



## Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry

近藤, 靖之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5336

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005336>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）による  
大腸がんの血清脂肪酸プロファイリング

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻  
消化器内科学  
(指導教員: 東 健 教授)

近藤 靖之

## 背景

大腸がんは、我が国を含む多くの国々で死亡原因の上位を占める疾患のひとつとして挙げられる。便潜血反応検査、下部消化管内視鏡検査など、大腸がん早期発見のために有効な検査法はすでに複数確立されているが、依然として診断時に根治治療の適応となる症例は4割程度といわれており、さらに有効な早期診断法の開発が求められている。

脂肪の主な構成成分の一つである脂肪酸は、様々な疾患に重要な役割を果たしていることが知られており、大腸がんとの関連も指摘されているが、その詳細な機序についてはいまだ不明な点が多い。

本研究は、血清中の脂肪酸に着目して質量分析計を用いてメタボローム解析を行い、大腸がんの早期診断に有用なバイオマーカーの探索、さらには、大腸がんの病態生理の理解にとって一助となる知見を得ることを目的とした。

## 対象

本研究は、神戸大学大学院医学研究科の倫理委員会より承認を得た上で、本研究の参加に対する同意を得た大腸がん患者42名と、健常者8名を対象として施行された。

## 方法

早朝空腹時に採取された血液を、遠心分離（3000×g、10分間、4度）することにより血清を回収した。回収した血清はマイナス80度で保管された。解析時に融解した血清50μLに内部標準として生体内には通常存在しないC17:0（Sigma-Aldrich, MO, USA）を4μg加えた後、Fatty Acid Methylation kit、ならびに、Fatty Acid Methyl Ester Purification kit（Nacalai tesque）を用いてメチル化、精製を行った。検体はN<sub>2</sub>ガスで上澄みを揮発させた後、ヘキサン100μLに希釈した上で、GC/MSによる解析を行った。GC/MS解析は、GCMS-2010Plus（Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて行った。DB-5MSカラム（30m×0.25mmI.D.、フィルム厚0.25μm）を用いて、GCカラム温度は40度から320度まで毎分6度で変化させ、GC run timeは50分間とした。インレット温度は280度、またキャリガスであるヘリウムの流入速度は毎秒43cmとした。検体は1μLを1:5スプリットモードで注入した。マス解析条件は以下の通りである（ionization voltage: 70 eV, ion source temperature: 200°C; full scan mode in the 35 u-500 u mass range with a 0.20 s/scan velocity）。

データ解析はShimadzu GCMSsolution software Version 2.53 (Shimadzu Co.)、GC/MS Metabolite MassSpectral Database (Shimadzu Co.)を用いて行った。得られたピーク面積はC17:0のピーク面積を用いて補正した。得られたデータは各種統計学的な処理を行い評価した。PLS-DAはSIMCA-P+Software Version 12.0.1 (Umetrics, Umea, Sweden)を用いて行った。

## 結果

今回の評価対象は大腸がん群（男性25名、女性17名、平均年齢65.2±10.6、腺腫4名、

Stage I 3名、Stage II 8名、Stage III 7名、Stage IV 20名)、健常群(男性2名、女性6名、平均年齢57.3±9.30)であった。本研究では、LST(Laterally Spreading Tumor)病変4症例を、病理学的にはがんと診断されていないが潜在的な悪性度が高い病変として、大腸がん群として解析対象に含めた。

今回の解析条件では、長鎖脂肪酸、特に、超長鎖脂肪酸では解析時ピークのずれが著明となる傾向が認められた。そのため、まず検出可能と判断された脂肪酸については、それぞれの純物質を準備して、個別に同様の条件で解析を行い、同定されたピークが期待された脂肪酸のピークであることを確認した。これらの手順を踏まえ、最終的には今回の解析条件にて、27個の脂肪酸(C17:0を含む)の測定が可能であった。

これら27個の脂肪酸中、大腸がん群、健常群間の比較で統計学的に有意な発現量の差を認めた脂肪酸は9種類であった。大腸がん群で減少した脂肪酸は以下の通りである(fold induction): C14:0(×0.58)、C15:0(×0.73)、C18:3n-6(×0.48)、C18:0(×0.78)。また、大腸がん群で上昇した脂肪酸は以下の通りである(fold induction): C24:0(×1.34)、C25:0(×1.40)、C26:0(×1.33)、C28:0(×1.62)、C30:0(×1.51)。

次に、大腸がん群と健常群間の群間に有効な脂肪酸を同定するため、主成分分析(PLS-DA)を行い、26個の脂肪酸から大腸がん診断に有用な可能性がある脂肪酸としてC18:3n-6、C18:0、C20:0、C24:0、C28:0を同定した。

統いて、病期進行度と血清脂肪酸の変動について評価を行った。C18:3n-6は大腸がん群においては著明な変動が認められず、腺腫を含めた全大腸がん群において、健常群と比較して低値となる傾向を認めた。一方、C28:0は腺腫を含める全病期において大腸がん群は健常群と比較して有意に上昇を認めたが、大腸がん群内での変動は認められなかった。同様にC24:0も腺腫の段階から有意な挙動を示した。C24:0は大腸がん群全病期で健常群と比較して上昇している傾向を認めたが、大腸がん群内では、Stage II群は、腺腫群、Stage III群と比較して有意に減少していた。

今回の検討では病期進行度の他、病変の局在と血清脂肪酸の変動についても評価したが、これらの間では明らかな相関は認められなかった。

#### 考察

大腸がん早期診断に有用なバイオマーカーを見出すため、血清中の脂肪酸に着目して、大腸がん群42症例(腺腫4症例を含む)、健常群8症例を対象としてメタボローム解析を行い、我々が設定した解析条件において、27脂肪酸(内部標準C17:0を含む)が同定可能なことを確認した。大腸がん群で最も減少していた脂肪酸はC18:3n-6(fold induction ×0.48、 $p=0.013$ )、また、最も上昇していた脂肪酸はC28:0(fold induction ×1.62、 $p=0.002$ )であった。

PLS-DAによりバイオマーカーとして有用である可能性が示唆されたC18:3n-6は必須脂肪酸の一つであり、ω-6群の脂肪酸である。これまでにC18:3n-6は、さらにC18:3n-6より合成されるC20:4n-6脂肪酸は、がん組織で上昇していることが知られている。また、PGE2カスケードはがん組織では活性化していることも指摘されている。今回の研究では血清の

C18:3n-6は大腸がん群では減少していたが、C20:4n-6の減少は認められなかつた。この知見はがん組織ではC18:3n-6の、PGE2の上流であるC20:4n-6への変換が促進されている可能性を、さらには、大腸がん組織では脂肪酸の伸長反応に寄与する酵素が上昇している可能性を示唆している。

さらに、これまでにfatty acid synthase(FAS)はヒトの多くのがん組織で上昇していることが示されていたが、今回の検討では、FASにより合成されるC14:0、C16:0は血清中ではむしろ減少しており(C14:0 fold induction ×0.58、 $p=0.008$ 、C16:0 fold induction ×0.90、 $p=0.362$ )、がん組織中のFASの上昇が血清中の脂肪酸量の上昇と必ずしも一致しない可能性が示された。血液中の脂肪酸測定は、がん組織におけるFASの発現量、活性測定に比較して容易、安価でありさらにより安全性が高い。今後、血清中の脂肪酸とがん組織のFAS発現量、活性との関係を示すことにより、大腸がん早期発見のスクリーニング法としての血清脂肪酸プロファイリングの有効性はさらに支持されると考えられる。一方、血清中のC24:0、C25:0、C26:0、C28:0、C30:0は大腸がん群において有意に上昇していた(C24:0 fold induction ×1.34、 $p=0.020$ 、C25:0 fold induction ×1.40、 $p=0.046$ 、C26:0 fold induction ×1.33、 $p=0.041$ 、C28:0 fold induction ×1.62、 $p=0.002$ 、C30:0 fold induction ×1.51、 $p=0.022$ )。これら超長鎖脂肪酸の伸長反応には、elongation of very-chain fatty acid family(ELOVL)1-6などが必要とされている。近年、さらにELOVL7が同定されたが、このELOVL7をノックダウンした前立腺がん細胞株ではC20:0、C22:0、C24:0が減少することが知られている。今回の検討において、健常群と比較して大腸がん群では血清の超長鎖脂肪酸が上昇していることが確認され、大腸がんにおいてもこのような超長鎖脂肪酸の合成、あるいは、分解が重要である可能性が示唆された。

大腸がんの血清脂肪酸プロファイリングは2つの可能性を示していると考えられる。がんにより引き起こされたプロファイリングと、がんの誘因となるプロファイリングである。がんの誘因となるプロファイリングは、がんの早期から認められると考えられるが、今回の検討では、がんの早期から変動が認められたC18:3n-6、C24:0、C28:0がこれらに該当する。これらの脂肪酸の変動は、病理学的にはがんと認められていない腺腫群からすでに認められていたことは興味深い。このような変動が観察された脂肪酸は、大腸がんの高リスク群の絞り込みに有効な脂肪酸と考えられる。一方、病期に従い変動する脂肪酸は、病期診断や、病期の進行、あるいは、治療効果判定に有効であると考えられ、こうした多様な変動を包括した血清脂肪酸プロファイリングは、大腸がん診断や治療において有用な可能性があると考えられた。

今回の検討は、対象規模が小さいため、今後、さらに大規模な解析が必要であるが、本研究において血清脂肪酸プロファイリングは大腸がんの早期診断のために有用である可能性が、さらには、がん研究において新たな光明を照らす可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2209号	氏名	近藤 靖之
論文題目 Title of Dissertation	<p>Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry</p> <p>ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による大腸がんの血清脂肪酸プロファイリング</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 伊藤一貴 Chief Examiner</p> <p>副査 南博信 Vice-examiner</p> <p>副査 具 夏代 Vice-examiner</p>		

大腸癌は、我が国を含む多くの国々で死亡原因の上位を占める疾患のひとつであり、より有効な早期診断法の開発が求められている。発表者は、血清中の脂肪酸に着目し、質量分析計を用いたメタボローム解析を行い、大腸癌患者42名と、健常者8名を対象として新たなバイオマーカーの探索を行った。前処理の後、GC/MS 解析は、GCMS-2010Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて施行した。データ解析は Shimadzu GCMS solution software Version 2.53 (Shimadzu Co.)、GC/MS Metabolite Mass Spectral Database (Shimadzu Co.) を用いて行った。得られたデータから各種統計学的処理を行い、結果を評価した。今回は、まず検出可能と考えられた脂肪酸については、純物質を用い、個別に同様の条件で解析を行い、同定されたピークが期待された脂肪酸のピークであることを確認した。最終的には27種の脂肪酸の測定を可能とした。これら27個の脂肪酸中、大腸癌群で減少した脂肪酸はC14:0 ( $\times 0.58$ )、C15:0 ( $\times 0.73$ )、C18:3n-6 ( $\times 0.48$ )、C18:0 ( $\times 0.78$ )、また、大腸癌群で上昇した脂肪酸はC24:0 ( $\times 1.34$ )、C25:0 ( $\times 1.40$ )、C26:0 ( $\times 1.33$ )、C28:0 ( $\times 1.62$ )、C30:0 ( $\times 1.51$ )であった。次に、大腸癌群と健常群間の群間に有効な脂肪酸を同定するため、主成分分析(PLS-DA)を行い、26個の脂肪酸から大腸癌診断に有用な可能性がある脂肪酸としてC18:3n-6、C18:0、C20:0、C24:0、C28:0を同定した。病期進行度と血清脂肪酸の変動について評価の評価では、C18:3n-6は大腸癌群においては著明な変動はないが、全大腸癌群は健常群と比較して低値となる傾向を認めた。一方、C28:0は全病期において大腸癌群は有意に上昇を認めたが、大腸癌群内での変動は認められなかった。同様にC24:0も腺腫の段階から有意な挙動を示した。C24:0は大腸癌群全病期で健常群と比較して上昇している傾向を認めたが、大腸癌群内では、Stage II群は、腺腫群、Stage III群と比較して有意に減少していた。病変の局在と血清脂肪酸の変動については明らかな相関は認められなかった。今回の結果からは、メタボローム解析が早期大腸癌のスクリーニングに有用である可能性が考えられ、大腸癌群で最も減少していた脂肪酸はC18:3n-6 (fold induction  $\times 0.48$ , p=0.013)、また、最も上昇していた脂肪酸はC28:0 (fold induction  $\times 1.62$ , p=0.002)であった。また、癌組織ではC18:3n-6の、PGE2の上流であるC20:4n-6への変換が促進されている可能性を、さらには、大腸癌組織では脂肪酸の伸長反応に寄与する酵素が上昇している可能性も示唆された。今後、新たな手法の導入により、大腸癌早期発見のスクリーニング法として血清脂肪酸プロファイリングの有効性は高まってゆくことが期待される。本研究は従来ほとんど行われなかつた重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。