

令和元年6月17日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15531

研究課題名（和文）NMRメタボロミクスを用いた脳腫瘍血清診断

研究課題名（英文）Serum diagnosis of brain tumor using NMR metabolomics

研究代表者

足立 好司（Adachi, Koji）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00231928

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍の血清診断に NMR メタボロミクスの技術が応用可能かをみるために平成27年から研究を開始し、脳腫瘍を含む脳疾患患者の血清検体を集積しました。計41例の血清を収集することができ、NMR 計測および解析は、研究分担者である平川らが確立した手法で行いました。結果は、この手法では、グリオーマと非グリオーマ系脳腫瘍、非腫瘍性脳疾患についてグループ化は可能でしたが、明瞭に3者を識別することができませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍の診断が血清で可能となると、疾病のモニタリングや健康人に対するスクリーニングに威力を発揮すると考えられます。今回の研究では、脳腫瘍の血清診断をめざし、脳腫瘍を含む41例の脳疾患症例からの血液検体を NMR メタボロミクスの技術で解析しました。結果としては、この手法では脳腫瘍と非腫瘍性脳疾患の区別が十分にはできませんでした。現在この技術を改良した手法で研究を続けています。

研究成果の概要（英文）： We started our research on brain tumor serum diagnosis aiming to apply NMR metabolomics techniques from 2015. We have collected serum samples from 41 patients of brain diseases including brain tumor. Samples were measured by unique method developed by Hirakawa, who is a member of this research project, and others, and analytical technique of metabolomics. As a result, we cannot clearly distinguish glioma group from non-gliomatous brain tumors and nontumoral brain diseases clearly in this approach.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳腫瘍 血清診断 NMR メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍は WHO 分類で 130 種類にも及ぶ多彩な腫瘍型があり、腫瘍の種類によりかなり異なる生物学的特性を示します。神経画像所見や疫学情報、神経症状などからある程度の鑑別は可能ですが、その存在診断を含めて確実な診断をつけるのは手術による組織学的診断が不可欠です。これとても腫瘍の heterogeneity や病理診断医の施設間格差などにより 100%の確定的な診断をつけるのは困難な状況です。脳には血液脳関門が存在しますが、一般的には血流の豊富な脳腫瘍組織を灌流する血液には脳腫瘍の情報が含まれていると考えられ、脳腫瘍マーカーとなる何らかの活性物質の測定が可能であると予測されます。しかし、現実には胚細胞性腫瘍や悪性リンパ腫などの一部の例外を除き、臨床応用されていません。

本学では共同研究施設である磁気共鳴分析室にある、化学分析用高性能核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance (NMR)) 装置を用いて、生体サンプル (血液、尿、脳脊髄液などの体液、細胞、臓器など) の NMR 計測を行っています。測定値に含まれる豊かかつ多彩な生体情報に関してさまざまな解析を行い、各種疾患に関する基礎的・臨床的研究が行われてきました。

研究分担者平川は、各種疾患の病態理解に役立つ NMR 計測手法、およびそのデータ解析法に関して技術開発を進めてきました。その結果、「メタボロミクス解析」を行うための新しい NMR 解析技術を開発することに成功しました (特許第 5415476 号 (2013/11/22); NMR データの処理装置及び方法)。生体試料を NMR 計測し、メタボロミクスによるデータ解析を行う方法は、生体試料に含まれる豊富な情報を活用して、個々の試料を識別することを可能にします。

平川らは、本技術を用いて、臨床に役立つ新規病態解析法を開発することを目的に、生体サンプル由来の NMR 信号の解析を続け、これまでに、麻酔薬が組織へ及ぼす影響に関して研究成果を報告しました (PLoS ONE 2010, 5(6): e11172、BMC Medical Imaging 2012, 12:28)。

2. 研究の目的

上記背景より、研究代表者の足立は、平川が開発した「NMR メタボロミクス解析手法」に注目し、血清から得られる NMR データを利用して脳腫瘍、特にグリオーマの診断を行いたいと考えました。

本課題では、倫理委員会の承認後の時点で、新たな未治療の患者や既治療で残存腫瘍のある患者からの血液を集積し、血清のメタボロミクス解析を行うことを第一の目的としました。

その上で通常の血液検査では診断することの困難な脳腫瘍に関する血清診断にこの技術が応用可能か否かをみることを本研究の目的としました。

3. 研究の方法

脳腫瘍の血清診断に NMR メタボロミクスの技術が応用可能かをみるために平成 27 年度から研究を開始し、脳腫瘍を含む脳疾患患者の血清検体を集積しました。患者からの研究目的の血清採取、NMR メタボロミクス解析は、いずれも、日本医科大学武蔵小杉病院倫理委員会の承認を得て行いました。

(1) 対象患者からの血清の採取

日本医科大学武蔵小杉病院症例の脳腫瘍及び非腫瘍性脳疾患の術前患者 41 例から IC を取

得し、静脈血を採取しました。血清は、遠心分離により細胞成分などの不溶成分を除去し、超低温フリーザー内で -80 度に保存しました。解析可能数 (41 検体) となった段階で、NMR 計測を行いました。

(2) 対象患者からの臨床情報の取得

症例からは、通常行われている血液生化学検査データ、画像所見、病理組織診断、遺伝子検査、臨床経過などの臨床情報も収集し、データ解析の際に検体ごとの臨床情報を振り返ることができるようにデータベース化しました。NMR 計測に際しては、本情報を連結不可能な匿名化資料としました。

(3) NMR 計測およびデータ解析

①検体の前処理・保存など

対象患者より採取した血清は、前述の如く -80 度冷凍保存を行い、NMR 計測時に解凍して使用しました。

②NMR 測定試料の調整

解凍した血清に、内部ロック用重水を加え NMR 試料管に入れました。

③NMR 計測条件の検討およびデータ収集

7 テスラ (300MHz) FT-NMR 装置 (JEOL) を使用し、核種はプロトン(^1H)についての計測を行いました。多検体の連続自動測定が可能な自動測定プログラムを用いて、CPMG スピンエコー法による測定を行いました。

④NMR 計測値の数値化処理

NMR 装置本体の PC に保存された raw データ (FID 信号) をデータ処理用の PC に転送しました。

⑤NMR データの確認および数値化処理

NMR スペクトル処理ソフトウェアである Alice2 ver5.5 (JEOL) を用いて、NMR スペクトルを確認し次に平川らが開発した、メタボロミクス用 NMR データ処理ソフトウェア Alice2 for metabolome (JEOL) を用いてデータを数値化し、CSV 形式にて保存しました。

⑥メタボロミクス解析

上記処理によって得られた NMR データについて、Unscrambler[®] ver10.5 (CAMO、Norway)を使用し、PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) 法によるクラス分類を行いました。

4. 研究成果

①血清の NMR スペクトル

CPMG 法による測定で得られた血清 ^1H NMR スペクトル例を図 1 に示しました。

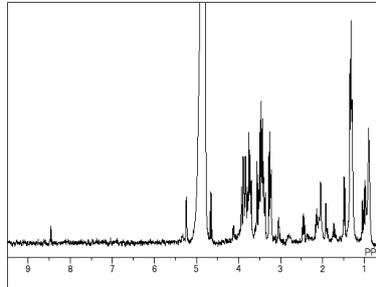
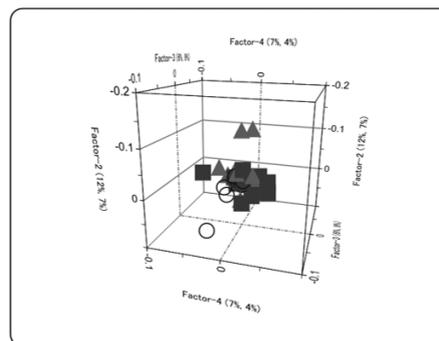


図1 ヒト血清の ^1H -NMRスペクトル
(CPMG法にて測定)

②メタボロミクス解析

41 例すべての血清の NMR raw データ (FID 信号) について、平川らが開発した手法によるデータの数値化処理を行い、PLS-DA 法による解析を行ったところ、グリオーマ群、非グリオーマ系脳腫瘍群、非腫瘍性疾患群は、スコアプロット上で、それぞれクラスター化する傾向を示しましたが、残念ながら、グリオーマと非グリオーマ系脳腫瘍、非腫瘍性脳疾患とを明瞭に識別できるモデルを作成するには足りませんでした。

PLS-DA 法による解析を行った結果を図 2 に示しました。



- グリオーマ
- ▲ 非グリオーマ系脳腫瘍
- 非腫瘍性疾患

図2 メタボロミクス解析の結果
(PLS-DA法にて解析)

今後は、症例数を増やすと共に、平川らが新たに開発した NMR 信号の処理法を導入するなどして、本技術をブラッシュアップすることで、通常の血液検査では診断することの困難な

脳腫瘍に関する血清診断への応用を可能とするモデル作成を目指したいと考えています。

5. 主な発表論文等

ありません。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：平川慶子

ローマ字氏名：HIRAKAWA Keiko

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30165162

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：金涌佳雅

ローマ字氏名：KANAWAKU Yoshimasa

研究協力者氏名：大野曜吉

ローマ字氏名：OHNO Youkichi

研究協力者氏名：小池薫

ローマ字氏名：KOIKE Kaoru

研究協力者氏名：森田明夫

ローマ字氏名：MORITA Akio