

論文の要約

揮発性肺がんマーカーの探索

花井陽介

【緒言】

初期の肺がんはほとんど症状が出ないため、早期に診断することは非常に困難である。そのため、簡便でかつ高感度・高特異的な肺がんの早期診断方法の開発が強く望まれている。従来法として、腫瘍マーカーも利用されているが、その感度および特異度は十分とはいえない。また、これら腫瘍マーカーの測定は採血を必要とする侵襲的な診断方法である。被験者に対して苦痛を与えない非侵襲かつ簡便な診断技術が望まれており、近年揮発性のバイオマーカーが注目されている。疾患と「におい」の間には関連があり、疾患特有のにおいがあることが報告されている。例えば、糖尿病患者からはりんご臭、壊血病患者からは腐敗臭、メチオニン代謝不全患者からはキャベツ臭がそれぞれ発せられる。肺がんについても、イヌを使った実験によって肺がん特有のにおいの存在が示唆されている。揮発性肺がんマーカーに関する研究は、血液、呼気などを対象として研究されている。呼気を対象とした研究の例として、1-butanol と 3-hydroxy-2-butanone の呼気中濃度は、健常者と比較して肺がん患者で有意に高くなっていることが報告されている。呼気は非侵襲的かついつでもどこでも得られる優れたサンプルではあるが、保存や輸送が難しいため、含まれる揮発性成分の分析が困難になるという問題がある。一方、尿は非侵襲的に収集できるだけでなく、保存や輸送も容易な優れた検体である。

第1章 センサーマウスを使った尿臭による肺がんの識別

嗅覚は哺乳類の生活上非常に重要な役割を担っている。においの情報は、まず鼻腔内にある嗅上皮の嗅覚細胞に発現する嗅覚受容体で受容される。この嗅覚受容体はヒトで 347 種あり、マウスでは 1035 種類、イヌでは 811 種類が確認されている。従って、マウスやイヌはヒトがかぎ分けることができないにおいについても嗅ぎ分けることが可能であると考えられる。実際、肺がんについても、イヌを使った実験によって肺がん特有のにおいの存在が指摘されている。これまでの報告では、呼気中の揮発性有機化合物 (VOC) を指標とした肺がん診断が提案されている。呼気は非侵襲的かついつでもどこでも得られる優れた検体ではあるが、保存や輸送が難しいという問題がある。それに対して、尿は非侵襲的に得られるだけでなく、保存や輸送も容易な検体である。揮発性肺がんマーカーに関するこれまでの研究において、血液や呼気などを対象としたマーカー探索は行われているが、尿に含まれる揮発性成分を対象とした研究は行われていない。本研究では、尿に肺がん特異的な揮発性成分の存在を確認することを目的として

実験を行った。センサーマウスを作成し、Y字迷路試験によって肺がん罹患しているかどうかを尿の匂いで区別できるか調べた。センサーマウスは、ヒト由来の尿（肺癌患者3名、健常者3名）を使って、80%以上の正答率を示すようになるまで約3ヶ月間トレーニングを行い、健常者の尿を識別するマウス2匹と肺癌患者の尿を識別するマウス2匹を作成した。作成したセンサーマウスを使って、トレーニングには用いていないヒト由来の尿（肺癌患者1名、健常者1名）で試験したところ、それぞれ80%以上の正答率を示した。このことから、尿において肺がん診断可能であることが示された。つまり今回の結果は、肺がん患者尿と対照者尿を識別できる何らかの揮発性化合物の存在を示しており、このにおい分子を特定できれば肺がんの揮発性バイオマーカーとして利用できることを確認した。

第2章 肺がん細胞培養液および肺がんモデルマウス尿由来の揮発性有機化合物の分析

第1章の結果より、尿中には肺がん特有の揮発性成分の存在が確認された。しかしこれまでのところ、尿中のVOCから揮発性肺がんマーカーを探索する手法は確立されていない。また、肺がんマーカーと考えられる内因性のVOCの細胞および生化学的起源はあまり理解されていない。そこで本章では、尿中から肺がん特異的なVOCを探索する手法を確立するとともに、尿中VOCと肺がん細胞由来VOCの相関を調べ肺がんの診断指標となる化合物についての知見を得ることを目的として実験を行った。実験はヒト肺癌細胞（A549細胞）を一定期間培養した培養液およびA549細胞を移植した肺がんモデルマウス尿由来の揮発性化合物の分析を行った。培養液および尿に含まれる揮発性成分の抽出は固相マイクロ抽出法（SPME）を利用し、GC-TOFMSを使って分析した。肺がん特異的な揮発性成分の特定は、2種類のヒト肺正常細胞（OUS-11細胞、WI-38VA13細胞）由来の培養液およびコントロールマウス由来の尿と比較することによって得た。その結果、培養液と尿の両方からいくつかの肺がん特異的に増加している揮発性化合物を特定した。特定した揮発性化合物の中で、培養液と尿に共通する化合物として7化合物（dimethyl succinate, 2-pentanone, phenol, 2-methylpyrazine, 2-hexanone, 2-butanone, acetophenone）が得られた。以上の結果より、肺がん細胞が放出するVOCの一部が尿中へ移行する可能性が示された。また、揮発性肺がんマーカー候補は1種類ではなく、複数の化合物が候補となることが明らかとなった。

第3章 ヒト肺がん患者の尿に含まれる揮発性肺がんマーカー候補化合物の探索

第2章の結果より、尿に含まれる揮発性化合物は固相マイクロ抽出法（SPME）を利用する

ことで抽出し、GC-TOF MS による高感度な分析が可能であることを示した。そこで本章では、肺癌患者（20名）と対照者（20名）から得られた尿のにおいに関して、GC-TOF MS を用いた代謝物プロファイリングを行い、肺癌患者を特徴付ける尿中 VOC の同定を目的として研究を行った。また、対照者には、肺癌患者を特徴付けている VOC が、肺癌のみに特異的であること確認するため、肺癌以外の肺疾患患者（慢性閉塞性肺疾患、喘息）を含めた。尿中 VOC は上記第 2 章で確立した方法を用いた。その結果、健常者グループと比較して肺癌患者グループで有意な増加の見られた 9 種類のマーカー候補化合物を特定した。さらに、得られた 9 種類の揮発性化合物のマーカーとしての能力を調べるために ROC 解析を行った。その結果、これらの揮発性化合物は高い感度と高い特異度を持つことが示された。次に、得られた揮発性化合物を用いて主成分分析を行ったところ、マーカー候補化合物の一つである 2-pentanone によって腺癌と扁平上皮癌を区別できる可能性を示した。また、得られた 9 種類の由来について考察したところ、特に 2-ethyl-1-hexanol、2-pentanone、tetrahydrofuran、2-methylpyrazine は肺癌のスクリーニング用マーカーとして有用であることを示した。これは、新しい簡便かつ非侵襲的な肺癌診断方法の実現可能性を示すもので、重要な知見といえる。

第 4 章 マウス尿中肺癌マーカー候補選定のための前処理法

水溶液中に含まれる揮発性有機化合物の抽出において、試料中に含まれる塩濃度、夾雑物、pH などの要因が抽出効率に影響すると考えられる。さらに、揮発性有機化合物はタンパク質や脂質に容易に吸着されることが知られている。そこで、尿においてもこれらの要因を適切に制御することができればより効率的な揮発性有機化合物の抽出が可能になると考えた。SPME 法による揮発性マーカー候補化合物の抽出効率を改善するために、これらの手法を組み合わせた 5 種類の前処理方法を用い、その影響を調べた。前処理方法を評価するために用いた揮発性肺癌マーカー候補は、A549 細胞を移植したヒト肺癌モデルマウスを使った実験から特定した 21 種類の揮発性有機化合物を用いた。その結果、飽和量の塩化ナトリウムを加えた後、加熱処理（120°C, 1 時間）する方法が最も抽出効率を改善させた。第 3 章では、揮発性化合物を熱分解から保護するために、抽出の際の加熱は控えたが、本研究テーマの最終的な目的は、早期肺癌を簡便かつ高精度に診断することである。揮発成分とがんとの生化学的な因果関係を考察する上では、尿中の成分の化学変化を伴うような処理は避けるべきであるが、診断の確実性の観点からは、がん患者と正常者の尿の違いが明確になることが最も重要であると考え、できるだけ揮発成分の検出感度を高めることのできる塩化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせる前処理を用いて、再分析することとした。この方法は塩化ナトリウムを添加し加熱するだけ

の簡便さもあり、ヒト尿中の揮発性肺がんマーカ―の検出感度の向上にとっても適した前処理方法であることが期待できる。

第 5 章 前処理方法を用いた尿中新規揮発性肺がんマーカ―候補化合物の探索

第 4 章において確立した前処理方法は、マーカ―の検出感度を向上するだけでなく、得られるクロマトグラム全体にも大きな影響を与えることを示した。そこで本章では、確立した尿の前処理方法を利用して従来よりも高い確度で識別できる尿中揮発性肺がんマーカ―の探索を試みた。移植後初期の肺がんモデルマウス尿を検体とし、第 4 章で用いた 5 種類の前処理を行った後、SPME GC-TOF MS を行った。その結果を基にした代謝物プロファイリングにより揮発性肺がんマーカ―候補化合物の特定を行った。その結果、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加した後、加熱処理することで、肺がんの初期ステージでも識別できる可能性を示すマーカ―候補として 2,4-Dimethylheptane, Ethanol, Acetonitrile, 4-Heptanone が得られた。今回の研究に用いた尿サンプルは、第 2 章で用いた尿（移植後 26 日から 30 日）よりも早期の尿（移植後 20 日から 25 日）であることを考慮すると、この処理を行えば肺がんの初期のステージでも識別できる可能性がある。これらのことから、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加してさらに加熱処理すると、尿に含まれる本来の成分のかかなりの部分が化学的に変化し、肺がんとの因果関係がわかりにくくなってしまふことは否定できないが、肺がん罹患由来の尿を早期に感度よく区別することが本研究の第一の目的であり、その観点に立てばヒト由来の尿の分析においてもこの前処理方法が有効に働く可能性は十分に期待できる。

【結言】

1. 尿中揮発性肺がんマーカ―の存在について、センサーマウスを使った行動実験によって明らかにした。
2. SPME 法による揮発性有機化合物の抽出・濃縮、GC-TOF MS を用いた高感度な分析、統計処理を利用したマーカ―候補の特定といった 3 つの技術を組み合わせ、希薄な尿中揮発性肺がんマーカ―を同定するための方法を確立した。
3. 肺癌患者と健常者の尿中揮発性化合物を比較することで、9 種類の尿中揮発性肺がんマーカ―を同定した。
4. 前処理を行うことで、揮発性化合物の抽出効率を改善するだけでなく、より有用な尿中揮発性肺がんマーカ―の存在の可能性を示した