

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05408

研究課題名(和文) 唾液メタボローム解析による乳癌診断・治療薬選択支援リキッドバイオプシー法の確立

研究課題名(英文) Establishment of liquid biopsy method for breast cancer diagnosis by salivary metabolomics

研究代表者

北川 雄光 (Kitagawa, Yuko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：20204878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は唾液によるリキッドバイオプシーが乳癌の診断に有用であり、将来の臨床試験における基礎的根拠を確立することを目的とする。全166例の解析から260種類の代謝産物が検出され、乳癌症例群で頻出する105の代謝産物を同定した。健常者群と浸潤癌群の比較において、31の代謝産物において有意な発現量の差が認められ、乳癌患者においてはポリアミンとアミノ酸濃度が比較的高いことが同定された。これらを用いて予測モデルの構築を行ったところROCカーブのAUCは0.864と高い予測精度を確立することが可能であった。本研究から、唾液を用いたメタボローム解析により乳癌を健常者から抽出することが可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健常者と乳癌患者を唾液により鑑別することが可能となれば、触診や画像による乳癌検診を受けるべきハイリスク患者のスクリーニング法として、過剰医療の提供を防ぐことが可能であり、本邦だけではなく、広く海外においても有用性を示すことが可能である。また唾液を用いた、liquid biopsyによる個別医療化に向けた研究は、学術的な成果だけでなく、高額化した昨今の癌治療においては、医療経済的なインパクトが高い。これら技術的・臨床的な背景をもとに本研究計画を立案した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to explore new salivary biomarkers to discriminate breast cancer patients from healthy controls. One hundred sixty-six unstimulated saliva samples were collected from 101 patients with invasive carcinoma of the breast (IC), 23 patients with ductal carcinoma in situ (DCIS), and 42 healthy controls (C). Of the 260 quantified metabolites, polyamines were significantly elevated in the saliva of patients with breast cancer. The ADTree with an ensemble approach showed higher accuracy ($P < 0.0001$). These data indicated that combinations of salivary metabolomics with the ADTree-based machine learning methods show potential for non-invasive screening of breast cancer.

研究分野：外科学

キーワード：リキッドバイオプシー 乳癌 唾液 メタボローム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ホルモン陽性・HER2陰性の進行再発乳癌に対する治療薬には、タモキシフェンに加えて、閉経後の患者にはアロマターゼ阻害剤(AI 剤)・フルベストラントなど内分泌治療薬の選択肢が増加した。さらに mTOR 阻害剤や、欧米で使用されている CDK4/6 阻害剤が本邦にも導入される予定であり、薬剤選択の幅は広がって行くことが予想される。しかし、これら分子標的薬の併用療法は、内分泌治療薬単剤と比較して、副作用やコストの面で、患者負担や医療費への配慮が必要であるが、どの場面で使用することが最も効果が見込めるかの基準となる、バイオマーカーや分子生物学的根拠は確定していない。さらに、内分泌治療から、抗癌剤へ治療を切り替えるべきタイミングについても、個々の臨床家の経験に基づいて判断されており、確固とした指標は存在しない。

この問題に対応するために、再発巣の生検組織検体に対する生物学的な解析を通じて、薬剤選択を行う試みがなされているが、転移巣の生検は侵襲的な処置であり、どの施設においても簡単に可能な手技ではない。そのため、より侵襲の少ない血中の circulating tumor cell (CTC)や、遊離 DNA(cell free DNA: cfDNA)から遺伝子変異を同定するリキッドバイオプシー法の開発が試みられているが、いずれも臨床応用には至っていない。

我々は、これまでに唾液が体内の様々な情報を反映している体液として、口腔内のみならず全身性疾患の診断応用への可能性を模索してきた。研究分担者である、慶應義塾大学・先端生命科学研究所の杉本らは、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、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・TCA 回路に代表される中心炭素代謝や、核酸・アミノ酸合成など、エネルギー代謝に関連する主要な代謝物である、イオン性物質測定を得意とする。そのため、これらの代謝異常が多く認め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有用な方法であることが立証されている。

唾液を用いた乳癌診断の取り組みは、本研究開始時には、国内・国外でもほとんど行われていないのが現状であり、用いられる解析技術、CE-TOFMS を用いた測定法は研究代表者らが所有している特許技術であり、独占的に研究を進めることが可能であった。

欧米を中心として、乳癌転移巣の生検検体の遺伝子変異に対応した薬剤を使用することで、予後の延長が見込めるか否かの臨床試験が施行中であり(SAFIRO2 試験、UMBRELLA 試験など)、近未来の乳癌治療コンセプトとして、受け入れられつつある。しかし、これら臨床試験のベースとなる遺伝子変異と対応薬剤の奏効の関連性は、必ずしも高いエビデンスを持つわけでは無く、見切り発車の要素も伺える。そのため将来的に本邦において、同様の臨床試験を行う際の基礎的な知見として、本研究を遂行することは、非常に意義深いと考えられる。

健常者と乳癌患者を鑑別することが可能となれば、触診や画像による乳癌検診を受けるべきハイリスク患者のスクリーニング法として、過剰医療の提供を防ぐことが可能であり、本邦だけでは無く、広く海外においても有用性を示すことが可能である。また唾液を用いた、liquid biopsy による個別医療化に向けた研究は、学術的な成果だけでなく、高額化した昨今の癌治療においては、医療経済的なインパクトが高い。これら技術的・臨床的な背景をもとに本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

我々は事前の研究から、より低侵襲に採取可能な唾液に含有される代謝物のメタボローム解析により、未治療の乳癌患者と健常者を良好に鑑別可能であることを確認した。組織の摘出や生検を施行せずに、血液などを用いて固形癌の診断やバイオマーカーの探索を行うリキッドバイオプシー法が提唱されていることから、この知見をもとに、本研究ではより大規模な多施設共同研究とすることで、画像診断に代わる、唾液による早期乳癌のスクリーニング技術を確立する。さらに、進行再発乳癌患者の薬物療法による病勢の変化と、唾液メタボローム解析の発現パターンに、相関が認められるかを検証する。これにより、唾液によるリキッドバイオプシーが薬剤選択の基準として使用可能である事を示し、将来の臨床試験における基礎的根拠を確立することを目的とする。

現在までにこのメタボローム解析を通じて、唾液中に含まれる代謝物の発現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確立を試み、予備研究の段階では特に乳癌患者を高い精度で健常者と鑑別することが可能であ

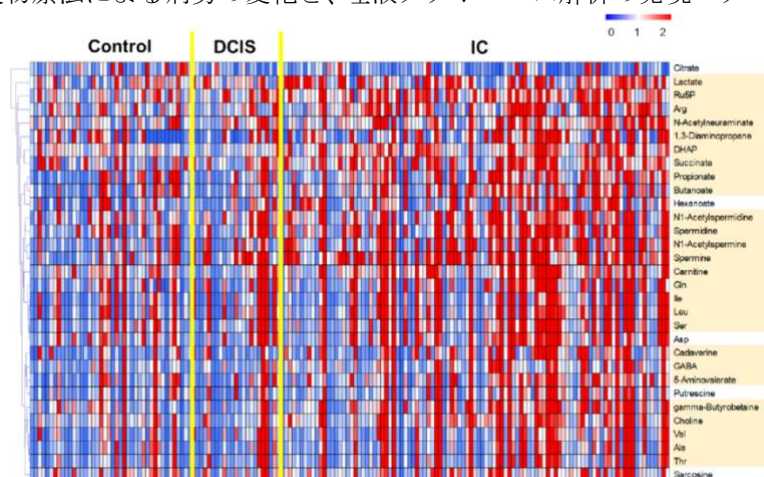


図1 唾液代謝物濃度によるヒートマップ

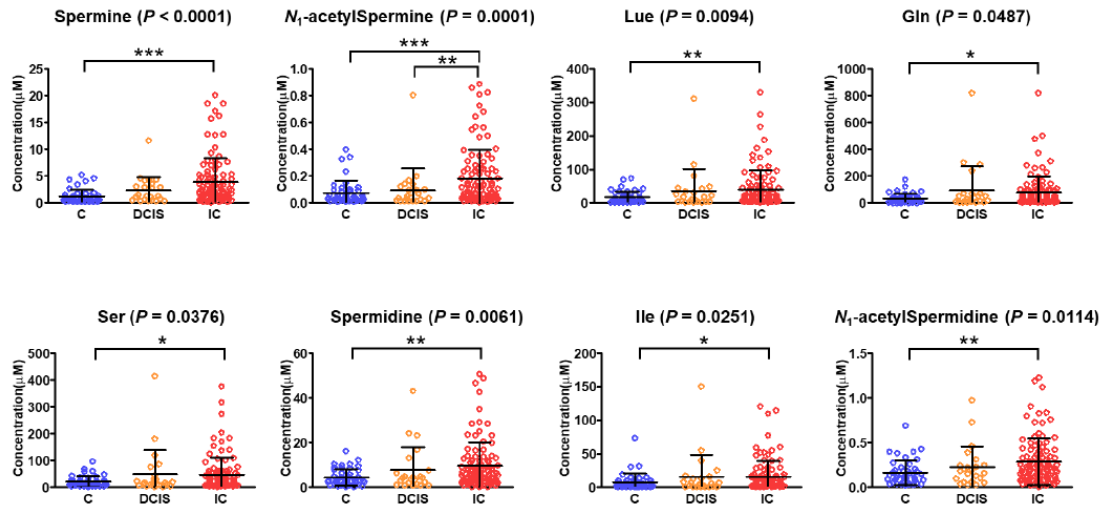


図2 各群における唾液由来ポリアミンおよびアミノ酸濃度定量値

った。血液と比較しても、低侵襲・低コストに採取が可能であるにも関わらず、代謝物の発現の差は同じ患者における血漿と比較して、唾液でむしろ頻度が高く、検体としての有用性が示唆された。また、内分泌および抗癌剤による治療前・治療後の代謝物の発現パターンにも変化が認められ、病勢の変化との相関が期待される結果であった。以上の予備実験の結果から、我々が開発した「癌用唾液バイオマーカーの測定法（特許出願 2013 - 223738）」を用いて、乳癌検診に変わる新たなスクリーニング法としての有用性のみならず、進行再発乳癌の病勢の変化を生物学的に感知することで、薬剤選択の補助となるバイオマーカーとしての使用が可能であるとの仮説を立てた。本研究課題では、この仮説を実証することで、唾液メタボローム解析をリキッドバイオプシー法の一分野として確立することを目的として想起された。

3. 研究の方法

(1) 唾液メタボロームにより、乳癌患者を健常者と鑑別可能するスクリーニング法の確立

これまでの予備実験の結果によると、唾液より 205 の代謝物が定量可能であり、そのうち健常者と手術可能早期乳癌患者（未治療）の間で有意差が認められた物質は約 60 種類であり、唾液により良好に乳癌患者を健常者と鑑別することが可能であった。そのため本研究では、

- ① 乳癌患者 400 名・健常者 200 名を目標として唾液・血液サンプルを採取し、トレーニングセットとして鑑別に有用な代謝物をあらためて確定し、診断アルゴリズムを作成する。
- ② 平成 29 年以降は、本法を各施設の乳癌検診センターを受診する患者に適用し、エコー・マンモグラフィーなどの画像診断および針生検による最終診断結果と照らし合わせる。
- ③ 正診率・感度・特異度などのデータを算出し、早期乳癌のスクリーニング法として妥当か否かを検証する。

④ 唾液採取法は、既に確立した方法である **Passive Drool** 法を用いて行うが、施設間による代謝産物発現のばらつきが無いかを検証し、最適な唾液採取方法の検討を行う。鑑別に有用な代謝物を確定する過程で、**CE-TOFMS** による測定技術の面でも改善が可能かについて検討していく。

(2) サブタイプごとに代謝物の発現パターンが異なるか否かの検証

(1) の副次的研究として、採取した乳癌患者唾液サンプルの代謝物質発現に、サブタイプごとの差が存在するか否かを検証する。既に予備実験として、細胞株の実験を施行しており、エストロゲン受容体 (ER) 陽性/HER2 陰性の乳癌細胞株 2 種類と、トリプルネガティブ乳癌細胞株 2 種類の代謝産物についてメタボローム解析を行った。その結果、両群間で複数の代謝産物に特定の発現パターンの差異が認められ、特にスペルミン・スペルミジン・グルタチオンなどの発現は特徴的であった。また、グルコース代謝経路についても有意差はないものの、差が認められる傾向にあり、各細胞株の性質を表していると考えられた。これら前実験から、同様の差異が唾液においても認められる可能性は高いと判断し、①で採取、測定された結果を統計学的に検討していく。

得られたデータは、後述の liquid biopsy としての有用性に関する検討に応用する。例えば、ホルモン感受性乳癌が、内分泌治療によって代謝産物発現パターンをトリプルネガティブ乳癌と同様に変化を生じた場合に、内分泌治療の奏効と関係するかを検討する。また、サブタイプのみならず、Ki67 index や核異型度など、乳癌の増殖・進展に関わる因子との相関も検討事項としていく。

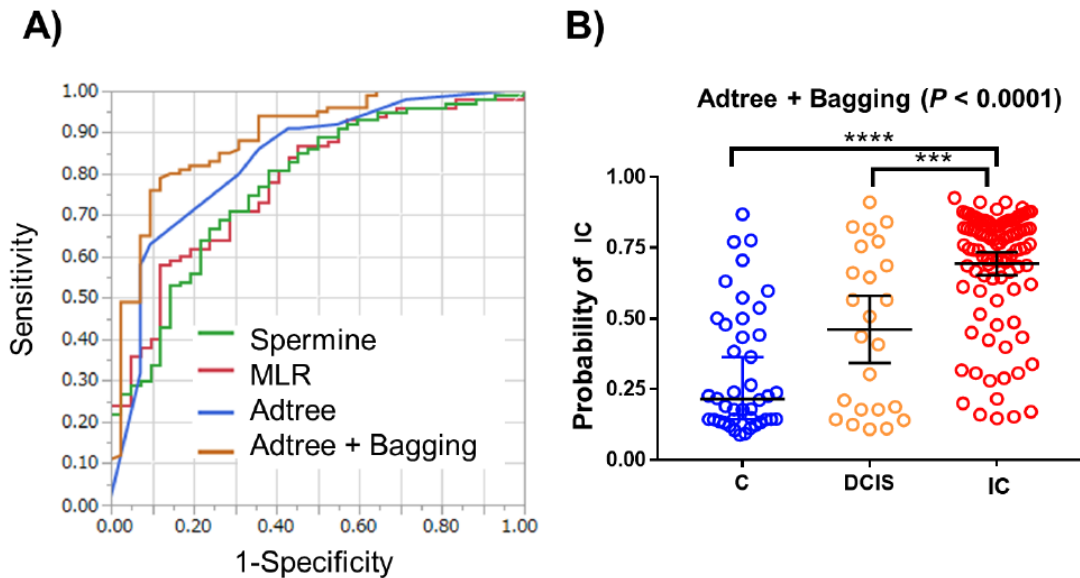


図3 A) 健常群・浸潤癌群予測モデル別のROCカーブ B) ADTree+Baggingモデルによる予測値

4. 研究成果

これまでに慶應義塾大学病院において計 166 名の唾液・血液サンプルが採取され、その内訳は浸潤癌 101 例、DCIS23 例、健常者症例 42 例であった。そのうち 2 例の良性乳腺疾患患者は健常人症例に含んでいる。浸潤癌の内訳は、浸潤性乳管癌 95 例、浸潤性小葉癌 2 例、粘液癌 2 例、アポクリン癌 1 例であった。

これらに対して、CE-TOFMS および LC-QQQMS により 260 種類の代謝産物が検出され、乳癌症例群で頻出する 105 の代謝産物を同定した。親水性代謝物については CE-TOFMS、ポリアミン類については CE-TOFMS をもしいてプロファイリングを行い、定量測定は LC-QQQMS を用いることで、精度の高い測定が唾液から行うことができることがわかった。

健常者群と浸潤癌群の比較において、31 の代謝産物において有意な発現量の差が認められた。

(図 1) 乳癌患者においてはポリアミンとアミノ酸濃度が比較的高いことが同定された。7 つの代謝産物において健常者群と浸潤癌群において有意差はあったが、浸潤癌群と DCIS 群の間では有意差を認めず、浸潤癌に特徴的な代謝産物の存在が確認された。さらに、N1-acetylSpermine は健常者群と浸潤癌群の間のみならず、DCIS 群と浸潤癌群の間にも有意差を認めた。(図 2) これらの結果を総合し、ROC カーブを作成したところ、スペルミンが最も高い AUC となる ROC カーブであった。(AUC=0.766) 複数の代謝産物を組み合わせた予測モデル構築のため、重線形回帰分析モデルを使用した。ステップワイズセレクションを行うと、スペルミンとともに ribulose-5-phosphate が抽出された。これら重線形回帰モデルによる ROC カーブの AUC は 0.790 とスペルミン単独予測よりも改善を認めた。

これに加えて、複数の Alternating decision tree (ADTree) model による予測値に対して、ブートストラップ集約(Bagging model)を用いて統合した新しい予測モデルの構築を行った。このモデルは 9 つの ADTree モデルを統合して予測に使用しており、このモデルによる ROC カーブの AUC は 0.864 と高い予測精度を確立することが可能であり、他の予測モデルと比較して有意に良好であった。(図 3)

乳癌のサブタイプごとの代謝産物の違いを検討したところ、5 つの代謝産物について Luminal A と Luminal B 間で有意差が認められた。また、N-acetylneuraminic acid のみ Luminal A と triple negative type の間で有意差を認めた。その他については、サブタイプ間で有意な差を認めた代謝産物を同定できなかった。(図 4)

本研究から、唾液を用いたメタボローム解析により乳癌を健常者から抽出することが可能であると考えられた。これらは、重線形回帰モデルや ADTree モデルを用いることで精度を高めることが可能であると考えられた。

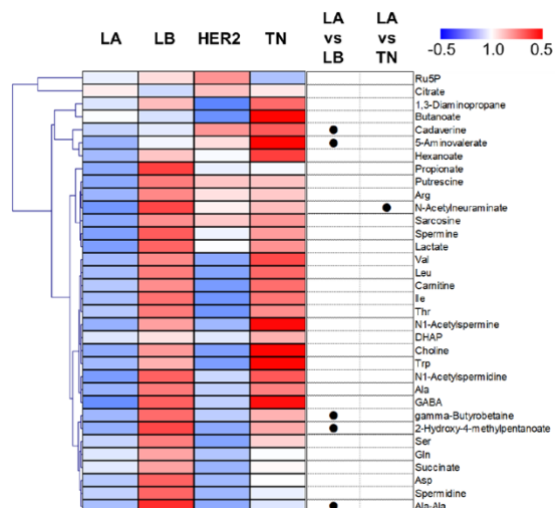


図4 各サブタイプごとにおける代謝物の差異

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Tomita A, Mori M, Hiwatari K, Yamaguchi E, Itoi T, Sunamura M, Soga T, Tomita M, Sugimoto M., Effect of storage conditions on salivary polyamines quantified via liquid chromatography-mass spectrometry. Sci Rep. 2018 Aug 13;8(1):12075. doi: 10.1038/s41598-018-30482-x. (査読あり)

2) Asai Y, Itoi T, Sugimoto M., Sofuni A, Tsuchiya T, Tanaka R, Tonozuka R, Honjo M, Mukai S, Fujita M, Yamamoto K, Matsunami Y, Kurosawa T, Nagakawa Y, Kaneko M, Ota S, Kawachi S, Shimazu M, Soga T, Tomita M, Sunamura M., Elevated Polyamines in Saliva of Pancreatic Cancer. Cancers (Basel). 2018 Feb 5;10(2). doi: 10.3390/cancers10020043. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 林田 哲

ローマ字氏名: HAYASHIDA, Tetsu

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 80327543

研究分担者氏名: 高橋 麻衣子

ローマ字氏名: TAKAHASHI, Maiko

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8桁) : 50348661

研究分担者氏名 : 関 朋子

ローマ字氏名 : SEKI, Tomoko

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8桁) : 70528900

研究分担者氏名 : 杉本 昌弘

ローマ字氏名 : SUGIMOTO, Masahiro

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 医学部

職名 : 特任准教授

研究者番号 (8桁) : 30458963

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 神野 浩光

ローマ字氏名 : JINNO, Hiromitsu

研究協力者氏名 : 石川 孝

ローマ字氏名 : ISHIKAWA, Takashi

研究協力者氏名 : 林 光弘

ローマ字氏名 : HAYASHI, Mitsuhiro

研究協力者氏名 : 砂村 真琴

ローマ字氏名 : SUNAMURA, Makoto

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。