

線虫でがんを検査する技術 「N-NOSE」の発明と実用化

株式会社HIROTSUバイオサイエンス

広津 崇亮

代表取締役

2005年 九州大学大学院理学研究院生物科学部門 助教

2016年 株式会社HIROTSUバイオサイエンスを設立し代表取締役に就任



1. はじめに

ここ最近、幸いにも私の線虫がん検査の研究が注目を浴びることが増え、メディアや講演会で話す機会が多くなった。そこで呼ばれるようになったのが「線虫博士」である。線虫というマイナーな生き物が好きで研究している変わった科学者と思われてしまつたらしい。しかし、線虫はノーベル賞受賞者が6名も出ている生物界では非常にポピュラーな生物であり、世界中に多くの研究者が存在する。さらに付け加えると、私は線虫の嗅覚を20年以上研究してきたが、人間の嗅覚のメカニズムに興味があつてその研究モデルとして線虫を使ってきただけで、線虫そのものに興味があるわけではない。世界中の研究者も私と同様に線虫を基礎研究のモデル生物として捉えてきた。そのために、線虫の嗅覚が優れていることは皆知っていたが、それを社会貢献に生かそうという発想がこれまでなかつたのである。どの分野でもそうであろうが、固定観念が強ければ強いほど、発想の転換はむずかしい。

こうして、研究の世界では長年基礎研究の生物として考えられてきた線虫は、社会に役立つ生物として広く人々に知られるようになったが、私は相変わらず線虫のことが好きな研究者だと思われているようだ、テレビの台本にも「ここで線虫愛を語ってください」といつも書いてある。空気を読んで「愛しています！」と答えることにしている。

2. がんの現状とがん検査の課題

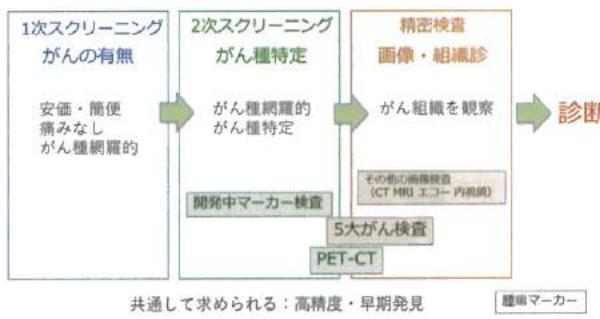
がんによる死亡を防ぐ最も有効な手段は、早期発見・早期治療である。胃がん、大腸がんの5年生存率は、ステージ0、1のいわゆる早期がんでは約90%と非常に高い結果が報告されている。しかし、わが国の主要5大がん（肺がん、大腸がん、胃がん、乳がん、子宮がん）のがん検診受診率は約30%にとどまっている。この受診率はほかの先進国と比較しても圧倒的に低く、たとえば米国

肺がん、子宮がんのがん検診受診率は80%近くある。わが国でがんが死因第1位である最大の理由は、がん検診受診率が低いことにあると考えられる。

わが国のがん検診受診率が低いのはなぜだろうか。2016年の国勢調査の結果によると、がん検査を受けない理由として「受ける時間がない」「健康状態に自信があり、必要性を感じない」「費用がかかる」「痛みを伴う」「それほど精度が高くない」などが挙げられている。「がんと分かるのが怖い」という理由も上位である。国が推奨しているがん検査は、5大がんに対する6種類の検査である。これらは科学的にも効果が証明された検査ではあるが、受診者にとっては「がん種ごとに異なる検査を別々に受ける必要がある」というのはデメリットであるかもしれない。ちなみに、5大がんは死亡者数の上位5種ではなく、上位5種は肺がん、大腸がん、胃がん、肝臓がん、膵臓がんとなっている。すなわち、死亡者数が多いにも関わらず、国が推奨するがん検査に含まれていないがん種も存在することは覚えておく必要がある。

がん検査を受けない理由のひとつとして、「がん検査がよく分からない」という理由も挙げられている。それぞれのがん検査技術にはメリットとデメリットがあり、それをよく把握して受診するのが望ましいのだが、それはなかなかむずかしい。図1にがん検査の流れに応じて、主要ながん検査、次世代のがん検査技術がどこに位置付けられるかを表した。皆さんに最初に受ける入口の検査＝1次スクリーニング検査として、がんの有無を簡単に調べられる検査が存在することが望ましい。1次スクリーニング検査に必須の特長として、安価、簡便、高精度、がん種網羅的、早期発見が挙げられる。1次スクリーニング検査で陽性だった場合、がん種を特定し、がん組織を画像などで捉えて、医師ががんと診断するのが一連の流れである。ここで改めて図1に注目していただきたい。現在、1次スクリーニング検査がこの世に存在しないのである。入口の検査がないにもかかわらず、その次の検査を受け

るよう勧められている状態で、がんがあるかないかも分からぬときに、高価、痛い、面倒などのデメリットのある検査を受けるのが負担であるのは想像に難くない。したがって、わが国のがん検診受診率を上げ、がんの早期発見率を上げる最も効果的な方法は、1次スクリーニング検査を作ることにあると私は考えた。



3. 生物診断という新しい発想

先ほど述べた通り、1次スクリーニングがん検査は、安価、簡便、高精度、がん種網羅的、早期発見との特長を全て兼ね備える必要がある。そのようながん検査技術は果たしてできるのであろうか。がん検査も含めて既存の検査のほぼ全ては、人工機器あるいは人工キットによっておこなわれている。がんを早期発見するためには、早期の小さながん組織を画像で捉える、あるいは小さな組織から分泌される極微量のマーカをセンサで捉える必要がある。そのためには機械のスペックを大きく上げる必要があり、結果として高価な検査ができてしまう。そこで反対に、安価を追求するために簡易キットを作ると、今度は高精度を満たせない場合が多い。つまり、人工機器に頼る限り、安価と高精度を両立することが非常にむずかしいという大きな壁に直面する。

そのジレンマを打破するものとして発想したのが、新しいコンセプト「生物診断」である。動物は五感のうち嗅覚に頼って生きていることが多く（人間のみ視覚の生き物といわれている）、鋭敏な嗅覚を有している。そして進化した生物の嗅覚は、人工機器と比較して微量物質を検知する感度が圧倒的に高く、よって、嗅覚を用いることができれば、高精度は満たされる。嗅覚の優れた動物として犬がよく知られているが、犬の飼育、訓練にはコストがかかるため、犬で検査するとやはり高価な検査ができてしまう。そこで私は、飼育コストが安価で、かつ嗅覚に優れた線虫を選択することで、初めて安価と高精度の両方を満たすことができるではないかと考えた。

線虫がん検査N-NOSE (Nematode NOSE=線虫の鼻) は、そのほかにも簡便、がん種網羅的といった特長があり、1次スクリーニング検査に向いた特性を有している。本稿では、N-NOSEの発見の経緯と実用化への取り組みについて紹介する。

4. がんの匂い

がんに特有の匂いがあることは、がん探知犬を用いた研究によって明らかにされてきた。しかし、がん探知犬の臨床応用は困難であると考えられている。がん探知犬の能力には個体差がある。また集中力に左右されるため1日に5検体程度しか調べることができない。がん探知犬の訓練は正解を当てたときに褒美を与えることでおこなわれるが、正解未知のサンプルに対する実際の検査では、トレーナーが褒美を与えるタイミングが分からぬため、検査を繰り返すと訓練度が落ちてしまう。

5. 線虫C. elegansの嗅覚

そこで私は、線虫C. elegansに注目した。線虫は一般には寄生性のものが知られているが（回虫、ぎょう虫など）、実は土壤や海中に生息しているものが多く、C. elegansは土壤中の体長約1mmの自活性線虫である。がん検査に用いる生物として見た場合、C. elegansが優れているのは、雌雄同体のため掛け合わせの必要がなく1匹の成虫から受精卵が産まれてくること（1匹の成虫あたり約100個～300個）、世代交代は約4日で増殖が速いことがある。そのため、飼育が容易で低成本である。さらに、産まれてくる子孫は遺伝的背景が同じクローンのため、個体差がほとんどない点でも制御がしやすい。また凍結保存により半永久的に株を保存・維持できるため、突然変異による株の変化にも対応できる。これらは、研究用生物として優れている点だと考えられてきたが、それがそのまま検査として用いる場合にもあてはまる。

線虫C. elegansは嗅覚の優れた生物であり、哺乳類と似た仕組みで匂いを受容することから、嗅覚研究のモデル生物として用いられている。ヒトには匂いを受容する嗅覚神経が500万個あるといわれているが、C. elegansには5種10個（左右に1対存在する）しかない。そのため、解析が容易である。線虫は好きな匂いには誘引行動を、嫌いな匂いには忌避行動を示す。よって、線虫が匂いを感じているのか、その匂いが好きなのか嫌いなのかは、寒天プレート上で走性行動を指標に容易に解析することができる。

C. elegansは嗅覚受容体を約1,200種以上有している。これは、ヒトの約3倍、犬の約1.5倍に相当し、より多くの

匂いを識別する能力を備えていると予想される。線虫*C. elegans*は犬と匹敵する、あるいは犬以上に嗅覚が優れた生物であるといえるかもしれない。

6. 線虫*C. elegans*のがんの匂いに対する反応

私は、まず血液について調べたが、がん患者、健常者の間で有意な差は見られなかった。そこで、尿に注目することにした。尿は簡便に非侵襲的に採取できるため、受診者の負担が最も少ない試料である。しかし、尿原液を用いて線虫の反応を調べたところ、がん患者の尿に対して誘引行動は見られなかった。

この最初の結果を見て、ほとんどの研究者は尿を濃縮することを考えるに違いない。がんの匂い物質は、血液中に含まれて体中を回り、尿として排出されることから、尿中のがんの匂いの濃度は非常に低いと予想される。しかし私は、同じ匂いでも濃度が変わると線虫の嗜好性（好き嫌い）が変化することを以前発見しており、その神経メカニズム⁽¹⁾、分子メカニズム⁽²⁾についての知見を得ていた。そこで、逆転の発想で、尿原液は濃度が高いために線虫は忌避行動を示すのであり、尿を薄めたら誘引行動を示すようになるのではないかと考えた。そして結果的に、10倍希釀付近に線虫が反応することを見出した。10倍に薄めたがん患者の尿20検体、健常者の尿10検体について線虫の反応を調べたところ、全てのがん患者の尿には誘引行動を、反対に全ての健常者の尿には忌避行動を示した⁽³⁾（図2、図3）。

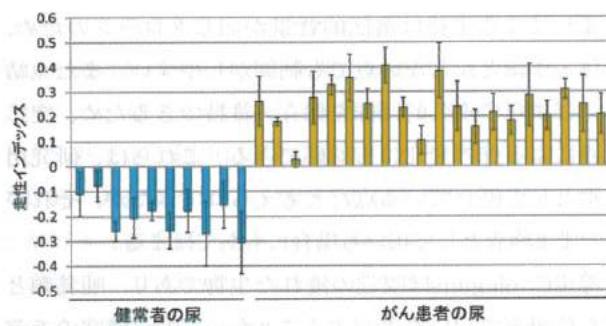


図2 尿に対する線虫の走性

線虫は健常者の尿には忌避行動を、がん患者の尿には誘引行動を示す。走性インデックスは、正の値=線虫が好きな匂いと感じて誘引行動を示した、負の値=線虫が嫌いな匂いと感じて忌避行動を示したことを表す。エラーバーは標準誤差(Sem)。文献⁽³⁾より改変。

次に尿中の「匂い」を線虫が感じているかどうかを明らかにするために、線虫の嗅覚神経を破壊したときの走性行動を観察した。すると、がん患者の尿に対する誘引行動は、好きな匂いを受容する嗅覚神経の破壊により有

意に減少した。さらに、生きている線虫の嗅覚神経はがん患者の尿に有意に強く反応した。よって線虫は、尿中におけるがんの匂いを嗅覚神経で感じていることがわかった⁽³⁾。

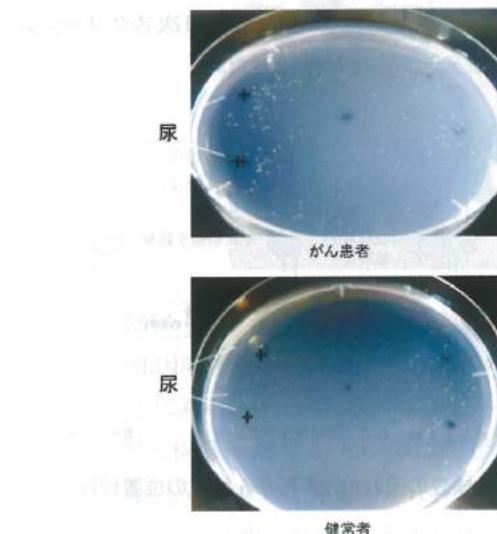


図3 がん患者、健常者の尿に対する野生型線虫の走性の写真
左のプラスの2点に尿を置いている。文献⁽³⁾より改変。

7. N-NOSEの精度

線虫がん検査N-NOSEの精度を調べるために、242検体（がん患者：24、健常者：218）の尿を用いて検証をおこなった。その結果、がん患者24例中23例が陽性、健常者218例中207例が陰性を示した。すなわち、感度は95.8%、特異度は95.0%であった（図4）。同じ被験者群について既存の3種の腫瘍マーカーでも検査をおこない比較すると、N-NOSEは感度が圧倒的に高いことが分かった。腫瘍マーカーは早期がんの検知に難点があることが知られており、我々の実験結果でも、早期がんに対して感度がさらに低くなかった。一方、N-NOSEは早期がんでも高い感度を示した（図4）⁽³⁾。

ステージ	CEA	抗p53抗体	原中ジアセチルスペレミン(DiAcSpm)	N-NOSE
0	33.3%	0.0%	0.0%	100.0%
I	0.0%	22.2%	11.1%	88.9%
II	20.0%	20.0%	0.0%	100.0%
III	25.0%	0.0%	25.0%	100.0%
IV	100.0%	33.3%	66.7%	100.0%
Total	25.0%	16.7%	16.7%	95.8%

図4 腫瘍マーカーとN-NOSEのステージごとの感度の比較

8. N-NOSEの利点

N-NOSEは、下記のさまざまな優れた点を全て併せ

持ったがんスクリーニング法である。

- ①安価：材料費だけなら1検体あたり数百円程度
- ②簡便、痛みがない非侵襲：尿を用い必要量も1滴程度
- ③高精度：感度95.8%と腫瘍マーカと比べ圧倒的に高い
- ④早期発見：ステージ0、1の早期がんについても高感度
- ⑤がん種網羅的：約10種類のがんについて検出可能

これらの特長は、N-NOSEが1次スクリーニング検査に適していることを示している。N-NOSEが実用化されれば、がん検診の受診率が飛躍的に向上すると予想される。その結果、早期がん発見率が上昇し、がんの死亡者数の激減、医療費の大幅な削減が見込まれる。一方、N-NOSEは生物そのものをセンサとして使用するために、周囲の環境や生物自身のコンディションの影響を受けやすい。これは生物診断に共通するデメリットであるが、線虫は前述のように比較的制御が容易である特長がある。

9. 実用化に向けて

私は長年理学部において基礎研究をおこなってきた研究者である。医師でなく、がんに詳しくなかったことが、発想を転換する意味ではよかったのかもしれないと思っている。一方、発明を実用化するうえでは、理学部の研究者であることは大きなデメリットである。理学部では企業との共同研究もほとんどおこなわれておらず、また医学部や病院との連携もほとんどないからである。ひとつのやり方として、発明者は実用化にタッチせず、どこかの企業に任せる選択肢もある。しかし、ノウハウを最も持っている発明者が先頭に立つ方が、明らかに実用化は早まるはずである。また、私はN-NOSEを安価な検査として世の中に広めたいと考えて発明したが、任せた企業は高価な検査として一部の富裕層向けに販売するかもしれない。そこで私は一念発起して2016年にベンチャー企業を設立し、社長に就任した。

N-NOSEは2020年1月の実用化を目指している。それまでに必須な研究開発には2つある。①臨床研究により症例数を増やしたときの精度検証と②自動解析装置の開発である。前者については、幸いなことに協力病院が一気に増え、大規模研究が進行中である。2016年12月に最新の臨床結果として、がん患者検体100例を超えた時点で、感度が90%以上を維持していることが報告された⁽⁴⁾。腫瘍マーカCEA、CA19-9は20%程度の感度であった。現在ではその数倍に症例数が増えているが、高精度を維持する結果が得られている。後者については、N-NOSEは1次スクリーニング検査として大きなニーズが見込まれることから、大量の検体を解析するための自動解析装置の開発

を進めている。我が国においてがん年齢（がん検査を受けるべき年齢）に達した人口は約6,000万人であり、世界展開も考えると、ハイスクロープな機械の開発は最重要である。機械の開発については大手企業と共同で進めている。また機械に使用する試薬などについても、複数の大手企業とのアライアンスを結び、さまざまな企業の技術を結集することで一刻も早い実用化を目指している。

N-NOSEは1次スクリーニング検査としてだけでなく、がん種特定検査、がん再発モニタリング技術としての実用化も期待できる。がん種によって匂いが違うことががん探知犬の研究により示唆されている。そこでがん種ごとの匂いに対応した受容体を同定し、その受容体を遺伝子組み換えによりたくさん働かせることができれば、あるがん種にだけ強く反応する特殊線虫を作ることができる。それらの特殊線虫株シリーズを用意することで、尿だけでがん種まで特定する検査を開発する。再発モニタリングについては、最新の成果が2017年6月に報告された⁽⁵⁾。それによると、N-NOSEで陽性と判定されたがん患者のうち、7割の患者で手術後にN-NOSEが陰転化した。がん組織の摘出により線虫の反応が変化したことから、尿に対する誘引行動はがんが原因であったことを示唆された。また、経過観察中に3人の患者で再発が発覚したが、3人ともN-NOSEで陽転化が確認されたことから、再発モニタリングにも有用である可能性が示された。N-NOSEは尿で検査できることから、繰り返し検査に向いており、早期発見にも優れていることから、ニーズが高いと予想される。

現在、当社では世界展開を始めている。目標は世界同時実用化である。「N-NOSEのおかげで早期発見できて良かった」そういう声が世界中で聞かれることを夢見ながら、今後も研究開発と事業化を急ピッチで進める予定である。

参考文献

- (1) Yoshida K, Hirotsu T, Tagawa T et al. Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat Commun.* 2012; 3: 739.
- (2) Taniguchi G, Uozumi T, Kiriya K et al. Screening of Odor-Receptor Pairs in *Caenorhabditis elegans* Reveals Different Receptors for High and Low Odor Concentrations. *Sci Signal.* 2014; 7: ra39.
- (3) Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T et al. A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using *Caenorhabditis elegans* Scent Detection. *PLoS One.* 2015; 10: e0118699.
- (4) 株式会社HIROTSUバイオサイエンス プレスリリース（2016年12月13日）
- (5) 株式会社HIROTSUバイオサイエンス プレスリリース（2017年6月16日）