

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02868

研究課題名（和文）新規概念によるNMR測定を用いた乳がん血清診断法の開発

研究課題名（英文）Development of breast cancer serum diagnostic method using NMR measurement based on a new concept

研究代表者

戸井 雅和（Masakazu, Toi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10207516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、我々が開発を行ってきた「モード解析の概念を取り入れたNMR分析」という新しい血清診断法を乳がんの臨床診断に応用できるかどうかを、全323検体からなるデータセットの比較/統合解析を行うことで検証した。その結果、現行の手法では「乳がんと健常者」、「浸潤がんと非浸潤がん」、「リンパ節転移の有無」といった2群の識別では比較的良好な性能を有することが明らかになった一方、「乳がんのサブタイプ」といった4群以上の識別においては性能が十分でない可能性が示唆された。また、測定時期や測定機器が異なるデータを較正して統合解析する手法の開発など、臨床応用に向けて必要な新たな課題も明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液を用いた乳がんの診断法には一般的な腫瘍マーカー検査や、循環腫瘍DNA（ctDNA）などがある。今回の研究では、「モード解析の概念を取り入れたNMR分析」を用いることで、乳がんの有無、浸潤の有無、リンパ節転移の有無といった、これまで手術や生検などでしか得られることができなかった情報を、血液を用いて診断できる可能性が示唆された。このような診断は、既存の血液診断法（腫瘍マーカーなど）では不可能であり、実際に臨床応用に結びつけば、患者負担を低減できる革新的な技術になると考えられた

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated breast cancer diagnosis by NMR-based modal analysis. Totally, 323 samples were analyzed. The developed method showed good discrimination abilities for (1) breast cancer and healthy subjects, (2) invasive cancer and non-invasive cancer, and (3) presence or absence of lymph node metastasis. Meanwhile, breast cancer subtypes could not be clearly discriminated. The development of a calibrating method eliminating unexpected bias caused by multiple batches should be developed.

研究分野：乳腺外科

キーワード：NMR 乳癌 診断

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は「振動工学におけるモード解析の概念を取り入れた NMR 分析」という新たな発想に基づく血清診断法を開発してきた。振動工学の分野では、構造物固有の動的構造特性（モード）を決定し、建造物の耐震性や機械の劣化の程度を評価するモード解析と呼ばれる手法がある。我々は世界に先駆けて、このモード解析の概念を NMR 分析に応用することで新規血清検査法の開発に成功した（特許第 6281973 号）。本研究開始までに行った予備的検討では、1) 乳がん患者と非乳がん者、2) がんの浸潤の有無、3) リンパ節転移の有無、4) 乳がんのサブタイプ、をモードの違いで識別することができた。

乳がんの治療成績は「早期発見」への取り組みと、「治療の最適化」の進歩によって向上してきた。乳がんの「治療の最適化」のためには正確な「病期診断（がんの浸潤やリンパ節転移の有無など）」と「病態診断（生物学的特性にもとづいたサブタイプ分類）」の情報が必要となるが、これらの診断には、生検・手術によるがん組織の採取が必須であるために患者負担は大きく、転移性乳癌などの生検困難例への対応や、検査精度の問題など解決すべき様々な課題がある。このため、血液などの体液試料を用いた、簡便かつ正確な診断法の開発が世界的な規模で精力的に続けられている。

本研究では、我々が開発してきた血清を用いた NMR モード解析の手法を乳がんの「存在診断（乳がん患者の検出）」、「病期診断（がんの進行度の診断）」、「病態診断（乳がんの生物学的特性の判別）」といった複合的な臨床診断への応用し、実臨床への導入に向けてさらなるブラッシュアップを行うべく計画されたものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の開発した NMR モード解析を用いた血清分析技術をさらに進歩させ、

① 乳がん患者の検出<存在診断>

② 乳がんの進行度の判別（リンパ節転移、浸潤の有無の判別など）<病期診断>

③ 乳がんのサブタイプ診断<病態診断>

に関するモデルの診断精度を実臨床へ応用可能どうかを検証し、そのブラッシュアップを行うことである。

3. 研究の方法

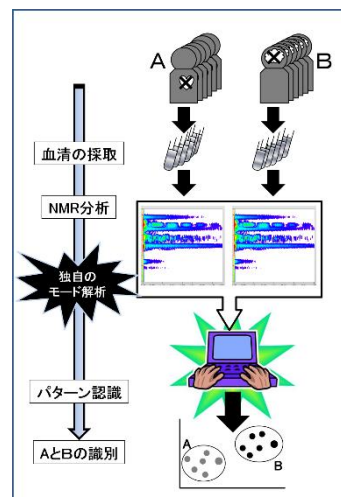
(1) 血液（血清）サンプル・臨床データの収集方法

京都大学乳腺外科と連携施設で運用する BioBank から原発性乳がん患者血清（診断時に採取したもの）および、非乳がん者血清を用いてこれまでに作成した診断モデルの検証を行い、モデルのさらなるブラッシュアップを行う。血清は血清分離後、速やかに -80°C にて凍結保管されているもので、1症例当たり 500ul 確保する。また、NMR 測定系の再現性も合わせて評価する。臨床情報データについては、BioBank のデータベースより匿名化された形で取得し、NMR 情報と統合させ解析に利用する。

(2) NMR 計測・解析方法

血清を FT-NMR 装置（JEOL）にてプロトン測定し、得られた FID 信号を数値化し、FID データを時間周波数解析（短時間フーリエ変換<STFT>）を実施する。ノイズ除去後、部分的最小二乗回帰（PLS-DA）法を用いて解析。与えられた臨床情報を分けることができるかを検証する。

図 1 解析方法の模式図



4. 研究成果

(1) 95 症例のデータセットでのモデル検証

まず、原発性乳がん患者血清 91 例、非乳がん者血清 4 例を用いて、これまでと同様の手法で NMR モード解析を行い、「乳がん(91)／健常者(4)」、「浸潤癌(75)／非浸潤癌(16)」、「リンパ節転移有(26)／無(49)」、「サブタイプ：ER+/Her2+(16), ER+/Her2-(38), ER-/Her2+(6), ER-/Her2-(15)」といった特性をそれぞれ NMR モード解析で識別できるかどうかを検証した。（()内は症例数を表す。）図 2 に代表的な解析例を示すがいずれの解析においても 2 次元 PLS-DA スコアプロットにて各群が良好に分かれて識別されていると考えられた（図 2）。

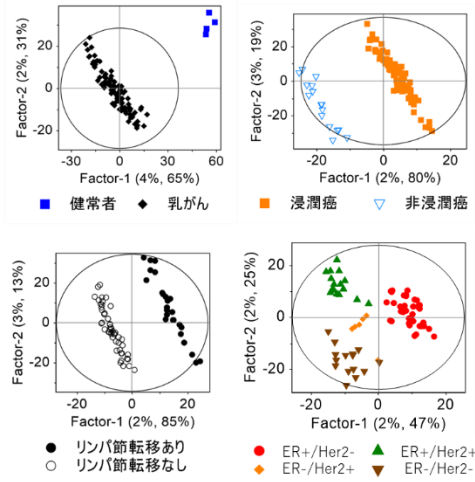


図2 原発性乳がん患者血清91例、非乳がん者血清4例のPLS-DAスコアプロット

(2) 浸潤癌症例を用いた解析堅牢性の検証

次に(1)で用いたデータセット (DS①) と、これ以前に測定解析を行った 98 症例からなるデータセット (DS②) の比較解析を行い、NMR モード解析の再現性や堅牢性などに関する調査を行った。まず、DS①より浸潤癌症例 75 症例「ER+/Her2+(16), ER+/Her2-(38), ER-/Her2+(6), ER-/Her2-(15)」、DS②より浸潤癌症例 43 症例「ER+/Her2+(4), ER+/Her2-(22), ER-/Her2+(7), ER-/Her2-(10)」を用いて PLS-DA 法でサブタイプを識別できるかを検討した。DS①、DS②では使用している NMR 装置は同じであるが、前後に部品交換が行われていた。結果、DS①、DS②いずれでもサブタイプを識別することはできるものの、識別に用いられる NMR 信号の重みづけを両 DS でそろえた場合は、同じサブタイプであっても PCA 空間上の別の位置に分布されてしまうことが判明した(図 3)。この傾向は上記データセットにそれぞれ 16 例ずつ非浸潤癌を加え、5 サブグループを識別するプログラムで検証しても同様の結果であった。即ち、機器の部品や構成の違いによって取得されるデータが異なることが示唆される結果であり、測定機器や測定コンディションによって生じる取得データのブレを校正するための何らかの方法を開発する必要があることが明らかになった。

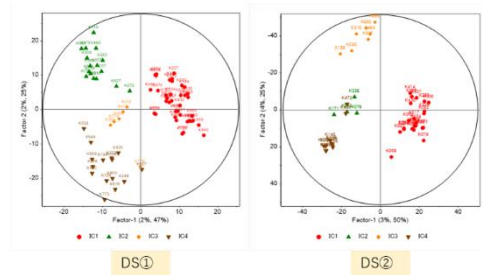


図3 DS①、DS②におけるPLS-DAスコアプロットの比較 (4群識別の例)

(3) 130 症例のデータセットでのモデル検証

最後に、原発性乳がん患者血清 130 例を用いて、多群識別能を中心に本手法の有効性を検証した。この解析では「サブタイプ:ER+/Her2+, ER+/Her2-, ER-/Her2+, ER-/Her2- (4 群の識別)」、「リンパ節転移有/無 (2 群の識別)」「サブタイプが分かっている状態でのリンパ節転移の有/無 (2 群の識別×4 セット)」「サブタイプ・リンパ節転移の複合情報 (8 群の識別)」といった種々の群設定を行って識別能を評価し、その後、一部の解析ではそれぞれのモデルの Q2/R2 値を算出し、モデルの妥当性を検証した。その結果、現在の手法ではリンパ節転移の有無といった 2 群識別までは 2 次元プロットでも群間識別が可能で、比較的良好なモデルが作成できるものの、4 群以上の識別になると、2 次元プロットでは群同士のオーバーラップがみられ、視覚的な識別を行うにはより高次元にプロットを拡張する必要があった(図 4)。高次元での PLS-DA では Overfitting が生じている可能性も否定できず、4 群以上の複雑な識別に関しては今後さらなる解析手法のブラッシュアップが必要であると考えられた。

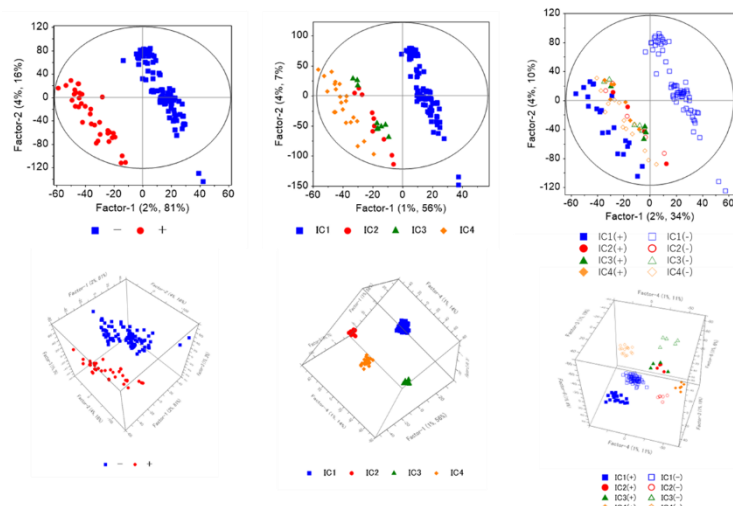


図4 原発性乳がん130例でのPLS-DAスコアプロット。右から2群識別/4群識別/8群識別の例を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小池 薫 (Kaoru Koike) (10267164)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	平川 慶子 (Keiko Hirakawa) (30165162)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	
研究分担者	杉本 昌弘 (Masahiro Sugimoto) (30458963)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	高田 正泰 (Masahiro Takada) (50452363)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	柚木 知之 (Tomoyuki Yunoki) (50639094)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	金涌 佳雅 (Yoshimasa Kanawaku) (80465343)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川島 雅央 (Masahiro Kawashima) (80766676)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関