

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01804

研究課題名(和文)線虫C. elegansの嗅覚機構を模倣した乳癌検知システムの研究開発

研究課題名(英文) Research and development of measuring systems of breast cancer by mimicking olfactory systems of nematode C. elegans

研究代表者

都甲 潔 (Toko, Kiyoshi)

九州大学・システム情報科学研究院・教授

研究者番号：50136529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物の嗅覚機構を利用し GC分析も並行して行うことで尿中の乳癌バイオマーカーの確定に成功した。このバイオマーカーは難揮発性物質の匂い分子であり、それら化合物が乳癌患者由来の尿(ステージII患者尿)においても存在することを確認した(特許出願中)。特定された2種のバイオマーカーについて、モノクローナル抗体(2種)をラットリンパ節法により作製を行った。センシングデバイスとして表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサを使用し、金ナノ粒子を用いた局在プラズモン共鳴による測定系の開発も行った。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in identification of biomarkers of breast cancer by utilizing olfactory mechanisms as well as performing GC analyses. These biomarkers are odor molecules belonging to low volatile substances, and were discovered in urine samples from patients breast cancer at stage II (patent applied). Monoclonal antibodies were produced for two kinds of biomarkers we found with the aid of a rat lymph node method. We adopted a surface plasmon resonance (SPR) biosensing system as a sensing device, and also performed development of a measuring system using a localized SPR with Au nanoparticles.

研究分野：計測工学

キーワード：癌検知 嗅覚 匂い バイオマーカー 簡易迅速・超高感度計測

### 1. 研究開始当初の背景

癌の早期発見は医療における大きな課題であり、これまでの腫瘍マーカーは経過観察には有効であるものの、早期発見には不向きとされている。国内における癌の疾病費用は約 10 兆円に達し、癌の早期発見は数兆円レベルの医療費削減を可能とする。特に乳癌ではその効果が大きい。最近、線虫や犬(癌検知犬)を用いた早期癌検査の可能性が応募者らにより見出された。事実、犬の嗅覚を用いた癌検知の研究が、応募者らをはじめとして、米国、イギリス、フランス、ドイツ等、世界各国で行われ始めた。

このような生物の嗅覚を利用した癌検知では、匂い物質を検知するわけであるが、匂い物質を標的とした検出システムの確立には匂い物質の特定が不可欠と考えられ、そのためにはガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)のような大型機器を用いた研究が必須となり、多くの時間と研究資金が必要となっていた。そこで、本研究は、生物の嗅覚と GC/MS 分析データを比較しながら、バイオマーカーを同定、さらに超高感度センシングデバイスの開発を行うことで、高感度性、高選択性、汎用性を備えた乳癌の超高感度計測技術の開発を試みるものである。

### 2. 研究の目的

上記「背景」で述べたとおり、癌の早期発見は医療における大きな課題であり、簡易迅速に癌を検出できる手法の開発が切望されている。こういった背景において、本研究の目的は、尿中における癌細胞由来揮発性物質(匂い物質;バイオマーカー)の存在を明らかにし、バイオマーカーを同定し、それらの濃度変化を高感度化したセンサで検出可能とすることである。癌細胞由来の低分子物質を検知する超高感度匂いセンサの実現は癌の検診、経過観察、個別化精密医療に貢献する技術になりうる。今回開発を目指す尿 1 滴での癌検知は、癌検診の受診率、診断精度の向上、健康寿命の増進に貢献し、穏やかで健やかな社会の形成に資するものである。また、本研究手法は生体内での癌という遺伝子発現変化を匂い物質で捉えるという新しい研究の創出にもつながると期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では 5 つの課題に分け研究を行う。

様々な種類の癌患者およびコントロール研究参加者から血液、尿、臨床情報を継続的に採取し、線虫や犬の嗅覚を用いて癌検出テストを行う。乳癌の尿サンプルの生物嗅覚による評価、ならびに GC 分析も併用することで、バイオマーカーの同定を行う。

走化性の数値化においては、映像から走化性を数値化する。匂い受容体を発現させた培養細胞系を用いたセンシングにおいては、嗅覚受容体再構築系を作製する。SPR(表面プラズモン共鳴)免疫センサや金

ナノ粒子を用いた L-SPR(局在プラズモン共鳴)センサによりバイオマーカーの超高感度センシングデバイスを開発する。

### 4. 研究成果

#### (1) サンプル収集とバイオマーカーの同定(研究の方法と)

バイオマーカーの特定を行うために、コントロール研究参加者の尿サンプルを収集した。また、乳癌細胞と乳由来線維芽細胞を用いて培養液を作製した。さらに、癌細胞に由来したバイオマーカーの比較を行うことも考慮し、大腸癌細胞と大腸由来線維芽細胞を用いて同様に培養液を作製した。

上記作製した細胞培養液について、GC 分析を行うために前処理として培養液を濃縮し、その濃縮した培養液について生物嗅覚を用い癌のバイオマーカーが存在していることを確認した。乳癌細胞と乳由来線維芽細胞の濃縮培養液について GC 分析を行い、比較分析を行った結果、癌のバイオマーカーの候補成分として 14 種類を抽出した。つまり、乳癌細胞株培養液中より、正常線維芽細胞株培養液中にはほとんど存在しない特徴的な難揮発性化合物を GC-MS 分析により同定することに成功した。このバイオマーカー候補物質は、既存のヘッドスペース回収法では見出されていなかった物質である。加えて、それら化合物が乳癌患者由来の尿サンプルにおいても検出可能であり、正常者(乳癌検査陰性)由来の尿においては検出されないこと(あるいは、極微量)を見出した。

さらに分析を進めた結果、癌患者と健常者の尿中で濃度に明らかに差がある十種以上の乳癌由来物質バイオマーカー候補の内 2 つの物質を特定することに世界で初めて成功した(特許出願中)。それら化合物が乳癌患者由来の尿サンプル(ステージ II 患者尿)においても存在することが確認され、正常者(乳癌検査陰性)由来の尿においては、極わずかであることを見出した。

また、上記 GC 分析と並行して癌探知犬を用いた実験を行った。その結果、培養細胞培養液において癌(乳癌および大腸癌細胞株)と正常(線維芽細胞株)の違いの判断が可能であることが確認され、かつ幾つかの候補物質を入れた呼気バックでの検証も試みた。

#### (2) 走化性の数値化(研究の方法)

さらに画像処理による線虫の走化性の定量化を行った。第一に、光源・カメラ・計算機などの画像撮影環境の構築を行った。その際、不要な光の混入を避けながら、線虫部分と背景部の輝度差が十分高く(すなわち高コントラストで)撮影できるように配慮した。第二に、各時刻の画像上で線虫の存在位置を決定するためのプログラムを実装した。

これら開発した測定系を用い、画像処理による線虫の走化性の定量化を行った。画像データから走化性指数を算出し、実際の目算に

近似するシステムを構築した。なお、走化性指数を [(左側の線虫の占めるピクセル数) - (右側の線虫の占めるピクセル数)] / (全体の線虫の占めるピクセル数) で定義した。線虫の行動を撮像し、動画解析によって線虫の行動を定量化した。その結果、図1に示すように、目視の行動観察と比較して同等程度の定量化を実現できた(マクロ走化性)。また、動画で撮影したことで、目視では困難であった細かな走化性指数の経過情報(ミクロ走化性)を得ることに成功した。

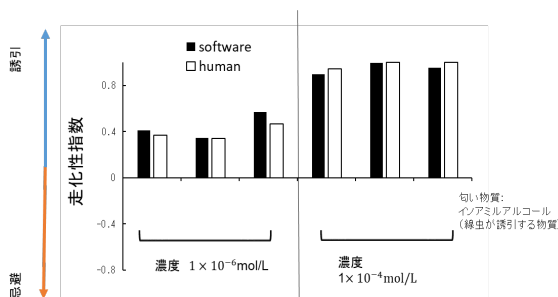


図1 走化性指数の比較

### (3) 培養細胞系(研究の方法)

嗅覚受容体を培養細胞に強制発現させた嗅覚受容体再構築系の確立を試みた。乳癌のバイオマーカー候補分子に反応するイヌ嗅覚受容体遺伝子(CfOR0012, CfOR0046, イントロン無し)を選択し、イヌゲノム DNA より発現ベクターにクローニングした。さらに、乳癌のバイオマーカー候補を検知する化学受容体として、難揮発性化合物に親和性が高い苦味受容体ファミリーに着目した。25種類のヒト苦味受容体再構築系の確立を試みた。その結果、既知の苦味分子に反応を示し、再構築系が機能することが明らかになった。

### (4) センシングデバイスの開発(研究の方法)

高感度センシングデバイスの開発では、SPR(表面プラズモン共鳴)免疫センサを用い、予備実験として、尿中低分子バイオマーカーに関して、HVA(小児癌や皮膚癌のバイオマーカー)の検出に成功した(図2)。

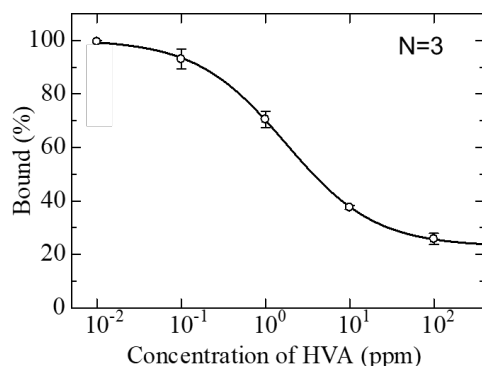


図2 SPRを用いたHVAの検出

続いて上記(1)バイオマーカー候補物質のセンシングデバイスの開発のため、特定さ

れた2種のバイオマーカーについて、類似物質をタンパク質(ロコ貝ヘモシアニン)に結合させ、これを免疫原としたモノクローナル抗体(2種)をラットリンパ節法により作製を行った。さらに、より簡便な測定系を実現するために、金ナノ粒子を用いた局在プラズモン共鳴による測定系の開発を進めた。

これらの成果を「がん症状の判定方法」(特願2018-53010)にて特許出願した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

松井 利郎、核磁気共鳴法を用いた食品品質評価への取り組み、アグリバイオ、1(8)、2017、844-848

前田 恵佑、内田 誠二、野寄 朋彦、小野 寺 武、都甲 潔、動画解析による線虫の走化性定量的評価、信学技報、116(435)、2017、5-8

前田 恵佑、内田 誠二、野寄 朋彦、小野 寺 武、都甲 潔、カメラ画像解析による線虫の走化性定量的評価、電気学会研究会資料 CHS = The papers of technical meeting on "chemical sensor"、IEE Japan 2016(18-31)、2016、12-18

Sonoda H, Yamamoto K, Ozeki K, Inoue H, Toda S, Mehara Y, An anisakis larva attached to early gastric cancer: report of a case, Surgery Today, 査読有, 45(10), 2015, 1321-1325, DOI 10.1007/s00595-014-1012-3

〔学会発表〕(計22件)

都甲 潔、味覚センサ開発・実用化から新規匂いセンサ開発へ向けて、第65回応用物理学会春季学術講演会、2018年

都甲 潔、匂いセンサ開発の近況と動向、第3回味覚センサシンポジウム、2018年

松井 利郎、移香・着香のメカニズムとその評価、テックデザイン 講習会、2017年

松井 利郎、におい成分と包材との相互作用、工業技術会 講習会、2017年

前田 恵佑、内田 誠二、野寄 朋彦、小野 寺 武、都甲 潔、動画解析による線虫の走化性定量的評価、MEとバイオサイバネティクス研究会、2017年

Kiyoshi Toko, Biochemical Sensors for senses of taste and smell, 5 th Bioscience and Biotechnology International Symposium, 2017 年

都甲 潔、味と匂いの可視化、電子情報技術部会 次世代エレクトロニクス分科会 講演会、2016 年

Tomohiko Noyori, Takuya Eda, Takeshi Onodera, Kiyoshi Toko, Detection of Homovanillic Acid in Model of Human Urine Using Surface Plasmon Resonance Immunosensor, Bio4Apps2016, 2016 年

野寄 朋彦、枝田 拓也、小野寺 武、都甲 潔、表面プラズモン共鳴センサを用いた類似尿中ホモバニリン酸の検出、平成 28 年度（第 69 回）電気・情報関係学会九州支部連合大会、2016 年

園田 英人、杉山 雅彦、中島 雄一郎、大垣 吉平、佐伯 浩司、沖 英次、前原 喜彦、がんの匂いの特徴に関する研究、第 71 回日本消化器外科学会、2016 年

前田 恵佑、内田 誠一、野寄 朋彦、小野寺 武、都甲 潔、カメラ画像解析による線虫の走化性定量評価、平成 28 年度電気学会 E 部門 ケミカルセンサ研究会、2016 年

Takuya Eda, Takeshi Onodera, Kiyoshi Toko, Detection of Homovanillic Acid in Model of Urine Using Surface Plasmon Resonance Biosensor, Bio4Apps 2015, 2015 年

Takuya Eda, Takeshi Onodera, Kiyoshi Toko, Detection of homovanillic acid using surface plasmon resonance (SPR) immunosensor, 11th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS2015), 2015 年

都甲 潔、味と匂いを目で見える、佐賀医療センター好生館 第 13 回理事長特別企画セミナー、2015 年

園田 英人、広津 崇亮、新田 吉陽、三森 功二、岡本 龍郎、佐伯 浩司、沖 英次、前原 喜彦、線虫嗅覚を用いた網羅的高精度がんスクリーニング法、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年

園田 英人、がん探知犬・線虫を使った

がんの匂いの研究、第 3 回九州大学病院別府病院 市民公開講座、2015 年

都甲 潔、食文化を後世につなぐ食譜、平成 27 年度九州大学開学記念講演、2015 年

〔産業財産権〕  
出願状況（計 1 件）

名称：がん症状の判定方法  
発明者：松井 利郎、田中 充、都甲 潔、小野寺 武、園田 英人、紅林 倫太郎  
権利者：JOHNA N 株式会社、国立大学法人九州大学  
種類：特許  
番号：特許願 2018-053010 号  
出願年月日：平成 30 年 3 月 20 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

都甲 潔 (TOKO, Kiyoshi)  
九州大学・大学院システム情報科学研究  
院・教授  
研究者番号：5 0 1 3 6 5 2 9

### (2) 研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：8 0 1 6 5 6 6 2

内田 誠一 (UCHIDA, Seiichi)  
九州大学・大学院システム情報科学研究  
院・教授  
研究者番号：7 0 3 1 5 1 2 5

二ノ宮 裕三 (NINOMIYA, Yuzo)  
九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発セン  
ター・学術研究員  
研究者番号：5 0 0 7 6 0 4 8

松井 利郎 (MATSUI, Toshiro)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：2 0 2 3 8 9 4 2

園田 英人 (SONODA, Hideto)  
九州大学・大学院医学研究院・共同研究  
員  
研究者番号：0 0 4 6 5 7 2 5  
(平成 28 年度より連携研究者)

広津 崇亮 (HIROTSU, Takaaki)  
九州大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：7 0 4 0 4 0 3 5

### (3) 連携研究者

沖 英次 (OKI, Eiji)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：70380392

岡本 龍郎 (OKAMOTO, Tatsuro)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：80568626

清水 邦義 (SHIMIZU, Kuniyoshi)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20346836

中野 啓子 (NAKANO, Keiko)  
九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授  
研究者番号：50380704

實松 敬介 (SANEMATSU, Keisuke)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：70567502

林 健司 (HAYASHI, Kenshi)  
九州大学・大学院システム情報科学研究院・教授  
研究者番号：50202263

小野寺 武 (ONODERA, Takeshi)  
九州大学・大学院システム情報科学研究院・准教授  
研究者番号：50336062

田原 祐助 (TAHARA, Yusuke)  
九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授  
研究者番号：80585927

矢田部 壘 (YATABE, Rui)  
九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・助教  
研究者番号：00735847