

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08427

研究課題名(和文)メタボローム解析を用いた膵癌の抗がん剤感受性予測と個別化治療法の確立

研究課題名(英文)Examinations of anticancer drug sensitivity of pancreatic cancer using metabolomics from saliva and urine and plasma

研究代表者

細川 勇一 (Hosokawa, Yuichi)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：50438066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤治療を行う膵臓癌症例の唾液、血液、尿のメタボローム解析を行った。半数以上で検出した物質を対象とすると唾液、血漿、尿に共通して46種類の物質が検出された。抗がん剤無効例では、唾液および血漿で1物質、唾液と尿でも1物質、血漿と尿では2物質が高値であったが、唾液、血液、尿に共通した有意な物質は認めなかった。Grade3以上の白血球減少例では、唾液および血漿で1物質、血漿と尿では2物質が高値で、唾液と血漿と尿ではleucineを含む2物質が低値であった。膵臓がんに対する抗がん剤治療では、メタボローム解析は、治療効果予測には積極的な関連性を認めないが、副作用発症予測には関連性がある可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗がん剤治療を行う膵臓がん症例において、唾液・尿・血液のメタボローム解析を行い、抗がん剤の治療効果予測および副作用発現予測との関連性を検討した。治療効果予測については積極的な関連性は指摘できなかったが、抗がん剤治療の副作用発現(特に白血球減少grade3)に関しては、唾液・尿・血液で共通した変化が見られた。膵臓がんに対する抗がん剤治療において、血液よりも侵襲性の低い検体である尿や唾液で、副作用発現予測ができる可能性を示したと思われる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a basic study for pancreatic cancer patients using metabolome of saliva and urine and plasma. In cases which anti-cancer drug treatment is ineffective, one metabolite was high in saliva and plasma, one metabolite was high in saliva and urine, and two metabolites were high in urine and plasma. However, no metabolites was high in saliva and urine and plasma. In cases with side effect of neutropenia (> grade3), one metabolite was high in saliva and plasma, two metabolites were high in urine and plasma, and two metabolites including leucine were high in saliva and urine and plasma. Metabolomic analysis of saliva and urine and plasma might be able to predict side effects of anti-cancer treatment in pancreatic cancer patients.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 化学療法 メタボローム

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

難治性癌である膵癌の外科治療において、術前治療や術後補助療法などの抗癌剤を中心とした集学的治療が発展し、その治療成績は向上してきている。しかし一方で、術後補助化学療法中にもかかわらず早期に再発する症例も認め、その予後は極めて不良である。そのため、膵癌治療においては各個人の抗癌剤に対する感受性を踏まえた個別化治療が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌の抗癌剤治療に対する感受性や副作用発現を予測するバイオマーカーの探索を、非侵襲的に採取可能な唾液や尿を検査材料として、代謝物を網羅的に測定するオミックス解析技術の一つであるメタボローム解析を用いて行うことである。

3. 研究の方法

抗癌剤治療を行う膵臓癌 7 例を対象とした。臨床情報については、抗癌剤治療の効果や副作用（血液毒性、末梢神経障害など）出現の有無について 7 例を 2 群に分け、各々の群の症例数が 2 例以上の項目について検討することとした。結果として、①抗がん剤治療効果の有無、②副作用（白血球減少 grade3 以上）、③副作用（好中球減少 grade4 \geq ）について検討した。

①抗癌剤治療の効果	②副作用（白血球減少 grade3 \geq ）	③副作用（好中球 grade4 \geq ）
無効	2 例有り	5 例有り
有効	5 例無し	2 例無し

表 1 各群の症例数

検体採取

上記の各症例から、尿、血液、唾液の検体をそれぞれ採取した。対象患者の唾液（非刺激性・混合唾液）は 400 μ L 程度採取した。検体は直ちに -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。血液は、採取後 EDTA-2Na⁺にて血漿とした。尿検体も採取した。

測定・解析方法

唾液検体は 4 $^{\circ}$ Cにて融解し、限外ろ過フィルターにかけて 5kDa 以上のタンパク質等の高分子を除去した。質量分析装置の測定ごとの感度の違いをキャンセルするために内部標準物質を添加し、濃縮後に測定を実施した。測定にはキャピラリー泳動・飛行時間型質量分析装置を用い、イオン性代謝物質の網羅的な測定を実施した。測定には陽イオンモードと陰イオンモードの 2 モードの測定を実施した。

解析方法としては、代謝物全体の傾向を可視化するために、クラスタリングを実施した。クラスタリングの実施では、様々なノーマライズ方法を適応した。また、抗がん剤治療の有無などの比較では、それぞれの群の平均値で F.C. を計算し、その値が大きく変動しているものを探索した。

4. 研究成果

同一症例から採取した 3 種類の検体をメタボローム解析し、それぞれ共通で見られる物質や特異的にみられる物質を比較した。検体数の半数以上で検出できた物質だけを比較対象とした。唾液、血漿、尿を共通して検出できた物質は 46 物質あり、尿唾液に特異的に検出されたものが特に多く 45 物質あった。

唾液検体、血漿検体、尿検体のそれぞれの代謝プロファイルに関して、個人ごとの違いを可視化すると、代謝プロファイルがその他の症例と違いが見られる症例をそれぞれに認めたが（例：図1）、その症例と明らかな臨床情報との関連性は認められなかった。

次に唾液検体、血漿検体、尿検体の代謝物に関して、①抗癌剤治療の効果が有効か無効か、②副作用（白血球減少 grade3 \geq ）の有無、③副作用（好中球 grade4 \geq ）の有無について、それぞれ検討した。検体はFold Change で、抗がん剤治療が有効無効それぞれの群で値の高い10物質ずつを、副作用の有無についてもそれぞれの群で値の高い10物質ずつを選択した。

唾液中の代謝物において、①抗癌剤治療有効無効の比較では、アルギニンやプロリンなどが無効で高く、逆にセリン、イソロイシン、バリンなどが無効で低い傾向にあった。（図2）同様に、②副作用（白血球減少 grade3 \geq ）の有無の比較では、抗がん剤治療効果の結果とアミノ酸の傾向は同じであったが、これ以外に、N1, N8-deacetylspermidine や N8-acetylspermidine など、膀胱癌の唾液マーカー

として以前報告したポリアミン類も高い値となった。③副作用（好中球 grade4 \geq ）の有無の比較では、ピルビン酸や乳酸などが副作用の高い群で高濃度の値となった。

血漿中の代謝物においては、①抗癌剤治療有効無効の比較において、N8-acetylspermine、N1-acetylspermine などの唾液膀胱癌マーカーが無効群で高い傾向となった。②副作用（白血球減少 grade3 \geq ）の有無の比較では、副作用がある群にてポリアミン類が高い傾向にあり、③副作用（好中球 grade4 \geq ）の有無の比較でも、副作用のある群でポリアミン類が高い傾向であった。

尿中の代謝物においては、①抗癌剤治療有効無効の比較では、ビオチンやカルノシンなどが無効群で高い傾向となった。②副作用（白血球減少 grade3 \geq ）の有無の比較および③副作用（好

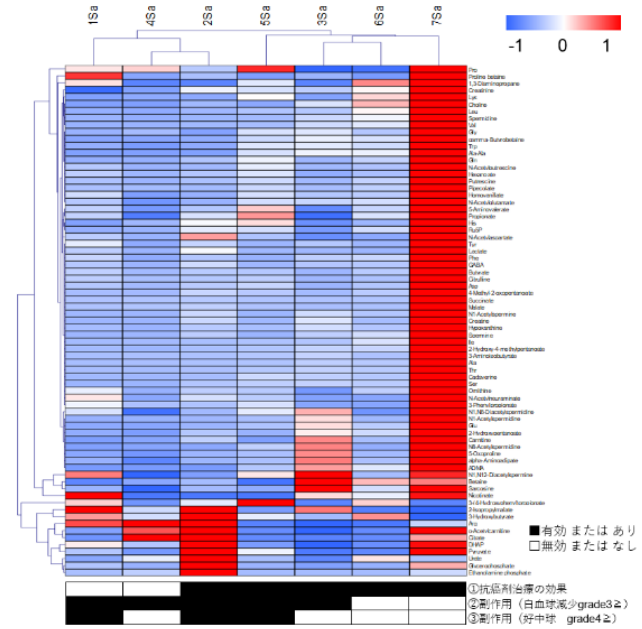


図1 唾液の代謝プロファイル

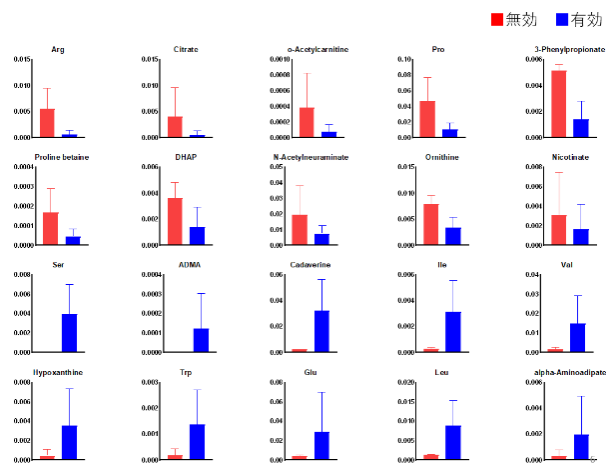


図2 唾液における 抗癌剤治療の効果

中球 grade4 \geq)の有無の比較では、アンセリンや α メチルセリンなどが、副作用がある群で高い傾向にあった。

次に、抗癌剤治療の効果において、唾液、尿、血漿の3検体で共通して有効もしくは無効な代謝物があるか検討した(図3)。唾液と血漿で無効の値が高かったのが1物質、有効の値が高かったのが2物質あった。唾液と尿で共通して無効の値が高いのは1物質あった。血漿と尿で共通して無効の値が高いのは2物質、有効の値が高いのは2物質あった。しかし

唾液、尿、血漿で共通して差のある物質は認めなかった。

次に副作用(白血球減少 grade3 \geq)について同様に検討した(図4)。唾液と血漿で副作用ありの値が高かったのが1物質、副作用なしの値が高かったのが2物質あった。血漿と尿では、副作用ありの値が高いのは2物質、副作用なしの値が高かったのが2物質あった。唾液と血漿と尿では、ロイシンおよびリシンが共通して副作用なしの群で高く、アルギニンにおいては唾液で副作用ありの値が高く、血漿と尿では副作用なしの値が高かった。

副作用(好中球減少 grade4 \geq)での検討(図5)では、唾液と血漿で副作用ありの値が高かったのが1物質、副作用なしの値が高かったのが1物質あり、唾液と尿で共通して副作用ありの値が高いのは1物質、血漿と尿で共通して副作用ありの値が高いのは2物質、副作用なしの値が高いのは2物質あった。しかし、唾液、尿、血漿で共通して、差のある物質は認めなかった。

考察

血液・唾液・尿のCE-TOFMSのメタボローム解析結果でイオン性代謝物の網羅的な解析を実施し、臨床情報との組み合わせを調べた。クラスタリングなどの全体のプロファイルでは臨床情報との明確な差はないが、個々の物質レベルで変化をみると、臨床情報との相関が認められた。特に抗がん剤治療の副作用(白血球減少 grade3 \geq)の有無については、唾液、尿、血漿で共通して、変化を認める物質を認め(ロイシン、リシン、アルギニン)、血液よりも更に侵襲性の低い検体

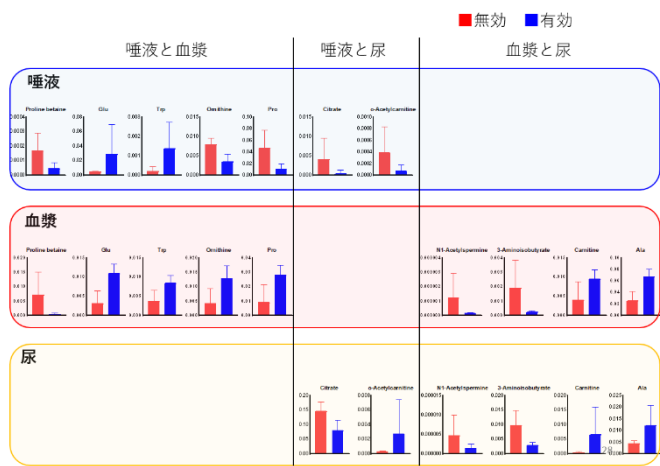


図3 抗癌剤治療の効果に対して有意な因子

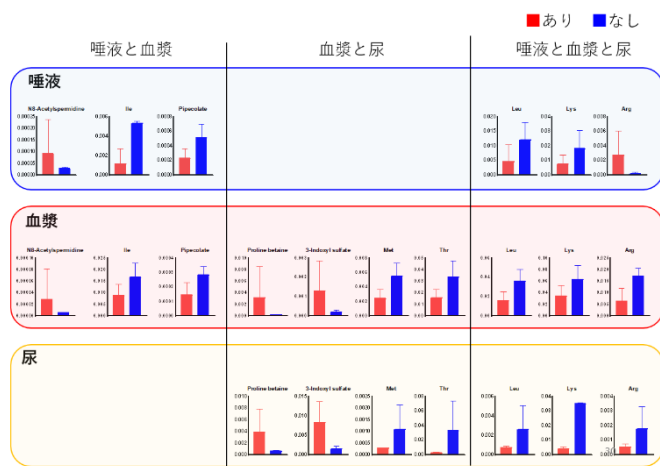


図4 副作用(白血球減少 grade3以上)に対して有意な因子

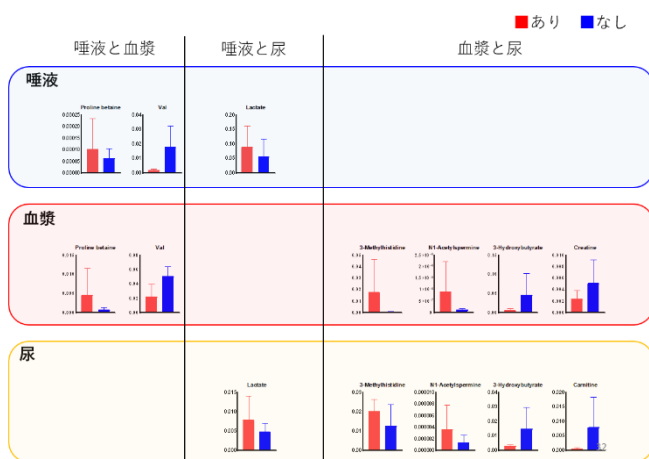


図5 副作用(好中球減少 grade4)に対して有意な因子

(尿、唾液)で臨床予測ができる可能性があると考えられた。今後さらなる症例数の増加でこれらを検証していく必要があると考えられた。

結論

膵臓癌の抗癌剤治療において、その治療効果と副作用発現の有無に関して唾液、尿、血漿のメタボローム解析との関連性を検討した。副作用の発現予測に関しては、関連性のある結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomita Atsumi, Mori Masayo, Hiwatari Kana, Yamaguchi Eri, Itoi Takao, Sunamura Makoto, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Sugimoto Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of storage conditions on salivary polyamines quantified via liquid chromatography-mass spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30482-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasutsugu Asai, Takao Itoi, Masahiro Sugimoto, Atsushi Sofuni, Takayoshi Tsuchiya, Mitsuyoshi Honjo, Shuntaro Mukai, Mitsuru Fujita, Kenjiro Yamamoto, Yukitoshi Matsunami, Takashi Kurosawa, Yuichi Nagakawa, Miku Kaneko, Sana Ota, Shigeyuki Kawachi, Motohide Shimazu, Tomoyoshi Soga, Makoto Sunamura	4. 巻 10
2. 論文標題 Elevated Polyamines in Saliva of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers(Basel)	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers10020043.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 杉本 昌弘	4. 巻 270
2. 論文標題 【メタボローム解析UPDATE】疾患とメタボローム解析 生体試料の腫瘍マーカー探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 496-501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 昌弘
2. 発表標題 唾液から見える全身の代謝異常
3. 学会等名 日本がん口腔支持療法学会 第5回 学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	砂村 眞琴 (Sunamura Makoto) (10201584)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	
研究分担者	永川 裕一 (Nagakawa Yuichi) (20349484)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	
研究分担者	杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro) (30458963)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	土田 明彦 (Tsuchida Akihiko) (50207396)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	糸井 隆夫 (Itoi Takao) (60338796)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	