

令和 2 年 6 月 26 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：17K10802

研究課題名(和文) 胸腔洗浄液メタボローム解析による肺癌新規バイオマーカーと予後予測因子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive exploration of novel biomarkers for lung cancer and prognostic factors by thoracic lavage fluid metabolomic analysis

研究代表者

前田 純一 (Maeda, Junichi)

東京医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50408176

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)：本研究ではキャピラリー電気泳動・質量分析装置を用いたメタボローム解析を対象とし、肺癌組織の代謝変化の解析を実施した。従来がんで知られている解糖系の亢進に関して、本データでも解糖系の最終産物である乳酸のがんでの上昇などが確認できた。それ以外にもアミノ酸、核酸、尿素回路など多数の代謝物を定量することができた。特にコリンの上昇が顕著な結果であった。主成分分析の結果、全体の濃度パターンとしてはStageごとに違いがあることが分かった。EGFRの変異の有無など、様々な臨床情報との比較を行い、その影響度を相対的に調べた。これらの解析により肺癌に特異的に変化している様々な代謝経路を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は肺がんの代謝異常を調べるために、代謝物を網羅的に解析することができるメタボローム解析を実施したものである。様々な臨床情報と合わせて解析し、従来がんで知られていた特徴的な代謝異常(ワーブルグ効果)を確認するだけでなく、他の代謝経路での様々な代謝の異常を確認することができた。多変量解析によりステージごとに違いなども見られた。今後予後との解析や、血液や胸腔内洗浄液などの解析も行い、体液を用いた診断のマーカーを絞り込むための基礎データとして活用していく。

研究成果の概要(英文)：This study conducted metabolomic analysis using capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry to analyze lung cancer, including paired tissue and control tissue samples corrected from identical patients. As expected, upregulated glycolysis was observed in our data, e.g. the concentration of lactate, an end product of glycolysis, was significantly elevated. Not only glycolysis, metabolites belonging to various metabolic pathways were simultaneously quantified. Especially choline was significantly and large fold change between tumor and paired controls samples. Principal component analyses showed stage-specific difference in overall metabolic concentration patterns. We also evaluated the effects of various clinical parameters, such as EGFR, on these data. These data and analyses showed lung cancer specific metabolic aberrance.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：メタボローム解析 肺癌 胸腔内洗浄液 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんのなかでも群を抜いて予後不良である肺がんの治療成績を向上するには、外科切除が可能な早期の診断と、正確な予後予測による補助方法の個別化などが必要である。肺がんの予後には、腫瘍が胸膜播種をしているか否かの診断が重要である。現在、本学では手術時に胸腔内洗浄液を約 10-20 mL 採取し細胞診による病理診断を行っている。腫瘍が胸膜表面に露出している症例や摘出肺の胸膜表面にわずかに腫瘍播種を認めるとされた症例においても細胞診の陽性率は高くないのが実態である。従って胸腔内洗浄液からの胸膜播種や、より低侵襲に採取できる検体の血液や尿などから新しい分子マーカーが見つければ、肺がんの治療成績向上につながると考えられる。

2. 研究の目的

代表者の所属する呼吸器外科・甲状腺外科では、肺がんの代謝物の網羅的解析 (メタボローム解析) を用いて肺がんスクリーニングを目的としたリキッドバイオプシーの研究を既に進めてきた。メタボロミクスに利用する方法として、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置) を用いて、糖代謝、TCA 回路、PPP、尿素回路、アミノ酸代謝、ポリアミン代謝などを単一の測定で一斉に定量化する方法を採用している。キャピラリーに注入するサンプル量として 3 nL 程度で他の分離装置 (液体クロマトグラフィーなど) に比べて微量で済むため、イオン同士が干渉して定量値の再現性が劣化する現象 (イオンサプレッション) が起きにくく、測定できる物質の範囲が広いだけでなく、再現性の高い定量値が得られることが特徴である。これを用い、大腸がんや胃がんにおける癌組織の代謝異常 (Hirayama et al, *Cancer Res*, 2009)、口腔癌組織の代謝異常 (Ishikawa et al, *Sci. Rep.*, 2016)、血中の肝疾患のバイオマーカー探索 (Soga et al, *J Hepatol*, 2011, Saito et al, *World Journal of Gastro*, 2016) などを実施してきた。

本研究中に腫瘍播種の採取を検討したが、コントロール検体の設定が難しく、その前に基礎的なデータとして、肺がんの組織検体の解析を進めた。

3. 研究の方法

術前化学療法等を受けていない手術時の検体 (肺がん組織とがんでない部分の肺組織) を採取し、-80 に凍結したサンプルをメタボローム解析した。

サンプルに内部標準物質の Methionine sulfone、MES および CSA (D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20 μ M となるように調製したメタノール溶液 625 μ L とジルコニアビーズをサンプルチューブに加え Shake Master NEO で 5 分間 (1,500 rpm, 5 min) ホモジナイズした (破碎が不十分だったサンプルは、ホモジナイズの時間を延長した)。ホモジナイズした溶液 500 μ L に CHCl_3 500 μ L、超純水 200 μ L を加えて攪拌し、4 $^{\circ}$ C、4,600 g で 15 分間遠心分離した (ホモジナイズした溶液の残り 125 μ L は DNA 定量に使用)。上層の水-メタノール層より 300 μ L を限外ろ過フィルター (分画分子量 5,000 Da) にとり、腫瘍組織は 4 $^{\circ}$ C、9,100 g、一晚遠心分離し、健常組織は 4 $^{\circ}$ C、9,100 g で 5.5 時間遠心分離した。そのろ液全量を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200 μ M 水溶液 50 μ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した (図 1)。またグルコースだけは別途液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて測定した。

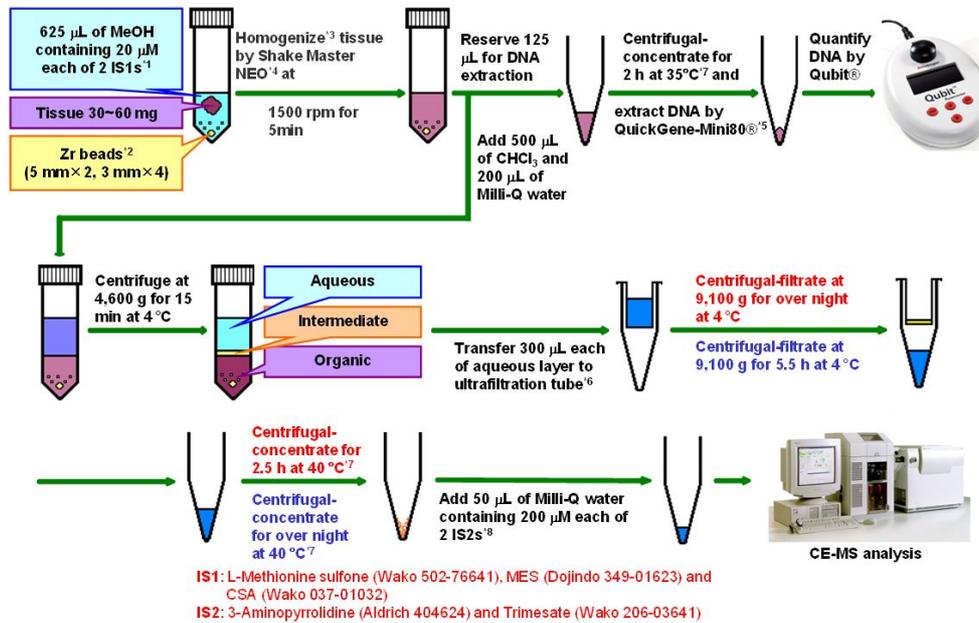


図1 メタボローム解析のための検体処理のプロトコール

4. 研究成果

80 検体のペア (合計 160 サンプル) を測定し、約 200 物質の同定・絶対濃度を算出した。サンプル間の量の違いを補正するために、DNA 量を測定し補正を試みたが、数サンプル量が足りなく、測定ができなかったために、重量補正を行った。図 2 に重量補正後の腫瘍組織 (Tumor) と健常組織 (Normal) のメタボローム解析結果を示す。

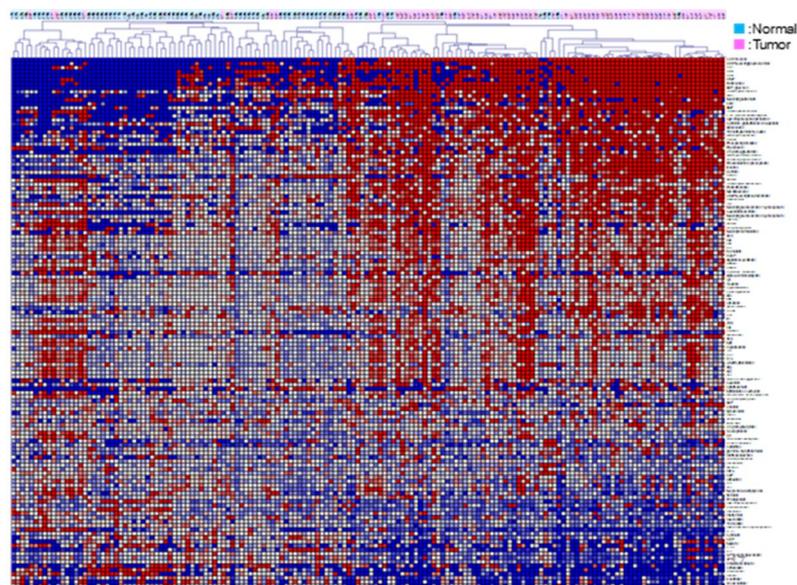


図2 肺組織 (がん部と健常部のペア) のメタボローム解析の結果。1 列が 1 サンプル、1 行が 1 代謝物を示す。がん部 80 サンプル、健常部 80 サンプルのペア検体である。全サンプル中 50%以上のサンプルでピーク検出された 132 物質を解析した。代謝物ごとに健常部の平均値を計算し、各代謝物の濃度を割り、1 は白色、1 以上は赤、1 より小さい場合は青の色とした。代謝物はがん部の中央値と健常部の中央値の差の大きいものから順に並んでいる。サンプルは Pearson Correlation を用いてクラスタリングした。

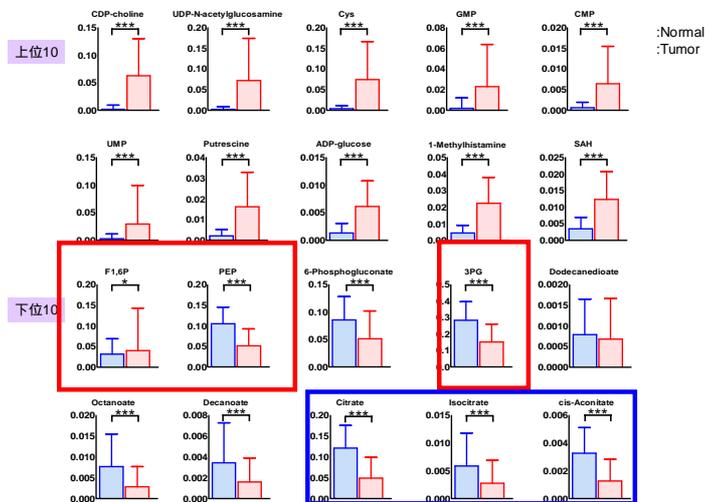


図3 がん部と健常部の差でソートし、健常部よりもがん部の値が高い10物質とがん部の値が低い10物質のグラフ。平均とSD。検定はWilcoxon matched-pairs signed rank testを実施。

解糖系においてはグルコースが減っており乳酸が上昇しており、亢進が確認できる。尿素回路等は、上昇している物質と低下している物質が混在しているが、葉酸回路等は一樣にがんで濃度が上昇している。図3では特に変化が大きかったものを示したが、CDP コリン等が高いものとして挙げられる。図4に主成分分析の実施結果に Stage の情報を載せた。個人差の影響を差し引くための、計算した主成分に関して、同一症例から得た腫瘍部の代謝物濃度から、ペアとなる健常部の代謝物濃度を差し引き、その後違いを検定したところ、第2主成分 (PC2) で Stage I との間で有意差が見られた。症例数が少なく有意差はでないが IV も同一方向への変化が見られた。他にも EGFR の変異の有無、年齢、性別、喫煙の有無など同様の解析をしたが、有意差が得られたのは Stage のみであった。

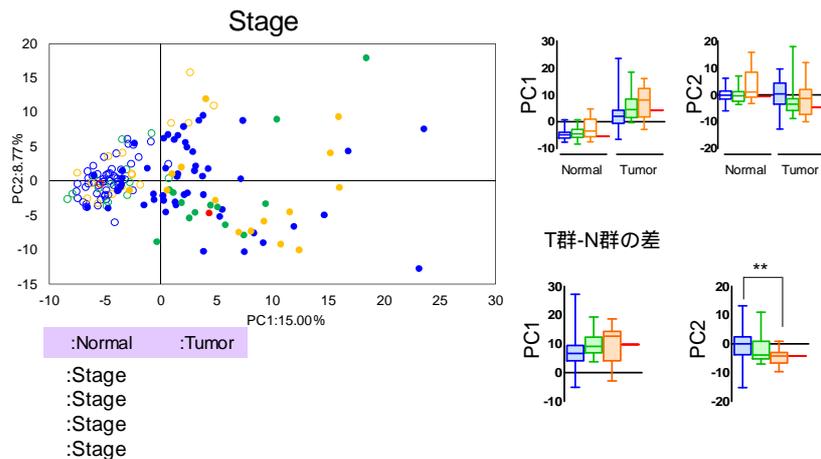


図5 1サンプルでもピーク検出された物質269物質を使用して主成分分析をした。箱ひげ図はPC1、PC2それぞれの値をStageごとに表示した。(Box and whiskers / Min to Max) T群-N群の差はペア検体ごとに差分を計算してStageごとにグラフにした。

図6に健常部位、「EGFR 変異あり、女性、adenoma」の条件を満たす症例、EGFR の変異あり、なし、その他にて比較を実施した。健常部位の検体は他と比べて最も変化があり、低濃度の物質が多い。がん部の検体では、EGFR の陽性検体で図の左のほうに、他のがん部の検体と大きな違いがあり、濃度が低い物質が多い。このように主成分分析のレベルでは見られなかったような違いがクラスタリングでは明らかとなった。

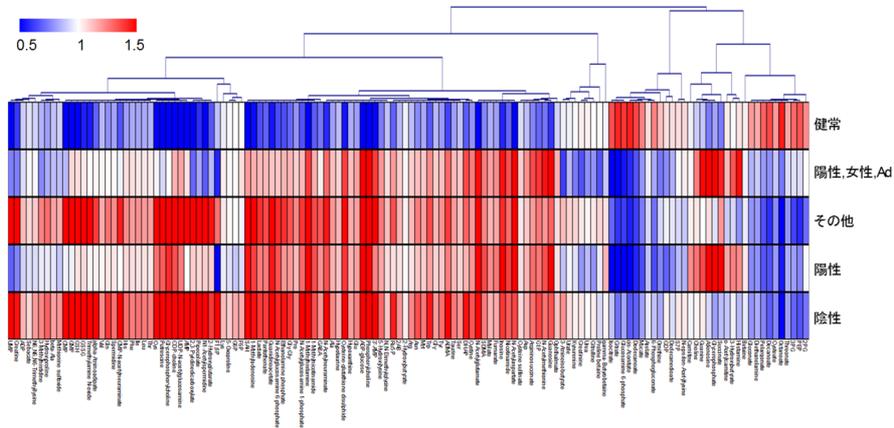


図6 全サンプル中50%以上のサンプルでピーク検出された132物質を解析した。各代謝物ごとに健常部の平均値を計算し、各代謝物の濃度を割り、1は白色、1以上は赤、1より小さい場合は青の色とした。健常部とEGFR陽性かつ女性かつ組織型Ad、に該当しないがん部、EGFR陽性全て、EGFR陰性全部の5つに分けてheatmapを作成した。

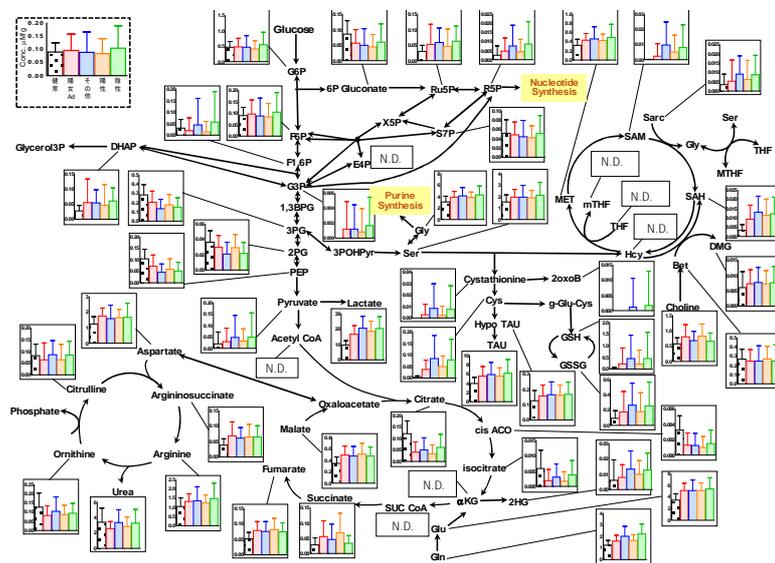


図7 1サンプルでもピーク検出された物質をPathwayに載せた。群分けは上記のHeatmapと同じ。グラフは平均とSD。

図7に個々の物質に関して、図6の分類の違いをPathwayの形式で示した。図中央部の乳酸、またTCA回路の最初のクエン酸が分類ごとに特に顕著に大きな違いを見せている。同じ肺がんであっても、EGFRの有無等によって解糖系とTCA回路の更新のバランスが異なっていることを示唆している。

今後、血液・尿などの低侵襲に採取できる検体でマーカーを探索するときに、これらの組織にて見られる変化と整合性が取れる物質に絞り込んでいく。また、胸腔内洗浄液の解析に関しても同様で、このデータを活用して絞り込みを進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 杉本 昌弘	4. 巻 76
2. 論文標題 メタボローム解析を用いたバイオマーカー探索	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 東京医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 11 - 21
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 杉本 昌弘	4. 巻 265
2. 論文標題 Liquid biopsyへの期待と限界 メタボローム解析によるliquid biopsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 513 - 516
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉本 昌弘, 梶原 直央, 前田 純一, 垣花 昌俊, 池田 徳彦
2. 発表標題 低侵襲精密医療up to date 人工知能とメタボローム解析を用いたリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原 直央, 前田 純一, 垣花 昌俊, 前原 幸夫, 嶋田 善久, 萩原 優, 大平 達夫, 杉本 昌弘, 池田 徳彦
2. 発表標題 低侵襲精密医療up to date Ex-Vivoと血液のメタボローム解析による新規バイオマーカーの創出
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原直央、前田純一、垣花昌俊、前原幸夫、嶋田善久、萩原優、大平達夫、杉本昌弘、池田徳彦
2. 発表標題 人工知能とメタボローム解析を用いた肺癌新規バイオマーカーの創出.
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kajiwara N, Maehara S, Maeda J, Hagiwara M, Okano T, Kakihana M, Ohira T, Sugimoto M, Ikeda N
2. 発表標題 Metabolomic analysis in lung cancer.
3. 学会等名 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kajiwara N, Maehara S, Shimada Y, Maeda J, Hagiwara M, Okano T, Kakihana M, Ohira T, Sugimoto M, Ikeda N
2. 発表標題 Metabolomic analysis in lung cancer for screening and early detection.
3. 学会等名 19th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原直央, 垣花昌俊, 前田純一, 前原幸夫, 嶋田善久, 萩原優, 大平達夫, 杉本昌弘, 池田徳彦
2. 発表標題 高次元解析技術を用いた肺癌予後におけるAI予測.
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
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	杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro) (30458963)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	