

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19342

研究課題名(和文) 血液と膵液を用いた膵疾患スクリーニング、および、悪性度評価システムの構築

研究課題名(英文) Pancreatic disease screening and grade evaluation system using metabolomics with blood and pancreatic juice

研究代表者

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90709669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液メタボロミクスによる膵疾患のスクリーニングシステムおよび膵液メタボロミクスを加えることによる膵疾患悪性度評価システムを構築することを目的とした。膵がん54例と健常対照58例の血清を解析すると、11成分に有意差がみられ、HistidineとXylitolを組み合わせた回帰モデルは、ステージ2までの膵がんに対する感度が70.4%で、CA19-9より優れていた。別の独立した膵がん16例と健常者16例の血漿で検証したところ、CA19-9と海合わせると感度81.3%、特異度93.8%であり、特に切除可能膵がんに限定したところ、感度は100%であり、有用性が強く示唆される結果であった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish pancreatic disease screening and grade evaluation system using metabolomics with blood and pancreatic juice. Blood samples were collected by 2 independent groups. In the 1st set (55 patients and 58 controls), Model Y, consisting of histidine and xylitol, possessed higher sensitivity (70.4%) than CA19-9. In the 2nd set (16 patients and 16 controls), model Y with CA19-9 displayed high sensitivity (81.3%) and specificity (93.8%). In particular, it displayed very high sensitivity (100%) for resectable PC. These quantitative analysis confirmed that metabolomics-based diagnostic methods are useful for detecting pancreatic cancer early.

研究分野：Metabolomics

キーワード：pancreatic cancer metabolomics screening biomarker

1. 研究開始当初の背景

膵がん患者の予後を改善させるために最も重要なことは、早期発見による早期治療であるが、今日においても膵がんの早期発見は極めて困難で、日本における膵がんの死亡者数は年間約3万人で増加傾向にある。効率良く、簡便、かつ、安全に膵がんやそのリスク疾患の早期発見や悪性度評価を可能にする新しい方法が強く求められている。近年、ポストゲノムシーケンス研究の重要性が示唆されるに伴い、質量分析計を用いた網羅的代謝分析、メタボロミクスが注目されている。がん組織中では、細胞の異常増殖を支えるために、特徴的な代謝活動がみられることが既に知られている。メタボロミクスはがんにおける特徴的な代謝変容や環境要因としてのリスク因子を精密かつダイナミックに捉えることができることから、バイオマーカー探索の方法として期待される。

2. 研究の目的

本研究では、血液メタボロミクスによる膵疾患のスクリーニングシステム、および、膵液メタボロミクスを加えることによる膵疾患悪性度評価システムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

計画 I : 「GC/MS と LC/MS を統合した網羅的解析系による膵疾患血液バイオマーカー再探索と検証」

GC/MS に LC/MS を加えた網羅的解析系によって、膵疾患における血液メタボロームのプロファイリングを行い、より高感度なバイオマーカー候補を明らかにする。解析系に LC/MS を導入することによって、近年、生体内で重要な働きを持つことが明らかになりつつある脂質・陽イオン性代謝物・陰イオン性代謝物の3系統を新たに測定対象とすることができる。これにより、従来の GC/MS による水溶性代謝物の約100成分に、脂質の約200成分、陽イオン性代謝物の約150成分、陰イオン性代謝物の約150成分を加えた計600成分が対象となり、対象を大幅に拡大した中からバイオマーカーを探索することが可能となる。分析に供する検体については、サンプリングバイアスや検体採取条件のばらつきを取り除くことが、特に重要となるため、検体採取から結果報告までの一連の工程を迅速、かつ、安定的に行うための統一システムを作成する。さらにこれまでの研究で候補成分となった16成分に関してはMRM法と安定同位体を用いた絶対定量法を導入する。患者検体としては特に切除可能と想定されるステージIIまでを主とし、100検体を目標に収集する。多変量解析で診断モデルを作成し、感度・特異度90%以上を目標としてROC曲線

解析を行う。

計画 II : 「膵液メタボロミクスによる膵疾患悪性度評価法の検討」

膵液のメタボロミクスを行い、膵疾患悪性度評価における有用性を明らかにする。膵液の採取から保存にあたっては、血液における方法を微調整した標準操作手順を作成する。検体数は各疾患でまず30検体程度を目標とする。血液と同様の分析系を用いて網羅的に分析を行い、代謝物のパターンや量と疾患悪性度との相関関係を調査する。また、血液の分析結果との関連を探索し、病態理解を深める。

計画 III : 「バイオマーカー候補代謝物のもつ生物学的意義の解明」

計画 I・II の成果からバイオマーカー候補とした代謝物が、なぜその膵疾患により変動したのかを明らかにするため、基礎的検証を実施し、生物学的意義を解明する。膵液と血液のメタボロミクスで得られたデータを統合的に代謝経路へマッピングすることで、疾患特有の代謝状態を明らかにする。さらに、疾患モデルマウスを用いた動物実験、培養細胞実験、あるいは、ヒト臨床検体(例えば、病変組織検体など)を用いた基礎的実験を、メタボロミクスに限らず、DNA、RNA、タンパク質レベルで実施し、候補代謝物が、なぜ各膵疾患によって変動したのかを明らかにする。



4. 研究成果

計画 I : 「GC/MS と LC/MS を統合した網羅的解析系による膵疾患血液バイオマーカー再探索と検証」

はじめに GC/MS と LC/MS を統合した網羅的解析系によって膵疾患血液バイオマーカーを再探索し検証することを目標としていたため、まずは分析対象とする代謝物ライブラリを整備し、これらの分析条件を最適化した。これによって、GC/MS と LC/MS を合わせて約600成分を対象に分析することを実現した。

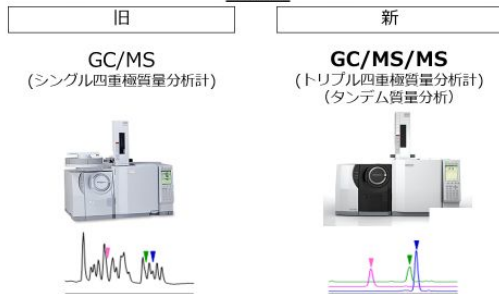


また、特に膵がんのバイオマーカーとして期待される16成分を我々のこれまでの解析結果から選定し、これらの成分については安定同位体を用いた検量線による定量的測定を導入することで、より確実な分析が行える分析系を構築した。

検体の採取法については、温度や時間などメタボロームに影響し得る様々な要因と結果との関連を検討実験で明らかにし、最適かつ実現可能な手順を標準操作手順として確

立し、実際の手順に導入した。具体的には、血漿の場合、朝絶食とした午前中に採血を行い、血液採取後は1分以内に氷冷し、採血から8時間以内に4、3000回転/分で遠心分離し血として-80で凍結保存することとした。

方法



選択性の高い分析法を採用し分析精度を高めた

次に、膵疾患の血液バイオマーカー探索として、過去に多施設から集められた膵がん・膵管内乳頭粘液性腫瘍・慢性膵炎を主とした患者血液を分析対象として解析を行った。特にステージ2までの膵がん54例と健常対照58例の血清の解析を行った。

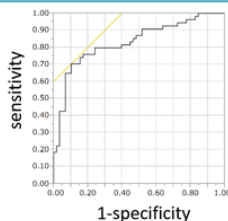
新たな検体セットによる検討

N		国立がん研究センター 第1セット		神戸大学 第2セット	
		PC	HV	PC	HV
Total		54	58	16	16
Male		34	27	n.s.	10
Female		20	31		6
Age, y	Mean	70.6	68.2	n.s.	67.4
	SEM	2.7	1.3	2.7	2.0
Stage	IA	4		0	
	IB	3		0	
	IIA	12		4	
	IIB	35		3	
	III	0		6	
IV	0		3		

その結果、16成分中11成分に有意差が認められ、このうちHistidineとXylitolの2成分を組み合わせた回帰モデルは、ステージ2までの膵がんに対する感度が70.4%で、CA19-9より優れていた。

ステップワイズ-多重ロジスティック回帰による予測式

$$P = 1 / [1 + e^{-\{0.815 - 0.08(\text{Histidine}) - 0.1(\text{Xylitol})\}}]$$

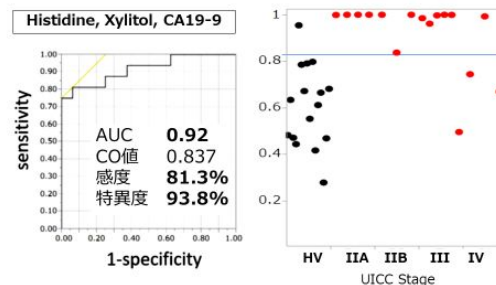


AUC 0.83
カットオフ値 0.604
感度 70.4%
特異度 89.5%

また、それらとCA19-9を組み合わせたところ、感度90.7%、特異度89.5%に向上した。これらの組み合わせを、さらに別の独立した

膵がん16例と健常者16例の血漿で検証したところ、感度81.3%、特異度93.8%であり、一定の精度が保たれていることを確認した。特に切除可能膵がんに限定したところ、感度は100%であり、有用性が強く示唆される結果であった。

CA19-9と組み合わせると精度が向上し、特にStage IIBまでの感度は100%であった



さらに、膵がんにおいてはリスク疾患の拾い上げが早期発見に有効とされることから、リスク疾患におけるバイオマーカー候補成分の評価を行った。膵がんステージIおよびIIの55検体、膵肝内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の27検体、慢性膵炎の4検体、健常者の64検体を用いて検討した。その結果、これまでに見出したバイオマーカー候補成分のうちいくつかの血中濃度は、健常者、IPMN、膵がんの順に統計学的有意差をもって高くなっていくことが明らかとなり、膵組織の悪性度との相関関係が示唆された。次に、膵がん早期発見における有用性を背景に偏りのない検体で検討するために、前向きコホート研究検体を用いた検討を行った。血液収集後に長期間追跡し(追跡期間中央値16年)その間に膵がんを発症した例と発症しなかった例の検体を比較解析した。検討には膵がん発症170例と未発症の340例を用いた。その結果、膵がん発症例では1,5-AGの濃度が有意に低いことが判明し、特に血液採取から膵がん診断までが6年未満の症例においては、既知のリスク要因でオッズ比調整してもなお、1,5-AGの低下が膵がん発症と有意に相関するという結果であり、これまでの結果を支持する結果であった。

計画II「膵液メタボロミクスによる膵疾患悪性度評価法の検討」

膵液については、数例のIPMN患者から採取した膵液中の代謝物濃度をGC/MSおよびLC/MSで半網羅的に測定し、そのうちアミノ酸の濃度に定量的な問題がないことを確認した。IPMN患者の膵液検体採取は予定通り進めていたが、切除に至る症例が乏しく、悪性度の答えがわからないまま経過観察となる症例が多かったため、目標とした悪性度とメタボロームとの関連分析を行うことができなかった。今後も症例と検体が蓄積されれば、血液との関連も考慮しつつ、悪性度との相関

分析を行う予定である。

計画 III 「バイオマーカー候補代謝物のもつ生物学的意義の解明」

今回の研究期間に膵がんにおけるバイオマーカー候補代謝物を数種類見出すことができた。これらの物質については細胞やモデル動物を用いた基礎実験によるメカニズムの検討を行う予定であり、現在、いくつかの細胞系で条件を検討しているが、今回の研究期間中に本実験を実施することはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Nakagawa T, Kobayashi T, Nishiumi S, Hidaka A, Yamaji T, Sawada N, Hirata Y, Yamanaka K, Azuma T, Goto A, Shimazu T, Inoue M, Iwasaki M, Yoshida M, Tsugane S. Metabolome analysis for pancreatic cancer risk in nested case-control study: Japan Public Health Center-based Prospective Study. Cancer Science. 査読あり. 25, 2018. 1672-1681

2. Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, Yoshida M. Differences in metabolite profiles caused by pre-analytical blood processing procedures. Journal of Bioscience and Bioengineering. 査読あり. 125(5), 2018. 613-618

3. Hirata Y, Kobayashi T, Nishiumi S, Yamanaka K, Nakagawa T, Fujigaki S, Iemoto T, Kobayashi M, Okusaka T, Nakamori S, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Kaneda T, Kato T, Yagihara K, Fujita S, Yamada T, Honda K, Azuma T, Yoshida M. Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. Clinica Chimica Acta. 査読あり. 468, 2017. 98-104

〔学会発表〕(計1件)

Takashi Kobayashi, Validation of serum/plasma metabolomic biomarkers against pancreatic cancer by quantitative targeted GC/MS/MS. UEGW2018. 2017年10月30日. バルセロナ(スペイン)

〔図書〕(計1件)

小林 隆, 久津見 弘, 八木 洋輔, 酒井 新, 吉中 勇人, 西海 信, 吉田 優, 東 健. 日本メディカル, 臨牀消化器内科, 2016, 6 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)
神戸大学大学院・医学研究科・医学研究員
研究者番号: 90709669

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()