

令和 4 年 4 月 7 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462074

研究課題名(和文)エクソソーム由来microRNA分離と唾液による癌診断および抗癌剤感受性予測

研究課題名(英文)Preparation of microRNA from saliva and detection of cancer and prediction of drug sensitivity using saliva

研究代表者

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

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)：LC-MSを用いて測定されたポリアミンやアセチル化したポリアミンなどの代謝物質などを人工頭脳で解析し、癌のリスクを予測するスクリーニング検査はすでに実用化されている。この研究では癌で特異的に上昇している代謝物質を標的としたイムノクロマトアッセイが確立できた。今回開発したイムノクロマトキットは、LC-MSの測定値と相関性を示し、十分臨床使用に耐えられる製品と考えている。臨床試験などを繰り返し、感度と特異度とのバランスを考えたカットオフ値を設定すれば、0次スクリーニング検査として活用することも可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリアミンやアセチル化した代謝物質などを人工頭脳で解析し、癌のリスクを予測するスクリーニング検査はすでに実用化されている。特に重要と考えられる代謝物を標的としたイムノクロマトアッセイが確立できた。今回開発したイムノクロマトキットは、LC-MSの測定値と相関性を示した。臨床試験などを繰り返し、感度と特異度とのバランスを考えたカットオフ値を設定すれば、0次スクリーニング検査として活用することも可能になると期待される。

低価格で簡便な癌に対するマススクリーニング検査の提供は、疾患の早期診断と早期介入を可能にし、低侵襲治療により早期の社会復帰を目指す未来型医療にイノベーションを起こすと期待される。

研究成果の概要(英文)：The screening test that use artificial brains to analyze metabolites such as polyamines and acetylated polyamines measured using LC-MS to predict cancer risk are already in practical use. In this study, an immunochromatographic assay targeting metabolites specifically elevated in cancer was established. The immunochromatography kit we have developed correlates well with LC-MS measurements, and we believe it is sufficiently robust for clinical use. If a cutoff value that balances sensitivity and specificity is established through repeated clinical trials, it is expected to be possible to use the kit as a zero-level screening test.

研究分野：腫瘍学

キーワード：メタボローム解析 人工頭脳 膵癌 胃癌 大腸癌 イムノクロマト

1. 研究開始当初の背景

難治癌の治療成績を改善する一つの方法は、より簡便で低侵襲な癌スクリーニング検査法を確立し、切除可能なステージで癌患者を拾い上げることである。研究代表者らは「唾液を用いた癌診断」の可能性に着目し、既に「膵癌患者 100 症例の唾液メタボローム解析」により、唾液代謝産物による膵癌診断が可能であることを報告した。この研究過程において唾液中にはエクソソームが存在し、癌由来のエクソソームには癌特異的な microRNA が存在することが示唆された。また研究代表者らは miR-34a の発現量がシスプラチン感受性を左右することを明らかとした。今回唾液メタボローム解析にエクソソーム由来の microRNA 解析を加え、唾液による癌診断の感度と特異度を更に改善し、同時に抗癌剤感受性に関しても情報を提供できる癌診療システムの構築を図りたい。

東京医科大学の杉本らは、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が実証されている。

2. 研究の目的

本研究では、唾液と尿を用いメタボローム解析により膵癌・大腸癌などに加え、胃癌・乳癌・肺癌などの診断マーカーを探索し、感度および特異度を改善するための代謝物質および腫瘍マーカーの組み合わせを検討する。これらによって、精度の高い「唾液による癌診断」の実用化が可能になる。同時に唾液、尿から癌細胞由来エクソソームを分離する技術を開発し癌特異的 microRNA の抽出を行う。癌特異的 microRNA 解析により早期の癌診断や個別化療法に役立つ抗癌剤感受性予測などが可能になると期待できる。メタボローム解析および microRNA 解析を臨床情報と合わせて検討することにより、定量的かつ客観的な指標で癌を特徴化することが可能となり、術後補助療法の個別化や予後予測などへの活用が期待できる。「唾液を用いた癌診断と個別化療法」が確立できればスクリーニング検査の受診者が増加し、過剰医療の防止や早期癌治療の増加が期待できる。同時に的確な化学療法の選択が可能となり医療経済的なインパクトも高い。

3. 研究の方法

1) メタボローム解析による検討

唾液および血液・尿などのメタボローム解析から健常者と癌患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、膵癌・大腸癌・胃癌に特徴的な代謝産物を同定する。

同時にこれまでは CE-TOFMS で代謝物の測定を行ってきたが、定性には優れるものの定量性に問題が認められている。さらに、コスト面や操作性から CE-TOFMS とは異なる測定法の開発が求められている。液体クロマトグラフィーを用いた LC-MS による測定法の開発にも取り組む。

2) 組織を用いたメタボローム解析

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を増加もしくは減少させる役割を担う蛋白を同定する。

3) イムノクロマトキットの開発

CE-TOFMS は熟練した技術者とデータ解析者が必要という面もあり、マススクリーニングには必ずしも向いていない。また測定にかかる費用も安価ではない。このため、これまで CE-TOFMS を用いて同定された代謝物質のポリアミンに対する抗体を作成し、イムノクロマトアッセイによる簡易測定キットを開発できればマススクリーニングとして広く社会に提供することが可能になる。メタボローム解析の結果から得られた代謝物の中から癌で特に増加する代謝物に着目し、ハイブリドームを樹立し代謝物に対する抗体を抽出する。得られた抗体からイムノクロマトキットを作成し、質量分析装置で得られた値との相関性を検証する。

4) オミックスの統合 DNA (ジェノミックス)、mRNA (トランスクリプトミックス)、タンパク質 (プロテオミックス)、代謝物質 (メタボロミックス) の情報を統合し、癌細胞における特徴的な代謝過程を解明し、中心的な役割を担う物質を解明する。これらの解析にはコンピューターを用いた情報科学技術が必要であるが、分担者の杉本は同分野におけるエキスパートである。

5) 癌特異的なエクソソームの分離癌細胞由来のエクソソームには癌細胞膜表面と共通の抗原が発現していると考えられる。また、内部には癌特徴的な microRNA 等が包含されており、癌早期診断マーカーのみならず、癌の薬剤感受性などが評価できるなど貴重な情報が含まれている。この抗原に対する抗体を付着させたファイバーを作成し吸着させ分離する技術を開発する。例えば、膵癌において高発現している膜抗原である CA19-9 や CEA 等を標的にすれば効率的に癌細胞由来のエクソソームの分離が可能となる。

6) エクソソームからの microRNA 分離

エクソソームの分離に関しては Johns Hopkins 大学が研究を進めており、胆汁中からの分離方法を参考にす。膵癌・胆道癌患者から採取した唾液・胆汁および膵液からエクソソームを分離し、microRNA を分離する。分離した microRNA の網羅的解析から、癌特異的な microRNA が存在するか検討する。さらに、癌細胞由来エクソソーム分離ファイバーを用いて分離したエクソソーム中に、癌特異的 microRNA が存在するかを検討する。

4. 研究成果

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、細胞の機能や疾患の病態などを研究する最も新しいオミックスである。我々はメタボロミクスを応用し膵癌・大腸癌・乳癌などの研究を進めている。血液や尿・唾液などの体液中の代謝物を網羅的に解析し、癌スクリーニング検査の可能性を検討した。代謝系を網羅的に検出するため、イオン性低分子(50m/z ~ 1,000m/z)を一斉定量できる CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置)を用いて癌診断の候補物質を探索した。その結果、唾液中のポリアミン類が癌のバイオマーカーとなることを発見した。

膵癌を対象とした研究では、膵癌 (PC: n=108, Stage1=5, Stage2=6, Stage3=25, Stage4=72) と健常者 (C: n=1398) の唾液中の代謝プロファイルと比較検討した (図 1)。

同定された代謝物から複数のポリアミン

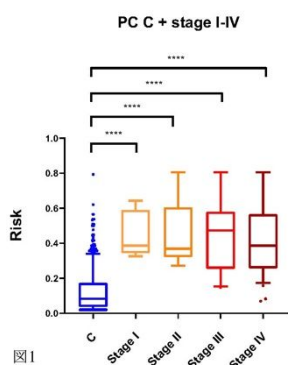


図1

類などをバイオマーカーとして人工知能による機械学習を行った。0 から 1 までの値で罹患リスクを数値化した。カットオフ値を 0.218 とすると感度 0.880、特異度 0.866 とな

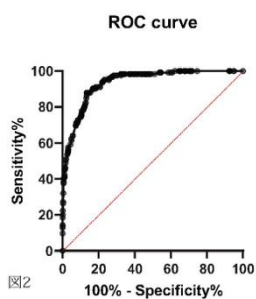


図2

また、ROC curve では AUC:0.938 とかなり良好な結果が得られた (図 2)。

CE-TOFMS による測定は網羅的な解析には有利であるが、特定の物質を標的にした測定では定量性に問題があることが指摘されている。今回の検討においてもアセチルスペルミンやアセチルス

ペルミジンなどの定量性に問題があることが判明した。このため LC-MS による測定と

検体の処理法を検討し、ポリアミンやアセチル化したポリアミン等が微量であっても測定可能なシステムが確立できた。

201 例の大腸癌症例と大腸ポリープ 14 例、健常者 17 例を対象として尿中のポリアミン類を測定し、大腸癌の診断が可能かを検討した。LC-MS による質量分析を行い、スペルミン や スペルミジンなどのポリアミン及びアセチル化したアセチルスペルミンやジアセチルスペルミンなど 7 種類の物質を測定した。

これらのポリアミン類において、ある単一物質が健常者と大腸癌患者で最も高い有意差を示した (AUC 0.79, $p < 0.0001$)。更に、測定されたポリアミン類を人工頭脳の機械学習で解析した。その結果、AUC 値は 0.961 ($p, 0.0001$) となり大腸癌症例を健常者及び大腸ポリープ症例から高感度に分離することが可能であった。また、Stage 0 においても罹患リスク危険値が上昇しており、早期診断での有用性が示されている。

メタボロミクスの解析データから多くの癌で上昇を認めた特定のポリアミン類に対する抗体の作成に取り組んだ。マウスを用いてハイブリドーマを樹立し、抗体の作製と精製に成功した。この成功によりプロジェクトの方向性をマススクリーニング検査の開発に大きく舵を切ることになった。

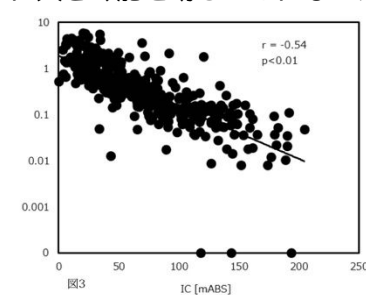


図3

まず、精製した抗体を用いたイムノクロマトキットの開発に取り組んだ。濃度依存的に測定値は変化し、測定

に用いることができることを確認した。続いてイムノクロマトキットによる測定値と LC-MS による測定値との比較検討を行った。図 3 (縦軸: LC-MS 値、横軸: イムノクロマトキット値) で示すように両者の測定値は相関性を示し、イムノクロマトキットの有用性が確認できた。

次に実際の唾液サンプルでイムノクロマトキットの有用性の評価を行うことにした。

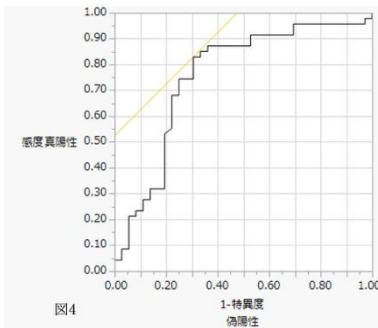
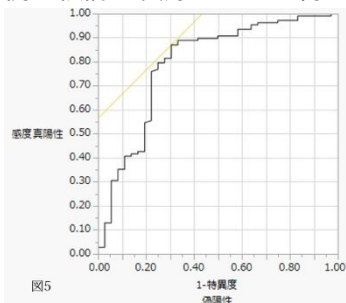


図4

検証に用いた検体は健常者 36 例、胃癌 47 例、膵癌 108 例、大腸癌 139 例である。全ての癌において癌症例の測定値と健常者の測定値には有意差が認められた。胃癌症例 (図 4) と膵癌症

例において

例(図5)のROC解析を示す。いずれの癌症例の検討で良好なAUCが得られている。



LC-MSは熟練した技術者と測定のためのデータ解析が必要という面もあり、簡便なマススクリーニングには適していない。また、測定にかかる費用も安価でないため気軽に受けられる検査とはなっていない。イムノクロマトキットは安価であり、手技も簡便なため一般の家庭や職場でも測定が可能になる。従来の質量分析装置の測定と人工知能を組み合わせた測定には精度において弱点はあるが、セルフヘルスケアの一手段として活用することが可能である。

今後の検討課題であるが、試薬ロット間のバラつきがどの程度か、安定製造できるかなどキットについて検討する。イムノクロマトキットの測定結果をLC-MSの測定結果と比較し、各癌における適正なカットオフ値を決定する。臨床試験を行いイムノクロマトキットとLC-MSとの間で各種癌の感度や特異度がどの程度異なるかを評価する。イムノクロマトリーダーを用いて測定をしているが、これをより簡便な測定方法に改良する。などが挙げられる。

本研究では、侵襲なく採取できる唾液を用い、唾液中の代謝物とmicroRNAを用いたより精度の高いリスク予測方法の開発に当初取り組んだ。社会情勢の影響もありエクソソームやmicroRNAの研究を推進することが困難であった。しかしながらエクソソームを回収するための抗体作製を行う過程で、癌で特異的に増加する代謝物に注目し、マウスを用いてハイブリドーマの樹立に成功した。抗体精製も順調に進み、得られた抗体の目的とする代謝物に対するアフィニティーは良好であった。このため研究の目標を当初予定した精度を求める内容から、簡便で安価なマススクリーニングに適した検査方法を開発することに变更した。

LC-MSを用いて測定されたポリアミンやアセチル化した代謝物質などを人工頭脳で解析し、癌のリスクを予測するスクリーニング検査はすでに実用化されている。この研究の中で特に重要と考えられる代謝物を標的としたイムノクロマトアッセイが確立できた。今回開発したイムノクロマトキットは、LC-MSの測定値と相関性を示し、十分臨床使用に耐えられる製品と考えている。臨床試験などを繰り返し、感度と特異度とのバランスを考えたカットオフ値を設定すれば、0次スクリーニング検査として活用することも可能になると期待される。

低価格で簡便な癌に対するマススクリー

ニング検査の提供は、疾患の早期診断と早期介入を可能にし、低侵襲治療により早期の社会復帰を目指す未来型医療にイノベーションを起こすと期待される。

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 3件)

〔学会発表〕(計 3件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1件)

名称：癌用唾液バイオマーカー、その測定方法、装置、及び、癌用唾液バイオマーカーの特定方法

発明者：砂村 眞琴、杉本 昌弘

権利者：株式会社サリパテック

種類：PCT出願

番号：100080458

取得年月日：平成28年4月28日

国内外の別：国内及び米国、EU、中国

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30458963

(3) 研究分担者

堀井 明 (Horii Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40249983

(4) 研究分担者

加藤 和則 (Katou Kazunori)
東洋大学・理工学部・教授
研究者番号： 60233780

(5)研究分担者

糸井 隆夫 (Itoi Takao)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号： 60338796

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

()