

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20720

研究課題名（和文）生体内アミノ酸バランスに基づいて悪性胸膜中皮腫を診断する新規検査法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic method for malignant pleural mesothelioma based on the analysis of amino acid profiles

研究代表者

富田 陵子（TOMITA, RYOKO）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10580194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内アミノ酸濃度のトータルバランスの変動に基づいて悪性胸膜中皮腫（MPM）患者を識別するための判別モデルの開発を行った。MPMまたは比較対照患者から採取された胸水試料のHPLC分析で得られた24種のアミノ酸濃度について主成分分析（PCA）を行い、MPM群と対照群ではアミノ酸バランスが異なることが確認された。さらに、線形判別分析（LDA）により未知検体の群情報（MPMか否か）を予測するための判別モデルを作成した。いくつかのアミノ酸で構成される本モデルは、良好な診断性能を示すことが確認され、本法を新しい悪性胸膜中皮腫（MPM）診断法として応用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のMPM診断は、画像診断や細胞診を行った後に鑑別のための外科的・胸腔鏡生検が実施されているが、これらは診断を行う検査技師や医師の知識と経験に依存する。本研究で提唱する新たな診断法は、判別モデル（計算式）から算出される数値によって判断するため、診断のための客観的な判断材料を提供することができる。既存の診断技術とは原理の異なる新しい補助診断法として、または定期的な健康診断等を利用したスクリーニング検査法としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a discriminant model was developed to diagnose malignant pleural mesothelioma (MPM) based on the analysis of the balance of amino acid concentrations. Amino acid data from the HPLC analysis of pleural fluid samples collected from MPM or control patients were applied to the principal component analysis (PCA). It was confirmed that the amino acid balance was different between the MPM and control groups. Furthermore, in order to create an index for identifying MPM patients, the linear discriminant analysis (LDA) was performed on amino acid data for establishing a discriminant model. The obtained model consisting of several amino acids as variables was confirmed to show good diagnostic performance. We believe this method could contribute to the development of a new auxiliary diagnostic technique.

研究分野：分析化学

キーワード：アミノ酸 アミノ酸バランス 悪性胸膜中皮腫 診断 HPLC

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫（MPM ; malignant pleural mesothelioma）は職業的なアスベスト曝露歴が深く関係しており、長い潜伏期間を経て発症した MPM の予後は極めて不良で、死亡率も高い。早期治療を行うことが最良の策であるものの、早期段階で自覚できる特徴的な症状は殆どなく、早期発見の機会を逃すことが多い。現行の診断では胸部 X 線・CT 等の画像診断や細胞診を行うが、最終的な鑑別診断には外科的胸膜生検を必要とする。これは検査技師や医師の豊富な知識・熟練した経験と技術に頼る部分が大きく、すべてが客観的に判断されているとは言い難い。早期発見に有効で標準化された診断技術を確立すべく、遺伝子レベルでの診断技術やバイオマーカーの開発が日進月歩で発展しているが、未だ改善の余地がある。

申請者はこれまでに、培養細胞の活動によって生じる培地中アミノ酸濃度の変動を包括的に評価することで細胞状態を判別する手法：アミノ酸メタボロミクス【Anal. Sci., 30 (2014) 751-758】を開発した。本法は、培地中に含まれる約 20 種アミノ酸濃度の変動をトータルバランス（組成）で評価するものであり、バイオマーカーのように特定の（単一の）化合物濃度の増減に基づいた評価とは原理が異なる。すでに、培養細胞レベルで抗がん剤の効果（細胞増殖抑制効果）を判定できることを明らかにしており、疾病の罹患により発生する生体内のアミノ酸濃度変動から、疾病の診断も充分可能であると考えられる。そこで、本法を臨床現場で利用可能な診断技術として発展させるべく、本研究を企図した。

2. 研究の目的

本研究では、MPM の早期発見に有効かつ標準化された診断技術の確立を目的としている。まずは、アミノ酸濃度のトータルバランスの変動に基づいた MPM 診断の有用性を確認すべく、培養細胞レベルから臨床検体へと段階的に検証を行った。なお、臨床検体には現行の確定診断で採取される胸水を試料として用いた。

3. 研究の方法

細胞培養培地または生体試料中の約 20 種アミノ酸濃度の測定は、*o*-フタルアルデヒド（OPA, 一級アミノ基のラベル化）およびクロロギ酸-9-フルオレニルメチル（FMOC, 二級アミノ基のラベル化）を蛍光試薬とする自動蛍光誘導体化 UHPLC 分析システム（Nexera X2, 島津製作所）にて行った。前処理（有機溶媒によるタンパク沈殿）を施した試料をシステムに導入後、誘導体化から分析完了および定量値の演算まで 1 検体あたり 20 分で完了する。ただし、得られた定量値そのものを統計解析に利用すると、アミノ酸間で観測される大きな濃度差が解析の干渉になることから、あらかじめ正規化したデータ（例えば、初期濃度からの変化率や総アミノ酸量に対する比率など）を統計解析ソフトウェア（SIMCA-P+, Umetrics ; SPSS Statistics 27, IBM）に入力し、多変量解析を行った。主成分分析（Principal Component Analysis : PCA）では、検体が有するアミノ酸情報を 2 次元グラフ（スコアプロット）上の 1 点に集約し、検体におけるアミノ酸バランスの類似性や差異を包括的に評価した。さらに線形判別分析（Linear Discriminant Analysis : LDA）では、MPM 群および対照群を識別して未知検体の群情報を予測できる判別モデルを作成し、MPM 診断のための性能を感度（真陽性率）、偽陰性率、特異度（真陰性率）にて評価した。

4. 研究成果

検討項目 (1) 培養細胞レベルでの MPM 細胞と非 MPM 細胞 (中皮細胞) の識別

まずは *in vitro* にてアミノ酸濃度のトータルバランスの変動に基づいた MPM 診断の有用性を確認すべく、MPM 由来細胞株 (MESO-1) と比較対照とする中皮細胞株 (Met-5A) を一定期間培養したときの培養培地を試料として検討を行った。UHPLC 分析により得られた 20 種アミノ酸データについて PCA を行ったところ、MPM および Met-5A 細胞培養培地中に含まれるアミノ酸濃度の経時的な変動は、互いに異なっていることが分かった (Fig.1)。これは、各細胞株が生存や増殖に要求するアミノ酸のバランスが異なっており、特にアルギニンやオルニチンを中間代謝物とする「尿素回路」が関与する代謝系に差を生じていることを示唆している。そこで、有意水準 $p < 0.05$ で MPM および Met-5A 細胞間で有意差がみられた 5 種のアミノ酸 [L-アスパラギン酸 (Asp)、L-グルタミン酸 (Glu)、L-アルギニン (Arg)、L-アラニン (Ala) および L-シスチン ((Cys)₂)] を抽出し、これらを説明変数として LDA を行い判別モデルを作成したところ、「判別得点 (Y) = $-14 \times \text{Asp} + 7 \times \text{Glu} + 5 \times \text{Arg} - 8 \times \text{Ala} + 16 \times (\text{Cys})_2 + 3$ 」が得られた。判別得点 (Y) とは、検体のアミノ酸データを予測モデルに代入して算出される値 (正または負の値) であり、これによって群情報を予測することができる。本モデルの診断性能を表す ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.994 と高い値を示し、モデルを構成する各アミノ酸単独での診断性能を上回っていた (Fig.2)。さらに、MPM 由来細胞株として MESO-1 以外の 4 種の細胞株 (MESO-4、CRL-2081、CRL-5915 および CRL-5946) についても同様の検討を行い、Met-5A 細胞と区別できるモデルが得られることを確認した。以上の結果より、培養細胞レベルで「複数のアミノ酸濃度のトータルバランス変動から疾病状態を評価する指標の作成」は有用なアプローチであることが示された。

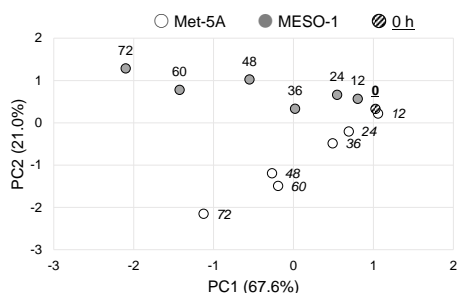


Fig.1 PCA score plot obtained from the analysis of MESO-1 and Met-5A cell culture media. Numbers indicate the incubation time (h) of each sample.

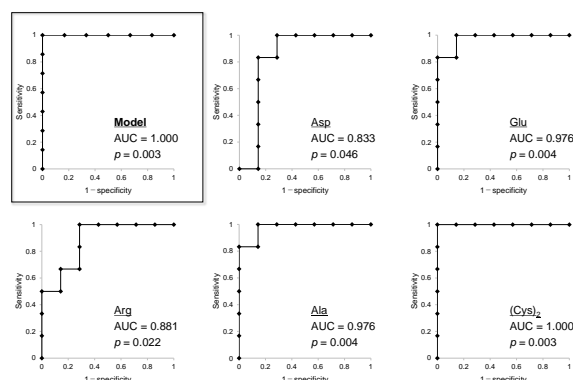


Fig.2 ROC curve of the discriminative model and comparison of five amino acids between the MESO-1 and Met-5A Cell Groups.

検討項目 (2) 臨床検体レベルでの MPM の識別

次段階として、臨床検体レベルで本法の MPM 診断における有用性を確認した。福岡大学病院にて同意が得られた上で採取した臨床検体として MPM 患者の胸水 (20 検体) および比較対照とした他疾患患者 (control, 41 検体) の胸水を手し、一部を「モデル構築用データセット (26 検体)」、残りを「検証用データセット (35 検体)」として使用した。MPM および control の胸水の UHPLC 分析で検出された 24 種アミノ酸データについて PCA を行い、トータルバランスの類似性をスコアプロット上で確認したところ、明瞭ではないものの両群のアミノ酸バランスは異なることが明らかになった。続いて、検体の群情報を予測するための判別モデルを構成するアミノ酸について検討し、有意水準 $p < 0.05$ で MPM および control 群間に有意差がみられた 7 種のアミノ酸を抽出した [L-アスパラギン (Asn)、L-ヒスチジン (His)、L-シトルリン (Cit)、L-バリ

ン (Val)、L-シスチン ((Cys)₂)、L-トリプトファン (Trp) および L-オルニチン (Orn)]。これらを説明変数として LDA を行い判別モデルを作成したところ、「判別得点 (Y) = 196×Asn - 162×His + 2×Cit - 21×Val + 82×(Cys)₂ - 157×Trp + 122×Orn + 0.2」が得られた。このモデル式は、感度 90%、偽陰性率 10%、特異度 94%と比較的良好な値を示し、診断性能を表す ROC 曲線下面積 (AUC) も 0.994 と高い値であった。また、予測モデルの AUC は、モデルを構成する各アミノ酸単独での診断性能を上回っており、複数のアミノ酸濃度のトータルバランスの違いに基づいた診断モデルの有用性が示唆される結果であった (Fig.3)。得られた予測モデルの診断性能をさらに検証すべく、本モデルを「検証用データセット」検体に適用したところ、感度 50%、偽陰性率 50%、特異度 76%であった。モデル構築用データと比較して感度、偽陰性率、特異度は低い値であった原因は、MPM 患者の病期や悪性度などの影響を考慮していないことや予測モデルの変数として選択したアミノ酸の種類や数が適切ではない可能性などが考えられる。判別モデルを構成するアミノ酸について精査したところ、有意水準 p<0.01 で MPM および control 群間に有意差がみられた 4 種のアミノ酸を利用した場合に、検証用データセットにて感度 (60%) および特異度 (80%) が最高値となった。

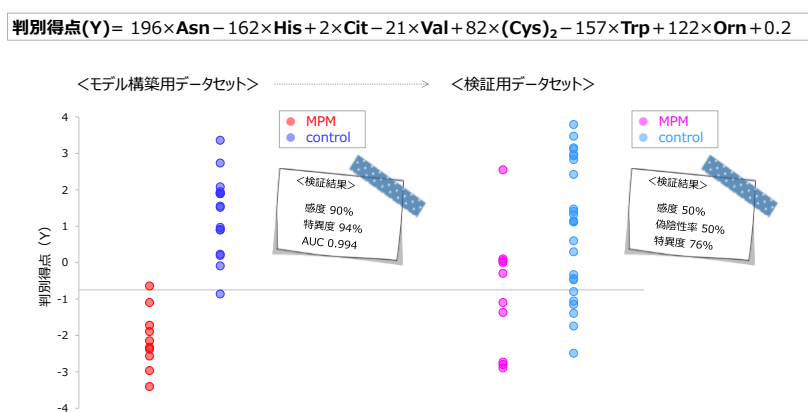


Fig.3 Discriminant scores (Y) obtained from the discriminative model.

今回の検討に用いた臨床検体の数は十分ではなく、モデル構築に最適なアミノ酸の種類や数を特定することはできなかった。ただし、今回使用した胸水は全身を循環している末梢血よりも MPM 組織に近接していることから、MPM 組織での変動がダイレクトに反映されていると考えられ、アミノ酸バランスに基づいた MPM 診断の有用性が示唆されたと考えている。胸水は、確定診断のために実施される細胞診で必ずと言ってよいほど入手できる試料であり、生検よりも侵襲性が少ない。本法は、現行の診断における補助診断法としての応用が期待される。ただし、最終的には健康診断等の定期的な検査の機会を利用したスクリーニング検査法としての応用を目指していることから、胸水に代わって検診等で入手可能な血液やより侵襲性の低い尿などを試料として更なる検討を行い、実臨床へ応用できる新しい診断ツールの開発を今後も継続する予定である。

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 4件）

1. 著者名 Ryoko Tomita, Nao Nishijo, Tadashi Hayama, Toshihiro Fujioka	4. 巻 45
2. 論文標題 Discrimination of Malignant Pleural Mesothelioma Cell Lines Using Amino Acid Metabolomics with HPLC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 724-729
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12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田麻裕、富田陵子、西條 尚、巴山 忠、藤岡稔大
2. 発表標題 アミノ酸メタボロミクスに基づいた新しい悪性胸膜中皮腫の診断法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田陵子、西條 尚、巴山 忠、鍋島一樹、藤岡稔大
2. 発表標題 アミノ酸メタボロミクスに基づいた新しい悪性胸膜中皮腫の診断法の開発
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳啓奈、富田陵子、西條 尚、巴山 忠、藤岡稔大
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫の診断を指向した尿素回路アミノ酸の分析
3. 学会等名 第 37 回九州分析化学若手の会夏季セミナー
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------