

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560058

研究課題名(和文) ヒト爪を用いた癌の早期診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of the early diagnosis technology of cancer using the human nail

研究代表者

関 俊哲 (Min, Junzhe)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：10453060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん診断を目的として、非侵襲的なヒト爪中のポリアミン9種類の一斉分析法、ジアセチルポリアミンの高感度定量法及び2-Hydroxy butyrate (HB)、Asp、Cysの光学異性体一斉分析法を確立した。健常人と肺癌患者の爪中定量値を比較した結果、SPMでは肺癌患者の方が健常人より有意 ($p < 0.05$) に高かった。また、大腸癌患者の爪からはHB、Asp、Cysを初めて検出することができ、HB、Aspにおいて、大腸癌患者は健常人より高い定量値が示され、大腸癌患者に増加傾向が示された。以上の結果より、非侵襲的なヒト爪分析はがんの病状診断の一手段となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed methods simultaneous high sensitive determination of 9 kinds of polyamines, 2-Hydroxy butyrate (HB), Aspartic acid (Asp), Cystamine (Cys) and quantitative analysis of diacetylpolyamines in the lung cancer patient fingernail. The proposed method was used to analyze human fingernail samples from lung cancer patients and healthy volunteers. When comparing the index from the lung cancer patients with that of the healthy volunteers, the SPM, DiAct-Spd level was higher in the lung cancer patients. There was no significant difference in the content of seven polyamines, that is, CAD, DAP, PUT, SPD, N1-actPUT, N8-actSPD and N1-actSPM, in the fingernail. However, a statistically significant ($p < 0.05$) correlation was observed between the SPM concentrations. Therefore, our findings suggest that measuring polyamines in human fingernails may be a simple, noninvasive technique to assist in the diagnosis and assessment of disease activity in patients with cancer.

研究分野：生体機能分子分析学

キーワード：ヒト爪 がん ポリアミン 早期診断 非侵襲

1. 研究開始当初の背景

病態が潜在的に進行するがんでは、発症前での早期発見が疾病の進行抑制や治療において重要な鍵となる。ポリアミンは生体内の腫瘍マーカーや治療モニタリングの指標として注目されている。中でも近年、尿中ジアセチルスペルミン測定による早期癌診断の報告がなされたことから、ジアセチル体が汎用腫瘍マーカーとしての期待が高まっている。しかしながら、尿の採取は非侵襲的な一方で、取扱いの煩雑さ、衛生面などの問題点がある。そこで、我々は固体試料であるヒト爪に着目した。ヒト爪は採取の場所、採取者の制限もなく、持ち運びが容易で長期保管も可能である。さらに、過去の長期間の体内情報が蓄積されるため、慢性疾患の新たな非侵襲的な生体試料として期待される。爪は主に法医学的乱用薬物犯罪の取締、または過去の元素曝露量等の調査に応用されてきたが、興味あることに、ヒト爪を用い健康及び慢性疾患への早期診断へのアプローチの事例はほとんどなく、近年我々がヒト爪中 D,L-アミノ酸、糖化反応中間体を報告した論文が初めてであり、ヒト爪は生活習慣病の非侵襲的な臨床検査生体試料としての新たな可能性が示唆された。そこで、我々はヒト爪中ポリアミン及びジアセチルポリアミンの高感度分析法を開発し、がんの早期診断への有用性の検証を行うことにした。

2. 研究の目的

がんの治療において、早期診断が鍵であることは言うまでもない。最近、ヒト爪が体内の長期間健康状態を反映可能なことや糖尿病などの慢性疾患早期診断の新規生体試料としての可能性が示唆された。本研究課題では、ヒト爪中ポリアミン、ジアセチルポリア

ミン等の低分子代謝物を標的とし、肺がんの新しい早期診断法を開発し、臨床診断へ新展開するため、ヒト爪中ポリアミン及びジアセチルポリアミンの分析及び腫瘍マーカーとしての有用性の検証を行い、ヒト爪を用いたがんの非侵襲的早期予防・診断法の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

ヒト爪を用いたがん疾患の早期診断技術を開発するには、健康人爪に存在する低分子代謝物を正確に定量することが最も重要である。しかし、爪に含まれている低分子化合物は極微量に存在するため、従来の分析法では分離検出が困難である。そこで本研究では、新たにヒト爪中ポリアミン及びジアセチルポリアミンの高感度一斉分析法を開発し、肺がん早期診断への有用性の検証し、肺がん疾患の早期予防・診断法を開発する。

4. 研究成果

(1) ヒト爪中ジアセチルポリアミンの高感度分析及び肺がん早期診断への有用性の検証

ヒト爪中のジアセチルポリアミン N^1, N^8 -diacetylspermidine (DiAct-Spd), N^1, N^{12} -diacetylspermine (DiAct-Spm) をターゲットとし、内部標準物質として 1,6-diaminohexane (DAH) を用い、4-(N,N -dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) と反応させ、UPLC-ESI-MS/MS による迅速且つ高感度な一斉分析法の開発を行った(Fig. 1)。その結果、DBD-F で標識されたジアセチルポリアミンは 3 min 以内に良好に分離検出することができ、その検出限界は 25~50 fg 以下となった(Fig. 2)。日内変動, 日間変動の CV 値はそれぞれ 7.06%, 6.19% 以下を示し、実際にヒト爪

を用いた添加回収率は 68.53-115.8% となった。健常者 40 名、肺癌患者 15 名のヒト爪試料に本法を適用したところ、健常者と肺癌患者の爪から初めて DiAct-Spd、DiAct-Spm を検出することができた。さらに、健常者と肺癌患者の爪を用い定量値を比較した結果、健常者の男女間では両者とも差が見られなかったものの若年男性において、DiAct-Spm の含量が女性に比べて多い傾向が見られた。また、肺癌患者と健常者においては、40-80 代の平均値で比較した際、癌患者において、DiAct-Spd の増加傾向が示された。さらに、DiAct-Spm において、女性では癌患者での減少傾向が示された一方で、男性では、癌患者での増加傾向が示された。

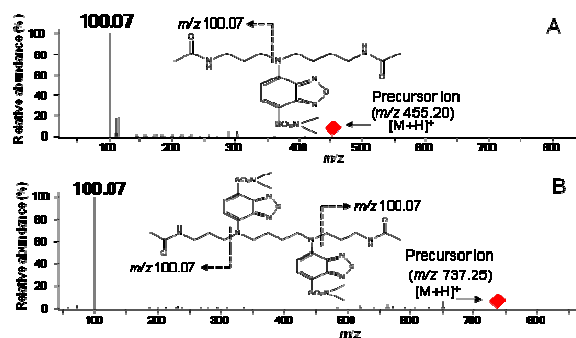


Fig. 1. MS/MS spectrum of ion produced from the derivatization reaction of diacetylpolymines with DBD-F by UPLC-ESI-MS/MS. A: DiAct-Spd; B: DiAct-Spm

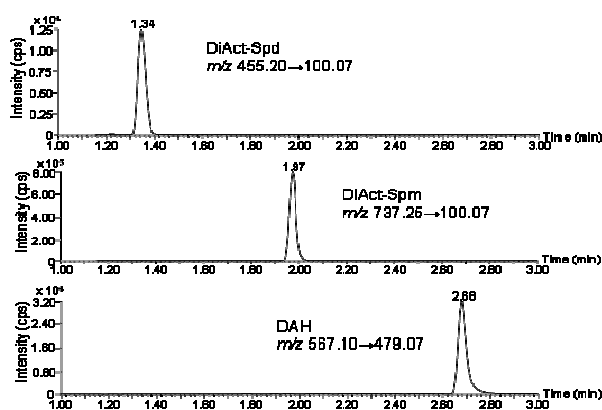


Fig. 2. MRM chromatograms obtained from the

DBD-labeled diacetylpolymines and IS (DAH) in the positive ionization mode.

(2) 肺がん早期診断を指向したヒト爪中 9 種類ポリアミンの一斉高感度分析法の開発

肺がん早期診断を指向として、ヒト爪中の ornithine (ORN)、1,3-diaminopropane (DAP)、putrescine (PUT)、cadaverine (CAD)、spermidine (SPD)、spermine (SPM)、N1-acetylputrescine (N1-actPUT)、N8-acetylspermidine (N8-actSPD)、N1-acetylspermine (N1-actSPM) の 9 種類をターゲットとし、HPLC-MS/MS 一斉高感度分析法の開発を行った。9 種類のポリアミンは 20 分以内に良好に分離検出することができ、その検出限界は 5~100 fmol 以下となった。日内変動、日間変動の CV 値はそれぞれ 5.40%、9.84% 以下を示し、実際ヒト爪を用いた添加回収実験の回収率は 89.14-113.0% となった。健常人 38 名、癌患者 14 名のヒト爪試料に本法を適用したところ、健常人と癌患者の爪から DAP、CAD、N¹-actPUT、N⁸-actSPD、N¹-actSPM をはじめとする今回標的とした 9 種類のポリアミン全てを検出することができた。さらに、健常人と癌患者の爪を用い定量値を求め、比較検討を行った結果、健常人の男女間では DAP、SPM、CAD、SPD、N⁸-actSPD、N¹-actSPM のポリアミンに含量の差は無く、PUT、N¹-actPUT の 2 つのポリアミンでは男性の方の含量が高く、有意差 ($p < 0.01$) があった(Fig. 3)。また、肺癌患者と健常人の爪中ポリアミンを比較した結果、DAP、CAD、SPD 等の 7 種類のポリアミンの含量はほぼ同等に検出されたが、SPM では肺癌患者の方が健常人より含量が高く有意差 ($p < 0.05$) が認められた(Fig. 4)。さらに、年齢に関係なく、SPM の定量値は肺癌患者で男女ともに高い値が示された(Fig. 5)。

以上の結果より、ヒト爪中のポリアミンの

測定は肺癌の早期診断への可能性が示唆され、今後、非侵襲的な診断の選択肢の一つとして期待される。

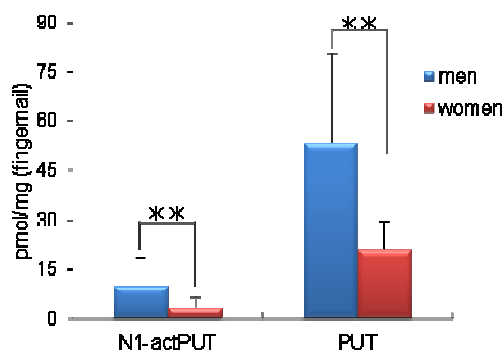


Fig. 3. Statistical analysis of the polyamines of men (n=19) and women (n=20) in the nails of the healthy volunteers. (** $p < 0.01$).

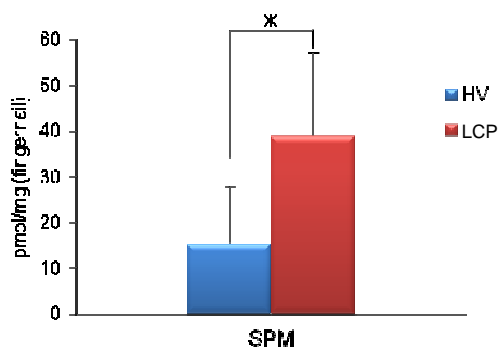


Fig. 4. Statistical analysis of the SPM in the healthy volunteers (n=39) and the lung cancer patients (n=17). HV, healthy volunteers; LCP, lung cancer patients; (* $p < 0.05$).

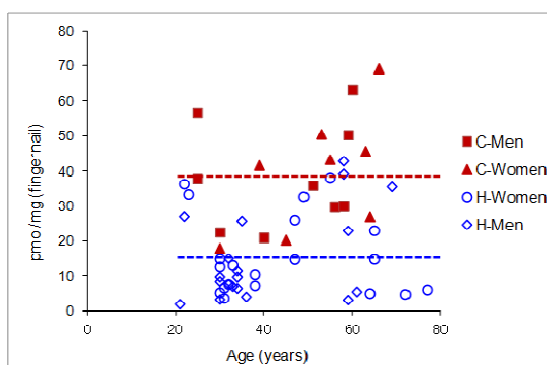


Fig. 5. Relation between nail SPM amounts and age in healthy volunteers (n=39) and cancer patients (n=17). H-Men, healthy men; H-Women, healthy women; C-Men, Cancer men; C-Women, cancer women.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Jun Zhe Min, Akihito Matsumoto, Gao Li, Ying-Zi Jiang, Hai-fu Yu, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Toshimasa Toyo'oka: A quantitative analysis of the polyamine in lung cancer patient fingernails by LC-ESI-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, (査読有) 2014, 28, 492-499.
DOI: 10.1002/bmc.3059
- ② Jun Zhe Min, Yuka Morota, Ying-Zi Jiang, Gao Li, Dongzhou Kang, Hai-fu Yu, Koichi Inoue, Kenichiro Todoroki and Toshimasa Toyo'oka: Rapid and sensitive determination of diacetylpolyamines in human fingernail by ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, (査読有) 2014, 20, 477-486.
DOI: 10.1255/ejms.1301
- ③ Jun Zhe Min: Development of a highly sensitive separation method for the analysis of metabolites in human nails and applications in the diagnosis of chronic disease. *YAKUGAKU ZASSHI*, (査読有) 2014, 134, 1191-1198.
- ④ Jun Zhe Min: Development of the high sensitive separation analysis method of metabolites in human nail and its application to the diagnosis of chronic disease.

2014, 35, 23-29. *Chromatography*, (査読有)

- ⑤ 関俊哲、豊岡利正：ヒト爪を用いた糖尿病リスク診断。検査と技術, (査読有) 2013, 41, 432-434.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 関俊哲、諸田有佳、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：癌の早期診断を指向したヒト爪中ジアセチルポリアミンの高感度分析、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (東京)、要旨集、pp.170-171、2013 年 8 月 2 日
- ② 関俊哲：ヒト爪中低分子代謝物の高感度分析法の開発及び慢性疾患診断への応用、第 59 回 日本薬学会東海支部総会・大会 (名古屋)、要旨集、p.16、2013 年 7 月 6 日
- ③ 関俊哲、富安優樹、諸富貴史、山本誠、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：ヒト毛髪中 N-acetyl-leucine の分析、日本薬学会第 133 年会 (横浜)、要旨集 2、p.299、2013 年 3 月 28 日
- ④ 永井啓裕、関俊哲、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：荷電構造を有する糖鎖高感度誘導体化試薬の開発、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (東京)、要旨集、pp.168-169、2013 年 8 月 2 日
- ⑤ 永井啓裕、関俊哲、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：N-結合型糖鎖高感度分析を指向とした荷電構造を有する誘導体化試薬の開発、第 11 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 2013 (静岡)、要旨集、p.12、2013 年 8 月 29 日
- ⑥ 関俊哲、諸田有佳、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：肺癌患者爪中ジアセチルポリアミンの高感度分析法の開発、第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 (神戸)、要旨集、p.65、2013 年 9 月 26 日
- ⑦ 関俊哲：生体微量成分の高感度分離分析法の開発と慢性疾患診断への展開、第 24 回クロマトグラフィー科学会議 (東京)、要旨集、pp.5-6、2013 年 11 月 12 日
- ⑧ 永井啓裕、関俊哲、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：N-結合型糖鎖高感度分

析を指向とした荷電構造を有する LC-ESI-MS/MS 用誘導体化試薬の開発、第 24 回クロマトグラフィー科学会議 (東京)、要旨集、pp.75-76、2013 年 11 月 12 日

- ⑨ 関俊哲、諸富貴史、富安優樹、轟木堅一郎、井之上浩一、豊岡利正：糖尿病患者毛髪中アセチルアミノ酸の定量分析、新アミノ酸分析研究会 第 3 回学術講演会 (東京)、要旨集、p.40、2013 年 12 月 2 日
- ⑩ 西尾優汰、関俊哲、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：大腸癌診断におけるヒト爪試料の有用性の検討、新アミノ酸分析研究会第 4 回学術講演会 (東京)、要旨集、p34、2014 年 11 月 17 日
- ⑪ Jun Zhe Min, Morota Yuka, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Toshimasa Toyo'oka : Sensitive analysis of diacetylpolyamines in human fingernail for early diagnosis of lung cancer. 5th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference (Beijing, China), July 16-18, 2014
- ⑫ 橋本立吾、関俊哲、池田潔、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：糖鎖転移酵素 Endo-M-N175Q を用いた糖鎖高感度定量法の開発、第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (東京)、要旨集、p.188-189、2014 年 8 月 20-21 日
- ⑬ Jun Zhe Min, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Toshimasa Toyo'oka : Sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in human fingernail for the diagnosis of diabetes. The 12th Changwon International Symposium on Advanced Science and Technology (Changwon, Korea), pp43-44, October 29-30, 2014
- ⑭ 内部あおい、関俊哲、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：ヒト爪中ヒスタミン及びその代謝物の高感度分析法の開発、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2014、静岡要旨集、p68、2014 年 11 月 9 日
- ⑮ 内部あおい、関俊哲、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：LC-MS/MS によるヒト爪中ヒスタミン及びその代謝物の同時定量、新アミノ酸分析研究会第 4 回学術講演会 (東京)、要旨集、p24、2014 年 11 月 17 日
- ⑯ Jun Zhe Min, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Toshimasa Toyo'oka : Development of oligosacchride highly sensitive analysis method by enzyme and chemical labeling.

The 2nd BK21Plus Workshop (2014) on Nano-biomaterials and Advanced Analytical Techniques (Changwon, Korea), p23-27, November 28, 2014

- ⑰ 永井啓裕、関俊哲、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：N-結合型糖鎖の分離分析を指向した MS/MS 用誘導体化試薬の開発
第 25 回クロマトグラフィー科学会議(京都)、要旨集、p38、2014 年 12 月 12 日
- ⑱ 永井啓裕、関俊哲、井之上浩一、轟木堅一郎、豊岡利正：荷電構造を有する LC-ESI-MS/MS 用 N-結合型糖鎖誘導体化試薬の開発、第 12 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 2014 (箱根)、講演番号 B-18、2014 年 7 月 15 日

[その他]

- ① 新聞記事：「糖尿病爪の成分で診断」
静岡新聞 朝刊 2014 年 5 月 31 日(土曜日)
p.21.
- ② JST 科学技術振興機構 A-STEP FS ステージ 技術移転紹介集 「ヒト爪を利用した糖尿病の非侵襲的な予防と診断技術の開発」 2013 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関俊哲 (MIN JUNZHE)

研究者番号：10453060