

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670580

研究課題名(和文) 血清を用いた新たな乳がん検出法の開発

研究課題名(英文) Development of new breast cancer detection method by the serous samples

研究代表者

竹内 恵 (Takeuchi, Megumi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90420398

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)：乳がんは早期診断や集学的治療が乳がん死亡率を減少させるため重要となる。乳がんの早期発見には画像検査が有用であるが、受検者への負担もある。血液検査で早期乳がんを検出できれば、検診率が向上し、検出率の上昇となり、治療成績が向上する。従来とは全く異なり血液採取により、「血清をNMR(核磁気共鳴)計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」という手法を用いて、新たな乳がんの検出を試みた。まずは、乳がん患者と健常者の2グループの血清に対してNMR計測し、グループ間の識別を試みた。結果、PLS-DA法により、それぞれのグループはクラスター化し識別をすることが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Early diagnosis for the breast cancer and multidisciplinary treatment are important to decrease in mortality. Image examination is useful for early detection of them, but it has a burden for patients. If we will detect early breast cancer by a blood test, the examined rate of the breast and detected rate of early breast cancer will be increased, and the effect of treatment will be improving.

"The serum samples were measured with Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and analyzed the data by pattern recognition" is new method with blood test. And we try to detect early breast cancer with this method. We measured the serum samples of two groups with NMR, and tried to discriminate the NMR data between "patients of breast cancer" and "healthy control group". The data were visualized by principal component analysis, and then analyzed with Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). We could see the tendency to separate by clustering those data of two groups in the PLS-DA analysis.

研究分野：乳腺

キーワード：乳がん NMR測定

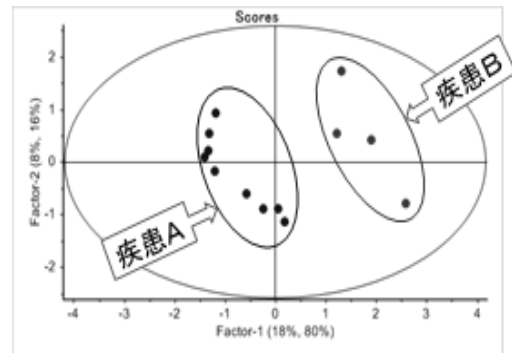
### h 1 . 研究開始当初の背景

わが国における乳がん発生数は年間5～6万人と女性のがん罹患率の第1位である。血液検査による腫瘍マーカー（CA15-3、BCA225、HER-2 など）は早期乳がんの診断には陽性率が低く、乳がん診断は触診による自己検診、マンモグラフィー、超音波検査などの乳がん検診に依存している。しかし、診断時に既に浸潤・転移をしていることも多い。乳がん治療においては手術、化学療法、分子標的薬治療、ホルモン療法など集学的治療を行うが、臨床の現場では治療介入のタイミングや治療抵抗性の有無など判断に難渋している。乳がん患者の治癒率向上の鍵は早期発見と乳がん診断時における適切な治療であるといえる。乳がんの発症前期における診断、ハイリスク群の選び出し、さらに治療的介入の必要性の判断、薬剤の応答性の判断などが可能となる診断法の開発は待ち望まれている。

乳がんの早期発見こそが乳がん死亡率を減少させるうえで最も大切であるが、乳がんの検診受診率はさまざまな啓蒙活動を行われ徐々に増加傾向を示してはいるものの30%代と低い。現時点では乳がんの早期発見には、画像検査が有用である。しかし、現時点で乳がん診断率が高いマンモグラフィー検査や乳房造影MRI検査などは、受検者への負担もある。早期乳がんを血液検査で検出できるなら、検査の負担をより軽減することが可能となる。検査負担の軽減は、検診率の向上へとつながり、これにより乳がんの検出率は上昇し、乳がん治療成績の向上にも貢献すると考える。

我々はこれまでに、生体試料の計測値を「ひとつのデータとして一括処理する」解析技術を開発した。本技術では、従来のように試料中の個々の物質を同定・定量するのではなく、計測値全体を単一データとして取り扱って診断指標とするため、サンプルから得ら

れるすべての情報を利用して、正確かつ高精度に鑑別することが可能となった。

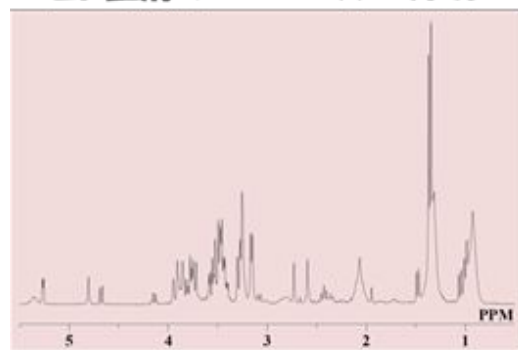


計量化学的NMRデータ解析  
(PLS-DA法)

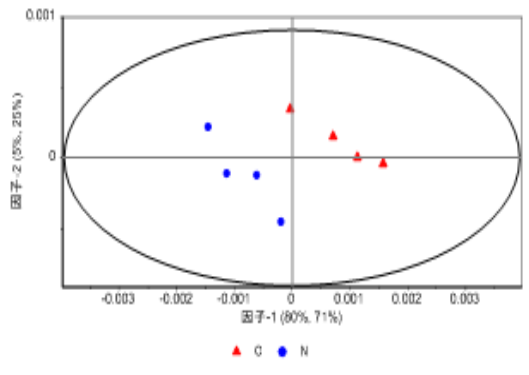
我々は、従来とは全く異なるこの画期的な「血清をNMR（Nuclear Magnetic Resonance：核磁気共鳴）計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」という手法を用いて、採取した血液より新たな乳がん検出を試みた。

NMRは血清などの生体資料を、非破壊的かつ網羅的に分析できる数少ない分析手段である。今日、単一の成分の量的変化のみで複雑な病態変化を正確に把握することは限界があるとされ、より複合的な情報解析が求められている。NMR技術はこの観点において優位性の高い計測法である。

### ヒト血清の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル



乳癌患者4名と健常者4名でのプレリミナリーにNMR計測を行い、解析において二極化したことを確認している。



## 2. 研究の目的

血清のNMR計測・ケモメトリクスによるデータ解析を行い、乳がんの発見や乳がんの生物学的性質の診断を行うことのできる新たな乳がん検出法の開発を目指す。

目的1：血清をNMR計測し、NMR信号の特性を活用したデータ解析を行うことにより、乳がん患者と非乳がん患者(健康者、乳腺症)を血清から識別できるか。

目的2：血清をNMR計測し、NMR信号の特性を活用したデータ解析を行うことにより、乳がんの組織学的特性や病期分類、ホルモン受容体の判定結果を血清から予測できるか。

## 3. 研究の方法

### 血清検体

京都大学大学院医学研究科 乳腺外科学と提携施設で運用する、「乳癌微小環境形成に関わる分子生物学的機序の生体試料を用いた探索研究 BORN・BioBank」で保管された乳がん症例の、診断時または手術時の薬剤などによる治療が行われていない状態の血清、ならびに健康者症例の血清を使用した。本研究に対して京都大学医の倫理委員会から承認を得た。健康者、非浸潤癌、浸潤癌の乳がん患者計70例の血清を用いて解析を行った。

### NMR計測

- 検体の前処理・保存など

被験者より採取した血清は、遠心分離により細胞成分等の不溶成分を除去し、-80に保存した。NMR計測時に解凍して使用した。

- NMR測定試料の調整

解凍した血清に、内部ロック用重水などを加え、ガラス性NMR試料管に入れた。

- NMR測定およびデータ収集

- NMR装置は7テスラ(300MHz) FT-NMR装置(JEOL)にて行った。
- 測定は、核種はプロトン( $^1\text{H}$ )について行った。

多検体の連続自動測定が可能なケモメトリクス用自動測定プログラムを用い、1次元測定、水信号抑制1次元測定、CPMGスピンエコー測定を行った。

### NMR計測値の数値化処理

- データの転送

NMR装置本体のPCよりrawデータ(FID信号)をデータ処理専用のPCに転送した。

- NMRデータの確認および数値化処理

Alice2 ver5.5(JEOL)を用いて、NMRデータ処理を行い、スペクトルを確認する。次にFID信号を処理し、数値化したデータをCSV形式で保存した。

パターン認識によるNMRデータ解析と全データを用いたデータマイニング

- ソフトウェアはUnscrambler<sup>®</sup> ver10.3(CAMO)を使用した。

主成分分析(PCA)によるデータの可視化を行った後、PLS-DA(Partial Least Squares Discriminant Analysis)法によるクラス分類を行った。

- クロスバリデーションによる解析結果の検証・評価を行う。

血清のNMRデータと乳がん疾患に特徴的な臨床情報すべてを統合したデータマイニングを行って、解析データと臨床情報との関連づけを行う。識別が可能と判断された場合には、NMRデータによる乳がん検出を行うためのブラッシュアップを行う。

#### 4. 研究成果

##### 目的1の研究成果

全70症例の血清検体を乳がん血清群、健常者血清群におけるPLS-DAの解析結果では、スコアプロットにおいて、両群のスコア値はクラスターして分布する結果を得た。これは両者を判別しうる結果である。

この成果は、血清を用いて乳がんの有無をスクリーニングする検査へと発展する可能性を示唆している。

##### 目的2の研究成果

全70症例は、内訳として、健常者30例、乳癌症例40例、このうち浸潤癌29例

(Phenotype別の内訳として、HER2 type 5例、luminal type 15例、triple negative type 9例)、非浸潤癌11例での血清検体を使用した。phenotype別やリンパ節転移の有無でも識別可能な傾向が見られたが、十分なサンプル数ではなかった。乳がんの有無のみならず乳がん患者の組織学的特性や進行度を血清検査にて識別出来る可能性についても検討できる可能性がある。

目的1、目的2の研究成果から、さらにサンプル数を増加し、パターン認識によるスクリーニングツールとしてのモデル作りを推進していくための方向性を見出した重要な実績が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

竹内 恵 (TAKEUCHI, Megumi)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90420398

##### (2) 研究分担者

戸井 雅和 (TOI, Masakazu)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10207516

高田 正泰 (TAKADA, Masahiro)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50452363

佐藤格夫 (SATO, Norio)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：330409025

平川 慶子 (HIRAKAWA, Keiko)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30165162