

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16381

研究課題名（和文）尿中マルチ腫瘍マーカーを用いた胆道がんの早期発見

研究課題名（英文）Early detection of biliary tract cancer using urinary multi-tumor markers

研究代表者

狩野 陽子（Kano, Yoko）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70848986

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）：本研究で胆道がん27症例（術前術後の尿計62サンプル）の尿中代謝物を網羅解析し、胆道がんに貢献度の高い尿中代謝物を確認した。全1524種の代謝物の中から、術前と術後4週間とで有意差ある代謝物113種（欠損値が多いものや外因性代謝物などを除外した86代謝物）を中心に解析を実施し、尿検体62サンプルのLC/MS測定から、未知構造含む計1524種類の尿中成分を検出し、各代謝物の重要度をランク付けした。これらの胆道がんに貢献度の高い代謝物を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道がんにおいて、血液検査にてCEAやCA19-9という腫瘍マーカーが上昇することがあるが、すべての症例で上昇するとは限らず、また、胆道がん以外でも異常値を示すことがあるため、胆道がんを特異的に検出する方法は確立されていない。有効なバイオマーカーが存在しないため、そのバイオマーカーの開発は社会的意義が高く喫緊の課題となっている。早期には自覚症状が乏しく、黄疸などの症状を認めて診断時にはすでに末期の状態で見られることが多く、5年生存率が約25%（胆道がん）と成人がんの中で最も予後不良の難治性がんである。本研究において胆道がんに疾患貢献度の高い尿中代謝物を同定した。

研究成果の概要（英文）：This study identified several novel urinary metabolite candidates significantly associated with bile duct cancer by comprehensive analysis of urinary metabolites from patients with bile duct cancer. This study was carried out on 62 urine samples collected before and after tumor resection in 27 patients with bile duct cancer. Urine metabolites were extracted using liquid chromatography/mass spectrometry and analyzed comprehensively. In about 1524 metabolites detected in urine samples, 113 urinary metabolites collected before tumor resection were significantly increased or decreased compared to those collected 4 weeks after tumor resection. The importance of the metabolites was determined by ranking the metabolites using the random forest method.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道がん 尿中代謝物 腫瘍マーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆道がんは特異的腫瘍マーカーが無い。難治性がんである胆道がんは2017年最新がん統計において年間死亡数1.8万人、3年生存率20%と極めて予後が悪い癌である。5年生存率が20%を切る難治性がんは、画像診断がいかに進歩したとしても検出が難しい。

これまでの研究で、LC/MSにより約2000種の尿中代謝物を高感度に測定できたこと、加えて、データの前処理、検定、多変量解析等を駆使した統計解析により有効なバイオマーカーを効率的に抽出可能になったことから、尿中腫瘍マーカー検出の着想に至った。さらに、血中の物質と比較すると尿中代謝物は酵素の影響を受けにくく構造的に安定していることや、尿を検体に用いるため容易に採取でき、がんのスクリーニング用途として利用しやすい。

### 2. 研究の目的

胆道がんにおいて、血液検査にてCEAやCA19-9という腫瘍マーカーが上昇することがあるが、すべての症例で上昇するとは限らず、また、胆道がん以外でも異常値を示すことがあるため、胆道がんを検出する方法は確立されていない。そこで胆道がん患者の尿を用いて、尿中代謝物(尿中腫瘍マーカー)を解析し、胆道がんに貢献度の高い代謝物の同定を試みた。胆道がん患者の尿中代謝物を、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS: Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer)により網羅的に解析し、手術前後(腫瘍切除後)で有意に増減している物質を特定し、多変量解析によりがん罹患の有無から胆道がん罹患の有無を識別できる条件を見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 治療前後で胆道がん患者の尿検体を臨床情報を含めて回収する。回収した尿検体は-80に凍結保存して保管し、解析に際しては解凍して一部を質量分析計にて代謝物解析する。胆道がん患者の尿検体は、腫瘍切除前後で収集した。症例数27であり、術前27サンプル、術後2週間27サンプル、術後1か月8サンプルの計62サンプルである。LC/MSを用いたメタボローム測定において、できるだけ多種の尿中代謝物を検出するため、イオン化には正負の電ロスプレーイオン化法を用いるとともに、成分分離には、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィーなど、複数の分離モードを用いている。今回の測定では全部で1524種類の代謝物が検出され、内、データベースにより特定された代謝物が1027種類、化学構造までは特定できていない未知化合物が497種類であった。これら代謝物の検出量(含有量)は、検体採取のタイミングや水分の摂取などによって濃度変動するため、別に測定した尿検体のOsmolality(浸透圧)で規格化した。検体毎に千種類以上の代謝物からなるデータマトリックスを作成後、メタボローム解析においてよく用いられる多変量解析、統計解析、機械学習等の手法を用いた。まず、教師なし学習である主成分分析により、バイアスなしで今回得られたデータの背後に存在する本質的な構造を確認した。次に、統計的有意差検定の一手法である対応のあるT検定を用い、どの代謝物が標本間で統計的に差があるかどうかを抽出した。絞り込んだ有意差のある代謝物に対しては、機械学習のアルゴリズムのひとつであるランダムフォレストを用いることで、判別能力の高さを重要度ランクとして数値化した。ランダムフォレストは、ランダムサンプリングされた教師データによって学習した多数の決定木を用いるため、汎用性の高い結果が得られる。最後に、算出した重要度ランクをもとに上位20種の代謝物を選択し、OPLS-DA(Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis)により群間を判別するモデルの検討及び本手法の有効性を検証した。OPLS-DAは、変数間に多重共線性があっても適用できるため、代謝物間に相関がある場合が多いメタボローム解析に適している。

(2) 解析フローに従ってLC/MSによる網羅的解析を行い、胆道がん手術前後で有意に増減して

いる尿中代謝物を決定する。

#### 4. 研究成果

主成分分析は、相関のある多数の変数から、相関のない少数で全体のばらつきをよく表す主成分を合成する、多変量データの次元削減法である。Fig. 1 に全代謝物 1524 種を用いた主成分分析 (Principal Component Analysis :

PCA) の結果を示す。図中の 62 点は各検体を表し、切除術前の腫瘍が有る状態 (pre-ope), 切除術後 2 週間 (post-ope1), 切除術後 4 週間 (post-ope2) の 3 群で分けて表記している。図から、術前群が右上、術後群が左下と明確に区分できていることがわかる。さらに、術後 4 週間が術前術後の境界付近にプロットされている一方、術後 2 週間は左下広範囲に散布している。これは、全代謝物を用いた解析であるため、術後 2 週間は腫瘍有無だけでなく切除術の影響も含んでおり、多様性が高いことを示唆している。従って、以降の教師あり解析では、腫瘍有無に直接関連する代謝物と、切除術からの回復に関連する代謝物等の切り分けの対処が必要となる。

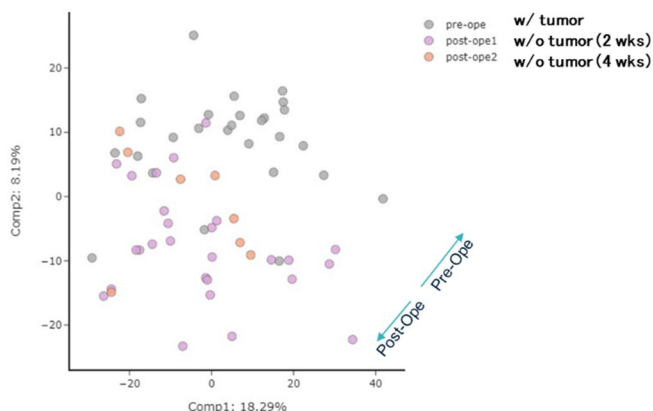


Fig 1 PCA Score Plots

Table 1 は対応のある T 検定 (Matched pairs t-test) の結果である。対応ありの検定は個人毎の時系列変動量として解析するため、個人差を排除し、切除術と時間経過による影響をより正しく扱うことができる。

Statistical Comparisons, Osmolality			
Matched Pairs t-test	Post Ope 1 Pre Ope	Post Ope 2 Pre Ope	Post Ope 2 Post Ope 1
Total biochemicals $p \leq 0.05$	494	113	182
Biochemicals ( $\uparrow \downarrow$ )	288   206	75   38	136   46
Total biochemicals $0.05 < p < 0.10$	115	114	150
Biochemicals ( $\uparrow \downarrow$ )	67   48	73   41	117   33

Table 1. Matched pairs t-tests

有意水準 5%とした場合 ( $p = 0.05$ ), 術前 (pre-ope) と術後 2 週間 (post-ope1) では、494 の代謝物が有意差ありであるのに対し、術前と術後 4 週間 (post-ope2) では 113 代謝物に減少する。前述の主成分分析の結果と同様、術後 2 週間では腫瘍有無と直接関連のない代謝物も数多く含まれていると推定されるため、術後 4 週間では有意差のある 113 代謝物を腫瘍有無と直接関係があると見なして、以降の解析を進めた。

抽出した 113 代謝物から、欠損値が多いものや外因性代謝物などを除外すると、86 代謝物になる。この 86 代謝物に対し、術前術後の 2 群でランダムフォレスト解析 (Random Forest Analysis : RFA) を実施することで、腫瘍有無を判別するためのランク付けを行った。ここでは、術後として 2 週間と 4 週間の双方を含めた。これは、術後 4 週間が 8 検体と N が少ないためである。結果を Table 2

Rank	Chemical name	Super pathway	Sub pathway
1	Metabolite A	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
2	Metabolite B	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
3	Metabolite C	Unidentified	-
4	Metabolite D	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
5	Metabolite E	Peptide	Dipeptide Derivative
6	Metabolite F	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism
7	Metabolite G	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
8	Metabolite H	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
9	Metabolite I	Amino Acid	Lysine Metabolism
10	Metabolite J	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism
11	Metabolite K	Peptide	Dipeptide
12	Metabolite L	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
13	Metabolite M	Unidentified	-
14	Metabolite N	Unidentified	-
15	Metabolite O	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
16	Metabolite P	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
17	Metabolite Q	Peptide	Dipeptide
18	Metabolite R	Peptide	Dipeptide
19	Metabolite S	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
20	Metabolite T	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeogenesis, and Pyruvate Metabolism

Table 2. RFA - Pre vs. Post1+Post2 (post2 markers = 86 compounds)

に示す。重要度上位に胆汁酸代謝物が含まれている。胆道がんの最も多い症状のひとつに黄疸があり、胆汁中のビリルビンが血液中に増加することで目や皮膚が黄色くなり、尿も褐色となる。これはがんが胆汁の通り道を閉塞し、胆汁を流れにくくするために起こる。従って、これら胆汁酸代謝物は、がんによる副次的な代謝変動の可能性が高い。今後、ステージ情報などのより詳細

な疾患情報との関連を解析する必要がある。

抽出した上位 20 マーカを用いた場合の OPLS 判別分析の結果を Fig.2~4 に示す。術前 (pre-ope) 27 例, 術後 4 週間 (post-ope2) 8 例を教師データとして判別モデルを作成し, 術後 2 週間 (post-ope1) 27 例をテストデータとしてモデルの汎用性を検証した。Fig. 2 は教師データに対する判別解析結果 (スコアプロット) であり, OPLS 判別分析は群間を最も分離する軸が横軸となるように回転している。図中の楕円は, それぞれ, 黒が全データ, 赤と青が各群の

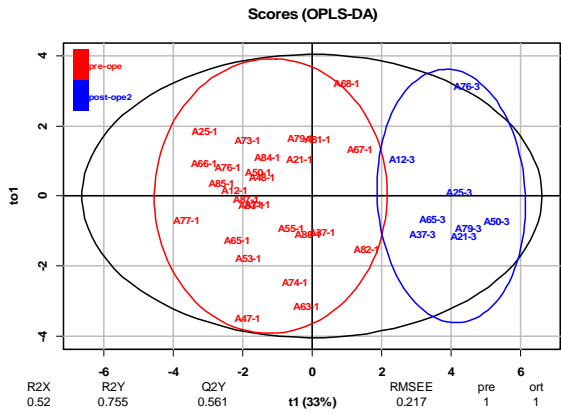


Fig. 2. OPLS-DA Pre vs. Post-ope2 (4wks)

赤と青が各群の 95%信頼区間を指す。赤の切除前群と青の切除後 4 週間群を明確に分離できた。Fig. 3

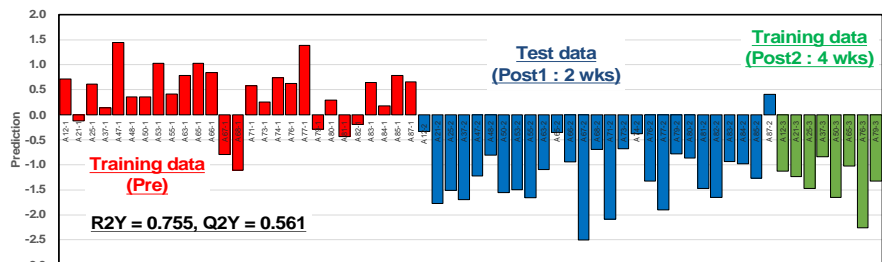


Fig. 3. Prediction of model1 : OPLS-DA Pre vs. Post-ope2 (4wks)

は, 判別指標を各

マーカー値に係数をかけて足し合わせた予測値とし, テストデータも含めてプロットしたものである。がん (腫瘍がある) と判定する予測値の閾値を 0 とした場合, 感度は 77.8% (21/27), テスト結果は 27 検体中 26 検体で正答, テスト結果も含む 35 検体での特異度は 97.1% (34/35)であった。モデル構築に用いた教師データに対する当てはまり度を表す説明変数 R2Y は 0.755, 一個抜き交差検証 (Leave-one-out cross-validation) によるモデルの予測変数 Q2Y は 0.561 であった。一般的

に, R2Y は 0.65 以上あれば定量的予測が可能で, Q2Y は 0.5 以上あれば良好な予測モデルとされており, 良好なモデル性能が得られた。Fig. 4 は, 予測値の閾値を可変させて作成した ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve) であり, 全 62 データの AUC (Area Under the Curve) は 0.939 であった。AUC は 0 から 1 までの値をとり, 一般的に, 判別能がランダムの場合で 0.5, 0.7 以上が良好なモデル, 0.9 以上高精度とみなされ, 本結果により高精度な判別を実証できたと言える。

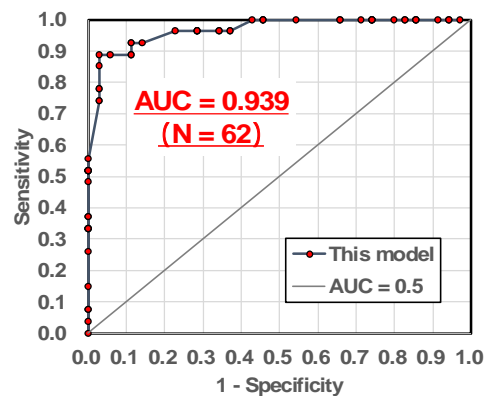


Fig. 4. ROC curve based on model1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 横田一樹、内田広夫、檜頭成、田井中貴久、城田千代栄、住田互、牧田智、天野日出、岡本眞宗、滝本愛太郎、安井昭洋、狩野陽子、石井宏樹
2. 発表標題 尿中腫瘍マーカー診断キットの開発
3. 学会等名 第36回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------