

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860532

研究課題名(和文) 膵液におけるメタボローム解析を用いたIPMN症例の悪性度の解明

研究課題名(英文) Can metabolome analysis of pancreatic juice of IPMN offer clinical impact?

研究代表者

小倉 健(Ogura, Takeshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10633331

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)：膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)における悪性度を解明するため腫瘍が産生する粘液に着目した、最終的な代謝産物を同定し、癌、非癌による相違を明らかにすることを目的とし膵液のメタボローム解析を行なった。

最終的に悪性で204成分、良性で286成分まで絞り込まれたが、これ以上の同定は不能であった。理由として保存膵液の状態や、個体差による影響が強いと考えられ、さらに症例数を増やし絞り込む必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inarticulate papillary mucinus neoplasm (IPMN), bad, a degree, to elucidate it, a tumor identified last metabolic product which aimed at produced viscous liquid, had to make the difference by cancer and non-cancer clear for its object and did a metabolome analysis of a pancreatic juice.

It was bad and was narrowed down to 286 ingredients by 204 ingredients and benignancy finally, but any more distinction was impossible. I could think the situation of the preservation pancreatic juice and influence by the individual difference were strong as a reason, and could think it was necessary to increase more number of cases and narrow down.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵管内乳頭粘液性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

多く存在する膵腫瘍のうち、膵癌は極めて予後不良である。よって膵腫瘍を正しく鑑別診断することは極めて重要であり、我々は超音波内視鏡下穿刺吸引法(EUS-FNA)検体を用いた K-ras 遺伝子解析により、より膵癌の診断能の向上が得られたことを報告した(Gastrointest Endosc 75;769-774:2012)。さらには K-ras 遺伝子変異の有無、subtype によって予後が異なることも報告した(J Gastroenterol In press)。

しかし、膵癌の治療に関しては、決定的に予後を改善する方法がなく、現状では、膵癌以外の膵腫瘍を正しく診断し、適切な治療を行っていくことが重要である。

一方、粘液産生を特徴とする IPMN は、過形性から腺腫、浸潤癌といったように、幅広い病理組織学的なスペクトラムを示す膵腫瘍である。根治的外科切除がなされれば予後は良好であるが、一般的には高齢者に好発する slow growing な腫瘍であるため、過大切除とならぬよう、その手術適応は慎重になされるべきであり、術前の悪性度を予測し、適切な時期に切除を行うことが求められている。

このような背景から、2006年、2012年に国際膵臓学会ワーキンググループにより IPMN/MCN 国際診療ガイドラインが出版された (Pancreatology 2006;6:17-32) (Pancreatology 2012;12:183-197)。

これにより、その取り扱いについての一応の指針が示された。すなわち、分枝型 IPMN では、嚢胞型が 30mm 以上、主膵管径が 6mm 以上、結節の存在、有症状、膵液細胞診が陽性の症例、主膵管型 IPMN は基本的に全例手術適応とされた。しかしながら、ガイドライン作成の根拠は外科的切除例を基とした後ろ向き検討が殆どであり、加えてその後の更なる症例の蓄積により、このガイドラインでは感度は高いが、特異度が低いといったような種々の問題点も指摘されている (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2009;16:353-358) (Am J Gastroenterol 2007;102:1759-1764)。IPMN の自然史や悪性度の予測因子を明らかにすべく、様々な検討がなされているが(Gut 2008;57:339-343) (Ann Surg 2010;34:2932-2938)、未だ一定の見解が得られていないのが現状で、その生物学的悪性度をより正確に予測できれば適切な手術適応が決定できると考えられる。

近年、膵腫瘍に対する EUS-FNA が広く普及し、特に膵癌においては、極めて高い感度と、低い偶発症から有用性が確立している。しかし、IPMN を代表とする膵嚢胞性腫瘍に対する EUS-FNA は、播種(J Gastroenterol Hepatol 18;1323-1324:2003)や、その正診度の低さから、有用性は確立していない(Am J Gastroenterol 102;2339-2349:2007)。よって、IPMN の術前悪性度診断においては、画像所見や、膵液を用いた何らかの悪性度予測因子の解析が急務である。

一方、ゲノム医学の発展は目覚ましく、様々な遺伝子解析がなされているが、それぞれの遺伝子は独立ではなく、複数互いに密接して関係していることから、遺伝子発現情報は複雑化する。このことが、単独の遺伝子解析のみでは、その生物学的悪性度に決定的な因子とならない原因の一つである。一方、メタボロームは細胞内で生成される代謝産物の総体を指し、生体反応の最終過程を担う低分子群と位置づけられる。よって代謝の全体像を捉えるメタボローム解析は、遺伝子発現・多型と表現型を結びつける重要な手がかりとなると考えられる (J Proteome Res 2;488-494:2003)。

IPMN においては、粘液を産生する腫瘍である以上、その生物学的悪性度の解明に、最終の代謝産物である粘液中に含まれる物質が重要な手がかりになると思われる。加えて、IPMN は、その産生する粘液により、しばしば膵液停滞による蛋白栓の形成や、膵管拡張を来し、加えて膵管内圧上昇による急性膵炎を発症することが知られている。このように、IPMN の産生する粘液の粘稠性も重要な因子となり得る可能性が考えられる。粘稠性に関しては、すでに我々も、既報にあるように、客観的尺度として、ヘキサミンが有用であることを報告してきた (日消会誌 1975;72:491-500、Gastroenterol Jpn 1981;16:623-626)。

2. 研究の目的

外科的切除がなされ、病理組織学的に悪性度の判明している症例の保存膵液を用い、ヘキサミンを含む糖蛋白を網羅的に解析(メタボローム解析)を行い、その悪性度との関連性を解明することを目的とした。本研究のテーマである、IPMN の産生する粘液中の糖蛋白を網羅的な解析により、IPMN の病理学的な悪性度、つまり、過形性、腺腫、上皮内癌、浸潤癌においての産生する糖蛋白の相違明らかにすること。

3. 研究の方法

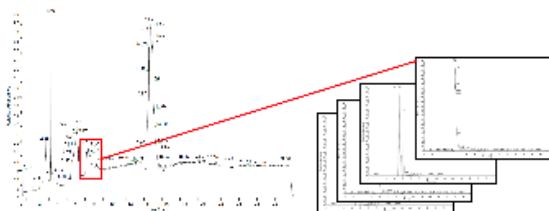
-80 で保存した膵液を、病理組織学的に過形性、腺腫、癌の3群に分類する。これらを用い、粘稠性の客観的指標であるヘキサミンを中心とした、糖蛋白をメタボローム解析を用い網羅的に解析を行う。メタボローム解析には、LC-MS(液体クロマトグラフィー; Liquid Chromatography、質量分析計; Mass Spectrometry)を用い、膵液サンプルが微量であることから、移動相を 50 μ L/min で制御することができ、分析に使用するサンプル量も 5 μ L 程度と微量サンプルの分析が可能な Nano LC Ultimate3000 を用いる。分析結果は TIS(Total ion current)クロマトグラムで得られ、効率的にピークの質量、測定時間及びピーク強度の情報を得るため Thermo の純正ソフトである SIEVE で解析を行う。データベースで物質推定を行い、統計解析の結果、

悪性度と最も関連する物質を同定する。物質の濃度を測定するため、理論上イオン化する物質すべての検出が可能な質量分析 (MS; Mass Spectrometry) を用いる。LC, MS に用いる装置は以下の如くである。



Ultimate300 LTO Orbitran XL

分析結果は TIS (Total ion current) クロマトグラムで得られる。TIC は個々の質量データが集積されたものであり、ある一部のピークに含まれる質量を表示させると、以下の図のように異なる質量チャート (MS クロマトグラム) が複数表示される。



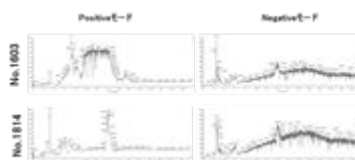
4. 研究成果

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) における悪性度を解明するため腫瘍が産生する粘液に着目し、最終的な代謝産物を同定し、癌、非癌による相違を明らかにすることを目的とし膵液のメタボローム解析を行なった。

保存膵液でまずヘキソサミン類の解析が可能かを行った。対象は、転移性膵腫瘍の保存膵液 (Control 膵液) および IPMN 浸潤癌の膵液 (IPMN 膵液) である。

まず、保存膵液の状態は良好で、ヘキソサミン類の解析および、メタボローム解析は十分に可能であった。

	総成分数	残り成分数	候補代謝物数
Positive	1,659	978	161 (203)
Negative	1,189	507	113 (257)



Positive モードの良性、悪性、両方において、保持時間 (Retention time; RT) に複数のピークが検出された。

特に良性では、R.T.13.5~15.0min に非常に強い強度のブロード状のピークが検出された。

一方、Negative モードでは、両サンプル共に R.T.1.5min~6.5min に複数のピークが検出された。

これらの TIC から単糖類の MS クロマトグラフィからピーク強度を算出した結果、両サンプルのヘキソサミン類および N-アセチルグルコサミンは不検出であった。

ヘキソースは $2.88E+04$ 、N-アセチルグルコサミンは $1.90E+04$ であった。ピークプロセッシングの結果、Positive モードの分析結果から 1659 成分が、Negative モードで 1189 成分が検出された。これらのうち、良性からは 361 成分、悪性からは 253 成分が検出された。

データベース検索の結果、良性では 361 成分中 352 成分に候補物質があり、悪性では 253 成分中 244 成分に候補物質が検出された。

最終的に悪性で 204 成分、良性で 286 成分まで絞り込まれたが、これ以上の同定は不能であった。理由として保存膵液の状態や、個体差による影響が強いと考えられ、さらに症例数を増やし絞り込む必要があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 小倉 健 (Takeshi Ogura)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：10633331