

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007－2008  
 課題番号：19590570  
 研究課題名（和文） 新規腫瘍マーカー尿中ジアセチルポリアミンの臨床的意義および生化学的基礎の解明  
 研究課題名（英文） Studies on the clinical significance and biochemical basis of diacetylspermine, a novel tumor marker in urine

研究代表者 川喜田 正夫  
 工学院大学 工学部 教授  
 研究者番号：00012740

## 研究成果の概要：

がん患者の尿中ではジアセチルスぺルミン排泄量が増加する。本研究では、ジアセチルスぺルミンが早期大腸がんに対して高い検出感度を示すほか、大腸がんの再発、転移、病勢の昂進を反映して上昇することを明らかにしたほか、肺がん、膵臓がんに対しても高い陽性率を示すことを見いだし。さらに、腫瘍マーカーとしての実用化に向けて、この物質と特異的に結合する抗体を利用した精密簡便測定法を開発し、尿中ジアセチルスぺルミン検査をがん診断に活用するための途を拓くことができた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生化学、臨床検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：尿検査、腫瘍マーカー、ポリアミン、ジアセチルスぺルミン、大腸がん、肺がん、膵臓がん

## 1. 研究開始当初の背景

ジアセチルスぺルミン (DiAcSpm) はポリアミンと総称されるアルキルアミンの1種である。ポリアミン類はがん組織をはじめ、増殖の活発な組織に多量に含まれ、アセチル体として尿中に排泄されることから、1970年代の初頭に腫瘍マーカーとなる可能性が指摘された。しかし、尿中主要ポリアミン成分である各種のモノアセチルポリアミンは偽陽性、偽陰性がともに多く、腫瘍マーカーと

しての実用性に乏しいことがその後の研究で明らかになった。しかしながら我々は、HPLC法による尿中ポリアミンの一斉分画分析法を開発して精密、詳細な分析を行うことによって、尿中に新規微量ポリアミン成分 DiAcSpm が存在することを発見するとともに、それが優れた汎用性腫瘍マーカーとなる可能性を明らかにした。我々はさらに、DiAcSpm を特異的に認識する抗体の作成に成功し、DiAcSpm の ELISA 測定系を開発

し、この物質が前立腺がん、精巣腫瘍、大腸がん、乳がん、脳腫瘍等の種々のがんに対して有効な汎用腫瘍マーカーであることを明らかにすることができた。

我々はその後、大腸がんを主要な対象として DiAcSpm の腫瘍マーカーとしての特性について研究を進め、尿中 DiAcSpm 排泄量が、早期の大腸がんの検出に関して既存のマーカー (CEA, CA19-9) より格段に高感度な検出指標であることを発見した。がんの治療法は近年長足の進歩を遂げている。特に、早期に発見された場合の治療率の向上はめざましく、stage 0 および stage I で発見された大腸がんの 5 年生存率は 100% に近い数字が得られている。DiAcSpm の早期がん検出特性を利用して DiAcSpm をがん検診に利用し、早期がん発見の精度を高めることによって治療率の向上に寄与することができれば、がんの治療率向上に大きく寄与することができる。これに加えて DiAcSpm はまた、手術後の経過観察におけるがんの病勢診断マーカーとしても大きな実用的価値をもつ可能性がある。すなわち、我々の予備的な結果によれば、DiAcSpm は再発の早期検知に関しても高い感度を示すだけでなく、経過観察中の高値化が患者の予後不良と、また、低値安定が寛解状態の継続ときわめて密接に関連していることが示唆されている。尿中ポリアミンに対して否定的な世界的潮流に逆らうかたちで進めてきたこれらの研究の成果はようやく近年になって認められるようになり、がん治療、臨床検査関連の学会のみならず、臨床検査試薬会社などからも新規腫瘍マーカーの候補として注目されるに至っている。

## 2. 研究の目的

腫瘍マーカーとしての DiAcSpm は、尿を用いる検査であることが大きな特徴の一つである。尿検査は被験者の苦痛を伴わないため、その実用化には大きな臨床的意義がある。本研究は、尿中 DiAcSpm の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を確立するとともにその簡便、精密な測定法を開発するとともに、腫瘍マーカーとしての生化学的基礎の解明をはかることにより、本検査項目を、実用的な新規腫瘍マーカーとして確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

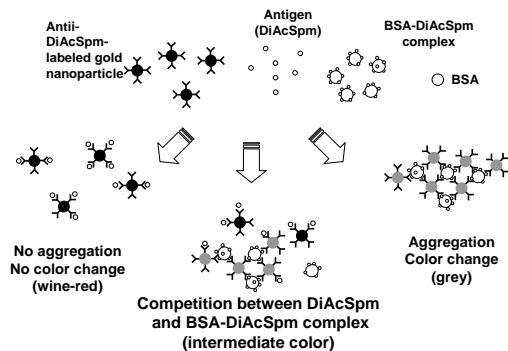
東京都立駒込病院大腸外科の外来患者および入院患者から、治療前から治療後の経過観察期間にかけて尿検体を継続的に採取し、DiAcSpm 値の測定を行った。駒込病院および長野県立須坂病院呼吸器外科で治療

を受けた非小細胞肺癌患者、および、駒込病院消化器内科で治療を受けた膵臓がん患者からも治療前の尿検体を採取し、尿中 DiAcSpm 値の測定を行った。DiAcSpm 値は、DiAcSpm 特異抗体を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) 法、または、本研究の成果の一つとして開発された金コロイド凝集法によって測定した。各種の血清腫瘍マーカー値の測定は駒込病院または須坂病院検査科で行った。DiAcSpm 値を実用可能な臨床検査項目として確立するためには一般の検査室で利用可能な測定手段を提供することが不可欠であるという見地から、DiAcSpm 特異抗体を用いた金コロイド凝集法の原理に基づく測定試薬を開発した。

## 4. 研究成果

### (1) 金コロイド凝集法による DiAcSpm 測定試薬の開発

DiAcSpm が早期大腸がんに対して高い検出感度を示すことが明らかになり、がん検



診も含めた検査項目としての実用化が期待されるようになるにつれて、従来の ELISA 法と比較してさらに迅速、高精度の測定系の開発が求められるようになった。このような高性能の測定系として、われわれは、金コロイド凝集法を用いた DiAcSpm 測定系の開発を試みた。

金コロイドの表面に抗 DiAcSpm 抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミン (BSA) に多数の DiAcSpm 分子を化学修飾によって結合させた BSA-DiAcSpm 複合体を加えると、金コロイド粒子が凝集し、色調が赤紫色から灰色に変化する。この反応液中に検体を添加すると、もし検体中に DiAcSpm があれば、それが抗体に結合し、BSA-DiAcSpm 複合体の結合を妨害するために、結果的に金コロイド粒子の凝集は妨げられ、色調の変化が抑制される。凝集抑制は検体中の DiAcSpm 濃度が高いほど強いので、この色調変化の大きさに基づいて、DiAcSpm 濃度を判定することができる (図 1)。

この測定法を利用することにより、臨床検査施設や病院の検査室等で実際に使用されている汎用生化学自動分析機に搭載可能な試薬をキット化することができた。この試薬を用いる実際の測定においては、検体と、競合体（BSA-DiAcSpm 複合体を含む）を混合し、抗体標識金コロイドを添加した時点で吸光度を測定する。さらに、凝集反応が進んだ5分後に再び吸光度を測定して、その差を求め、この数値を DiAcSpm 濃度に換算する。この一連の操作を完全自動化することにより、1検体を10分間で処理することができるようになった。この試薬による測定の同時再現性（C.V.=1.1-2.5%）、日差再現性（C.V.=1.1-5.3%）、添加回収試験の成績（回収率 94-115%）はいずれも満足すべき性能を示す数値であり、また DiAcSpm の検出感度 5.4nM は、入院加療中に点滴の処置を受けている患者の希薄尿中の DiAcSpm 測定にも十分に対応できる水準のものである。この測定法が開発された結果、従来よりもさらに大量の検体を迅速に処理し、正確な測定値を短時間で得ることが可能になった。

## (2) 健常者の尿中ジアセチルスペルミンレベルの検討

腫瘍マーカーとして診断の有効な指標とするためには、健常者の尿中排泄量について詳しく検討し、異常を判別するためのカットオフ値を正しく設定する必要がある。このような観点から、金コロイド凝集法による測定試薬の完成を機に、東京都の職員健康診断受診者の同意・協力を得て、健常者（男性 954 名、女性 232 名）の尿検体の提供を受け、尿中ジアセチルスペルミンレベルを測定した。その結果、カットオフ値を健常者平均値 + 2S.D. に設定する場合、男性については  $0.107+0.087=0.194$  ( $\mu\text{mol/g}$  クレアチニン)、女性については  $0.138+0.098=0.236$  ( $\mu\text{mol/g}$  クレアチニン) の値が得られ、健常者のジアセチルスペルミン値には男女の間に有意の差があることが明らかになった。このことは、今後の実用化の過程で留意すべきポイントの一つとして重要な意味をもつと考えられる。

## (3) 大腸がん患者の経過観察過程における尿中 DiAcSpm の変動と病勢の関連

都立駒込病院大腸外科で治療し経過観察を継続している大腸がん患者から、患者の同意を得て経時的に尿検体を採取し、新たに開発した金コロイド凝集法および従来の酵素免疫測定法（ELISA 法）を併用して尿中ジアセチルスペルミン値を測定した。患者の DiAcSpm 値が治療によってどう動くのかを考えるために、患者を治療前の DiAcSpm 値

にしたがって、カットオフ値未満の grade 1 から、カットオフ値の 2 倍までの grade 2、3 倍までの grade 3、それ以上の grade 4 の 4 群に分類した。さらに、手術後 6 ヶ月の時点における DiAcSpm 値によって患者をもう一度同様にグループ分けし、手術前の測定値の分布と比較した。手術後 6 ヶ月の時点では、カットオフ値の 2 倍、3 倍を超える grade 3,4 グループの割合が手術前より大きく減少し、カットオフ値未満の grade 1 グループが大きく増えていることがわかった。これは、治療有効例でこの間に DiAcSpm 値が下がったことを反映するものであらうと考え、この時点での各グループの患者について、手術後 6 ヶ月以降の生存曲線を作って比較したところ、カットオフ値の 3 倍を超える grade 4 グループの患者の予後は著しく不良であり、一方、全体の約 2/3 を占める grade 1 患者の予後は全体として非常に良好であった。このことは手術後 6 ヶ月の DiAcSpm 値が、治療効果の指標および術後のフォローアップにおける病勢の指標として有用であることを示している。

尿中 DiAcSpm 値と血清 CEA 値および患者の臨床経過とを照合比較しつつ検討を行った結果、多くの症例では再発および病勢の昂進に伴ってジアセチルスペルミンと CEA がともに増加したが、両者が乖離する症例においては、ジアセチルスペルミンが患者の病勢をよりよく反映した動きを示す傾向があることが示唆された。

これらの症例についての観察は以下のように要約することができる。① 治療前の DiAcSpm レベルがカットオフ値の 3 倍を超えている場合は、カットオフ値未満の場合と比較して予後不良の危険が大きい。但し、治療後半年以内に正常化すれば、治療奏効と考えることができ、良好な予後が期待できる。② 治療前レベルがカットオフ値の 3 倍以内であれば、多くの場合、予後は良好と期待してよい。③ 一方、治療によって寛解状態に導かれた患者の場合には、担がん状態であっても、DiAcSpm が正常域にあればがんは活動度が低いと考えてよい。しかし、上昇傾向を見せたときは、再発、転移の可能性が高く、精査の必要があると考えられる。

このような特性を持つ DiAcSpm は、治療効果の指標、術後のフォローアップにおける病勢の指標として、きわめて利用価値の高い腫瘍マーカーとなるのではないかと考えられる。

## (4) 大腸がん以外のがんにおける尿中 DiAcSpm の陽性率

都立駒込病院および長野県立須坂病院の呼吸器外科において治療を受けた非小細胞肺癌（NSCLC）患者 273 例について尿

中ジアセチルスペルミン値を測定した。患者の2/3はI期の肺がんであった。ジアセチルスペルミンの陽性率は腺がんに対してはCEAと同等であったがCYFRAより高く、一方、扁平上皮がんに対してはCYFRAと同等であったがCEAより有意に高かった。このことはDiAcSpmが多くの肺がんに応用できるマーカーであることを示している。肺がん領域への適用に関連して、尿中DiAcSpm値が喫煙習慣の影響を受けるかどうかについても検討したところ、喫煙は健常者の尿中DiAcSpmレベルには全く影響しないことが明らかになった。

都立駒込病院において治療を受けた膵臓がんの患者についても予備的な検討を開始した。その結果、この領域で現在最も多用されている既存のマーカー、CA19-9が0-III期の膵臓がんにはほとんど検出能力を示さないのに対して、尿中DiAcSpmは高い検出感度を示すことが明らかになった。膵臓がんは一般にきわめて予後の悪いがんであり、しかも早期発見が困難ながんであるが、III期までに発見されれば外科的な切除が可能であり、3年生存率、5年生存率ともIV期で発見されたがんよりも有意に高いことが知られている。膵臓がんに関してはなお例数を重ねて詳細に検討する必要があるが、これらの結果は、尿中DiAcSpmが汎用腫瘍マーカーとして、各種のがんの診断指標として優れた臨床的有用性をもつことを示す結果であると考えられる。

## 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 5 件)

川喜田正夫(1 番目)、平松恭子 (5 番目) ほか 3 名、スポット尿による尿中ジアセチルスペルミン量の測定の妥当性の検討、日本分子腫瘍マーカー研究会誌、査読なし、23, 42-43(2008)

柳谷真理、平松恭子 (5 番目)、高橋慶一 (6 番目)、川喜田正夫 (7 番目) ほか 3 名、金コロイド凝集法を測定原理とする尿中ジアセチルスペルミン試薬の開発、日本分子腫瘍マーカー研究会誌、査読なし、23, 44-45(2008)

川喜田正夫 (1 番目)、平松恭子 (2 番目)、高橋慶一 (3 番目) ほか 4 名、尿中腫瘍マーカーN1, N12-ジアセチルスペルミンの特性とその測定、日本臨床検査自動化学会誌、招待記事、33, 141-144(2008)

川喜田正夫、平松恭子、大腸がん腫瘍マーカーとしての N1, N12-ジアセチルスペルミン、

検査と技術、招待記事、36, 457-459(2008)

江川直人、平松恭子 (2 番目)、高橋慶一 (8 番目)、川喜田正夫 (12 番目) ほか 8 名、日本分子腫瘍マーカー研究会誌、査読なし、33-34(2009)

[学会発表] (計 21 件)

Sakaguchi I, K.,: N1, N12-Diacetylspermine (DiAcSpm) as a Tumor Marker for Non-Small Cell Lung Cancers. 12th World Conference on Lung Cancer 2007.9.2.~9.6. Korea

Takahashi, K., Urine di-acetyl spermine (DiAcSpm) as a new prognostic marker for colorectal cancer. 第 11 回アジア大腸肛門病学会 2007. 9. 20-22, 大阪.

川喜田正夫, 尿中腫瘍マーカーN1, N12-ジアセチルスペルミンの特性とその測定. 日本臨床検査自動化学会第 39 回大会 2007. 9. 26~28, 横浜.

柳谷真理, 金コロイド凝集法を測定原理とする尿中ジアセチルスペルミン試薬の開発. 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会 2007. 10. 2, 東京.

川喜田正夫, スポット尿による尿中ジアセチルスペルミン量の測定の妥当性の検討. 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会 2007. 10. 2, 東京.

高橋慶一, 大腸癌術後患者に対する尿中ジアセチルスペルミン (DiAcSpm) の予後予測について. 第 45 回日本癌治療学会総会 2007. 10. 24~26, 京都.

平松恭子, 大腸がん患者の経過観察における尿中ジアセチルスペルミン測定の意義. 第 30 回日本分子生物学会年次会・第 80 回生化学会大会・合同大会 2007. 12. 11~15, 横浜.

坂口幸治, 非小細胞肺癌における尿中ジアセチルポリアミン測定の意義. 日本ポリアミン研究会 第 22 回研究発表会, 2008.1.24-25, 熊本.

鈴木健太, スペルミジン N8-アセチル化酵素の測定系の検討. 日本ポリアミン研究会 第 22 回研究発表会, 2008.1.24-25, 熊本.

Sakaguchi, K., M.,: N1, N12-Diacetylspermine as a tumor marker for non-small cell lung cancers (NSCLC). 2008 ASCO (American Society of Clinical Oncology ) 44th Annual Meeting, 2008.5.30-6.3, Chicago, USA

高橋慶一, 大腸癌術後患者に対する尿中ジアセチルスペルミン (DiAcSpm) の予後予測能と

実用化に向けての検討. 第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008. 5. 16. 長崎

Takahashi, K., Urine di-acetyl spermine (DiAcSpm) as a new prognostic marker for colorectal cancer. 2008 ASCO (American Society of Clinical Oncology ) 44th Annual Meeting, 2008.5.30-6.3, Chicago, USA.

Sakaguchi, K., N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-Diacetylspermine as a Tumor Marker for Non-small Cell Lung Cancers. 1st ESMO European lung cancer Conference, 2008.4.23-26, Geneva, Switzerland.

Hiramatsu, K., Urinary N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diacetylspermine: Clinical significance and high throughput determinataion. Polyamines. Forty years of mammalian ornithine decarboxylase, 2008.6.26-30, , Kuopio, Finland.

Yanagiya, M., Determination of the urinary N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diacetylspermine based on colloidal gold aggregation system using monoclonal antibody. (AACC) American Association for Clinical Chemistry, 2008.7.27-31, Washington DC, USA.

江川直人, 尿中ジアセチルスペルミンの膀胱腫瘍マーカーとしての可能性. 第 39 回日本膀胱学会大会, 2008, 7. 30-31, 東京.

Takahashi, K., Urine N<sup>1</sup>N<sup>12</sup>-di-acetyl spermine (DiAcSpm) as a novel cancer marker for colorectal cancer. XX II Biennial Congress of the International Society of University Colon & Rectal Surgeons, 2008.9.13-17, San Diego, USA.

江川直人, 膀胱がんにおける尿中ジアセチルスペルミン陽性率の検討. 第 28 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2008. 10. 27. 名古屋.

坂口幸治, 原発性肺癌における尿中ジアセチルスペルミン測定の意義. 第 49 回日本肺癌学会総会, 2008. 11. 13-14. 小倉.

川喜田正夫, 腫瘍マーカーとしてのポリアミン: 分析と臨床の二人三脚, 日本ポリアミン研究会 第 23 回研究発表会, 2009.1.22-23, 大阪

平松恭子, 健常者の尿中 N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-ジアセチルスペルミンレベルの検討, 日本ポリアミン研究会 第 23 回研究発表会, 2009.1.22-23, 大阪

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川喜田 正夫

工学院大学・工学部・教授

研究者番号: 00012740

### (2) 研究分担者

平松 恭子 (2007 年度)

(財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号: 80181089

高橋 慶一 (2007 年度)

(財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・客員研究員 (がん・感染症センター東京都立駒込病院外科部長)

研究者番号: 60443115

### (3) 連携研究者

平松 恭子 (2008 年度)

(財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号: 80181089

高橋 慶一 (2008 年度)

(財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・客員研究員 (がん・感染症センター東京都立駒込病院外科部長)

研究者番号: 60443115