

令和元年6月18日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15975

研究課題名(和文)胆汁メタボローム解析を用いた胆道癌新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarker of bile duct cancer using metabolome analysis of bile juice

研究代表者

小倉 健(Ogura, Takeshi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10633331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：採取された胆汁を用いて悪性、良性に分類し、メタボローム解析を行った。胆汁6検体についてキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)のカオチンモード、アニオンモードによる測定を行った。結果107のピークが検出され、各群の相対面積比の比較およびWelchのt-検定を行ったところ、物質Aが統計学的有意差をもって検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物質Aが同定された。本結果は、胆道癌の診断の際、胆汁細胞診を行うが、感度が低いこと、偽陽性が多いことが問題であった。しかし、胆汁中の物質Aを測定することで癌の補助診断に有用である可能性が示唆された。さらに前向き試験として行い、感度、特異度を算出することで、より確立された手法になる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：50 uL of plasma (or serum) were added to 450 uL 181;L of methanol containing internal standards (Solution ID: H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japan) at 0 186;C in order to inactivate enzymes. The extract solution was thoroughly mixed with 500 uL 181;L of chloroform and 200 uL 181;L of Milli-Q water and centrifuged at 2,300 xg and 4uL 186;C for 5 min. The 350 uL 81;L of upper aqueous layer was centrifugally filtered through a Millipore 5-kDa cutoff filter to remove proteins. The filtrate was centrifugally concentrated and re-suspended in 50 uL 181;L of Milli-Q water for CE-MS analysis. Finally, A was significant factor associated with malignancy.

研究分野：消化器病学

キーワード：メタボローム解析

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

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は進行癌で発見されることが多く、その予後は不良である。中下部胆管癌と肝門部胆管癌の5年生存率は各々Stgae が54%、47%、 が33%、30%、 が20%、19%、 が15%、12%とされている(Gastrointest Endosc 2002;56:33-39, Arch Surg 2005;130:759-763)。胆道癌に対する唯一の根治治療が外科切除のみであるため、可能な限り手術可能な時点で発見、診断することが極めて重要である。現行の胆道癌のマーカーは、CEA や CA19-9 などが最も汎用されているが、CEA の陽性率は35-61%、CA19-9 は67%であり(Pharma Med 1987;5:21-27, Am J Gastroenterol 1990;85:350-355)、決して満足行く診断能ではない。また、他の良性疾患が併存している場合には偽陽性になり、陽性であっても必ずしも手術可能な段階で発見できるとは限らない。原発性硬化性胆管炎に代表される良性胆道疾患との鑑別は時として困難である。特に肝門部胆管癌の手術死亡率は5~10%(胆道 2007;21:591-598)と決して低いとは言えず、その鑑別診断は極めて重要である。鑑別診断には、組織学的診断が Gold standard である。胆道疾患の組織を得るには内視鏡的逆行性胆管膵管造影検査(ERCP)を行うことが必要であるが、レントゲン透視下でのブラインドでの生検になるため、その正診度は41%~92%(Gut 2002;50:326-331)、胆汁細胞診では33%~80%(Gut 1997;40:671-677)と報告されている。これらの成績は、特に予後の観点からは未だ不十分である。加えて炎症を伴う場合には良悪の病理学的診断が困難になることから、その偽陽性や、偽陰性が問題となる。また、ERCP に関しては、偶発症である急性膵炎の発症が問題となり、発症した場合、致死率は2-15%(Am J Gastroenterol 2010;105:1753-1761)であり、決して安全に施行可能とはいえない。また、ERCP は、術後腸管を有する症例には施行困難である。以上のような背景から、非侵襲的で、確実な胆道癌に対する新規マーカーの開発が急務である。一方、ゲノム医学の発展は目覚ましく、様々な遺伝子解析がなされているが、それぞれの遺伝子は独立ではなく、複数が互いに密接して関係していることから、遺伝子発現情報は複雑化する。このことが、単独の遺伝子解析のみでは、その生物学的悪性度に決定的な因子とならない原因の一つである。一方、メタボロームは細胞内で生成される代謝産物の総体を指し、生体反応の最終過程を担う低分子群と位置づけられる。よって代謝の全体像を捉えるメタボローム解析は、遺伝子発現・多型と表現型を結びつける重要な手がかりとなると考えられる(J Proteome Res 2;488-494:2003)。

以上のような背景から、外科的切除がなされ、病理組織学的に良悪の判明している症例の保存胆汁を用い、糖蛋白を網羅的に解析(メタボローム解析)を行い、その悪性度との関連性を解明することを目的とした。本研究のテーマである、胆汁の糖蛋白を網羅的な解析により、胆道疾患の病理学的な悪性度、つまり、炎症を含む良性疾患と癌においての産生する糖蛋白の相違が明らかにされることが期待される。将来的にはその糖蛋白を Code する遺伝子を解明し、その遺伝子をターゲットとした進行胆道癌に対する遺伝子治療や、血中に遊離する代謝産物を同定し、あらたな胆道癌発見の新規マーカーの開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

近年印刷業に従事した患者に発症することで注目をあびている胆道癌は、手術加療が唯一の根治治療であり、早期発見が極めて重要である。しかし、早期癌の発見、診断は極めて困難であり、その診断が可能な手法の開発が急務である。CA19-9 や CEA といった腫瘍マーカーが広く使用されているが、前述の問題解決には未だ不十分である。そこで、胆道癌症例の胆汁について、その糖蛋白を網羅的に解析(メタボローム解析)を行うことで、特有の代謝産物を同定することを目的とした。良性症例、癌症例に分けて解析を行い、異同する糖蛋白について検討する。将来的にはその蛋白を Code する遺伝子を解明し、その遺伝子をターゲットとした遺伝子治療や、血中に遊離した物質を測定することで早期発見、診断が可能になることが期待できる。

3 . 研究の方法

当科で ERCP 下に留置した ENBD tube から採取した胆汁(-80 保存) 5800 検体の中から最も適切な検体を選定する。選定基準は外科的切除が施行され、病理学的に最終診断がなされた良性、癌の 2 群。各々の症例を選択し、術前の画像所見を含む臨床学的所見を集積し、病理組織を再度検鏡し、病理学的診断を再確認する。選定された胆汁について、メタボローム解析を行う。解析方法は以下に示す通りである。効率的かつ解析精度を向上させるため、メタボローム解析について、経験豊富な一般財団法人化学物質評価機構 安全性評価技術研究所 研究第一部 研究第二課(以下 CREI)の、石田和也氏を研究協力者として、共同で解析を行った。

生体サンプル中にはコレステロールなどの親油性物質(極性が低い物質)からアミノ酸や糖類などの親水性物質(極性が高い物質)まで数千種類が含まれ、試料中の物質の濃度を測定するにはそれらの物質を分離して測定する必要がある。本研究のサンプルは胆汁であり、熱に不安定であること、また網羅的解析であることより、液体を使用する場合を液体クロマトグラフィー(LC; Liquid Chromatography)を用い分離を行った。

得られた TIC クロマトグラムの中から効率的にピークの質量、測定時間及びピーク強度の情報を得るため Thermo の純正ソフトである SIEVE で解析を行う。その後、データベースで物質推定を行い、統計解析の結果、悪性度と最も関連する物質を同定した。

得られた悪性度との関連性が最も疑われる蛋白に対し、前向き試験で検証する。実際には当科で術前に ENBD tube を留置し、同意を得て胆汁を保存してメタボローム解析を行った。

4 . 研究成果

内部標準物質の濃度が 50 μM となるように調整した 450 μL のメタノール溶液に 50 μL の胆汁を添加して攪拌を行う。これに 500 μL のクロロホルム及び 200 μL の Milli-Q 水を加えて攪拌し、遠心分離を行った。遠心分離後、水層を限外濾過チューブに 200 μL 移し、遠心後、限外濾過処理を行った。濾過を乾固させ、再び 50 μL の Milli-Q 水に溶解し測定に共した。陽イオン性代

謝物質及び陰イオン性代謝物質の測定を CE-TOFMS system にて行った。CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver.2.17.1.11 を用い、シグナル・ノイズ比が3以上のピークを自動抽出し、質量電荷比、ピーク面積値、泳動時間を得る。得られたピーク面積を相対面積値に変換し、アダクトイオン及び脱水、脱アンモニアなどのフラグメントイオンなどの分子関連イオンを削除した。検出されたピークについて、代謝物質ライブラリに登録されている全物質と照合、検索を行った。

結果、107 のピークが得られた。これらを用い、最も悪性群と良性群の識別に寄与する可能性である物質 A が同定された。

さらに二次試験として、胆汁中に含まれる物質 A を、悪性4例、良性2例の保存胆汁の解析し、その定量を行った。下記に物質 A の濃度を示す。

- 1 悪性 3.1 $\mu\text{mol/L}$
- 2 悪性 3.1 $\mu\text{mol/L}$
- 3 悪性 4.6 $\mu\text{mol/L}$
- 4 悪性 2.1 $\mu\text{mol/L}$
- 5 良性 7.4 $\mu\text{mol/L}$
- 6 良性 6.4 $\mu\text{mol/L}$

以上のように、良性では高い濃度を示す物質 A は、悪性では低い傾向があることが示された。

今後は、前向き試験とし、種々の条件下で胆汁を採取し、物質 A を測定する。

多数例を集積後、本試験結果の再現性を確認し、もっとも感度、特異度の良い閾値を設定する。

最終的には迅速キットを作成し、胆道癌診療の一助にすべく今後も研究を遂行していく予定である。

5 . 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織 該当なし

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。