

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590639

研究課題名（和文） 尿中ジアセチルスペルミンの早期がん検出能とその活用に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the early cancer detection with urinary diacetylspermine and its application

研究代表者

川喜田 正夫 (KAWAKITA MASAO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：00012740

研究成果の概要（和文）：がん患者の尿中ではジアセチルスペルミン排泄量が増加する。本研究では、ジアセチルスペルミンが比較的早期の癌に対して高い検出感度を示すことに着目し、健康診断受診者を対象としてジアセチルスペルミンの測定を行い、健常者レベルの詳細な検討に基づいて信頼性の高いカットオフ値を設定したほか、異常高値者の中に癌保有者が見いだされることを明らかにした。さらに、在宅検査による患者の早期掘り起こしを可能にするため、イムノクロマトグラフィーによる簡便測定法の開発を進めた。一方、癌組織中で、正常組織では検出されないジアセチルスペルミンが極めて早期の段階から上昇することを見いだした。この発見は、早期癌検出の新しい方法を提供するとともに、早期癌における尿中ジアセチルスペルミン上昇の原因解明のための手がかりを与えるものである。

研究成果の概要（英文）： N^1, N^{12} -diacetylspermine (DiAcSpm) in urine is frequently increased in cancer patients at earlier stages of the disease and hence is considered as promising tumor marker. In the present study we first analyzed the urinary DiAcSpm level of healthy persons in detail, and established cut-off values to distinguish between normal and abnormal levels of DiAcSpm excretion. We then developed an immunochromatographic device for simple and rapid DiAcSpm determination. The spreading of this simple determination procedure may help in increasing the opportunity of early detection of cancer patients. Our further analysis revealed that DiAcSpm is increased in cancer tissues from very early stages of cancer development. This finding provides us with a new method for early cancer detection on one hand, and a useful clue to answer the question of why DiAcSpm is increased in the urine from early cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学、臨床検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：尿検査、腫瘍マーカー、ポリアミン、ジアセチルスペルミン、大腸がん、イムノクロマトグラフィー、早期がん

1. 研究開始当初の背景

ジアセチルスペルミン (DiAcSpm) は、ポリアミンと総称されるアルキルアミンの 1 種である。ポリアミン類はがん組織をはじめ、増殖の活発な組織に多量に含まれ、アセチル体として尿中に排泄されることから、1970 年代の初頭に腫瘍マーカーとなる可能性が指摘された。しかし、尿中主要ポリアミン成分である各種のモノアセチルポリアミンは偽陽性、偽陰性がともに多く、腫瘍マーカーとしての実用性に乏しいことがその後の研究で明らかになった。一方、我々は、HPLC 法による尿中ポリアミンの一斉分画分析法を開発して精密、詳細な分析を行うことによって、尿中に新規微量ポリアミン成分 DiAcSpm が存在することを発見するとともに、それが優れた汎用性腫瘍マーカーとなる可能性を明らかにした。我々はさらに、DiAcSpm を特異的に認識する抗体の作成に成功し、DiAcSpm の ELISA 測定系を開発し、この物質が前立腺がん、精巣腫瘍、大腸がん、乳がん、脳腫瘍等の種々のがんに対して有効な汎用腫瘍マーカーであることを明らかにすることができた。

我々はその後、大腸がんを主要な対象として DiAcSpm の腫瘍マーカーとしての特性について研究を進め、尿中 DiAcSpm 排泄量が、早期の大腸がんの検出に関して既存のマーカー (CEA, CA19-9) より格段に高感度な検出指標であることを発見した。がんの治療法は近年長足の進歩を遂げている。特に、早期に発見された場合の治療率の向上はめざましく、stage 0 および stage I で発見された大腸がんの 5 年生存率は 100% に近い数字が得られている。DiAcSpm の早期がん検出特性を利用して DiAcSpm をがん検診に利用し、早期がん発見の精度を高めることによって治療率の向上に寄与することができれば、がんの治療率向上に大きく貢献することができる。これに加えて DiAcSpm はまた、手術後の経過観察におけるがんの病勢診断マーカーとしても大きな実用的価値をもつ可能性がある。

DiAcSpm のこのような特徴を癌治療の臨床において活用するためには、迅速、精密な測定法の確立が重要である。このような観点から我々は、本研究に先立ち、DiAcSpm 結合金コロイドを用いた、金コロイド凝集法による自動化測定試薬を開発した。この試薬は、汎用生化学自動分析機に搭載可能であり、十分な実用性を備えた試薬である。本研究は、このような状況の下で実施された。

2. 研究の目的

腫瘍マーカーとしての DiAcSpm の特徴の一つは、高い早期がん検出性能である。この特徴を活用し、尿中 DiAcSpm 検査を癌検診に利用することができれば、早期発見を通じて治療率の向上に大きく寄与することができる。また、一般人が家庭で利用できる新たな簡易検出法を開発することができれば、早期受診の機会を増やすことを通じて、早期発見率を向上させ、同様に治療率を向上させることができる。本研究は、これらの研究を通じて、尿中 DiAcSpm 検査をがんの早期発見・早期治療に導くユニークな腫瘍マーカーとして確立する一方、がん組織における DiAcSpm の精密測定などを通じて、DiAcSpm がなぜ、腫瘍マーカーとしてすぐれた特性を示すのかについて、その分子生化学的基礎を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 東京都職員健康診断の協力を得て、2009～2011 年度にわたり、同意が得られた受診者、各年度約 6000 名 (男性約 4000、女性約 2000) の尿中 DiAcSpm の測定を行い、健常者レベル、および、癌検診への応用の可能性について検討した。

(2) 長野県立須坂看護学校の学生有志の協力を得て、3 ヶ月間、毎朝、基礎体温の記録と早朝尿の採取を継続し、その結果に基づいて、尿中 DiAcSpm レベルと月経周期の関連について検討した。

(3) イムノクロマト法による DiAcSpm 検出系を構築するために、抗 DiAcSpm 抗体、金コロイド剤、検出用抗原、使用部材などの諸要因について検討し、さきを開発して性能を確認済みの金コロイド凝集法による自動化測定試薬を用いた測定値と、イムノクロマトデバイスによる測定値を比較して、後者の性能を検定した。

(4) 都立駒込病院大腸外科、および、消化器内科で治療施行した大腸癌および大腸腺腫患者の腫瘍部分および隣接正常部分の組織の抽出液を調製し、抽出液中の DiAcSpm を測定して病態との関連について解析した。

(5) 尿中および組織抽出液中の DiAcSpm 濃度は、金コロイド凝集法による自動化分析試薬を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 尿中 DiAcSpm の健常者レベルと癌検診への応用の可能性

腫瘍マーカーとして診断の有効な指標とするためには、健常者の尿中排泄量につい

て詳しく検討し、異常を判別するためのカットオフ値を正しく設定する必要がある。このような観点から、2009～2011年度の東京都職員健康診断受診者の同意・協力を得て、尿検体の提供を受け、尿中 DiAcSpm レベルを測定した。各年度約 6000 名分（男性約 4000、女性約 2000）の測定値は、年度ごとに多少の相違はあるものの、平均値、標準偏差値、中央値、95 パーセンタイル値のいずれの観点から見ても比較的安定していた。しかし、女性は男性より全体的に DiAcSpm 値が約 1.5 倍高い傾向が認められた。これは、DiAcSpm 排泄量をクレアチニン排泄量あたりで比較しているため、筋肉の少ない女性ではクレアチニン排泄量が少なく、分母が小さくなるのが一つの原因だと考えられる。女性の尿中 DiAcSpm 排泄量の個人差を精査した結果、40 台までは 2 峰性に近い分布を示すのに対し、50 代以降では男性と同様、単峰性の分布を示した。そこで、女性特有のホルモン分泌と関連する可能性について検討する目的で、看護学生有志の協力を得て、3 ヶ月間の連続調査をしたところ、基礎体温の高温期には、低温期より有意に DiAcSpm 排泄量が多いことが明らかになった。これらの結果に基づいて、男性 190、女性 300 (nmol DiAcSpm/g クレアチニン) をカットオフ値とした。但し、閉経後の女性、および、月経終了直後の女性については、250 とすることができると思われる。

2010、2011 年度の職員健康診断受診者の内、尿中 DiAcSpm が高値を示した約 5% の受診者に再検査の依頼を行ったところ、10 年度 2 名、11 年度 3 名の受診者から、別途癌が発見されて治療中である旨の申告があった。これらは、検診における尿中ジアセチルスペルミン測定の意義を示唆する事例であると考えられるが、確実な結論を得るためには、さらに検討を重ねることが必要であると考えられる。

(2) イムノクロマトによる DiAcSpm 測定系の構築

専門の検査施設に頼らず、「家庭や小規模の医院において、手軽に利用できる」検査法が開発できれば、異常の可能性を早期に発見することが可能になり、これが、専門医療機関を早期に受診することへの動機付けとなる。このようにして自覚症状のない早い段階での発見機会を拡大させることができれば、早期癌に対して高い感度を示す DiAcSpm の特徴を活かした用途を開くことができると期待される。このような観点から本研究においては、DiAcSpm を簡便・迅速に測定できる測定系として、インフルエンザ検査などに使用されているイムノクロマト法による尿中 DiAcSpm の測定系の構築について検討した。DiAcSpm は低分子物質であるため、通常の免

疫学的検出法に利用されるサンドイッチ法は適用できない。そこで我々は、競合法による検出系の構築を試みた。研究では、まずイムノクロマトデバイスの作成に使用する金コロイド標識抗体の作製条件の検討を行った。金コロイドとしてはワインレッドケミカル社の金コロイド WRG H1 (粒子径 50nm) を使用した。標識抗体の作製に適した緩衝液の種類及び pH などの条件は、使用する抗 DiAcSpm 抗体の種類によって異なり、複雑な様相を呈したが、様々な条件を検討した結果、金コロイド標識抗体の分散状態を安定に維持することができる条件を見いだすことができた。標識抗体をガラスファイバー片に吸収・乾燥させ、検出物質としてアセチルスペルミン結合タンパク質 (DiAcSpm 類似構造物質) を細い線状に固定したニトロセルロースメンブレンと合体させて組み立て、測定のためのイムノクロマトデバイスを作製した。このデバイスでは、標準 DiAcSpm 溶液を添加した場合に、DiAcSpm による競合のため、検出物質に結合した金コロイド標識抗体によるバンドの濃さが、目視で大きく変化するカットオフ値を DiAcSpm 濃度 100-300nM の間に設

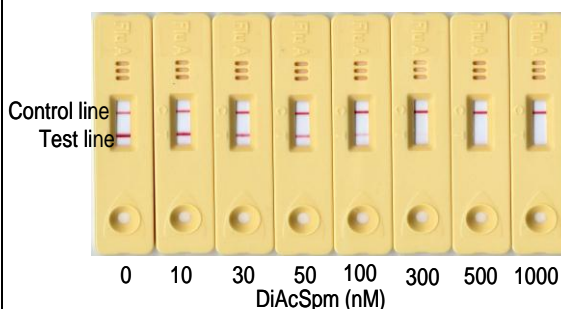


図1 イムノクロマト法による DiAcSpm の測定

定することができ、また、イムノクロマトリーダーを使用した測定では 0-300nM 濃度の範囲での測定が可能になった。今後、さらに研究を進めることにより、さらに精度の高い、判定の容易なデバイスの開発を目指そうと考えている。

(3) 癌組織および正常組織の DiAcSpm 含量

東京都立駒込病院大腸外科および消化器内科で治療施行した大腸癌および大腸腺腫で、病理病期の確定した症例について、患部組織および患部に隣接する同一患者の正常組織を採取し、組織抽出液中の DiAcSpm を測定した。正常組織中には DiAcSpm はほとんど検出されなかった。これは正常組織中のアセチルポリアミンレベルが、一般に、極めて低いという従来知見を裏付けるものであった。これに対して大腸癌 (II 期～IV 期) 組織中の DiAcSpm レベルは、同一患者の隣接正常組織と比較してほぼ全例で 2 倍以上 (2.8-33.5 倍) の高値を示した。IV 期症例

では、大腸原発巣のみならず、肝転移病巣においても同様の結果が得られた。しかし、組織 DiAcSpm レベルと病期の間には関連がなかった。質量分析法、および、HPLC 法によって定量した N¹-アセチルスぺルミジン、アセチルスぺルミンについても同様の傾向が認められた。

0 期大腸癌（粘膜内癌）と診断された内視鏡摘除組織においては 70%以上の症例で DiAcSpm 含量が隣接正常組織の 2 倍以上（2.1-9.8 倍）であり、組織 DiAcSpm レベルが早期大腸癌の段階から高頻度で上昇することが明らかになった。一方、患部の DiAcSpm レベルが隣接正常部の 1.5 倍を超える症例は、中等度異型腺腫では約 30%であったのに対し、高度異型腺腫では約 70%にのぼった。このように、腫瘍組織の DiAcSpm 量が病理形態学的に癌と判定される以前の癌状態においてすでに顕著な増加を示す事実は、組織 DiAcSpm の測定という手法が、従来よりも早期の段階に癌化の傾向を捕捉する新たな癌検出法を提供する可能性を示している。

本研究は、DiAcSpm が組織抽出液中に存在することを示した最初の例である。DiAcSpm が癌組織で作られているのであるか、あるいは、癌組織から循環系に排出されたポリアミンを利用して、非癌組織（細胞）が作っているのかについては、これまで定説がなかった。特に、早期癌の段階から尿中で増加する DiAcSpm が体内のどこで、どのようにして合成されるかは全く明らかにされていなかった。本研究の結果は、DiAcSpm が実際に早期の癌組織で作られていることを示すものであり、したがって、癌の比較的早期の段階から認められる患者の尿中 DiAcSpm レベルの上昇に癌組織から排出される DiAcSpm が寄与していることを強く示唆するものであることができる。

上述のように、中等度異型大腸腺腫－高度異型大腸腺腫－早期大腸癌－進行癌の順に組織 DiAcSpm の上昇頻度が増すことは、DiAcSpm レベルと組織の悪性化の間に密接な関連があることを示唆するものと考えられる。したがって、DiAcSpm が前癌状態の腫瘍組織中で上昇する仕組みの解明によって、細胞の癌化のメカニズムの解明に向けて新たな手がかりが得られる可能性がある。DiAcSpm レベルの上昇のメカニズムとしては SSAT（spermine/spermidine acetyltransferase）の増加、APA0（acetylpolyamine oxidase）の減少、DiAcSpm 細胞外排出機能の低下などが考えられるが、その解明は今後の課題である。

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 6 件）

- ① 高橋慶一, 平松恭子, 桑田剛, 八杉利治, 岩崎善毅, 堀尾裕俊, 堀口慎一郎, 小泉浩一, 岩崎香里, 森谷俊介, 川喜田正夫 (2012) 癌組織中の N¹, N¹²-ジアセチルスぺルミン. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌 27, 37-38 (査読無)
- ② 桑田剛, 平松恭子, 小泉浩一, 高橋慶一, 鮫島啓二郎, 三浦正子, 森谷俊介, 斎藤文江, 酒井麻美, 川喜田正夫 (2011) 大腸癌組織中の N¹, N¹²-ジアセチルスぺルミン. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌 26, 70-71 (査読無)
- ③ 坂口幸治, 平松恭子, 山本学, 原田国彦, 堀尾裕俊, 森谷俊介, 盛山優子, 三浦正子, 斎藤文江, 高橋慶一, 川喜田正夫, 非小細胞肺癌における尿中ジアセチルスぺルミン測定の意義. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌 25, 55-56, 2010 (査読無)
- ④ K. Samejima, K. Hiramatsu, K. Takahashi, M. Kawakita, M. Kobayashi, H. Tsumoto, K. Kohda: Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry. Analytical Biochemistry, 401, 22-29, 2010 (査読有)
- ⑤ 川喜田正夫, 平松恭子, 高橋慶一: 尿中ジアセチルスぺルミン. 日本臨牀, 68, 増刊号 8, 793-795, 2010 (査読無)
- ⑥ 江川直人, 平松恭子, 来間佐和子, 神澤輝実, 森谷俊介, 盛山優子, 斎藤文江, 高橋慶一, 倉田昌直, 本田五郎, 鶴田耕二, 川喜田正夫: 膀胱がんにおける尿中ジアセチルスぺルミン陽性率の検討. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 24, 33-34, 2009 (査読無)

〔学会発表〕（計 21 件）

- ① 平松恭子, 子宮癌および卵巣癌組織中における N¹, N¹²-ジアセチルスぺルミンの増加. 日本ポリアミン学会第 3 回年会 2012. 1. 26-27, 大宮
- ② 森谷俊介, 質量分析法による APA0, SMO, および SSAT の酵素活性測定法. 日本ポリアミン学会第 3 回年会 2012. 1. 26-27, 大宮
- ③ 高橋慶一, 新しい癌マーカーとしての尿中ジアセチルスぺルミン (DiAcSpm) の大腸癌検出能について. 第 49 回日本癌治療学会 2011. 10. 27-29, 名古屋
- ④ 高橋慶一, 癌組織中の N¹, N¹²-ジアセチルスぺルミン. 第 31 回日本分子腫瘍マーカー研

- 研究会 2011.10.2, 名古屋
- ⑤平松恭子, 組織中の N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン. 日本生化学会第84回大会 2011.9.21-24, 京都
- ⑥ Takahashi, K., Urine N^1, N^{12} -diacetyl-spermine (DiAcSpm) as a new cancer marker for colorectal cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer 2011.9-21-23, Osaka
- ⑦川村眞智子, 小児悪性腫瘍患者における腫瘍マーカーとしての尿中ポリアミン測定の有用性に関する検討. 第114回日本小児科学会学術集会 2011.8.12-14, 東京
- ⑧平松恭子, 大腸癌および肝臓転移組織のポリアミン含有量: 癌組織特異的な N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン. 第2回日本ポリアミン学会 2011.1.27-28, 宇都宮
- ⑨森谷俊介, 腫瘍マーカー N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンの測定のためのイムノクロマト法の検討. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010.12.7-10, 神戸
- ⑩平松恭子, 大腸癌および肝臓転移組織のポリアミン含有量. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010.12.7-10, 神戸
- ⑪ K. Hiramatsu, Analysis of N^1, N^{12} -Diacetylspermine and Other Polyamines in Tissues of Cancer Patients. 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases (招待講演) 2010.12.1-6, Tivoli (Rome), Italy
- ⑫川村眞智子, 造血器腫瘍疾患における尿中ポリアミン測定の意味. 第72回日本血液学会 2010.9.24-26, 横浜
- ⑬桑田剛, 大腸癌組織中の N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン 2010.9.21, 大阪
- ⑭ K. Hiramatsu, N^1, N^{12} -Diacetylspermine in Colon Cancer Tissues. 2010 International Polyamine Conference 2010.06.14-18, Gotemba, Japan
- ⑮川喜田正夫, 尿中腫瘍マーカー ジアセチルスベルミンの特性と臨床的有用性. 第6回便潜血研究会 (招待講演) 2010.3.12, 東京
- ⑯堀尾裕俊, 胸腺関連腫瘍の腫瘍マーカーとしての尿中ジアセチルポリアミン測定の意味. 第50回日本肺癌学会総会 2009.11.12-13, 東京
- ⑰平松恭子, 健常者の尿中 N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンレベルの検討. 第82回日本生化学会大会 2009.10.23, 神戸
- ⑱下山達, 悪性腫瘍の化学療法における尿中ジアセチルスベルミン測定の意味. 第47回日本癌治療学会学術集会 2009.10.22-24, 横浜

- ⑲坂口幸治, 非小細胞がんにおける尿中ジアセチルスベルミン測定の意味. 第29回日本分子腫瘍マーカー研究会 2009.9.30, 横浜
- ⑳鮫島啓二郎, ESI-TOF MSによるヒト尿中アセチルポリアミンの同定と同時定量. 第34回日本医用マススペクトル学会 2009.9.10-11, 大阪
- ㉑坂口みほ, 健診受診者における尿中ジアセチルポリアミン測定の意味. 第50回日本人間ドック学会学術大会 2009.9.3-4, 東京

[図書] (計3件)

- ① Masao Kawakita 他、Humana Press、Determination of N^1, N^{12} -Diacetylspermine in Urine: A Novel Tumor Marker, *in* Methods in Molecular Biology 720, Polyamines; Methods and Protocols, 2011, 367-378
- ②川喜田正夫 他、日本臨牀社、広範囲血液・尿化学検査 免疫検査 —その数値をどう読むか— [第7版] (4)、2010、793-795
- ③川喜田正夫 他、医薬ジャーナル社、腫瘍マーカーハンドブック、2009、275-278

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: がんの検出方法
発明者: 平松恭子ほか5名
権利者: 財団法人東京都医学総合研究所および高橋慶一

種類: 特許
番号: 特願 2010-103771
出願年月日: 22年4月28日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川喜田 正夫 (KAWAKITA MASAO)
財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員
研究者番号: 00012740

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

平松 恭子 (HIRAMATSU KYOUKO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学
研究分野・主任研究員

研究者番号：80181189

高橋 慶一 (TAKAHASHI KEI-ICHI)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学
研究分野・客員研究員 (がん・感染症セン
ター東京都立駒込病院外科部長)

研究者番号：60443115