

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17643

研究課題名（和文）膵癌集学的治療のモニタリングに有用なリポドームマーカーの探索

研究課題名（英文）Research of lipidome markers for monitoring multidisciplinary treatment of pancreatic cancer

研究代表者

中川 暢彦（Nakagawa, Nobuhiko）

東京医科大学・医学部・臨床研究医

研究者番号：90866500

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）：膵癌症例血清中のエクソソーム由来脂質をリポドミクス解析し、新たな治療モニタリングマーカー抽出を試みた。健常者4例と膵癌患者4例の血清検体からエクソソームを抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）によりリポドミクス解析を施行した。脂質クラス解析において有意差を認めた候補脂質分子群について、膵癌治療介入前後での推移と再発傾向、術前血清検体の脂質マーカー含有量を用いた予後予測について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中のリポドームに着目し、ヒトの癌との関連を検討した研究は少数ながら存在する（Passos-Castilho AM, 2015, BMC cancer; Duscharla D, 2016, PLoS One; Kim HY, 2017, Sci Rep）。しかし癌治療関連バイオマーカーの報告研究は未だなく、集学的治療中の膵癌病勢モニタリングに脂質バイオマーカーを適用した本研究は、新発見のある研究と言える。

研究成果の概要（英文）： We tried to detect novel lipid monitoring markers for multimodally treated pancreatic cancer cases using patients' serum samples-originated lipidome data. Exosome extraction was performed from 4 pancreatic cancer cases and 4 healthy controls, and lipidome analysis was conducted by the LC-MS analyzer. We found some candidate lipid molecules and accessed their recurrence or prognosis predicting ability using multi-timepoint serum samples of additional cohort of pancreatic cancer cases.

研究分野：消化器外科

キーワード：リポドミクス 膵癌 病勢モニタリング

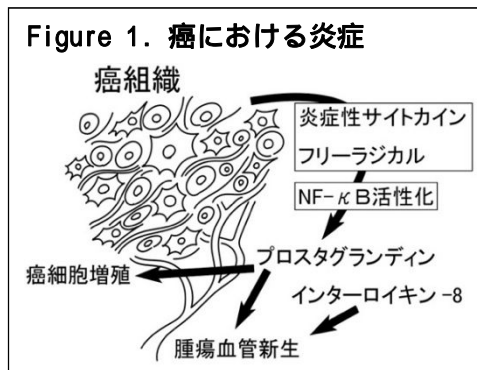
1. 研究開始当初の背景

< 膵癌治療の変遷と今日の課題 >

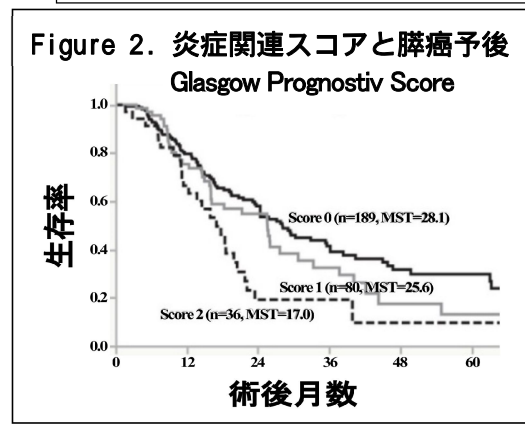
膵癌は5年生存率が未だ15%に満たない難治癌である。膵癌に対して唯一根治が望める治療は外科切除であるが、切除例の5年生存率も20-40%と充分とは言えず、局所治療としての手術だけでは膵癌の治療成績向上は不可能である。このような全身病としての膵癌に対し、最近では初診時の切除可能性分類に関わらず、全身化学療法・放射線療法・手術療法を用いた集学的治療が盛んに行われるようになっており、導入療法として化学療法を含む全身治療をまず行った上で根治手術実行の妥当性を判断し、個々の患者に最適と思われる治療戦略を立てることが主流となっている。現状では各治療の効果判定に腫瘍マーカー(CA19-9など)や画像診断(CT・MRIなど)が頻用されるが、癌の生物学的効果判定や予後と必ずしも関連しているとは言えず、集学的治療の効果判定に最適なバイオマーカーや臨床指標は未だ存在しない。膵癌は組織内の不均一性(heterogeneity)が強く、また、これまでの当教室での臨床経験から、膵癌の進展様式は局所進展タイプと遠隔転移タイプに二分される可能性があり、治療中にその後の進展形式や予後まで予想可能なバイオマーカーがあれば、個々の患者に最適な治療を提供可能となるのみならず、不要や過剰と思われる治療を回避できる可能性があり、今後の膵癌プレジジョン・メディシンの達成に大いに役立つと考えられる。

< 炎症と癌 >

HanahanとWeinbergは2011年にHall marks of cancer: The next generationの中で[1]癌によるエネルギー代謝異常、[2]免疫逃避、[3]腫瘍促進性の炎症、[4]ゲノム不安定性と遺伝子変異の4つを癌の特徴に加えている。この中で、炎症に癌と密接な関わりがあることは以前よりよく知られ、胃癌とピロリ菌との関係、肝細胞癌と慢性肝炎との関係、大腸癌と炎症性腸疾患との関係などが代表的である。炎症反応は本来、外来からの病原物質・病原生物や被傷害組織などの効率的な除去過程で必須のメカニズムである。炎症のプロセスではサイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどの炎症惹起性メディエーターが産生され、活性化した好中球はこれらの影響下に貪食作用を發揮する。その後はアポトーシスで生じた残骸がマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれ、炎症反応が消退して通常の生理的狀態に原状回復されるが、不必要な炎症反応の遷延は組織中微小環境における遺伝子不安定性や免疫応答不全を誘導し、腫瘍形成環境を構築する(Figure 1)。



このように炎症が癌発生の母地となるとともに、癌微小環境における癌から分泌される炎症性メディエーターはプロスタグランジンの産生を通して炎症細胞を癌微小環境に動員し、さらに炎症誘発性サイトカインなどの産生が誘導され、炎症反応の持続・亢進から癌の進展に有利な環境を生み出す。我々は過去の膵癌手術例のデータを用い、炎症指標に基づく予後スコアの一つである Glasgow Prognostic Score が膵癌患者の独立した予後因子となることを明らかにしており、膵癌患者の炎症状態がその病態を示す有力な指標となり得ることを明らかにしている (Figure 2 Yamada S, 2016, Medicine)。



< 炎症メディエーターとメタボロミクス >

メタボロミクス (metabolomics) は生体内において酵素などの代謝活動によって作り出された代謝物質 (メタボローム) を網羅的・包括的に捉える研究分野の一つであり、生命現象や病態解明において注目を浴びている。中でも、脂質に関するリピドミクスは代謝異常・免疫異常・炎症反応と関連した疾患のあらたなバイオマーカーや病態解明の糸口になり得るとして注目されている。脂質やその代謝物 (リピドーム) はタンパク質、糖質、核酸とともに生体の主要な構成成分であり、生体活動に必要なエネルギー源となる一方、プロスタグランジンやロイコトリエンと言った脂質メディエーターとしてシグナル伝達経路などにおいて

重要な役割を持つ。生体内の炎症反応惹起におけるシグナル伝達に関する脂質メディエーターが存在する一方で、生理的炎症収束過程において 3 系脂肪酸由来物質のリポキシン、レゾルビン、プロテクチンなどの抗炎症性脂質メディエーターが存在し、これらの作用で速やかな生理的状況の回復をもたらされる。したがって、脂質メディエーターは、非常に多様な生理機能に関わるとともに、生体内の生理的および病的な炎症状態を動的に反映する指標となり得ることから、膵癌によって惹起される炎症の状況を鋭敏に捉え、治療効果や予後の評価などに既存の腫瘍マーカーとは異なる観点から鋭敏な指標として有用な可能性がある。

< 血液中脂質マーカーの探索 >

膵癌に対する集学的治療において、治療効果の判定には主として [1]血液腫瘍マーカー (CEA、CA19-9、DUPAN-2、SPan-1 など)、[2]各種画像診断 (CT、MRI など) が頻用されている。これらは日常診療で広く普及しており、腫瘍マーカー値と画像による腫瘍形態の経時的変化の両者を総合して判定している。我々はこれまで多くの膵癌集学的治療を行ってきたが、導入治療から手術治療に移行するに当たり、後の腫瘍制御に重要な臨床指標として腫瘍マーカー (CA19-9) 正常化と画像的腫瘍縮小率であることを明らかにした。一方で、切除標本における顕微鏡的腫瘍縮小率と膵癌患者の予後の間には関連が乏しいことも判明し、腫瘍局所の評価のみならず、全身病として膵癌を評価することの重要性を再認識することとなった。さらに膵癌は胃癌や大腸癌などの管腔臓器と異なり、生検による組織採取が困難なため、血液等を用いた非侵襲的マーカーが切望されている。近年は腫瘍から血中に分泌される核酸をリキッドバイオプシーとして早期発見・病勢モニタリングに利用する試みもされており、サンプリングエラーのない画一性という観点でも血液等による検査の優位性があると考えている。

近年、生体内のタンパク質や脂質由来の微量代謝物を解析するメタボロミクスが注目されているが、その中でも脂質は今まで遺伝子にコードされず極めて微量である等の理由で比較的解析困難な対象とされてきた。最近解析手法の改良が進み、LC-MS、CE-MS 等による微量脂溶性分子の高分解定量解析が可能となり、臨床検体などの有限のサンプルから、網羅的解析が可能となっている。したがって、炎症反応において重要な役割を果たす炎症メディエーターを含むリポドーム解析を、臨床的に現実的な量の検体から解析することが可能であり、既存の腫瘍マーカーとは異なる観点のバイオマーカーとしてのリポドームマーカーを抽出することが可能との考えから本研究の発案となった。

2. 研究の目的

全身疾患とも言える膵癌の治療成績向上には、集学的治療が不可欠である。また、膵癌は解剖学的に生検が困難であり、集学的治療の経過中には非侵襲的なリキッドバイオプシーによる病勢の把握が理想的である。当教室ではこれまでに炎症は膵癌の再発や予後と密接に関わることを示してきた。慢性炎症は癌の発生に有利な遺伝子変化や免疫機能の変化を組織微小環境にもたらし、腫瘍から分泌される炎症性メディエーターによってさらなる腫瘍進展に有利な環境が醸成される。生体内の 4 大構成要素の一つである脂質代謝物 (リポドーム) のバイオマーカーとしての利用は最近の分離解析能の向上から注目を集めている。特に炎症反応を惹起する脂質メディエーターの血液検体における測定結果は膵癌の病勢を鋭敏に反映する可能性がある。

これまでのリポドームをめぐる研究では、ある種の疾患と血液中脂質との関係を示した研究は散見されるものの、特に膵癌の治療経過において、炎症メディエーターとしての脂質メディエーターに着目し、治療効果や予後との関連を解析した研究は認められない。一方で、脂質はゲノムにコードされず、微量かつ半減期が短いなどの理由で比較的困難な研究対象であったが、代謝産物分離法の改善により、リポドームにおいても高感度・高選択性の網羅的解析が可能となった。本研究ではこのリポドミクスを用い、日常診療において汎用される腫瘍マーカーとは異なる観点から新たな治療モニタリングのためのバイオマーカーとしての脂質メディエーターに焦点をおいた。

本研究では集学的治療の各経過で採取されたマルチタイムポイント採血検体を用い、血液リポドミクス解析を用いた包括的アプローチで臨床的に有用なリポドームマーカーを見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、膵癌集学的治療の各経過で採取されたマルチタイムポイント採血検体を用い、リポドミクス解析を行う。経時的な脂質メディエーターの変化を解析することで疾患の病勢と関連したリポドームを見いだす。さらに、有望な分子に関してパネル化し、病勢把握や予後と関連したリポドームマーカーパネルを開発する。これにより、既存の腫瘍マーカーとの組み合わせ等も検討した上で膵癌集学的治療のモニタリングに有用な非侵襲的リポドームマーカーを見いだす。

(1) 膵癌患者の血液リポドミクス解析

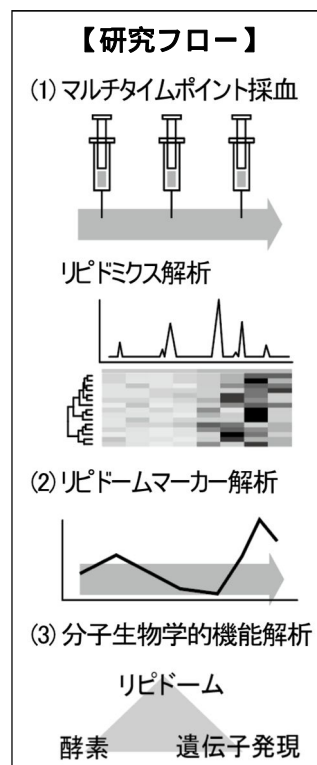
まず、膵癌患者における血液リポドミクス解析を行い、炎症性メディエーターを中心としたリポドームの網羅的定量解析を行う。この際、全身化学療法あるいは化学放射線療法を行っている患者の治療経過中に採取されたマルチタイムポイント検体を用いて解析を行う。さらに手術症例については術後経過におけるマルチタイムポイント検体も同様に解析に用いる。またマルチタイムポイント検体については既に患者の同意のもと収集・保管され、ライブラリ化されている。

(2) 膵癌治療モニタリングに有用なリポドームマーカー解析

リポドミクス解析の結果、各患者の治療時系列におけるリポドーム解析結果を比較し、治療経過および病勢の進行・再発などで変化のあるリポドームを抽出する。さらに抽出されたリポドームの中で治療前の数値から再発や予後を反映すると考えられる分子について統計学的手法により検証し、再発および予後予測マーカーとしての臨床応用可能性を検討する。

(3) 膵癌細胞株における膵癌関連脂質メディエーターの機能解析

(1)の結果、特に重要と考えられるリポドームについて、膵癌細胞株を用いて培養液に混合することで細胞株の増殖能・浸潤能の変化および、抗アポトーシス能の変化などを検討する。



4. 研究成果

健常者 4 例と膵癌患者 4 例の術前化学療法開始前の血清検体からアフィニティ法にて exosome を抽出し (Nanosight を用いて採取を確認済) 液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) によりリポドーム解析を施行した結果、健常者と膵癌患者を比較して、脂質 A および 脂質 B は、膵癌担癌症例で低値をとる傾向を認めた。

膵癌切除 4 症例について、周術期のマルチタイムポイント (術前化学療法前・術前・術後) で採取した血清検体から exosome を抽出し、上記脂質クラス A、B について測定した。脂質 A、B とも、術後に含有量の回復上昇を認めた。また、術後再発の無い 2 症例と早期再発 2 症例を比較すると、術後早期再発症例では脂質 A、B について、術後の含有量の回復傾向がわずかであった。

以上より、脂質 A、B について、膵癌症例の病勢を反映するバイオマーカーとしての挙動が確認できたため、マルチタイムポイント検体症例数を切除膵癌 53 例に増やして脂質 A、B の定量値推移を検討した。その結果、53 例のうちの無再発症例 19 例と再発症例 34 症例について脂質 A で明確な差を認め、術後無再発生存率の検討でも術前脂質 A 高値群が有意に良好であることがわかった (予後更新により $P=0.007$ に)。

脂質 A は抗炎症性脂質メディエーターの一種であり、その抗炎症作用が制癌効果に相關すると推定されたため、53 症例の血液検体における脂質 A 定量値を、同時期の腫瘍マーカーや各種栄養指標、炎症マーカーとの相関を調べたが、有意に相関する代替指標は認められなかった。

また脂質 A は、悪性黒色腫において腫瘍細胞の接着能を低下させることで血行性転移を抑制することが報告されており、膵癌においても腫瘍進行を抑制する可能性が示唆されたため、膵癌細胞株を用いた *in vitro* 実験を施行した。その結果、複数の脂質 A 濃度の散布により、コントロール群において有意な細胞増殖抑制効果を認めた。

以上より、膵癌血液検体を用いた脂質網羅解析により抽出した脂質 A が、膵癌病勢モニタリングマーカーとして機能し、膵癌細胞増殖抑制効果を持つ脂質であることが示唆された。これらは膵癌領域における新知見と考えられるため、傍証を加えて論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------