

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461996

研究課題名(和文) 唾液メタボローム解析による乳癌診断法の確立

研究課題名(英文) Identification of breast cancer-specific signatures in saliva metabolites using capillary electrophoresis mass spectrometry

研究代表者

神野 浩光 (Jinno, Hiromitsu)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20216261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌患者を対象として、唾液のメタボローム解析を行うことにより新たな乳がん診断法を開発することを目的とした。

乳癌患者90例と健常者20例の唾液を採取し、CE-TOFMS(キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置)を用いて50-1,000 m/zのイオン性代謝物の網羅的な測定を行った。乳癌患者と健常者の間に有意差を認めた代謝物は62物質であった。乳がん患者における濃度が健常者の3倍以上の物質は34物質、10倍以上の物質は4物質であった。

低侵襲かつ低コストにて採取可能である唾液のメタボローム解析により新たな乳癌検診システムの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify breast cancer-specific signatures in saliva metabolites to facilitate the early diagnosis of breast cancer.

Comprehensive metabolite analysis of saliva was conducted using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. Saliva samples were obtained from 20 healthy controls and 90 breast cancer patients. Among 205 peaks identified from the salivary metabolites, 62 salivary biomarkers demonstrated significantly higher concentrations in breast cancer patients comparing with healthy individuals ($p < 0.05$). Known markers such as N1-acetylspermidine, spermine, putrescine and N8-acetylspermidine were included in these 62 markers.

These data suggested that quantitative information for salivary metabolites and their combinations could be promising biomarkers for the early diagnosis of breast cancer.

研究分野：乳癌外科, 外科腫瘍学

キーワード：唾液 メタボローム 乳癌 診断 CE-TOFMS

1. 研究開始当初の背景

乳癌は早期発見されれば治癒する確率が高く、また早期の段階では自覚症状を有さないことが多いため、治療成績向上のためには検診による早期発見が重要である。しかし我が国における検診受診率は 10-20%と低く、また受診者における乳癌発見率も 0.1%以下と低い。そこでより効率的に高リスク群を選別する必要がある。血液、尿及び唾液の様に低侵襲に収集可能である体液から有効な腫瘍マーカーが得られることが理想ではあるが、現在、臨床で用いられている乳癌の腫瘍マーカー (CA15-3、ST-439 や CEA) は再発の検出や、再発に対する化学療法の効果の評価の上では有用であるが、これらの腫瘍マーカーにより乳癌の早期診断をすることは困難である。そこで従来とは異なる新規開発技術を用いた、より簡便かつ安価な診断方法の確立が急務となっている。本研究では、革新的な「唾液メタボローム解析による癌診断法」の実用化を目指す。

慶應大学・先端生命科学研究所の曾我・杉本らは、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置) を用いて、アセトアミノフェンの過剰摂取によって引き起こされる急性肝炎のバイオマーカーの発見や、大腸癌や胃癌組織における網羅的な代謝プロファイルの測定を行ってきた。CE-TOFMS は、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路に代表される中心炭素代謝や核酸合成、アミノ酸の生合成・分解に関与する代謝物群など、エネルギー代謝に関連する主要な代謝物の大部分であるイオン性物質の測定を得意とする。

このため、これらの代謝異常が多く見られる癌の研究や代謝レベルでのバイオマーカー探索に最適な方法であることを実証してきた。

我々はすでに膵疾患の血液をサンプルとして CE-TOFMS を基盤としたメタボローム解析により膵癌に特徴的な代謝産物の特定を行った。測定された約 500 の代謝産物から健常者と比較して膵癌に特徴的な代謝産物の抽出が可能であった。さらに既存の腫瘍マーカーと組み合わせることにより、膵癌と慢性膵炎との鑑別が sensitivity, specificity とともに 100%とすることができた。

2. 研究の目的

乳癌の治療成績向上のためには乳癌検診が有効な高リスク群を選別する必要がある。メタボロミクスは、代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定して、環境や疾患などの要因により変化する代謝物から細胞の機能解析や、各疾患への診断応用などを研究する最も新しいオミックスである。ポストゲノムの時代となり、解析されたゲノム情報をどのように医療へ応用していくかに焦点が当てられ

ている。DNA、mRNA、タンパク質、代謝物質 (メタボローム) の情報を統合していくことがポストゲノム研究の大きな流れとなり、ジェノミクス、プロテオミクスの下流、すなわち最も表現型に影響を及ぼす代謝産物を対象とするのがメタボロミクスである。本分野で使用される主な測定機器としては、NMR(核磁気共鳴)や MS(質量分析装置)が用いられる。しかし、NMR は感度が低く、一度に測定できる物質も少数に限られているため、網羅的な測定を行うためには MS を用いられる方が一般的である。さらに申請者らは独自に開発した CE-TOFMS を用いるが、極めて低容量 (10 μ L) の検体で、また唾液と血液中の極めて低濃度の代謝産物を高い解像度で安定して網羅的に一斉に検出・定量する方法である。

そこで、本研究では、唾液、血液などの低侵襲に収集できる体液にメタボローム解析を用いることで乳癌のスクリーニング用マーカー (低侵襲マーカー) を探すことと、癌組織の代謝物から臨床現場の意思決定に利用可能な癌の特徴を決定付ける代謝マーカー (特徴マーカー) の探索を同時に行う。癌組織における代謝プロファイルを用いることによって、低侵襲マーカーの候補の絞り込みや、疾患以外の環境要因から生じる偶然の異常を除去することも可能となり、マーカーの信頼性を高める効果も期待される。また、特徴マーカーを臨床情報と合わせて解析することにより、定量的かつ客観的な指標で癌を特徴化することができれば、術後補助療法の個別化や、予後予測などへの活用も期待できる。このように乳癌検診を受けるべきハイリスク患者のスクリーニング用マーカー探索と合わせて、医療の標準化で陥りやすい過剰医療の提供を防ぎ、個別医療化に向けたマーカーを同時に探す研究例は、学術的な成果だけでなく、医療経済的なインパクトが高い。

このメタボロミクスを乳癌診断に応用し、「唾液による乳癌の新しい診断法」を確立することが本研究の目的である。申請者らは、唾液が体内の様々な情報を反映している体液として、口腔内のみならず全身性疾患の診断応用への活用の可能性を模索してきた。その結果、唾液中に含まれる代謝物のパターンから口腔癌、乳癌、膵癌を高度に検出する方法を確立し、予備的研究の段階では特に乳癌患者を高い精度で健常者と鑑別することが可能であった。唾液は低侵襲、低コストに採取可能であり、本診断法の確立により新たな癌検診システムの提案が可能となる。本研究では、以下の 3 点を到達目標としている。

(1) 唾液を用い、乳癌を検出することができる低侵襲マーカーを同定し、新たな癌スクリーニングシステムを確立する。

(2) 上記の低侵襲マーカーの原因となる代謝異常について癌組織を用い解明する。

(3) 癌組織代謝プロファイルから、乳癌を客観的に評価する唾液中の特徴マーカーを見出す。

唾液を用いた乳癌診断の取り組みは、国内・国外でもほとんど行われていないのが現状である。さらに、本研究で用いられる解析技術、CE-TOFMS は申請者が所有している特許技術であり、ほぼ独占的に研究を進めることが可能である。

3. 研究の方法

唾液メタボローム解析を行うための唾液採取条件を決定したうえで、乳癌患者から唾液と血液を採取する。唾液と血液との代謝プロファイルと比較検討するとともに、癌患者と健常者および良性乳腺疾患患者における唾液の代謝プロファイルの相違点を解析する。患者から得られた臨床情報と代謝プロファイルとの関連性を解析し、病期による特徴的な代謝物質マーカーを同定する。さらに、手術症例から得られた組織標本を用い、組織における代謝プロファイルを唾液と比較する。癌組織のマイクロアレイ解析を行い、代謝プロファイルの変化を誘導する遺伝子との関連性を解析し、中心的役割を果たす蛋白を同定する。培養乳癌細胞株を用いて、このタンパク質を標的とする治療法の有用性を siRNA 法により検討し、新たな分子標的治療薬の開発へと発展させる。

(1) 唾液・血液・組織の採取

対象患者の午前中の唾液、血液を採取する。採取後、遠心器にて分離し、 -80°C で凍結する。生検組織や切除組織が得られる場合も同様に -80°C で凍結しておく。凍結材料は冷凍宅配便にて研究所へ送付し解析する。100 例目の乳癌症例の解析終了後にその結果と各症例のデータを解析する。

(2) 乳癌切除標本を用いた検討

① 組織検体の収集

乳癌手術の際、標本を摘出後直ちに凍結保存する。

② 癌細胞の採取

レーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにより腫瘍組織から癌細胞のみ採取する。

③ DNA chip を用いた mRNA の発現解析

cDNA ライブラリーを作成すると同時に蛍光色素 (Cy3) にて標識する。これを 40,000 個のオリゴがスポットされた cDNA マイクロアレイ上に載せて 47°C で 16 時間ハイブリダイゼーションする。遺伝子発現の差は蛍光強度として Scanner を用いて計測し、数値化する。

④ 数値データの解析による遺伝子群の抽出
マイクロアレイ解析で得られたデータを分析し、癌組織において特徴的に発現上昇または低下している遺伝子群を抽出する。

(3) 唾液および血液のメタボローム解析から両者の代謝産物の違いを比較検討する。

さらに健常者および乳腺良性疾患の患者から得られたメタボローム解析データとの違いを分析し、乳癌に特徴的な代謝産物を同定する。

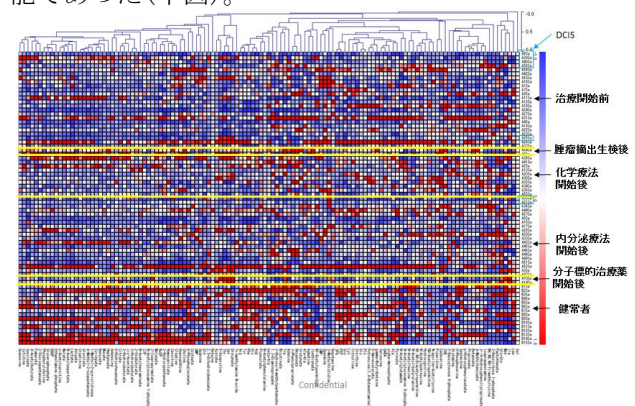
(4) 唾液・血液から得られた特徴的な代謝産物が癌組織においても同様に増加ないしは減少しているかを確認する

これら代謝産物の産生過程に注目し、酵素などの代謝産物もしくは減少させる役割を担う蛋白を同定する。

(5) 唾液メタボローム解析から得られた診断用マーカーの有用性を確認するために、検体情報をブラインドとしてメタボローム解析を行い、提案された診断システムの正診率を評価する。唾液のみならず血液も用いてマーカーの有用性を評価する。正診率が有意差を持って高率であれば、このメタボローム解析の代謝産物に関して特許を申請する。

4. 研究成果

当院を受診した乳癌患者 90 例の唾液を採取し、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置) を用いて $50-1,000\text{m/z}$ のイオン性代謝物の網羅的な測定を行った。540 物質の標準同定と定量を行った。対照として 20 名の健常女性から得られた唾液を用いた。統計解析には nonparametric Mann-Whitney U test 及び receiver operating characteristics (ROC) を用いた。浸潤性乳管癌 70 例、浸潤性小葉癌 2 例、非浸潤癌 14 例を含む乳癌症例の年齢中央値は 61 歳 (range: 26-81 歳)、平均腫瘍径は 2.3cm、臨床的リンパ節転移陰性症例が 71 例であった。ホルモン陽性症例を 77 例、HER2 陽性症例を 19 例に認めた。平均の Ki-67 値は 20.4% であった。術前化学療法後の症例を 21 例に認めた。Mann-Whitney test にて乳癌患者と健常者の間に有意差を認めた代謝物は 62 物質であったが、false discovery rate にて補正後は 50 物質となった。乳癌患者における濃度が健常者の 3 倍以上の物質は 34 物質、10 倍以上の物質は 4 物質であった。これら 4 物質の濃度は術前化学療法施行後では低下する傾向がみられた。4 物質における ROC (受動者動作特性) 曲線下の面積は 0.850、0.819、0.809、0.765 と高値であった。測定された約 500 の代謝産物から健常者と比較して乳癌に特徴的な代謝産物の抽出が可能であった (下図)。



健常者と乳癌患者の間でピークに有意差を認めたのは 62 物質であり、さらに乳癌患者において健常者の 10 倍以上濃度の高い spermine、3-methylhistidine、piperdine、trimethylamine n-oxide などを同定した。低侵襲かつ低コストにて採取可能である唾液のメタボローム解析により新たな乳癌検診システムの可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

① H. Jinno, T. Murata, S. Makoto, S. Masahiro. Identification of breast cancer-specific signatures in saliva metabolites using capillary electrophoresis mass spectrometry. 10th European Breast Cancer Conference, 2016. 03. Amsterdam, The Netherlands

② H. Jinno, T. Murata, M. Sunamura, M. Sugimoto. Investigation of potential salivary biomarkers for the diagnosis of breast cancer. 2015 Breast Cancer Symposium, 2015. 09. San Francisco,

③ H. Jinno, T. Murata, S. Makoto, S. Masahiro. Identification of breast cancer-specific signatures in saliva metabolites using capillary electrophoresis mass spectrometry. 2014 ESMO, 2014. 09. Madrid, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 浩光 (JINNO, Hiromitsu)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：20216261

(2) 研究分担者

砂村 眞琴 (SUNAMURA, Makoto)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：10201584

杉本 昌弘 (SUGIMOTO, Masahiro)
慶應義塾大学・その他の研究科・特任准教授
研究者番号：30458963