

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K07266
研究課題名（和文）膵がんにおける代謝バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Metabolic biomarker of pancreatic cancer

研究代表者
小林 隆（KOBAYASHI, Takashi）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：90709669
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌を早期に発見することは難しいが、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）を発見し追跡することが早期発見に寄与することが知られている。この研究では特にリスクの高いIPMNと膵癌を簡便に発見するための代謝物バイオマーカーを探索し、精度を検証した。膵癌44例、高リスクIPMN15例、健常者46例の血中代謝物をGC/MSでメタボローム解析し、メチオニン、アラビノース、ヒスチジン、リジンとBMI、ALP、HbA1cを組み合わせた診断式を作製した。この診断式の膵癌/高リスクIPMNに対する感度は92%で、特異度は90%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでCTやMRIなど大規模な検査が必要であったIPMNを血液バイオマーカーによって検出することができれば、より効率的に膵癌高リスク保因者を拾い上げることができ、膵癌の嘔気発見に寄与できる可能性がある。また疾病によってヒトの代謝環境が特異的に変化していることを示唆しており、疾患診断や治療効果予測、予後予測など幅広い応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Although early detection of pancreatic cancer is difficult, it is known that detection and tracking of intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) can contribute to early detection. In this study, we explored metabolite biomarkers for detection of IPMN and pancreatic cancer. Metabolites in the blood of 44 cases of pancreatic cancer, 15 cases of high-risk IPMN, and 46 cases of healthy subjects were analyzed by GC/MS, and a diagnostic formula combining methionine, arabinose, histidine, and lysine with BMI, ALP, and HbA1c was developed. The sensitivity of this diagnostic formula for pancreatic cancer/high-risk IPMN was 92% and the specificity was 90%.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：代謝物バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の新規罹患数や死亡数は世界的に年々増加傾向にあり、本邦における年間死亡者数は3万人を超える規模に達している。膵癌患者全体の5年生存率は10%未満で、発見時には既に高度浸潤や転移を来している例が大多数である。膵癌の5年生存率は、ステージでは6.5%であるのに対し、ステージIでは約40%であり、早期発見が生存率の向上に寄与する可能性は高い。ただし、ステージIでも過半数が根治を得られないという事実は、ステージIの中でもより早期の微小な段階、もしくは、前癌段階で疾患を検出しなければ、根治率の向上は得られないことを意味している。現在、この課題に対して最も有力な方法の一つは、膵リスク疾患としての膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) に対するサーベイランスである。IPMNはそれ自体が年率約1%の悪性化リスクをもち、「IPMN 随伴性膵癌」は対照より数十倍高リスクであることが近年報告されている。IPMNを抽出するのに最も用いられるのは腹部超音波検査であるが、精度管理上の限界があり、標準化することは容易でない。一方、血液バイオマーカーは、手法を標準化しやすい利点があるが、一般的に用いられるCA19-9は、IPMNや早期の膵癌においては感度が50%以下と低く、炎症によって偽陽性となることも欠点である。このような欠点を克服し得る血液バイオマーカーが開発されれば、その潜在的需要は極めて大きい。

生体内には、糖・有機酸・アミノ酸・脂肪酸などの低分子化合物が数千種類存在し、その総体をメタボロームという。また、このメタボロームを解析することをメタボロミクスと呼ぶ。ポストゲノム研究の重要性が叫ばれるに伴い、メタボロミクスが注目され、飛躍的に進歩してきた。代謝物は遺伝子やたんぱくよりも直接かつ鋭敏に表現型を反映するという特徴がある。癌組織中では、細胞の異常増殖を支えるために、特徴的な代謝リプログラミングが起こることが知られてきており、近年では代謝物自体が発癌に関与する「オンコメタボライト」も報告された。ヒト血液検体を用いたメタボロミクスによって、膵癌においても血中の代謝物パターンが健常者と異なることが確認され、膵癌においても発癌の初期段階から特異的な代謝変化を来している可能性が強く示唆されている。血液メタボロミクスで膵癌やその前段階に特徴的な代謝変容を捉えることができれば、膵癌根治に寄与し得る早期検出が実現できる。

2. 研究の目的

本研究は、血液メタボロミクスによって膵癌、および、IPMNに対するバイオマーカーを開発することが目的である。

3. 研究の方法

あらかじめ規定したプロトコルで前向きに採取された、膵癌、ならびに、IPMN患者、そして、それらに年齢・性別をマッチさせた健常者の血漿を用いて本研究を実施した。健常者は腹部エコーで明らかな膵疾患がなく、かつ膵疾患の既往がないものと定義した。また、膵癌に関連する患者背景因子(BMI、喫煙歴、飲酒歴)、および、血液検査所見(AST、ALT、ALP、 γ -GTP、LDH、Amy、HbA1c)を、研究参加時の診療録から収集した。High-risk stigmata(HRS)もしくは worrisome-feature(WF)を有するIPMNを高リスクIPMNと定義し、膵癌/高リスクIPMN群を疾患群として、健常者検体と共に、GC/MSを用いたメタボローム解析を実施した。GC/MSで分析するバイオマーカー候補代謝物は、1,5-AG、arabinose、asparagine、glutamine、histidine、inositol、lysine、methionine、threonine、tyrosine、uric acid、xylitolの計12種類とした。すべての検体は8時間以上絶食とした朝に採血した後、速やかに冷却、遠心分離を行い、分析まで凍結保存した。除タンパク、代謝物抽出、凍結乾燥、誘導体化といった検体前処理を行った後、GC/MSによる代謝物分析を実施した。定量分析は安定同位体を用いた検量線法にて行い、得られた定量値を統計解析に供して評価した。

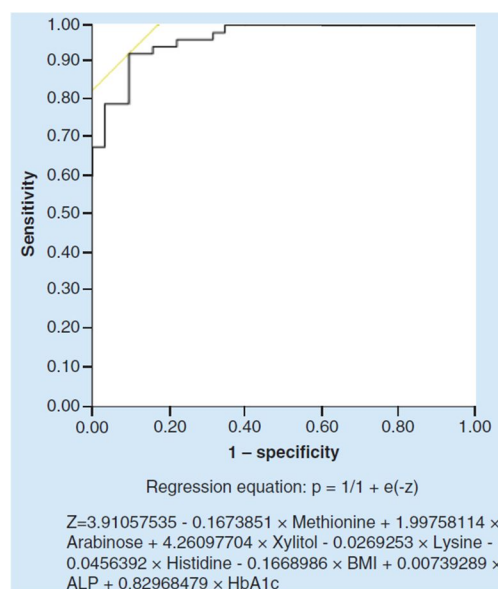
4. 研究成果

合計114例の血漿の分析を実施した。検体の内訳は膵癌44例、IPMN24例、健常者46例であり、IPMN24例のうち高リスクIPMNは15例であった。疾患群は59例(膵癌44例、高リスクIPMN15例)、健常群は46例で、膵癌の患者背景として、stageが2例、stageが18例、stageが13例、stageが11例で、IPMNの患者背景は、WFが9例、HRSが6例であった。それぞれの候補代謝物に関して、膵癌/高リスクIPMNに対する個別バイオマーカーとしての性能評価を行った。GC/MSにて定量分析を実施した後、それぞれの代謝物に対して単変量解析を行い、ROC曲線解析から曲線下面積(AUC)値を算出した。個別のバイオマーカーとして最大のAUC値を示したのはlysineで、AUC値は0.79、感度は67%、特異度は86%であった。

続いて、12種類の候補代謝物に対して多重ロジスティック回帰分析実施し、膵癌/高リスクIPMNの検出モデルを作製した。ステップワイズ法でmethionine、arabinose、xylitol、lysineの4代謝物の変数として選択され、これらを用いた回帰式を作製し、ROC曲線解析からAUC値を算出

した。その結果、算出式： $p=1/1+e(-z)$ ($Z=2.91276175-0.1273538 \times \text{Methionine}+2.37491003 \times \text{Arabinose}+2.74253629 \times \text{Xylitol}-0.0259883 \times \text{Lysine}$)による検出モデル(モデル 1)が導き出され、AUC 値が 0.90052、感度は 79.6%、特異度は 86.9%であった。

次に、より高精度な検出モデルを作製するため、候補代謝物と臨床パラメーター情報とを組み合わせ、膵癌/高リスク IPMN の検出モデルを作製した。疾患群と健常群で 2 群間比較を行い、有意差を示したパラメーターについて多変量解析を行った。2 群間比較において、臨床パラメーターの BMI、生化学検査の ALP と HbA1c で有意差を認め、バイオマーカー候補代謝物では、threonine、methionine、arabinose、asparagine、xylitol、1,5-AG、lysine、histidine、tyrosine で有意差を認めた。これらの有意差を認めた 12 変数について多重ロジスティック回帰分析を行った。ステップワイズ法にて methionine、arabinose、xylitol、lysine、histidine、BMI、ALP、HbA1c が変数として選択され、回帰方程式を作製して ROC 曲線解析から AUC 値を算出した。その結果、算出式： $p=1/1+e(-z)$ ($Z=3.91057535-0.1673851$



$\times \text{Methionine}+1.99758114 \times \text{Arabinose}+4.26097704 \times \text{Xylitol}-0.0269253 \times \text{Lysine}-0.0456392 \times \text{Histidine}-0.1668986 \times \text{BMI}+0.00739289 \times \text{ALP}+0.82968479 \times \text{HbA1c}$)による検出モデル(モデル 2)が導き出され、AUC 値が 0.96、感度は 92%、特異度は 90%と、高精度な結果を示した。

さらに、導き出した検出モデルの疾患検出能を検証するため、モデル作製で使用した検体とは別の膵癌、ならびに IPMN 患者の血漿 18 検体(膵癌:11 例、IPMN:7 例)の分析を行った。検証サンプルのデータを検出モデルの回帰式に当てはめたところ、膵癌/高リスク IPMN の検出感度は、モデル 1 で 66%(12/18)、モデル 2 では 100%(18/18)であった。

一般人口における膵癌の罹患率の低さを考慮すると、膵癌のみでなく、膵癌発症高リスク集団を検出できるバイオマーカーの特定が重要である。本研究におけるメタボローム解析の結果、多くの代謝物において、高リスク IPMN においても、膵癌と同様の変化が起きていることが示唆された。また、多重ロジスティック回帰解析により膵癌/高リスク IPMN の有用な検出モデルを確立することに成功した。90%以上の高い感度・特異度を示し、今後の臨床応用にも有用となる可能性があると考えられた。

本研究のリミテーションとしては、微小な膵癌病変はほとんどの画像検査で検出困難であるため健常者が微小な膵癌を有していないと証明することはほぼ不可能であること、検体数が不足していたことであり、これらのリミテーションを克服するためには、より大規模で長期間にわたる多施設研究へ発展させることが必要である。

本研究では血液メタボローム解析を用いて膵癌/高リスク IPMN を検出する技術を開発した。検出モデルは、膵癌/高リスク IPMN に対して高い感度と特異度を示し、その高検出能を検証試験においても確認することができ、膵癌の血中バイオマーカー候補代謝物が、膵癌前駆病変である高リスク IPMN の検出にも有用である可能性が示唆された。

引用文献) Biomark Med. 2020 Jul;14(11):1009-1020. doi: 10.2217/bmm-2019-0587.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yamakawa Kohei, Masuda Atsuhiko, Nakagawa Takashi, Kobayashi Takashi, Tsujimae Masahiro, Ashina Shigeto, Yamada Yasutaka, Tanaka Takeshi, Tanaka Shunta, Nakano Ryota, Sato Yu, Ikegawa Takuya, Kurosawa Manabu, Fujigaki Seiji, Kutsumi Hiromu, Itoh Tomoo, Fukumoto Takumi, Kodama Yuzo	4. 巻 19
2. 論文標題 Evaluation of efficacy of pancreatic juice cytology for risk classification according to international consensus guidelines in patients with intraductal papillary mucinous neoplasm; a retrospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 424 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2019.02.013	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 Tsujimae Masahiro, Masuda Atsuhiko, Shiomi Hideyuki, Kobayashi Takashi, Sakai Arata, Kutsumi Hiromu, Zen Yoh, Itoh Tomoo, Fukumoto Takumi, Kodama Yuzo	4. 巻 34
2. 論文標題 Significance of pancreatic calcification on preoperative computed tomography of intraductal papillary mucinous neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1648 ~ 1655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14732	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 Kobayashi Takashi, Honda Kazufumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Trends in biomarker discoveries for the early detection and risk stratification of pancreatic cancer using omics studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Review of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 651 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14737159.2019.1643718	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 Shin Nishiumi, Makoto Suzuki, Takashi Kobayashi, Masaru Yoshida	4. 巻 125(5)
2. 論文標題 Differences in metabolite profiles caused by pre-analytical blood processing procedures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 613-618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2017.11.011.	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 -

〔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 小林 隆、平田 祐一、吉田 優
2. 発表標題 血液メタボロミクスによる膵がんスクリーニング法の開発
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林 隆	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 胆と膵	

〔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	西海 信 (NISHIUMI Shin) (20514706)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------