

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670279

研究課題名(和文) 悪性腫瘍から排出される呼気成分の同定 - 悪性腫瘍スクリーニングのために -

研究課題名(英文) Identification of compound in exhaled air from model mouse of cancer

研究代表者

石川 哲也 (Ishikawa, Tetsuya)

岡山大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：90221754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、呼気を利用した悪性腫瘍のスクリーニング検査のために、呼気中に含まれる悪性腫瘍特異的な成分を同定することを目的とした。悪性腫瘍モデルマウスを使用し、呼気中に予測した成分が増加するのか調べた結果、コントロールに比べて有意に増加することを確認した。その成分以外の2成分は増加しなかった。このことから、人においてもこの成分が悪性腫瘍患者において特異的に増加することが予想される。

研究成果の概要(英文)：Cancer is top cause of death in Japan. New types of diagnostic test are necessary to decrease the number of cancer deaths, for example, test of exhaled breath. To make it realized, several studies have shown that biochemical markers have been found in the exhaled breath of patients with cancers. However, cancer specific markers of exhaled breath have not been found from those markers. In this report, I identified a possible biochemical marker in the exhaled breath from mouse model of cancer. The concentration of the marker in the exhaled breath from mouse model of cancer was significantly different from that of control.

研究分野：molecular biology

キーワード：exhaled air cancer biochemical marker

1. 研究開始当初の背景

我が国の悪性腫瘍による死亡者数は、平成22年度には35万人を超え(厚生労働省, 人口動態統計), 現在死亡原因の第一位である。したがって悪性腫瘍を早期に発見し, 死亡者を減らすことは医療における最大の課題の一つである。しかし PET-CT のような画像診断を除けば, 多くの腫瘍検査は各腫瘍個別の検査であり, 悪性腫瘍全般を検出するような普遍的な検査はまだない。このようなスクリーニング検査が開発され, 健康診断などで人々が受け, 陽性と判定された人が精密な検査を受けるようにすれば, 悪性腫瘍の患者を効率的に明らかにできると考えられる。そのような検査は, 非侵襲的, 簡便かつ安価であり, すべての種類の悪性腫瘍を検査できることが望ましい。

呼吸を用いた悪性腫瘍検査は, そのようなスクリーニング検査を可能にすると考えられる。2006年には, 訓練した犬が嗅覚によって肺癌, 乳癌患者の呼吸と健常人の呼吸をかぎ分けたという報告がある(McCulloch et al., Integrative cancer therapies, 2006, 5, 30)。すなわち, 悪性腫瘍患者の呼吸には悪性腫瘍特有のにおい成分が含まれていると考えられる。したがって, 呼吸を用いた悪性腫瘍検査を行うためには, 呼吸中に含まれる悪性腫瘍特有のにおい成分を特定することが必要である。そのようなにおい成分は揮発性有機化合物(VOCs)であると考えられ, 種々の化合物が候補として同定されている。世界中の研究者がそのような化合物を明らかにすべく研究しているはずであるが, 現在に至るまでそのような化合物のうち, 悪性腫瘍の検査に利用できるものは報告されていない。悪性腫瘍患者の呼吸と健常人の呼吸を犬が区別できたことから, 悪性腫瘍特有のにおい成分が存在することは確かであろう。したがって, そのようなにおい成分を明らかにすることが悪性腫瘍患者のスクリーニング検査に必要である。

2. 研究の目的

本研究は, 呼吸を利用した悪性腫瘍のスクリーニング検査のために, 呼吸中に含まれる悪性腫瘍特異的な成分を明らかにすることを目的とした。申請者は, このような悪性腫瘍のスクリーニング検査を可能にする成分に気がついた。その成分は呼吸中に排出されることがわかっている。また, その成分を産生する酵素が, マウスやラットのある悪性腫瘍で産生されていることが報告されていた。

これらのことから, この成分が悪性腫瘍特有のにおい成分であると予想した。

そこで悪性腫瘍モデルマウスを使用し, コントロールと比べて呼気中に予測した成分が増加するのか調べることにした。当初は, 上皮成長因子レセプター欠損遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを使用する予定であった。予備実験は行ったが, その後子供が生まれにくい状態になったため, このマウスを利用した実験は行えなかった。次に腫瘍細胞株を腹腔内へ移植したマウスを使用したが, 予想に反して血液中および呼気中の予測成分の濃度は上昇しなかった。そこで, 白血病由来の腫瘍細胞株をマウスの静脈に導入し, 呼気中に目的の成分が増加するかどうか明らかにすることを目的とした。

なお本研究では, 申請時から悪性腫瘍患者の呼吸に含まれると予想される成分, およびその成分を産生する酵素等を伏せて計画書を提出しているため, 本報告でもそれらを伏せさせていただく。そこで, 呼気中の成分を X, 酵素を A とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

移植細胞には T 細胞性悪性リンパ腫細胞株 EL4-TK (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより供与) を用いた。この細胞を 10% FBS (BioSera), 100 units/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco) 含有 RPMI-1640 培地 (ナカライテスク) で培養し, LunaTM (エル・エム・エス) を用いて細胞数を計測した。

(2) 免疫染色

培養した EL4-TK 細胞を集め, PBS(-) に懸濁し, iPGeII キット (ジェノスタッフ) を用いてゼリー化した。そして, 10% 中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。パラフィン包埋し, パラフィンブロックを作り, ミクロトームを用いて 6 μ m に薄切した。それをスライドガラスに載せ, 90 $^{\circ}$ で伸展させた。60 $^{\circ}$ でパラフィンを溶かし, キシレンで脱パラフィン, エタノールで脱キシレン処理を行った。そして, マイクロウェーブ処理によって抗原賦活化し, 3% H_2O_2 処理, 5% スキムミルクを入れてブロッキング後に 500 倍希釈した酵素 A に対する抗体を加え 4 $^{\circ}$ で反応させた。PBS/tween および PBS で洗浄後, Labelled polymer HRP anti-rabbit (ダコ) を反応させ, DAB で発色した。最後にマイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。

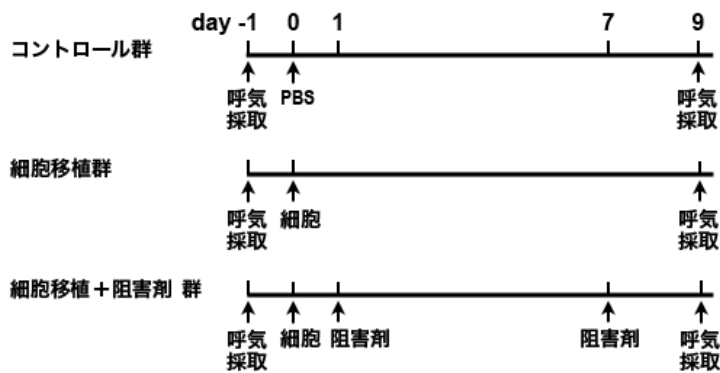


図1 動物実験の手順

マウスを7匹ずつ、コントロール群、細胞移植群、細胞移植+阻害剤群に分けた。まず呼気採取を行い、翌日にEL4-TK細胞を 1×10^7 個尾静脈から導入した。移植して9日目に再び呼気を採取した。酵素Aの阻害剤を、細胞移植の翌日と7日目に腹腔内注射した。

(3) 動物

6週齢のマウス scid/scid (日本クレア) を21匹用いた。それらのマウスを7匹ずつ、コントロール群、細胞移植群、細胞移植+阻害剤群に分けた。実験手順は図1に示した。培養したEL4-TKを室温で3分間遠心(1000 rpm)し、PBSで洗浄した後に 1.0×10^7 cells / 0.1 ml になるようにPBSを加え懸濁した。マウスに移植するまで氷冷した。細胞をマウスの尾静脈から0.1 ml 導入した。なお、コントロールにはPBSを0.1 ml 導入した。阻害剤は粉末を溶かした後にpH 7.4に調節し、その後5 mg/kgに調製し、濾過滅菌した。阻害剤は、細胞移植+阻害剤群に対し、細胞移植1日目と7日目に腹腔内投与した。体重は当初は一日おきに、その後毎日測定した。マウスからの呼気採取は次のように行った。マウスを100 mlのポリプロピレンボトル(サンブラテック)に入れて蓋をした。蓋には注射針が通る穴を空けておき、注射針を入れるとき以外はテープで蓋をした。10分後、容器内の空気を50 ml注射筒を用いて、蓋をしたまま穴から注射針を差し込み14 ml採取した。2 mlのシリンジバイアル(日電理化硝子)の蓋をピンの口からずらし、その隙間から針を差し込んでその空気を押しだし、素早く蓋を閉めた。呼気採取を行うときには、実験を行った実験室の空気も採取した。

(4) 成分解析

バイアルからガラス製シリンジで空気を1 ml取り、専用の機器に注入して濃度を測定した。

(5) 統計処理

それぞれの成分の値から実験室内の空気

の値を引いた値を用いた。統計処理はMann-WhitneyのU検定を行った後にBonferroni法によって補正した。EXCEL VBA MACRO FOR WINDOWS ノンパラメトリック統計2012に付属のソフトを利用した。

4. 研究成果

(1) EL4-TK細胞の免疫染色

マウスに移植するEL4-TK細胞に酵素Aが発現しているかどうか、酵素Aの抗体を用いて調べた。その結果、図2に示すようにEL4-TK細胞には酵素Aが発現していることが明らかになった。

(2) 体重の変化

scidマウスの尾静脈からT細胞性悪性リンパ腫細胞株EL4-TKを 1.0×10^7 個導入し、その後呼気を採取してその中の成分Xを測定した。EL4-TK細胞を移植した群を細胞移植群、PBSを移植した群をコントロール群、細胞移植に加え酵素Aの阻害剤を導入した群を細胞移植+阻害剤群とした。細胞を移植した群では、導入9日目にマウスの平均体重が増えなくなった。そこでこの日に呼気を採取した。

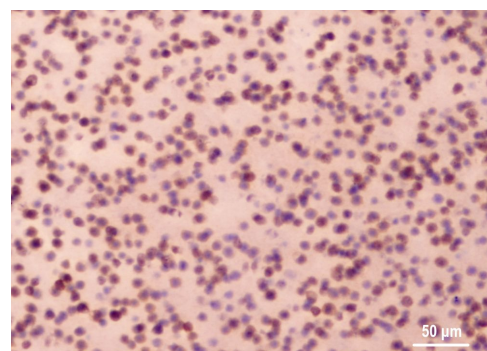


図2 EL4-TK細胞の免疫染色

EL4-TK細胞を、酵素Aの抗体を用いて免疫染色した。

翌日には体重は落ち、マウスも動かない状態になった。コントロール群、細胞移植 + 阻害剤群のマウスは元気であった。

(3) 呼気成分 X の濃度変化

呼気成分を測定した結果、細胞移植群の成分 X の濃度は増加していた (図 3)。移植前に比べて 9 日目には 1.2 倍と有意に上昇していた。その他の群については、増加は見られなかったが、細胞移植 + 阻害剤群では、低下傾向を見せた。また、9 日目の各群を比較しても、細胞移植群はコントロール群に比べて 1.25 倍と有意に高く、細胞移植 + 阻害剤群に比べても有意に高かった。

(4) 成分 X 以外の成分の変化

呼気中の成分 X の変化が悪性腫瘍特異的であることを示すために、成分 X の測定時に同時に成分 Y、Z も測定した (図 4)。Y および Z は X とは独立した成分である。9 日目の成分 Y は、コントロールを 1.0 とすると、細胞移植群が 0.74、細胞移植 + 阻害剤群が 0.65 と低かった。しかし、成分 Y はばらつきが大きいため、有意に下がったとは判断されなかった。9 日目の成分 Z は、コントロールを 1.0 とすると、細胞移植群が 1.05、細胞移植 + 阻害剤群が 1.0 であり、ほとんど差がなかった。

(5) 酵素 A の発現についての考察

マウスに移植する EL4-TK 細胞に酵素 A が発現しているかどうか調べたところ、発現していることが明らかになった。酵素 A の腫瘍細胞における発現は、すでにいくつかの腫瘍

細胞でも報告されている。したがって、この細胞をマウスに移植すれば、酵素 A により成分 X が産生されると予測できた。

(6) 成分 X についての考察

呼気中の成分 X の濃度は、移植前に比べて移植 9 日目には 1.2 倍になっていた。EL4-TK 細胞は血液中に存在し、その細胞には酵素 A が発現していたため、血液中の成分 X が上昇すると考えられる。そして、血液の成分は肺から呼気に移行するものがある。成分 X は呼気に移行すると考えられているため、呼気中の成分 X の濃度が増加することは矛盾がない。

また 9 日目についても、成分 X は細胞移植群はコントロール群と比較して 1.25 倍と有意に増えていた。すなわち、マウスの成長と共に増えたのではないことがわかった。また、細胞移植 + 阻害剤群と比較しても有意に濃度が高かった。酵素 A の阻害剤をマウスの腹腔内に導入すると、血液を介して全身に作用すると考えられる。したがって、阻害剤が血液中の EL4-TK 細胞の酵素 A と内在性の酵素 A を抑制したためにコントロール群より低い値になったと考えられる。

(7) 成分 X についての今後の課題

1.2 倍程度の増加で人に応用できるかが問題となる。本研究では 1.0×10^7 個の細胞をマウスに移植しており、呼気採取の時点でマウスの元気がなかったという状態を考えると血液中には EL4-TK 細胞がかなり増えていると考えられる。その割に 1.25 倍の増加は少ないと考えられ、人に応用した場合、1.25 倍程度では健常者との違いを明確にできない

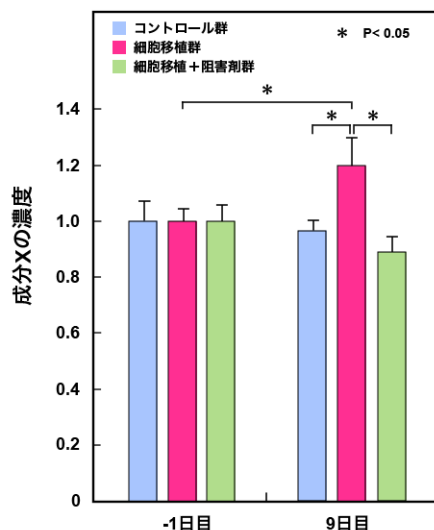


図3 呼気中の成分Xの濃度
細胞を移植する前 (-1日目) および9日目について、呼気中の成分Xの濃度を測定した。濃度は-1日目の濃度を1.0として表示した。

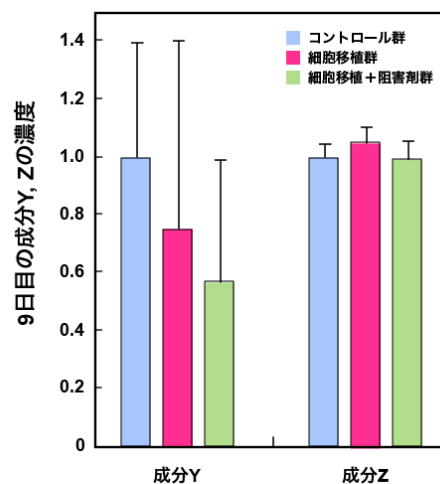


図4 呼気中の成分Y, Zの濃度
細胞移植9日目について、呼気中の成分Y, Zの濃度を測定した。コントロール群の値を1.0として表示した。

と予想される。しかし、今回行った呼気採取は改善の余地がある。人から呼気を採取する際は、呼気採取用の袋に直接人の口をつけて息を吐いてもらうため、呼気中の成分濃度を直接測定することができる。しかし、動物ではそのようなことができない。そのためボトルにマウスを入れ、空気とマウスが吐いた呼気が混ざった状態（薄まった状態）から一部の空気を抜き取り、それをいったんバイアルビンに移し（その際も薄まる）、それからさらに一部を抜き取って測定器にかけた。したがって、本来のマウスの呼気濃度に比べるとかなり低くなっている。今後はマウスの口から直接呼気を採取できる方法に変え、採取した呼気をそのままストックし、そこから測定器にかけるように変更する。そのようにすることで、より実際の呼気の濃度に近い値になると考えられる。すなわち、悪性腫瘍患者の呼気で測定するともっと高い値になると予測している。

(7) 成分 Y,Z についての考察

成分 Y,Z については、9 日目において三群の間で有意な差は見られなかった。成分 Y は、細胞移植群および細胞移植 + 阻害剤群ではかなり値が低かったが、有意ではなかった。成分 Y は空気中の濃度が変化しやすく、測定による変化が激しいという連絡を測定機器の会社から受けている。すなわち、平均を見ると下がっているが、これは生体の状況を反映していないと考えられる。以上のことから、白血病細胞の移植による呼気中の成分 X の増加は、成分 X 特異的であると考えられる。したがって、人に対する有用な悪性腫瘍の検査法に応用できると考えられる。

(8) 追記

今回の研究を行って、成分 X を用いてさらに利用価値の高い悪性腫瘍の検査法を思いついた。それを実現するには、さらに種々の解析が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
出願予定あり

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 哲也 (Ishikawa Tetsuya)

岡山大学大学院保健学研究科・准教授
研究者番号：90221754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高原 潤子 (Takahara Junko)

岡山大学医学部耳鼻咽喉科・技術職員

有川 裕美子 (Arikawa Yumiko)

岡山大学大学院保健学研究科大学院生

中川 梨沙 (Nakagawa Risa)

岡山大学大学院保健学研究科大学院生