

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82609
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25460714
研究課題名(和文) 腫瘍マーカー尿中ジアセチルスペルミン：臨床的有用性、代謝、簡易迅速測定法の研究

研究課題名(英文) Diacetylspermine in urine, a tumor marker: studies on its clinical usefulness, metabolism, and simple and rapid determination

研究代表者
平松 恭子 (HIRAMATSU, Kyoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：80181189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ジアセチルスペルミン(DiAcSpm)を腫瘍マーカーとして確立し、その簡便迅速な測定法を開発することを目的として、遂行された。我々は、早期癌組織中におけるDiAcSpmの上昇が早期大腸癌における尿中DiAcSpmの上昇の原因であることを明らかにし、さらに、DiAcSpmの治療前値が大腸癌および肺癌完全切除例の早期再発リスクと関連することを明らかにした。また、非侵襲的な尿検査によって比較的早期の癌の検出が可能であるというDiAcSpmの特徴を生かすためにイムノクロマト法によるDiAcSpm簡易測定デバイスを開発した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to establish N1,N12-diacetylspermine (DiAcSpm) as a useful tumor marker, and to develop a simple and rapid procedure for DiAcSpm determination. Our study revealed that DiAcSpm was increased in early cancer tissues, and that this increase is responsible for the increased excretion of DiAcSpm in the urine of patients with early colorectal cancer patients. Further study indicated that preoperative urinary DiAcSpm level was significantly related with the risk of early recurrence of completely resected colorectal cancer and non-small cell lung cancer patients. We also developed an immunochromatographic device for simple and rapid determination of urinary DiAcSpm. The simplicity of the procedure is a definite merit in promoting wider use of urinary DiAcSpm testing, a non-invasive and sensitive measure for early cancers.

研究分野：clinical chemistry

キーワード：ジアセチルスペルミン 腫瘍マーカー 尿検査 大腸癌 肺癌 イムノクロマト 癌の早期発見 癌のフォローアップ

1. 研究開始当初の背景

ジアセチルスベルミン (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。癌患者では尿中ポリアミンが増加する傾向があることから、ポリアミンを腫瘍マーカーとして利用できる可能性を念頭に尿中ポリアミンの分析が行われたが、約 20 年間に亘る研究を経て、尿中ポリアミンの大部分を占める各種のモノアセチルポリアミンについては、腫瘍マーカーとして用いるには偽陽性、偽陰性が多く、実用的な価値は乏しいという評価が主流となった。

一方、我々は、微量成分を含めた尿中ポリアミンの精密、詳細な分画分析を行い、尿中に新規の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、それが各種の癌の患者尿中で上昇する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。そして、大腸癌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、早期の大腸癌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。stage 0 および stage I で発見された早期大腸癌の 5 年生存率は 100% に近い。従って、DiAcSpm の早期癌検出特性を利用することにより、早期癌発見の頻度を高めることが可能であり、それによって癌の治癒率向上に大きく貢献することができると期待されている。これに加えて DiAcSpm はまた、手術前後の癌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り、各種の癌の治療方針の策定過程において、既存のバイオマーカーや臨床情報を補完する新たな情報を与えることができるかどうかを明らかにすることが課題の一つであると考えられる。

DiAcSpm のこのような特徴を利用し、癌治療の臨床において活用できる新しい検査項目として確立するためには、迅速、精密な測定法の開発が重要である。このような観点から我々は DiAcSpm を特異的に認識する抗体を作成した。そして、DiAcSpm の ELISA 測定系を構築し、さらに抗 DiAcSpm 抗体結合金コロイドを用いた金コロイド凝集法による自動分析試薬を開発した。この試薬は汎用生化学自動分析機に搭載可能であり、一般の臨床検査室においても使用できる十分な実用性を備えた試薬である。

このように、DiAcSpm の臨床的意義、および、実用化に向けた測定法の整備については着実に研究が進んできたが、DiAcSpm が実際に癌組織中で早期から作られているのかも含め、その生成機構や体内動態に関する知見はまだ限られており、今後の解明が待たれている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、DiAcSpm を利用して早期癌発見の効率の向上をはかること、腫瘍マーカーとしての DiAcSpm の特性を多面的に解明し、癌治療の質の向上を図るために、既存の検査法との組み合わせも含めその特性を有効に利用する方法を開発することを目的とし、さらに、DiAcSpm の生合成から尿中への排泄に至る動態の解析を進め、優れた実用性のみならず、生化学的基礎の観点からも万人が納得できる新規検査項目として確立することを目指して行われた。

(2) 尿検査は被験者の苦痛を伴わない無侵襲的な検査であるため、尿中 DiAcSpm 検査の実用化・普及には大きな意義がある。そのような観点から本研究は、一般人が家庭で利用できる新たな簡易検出法としてイムノクロマト法による DiAcSpm 測定デバイスを開発することを通じて、本検査項目の普及のための環境整備を進めることも併せて目的とした。

3. 研究の方法

(1) DiAcSpm が癌の早期から上昇する仕組みを解明するために、大腸腺腫および早期大腸癌の腫瘍、および隣接正常組織を採取し、正常および腫瘍組織の DiAcSpm 含有量を比較する。

(2) 腫瘍マーカー値が大腸癌、肺癌等の病態とどのように関連するかを解析し、それぞれ最も適切な DiAcSpm の利用法を明らかにする。必要に応じて既存の腫瘍マーカーや臨床・病理所見と組み合わせることにより、効率よい早期癌発見、病勢判断、予後予測のプロトコルの提示を図る。

(3) 癌組織、培養細胞等における DiAcSpm 代謝を詳細に解析するために不可欠な粗抽出液中のポリアミン代謝酵素活性の精密測定法として、安定同位体標識基質を用いた質量分析による酵素活性測定法を開発する。測定系の構築に必要な安定同位体標識基質、標識内部標準物質等を必要に応じて合成する。

(4) これまでの予備的検討で得られた結果をもとに、イムノクロマト法による DiAcSpm 簡易・迅速測定系の確立に向けて、抗体標識金コロイドの調製、抗体捕捉用競合抗原の検討など尿中 DiAcSpm の測定に向けた条件の最適化を行う。

4. 研究成果

(1) 大腸腫瘍の悪性化に伴う腫瘍組織 DiAcSpm 含量の上昇：

本研究に先立って、我々は II 期以降の進行大腸癌組織および大腸癌肝転移組織の DiAcSpm 含量について研究し、癌組織中では隣接正常組織と比較して DiAcSpm が高値を

示すことを明らかにしていた。本研究においては、DiAcSpmの上昇が大腸腫瘍のどの時期から認められるかを明らかにするために、良性大腸腺腫から早期大腸癌にいたる各段階の腫瘍組織および隣接正常組織のDiAcSpm含量を測定した。その結果、前癌状態と考えられる高度異型腺腫の段階になると、中等度異型腺腫の段階と比較して腫瘍組織中でDiAcSpmが上昇することが明らかになった。

体液中に排出されたDiAcSpmは、腎臓で原尿中に排出された後に、他のポリアミン成分や低分子成分とは異なり、再吸収・再利用されことなく全て尿中に排泄される(図1)。

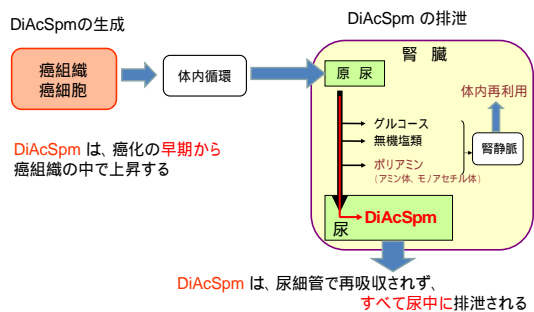


図1 DiAcSpmの生成と排泄

従って、癌化の早期から腫瘍組織でDiAcSpmが生成することを示す上記の知見は、早期癌における尿中DiAcSpmの上昇が癌組織中におけるDiAcSpmの上昇によってもたらされるものであることを強く示唆するとともに、癌化の過程とDiAcSpm増加機構との関連を示唆するものと考えられる。早期癌組織におけるDiAcSpmの上昇と、腎臓におけるポリアミン再吸収に関する他のポリアミン成分との挙動の違いを考え併せることで、DiAcSpmがなぜ癌の早期から上昇し、他のポリアミン成分とは異なる切れ味を示す腫瘍マーカーになるのかを理解する鍵を得ることができるであろう。

(2) 手術前尿中DiAcSpm値を用いた肺癌の浸潤性予測、および、完全切除可能な肺癌および大腸癌の再発リスク評価：

非小細胞肺癌における尿中DiAcSpm測定の臨床的意義を明らかにするために、臨床病期IA期の非小細胞肺癌の切除例について、術前尿中DiAcSpm値と病理学的浸潤性の間の関係について解析した。その結果、尿中DiAcSpm低値は多変量解析において、腫瘍径2cm以下、高分解能CT上での腫瘍消失率(TDR)とともに、病理学的非浸潤性の独立した予測因子であることが示された。临床上、非浸潤性肺癌に対しては縮小手術の適応が考慮される。DiAcSpmがこのような非浸潤性予測因子としての特性を示すことは、非侵襲的な尿中DiAcSpm検査の新たな応用の可能性を示すものと考えられる。

我々はまた、非小細胞肺癌に対して完全切除を施行した症例について尿中DiAcSpmの術前値と臨床病理学的因子および予後との

関連について解析した。尿中DiAcSpm高値群の患者は低値群の患者と比較して、無再発生存率および全生存率の双方で有意に予後不良であり、多変量解析の結果、血清CEA、病理病期、胸膜浸潤とともに、DiAcSpm高値が

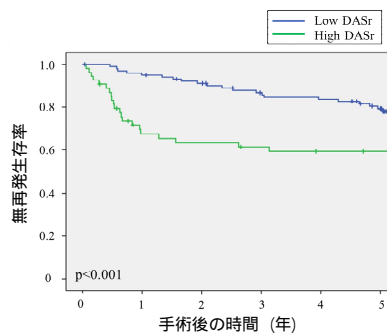


図2 術前DiAcSpm値とIA期肺癌の無再発生存率

有意な予後不良因子であることが明らかになった(図2)。

大腸癌についても、手術前尿中DiAcSpm高値群では根治的手術後の早期再発リスクが高いことが明らかになった。術前腫瘍マーカー値と手術後の経過との間のこのような関連は、術後の補助治療方針の策定にあたって有用な情報を提供することが期待される。

(3) 安定同位体標識基質を用いた質量分析法によるポリアミン代謝酵素活性の精密測定法の開発：

癌化の早期過程におけるDiAcSpm上昇のメカニズムの解明に向けた努力の一環として、組織抽出液等、生体試料中の微弱なポリアミン代謝酵素活性を精密に測定する方法の開発を進めた。在来の測定法では、内在性の物質や混在酵素による副反応による妨害のために組織抽出液中の酵素活性の正確な測定は困難であると考えられた。我々は、安定同位体標識基質を利用し、内在性の天然ポリアミンとは質量数の異なる標識基質由来の反応生成物を質量分析法によって定量することにより、添加した基質に対する酵素の反応産物を選択的、かつ精密に測定する方法を開発した(図3)。反応後の溶液中に標識生

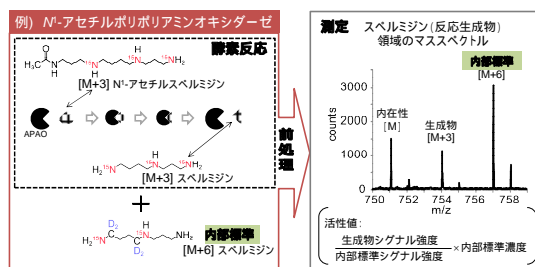


図3 安定同位体標識基質による酵素活性の測定

成物よりさらに質量数の大きなポリアミンを内部標準物質として添加することで、各成分の信号強度比から正確な活性値を求めることができる。この方法によって、DiAcSpmの合成、分解に直接関与する3種類の酵素N1-acetyl polyamine oxidase (APAO)、spermine

oxidase (SMO)、spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase (SSAT)の精密測定系を構築することができ、生体内 DiAcSpm 代謝の解明のための一つの手段を提供することができた。

(4)イムノクロマト法による DiAcSpm 簡易測定系の確立:

多くの癌で上昇し、非侵襲的に検査できるという DiAcSpm の特徴を活用するために、「即時に現場で結果を知ることができる」検査法として、イムノクロマト測定系を開発した。既に保持していた数種類の DiAcSpm 抗体の中から金コロイド粒子との適合性も含めて優れた特性を有するものを選び、抗体標識金コロイドの作成および安定化条件その他種々の基礎的条件を検討した。その結果、

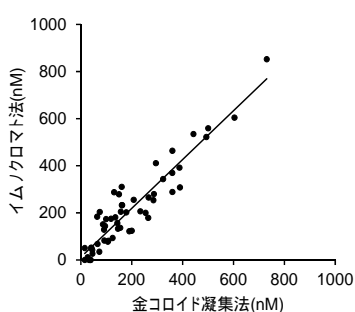


図4 DiAcSpm 測定値の方法間比較

定量性、安定性を兼備し、実用化に向けたプロトタイプと位置づけることができる測定デバイスを開発することができ検査薬メーカーに技術導出することができた(図4)。

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8件)

Yusuke Takahashi, Kouji Sakaguchi, Hirotochi Horio, Kyoko Hiramatsu, Shun-suke Moriya, Keiichi Takahashi, Masao Kawakita. (2015) Urinary N^1, N^{12} -diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Brit. J. Cancer*, 査読有り 113, 1493-1501; (advance online publication, October 27, 2015); Doi: 10.1038/bjc.2015.349

Giselle L. Saulnier Sholler, Eugene W. Gerner, Genevieve Bergendahl, Robert B. MacArthur, Alyssa VanderWerff, Takamaru Ashikaga, Jeffrey P. Bond, William Ferguson, William Roberts, Randal K. Wada, Don Eslin, Jacqueline m. Kraveka, Joel Kaplan, Deanna Mitchell, Nehal S. Parikh, Kathleen Neville, Leonard Sender, Timothy Higgins, Masao Kawakita, Kyoko Hiramatsu, Shun-suke Moriya, Andre S. Bachmann (2015) A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction

in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma.

Plos One, 査読有り 10(5): e0127246; DOI: 10.1371/journal.pone.0127246

Yusuke Takahashi, Hirotochi Horio, Kouji Sakaguchi, Kyoko Hiramatsu, Masao Kawakita. (2015) Significant correlation between urinary N^1, N^{12} -diacetylspermine and tumor invasiveness in patients with clinical stage IA non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 査読有り 15: 65; DOI: 10.1186/s12885-015-1068-5

Shun-suke Moriya, Kyoko Hiramatsu, Emi Kimura, Kyoichi Matsumoto and Masao Kawakita (2014) Construction of an immunochromatographic determination system for N^1, N^{12} -diacetylspermine. *J. Clin. Lab. Anal.* 査読有り 28, 452-460; DOI: 10.1002/jcla.21709

Shun-suke Moriya, Naoki Terayama, Kyoko Hiramatsu, Masao Kawakita, Tatsuya Kiryu, Takato Kawanishi, Eiko Yasui, Shinji Nagumo (2014) Synthesis of 1-(4-Aminobutyl)-2-iminoimidazolidin-4-one Aimed at Preparation of a Creatinine-specific Antibody. *Chem. Pharm. Bull.* 査読有り 62, 350-353; DOI: 10.1248/cpb.13-00960 published on line 5, Feb. 2014

Kyoko Hiramatsu, Kouji Sakaguchi, Nana Fujie, Fumie Saitoh, Emi Takahama Shun-suke Moriya, Kaori Iwasaki, Masayoshi Sakaguchi, Kei-ichi Takahashi, Masao Kawakita (2014) Excretion of N^1, N^{12} -diacetylspermine in the urine of healthy individuals. *Ann. Clin. Biochem.* 査読有り 51, 459-467; DOI: 10.1177/0004563213496978

Shun-suke Moriya, Toshiyuki Miura, Koichi Takao, Yoshiaki Sugita, Keijiro Samejima, Kyoko Hiramatsu, Masao Kawakita (2014) Development of irreversible inactivators of spermine oxidase and N^1 -acetyl polyamine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有り 37, 475-480; DOI: 10.1248/bpb.b13-00913

Go Kuwata, Kyoko Hiramatsu, Keijiro Samejima, Kaori Iwasaki, Kei-ichi Takahashi, Koichi Koizumi, Shin-ichiro Horiguchi, Shun-suke Moriya, Masaki Kobayashi, Masao Kawakita (2013) Increase of N^1, N^{12} -diacetylspermine in tissues from colorectal cancer and its liver metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 査読有り 139, 925-932; DOI: 10.1007/s00432-013-1405-5

〔学会発表〕(計 21 件)

森谷俊介:安定同位体標識ポリアミンを用いたラット再生肝内のポリアミン動態の解析. 日本ポリアミン学会第 8 回年会, 2017.1.20-21 千葉工業大学(千葉県・習志野市)

平松恭子:腫瘍組織の N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン量による子宮および卵巣腫瘍の良・悪性鑑別. 日本ポリアミン学会第 8 回年会, 2017.1.20-21 千葉工業大学(千葉県・習志野市)

高橋慶二:大腸癌治癒切除症例の早期再発リスク評価における尿中 N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンと血清 CEA 併用の臨床的意義. 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2016.10.5, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

森谷俊介:安定同位体標識基質を用いたオルニチン脱炭酸酵素の活性測定. 第 89 回日本生化学会大会 2016.9.25-27 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

平松恭子:子宮体癌、子宮頸癌および卵巣癌組織の N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン. 第 89 回日本生化学会大会 2016.9.25-27 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

平松恭子:大腸癌および非小細胞肺癌の手術前尿中ジアセチルスベルミン値と予後の関連 BMB2015 ワークショップ「生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える」 2015.12.1- 4 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

森谷俊介:質量分析計と安定同位体標識基質を用いたポリアミン合成系酵素の活性測定法の検討. BMB2015. 2015.12.1- 4 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

平松恭子:手術前尿中 N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンと非小細胞肺癌の予後. 日本ポリアミン学会第 7 回年会 2015.11.13-14, 京都工業繊維大学(京都府・京都市)

堀尾裕俊:非小細胞肺癌における尿中ジアセチルスベルミン測定の臨床的意義. 第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会 2015.10.5 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

平松恭子; 大腸癌の手術前尿中ジアセチルスベルミン値と予後の関連. 日本ポリアミン学会第 6 回年会, 2015.1.19-20, 東京海洋大学(東京都・港区)

Keiichi Takahashi ; Urine N^1, N^{12} -diacetylpermine(DiAcSpm) as a new cancer marker for colorectal cancer; 7th European Multidisciplinary Colorectal Cancer Congress (EMCCC 2014), 2014.11.24-25, Amsterdam (Netherlands)

高橋祐介; 非小細胞肺癌切除例の予後における尿中ジアセチルスベルミンの意義. 第 55 回日本癌学会学術集会, 2014.11.14-16, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Masao Kawakita: Urinary tumor marker N^1, N^{12} -diacetylpermine: clinical significance, determination, production and excretion. The

1st Innovation Forum of Advanced Engineering and Education, 2014.11.1, Kogakuin University (Tokyo・Shinjuku-ku)

森谷俊介; 安定同位体標識基質を用いたポリアミン合成・代謝酵素の活性測定法の検討. 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.15-18, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

高橋祐介; 臨床病期 IA 期非小細胞肺癌における尿中ジアセチルスベルミンと病理学的浸潤性の関係. 第 31 回日本呼吸器外科学会総会, 2014.5.29-30, ホテル日航東京(東京都・港区)

川喜田正夫: N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンとその臨床応用に向けた取り組み. 第 5 回ポリアミン学会年会, 2014.1.23-24 千葉科学大学(千葉県・銚子市)

平松恭子: 健常者尿中 N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン 第 5 回ポリアミン学会年会, 2014.1.23-24 千葉科学大学(千葉県・銚子市)

堀尾 裕俊: 胸腺腫瘍における尿中ジアセチルスベルミン値は腫瘍マーカーとして有用か? 第 66 回日本胸部外科学会, 2013. 10. 16-19 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

森谷俊介: アセチルポリアミンオキシダーゼ、スベルミンオキシダーゼ阻害薬. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

川喜田正夫: 癌患者における尿および組織中の N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミンの増加. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

②平松恭子: 胃癌および悪性リンパ腫の薬物療法における治療効果、経過観察としての尿中 N^1, N^{12} -ジアセチルスベルミン 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

Kawakita M, Hiramatsu K, Moriya S, Samejima K, Takahashi K. Polyamines A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism. Springer, 2015, 305-314

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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

平松 恭子 (HIRAMATSU, Kyoko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・主席研究員
研究者番号: 80181189

(2)研究分担者

川喜田 正夫 (KAWAKITA, Masao)
公益財団法人東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・研究員
研究者番号：00012740

(3)連携研究者

高橋 慶一 (TAKAHASHI, Keiichi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・客員研究員
(東京都立駒込病院・大腸外科・部長)
研究者番号：60443115

(4)研究協力者

なし