



A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer

小林, 隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5879

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005879>

※ 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

A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer

血清メタボロミクスによる膵がんに対する新たな診断的アプローチ

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)

小林 隆

【背景】

膵がんは、急速な増殖と早期の転移に特徴付けられ、その5年生存率は5%にも満たない。膵がんに対する唯一の根治的治療法は、外科的切除であるにも関わらず、80%以上の膵がん患者は、切除不能な局所進行、または、転移腫瘍をもつ段階で発見される。これは、膵がんの臨床症状が、進行期にならないと明らかにならないことに加え、膵がんを早期発見するための効果的な方法が存在しないことが原因である。腫瘍マーカーCA19-9は、切除可能な段階の膵がんに対する感度が低いため、早期発見には適していない上に、膵がん以外の消化器悪性疾患や良性胆膵疾患においても上昇する。画像検査は費用効率が悪く、腫瘍形成性膵炎のような良性膵疾患と膵がんを識別することができない。内視鏡検査は、スループットの低さと合併症リスクの高さにより、スクリーニングには適していない。よって、膵がんに対する新たなスクリーニング法および検査法が強く求められているこれまでに多くの研究者が膵がんに対するバイオマーカー開発に精力を傾けてきたが、いずれも、CA19-9や他の臨床検査を超える臨床的な有用性を示すことができず、実用に至っていない。メタボロミクスとは、オミクスカスケードの最終点であり、表現型に最も近いであろう低分子代謝物を、網羅的に解析する研究である。ある特定の疾患の代謝変動を解明することは、疾患の理解を深めることにつながる。それゆえに、メタボロミクスは、医学研究領域において急速に発展してきている。本研究において、我々は、ガスクロマトグラフィ質量分析(GC/MS)によるヒト血清メタボロミクスを用いて、膵がん診断モデルを構築し、さらに、検証解析において、従来の腫瘍マーカーと比較することで、その診断能力を確認した。

【対象と方法】

本研究は、神戸大学大学院医学研究科によって承認され、2009年2月から2012年2月までに実施された。ヒトの検体は、神戸大学医学部附属病院のガイドラインに基づき扱った。全ての対象者には説明の上、署名による同意を得た。膵がん患者(PC)と慢性膵炎患者(CP)の血清検体は、神戸大学医学部附属病院と、もう一つの施設から収集した。健常ボランティアの血清検体は、神戸大学医学部附属病院とその他複数の施設から収集した。健常ボランティアは、身体診察、血液検査、尿検査、画像検査、および内視鏡検査による健診において異常がないことを確認した。全ての血清検体は、朝、標準的静脈採血法で採取した血液から分離した。低分子量代謝物の抽出やオキシム化、誘導体化、GC/MS、データ解析は、過去の報告に準じて行った。内部標準物質である2-isopropylmalic acidのピーク高によって、それぞれのピーク高を標準化し、半定量解析を行った。再現性が不安定な物質や、主に実験環境に由来する物質は、半定量解析から除外した。PCは、無作為に学習セット、もしくは、検証セットに割り当てた。HVは、PCに対して年齢と性別が適合した対照群となるよう準備した。全てのCPは検証セットに含めた。学習セット解析においては、PCとHVの血清代謝物量をWilcoxon順位検定と比較した。診断モデルを構築するために、ステップワイズ法によって選択した代謝物を、多重ロジスティック回帰分析に供した。診断能力を評価するため、ROC解析によって、AUC、感度、特異度を算出した。診断モデルの至適カットオフ値を、ROC曲線から決定した。検証セット解析においては、学習セットで得られたカットオフ値を用いて、AUC、感度、特異度、精度を検証することで、診断モデルを評価した。さらに、CPにおける血清代謝物の変動を検討するために、CPに

対して、年齢、性別を適合させた対照群となるように、もう一つのHV群を準備した。CPとHVの血清代謝物量を、Wilcoxon順位検定と比較した。全ての検討において、p値が0.05未満であることを有意とみなした。

【結果】

主に水溶性代謝物をターゲットとした分析によって、血清から159成分が検出された。これらのうち、上記条件によって113個の代謝物は半定量解析から除外した。残った45個の代謝物を半定量解析に供した。学習セット解析においては、PC群とHV群の間で、18個の代謝物に有意な変動を認めた。これら18個を膵がんに対する単一バイオマーカーとした場合、感度、特異度がともに80%を超える代謝物は存在しなかった。そこで、膵がんに対してより効果的な診断モデルを構築するために、我々は学習セット解析の結果を用いた多変量解析を行った。まず、ステップワイズ法によって、xylitol, 1,5-Anhydro-D-glucitol, histidine, inositolの4個を選択した。これらの代謝物を用いて、多重ロジスティック回帰分析による膵がん診断モデルを作成した。

$$p=1/[1+e^{-\{5.48-167.57(xylitol)-15.21(1,5-anhydro-D-glucitol)-282.34(histidine)+60.99(inositol)\}}].$$

学習セット解析において、この診断モデルのAUCは0.92857であり、至適カットオフ値は0.5137であった。この値を用いた場合、感度は86.0%、特異度は88.1%であった。CA19-9は、感度62.8%、特異度100%であった。CEAは、感度44.2%、特異度97.6%であった。この研究に参加する際の健診において、CA19-9やCEAに異常があった場合は、HVから除外したため、腫瘍マーカーの特異度は著明に高値であった。

検証セット解析において、この診断モデルのAUCは0.76004で、感度は71.4%、特異度は78.1%であった。CA19-9は、AUC 0.79762、感度69.0%、特異度85.9%であった。CEAは、AUC 0.66488、感度35.7%、特異度79.7%であった。さらに、検証セット解析において、切除可能膵がん(stage 0-IIb)に対する感度では、診断モデルが77.8%、CA19-9が55.6%、CEAが44.4%であった。また、慢性膵炎患者における偽陽性率は、それぞれ、17.4%、30.4%、43.5%であった。従来の腫瘍マーカーの正診率は、がんステージが進行すればするほど高くなるのに対し、我々の診断モデルは、早い段階においても高い値を示した。

我々は、非悪性慢性炎症が血清メタボロームに与える影響も検討するため、CPとHVの比較検討を行った結果、16個の代謝物がCPにおいて有意に変動していた。

【考察】

近年、メタボロミクスを膵がんに対する診断法として用いることの可能性が多く報告されているが、いずれにおいても、メタボロミクスの有用性を示すために主成分分析(PCA)が用いられている。PCAは、データセットとして、全ての検体を同時に解析しなければならないことから、個別の臨床検体に対して用いることができない。よって、実用的な臨床診断法を開発し、さらに、その感度、特異度を別の集団で評価することが必要である。そこで、我々は、初めて、ステップワイズ法による変数選択と多重ロジスティック回帰分析による診断モデル構築を行った。より効果

的なバイオマーカーを開発するために、多重ロジスティック回帰分析を用いて複数の代謝物を組み合わせることで、マルチバイオマーカーモデルとした。さらに、信頼し得るバイオマーカーを開発するために、よく検証された血清検体を多施設から集め、厳格なバイオインフォマティクス法を用いてデータ解析を行った。

膵疾患には、3つの大きな臨床的問題が存在する。一つ目の問題は、膵がんを切除可能な段階で発見することができないことである。本研究において、我々は、血清メタボロミクスを用いた診断モデルが切除可能膵がんを発見するのに有用であることを確認した。この段階のほとんどの患者には自覚症状がないため、血液検査を最初のスクリーニング検査として用いることができれば、臨床的意義は大きい。二つ目の問題は、膵がんと慢性膵炎とを識別するのが困難な場合が多いことである。慢性膵炎は、膵がんの主な危険因子の一つである。多くの消化器医は、慢性膵炎患者を、CT、MRI、EUS、腫瘍マーカー、および、ERCPによって定期的に検査することで経過観察しているが、最初の悪性化はたびたび見逃され、切除不能な腫瘍へ急速に進行する。さらに、良性的炎症性病変に対して、CA19-9や画像検査の偽陽性が原因となり、不必要な切除術が行われることもある。本研究において、我々の構築した診断モデルは、CA19-9よりも低い偽陽性率を示しており、悪性化の見逃しや良性病変に対する不必要な大手術を減らすことができると示唆される。三つ目の臨床的問題は、膵臓の検査における合併症リスクの高さである。血清メタボロミクスにおいて、血清検体は標準的な静脈採血法によって採取できることから、合併症のリスクは非常に低く、スループットは比較的高い。つまり、我々のメタボロミクスを用いた手法は、大集団に対するスクリーニング法としても有用であると言える。

膵疾患は、血清中アミノ酸や脂肪酸を有意に減少させた。がん組織においては、急速な細胞増殖を支えるために、アミノ酸や脂肪酸の取り込みと異化が亢進することは、よく知られている。本研究で見られた膵疾患患者血清におけるアミノ酸と脂肪酸の減少も、腫瘍による消費亢進によって説明できるかもしれない。膵疾患患者は、膵臓の内分泌機能不全および外分泌機能不全によって低栄養を来すことも多いことから、これももう一つの要因と考えられる。また、本研究においては、PCにおいて1,5-Anhydro-D-glucitolが減少していた。1,5-Anhydro-D-glucitolは、既に臨床で用いられている血糖調整の血清バイオマーカーであり、PCには耐糖能障害があることを示唆する。

将来的には、より厳格な評価を行うために、他のがんや自己免疫性膵炎、腫瘍形成性膵炎のような慢性疾患も研究に含めるべきである。また、特に切除可能な膵がん患者のサンプル数は、サブグループ解析をするには不十分であることから、もっと大規模な計画が必要である。

【結論】

我々は、多重ロジスティック回帰分析によって、血清メタボロミクスを用いた膵がんに対する診断モデルを初めて構築した。我々の構築した診断モデルは、従来の腫瘍マーカーと比較して、慢性膵炎患者を含む患者群の中から切除可能な膵がん患者をより正確に発見できた。将来的には、大規模な多施設共同研究が必要であるが、この新たな診断的アプローチを用いて膵がんを治療可能な段階で発見することによって、膵がん患者の予後を改善させることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2328号	氏 名	小林 隆
論文題目 Title of Dissertation	血清メタボロミクスによる膵がんに対する新たな診断的アプローチ A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer		
審査委員 Examiner	主 査 岸本 智雄 Chief Examiner 副 査 佐々木 正 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

膵癌は、急速な増殖と早期の転移に特徴付けられ、その5年生存率は依然として厳しい疾患である。根治的治療法は外科的切除であるにも関わらず、80%以上の膵癌患者は、切除不能な段階で発見される。よって、膵癌に対する新たなスクリーニング法および検査法が強く求められている。発表者は、ガスクロマトグラフィ質量分析 (GC/MS) によるヒト血清メタボロミクスを用いて、膵癌診断モデルを作り、検証解析において、従来の腫瘍マーカーと比較することで、その有用性を確認した。膵癌患者 (PC) と慢性膵炎患者 (CP) の血清検体は、神戸大学医学部附属病院と、もう一つの施設から収集した。健常ボランティア (HV) の血清検体は、神戸大学医学部附属病院とその他複数の施設から収集した。PC は、無作為に学習セット、もしくは、検証セットに割り当てた。HV は、PC に対して年齢と性別が適合した対照群となるよう準備した。診断モデルを構築するために、ステップワイズ法によって選択した代謝物を、多重ロジスティック回帰分析に供した。診断能力を評価するため、ROC 解析によって、AUC、感度、特異度を算出した。診断モデルの至適カットオフ値を、ROC 曲線から決定した。検証セット解析においては、学習セットで得られたカットオフ値を用い、AUC、感度、特異度、精度を検証することで、診断モデルを評価した。学習セット解析においては、PC 群と HV 群の間で、18 個の代謝物に有意な変動を認めた。これら 18 個を膵癌に対する単一バイオマーカーとした場合、感度、特異度がともに 80%を超える代謝物は存在しなかった。そこで、発表者は膵癌に対してより効果的な診断モデルを構築するために、学習セット解析の結果を用いた多変量解析を行った。まず、ステップワイズ法によって、xylitol, 1,5-Anhydro-D-glucitol, histidine, inositol の 4 個を選択した。これらの代謝物を用いて、多重ロジスティック回帰分析による膵癌診断モデルを作成した。学習セット解析において、この診断モデルの AUC は 0.92857 であり、至適カットオフ値は 0.5137 であった。この値を用いた場合、感度は 86.0%、特異度は 88.1%であった。CA19-9 は、感度 62.8%、特異度 100%であった。CEA は、感度 44.2%、特異度 97.6%であった。検証セット解析において、この診断モデルの AUC は 0.76004 で、感度は 71.4%、特異度は 78.1%であった。CA19-9 は、AUC 0.79762、感度 69.0%、特異度 85.9%であった。CEA は、AUC 0.66488、感度 35.7%、特異度 79.7%であった。さらに、検証セット解析において、切除可能膵癌 (stage 0-IIb) に対する感度では、診断モデルが 77.8%、CA19-9 が 55.6%、CEA が 44.4%であった。また、慢性膵炎患者における偽陽性率は、それぞれ、17.4%、30.4%、43.5%であった。

本研究において、発表者の構築した診断モデルは、CA19-9 よりも低い偽陽性率を示しており、不必要な大手術を減らすことができると期待される。また、今回の方法は、標準的な静脈採血法によって検体を採取できることから、合併症のリスクが非常に低く、大集団に対するスクリーニング法としても有用であると言える。

本研究は、血清メタボロミクスに基づく多重ロジスティック回帰分析によって、膵癌に対する診断モデルを初めて構築したもので、新たな膵癌の診断法の開発におい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。