

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293131

研究課題名(和文) マルチターゲットメタボロミクスを用いたがん診断システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of cancer diagnosis system by multi-platform metabolomics

研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA, MASARU)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00419475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計と液体クロマトグラフ質量分析計とを用いて、がん患者血清において、がん特異的的血中代謝物の変動パターンを捉えることで、がんプロファイリング診断システムを構築できるかを検証した。はじめに、4つの血中代謝物分析プラットフォームを構築し、その分析手法を用いて、がん患者血清の分析を行い、バイオマーカー候補となりうる代謝物を見出した。さらに、「2-phase screening」という代謝物データを用いた新たな診断方法を提唱することができた。

研究成果の概要(英文)： In this study, we analyze serum from cancer patients by using gas chromatograph mass spectrometry and liquid chromatograph mass spectrometry, and then validated the possibility for the cancer profiling diagnosis system based on the alterations in the levels of blood metabolites. We established the four kinds of the analyzing platform for blood metabolites, and then analyzed serum from cancer patients by using these platforms. As a result, we could find the candidates for metabolite biomarkers, and furthermore could suggested the new diagnosis procedure called '2-phase screening'.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メタボロミクス 質量分析計 バイオマーカー がん

1. 研究開始当初の背景

1981年以來、がんは日本人の死亡原因の第1位となっており、国民の3人に一人はがんで尊い生命を失っている。がんは国民にとって重大な脅威であるため、その克服に対する社会的ニーズは極めて高いと想定される。がん患者の死亡率統計(2010年厚生労働省「人口動態統計」)によれば、近年、大腸がんなどの消化器がん患者数は増加傾向にあり、食生活の欧米化などがその原因と考えられている。一方で、消化器がんの診断において使用されている内視鏡検査は、比較的早期に診断が可能な優れた検査法のひとつだが、侵襲的な検査であり、スクリーニング法として全国民に行うことは困難である。従来簡便な消化器がん検査法として糞便の免疫学的潜血反応検査、血液検査による腫瘍マーカー診断が挙げられる。しかし、これらの検査で陰性であっても、がんの発症を否定することはできない。さらに、消化器がん検査で使用される腫瘍マーカーは、大腸がんや胃がん、膵がんなどを特異的に識別して診断できるものではない。すなわち、各種がんを早期に、かつ、より精確に発見できる血液マーカーは発見されていないのが現状である。

がんでは、健康人では見られないタンパク質の発現やその活性の変化により代謝経路に異常が認められている。その結果、細胞内で誘発された様々な代謝物の変動を血液中での確に、かつ、感度よく検出することができれば、様々な病気の診断に使えると考えられる。そこで、健康診断で採取される多数の血液検体中のがん特異的代謝物(メタボローム)の変動パターンを高感度に検出し、プロファイリングすることができれば、画期的な超早期診断システムの開発につながると考えた。研究代表者が所属する神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学分野・消化器内科学分野では、臨床検体における体系的な代謝物解析を用いた臨床メタボロミクスの確立を目指し、研究代表者を中心に臨床研究に参加する医師の管理のもと、消化器疾患の種類や病歴、進行度などにより分類し、詳細で正確な臨床データと生化学所見を備えた質の高い患者のサンプルを対象として、様々な質量分析計を用いたメタボロミクス研究を実施し、疾病特異的な代謝物の質的、量的変化を簡便に捉える技術を開発してきた。これまでにガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC-MS)や液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計(LC-QqQMS)を用いることで、いくつかのがんにおいて特異的な血中代謝物のパターンが存在することを明らかにしている。そこで、消化器がんに対する簡便かつ低侵襲的で信頼性のある超早期診断への実用化に結びつけるべく本研究開発を計画した。本研究の成果は、がんの早期発見、医療費削減に貢献できると考える。

2. 研究の目的

日本社会の高年齢化に伴い、がんによる死者数は増加の一途を辿っている。そのため、治療可能ながんを簡便かつ非侵襲的に、より早期に発見できる診断法の開発が求められている。研究代表者は臨床検体における代謝物の包括的分析である「臨床メタボロミクス」の実用化に向けての研究を進めてきた。これまでに、いくつかのがんでの特異的な変動を示す血中代謝物(メタボローム)パターンを同定するがんプロファイリング法を確立している。そこで、がん特異的な血中代謝物の変動パターンを、国内で実施される健康診断に応用するため、多検体処理が可能で、かつ、より簡便に解析できるがんプロファイリング診断システムを開発し、実用化に供することができるのか否かについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(A)-1. GC-MSを用いたアミノ酸、有機酸分析と血清メタボロームデータベースの作成

これまで、GC-MSを用いた水溶性代謝物の血清メタボロミクス研究を中心に行ってきたおり、その実績も数多く存在することから、GC-MSによる測定・解析を優先的に進め、これまでの我々が行ってきた研究開発と同様な方法により、GC-MSを用いてがん患者血清中のアミノ酸、有機酸などを測定した。

(A)-2. LC-QqQMSを用いた脂質分析と血清メタボロームデータベースの作成

遊離脂肪酸、中性脂質、リン脂質、糖脂質など脂質は、その生体内における役割が注目されており、脂質の変動はがんの早期診断に大いに役立つ可能性がある。しかし、脂肪酸以外の脂質は、その化学的特性からGC-MS分析が非常に困難である。そこで、血清メタボロミクス研究に使用している機器のひとつであるLC-QqQMSを用いた脂質の分析を実施した。上記(A)-1と同様ながん患者のデータセットを準備し、リン脂質、糖脂質など脂質の測定を行い、得られた測定データの検証を行った。

(A)-3. イオンペアLC-QqQMSによるアニオン代謝物分析と血清メタボロームデータベースの作成

解糖系やTCAサイクルなどのグルコースをエネルギー分子のATPに変換するエネルギー代謝や、NADPHの供給源として脂質の生産にも関与しているペントース・リン酸経路は、生命活動の最も基本となる代謝反応であることから、疾患との関連性が極めて高いと考えられている。しかし、これらの代謝反応に関連する中間代謝物や補酵素類の多くが、リン酸基を有する高極性アニオン代謝物であり、上記2種の分析系において分析することは困難である。そこで、LC移動相にイオンペ

ア試薬である疎水性カチオン化合物を添加し、イオンペアを形成（中性化）させることで、LCカラム内での保持・分離を可能にさせるイオンペア LC-QqQMSにより測定を実施した。上記(A)-1、-2と同様ながん患者のデータセットを準備し、代謝物データを取得した。

(B) 質量分析データの自動解析ソフトウェアの開発・改良

GC-MSとLC-QqQMSを用いた血清メタボロミクス研究により得られた質量分析データに対して、より正確なデータ解析を実施できる手法の可能性について検証した。

(C) 質量分析計を用いた分子同定用データベースリストの改良

研究代表者は、アミノ酸や有機酸などの分子同定用のデータベースリストを保有しており、実際に血清メタボロミクス研究に活用しているが、その分子同定用データベースリストにない分子も数多く存在する。そこで、本研究開発プロジェクトで使用するGC-MS用とLC-QqQMS用の分子同定用データベースリストの改良を行い、より多くの血清中代謝物を迅速に同定できるように設定した。

(D) 血清メタボロームデータベースの評価とその実用化へ向けた検討

今回の研究開発プロジェクトでは、GC-MSとLC-QqQMS、イオンペアLC-QqQMSの3種類の質量分析計を用いて、糖やアミノ酸、有機酸、糖リン酸、ヌクレオチド、補酵素、脂肪酸を含めた脂質の解析を行い、がんを早期に診断できるシステムの開発を目的とした。3種類の質量分析計からの情報を含むがん早期診断システムを開発できれば、診断精度の向上が期待できるが、それぞれの質量分析計の特性が異なることから、その特性を反映した測定データ情報も大きく異なる。それにより、3種類のデータを合わせると膨大なデータ量となり、そのデータ解析にも多くの時間が必要となる可能性がある。そこで、本開発システムの実用化へ向けて、データの統合システム開発と多検体処理に耐えうる診断システムの可能性について検証した。

4. 研究成果

はじめに、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計（糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸など）、液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計（脂肪酸、リン脂質など）、そして、イオンペア液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計（糖リン酸、核酸、補酵素など）の3種の分析プラットフォームによる包括的な血清代謝プロファイリング研究を進めるために、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計、液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計、イオンペア液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計

の3種類のプラットフォームにより分析可能な血清中代謝物データベースの作成を行い、それぞれ完成できた。さらに、液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計を用いて、アミノ酸や塩基等を分析できる系も、分析カラムを交換することで構築し、この手法を用いて分析可能な血清中代謝物データベースの作成を実施した。以下、当初計画した3種類の分析プラットフォームに新たな分析プラットフォームを加えた4種類の分析プラットフォームを「マルチプラットフォームメタボロミクスシステム」と命名し、このシステムによる血清代謝物分析を実施した。

次に、膵がん患者血清検体を分析した結果を示す。マルチプラットフォームメタボロミクスシステムにより、対象の血清サンプルから385種類の代謝物が検出された。このうち分析定量性が不安定であると判断された149種の代謝物を除外し（RSD%を基準にして決定）、残りの236種類の代謝物を評価に供した。はじめに、学習セットで、膵がん患者と健常者の血清代謝物をWilcoxonの順位和検定を用いて有意差検定を行った結果、75種類の代謝物において、統計学的に有意差を認められた。これら75種類の代謝物を、それぞれの測定データに基づいて、ロジスティック回帰分析を用いて診断モデルを作成した結果、25種類の単代謝物診断モデルで高い診断能（脂質分析でAUC>0.80、その他の分析でAUC>0.70を指標）を示した。これら25種類の単代謝物診断モデルを、検証セットを用いて評価した結果、6種類の単代謝物診断モデルではAUC>0.70を示したが、感度・特異度がともに80%を超える単代謝物診断モデルは存在しなかった（表1）。

表1. 6種の単代謝物モデルの結果

代謝物名	学習セット			検証セット		
	感度	特異度	AUC	感度	特異度	AUC
1,5-AG	80.0	66.7	0.7867	70.5	72.7	0.8130
Mannose	86.7	80.0	0.9022	47.7	86.4	0.7810
LPC18-0(sn-1)	80.0	86.7	0.8756	40.9	97.7	0.7505
LPC18-0(sn-2)	80.0	93.3	0.8667	31.8	100	0.7164
LPC20-3(sn-2)	73.3	86.7	0.8711	50.0	81.8	0.7732
PC14-0,22-6	86.7	80.0	0.8800	79.5	70.5	0.8301

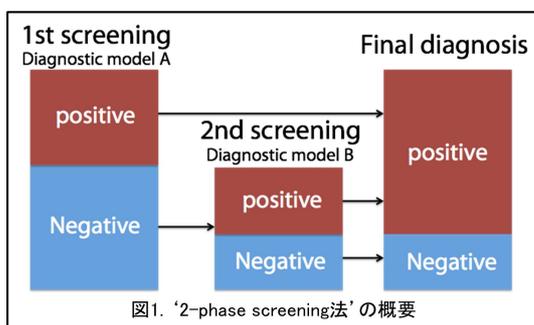
次に、より診断能が高い診断モデルを作成するため、多変量解析による評価を実施した。ステップワイズ法に供することで、Mannoseと1,5-anhydro-D-glucitolの2種類の代謝物を選択し、多重ロジスティック回帰分析により診断モデルを作成した。次に示す式が、作成できた診断モデルである。

$$p=1/[1+e^{-\{-3.87-8.28(1,5\text{-anhydro-D-glucitol})+42.33(\text{Mannose})\}}]$$

学習セットにおける診断モデルのAUC、感度、特異度、正診率はそれぞれ0.9511、100%、80.0%、90.0%であった。次に、この診断モデルを、検証セットを用いて評価した結果、AUC、感度、特異度、正診率はそれぞれ0.8512、

72.7%、84.1%、78.4%であった。

続いて、実用化を目指して、より性能の高い診断モデルの構築を試み、'2-phase screening 法'(図1)という、2つの診断能の高い単代謝物診断モデルを段階的に組み合わせた診断モデルを提唱し、その有用性について検証した。この提唱した手法は、代謝物を対象としたバイオマーカー研究では、文献上、使用されたことがなく、全く新規に構築したものである。まず、学習セット・検証セットともに高い診断能を示した6種類の単代謝物診断モデルを組み合わせて新たに診断モデルを作成し、学習セットを用いて評価した結果、16パターンの組み合わせで感度・特異度ともに80%を超える成績であった。この16パターンの組み合わせ診断モデルを検証セットで評価した結果、1つの組み合わせ(第1スクリーニング: Mannose + 第2スクリーニング: LPC18-0(sn-1))で感度・特異度ともに80%を超える成績であった。この診断モデルは、学習セットで感度100%、特異度80%、正診率90%、検証セットで感度84.1%、特異度84.1%、正診率84.1%と高い診断能を示した。



この研究で、GC-MSとLC-MSを使用したマルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いて、対象の血清サンプルから385種類の代謝物を検出し、感度の高い膵癌のバイオマーカー候補を探索した。血清代謝物のデータは、食事や身体活動の影響を受けるので、その評価は慎重に行わなければならないが、我々の研究では、学習セットの膵がん患者検体は絶食下の検体のみとし、一方、検証セットの膵がん患者検体は絶食下とそうでない検体とで構成された。この方法により、採血前の絶食の有無に影響されない強固な診断モデルを作成することができると考えられる。

最近の研究で、膵癌の原因の多様性が明らかにされており、現在、膵癌の腫瘍マーカーは感度、特異度ともに低く、複数のマーカーを組み合わせることは必要不可欠である。我々の先行研究において、GC-MSによる血清メタボロミクス、および、ステップワイズ法と多重ロジスティック回帰分析を用いて膵癌の診断モデルを作成し、検証セットで感度71.4%、特異度78.1%の成績を示した。今回の研究においても、我々は、GC-MS、および、LC-MSから得られたデータを用いて、ステップワイズ法と多重ロジスティック回帰分析

による膵癌の診断モデルを構築し、検証セットで感度72.7%、特異度84.1%と高い診断能を示すことができた。しかし、膵癌の進展には、様々な遺伝的因子と環境因子が相互に関わっているため、1つの診断モデルを用いると、1つの独立した膵癌の原因となる因子から引き起こされる代謝の変化を同定しているにすぎない可能性があり、このことが膵癌のマーカーの診断感度を下げる原因になっているかもしれない。そこで、我々は、2-phase screening 法という、2つの診断能の高い単代謝物診断モデルを組み合わせた診断モデルを提唱し、その有用性について検証した。この診断モデルは、検証セットで感度84.1%、特異度84.1%、正診率84.1%と非常に高い診断能を示した。

我々の研究では、膵がん患者で phosphatidylcholine と lysophosphatidylcholine の血清レベルが低下しており、LPC18-0(sn-1)が、2-phase screening 法における重要な代謝物であると明らかとなった。Phosphatidylcholine は choline から合成されるリン脂質の一つで、生体膜の主な構成成分である。Lysophosphatidylcholine は phosphatidylcholine に由来する化学物質である。choline を含む代謝物はすでに、膵癌を含む様々な癌において、バイオマーカー候補として見出されている。膵がん患者でみられる phosphatidylcholine と lysophosphatidylcholine の血清レベルの変化は、おそらく癌細胞の増殖に伴う、生体膜の構成成分の盛んな利用と関係があると思われる。

2-phase screening 法における重要な代謝物の一つとして同定された Mannose は、タンパク質のグリコシル化において重要な役割を果たしているが、癌代謝との関連は明らかではない。しかし、食道癌や乳癌において、血清 mannose レベルの上昇が報告されている。一方、糖尿病患者においても、空腹時血清 mannose レベルの上昇が報告されている。我々の研究では、膵がん患者ではHbA1cが平均6.6%であり、耐糖能異常の存在が示唆される。血清代謝物の変化は、局所の代謝の変化のみならず、膵癌に対する全身の反応も反映されているものと思われる。すなわち、血清代謝物におけるこれらの変化の理由については、さらなる検討で明らかにする必要がある。

我々は、これまで、GC-MSを用いて膵癌に関する研究を行ってきたが、今回の研究では、GC-MSに加えてLC-MSも採用することで、バイオマーカー候補として、より幅広い代謝物のスクリーニングを実施した。その結果、膵癌の新たなスクリーニング法を提唱し、この診断モデルは高い感度と特異度を示した。この研究結果の臨床応用のためには、良性膵疾患など他の疾患を含む、多検体大規模研究を行い、我々の研究結果を検証する必要がある。

さらに、将来的には、膵癌の治療効果判定や、治療後の予後予測についても評価が必要である。

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 5 件)

Suzuki M., Nishiumi S., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.

Metabolome analysis for discovering biomarkers of gastroenterological cancer.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 966, 59-69 (2014).

doi: 10.1016/j.jchromb.2014.02.042.

Matsubara A., Izumi Y., Nishiumi S., Suzuki M., Azuma T., Fukusaki E., Bamba T., Yoshida M.

Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots.

Journal of Chromatography B, 969, 199-204(2014).

doi: 10.1016/j.jchromb.2014.08.013.

Nishiumi S., Suzuki M., Kobayashi T., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.

Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer.

Metabolites, 4, 547-571 (2014).

doi: 10.3390/metabo4030547.

Suzuki M., Nishiumi S., Kobayashi T., Azuma T., Yoshida M.

LC-MS/MS-based metabolome analysis detected changes in the metabolic profiles of small and large intestinal adenomatous polyps in ApcMin/+ mice.

Metabolomics, 12,68, 1-9(2016).

doi: 10.1007/s11306-016-0988-7.

Sakai A., Suzuki M., Kobayashi T., Nishiumi S., Yamanaka K., Hirata Y., Nakagawa T., Azuma T., Yoshida M.

Pancreatic cancer screening using a multiplatform human serum metabolomics system. Biomarkers in Medicine, in press.

[学会発表](計 7 件)

吉田優

血清メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索、第 2 回がんと代謝研究会、2014/7/10-10、東京理科大学(東京都)

Masaru Yoshida

Metabolomics analysis for medical research、ISSX・JSSX CAMS2014、2014/10/19-23、San Francisco, USA

吉田優

メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索、日本薬学会第 135 年会、2015/3/25-27、神戸学院大学(兵庫県)

吉田優

血清メタボローム解析によるがんバイオマーカー探索、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015/8/21-22、長崎大学(長崎県)

吉田優

メタボロミクスによる新しい臨床検査の展開、日本臨床検査自動化学会第 47 回大会、2015/10/8-10、パシフィコ横浜(神奈川県)

吉田優

メタボロミクスによるがん診断法の開発と自動化の試み、第 15 回日本質量分析学会北海道談話会・研究会、2015/10/19-19、北海道大学(北海道)

Masaru Yoshida

Metabolome analysis for discovering Biomarkers of Gastrointestinal Cancers、2015 Mass Spectrometry for Clinical Diagnosis、2015/11/5-7、Taipei, Taiwan

[図書](計 0 件)

[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

神戸大学大学院医学研究科内科系講座病
因病態解析学分野ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/metabo/index.html>

神戸大学大学院医学研究科内科学講座消
化器内科学分野ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA, Masaru)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00419475

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：