

唾液サイトカイン群の網羅解析による 肺がんスクリーニングの可能性

Clinical Utility of Salivary Cytokines for Estimation of Lung Cancer

山口昌樹*

体内で情報伝達を担う生化学物質のネットワークを利用し、バイオマーカーの種類、量、および変化からがん代表される病気の進行を可視化する技術がもたらすインパクトはきわめて大きい。筆者は、300種以上が発見されているサイトカインと呼ばれる一群の情報伝達物質の変化を分析し、がんを可視化することを目的としている。ここでは、がん部位の推定に関する唾液サイトカインの網羅解析の臨床的意義を概観する。

1. はじめに

臨床で使用されているCT (Computed Tomography) やMRI (Magnetic Resonance Imaging) など形態情報に基づく診断機器や、PET (Positron Emission Tomography) など機能情報に基づく診断機器では、直径1 cm以下のリンパ節転移を正確に検出できる精度を有していない。また、がんの診断にも血中のタンパク質をマーカーとして利用することがあるが、診断精度は満足できるものではないため、補助的な検査となっている。一方、分析技術の著しい進歩により、本特集号でも取り上げられているように、メタボローム解析やエクソソーム解析などにより、がんの発症に伴って異常を示す新たながんマーカーの探索が精力的に行われている¹⁾。

がん患者の死因の9割は転移である。すなわち、がん転移を制圧することはがんを制圧することである。がん転移はランダムに起こるわけではなく、乳がんは肺へ、大腸がんは肝臓へなどと、ある程度の指向性がある。この臓器選択性を制御

しているのが、細胞遊走を主要な作用とするケモカインと呼ばれるサイトカインの一群である。サイトカインは、細胞から分泌されるタンパク質であり、細胞間相互作用に関与する生理活性物質の総称で、ヒトでは現在までに300種類ほどが同定されている²⁾。サイトカインは、標的細胞にシグナルを伝達し、細胞の増殖、分化、細胞死、機能発現、創傷治癒など多様な細胞応答を引き起こす生命維持の根幹にかかわる物質群である。

サイトカインには免疫、炎症に関係したものが多く、炎症症状を引き起こす原因因子として関与するものを炎症性サイトカイン、炎症症状を抑制する働きをもつものを抗炎症性サイトカインと呼ぶこともある。がんが進むと全身に炎症が広がっていくように、筆者らはいくつかのサイトカイン濃度とがんの進行状態が強い関連性を持つのではないかとの仮説を立て、がんスクリーニング技術の開発に挑戦している。もし、唾液に含まれるサイトカイン(唾液サイトカイン)でがんの有無や進行度合いが推定できれば、非侵襲的な手法となるだけでなく、利用者自身で随時に採取すること

*Masaki Yamaguchi 信州大学 大学院 総合理工学研究科 生命医工学専攻 教授

も可能となる。ここでは、複数のサイトカインを同時分析することが、がんマーカーとしてどのような可能性を持つか、文献、唾液分泌機序、分析技術、および先行的な探索研究結果をもとに概観してみる。

2. 文献から見た血中サイトカインとがん

2.1 サイトカイン

炎症は、外傷や感染で死んでしまった細胞や異物を排除して、生体の恒常性を維持しようという反応である。外傷、感染、異物に反応して急性の炎症反応が生じ、死亡細胞や遺物の排除を行う。局所的に増幅した炎症反応は、その後抗炎症作用によって速やかに消散し、組織の修復過程に繋がる。この一連の防御反応は、T細胞やB細胞などの細胞間相互作用によって成り立っており、それらの情報伝達にはサイトカインと呼ばれる一群のタンパク質が必須であることが明らかとされている。

炎症性サイトカイン (inflammatory cytokine)、抗炎症性サイトカイン (anti-inflammatory cytokine) という呼称はサイトカインの分類ではなく、サイトカインの生理学的作用を説明するのに便利な場合に使われる呼び方である。炎症性サイトカインとしてコンセンサスが取れているのはIL-6, TNF- α , IL-1 β で、これらにIL-12, IL-18, IFN- γ , IL-17Aを加える研究者もいる^{3,4)}。IL-8はケモカインであるが、炎症性サイトカインに含まれることが多い。抗炎症性サイトカインとしては、IL-10とTGF- β が挙げられる。IL-4はアレルギーなどの2型炎症を引き起こすという意味からは炎症性サイトカインといえるかもしれないが、炎症性サイトカインに含まれることはなく、IL-13とともに抗炎症性サイトカインとして説明されることがある。

2.2 血中サイトカインとがんの相関性

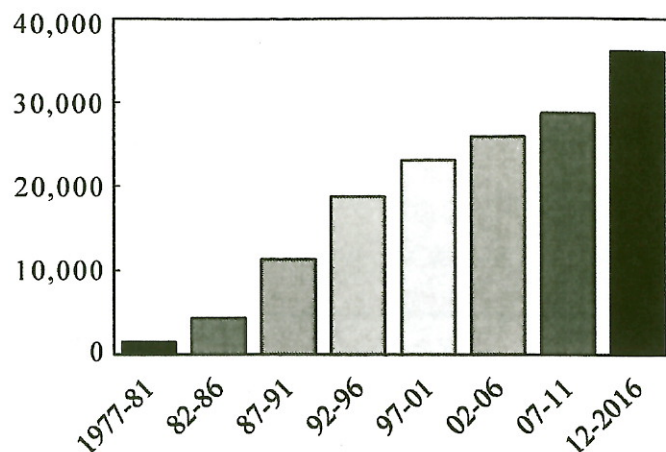
無料文献検索エンジンを例にとり、サイトカインに関する学術研究の状況を見てみよう。PubMed (パブメド, 国立生物工学情報センタ

ー; NCBIが運営) を用いて「cancer×cytokine」で検索すると、1977~2016年の40年間でがんとサイトカインに関する149,779編におよぶ英文学術論文が発表されている。ちなみに、エルゼビア社が提供する世界最大級の有料文献検索エンジンScopus (スコーパス) では、同条件で20万編を超える。同一期間でがんというキーワードのみから検索される論文が300万編あることから、その5%でサイトカインについて何らかの言及がなされていることになる。5年毎の文献数の推移をみると継続的に増加しており、2010年代では6,874編/年程度に達している (図1(a))。なお、salivaで限定すると148編となり、大部分の論文が検体に血液 (血清, もしくは血しょう) を用いていると想像される。

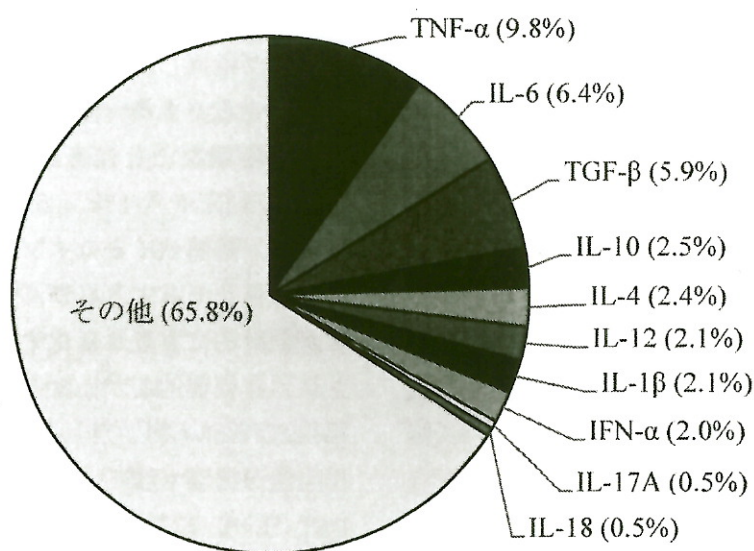
文献数の多いサイトカイン上位10種類を列記すると、TNF- α (9.8%), IL-6 (6.4%), TGF- β (5.9%), IL-10 (2.5%), IL-4 (2.4%), IL-12 (2.1%), IL-1 β (2.1%), IFN- α (2.0%), IL-17A (0.5%), IL-18 (0.5%)となる。ほとんどが炎症性/抗炎症性サイトカインであり、これらで34%を占めていることが判る (図1(b))。

数十万編に及ぶ論文をレビューするのは、人手のみではもはや物理的に不可能であろう。情報量が人間の処理能力を超えつつある現代社会の現状は、ある意味で興味深い。私などはよく恩師から「自分の専門分野の論文ぐらいいは、ちゃんと目を通しなさい」と怒られたものであるが、一個人が全ての論文に目を通せる時代は、幸せな時代だったのではないかと思うことがある。機械学習などの技術に期待が寄せられるのも理解できる。

ほんの一部ではあるが、いくつかの論文を取り上げてみる。Ashizawaらは、IL-6が胃がん浸潤およびリンパ節・肝転移に関与していると考えられるとし、IL-6の予後マーカーとしての可能性を示唆している⁵⁾。Liuらは、血清MIC-1 (Macrophage inhibitory cytokine-1) が、早期肺がん患者の診断および予後のバイオマーカーであり得ると示唆している⁶⁾。また、DeCotiisらは血中サイトカインの網羅解析から肺がんとの関連性についてレビ



(a) 5年毎の文献数の推移



(b) 論文件数上位 10 種類のサイトカインとその割合

図1 文献検索エンジン PubMed 「cancer×cytokine」で検索した結果ヒットした
がんとサイトカインに関連する学術論文数 (1977~2016年, 計 149,779 編)

ユーしており, 進行した肺がんにおいて IFN- γ や TNF- α などいくつかのサイトカインが増加すると述べ, 予測よりも進行度合いの推定に用いることに優位性があると示唆している⁷⁾。

新規がん治療薬として, 2014年に免疫チェックポイント阻害薬「ニボルマブ」が登場して以来, 薬剤投与の適切な患者選択と治療効果を予測するバイオマーカーの確立が渴望されている^{8,9)}。このような薬剤と一対で使用され, 薬剤反応性(治療反応性)をモニタリングするバイオマーカーは, コンパニオン診断薬と呼ばれている¹⁰⁾。つま

り, がんマーカーには, 早期診断のためのスクリーニング検査技術と, 薬剤反応性のモニタリング(予後管理)という2大ニーズがある。

3. 唾液サイトカイン

前述したように, 血中サイトカインとがんの相関性に関しては, 膨大な先行研究が存在する。では, 唾液サイトカインによるがんスクリーニングの可能性を考えると, 重要なポイントは何であろうか。それは, (a)サイトカイン濃度に関する血液と唾液の相関性, (b)唾液サイトカインとがんと

の相関性、の2項目であろう。ここでは、これらに焦点を当てて考えてみたい。

3.1 唾液の分泌ルート

これまで、様々なバイオマーカーに関する血液と唾液の相関性が検証されてきた¹¹⁾。唾液腺は、血液を原料として唾液を作っている。唾液腺細胞によって分泌された唾液（原唾液）が、導管を通過して口腔内に向かって流れていく間に、唾液に含まれる生化学物質の一部が能動的に再吸収され、唾液を水に近い組成に変えていく。ぶどう糖など生命維持に重要な生化学物質の再吸収率は高いことが判っている。しかし、この再吸収を受けない生化学物質は、血液中の濃度とある程度の相関を持ったまま口腔内に排出される¹²⁾。この唾液腺における生化学物質の分泌ルートには、(1)タイトジャンクション（細胞間隙）ルート、(2)細胞内通過ルート、(3)エキソサイトーシス（開口分泌）ルートがあり、血液と唾液の相関性はどのルートから唾液中に分泌されたかに大きく依存する¹³⁾。

- (1) タイトジャンクション：通常、隣り合う細胞は、分子が細胞間を通過するのを防ぐために結合している。唾液腺細胞の間には、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間結合があり、これは刺激によって開いたり閉じたりする。濃度の差こそあれ、血液に存在するほとんど全ての物質が唾液にも存在するのは、この機構が存在するからである。
- (2) 細胞内通過ルート：唾液腺細胞の細胞膜に、イオンチャンネルと呼ばれる膜貫通タンパク質が存在し、ナトリウムイオン (Na^+)、塩素イオン (Cl^-)、カリウムイオン (K^+) などの特定のイオンを血液中から細胞内に取り込んだり、唾液中に分泌したりする。また、コルチゾールのような脂溶性物質では、細胞内ルートを経るので血液と唾液の相関性は良好である¹⁴⁾。
- (3) エキソサイトーシス：細胞内で合成されたタンパク質などの生化学物質は、ゴルジ体で分泌顆粒という泡のようなものに貯蔵される。この分泌顆粒が細胞膜に近付くと、細胞膜の一部が

シャボン玉のように膨れてちぎれ、分泌顆粒内の物質が細胞外に放出される。唾液腺細胞で生産されるアミラーゼなどの酵素は、このルートで分泌される。

3.2 がんとの相関性

サイトカイン濃度に関して血液と唾液が相関するという事は、唾液サイトカインの由来が血液と断定できるということである。今のところ、条件を満たせば相関性が有るとするもの¹⁵⁾、健常者では相関が無いとするもの¹⁶⁾、相関性の有無はまだ断定できないとするもの¹⁷⁾ が併存する状況にある。この原因の一つとしては、相関がないとする論文が指摘しているように、唾液採取方法が影響している。また、歯周病の影響を完全に除いた評価が困難なことにも起因していると考えられる^{18,19)}。

次に、唾液サイトカインとがんとの相関性について着目してみよう。がん患者の唾液サイトカインが統計的に有意に変化することは繰り返し報告され、非侵襲的ながんマーカーとしての可能性が期待されている^{17,20,21)}。これらの論文でがんとの相関性が指摘されている唾液サイトカインは、IL-1 β 、IL-8、EGF などである。

4. 唾液サイトカインと肺がんの相関性

4.1 網羅分析

バイオマーカーの分析に用いられるバイオセンサは、目的物質のみを認識する部分（分子認識素子）と、認識したという情報をシグナルに変換する部分（信号変換素子）から構成され、両者の特性がセンサ性能を左右する。高感度なバイオセンサに共通しているのは、分子識別素子に抗原-抗体反応（イムノアッセイ）を用いていることである。

よって、バイオマーカーの高感度分析には、信号変換素子においてどのような原理で信号増幅するかがキーテクノロジーとなる。サイトカイン群は1~1,000 pg/mL の幅広い濃度に分布しており、最も低濃度領域のサイトカインでは1 pg/mL

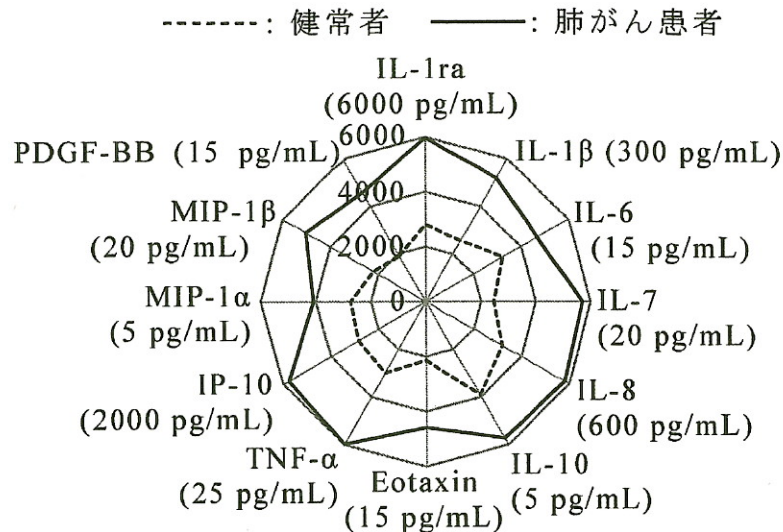


図2 Mann-Whitney 検定で肺がん (NSCLC) 患者と健常者に有意差が認められた唾液サイトカイン 12 種類

の感度が必要となる。2000年頃より、主に磁気ビーズ法¹⁸⁾やデジタルELISA法²²⁾などの信号増幅方法が提案されている。デジタルELISA法を用いることで、1サンプルから100種類ほどのバイオマーカーを同時分析できるマルチ分析システムが、米国のクオンテリクス社などから実用化されている。通常の化学発光法では、1つの反応室の化学発光強度をアナログ的に読み取ることで、被測定物質の濃度に比例した検出信号を得ている。デジタルELISAでは、サンプルをいったん $10^5 \sim 10^6$ 個の反応室に分割し、化学発光の信号が検出されるか否かというデジタル信号として検出して積算することで高感度化している。

4.2 肺がんに関するケースコントロールスタディ

筆者らは、がん部位毎の検出可能性を検討している。ここでは、肺がんに関する探索研究の一例を紹介する。被検者は、ステージI～IVの非小細胞肺がん (NSCLC; non-small cell lung cancer) 成人患者 35名 (年齢42～80歳) と健康成人 35名 (年齢42～69歳) の2群である。研究に先立ち、信州大学倫理委員会の承認を得た。

朝6～9時、昼11～13時、夕方15～16時の3回、被検者から唾液150 μLを採取した。サイトカインの分析には、磁気ビーズ法を用いたマルチ

分析システム (Bio-Plex, バイオ・ラッドラボラトリーズ株) を使用し、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインを中心に27種類 (IL-1ra, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, VEGF) を同時分析した。肺がんとサイトカイン群との関連性を検証するために、(1) Mann-Whitney 検定, (2) ロジスティック回帰分析および(3) Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を行った。

27種類のサイトカイン群のうち、6種類については感度不足で有効検体数を分析できなかった。21種類に関して Mann-Whitney 検定したところ、12種類のサイトカインで肺がん患者と健常者に有意差が観察された ($p < 0.05$, 図2)。これら12種類について変数減少法でロジスティック回帰分析したところ、IL-10 (オッズ比: 1.156) と IP-10 (オッズ比: 1.000) によるロジスティックモデルが得られた ($p < 0.05$)。ROC 解析してその検出能を評価したところ、感度 60.6%, 特異度 80.8% が得られた (図3, 曲線下面積: 0.701)。このように、がん部位に特徴的な数種類のサイトカインの濃度を 1 pg/mL 領域で同時分析すれば、がん部位の罹患リスクを推定できる可能性が

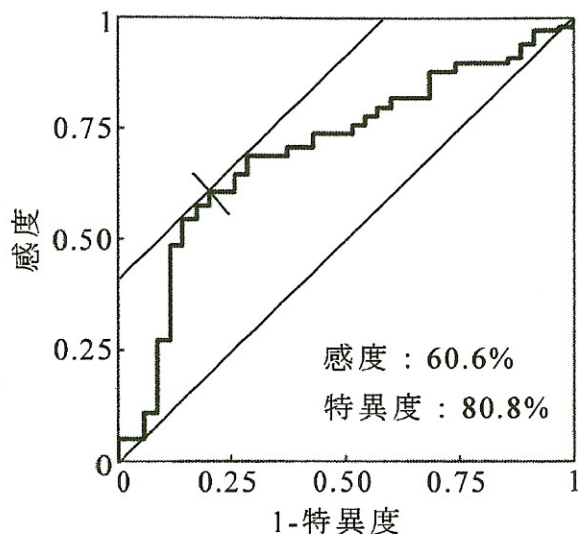


図3 IL-10とIP-10を用いたロジスティックモデルで肺がん (NSCLC) リスクに関するROC解析

あることが示唆された。

5. おわりに

本研究はまだその端緒についたばかりであるが、複数のサイトカインにより体内ネットワークモデルとして記述 (コーディング) されている細胞間情報を数値化するアルゴリズムと、数種類のバイオマーカーに特化して現場で迅速に分析できるバイオセンサアレイが実現できれば、体内をデジタル的にイメージ化するキーテクノロジーとなり、がんだけでなく幅広い疾患検査への波及効果を持つと考えられる。

血糖値による糖尿病検査に代表されるように、医療の診断現場では1項目1検査が主流で、複数のバイオマーカーを用いて1つの疾患を検査するという多項目1検査は世界的にもまだ実用化例がほとんどない。しかし、多項目1検査は生活習慣、環境因子、遺伝的因子など複数の要因が関与する疾患の診断には有効であり、IoT (Internet of Things) にも通じる新しいアプローチであろう。この検査アルゴリズムの構築には、機械学習などといった情報処理技術の取り込みも必要となる。

謝辞：臨床研究に協力された信州大学医学部包括的がん治療学教室の小泉 知展 教授に謝意を表す。ここ

に記載した成果の一部は、平成 27~28 年度ふくしま医療福祉機器開発事業費補助金「唾液マーカーによる非侵襲・迅速・安価ながん兆候の検出技術の開発」、および平成 28~30 年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究 B「サイトカインコーディングとマイクロ粒子センサアレイによるがんの可視化」(課題番号：16H03166, 代表：山口 昌樹) によって行われた。

文 献

- 1) Jayanthi VSPKSA *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **91**, 15~23 (2017)
- 2) 笠倉新平, 松島綱治 編著: サイトカイン・ケモカインのすべて, 第3版改訂新版, (株)日本医学館 (2004)
- 3) Raison CL *et al.*, *Trends Immunol.*, **27** (1), 24~31 (2006)
- 4) Steptoe A. *et al.*, *Brain Behav. Immun.*, **21** (7), 901~12 (2007)
- 5) Liu YN *et al.*, *Chin. Med. J.*, **129** (17), 2026~2032 (2016)
- 6) Ashizawa T. *et al.*, *Gastric Cancer.*, **8** (2), 124~31 (2005)
- 7) DeCotiis C. *et al.*, *Cancer Biomark.*, **16**, 219~233 (2016)
- 8) 柴山史朗, *ファルマシア*, **52** (4), 322~326 (2016)
- 9) 清水哲男, *日大医誌*, **75** (4), 161~163 (2016)
- 10) 登 勉, *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **36** (2), 79~85 (2012)
- 11) 吉田 洋, *歯科医学*, **63** (1), 64~71 (2000)
- 12) 山口昌樹, 高井規安, *唾液は語る*, 工業調査会 (1999)
- 13) 山口昌樹, 花輪尚子, *Bio Industry*, **24** (10), 15~19 (2007)
- 14) 山口昌樹, *ストレス科学*, **29** (4), 355~365 (2015)
- 15) Schapher M. *et al.*, *Clin Chim Acta.*, **412** (19~20), 1740-1748 (2011)
- 16) Williamson S. *et al.*, *Nurs. Res. Pract.*, **2012**, 246178 (2012)
- 17) Idris A. *et al.*, *Biomark. Cancer*, **7**, 25~29 (2015)
- 18) Arellano-Garcia ME *et al.*, *Oral Dis.*, **14** (8), 705~712 (2008)

- 19) Leishman SJ *et al.*, *Dis. Markers*, **35** (5), 543~549 (2013)
 20) Rathnayake N. *et al.*, *PLoS One*, **8** (4), e61356 (2013)

- 21) Prasad S. *et al.*, *Exp. Biol. Med.*, **241** (8), 783~799 (2016)
 22) D. H. Wilson *et al.*, *J. Lab. Autom.*, **21**, 533~547 (2016)

非侵襲的検体検査の最前線 —唾液検査・呼気検査を中心に—

監修：槻木 恵一（神奈川歯科大学）

- ★医療現場やヘルスケア産業において需要が高まる「非侵襲的検査技術」!
 ★特に利用拡大が期待されている「唾液検査」及び「呼気検査」に焦点を当てた初の書籍!
 ★検査法やデバイスの研究開発動向、国内外の市場動向や今後の展望が見えてくる!

【第I編 総論】

- 第1章 非侵襲的検査について
 第2章 ヘルスケアモニタリング技術の現状と今後

- 4 全身性疾患の唾液検査
 5 前立腺がん診断への応用
 6 唾液を用いたアレルギー診断
 第6章 唾液検査に用いる新規デバイスの開発動向

【第II編 唾液検査】

- 第1章 唾液検査による診断的価値と市場
 第2章 米国における唾液検査の動向-NIDCR研究ロードマップ
 第3章 唾液腺の基礎知識と唾液産生の仕組み
 第4章 唾液検査によるヘルスケアと診断
 1 唾液検査のストレス測定への展開
 2 唾液中のステロイドホルモンの測定とその意義
 3 唾液検査における喫煙マーカーの測定と有用性
 4 HIV唾液検査の評価
 5 感染症診断における唾液検査の有用性-糖鎖固定化ナノ粒子を用いた感染初期からのインフルエンザウイルス、およびエイズウイルス(HIV-1)の検出-
 6 唾液を用いた個人識別
 7 唾液検査と歯科～齲蝕活動性試験と歯周病検査～
 第5章 新規唾液検査法の開発動向
 1 sIgAを指標とした免疫力評価
 2 アンチエイジング医学と唾液検査
 3 臨床検査としての唾液検査の応用と可能性

【第III編 呼気検査】

- 第1章 呼気検査の診断的価値と市場
 第2章 呼吸器の基礎知識と呼気産生の仕組み
 第3章 呼気検査によるヘルスケアと診断
 1 口臭検査
 2 尿素呼気試験によるヘリコバクターピロリ感染の診断
 第4章 新規呼気検査法の開発動向
 1 呼気ガス分析による腸内環境・消化管機能評価
 2 呼気中アセトンによるダイエット評価
 3 呼気ガスによる肺がん診断-現状と可能性
 4 呼気中一酸化窒素濃度(FeNO)測定の気管支喘息診断・管理における有用性
 5 13C呼気試験による肝機能検査
 6 糖尿病患者における呼気アセトン測定の意義
 7 精神科領域における呼気ガス検査の応用
 8 呼気による消化管機能評価
 第5章 呼気検査に用いる新規デバイスの開発動向

■体裁/B5判・261頁 ■発行/2015年1月 ■定価/68,000円+税

申込 FAX:03(3293)2069 <http://www.cmcbooks.co.jp/> シーエムシー出版