



# Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer

池田, 篤紀

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5448

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005448>

※ 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 metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer

血清メタボロミクスによる消化管がんの新規診断法

池田 篤紀 西海 信 篠原 正和 吉江 智郎 波多野 直哉 奥野 達哉  
馬場 健史 福崎 英一郎 竹縄 忠臣 東 健 吉田 優

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
消化器内科学

(指導教員： 東 健 教授)

池田 篤紀

### Abstract:

従来の血液腫瘍マーカーは早期の段階でがんを発見することには不適當で、実用的ではない。この研究において我々は食道・胃・結腸・直腸がんの血清を metabolomics という手法を使用して健常人との比較により代謝物質の周辺環境を明らかにし、より敏感で特異的なバイオマーカー候補を探索した。血清サンプルは、食道がん (n=15)、胃がん (n=11)、結腸直腸がん (n=12) 患者と健常人 (n=12) を使用した。バイオマーカー候補の探索に際して Principal Component Analysis (PCA) 手法を使用し、その結果の感度特異度を ROC 曲線により評価した。計 58 個の代謝物質のうち食道がん 9 代謝物、胃がん 5 代謝物、結腸直腸がん 12 代謝物質でそれぞれ、健常人との間で統計学的な有意変化がみられた。さらに malonic acid と L-serine 値の変化は主に食道がん、胃がんでは 3-hydroxypropionic acid と pyruvic acid 値の変化、そして結腸直腸がんでは L-alanine、glucuronic lactone、L-glutamine 値の変化が特異的であった。これらの感度・特異度は従来の血液腫瘍マーカーより良好であることが示唆された。今回の研究結果はがんの早期診断の一助となる可能性が考えられ今後の応用・発展の可能性が示唆された。

### Introduction

食道、胃、結腸直腸がんを含む消化悪性新生物に関連した死亡は現在の日本のがん死亡で最も多い。医学が発達した今日でもしばしば進行した状態で発見され治療が非常に難しい場合も多々みられる。また、これら消化管がんの大部分は進行した状態までは症状は現れない。これまで多くの研究が消化管がんの早期発見のためになされてきたが、その臨床応用はまだ十分な状態にあるとはいえない。

我々はメタボロミクス手法を使用して食道、胃、結腸・直腸がんの診断のた

めの新しいバイオマーカー候補の探索を試みた。これまでも消化管がんでメタボロミクス手法を利用した研究報告で少数例ながら報告はみられるが各消化管がんの特異的なバイオマーカー候補の検討はなされていない。我々はこの研究において食道、胃、結腸・直腸がん患者血清と健常人血清をガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) により評価し、より敏感な代謝バイオマーカーの候補を明らかにした。GC/MS は少量の検体で多量のサンプルを一時に高い再現性でもって測定し得ることができる。さらに他の測定装置 (例えば液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC/MS)) よりさらに大量のデータベースライブラリーを保有しており、大多数の代謝物質測定・管理の点で優れている。今回の研究において消化管がんの血清代謝物質の変化を評価するアプローチとしても有用であると考えられた。

## Materials and Methods

### Subjects and characteristics of the cancer patients

この研究は、神戸大学大学院医学研究科で倫理委員会の承認を得て施行された。すべての血清サンプルは 2008 年 4 月～2009 年 3 月に神戸大学病院に通院および入院加療中の対象患者から採取され、文書告知に基づく同意がすべて得られている。血清は食道がん (n=15)、胃がん (n=11)、結腸直腸がん (n=12) 患者と健常人 (n=12) からすべて早朝の空腹時に採取された。がん患者は組織学的に食道、胃、結腸・直腸にがんが証明された未治療のがんであり、また重篤な臓器障害、脳循環器系に虚血や梗塞、耐糖能異常、膠原病、肝炎、経口摂取不良および他がん並存例は除外された。健常人に関しても血液検査、内視鏡試験および CT やエコーなどの画像診断で異常がないことが証明されているとした。全血清は採取後迅速に遠心分離され血清は一括測定まで -80 度で凍結保存され、測定時に確立された方法で同様に血清の抽出法と誘導

体化がすべて同様に施行された。

### GC/MS analysis and Data processing

GCMS-QP2010plus (Shimadzu) の GC/MS ソフトウェア Version 2.53 (Shimadzu) を使いクロマトグラムのピークの探知と波形処理を実行した。低分子量代謝物質の識別は GC/MS Metabolite Mass Spectral Database (Shimadzu) を使用し定量評価を、実行するため各々の定量化されたイオンのピークの強度を内部標準物質 (MS-TFA) で補正した。

### Multiple classification analysis and statistics

測定したクロマトグラフ生データは LineUp Software (Informatrix) と Pirotrans Software (Informatrix) を使って処理。データは代謝物質プロファイリングで 3 次元マトリックスに編集しピーク強度を解析したものを Principle Component Analysis (PCA)、SIMCA-P+ Software Version 12.0.1 (Umetrics) により多変量解析を行った。統計的有意性は Steel-Dwass テストで P 値が 0.05 未満であることを有意とした。

### Results and Discussion

GC/MS によって測定・解析された 15 人の食道がん患者、11 人の胃がん患者、12 人の結腸直腸がん患者と 12 人の健常人の臨床的背景は表 1 にまとめられ、各消化管がんのステージは UICC 第 6 版で分類した。各消化管がん患者は手術、放射線療法または化学療法などいずれも治療前である。食道、胃、結腸・直腸がん患者および健常人血清より抽出し測定された TIC クロマトグラムは図 1 に示される。クロマトグラムから PCA 解析を用いて得られた食道がん (黒)、胃がん (緑)、結腸・直腸がん (青) 患者と健常人 (赤) 間の違いが 3 次元で示され、群間の変化が確認された。代謝物質プロファイリングを実行し 58 の代謝物質が明らかになった (表 2)。58 の代謝物質の

うち食道がん患者で9個、胃がん患者で5個、結腸・直腸がん患者で12個の有意な変化が確認され、さらに malonic acid と L-serine 値の変化は主に食道がん、胃がんでは 3-hydroxypropionic acid と pyruvic acid 値の変化、そして結腸直腸がんでは L-alanine、glucuronic lactone、L-glutamine 値の変化が特異的であり各消化管がんのバイオマーカー候補が示された。そして得られた候補の代謝物の感度と特異度を ROC 曲線により評価した。食道がんでは malonic acid は 80%と 59.2%の感度と特異度であり、L-serine は 81.3%と 40.1%の感度と特異度を示した。胃がんでは 3-hydroxypropionic acid の感度と特異度は 84.6%と 71.4%で pyruvic acid の感度と特異度は 70%と 90.9%であった。結腸・直腸がんでは L-alanine の感度と特異度が 54.5%と 91.6%、glucuronic lactone は 75%と 75%の感度と特異度、L-glutamine は、81.8%と 66.7%の感度と特異度であった。これらの感度・特異度は現在頻用している実臨床の各種癌マーカーと遜色ない結果であった。

がん細胞をとりまく慢性低酸素環境でがん細胞は TCA 回路よりも解糖を介した酸化的リン酸化反応によりエネルギーを獲得していることが報告されている (Warburg 効果)。我々の研究において TCA 回路に関与するさまざまな代謝物質の血清変化が、食道、胃、結腸・直腸がん患者でも確認された。これらのさらなる詳細な検討により TCA 回路以外のがん細胞増殖時のエネルギー獲得における代謝物の変化が明らかになる可能性がある。

また発がんの母地には影響することも考慮される。慢性炎症と発癌の関連はこれまでさまざまな研究で証明され、とくにいろいろな炎症性細胞、サイトカインやケモカインが発がんに関係するとされる。結腸・直腸の慢性炎症状態である炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎 UC やクローン病 CD）では炎症経過中に結腸・直腸がんが高頻

度に生じることが報告されている (Gupta ら、2007)。また UC 活動性患者の血清を用い metabolomics (GC/MS) にてフマル酸濃度が健常人と比較し UC 患者血清で有意に上昇し、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸の血清濃度は CD 患者で有意に増加するとの報告がある (Ooi ら、2011)。腸管炎症で代謝物質に変化のみられたフマル酸、リンゴ酸とコハク酸が今回の結腸・直腸がん患者血清ではいずれも変化を認めないことより、がんの病態に係る代謝物変化は腸管慢性炎症状態の代謝変化とは異なる可能性が推察された。

また今回得られた結果より各消化管がんの早期診断に応用できる可能性が示唆された。健常人との比較および消化管がんのステージ間での検討を行い各消化管がんの特異的な代謝物質の変化する傾向が示された。(supplementary data)

今回の我々の研究は食道・胃・結腸直腸がん患者の血清を使用し低分子量代謝物質の評価を行った最初の報告である。今回解析されたサンプル数は少数例であり大規模数での validation の検討を行う必要がある。本研究の調査結果に基づき低分子量の代謝物質の血清変化がさらなる各消化管がんの病因・病態の解明に結びつき、さらにメタボロミクス手法ががんの早期診断として有効である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2243 号	氏 名	池田 篤紀
論文題目 Title of Dissertation	血清メタボロミクスによる消化管がんの新規診断法 Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer		
審査委員 Examiner	主 査 南 博 信 印 Chief Examiner 副 査 崎 尚 Vice-examiner 副 査 澤 藤 智 雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

従来の血液腫瘍マーカーは早期の段階でがんを発見するためには不適當で、早期診断には実用的でない。この研究では食道・胃・結腸・直腸がんの患者血清をメタボロミクスの手法を使用して健康人の血清と比較することにより代謝物質を網羅的に解析することにより、より敏感でがんの特異的な代謝物質候補を探索した。メタボロミクスでは微量の血液(50 $\mu$ L以下)で同時に多くの代謝物が検出可能であり、がん特異的な代謝物変化によるプロファイリング診断が可能であるという特徴を有している。しかし、これまでにメタボロミクス手法により血清を使用して消化管がん、とくに食道・胃・結腸・直腸がんの特異的な代謝物質やその周辺環境を網羅的に解析し同定した報告はない。

本研究では食道がん(n=15)、胃がん(n=11)、結腸直腸がん(n=12)患者と健康人(n=12)より同意を得て、食前空腹時に採血し血清をGCMS(ガスクロマトグラフ)により測定した。候補物質の網羅的探索に際しては多変量解析のひとつであるPrincipal Component Analysis(主成分分析)手法を使用し、その結果の感度、特異度をROC曲線により評価した。測定され得た計58個の代謝物質のうち食道がん9代謝物、胃がん5代謝物、結腸直腸がん12代謝物質でそれぞれ、健康人との間で統計学的な有意変化がみられた。さらにmalonic acidとL-serine値の変化は主に食道がん、胃がんでは3-hydroxypropionic acidとpyruvic acid値の変化、そして結腸直腸がんではL-alanine、glucuronic lactone、L-glutamine値の変化が特異的であった。これらの感度・特異度は従来の血液腫瘍マーカーより良好であることが示唆された。Validation setとして異なる健康人(n=123)と結腸直腸がん(n=119)の血清を用いた検討でglucuronic lactoneがstage毎(stage 0-4)に有意に上昇していた。

今後測定方法のvalidationと検体のfeasibilityを厳格に行い、multi cohortで検討するなど信頼性の高い代謝物情報を確立できるシステムを構築する必要があるが、今回の成果は血清を使用し食道・胃・結腸・直腸がんの特異的な代謝物質やその周辺環境を網羅的に解析して得られたもので、これらの研究結果は今後のがんの早期診断の一助となる可能性がある点に意義がある。消化器がんの診断に応用・発展する可能性が示唆される価値ある業績であると認める。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。