

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08751

研究課題名(和文) 唾液メタボローム解析による膵癌・乳癌をはじめとする癌の早期診断技術の確立

研究課題名(英文) Salivary metabolomics-based study for early detection of various cancers including cancers pancreatic and breast.

研究代表者

岩淵 篤敬 (Iwabuchi, Atsuhiko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10256208

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)：癌検診の受診率、発見率向上の為、非侵襲的で良いマーカーが求められている。唾液検体のメタボローム解析により、膵癌や乳癌の腫瘍マーカーとなる可能性のある物質を発見し、肺癌・大腸癌などに関しても同様の研究を進行中である。当該物質が健常者では異常をきたさないことの確認、異常値を認めた被験者について診断治療の一助とし当該検査の有用性を評価検討する為、当施設における、人間ドック受診者よりボランティアを募り唾液を採取、解析を行っている。総計3000例を予定も、総計2296件の検体採取にとどまったが、試験的に1000症例弱で統計解析によって体重変化やBMIなどが、唾液中代謝物への影響要因と考えられる。

研究成果の概要(英文)：As efficient cancer screening, the development of non-invasive and accurate biomarkers are required. Metabolomics has been used for discovery of salivary biomarkers for various diseases including lung colon pancreatic, and breast cancers. In this study, specificity test of these markers was conducted using large cohort data. Totally 2296 saliva samples, among expected 3000 samples at the planned stage, were collected and their metabolites were quantified using capillary electrophoresis-mass spectrometry that can quantify hundreds of charged metabolites simultaneously. Of these, the quantified metabolite concentrations data of 1000 samples were statistically analyzed with clinical data collected from the identical cohort, which resulted in the change of weight and BMI showed significant correlations with metabolomic profiles.

研究分野：健診 予防医学

キーワード：唾液健診 唾液検診 腫瘍マーカー メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

本国において健康診断や人間ドッグにおけるがん検診の受診率に関する約 74 万件の調査結果として、どの疾患でも 20%~40%しか検診していないということが報告されている(引用:厚生労働省健康局がん・疾病対策課、がん検診受診率等に関する問題点、平成 28 年)。これらを改善するために様々なアプローチがあるが、我々は低侵襲な検査によって受診者の心理的を下げるのが重要であると考へた。以下に疾患ごとの問題点や技術的な課題を述べる。

1)膵癌の検診に関する問題点

膵癌は 5 年生存率が 5%以下と他の癌種と比べても極めて低い。これは、初期に自覚症状がほとんどないために発見時に既に悪性腫瘍に進行してしまっている、或いは、リンパ節や周囲の臓器への転移によって局所的な外科手術では治療できない状態で発見されることが多いことなどが原因である。このため、膵癌は早期発見と早期治療の重要性が他の癌種と比べても極めて高い癌種である。膵癌の早期発見を目的として、膵液や血液や尿など低侵襲に収集できる体液から膵癌の診断マーカーの探索が行われており、血中の蛋白マーカーである CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、や膵酵素 Elastase-1 が臨床で用いられている。また、膵液中のジェネティックなマーカーとしては K-ras や TP53、また microDNA など新しい分子マーカーの研究も報告されている。また、膵癌の初期段階の症状が、慢性膵炎と類似しており、鑑別診断に難渋する場合もあり、慢性膵炎と膵癌とを特異的に見分けられるマーカーの必要性も高い。

2)乳癌の検診に関する問題点

乳癌は早期発見されれば治療する確率が高く、また早期の段階では自覚症状を有さないことが多いため、治療成績向上のためには健診による早期発見が重要である。しかし我が国における健診受診率は 20%程度と低く、また受診者における乳癌発見率も 0.1%以下と低い。そこでより効率的に高リスク群を選別する必要がある。血液、尿及び唾液の様に低侵襲に収集可能である体液から有効な腫瘍マーカーが得られることが理想ではあるが、現在、臨床で用いられている乳癌の腫瘍マーカー(CA15-3やCEA)は再発の検出や、再発に対する化学療法の効果を評価する上では有用であるが、これらの腫瘍マーカーにより乳癌の早期診断をすることは困難である。

3)唾液検査の可能性

近年、腫瘍マーカーを探す対象として血液や尿だけでなく、唾液も体内の様々な情報を反映している体液として、口腔内ならず

様々な全身性疾患の検査ができないか注目されている。他の体液に比べて、低侵襲、低コストで、安全な収集ができることなどが大きな利点である。例えば、口腔癌、扁平上皮舌癌や化学療法の応答測定・薬物乱用の検査などの応用例が報告されている。また口腔外の癌としては、乳癌患者の唾液中の蛋白レベルに特異的な違いがあることも報告されている。

4)メタボローム解析の可能性

メタボロームまたはメタボロミクスは、代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定して、環境や疾患をはじめとする様々な要因により変化する代謝物から細胞の機能解析や、各疾患の診断応用などを研究する最も新しいオミックスである。本分野で使用される主な測定機器としては、NMR(核磁気共鳴)やMS(質量分析装置)が用いられる。しかし、NMRは感度が低く、一度に測定できる物質も少数に限られているため、網羅的な測定を行うためにはMSを用いられる方が一般的である。また、MSを単独で用いると同じ m/z の物質を個別に定量することができないため、GC(ガスクロマトグラフィー)、LC(液体クロマトグラフィー)、CE(キャピラリー電気泳動)などの分離装置と結合して使うことが一般的である。それぞれに得意とする分析対象が違っており、単一手法で全ての代謝物測定を網羅することはできず、対象に合わせて適切な選択が要求される。

慶應大学・先端生命科学研究所(以下先端研)では、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。

先端研ではCE-TOFMSを用いて唾液中に含まれる代謝物のパターンから口腔癌、乳癌、膵癌を高精度に検出する方法の開発も行った。症例数のケースコントロールスタディであるがこの中で膵癌と健常者は、ROC(受動者動作特性)曲線下の面積が 0.969 という高い精度で見分けることができている。臨床情報と合わせた解析を更に進め、どの程度まで早期であれば検出可能か、あるいは喫煙・年齢などの唾液中代謝物の変動要因と合わせた解析を行い、マーカーの評価を行う必要がある。

5)これまでの研究成果

申請者らは膵疾患の血液をサンプルとしてCE-TOFMSを基盤としたメタボローム解析により膵癌に特徴的な代謝産物の特定を行った。測定された数百の代謝産物から健常者と比較し膵癌に特徴的な代謝産物を抽出した。より簡便な検査法を目指すため唾液中の代謝産物解析へと研究を進め、膵癌患者の唾液メタボローム解析を行った。

CE-TOFMSにより唾液中の288代謝物を同定・定量し、膵癌症例の唾液中で健常者に比し顕著に濃度が上昇するポリアミン類が存在した。同定された物質の濃度は、膵癌切除症例において術後に低下していることも確認できた。

乳癌症例に関しても乳癌患者60例の唾液を採取し、対照として20名の健常女性から得られた唾液を用いた。Mann-Whitney testにて乳癌患者と健常者の間に有意差を認められた代謝物は61物質であったが、false discovery rateにて補正後は50物質となった。乳がん患者における濃度が健常者の3倍以上の物質は34物質、10倍以上の物質は4物質であった。これら4物質の濃度は術前化学療法施行後では低下する傾向がみられた。4物質におけるROC曲線下の面積は高値であった。

メタボロームで測定する代謝プロファイルは、トランスクリプトームやプロテオームに比べて測定のための処理が簡便であり、定量性・再現性も高いため、臨床応用を考慮した場合の利点は大きい。一方、唾液の健常者の横断的な研究例は存在しなく、どのような因子が唾液中代謝物に影響を及ぼすかを調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、将来的にがんを含む様々な疾患検査を唾液で検査することを長期的な目標として、まずは健常者の唾液を大規模な症例で採取し、データベースを構築することを目的とする。検診にて得られる情報との統合解析を行い、どのような因子が唾液中の代謝物に影響を与えるかを調査する。

3. 研究の方法

東京医科大学病院健診予防医学センターにて、同意の得られた被験者より唾液を採取し、慶應義塾先端生命科学研究センターにてCE-TOFMSを用いたメタボローム解析を行い、その後、ほかの検査所見等と併せデータ解析を行う。唾液は8時間絶食で午前中に採取時間を限定する。採取後速やかにディープフリーザにて凍結し保存する。測定時には解凍後、限外ろ過を行い除タンパクを行う。この後、内部標準物質を添加して質量分析装置の感度のブレを補正する仕組みを入れる。大規模な測定になるために、一度にすべてを測定することができず、複数のバッチにて測定しなければならない。このため品質評価と制

御のために補正や再測定を行う基準としてQC(Quality Control)サンプルを準備してこれを各バッチにて測定し、バッチ間ごとの誤差がないかを確認した。

4. 研究成果

研究期間中に2442症例の唾液検体を取得した。このうち、測定が終了した882症例の測定を用いて、約200物質の定量値のデータを取得した。これらの代謝物の濃度パターンを俯瞰的に解析するために、多変量解析の一つである主成分分析(PCA)を用い、代謝物の濃度パターンがどのようなアンケート収集項目(性別やBMIなども含む)との関係があるかを調べた。主成分分析では内部で分散値を使って、多数の情報から特徴的な数個の主成分に次元を低下させる。このとき、欠損値の多いデータ(代謝物)を含むと、この欠損値の影響を強く受けるために、多くの検体で検出されている(検出限界以上の値が観測できている)代謝物を使い、PCAを実施した。

差が小さいものを選別し、更に欠損値には観測できた最小値の半分の定量値を用いて穴埋め処理を実施した。データがポワソン分布しているものは対数変換して正規分布を実施した。これらのフローを図1に示す。

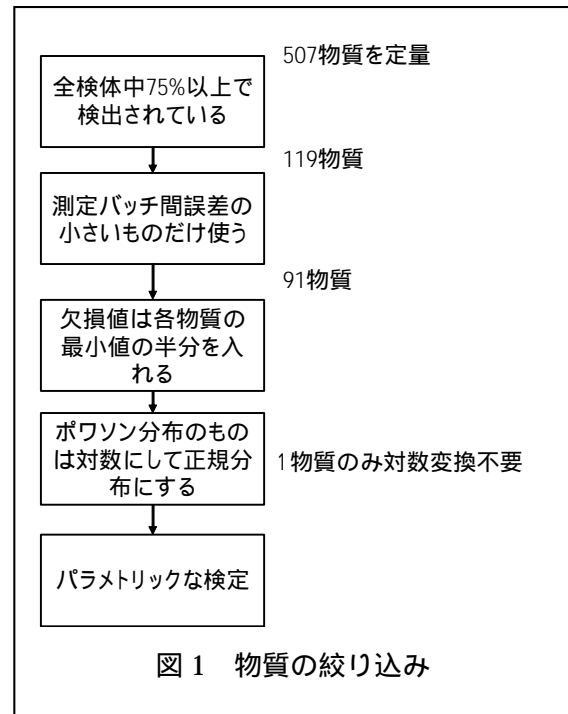


図1 物質の絞り込み

図2に主成分分析をした結果を示す。X軸(PC1)の正の値の(右側)に多くの代謝物が存在するが、負の値(左側)に存在する分子や、 $X=0$ 上にアミノ酸の一つであるアルギニン酸などが存在し、単に全般的に濃い薄いではなく個人ごとに様々な濃度パターンが含まれていることが示唆されている。Y軸(PC2)でも上下に様々な物質が散らばって

おり、同様に個人ごとのパターンが情報として含まれていることが示唆される。

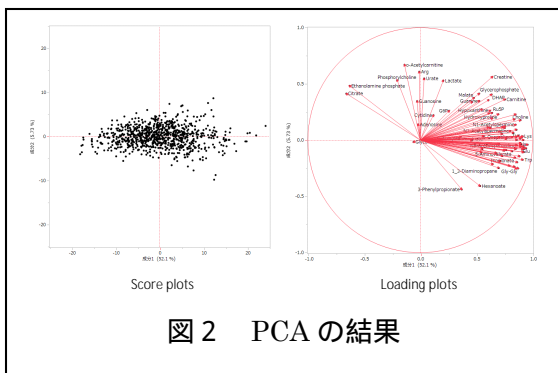


図 3 に解析の 1 例として、男女の情報を score plots に乗せた例を示す。赤色と青色のプロットが重なっており、特に偏りが見られない。ここからこの主成分では男女の違いが説明できない、(= 男女の影響が主成分に現れない) ことがわかる。これらをより客観的に行うために、表 1 に同様の解析で具体的な質問項目と主成分の違いを統計解析した結果を示す。

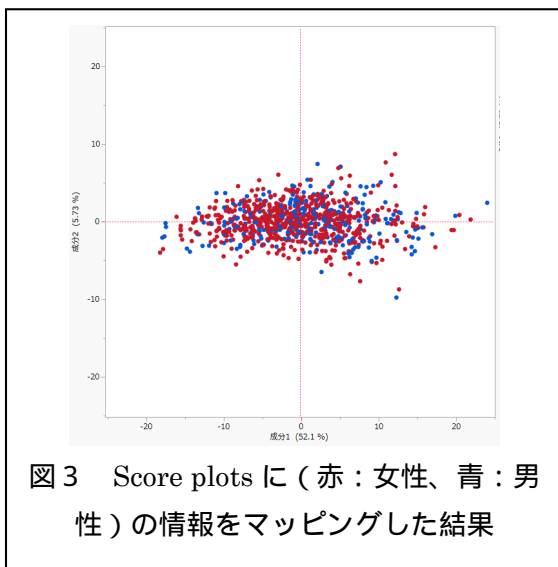


表 1 質問項目と主成分の関係

項目	回答 1	検定方法	検定値
a. 血圧を下げる薬	Y/N	Student's t-test	<0.0001
b. インスリン注射または血糖を下げる薬	Y/N	Student's t-test	0.04801
c. コレステロールを下げる薬	Y/N	Student's t-test	0.0231

a. 脳卒中 (脳出血・脳梗塞)	Y/N	Student's t-test	0.9166
b. 心臓病 (狭心症・心筋梗塞)	Y/N	Student's t-test	0.1059
c. 慢性の腎不全・人工透析	Y/N	1 症例だけはい	-
d. 貧血	Y/N	Student's t-test	0.2529
煙草を習慣的に吸っているか	Y/N	Student's t-test	0.4773
20 歳の時の体重から 10kg 以上増加している	Y/N	Student's t-test	<0.0001
1 回 30 分以上の汗をかく運動を週 2 回以上、1 年以上実施している	Y/N	Student's t-test	0.3338
日常生活において歩行または同等の身体活動を 1 日 1 時間以上実施している	Y/N	Student's t-test	0.3669
ほぼ同じ年齢の同性と比較して歩くのが早い	Y/N	Student's t-test	0.6115
この 1 年間で体重の増減が ±3kg 以上あった	Y/N	Student's t-test	0.4197
睡眠で休養が十分取れている	Y/N	ANOVA	0.6794
朝食を抜くことが週に 3 回以上ある	Y/N	Student's t-test	0.0002
就寝前の 2 時間以内に夕食を取ることが週に 3 回以上ある	Y/N	Student's t-test	0.4505
夕食後に間食を	Y/N	Student's t-test	0.0001

取ることが週に3回以上ある		t-test	
人と比較して食べる速度が速い	速い/普通/遅い	ANOVA	0.0022
お酒を飲む頻度	毎日/時々/のまない	ANOVA	0.3294
生活習慣の改善について保健指導を受ける機会があれば利用しますか	Y/N	Student's t-test	0.8529

表1の結果より、血糖、血圧を下げる薬を飲んでいるといった薬剤の影響や、20歳からの体重増加が10kg以上などの肥満の影響が、他の因子と比べて相対的に影響が大きいことがわかる。また、性別や年齢、BMIなどの項目と主成分との関係を表2に示す。年齢、BMIなどのP値が小さいが、これ以外に血圧、HbA1c、TG、LDLなどの結果が大きく影響している。肥満等の影響が大きいことがわかる。いずれに体内の代謝の変化が推測される因子であり、体内の代謝の変化が唾液にも影響があることが観測された。

今後、採取できた残りの検体の解析も実施してこれら観測できた現象の評価試験を行う。特にがん疾患に関してもその代謝異常が多く報告されている。このため生体内のがんの代謝異常も唾液に影響がある可能性も考えられる。今回はCE-TOFMSを用いて水溶性の物質を中心に解析を行ったが、メタボローム解析はこの手法だけで全ての物質を調べられているわけではなく、他の方法による解析により、より広い範囲で物質をみる必要性もある。

表2

項目	検定	P値	備考
性別	T-test	0.00557	
年度末年齢	ANOVA	0.0001	10台ごと
BMI	ANOVA	0.0001	18.5-25
血圧H_平均値 結果値	T-test	0.0028	140未満
血圧L_平均値 結果値	T-test	0.0188	90未満

HbA1c(NGSP) 結果値	T-test	0.0044	6.0 未満
TG結果値	T-test	0.0065	150 未満
LDL-C結果値	T-test	0.0015	120 未満
HDL-C結果値	T-test	0.3567	40以上
AST(GOT)結果値	T-test	0.3071	35以下
ALT(GPT)結果値	T-test	0.0806	35以下
γGTP結果値	T-test	0.198	55以下

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩淵 篤敬 (Atsuhiko, iwabuchi)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10256208

(2)研究分担者

砂村 眞琴 (Makoto, Sunamura)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：10201584

土田 明彦 (Akihiko, Tsuchida)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：50207396

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

池田 徳彦 (Norihiko, Ikeda)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：70246205