

令和元年6月4日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08964

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫の術中迅速診断支援システム開発と有用性の検証

研究課題名(英文) Development and validation of rapid intraoperative diagnosis system for malignant glioma

研究代表者

吉村 健太郎 (YOSHIMURA, Kentaro)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：70516921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脳腫瘍および非腫瘍組織を質量分析して得られたマススペクトルを、各種の診断結果ラベルと共に蓄積してデータベースを構築した。さらに蓄積されたデータをサブグループに分けた後にロジスティック回帰で機械学習し、一個抜き交差検証で判別性能を確認した。その結果、腫瘍のグレードおよびMRI検査やその他の検査法の結果を80%以上の正答率で予測できることが明らかとなり、脳腫瘍の診断に有用であることが示唆された。また、生体から組織を摘出せずダイレクトに探索部位の成分分析と診断を可能とするために、質量分析装置のイオン導入孔の遠隔化と、検体採取プローブの構築を完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発するシステムは悪性神経膠腫の存在診断および質的診断の術中支援を、これまでにない迅速性と判定精度で遂行可能とするものであり、手術時間の短縮や切除領域の正確な判断により患者の予後改善に寄与することができる。検証の結果、腫瘍の検出に加えてグレード判別も可能であることが確認でき、これによって例えば腫瘍のグレード4で保険が適用される脳内留置用徐放性製剤を用いるか否かの術中判断にも利用できる。また、ここで構築されたデータは膠芽腫の代謝マップそのものであるため、腫瘍特異的な代謝経路の阻害をターゲットにした、新規抗がん剤の開発に応用できることも意義の一つである。

研究成果の概要(英文)：We constructed a mass spectral database of human non-tumor and cerebral tumor tissues with labels of tumor grades (grade I-IV) and patient information. To confirm the discrimination ability of learning machine (logistic regression)-based diagnostic algorithm, stored data were divided into the sub groups, and leave-one-out cross-validation was performed. As a result, the discrimination accuracy for non-tumor/tumor or tumor grade were over 80%. This result suggest that our system is useful for diagnosis of human cerebral tumor. In addition, we constructed the real-time and remote sampling probe. It enables us to perform intraoperative diagnosis without extirpation of tissues.

研究分野：腫瘍診断学、分析化学、解剖学

キーワード：がん診断 アンビエント質量分析 機械学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 脳腫瘍治療の現状

悪性神経膠腫の標準治療は可及的な外科的摘出後の放射線化学療法であるが、最も悪性である膠芽腫では標準治療を行っても生存期間中央値が1年4ヶ月程度である。これは既存手技による腫瘍の可視化領域よりも遥かに広範囲に腫瘍細胞が存在するためであり、症例ごとの切除範囲決定のための明確な指標を提供可能な、新規術中迅速診断法の開発が望まれている。現状での術中迅速診断はHE染色標本の形態学的観察により下されるが、切片作成から診断結果の提示までに数十分を要するため、術中における頻回の提出は実質的に困難である。よって大部分は執刀医の経験の下に切除領域が決定されているが、前述のように悪性神経膠腫はさらに周辺へ浸潤している可能性が高く、その領域を正確に識別するのが困難である。

#### (2) 質量分析と機械学習を基盤としたがん迅速診断技術

申請者はこれまでに検体を前処理無く迅速に質量分析し、その結果を機械学習によって判別することで肝細胞がんや腎細胞がんの診断を行うシステムの開発を行ってきた。当該システムはがんの検出能力が高く、また検査のスループットを向上させるために生体からの組織の直接サンプリングを可能とするプローブの開発も進めていることから、これらの技術を悪性神経膠腫の術中診断に応用することが好適であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では山梨大学で独自開発された大気圧イオン化法を搭載した質量分析装置と、機械学習を基盤とした判別アルゴリズムを組み合わせ、悪性神経膠腫の存在診断と質的診断を術中に遂行可能な統合システムを構築することを目的とする。さらに脳組織を摘出することなく生体からダイレクトに成分の採取と分析を可能とするプローブを開発し、システムに組み込むことを目指す。データ判別アルゴリズム部には学習機械を採用し、マーカー分子となる特定のピークの発現量比較に依存せず、マススペクトルパターンの変化を基に判別を行う。これによりマーカーに依存した従前の方法論では超えられない、生体の多様性によりその限界が見えていた精度の壁を打ち破ることが可能となる。

### 3. 研究の方法

(1) 患者より摘出されたグレード I~IV の脳腫瘍あるいはその周辺の非腫瘍組織を 50%エタノールでホモジナイズし、遠心上清を探針エレクトロスプレーイオン化法-シングル四重極型質量分析装置 (DPiMS-2020, 島津製作所) を用いて質量分析する。得られたマススペクトルは患者に付随する病理診断結果や各種の検査結果などのラベルと共に蓄積し、関係データベース (Relational DataBase, RDB) を構築する。

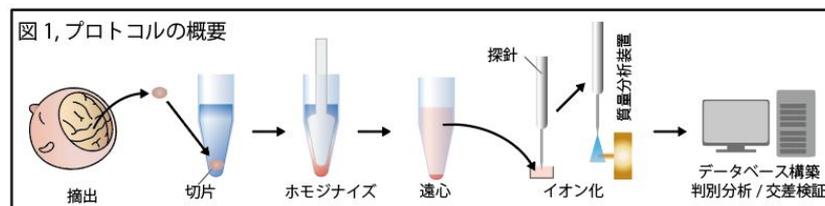
(2) マススペクトルは質量電荷比 ( $m/z$ ) とイオン強度からなるが、判別分析を行うために  $m/z$  の bin 幅と数の設定や、イオン強度を相対値化する方法などのデータ前処理手順を検討する。さらに、機械学習であるロジスティック回帰 (Logistic Regression, LR) を用いた判別アルゴリズムを構築し、サブグループに分けられたマススペクトルを一個抜き交差検証 (Leave-One-Out Cross-Validation, LOOCV) して判別性能を確認する。

(3) 組織を摘出することなく *in situ* での判別を可能とするために、質量分析装置にイオン化された生体成分が導入される孔の遠隔化を行う。また検体を採取してイオン化し、それを質量分析装置に移送するための検体採取プローブの構築を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳組織検体の前処理および質量分析と RDB 構築

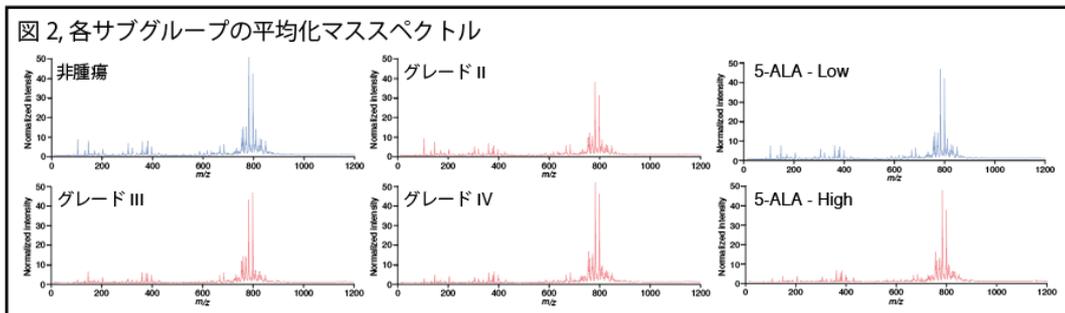
摘出された脳非腫瘍およびグレード I~IV の腫瘍組織 90 切片 (グレード II~IV 88 切片) を収集した。検体の前処理は約 5 mg の切片を 100  $\mu$ l の 50%エタノール



でホモジナイズした後に遠心することとし、9  $\mu$ l の遠心上清を質量分析に供する (図 1)。計 1,110 マススペクトルを得たが、グレード I の腫瘍はほとんど入手できず、機械学習を行うための必要数に満たなかったため除外し、解析にはグレード II~IV の腫瘍に由来する 1,020 マススペクトルを用いた。各マススペクトルに付随するサブグループへの分別用ラベルとしては非腫瘍、腫瘍の他に Gd MRI 像所見、MRI FLAIR 像所見、5-ALA 検出の有無、IDH-1 変異の有無、MIB-1 染色結果を数値化して RDB に登録した。

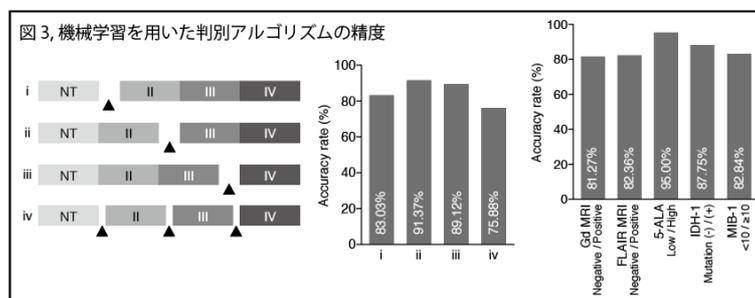
各サブグループに含まれるマススペクトルを平均化して比較したところ (図 2)、ピークの出現パターンは類似しており、目視による特定分子の存在量の差異を確認することはできなかつ

た。よってマーカー分子の同定およびそれを用いた腫瘍の判別は難しいと判断し、本研究では機械学習を用いた判別のみを行うこととした。



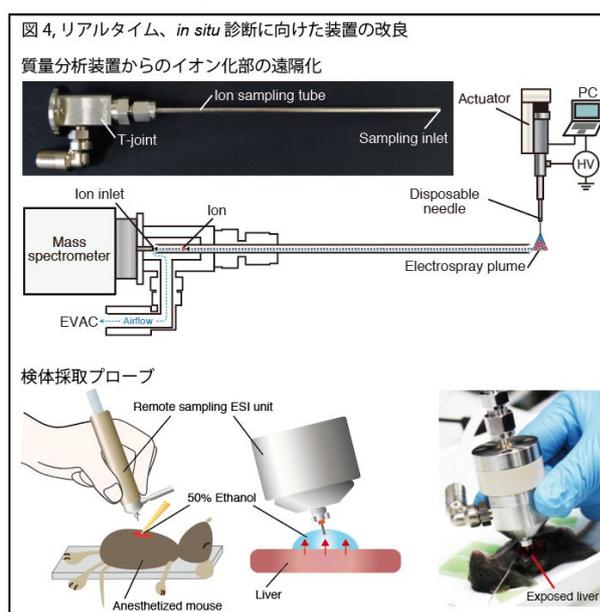
## (2) 機械学習を用いたサブグループ判別

腫瘍グレード (G) および各種検査結果のラベルにより分けられた、マススペクトルのサブグループを2~4群で判別分析した。その結果、それぞれの正答率は非腫瘍対 GII-IV 83.03%、非腫瘍, GII 対 GIII, IV 91.37%、非腫瘍, GII, III 対 GIV 89.12%と実用レベルであった。非腫瘍および GII~IV の4群判別では正答率 75.88%とやや低めではあったが、今後データベースを拡充することで改善が見込まれる。また、Gd MRI Negative 対 Positive および FLAIR MRI Negative 対 Positive ではいずれも 80%以上と画像診断の結果も予測が可能であることが明らかとなった。また IDH-1 変位の有無、MIB-1 染色性も判別が可能であり、特に 5-ALA シグナル検出 low 対 high では 95%と、他の検査方法論による結果とも高い相関が見られた (図3)。以上の結果は当該システムが脳腫瘍診断において従前の複数の検査方法論に相当する情報を提供できる可能性を示唆している。



## (3) リアルタイム術中診断に向けた装置の改良およびプローブの構築

生体より組織を摘出することなく、*in situ* での判別結果を提示することが可能となれば、より正確に腫瘍の切除領域を判断することが可能となる。質量分析では装置インターフェースのイオン導入孔直近にイオン化部が配置されているが、これを遠隔化し、生体組織に存在する成分の直接イオン化と、その分析装置への移送を可能とすることを旨とした。分析装置のイオン導入孔にステンレス管を用いたイオン移送路とバキュームポンプによる吸引を行う機構を構築し、イオンを遠隔部位から減衰なく移送することを可能とした。さらにステンレス管をフレキシブルチューブに変更し、イオン化部を任意の部位に移動することを可能とした。加えてイオン化部の小型化と、検体をダイレクトに吸引可能な検体採取プローブを構築することで、ペンを持つような感覚で生体成分の *in situ* 分析が可能となった。現在当該システムの実用化に向けて、前述の判別アルゴリズムと統合した一体化システムの構築と性能の検証、改良を進めている。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

K Yoshimura, Y Yamada, S Ninomiya, WY Chung, YT Chang, AR Dennison, K Hiraoka, S Takeda, LC Chen, Real-time analysis of living animals and rapid screening

of human fluid samples using remote sampling electrospray ionization mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 査読有, Vol.172, 2019, pp.372-378  
DOI:10.1016/j.jpba.2019.04.050

K Sakamoto, Y Fujita, K Chikamatsu, S Tanaka, S Takeda, K Masuyama, K Yoshimura, H Ishii, Ambient mass spectrometry-based detection system for tumor cells in human blood, *Transl Cancer Res*, 査読有, Vol.7, No.3, 2018, pp.758-764  
DOI:10.21037/tcr.2018.04.20

H Johno, K Yoshimura, Y Mori, T Kimura, M Niimi, M Yamada, T Tanigawa, J Fan, S Takeda, Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry, *Metabolomics*, 査読有, Vol.14, No.38, 2018, pp.1-11  
DOI:10.1007/s11306-018-1334-z

K Ashizawa, K Yoshimura, H Johno, T Inoue, R Katoh, S Funayama, K Sakamoto, S Takeda, K Masuyama, T Matsuoka, H Ishii, Construction of mass spectra database and diagnosis algorithm for head and neck squamous cell carcinoma, *Oral Oncol.*, 査読有, Vol.75, 2017, pp.111-119  
DOI:10.1016/j.oraloncology.2017.11.008

LC Chen, K Yoshimura, S Ninomiya, S Takeda, K Hiraoka, Towards Practical Endoscopic Mass Spectrometry, *Mass Spectrom*, 査読有, Vol.6, No.S0070, 2017, pp.1-8  
DOI:10.5702/massspectrometry.S0070

LC Chen, T Naito, S Tsutsui, Y Yamada, S Ninomiya, K Yoshimura, S Takeda, K Hiraoka, In-vivo Endoscopic Mass Spectrometry using a Moving String Sampling Probe, *Analyst*, 査読有, Vol.142, No.15, 2017, pp.2735-2740  
DOI:10.1039/C7AN00650K

J Yasumoto, H Kasai, K Yoshimura, T Otaguro, K Watashi, T Wakita, A Yamashita, T Tanaka, S Takeda, K Moriishi, Hepatitis B virus prevents excessive viral production via reduction of cell-death inducing DFF45-like effectors, *J Gen Virol.*, 査読有, Vol.98, No.7, 2017, pp.1762-1773  
DOI:10.1099/jgv.0.000813

DT Usmanov, S Ninomiya, LC Chen, S Saha, MK Mandal, Y Sakai, R Takaishi, A Habib, K Hiraoka, K Yoshimura, S Takeda, H Wada, H Nonami, Desorption in Mass Spectrometry, *Mass Spectrom*, 査読有, Vol.6, No.S0059, 2017, pp.1-16  
DOI:10.5702/massspectrometry.S0059

S Ninomiya, K Yoshimura, LC Chen, S Takeda, K Hiraoka, Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Renal Cell Carcinoma with Electrospray Droplet Ion Beams, *Mass Spectrom*, 査読有, Vol.6, No.A0053, 2017, pp.1-6  
DOI:10.5702/massspectrometry.A0053

A Hamamoto, S Yamato, Y Katoh, K Nakayama, K Yoshimura, S Takeda, Y Kobayashi, Y Saito, Modulation of primary cilia length by melanin-concentrating hormone receptor 1., *Cell Signal*, 査読有, Vol.28, No.6, 2016, pp.572-584  
DOI:10.1016/j.cellsig.2016.02.018

[学会発表](計 10 件)

吉村 健太郎、チェン リーチュイン、二宮 啓、城野 悠志、堂本 貴寛、源 利成、竹田 扇、質量分析と AI を用いた消化器がんの診断法開発、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、新潟、2019

吉村 健太郎、岩野 智彦、城野 悠志、堂本 貴寛、源 利成、竹田 扇、大気圧イオン化法-質量分析を用いた大腸がんのメタボロミクス、第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回日本発生物学会 合同大会、東京、2018

吉村 健太郎、堂本 貴寛、源 利成、竹田 扇、リポドミクスを基盤とした大腸がん診断システムの開発と病態解明、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、東京、2018

吉村 健太郎、堂本 貴寛、源 利成、竹田 扇、質量分析と機械学習を用いた大腸がん診断システムの構築および分子病態解明、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、金沢、2017

吉村 健太郎、チェン リーチュイン、二宮 啓、竹田 扇、リアルタイム診断システムの開発、第 42 回日本医用マスペクトル学会年会、東京、2017

吉村 健太郎、城野 悠志、竹田 扇、PESI-MS の新たな展開：消化器がんの代謝経路解析に基づく創薬への展望、第 65 回質量分析総合討論会、茨城、2017

吉村 健太郎、竹田 扇、質量分析法を用いたリポドーム解析その応用例と展望、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎、2017

吉村 健太郎、城野 悠志、チェン リーチュイン、竹田 扇、リアルタイムメタボローム解析システムの構築とその臨床応用、第 64 回質量分析総合討論会、大阪、2017

吉村 健太郎、城野 悠志、堂本 貴寛、源 利成、竹田 扇、質量分析と機械学習を用いた大腸がん診断システムの構築、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シン

## ポジウム、金沢、2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：質量分析装置、質量分析方法、質量分析システム、及び質量分析解析プログラム

発明者：吉村 健太郎、石井 裕貴、チェン リー チュイン

権利者：国立大学法人山梨大学

種類：特許

番号：特願 2018-004860

出願年：2018 年

国内外の別：国内

名称：質量分析装置及び質量分析方法、並びに解析装置及び解析方法

発明者：吉村 健太郎、チェン リー チュイン、二宮 啓

権利者：国立大学法人山梨大学

種類：特許

番号：特願 2017-079391

出願年：2017 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://hh-bd.link>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：川瀧 智之

ローマ字氏名：(KAWATAKI, Tomoyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。