

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860504

研究課題名(和文) 血清メタボロミクスを用いた膵がんスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Serum Metabolomics as a Screening Method for Pancreatic Cancer

研究代表者

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90709669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液メタボロミクスを用いた膵がん診断手法を開発し検証した。GC/MSとLC/MSを組み合わせることで、約600成分を測定対象とし、うち分析再現性が良好な236成分を評価対象とした。膵がん患者と健常者の各15検体を比較すると、75成分に有意差が認められ、多重ロジスティック回帰分析によってMannoseと1,5-Anhydro-D-glucitolを組み合わせたモデルは、ROC-AUC0.951、感度100%、特異度80%であった。このモデルを別の膵がん44検体、健常者44検体に当てて検証すると、感度72.7%、特異度84.1%であり、膵がん検出能に優れていることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to discover and validate the diagnostic method using blood metabolomics. We discovered the multi-platform metabolomics system by combining the GC/MS and the LC/MS. We could measure over 600 metabolites at once by this system. Serum metabolomics using our multi-platform system showed significant change in 75 metabolites of serum in training set analysis including 14 pancreatic cancer patients and 14 controls. The diagnostic model was constructed by multivariate analysis in training set. Its sensitivity and specificity were 100% and 80%, respectively, in training set. In validation set including 44 patients and 44 controls, the sensitivity and specificity were 72.7% and 84.1%, respectively. We concluded that the serum metabolomics model might have high possibility to be a useful diagnostic method for pancreatic cancer.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボロミクス バイオマーカー 血液 膵がん

1. 研究開始当初の背景

膵がん患者の予後を向上させるためには根治を目指せる段階での早期発見が不可欠であるが、有効なスクリーニング法は未だ確立しておらず、膵がん患者の約 80% は根治が期待できない進行期になってからようやく発見されているのが実状である。

遺伝子や蛋白質と比べると、メタボロームは生体の状態をより鋭敏かつ直接的に反映すると考えられていることから、メタボロミクスはバイオマーカー探索研究における有用なツールとして期待されており、近年、様々な分野で成果を挙げつつある。

研究代表者は、これまで行ってきた研究において、血清メタボロミクスを用いた診断手法が膵がんの早期発見や慢性膵炎との鑑別に有用である可能性を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究は、血液メタボロミクスを用いて膵がんを早期に発見するためのスクリーニング法を開発することを主な目的とする。血液メタボロミクスを用いた診断手法の精度と安定性を高め、実用化に向けてその有用性をより厳密に検証する。

3. 研究の方法

(1) 分析系の開発

まず、ガスクロマトグラフィ質量分析 (GC/MS) と液体クロマトグラフィ質量分析 (LC/MS) を統合する。代謝物の抽出はクロロホルム/メタノール/水を用いた方法で行う。上層から抽出した水溶性代謝物は、誘導体化した後、GC/MS によって分析する。これまでの研究や文献的検索によって特に重要と考えられる代謝物については、より選択性が高く高分解能をもつ多重反応モニタリング法 (MRM) による GC/MS/MS を適用する。脂溶性代謝物は LC/MS/MS によって分析を行う。得られた測定データを単変量解析と多変量解析の各々で統計解析するまでの手法をプロトコール化し、実験手技や統計解析手法の違いによるバイアスを最小化することで検証を厳密なものとする。

(2) バイアスの少ない検体収集

解析系の構築と同時に、統一した手法によって多施設から多検体を収集する。研究代表者はこれまでの検討において、特に代謝物分析においては、検体採取時点の操作条件が結果に鋭敏に反映することという知見を得ていることから、安定的に測定でき、かつ、実用化の妨げにならない方法を開発し、すべての検体採取において一定化することで、バイアスを最小化する。また、年齢、性別、体重、喫煙、飲酒、薬剤などの背景情報を統一した基準で細かく収集し、統計的に詳細な検討が実施できる体制を整える。

(3) 代謝プロファイリングとモデル構築

次に、膵がん患者における血清・血漿メタボロミクスによる包括的代謝プロファイリ

ングを行う。膵がん患者と健常者に関しては、それぞれ 50 検体以上を分析し、評価を行う。代謝プロファイルが明らかになれば、その成果を利用した膵がん検出法の構築を行う。特に単一代謝物での診断が困難な場合には、多変量解析を用いて複数代謝物を指標にした診断モデルを作成する。作成したモデルに対しては、別施設で収集し、ブラインド化された検体を用いることで検証を行い、感度・特異度・偽陽性率・偽陰性率を算出し、従来の腫瘍マーカーとの比較を加えることで、有用性や課題を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 分析系の開発

まず、LC/MS による脂質・陽イオン性代謝物・陰イオン性代謝物の 3 系統の測定系について、検体前処理の操作手順を決定し、データベースを構築した。これによって、解析対象となる化合物数は、これまでの水溶性代謝物の約 100 種から、脂質約 300 種、陽イオン性代謝物約 100 種、陰イオン性代謝物約 100 種を加えた約 600 種となった。この成果によって、例えば脂質メディエーターのように生体中で重要なはたらきに関係する脂溶性物質を測定することや、代謝経路への連続したマッピングを行うことが可能となり、病態解析も含めたより詳細な検討が可能となった。

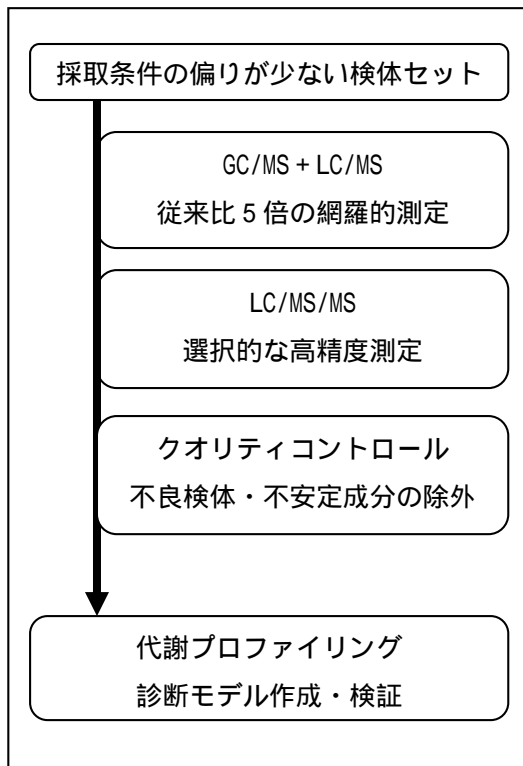
さらに、これまでに行ってきた網羅的な半定量解析に加えて、膵がんにおける有力なバイオマーカー候補としてこれまでに見出した 1,5-Anhydro-D-glucitol、Histidine、Inositol など 16 成分に対しては、より選択性と定量性の高い多重反応モニタリング法 (MRM) を導入した。これによって、重要度の高い特定の物質に対しては、より精度と安定性の高い測定によって検証を行うことが可能となった。

また、新たにクオリティコントロール法 (QC) を開発し、分析に導入した。具体的には、QC 用の血漿を実検体測定の間定期的に挿入することによって、QC 間で定義される一つの分析区画ごとに全体としての妥当性を評価し、さらに、全 QC 結果から代謝物ごとの再現性を評価することで、実験操作が不良と思われる検体や再現性の悪い成分を評価から除外することとした。この QC 導入によって、実用化の際に必要なと想定される長期にわたる大量検体処理においても、安定的に信頼性の高い結果を報告することが可能となった。

(2) バイアスの少ない検体収集

前向きに行う検体の収集においては、採取条件を絶食下の午前中に限定し、採血直後から室温に晒すことなく 4 前後で一定に管理し、遠心分離を 4・3000 回転/分・15 分、保存はマイナス 80 凍結と規定することで、採取条件が均一に管理された血漿を収集した。さらに、この方法によって採取された血液は、遠心分離するまで 8 時間経過しても分

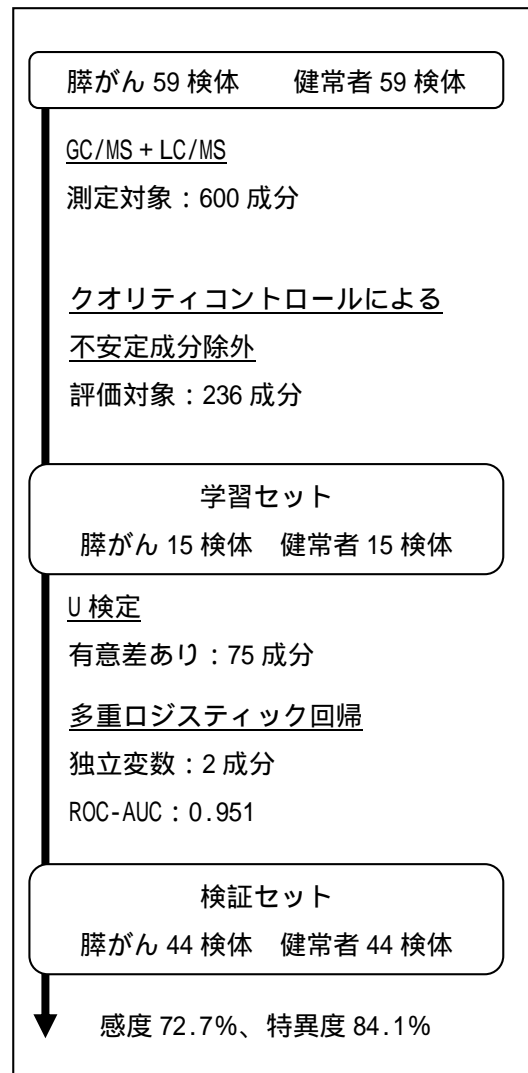
析対象となるほとんどの成分濃度が安定的であることを確認した。また、検体の背景情報は、基本的な項目を統一したフォーマットに入力していくこととした。このようなプロトコルに従い、2年間の研究期間中に、膵疾患患者血漿を約80検体と健常者血漿を約800検体収集し、さらに継続中である。一方、既存の検体に関しても、今回策定した採取条件に準じた条件で採取されている検体を選択することによって、バイアスを最小化し、純粋な疾患要因によるメタボロームの差を検出しやすい体制を整えた。



(3) 代謝プロファイリングとモデル構築

前項の方法で収集した検体から、膵がん患者血清59検体と健常者血清59検体を用いてメタボロームによる包括的代謝プロファイリング、および、それを用いた診断能の評価を右図の如く行った。分析では、GC/MSによる水溶性代謝物分析にLC/MSによる脂質分析・陽イオン性代謝物分析・陰イオン性代謝物分析を組み合わせることで、従来比で約5倍となる約600成分を対象とすることに成功し、分析を実施した。また、分析の信頼性を担保するため、今回新たにクオリティコントロール法(QC)を導入した。これによって、分析の再現性が良好な236成分を明らかにすることができ、これらの成分のみを評価対象として解析を進めた。学習セットとして膵がん患者15名と健常者15名の検体を使用し最初の解析を行った。2群の分析結果をU検定で比較検討すると、236成分中75成分に有意差が認められ、特に6成分ではROC曲線解析における曲線下面積値(ROC-AUC)が0.7以上であった。この結果は、これらのある代謝

物が膵がんの診断マーカーとなり得る可能性があることを示唆するものであった。しかし、単独で感度と特異度がともに80%を超える成分は存在せず、スクリーニングとしては感度も特異度も不十分と考えた。そこで、多成分を組み合わせた多変量モデルを作成することとした。多重ロジスティック回帰分析によってMannoseと1,5-Anhydro-D-glucitolを組み合わせた診断モデルを作成すると、ROC-AUCは0.951で、感度100%、特異度80%であった。この診断モデルを、学習セットとは別の独立した検証セットの膵がん44検体、健常者44検体に当てはめると、感度72.7%、特異度84.1%であった。検証セットにおけるCA19-9の感度は68.2%であったことから、今回の検証によって、網羅的血清メタボロームから得られた膵がん診断モデルは、従来の腫瘍マーカーと比べて、膵がんの検出能に優れていることがあらためて確認された。



メタボロームは、非常に鋭敏であるがゆえに通常の臨床や実験の環境下では不安定であることが次第に明らかになってきた。このことによって、実験結果の再現性に問題がみられる場合もあり、再現実験を克服したとしても、実用化に求められる安定的な運用には

課題が残ることが想定される。今回の研究成果のもつ意義は、メタボロミクスによる疾患検出の可能性をあらためて確認したことのみならず、今後も継続して利用可能で実用化にも応用可能な、検体採取から結果報告までの包括統一システムを整備したことにある。今後、今回の成果を踏まえて評価対象とする成分をさらに取捨選択し、前向きに収集した血漿検体の解析や、他施設で集められブラインド化された検体の解析などを行う。また、今回の研究期間中に収集した膵がん以外の膵疾患や他臓器がんの検体に関しては、期間中に十分な解析を行うことができなかったため、今後、解析を実施し、周辺データを明らかにしていく。このような実用化に必要な客観的な証拠を蓄積していくにあたり、今回開発したシステムを継続的に活用できるということは、本研究期間における重要な成果の一つである。既に前向き収集検体の分析には着手しており、膵がん患者の予後を改善することを最終的な目標として、今後も引き続き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と実用化に取り組む。

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3件)

1. 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. *Biomark Med.* 2016 May 12. 査読あり
<http://www.futuremedicine.com/loi/bmm>

2. Fujiwara Y, Kobayashi T, Chayahara N, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Mukohara T, Nishiumi S, Azuma T, Yoshida M, Minami H. Metabolomics evaluation of serum markers for cachexia and their intra-day variation in patients with advanced pancreatic cancer. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e113259. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0113259.

3. Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, Matsubara A, Azuma T, Yoshida M. Metabolomics for biomarker discovery in gastroenterological cancer. *Metabolites.* 2014 Jul 7;4(3):547-71. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0113259.

[学会発表](計5件)

1. 小林 隆、血清メタボロミクスによる早期大腸がんスクリーニングシステムの開発、JDDW2015 第57回日本消化器病学会大会、2015年10月9日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

2. 小林 隆、微量の血液からのメタボロミクスによる疾患診断、メディカルジャパン2015 大阪、2015年2月5日、インテックス大阪(大阪府・大阪市)

3. 小林 隆、血清メタボローム解析による膵癌スクリーニング法の有用性、JDDW2014 第56回日本消化器病学会大会、2014年10月25日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

4. 小林 隆、血清メタボロミクスによる新規バイオマーカーの開発、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

5. 小林 隆、血清メタボロミクスによる膵癌スクリーニング法の検討、第45回日本膵臓学会大会、2014年7月11日、福岡国際会議場(福岡県・北九州市)

[図書](計1件)

1. 酒井 新、西海 信、小林 隆、東 健、吉田 優、医学書院、臨床検査メタボロミクスによる癌診断の新たな展開、2016年、6頁

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)
神戸大学大学院・医学研究科・学術研究員
研究者番号：90709669

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：