

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10542

研究課題名(和文) がんのニオイ発生の分子機序解明と新しいがん診断法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the cancer odor and development of the new cancer diagnostic system

研究代表者

沖 英次 (OKI, eiji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70380392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らの研究グループはこれまでにイヌの嗅覚応答を用いる(がん探知犬)ことで、大腸がんを感度・精度ともに高く診断可能であることを見出ししてきた。このことはすなわち、イヌの嗅覚には応答可能なレベルでの揮発性化合物の存在を示唆している。私達は、がんの匂いをバイオマーカーとするため、細胞の培養液中の揮発成分に着目した。今回、乳がん細胞(MCF-7)培養液を用いたGC/MS、LC/MS(リクイッドクロマト質量分析計)の分析から揮発性成分および難揮発性成分を網羅的に回収し、特定の中鎖不飽和脂肪酸Xが乳がん細胞に特徴的な難揮発性代謝物であることを世界で初めて見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲にて採取可能な生体サンプルを用いて高感度・高精度ながん早期発見技術の確立は、まさに患者に優しいがん診断法となる。本研究成果は、尿1滴でのがん検査を可能とし、がん検診の受診率と正診率の向上、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。がんの発生は複数のがん関連遺伝子の変化に起因することが知られていることから、尿中代謝物によるがん細胞の発生の検知は、すなわち、当該代謝物による遺伝子変異の検知の可能性を示していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is thought that the research on the odor of cancer is also on the line of omics research. It is difficult to identify cancer-specific odorants buried in various environmental substances. However, it is expected that human will be able to acquire the technology, from the fact that they can be recognized by biological olfaction. We focused on volatile constituent of the culture medium of cancer cells to develop the new biomarker. We analyzed culture medium of the breast cancer cells (MCF-7) using GC/MS, LC/MS (liquid chromatography mass spectrometer). We collected volatility and slightly volatility substance cyclopaedically and found that specific middle chain unsaturated fatty acid X was the slightly volatility substance which is peculiar to breast cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：がんの匂い バイオマーカー 中鎖不飽和脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複数の研究機関が、犬の嗅覚を介してがんをニオイによって検出可能であることを報告してきた (BMJ 2004, Integr Cancer Ther 2006,2008, Gut2011)。しかし、がん探知犬は個体差や環境によって精度が左右されるため、臨床応用、研究に資する事には様々な点で困難である。そこで我々は、知能を有さず、人間の約 4 倍の嗅覚受容体遺伝子を持つ線虫 *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*) を用いてがんのニオイに対する化学走性を指標とするがん検出の可能性について解析した。その結果、線虫が、がん細胞培養液上清およびがん患者尿に対して誘引行動を示し、コントロール尿に対して忌避行動を示す事を発見した。242 検体 (早期がんを含むがん患者 24 検体、コントロール 218 検体) でのがん患者検出の精度は、感度 100%、特異度 95%と非常に高いものであった。線虫を用いたがん検出法において、早期を含む消化器癌 (食道、胃、結腸・直腸、膵臓、胆管、消化管間葉性)、前立腺癌、乳癌、悪性リンパ腫を網羅的に検出可能であることを確認している。線虫を用いたがん検出法は、そのままでも高精度で安価であり、世界規模でがん医療の改善に貢献すると考えられる。しかし、臨床応用を目指してさらなる研究の発展が必要である。

本システムにおいて、線虫におけるがんの検出は、感度、特異度ともに高いものの癌の部位による検討や発癌過程における検討、さらにはニオイに関連する遺伝子異常や代謝物の詳細な検討はなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、自然発がんマウスを使って、尿を採取し、がんの匂い発生のメカニズムを検討する予定であった。

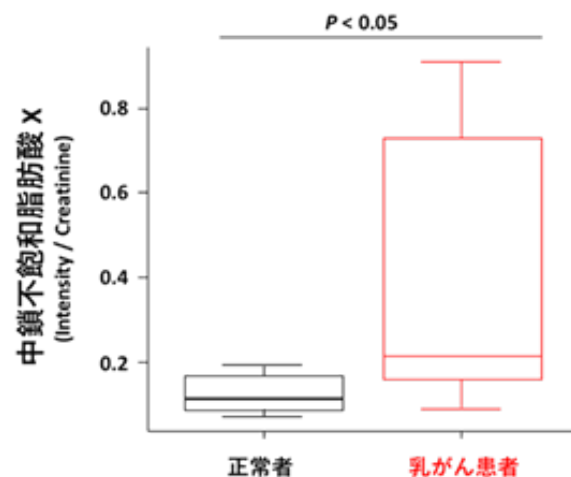
3. 研究の方法

がんの匂い、いわばがん由来の揮発性有機物質は過去の報告を確認すると、GC/MS(ガスクロマト質量分析計)、LC/MS(液体クロマト質量分析計)を等の様々な分析装置を用いて探索研究が行われている。これまで報告された 189 物質を検討すると、分子量 27~390.6 (中央値 120)、炭素数 0~24 (中央値) であり、報告物質の約 9 割が分子量 200 以下・炭素数 14 以下の比較的小さい VOC (Volatile organic compound: 揮発性有機化合物) の報告が多い。一般的に VOC は空気中に気体状態で存在が可能な沸点が約 250 以下の物を指す。メタン (C1) やエタン (C2) のような炭素数が低い化合物は沸点が約 -100 と低く、デカン (C10) のような炭素数が多い化合物は沸点が約 200 と高い。また VOC は 1 度揮発してしまうと急速にその物質が劣化するとされている。ここでがん探知犬は、収集から 5 年以上経った呼気検体の匂いでもがんの匂いとして区別できることから、炭素数が少なく分子量が小さい有機化合物のような揮発性の高い物質より、炭素数が多く分子量が大きい物質を GC/MS、LC/MS (リクイッドクロマト質量分析計) にて検出することとした。

4. 研究成果

我々は当初から尿中のがん匂い物質の検出を試みるため、マウスを使用した検討を進めていたが、自然発がんマウスの尿での検討は困難であった。そこで、バイオマーカーとしての安定性と存在量を考慮して、がん細胞の中程度~難揮発性成分に着目した。今回は乳がん細胞 (MCF-7) 培養液を用いた GC/MS、LC/MS (リクイッドクロマト質量分析計) の分析から、揮発性~難揮発性成分を網羅的に回収し、特定の中鎖不飽和脂肪酸 X が乳がん細胞に特徴的な難揮発性代謝物であることを世界で初めて見出した (特願 2018-53010、論文投稿準備中)。具体的には、乳がん細胞株 MCF-7 培養液中より、正常線維芽細胞株 KMST-6 培養液中にはほとんど存在しない特徴的な 2 種の低

揮発性化合物 (がん細胞特異的脂肪酸代謝中間物である中鎖不飽和脂肪酸類) を GC-MS 分析により同定している。さらに特筆すべきことに、見出した中鎖不飽和脂肪酸群が乳がん患者由来の尿 (ステージ II 患者尿) においても存在する (0.84 ppb) ことが初めて確認され、正常者 (乳がん検査陰性) 由来の尿においては、極わずかであること (クレアチニン補正值として (検体数 6/群) : 図参照) を見出し、当該代謝物が幾多の論文でがんバイオマーカーとして報告されている VOCs (高揮発性物質 : hexanal, heptanal, octanal, 等) の前駆体であることを明



らかにした(未発表データ)。すなわち、これまでに報告されている呼気等においてがんバイオマーカーとして報告されている VOCs と比較して、より早期のがん発生段階での検出の可能性が期待される。尿検体の採取については、すでに 354 検体の尿を取得済み(うち、正常 220 検体、乳がん 27 検体、大腸がん 49 検体、胃がん検体 43 検体)である。尿中の不飽和脂肪酸群の定量法についてもすでに確立しており、今後は中鎖不飽和脂肪酸の早期がん診断バイオマーカーとしての妥当性を検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件 すべて査読あり)

1. Oki E, Shimokawa M, Ando K, Murata A, Takahashi T, Maeda K, Kusumoto T, Munemoto Y, Nakanishi R, Nakashima Y, Saeki H, Maehara Y. Effect of lateral lymph node dissection for mid and low rectal cancer: An ad-hoc analysis of the ACTS-RC (JFMC35-C1) randomized clinical trial. *Surgery* 2019; 165(3):586-592.
2. Imamura Y, Watanabe M, Toihata T, Takamatsu M, Kawachi H, Haraguchi I, Ogata Y, Yoshida N, Saeki H, Oki E, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Mine S, Hiki N, Baba H, Sano T. Recent Incidence Trend of Surgically Resected Esophagogastric Junction Adenocarcinoma and Microsatellite Instability Status in Japanese Patients. *Digestion* 2019; 99(1):6-13. doi: 10.1159/000494406. Epub 2018 Dec 14.
3. Denda T, Sakai D, Hamaguchi T, Sugimoto N, Ura T, Yamazaki K, Fujii H, Kajiwara T, Nakajima TE, Takahashi S, Otsu S, Komatsu Y, Nagashima F, Moriwaki T, Esaki T, Sato T, Itabashi M, Oki E, Sasaki T, Sunaga Y, Ziti-Ljajic S, Brillac C, Yoshino T. Phase II trial of aflibercept with FOLFIRI as a 2nd-line treatment for Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 2019; 18(10):13943.
4. Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X, Li T, Xu D, Schumacher SE, Puschhof J, McFarland J, Zou C, Dulak A, Henderson L, Xu P, O'Day E, Rendak R, Liao WL, Cecchi F, Hembrough T, Schwartz S, Szeto C, Rustgi AK, Wong KK, Diehl JA, Jensen K, Graziano F, Ruzzo A, Fereshetian S, Mertins P, Carr SA, Beroukhim R, Nakamura K, Oki E, Watanabe M, Baba H, Imamura Y, Catenacci D, Bass AJ. Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition. *Nat Med* 2018; 28(10):018-0022
5. Tsuchihashi K, Ito M, Moriwaki T, Fukuoka S, Taniguchi H, Takashima A, Kumekawa Y, Kajiwara T, Yamazaki K, Esaki T, Makiyama A, Denda T, Satake H, Suto T, Sugimoto N, Katsumata K, Ishikawa T, Kashiwada T, Oki E, Komatsu Y, Okuyama H, Sakai D, Ueno H, Tamura T, Yamashita K, Kishimoto J, Shimada Y, Baba E. Role of Predictive Value of the Modified Glasgow Prognostic Score for Later-line Chemotherapy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 29(18):30206-8
6. Tanioka H, Miyamoto Y, Tsuji A, Asayama M, Shiraishi T, Yuki S, Kotaka M, Makiyama A, Shimokawa M, Shimose T, Masuda S, Yamaguchi T, Komatsu Y, Saeki H, Emi Y, Baba H, Oki E, Maehara Y. Prophylactic Effect of Dexamethasone on Regorafenib-Related Fatigue and/or Malaise: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Study in Patients with Unresectable Metastatic Colorectal Cancer (KSCC1402/HGCSG1402). *Oncology* 2018; 7(000486624):000486624.
7. Taniguchi D, Saeki H, Nakashima Y, Kudou K, Nakanishi R, Kubo N, Ando K, Oki E, Oda Y, Maehara Y. CD44v9 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor outcomes in

- esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2018; 7(12):6258-6268. doi: 10.1002/cam4.1874. Epub 2018 Nov 26.
8. Shu S, Iimori M, Nakanishi R, Jogo T, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Changes in HER2 Expression and Amplification Status Following Preoperative Chemotherapy for Gastric Cancer. *In Vivo.* 2018; 32(6):1491-1498. doi: 10.21873/invivo.11405.
 9. Shibata T, Tokunaga E, Hattori S, Watari K, Murakami Y, Yamashita N, Oki E, Itou J, Toi M, Maehara Y, Kuwano M, Ono M. Y-box binding protein YBX1 and its correlated genes as biomarkers for poor outcomes in patients with breast cancer. *Oncotarget.* 2018; 9(98):37216-37228. doi: 10.18632/oncotarget.26469. eCollection 2018 Dec 14.
 10. Saeki H, Oki E, Kashiwada T, Arigami T, Makiyama A, Iwatsuki M, Narita Y, Satake H, Matsuda Y, Sonoda H, Shimokawa M, Maehara Y, Kyushu Study Group of Clinical C. Re-evaluation of HER2 status in patients with HER2-positive advanced or recurrent gastric cancer refractory to trastuzumab (KSCC1604). *Eur J Cancer* 2018; 105(doi):41-49.
 11. Oki E, Kato T, Bando H, Yoshino T, Muro K, Taniguchi H, Kagawa Y, Yamazaki K, Yamaguchi T, Tsuji A, Iwamoto S, Nakayama G, Emi Y, Touyama T, Nakamura M, Kotaka M, Sakisaka H, Yamanaka T, Kanazawa A. A Multicenter Clinical Phase II Study of FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as First-line Therapy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: QUATTRO Study. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 9(17):30313-4.
 12. Nakanishi R, Oki E, Sasaki S, Hirose K, Jogo T, Edahiro K, Korehisa S, Taniguchi D, Kudo K, Kurashige J, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Saeki H, Maehara Y. Sarcopenia is an independent predictor of complications after colorectal cancer surgery. *Surg Today* 2018; 48(2):151-157
 13. Korehisa S, Oki E, Iimori M, Nakaji Y, Shimokawa M, Saeki H, Okano S, Oda Y, Maehara Y. Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability. *Int J Cancer* 2018; 142(4):822-832.
 14. Korehisa S, Ikeda T, Okano S, Saeki H, Oki E, Oda Y, Hashizume M, Maehara Y. A novel histological examination with dynamic three-dimensional reconstruction from multiple immunohistochemically stained sections of a PD-L1-positive colon cancer. *Histopathology* 2018; 72(4):697-703.
 15. Kato K, Satoh T, Muro K, Yoshikawa T, Tamura T, Hamamoto Y, Chin K, Minashi K, Tsuda M, Yamaguchi K, Machida N, Esaki T, Goto M, Komatsu Y, Nakajima TE, Sugimoto N, Yoshida K, Oki E, Nishina T, Tsuji A, Fujii H, Kunieda K, Saitoh S, Omuro Y, Azuma M, Iwamoto Y, Taku K, Fushida S, Chen LT, Kang YK, Boku N. A subanalysis of Japanese patients in a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial of nivolumab for patients with advanced gastric or gastro-esophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2). *Gastric Cancer* 2018; 1(10):018-0899.
 16. Edahiro K, Iimori M, Kobunai T, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Kataoka Y, Niimi S, Wakasa T, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Thymidine Kinase 1 Loss Confers Trifluridine Resistance without Affecting 5-Fluorouracil Metabolism and Cytotoxicity. *Mol Cancer Res* 2018; 4:1541-7786.

17. Bando H, Shimodaira H, Fujitani K, Takashima A, Yamaguchi K, Nakayama N, Takahashi T, Oki E, Azuma M, Nishina T, Hironaka S, Komatsu Y, Shitara K. A phase II study of nab-paclitaxel in combination with ramucirumab in patients with previously treated advanced gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2018; 91:86-91.(doi):10.1016/j.ejca.2017.11.032. Epub 2018 Jan 30.
18. 園田英人, 沖英次, 田中充, 松井利郎, 小野寺武, 都甲潔, 佐藤悠二, 前原喜彦. 【外科医のがん研究】 がんの匂いセンサ開発に向けての研究. 日本外科学会雑誌 2018; 119(3):272-277.
19. 園田英人, 沖英次, 田中充, 松井利郎, 小野寺武, 都甲潔, 佐藤悠二, 前原喜彦. 【がんの早期診断】 がんの匂いの研究. 癌と化学療法 2018; 45(6):911-915.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

出願番号: PCT/JP2019/ 7317

発明者: 池田哲夫, 佐々木駿, 沖英次, 沖原伸一郎

発明の名称: 組織の接合用部材及びその使用

出願人: 国立大学法人九州大学

出願日: 2018年03月02日

出願番号: PCT/JP2018/013763

発明者: 池田哲夫, 沖英次

発明の名称: ヘモグロビン定量装置、ヘモグロビン定量方法及びヘモグロビン定量プログラム、並びに施術支援装置

出願人: 国立大学法人九州大学

出願日: 2018年03月30日

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 佐伯浩司

ローマ字氏名: Hiroshi Saeki

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学病院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 80325448

研究分担者氏名: 園田英人

ローマ字氏名: Hideto Sonoda

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 医学研究院

職名: 共同研究員

研究者番号(8桁): 00465725

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。