



A metabolomic approach to lung cancer

堀, 朱矢

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5887

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005887>

※ 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)

学位論文内容要旨

A metabolomic approach to lung cancer

メタボロミクスを用いた肺癌診断へのアプローチ

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

内科学講座呼吸器内科学

(指導教員：西村 善博 准教授)

堀 朱矢

メタボロミクスを用いた肺癌診断へのアプローチ

【緒言】

肺癌は世界で最も罹患率の高い癌の一つであるが、早期診断や予後予測に有効なマーカーはいまだ無く、新しい臨床マーカーを確立することが必要である。

メタボロミクスとは、糖、有機酸、アミノ酸などの低分子代謝物を包括的かつ網羅的に解析する手法であり、その代謝物は生物の生理学的機能や病理学的特徴を最もよく表現する。Otto Warburg らは、癌細胞は増殖のためにグルコースやグルタミンを大量に使い、エネルギー産生は酸化的リン酸化よりも解糖系に依存していることを報告し、「Warburg effect」と呼ばれている。癌細胞内では、解糖系や TCA サイクルなどに関与する低分子代謝物が増加することが示唆される。今回我々は、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて、肺癌患者の血清、および、組織の低分子代謝物のプロファイリングを解明することにより、肺癌の診断に有用となりうる低分子代謝物を探究した。

【方法】

2009 年 7 月から 2010 年 3 月に、神戸大学医学部附属病院に入院する肺癌患者 33 名と健康ボランティア 29 名の早期採血の血清、および、手術を施行した 7 名の肺癌患者の癌組織とその周囲の非癌組織を採取した。血清は -80°C で保存した。採取組織検体は生理食塩水で洗浄して血液成分を除去し、液体窒素で凍結して -80°C で保存した。得られた血清と組織の各検体から、水溶性代謝物を抽出し、誘導処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010plus) を用いて代謝物の網羅的解析を行った。統計学的有意差は、Student's t-test を用いて解析し、得られた代謝物の多変量解析は Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) を用いて解析した。

【結果】

1. 患者背景

血清検体を解析した 33 名の肺癌患者の内訳は、病期：I-II 期 (早期) / III-IV 期 (進行期) = 11/22 名、組織型：腺癌/扁平上皮癌/小細胞癌 = 12/11/10 名であった。組織検体を解析した 7 名の肺癌患者の内訳は、病期：早期/進行期 = 6/1 名、組織型：腺癌/扁平上皮癌/小細胞癌 = 4/3/0 名であった。

2. 肺癌の代謝物プロファイリング

58 の血清代謝物と、71 の組織代謝物が確認された。58 の血清代謝物のうち 23 の代謝物が、健康ボランティアと肺癌患者間で有意な変化を認め、このうち 13 の代謝物が早期肺癌患者において、17 の代謝物が進行期肺癌患者において、有意に変化していた。また 71 の組織代謝物のうち 48 の代謝物において、癌組織と非癌組織間で有意な差を認めた。

3. TCA サイクルに関与する代謝物の変化

血清代謝物のうち、6 の代謝物は TCA サイクルに関与し、乳酸(×1.51; 倍, 以下同じ)、フマル酸(×1.76)、リンゴ酸(×1.40)は健常ボランティア血清に比較し、肺癌患者血清で有意に増加していた。同じく、組織代謝物のうち7 の代謝物は TCA サイクルに関与し、乳酸(×1.22)、コハク酸(×1.84)、フマル酸(×1.86)、リンゴ酸(×1.84)は、非癌組織に比較し、癌組織で有意に増加していた。

4. アミノ酸およびアミノ酸由来代謝物の変化

16 の血清代謝物は、アミノ酸、あるいは、アミノ酸由来代謝物であった。サルコシン(×1.17)、L-プロリン(×1.33)、L-スレオニン(×1.24)、4-ヒドロキシプロリン(×1.17)、アスパラギン酸(×0.64)、5-オキソプロリン(×0.85)、L-グルタミン酸(×0.72)は、健常ボランティア血清に比較し肺癌患者血清で有意に変化していた。

L-プロリン(×2.02)、アスパラギン酸(×1.59)、5-オキソプロリン(×2.06)、L-グルタミン(×2.54)など19の組織代謝物は、非癌組織に比較し、癌組織で有意に増加していた。

5. 脂肪酸、ヌクレオチド、その他の代謝物

以下の血清代謝物は、健常ボランティア血清に比較し、肺癌患者血清で有意に変化していた: 2-ヒドロキシイソ酪酸(×1.35)、3-ヒドロキシ酪酸(×2.20)、2-ヒドロキシイソ吉草酸(×1.47)、マロン酸(×1.31)、安息香酸(×1.39)、オクタン酸(×1.58)、グリセロール(×0.77)、リン酸(×0.87)、グリセリン酸(×0.47)、2-hexenedioic acid(×1.11)、2-プロピルグルタル酸(×1.13)、ラウリン酸(×0.77)、尿酸(×2.33)、プロパン酸(×1.20)、グリコール酸(×1.33)、ミリスチン酸(×0.69)など18の組織代謝物は、非癌組織に比較し、肺癌組織で有意に変化していた。ヌクレオチドに分類される以下の代謝物は、非癌組織に比較し、癌組織において有意に増加していた: イノシン(×1.97)、アデノシン(×1.69)、グアニン(×2.02)、ピリミジン(×1.92)、ウラシル(×1.86)、9H-プリン(×2.18)。

6. 病期に寄与する血清代謝物

病期に寄与する血清代謝物を見出すために多変量解析 (PLS-DA) を行った。乳酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、L-グリシン、サルコシン、安息香酸、オクタン酸、フマル酸、リンゴ酸、2-hexenedioic acid、2-プロピルグルタル酸は進行期肺癌に、3-ヒドロキシ酪酸、L-プロリン、4-ヒドロキシプロリン、尿酸は早期肺癌に、グリセリン酸、アスパラギン酸、5-オキソプロリン、リン酸、L-グルタミン酸は、健常ボランティアで高度に発現していた。

7. 組織型の分類に寄与する血清代謝物

組織型の分類に寄与する代謝物の解析では、グリシン、2-ヒドロキシイソ吉草酸、メチオニン、フェニルアラニンは腺癌に、アコニット酸は扁平上皮癌に、ピルビン酸、安息香酸、オクタン酸、イソバレリルグリシン、2-hexenedioic acid、パルミトレイン酸は小細胞癌に、より高度に発現していた。

8. 既存の腫瘍マーカーとの感度の比較

本研究にエントリーした患者血清の、腺癌に対する CEA の感度は 33%、小細胞癌に対する NSE の感度は 90.0%であった。一方、2-ヒドロキシイソ吉草酸の腺癌における感度は 91.7%、オクタン酸の小細胞癌における感度は 100%と、いずれも既存の腫瘍マーカーより感度が高かった。

9. 血清代謝物の日内変動と日間変動

血清代謝物の日内変動および日間変動を検証した。血清 16 サンプルを朝食前、昼食前、夕食前の1日3回採取し、日内変動を検証した。また、同じく血清 16 サンプルを、異なる3日間の朝食前に採取し、日間変動を検証した。結果、日内変動や日間変動を認めた代謝物も確認できたが、いずれも有意な差はなかった。血清代謝物プロファイルング解析には早朝採血が適していると考えられた。

【考察】

Warburg effect のように、癌細胞における特徴的な代謝サイクルの変化が、腫瘍組織における代謝物の変化をもたらしていると考えられる。今回の肺癌組織における代謝物の変化で特徴的であるのは、大腸癌や胃癌ではグルタミンの減少が報告されているが、肺癌組織では増加していることが判明した。タバコ煙のヒト肺基底上皮腺癌細胞 A549 への影響を調べた *in vitro* の研究において、グルタミン値は上昇していることが報告されており、今回の結果は、エントリーされた肺癌患者の多くが喫煙者であったことが影響していると考えられた。

これまでに遺伝子型と病理組織型、あるいは、タンパク表現型と病理組織型を比較検討した報告はあったが、今回の我々の研究は、肺癌の病理組織型と代謝物の関係を言及した初めての報告である。肺癌組織中の組織代謝物の量の変化は、肺癌患者の血清代謝物の量の変化に影響していると考えられる。血清のフマル酸、リンゴ酸、乳酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、L-プロリンは組織と同じく上昇していた。これは、癌化した組織中で増加した低分子代謝物が、組織から血清に移行しレベルが上昇したことが考えられた。一方、アスパラギン酸、5-オキソプロリンは、血清では減少し組織では上昇した。これは、癌細胞が増殖するために必要な代謝物が血清から組織へ移行したためと考えられた。また、病期の進行とともに増加する血清代謝物: 乳酸、安息香酸、フマル酸や、減少する代謝物: グリセリン酸、L-グルタミン酸も確認できた。これらも、組織-血清間の代謝物の産生量-消費量を反映していると考えられた。

従来から使用されている肺癌腫瘍マーカーは、Hamburger Group の研究によると、腺癌に対する CEA 感度は 58.0%、同じく扁平上皮癌に対する CYFRA の感度は 66.4%、小細胞癌に対する NSE の感度は 58.6%であると報告されている。各組織型でより高く存在した代謝物の中には、その感度が従来の肺癌マーカーに比して高いことが示された。これらさまざまな代謝物の存在パターンの違いを検討することが、肺癌早期発見の新しいバイオマーカーにつながると期待される。

【結論】

GC/MS を用いた肺癌のメタボローム解析によって、血清や肺癌組織における様々な代謝物のレベルが変化することがわかった。さらに、病期や組織型によって血清代謝物のレベルが変化することも示された。低分子代謝物のレベルの変化やそのパターンを知ることで、肺癌の新しい診断ツールにな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2336 号	氏 名	堀 朱矢
論文題目 Title of Dissertation	A metabolomic approach to lung cancer メタボロミクスを用いた肺癌診断へのアプローチ		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 南 博治 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 大野 良治		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肺癌は世界で最も罹患率の高い癌の一つであるが、早期診断や予後予測に有効なマーカーはいまだ無く、新しい臨床マーカーを確立することが必要である。メタボロミクスとは、糖、有機酸、アミノ酸などの低分子代謝物を包括的かつ網羅的に解析する手法であり、その代謝物は生物の生理学的機能や病理学的特徴を最もよく表現する。癌細胞内では、解糖系や TCA サイクルなどに関与する低分子代謝物に変化することが示唆される。申請者らは、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて、肺癌患者の血清、および、組織の低分子代謝物のプロファイリングを解明することにより、肺癌の診断に有用となりうる低分子代謝物を探究した。

2009 年 7 月から 2010 年 3 月に、神戸大学医学部附属病院に通院する肺癌患者 33 名と健常ボランティア 29 名の早朝採血の血清、および、手術を施行した 7 名の肺癌患者の癌組織とその周囲の非癌組織を採取した。得られた血清と組織の各検体から、水溶性代謝物を抽出し、誘導化処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて代謝物の網羅的解析を行った。

血清検体を解析した 33 名の肺癌患者の内訳は、病期：I-II 期（早期）/III-IV 期（進行期）=11/22 名、組織型：腺癌/扁平上皮癌/小細胞癌=12/11/10 名であった。組織検体を解析した 7 名の肺癌患者の内訳は、病期：早期/進行期=6/1 名、組織型：腺癌/扁平上皮癌/小細胞癌=4/3/0 名であった。

肺癌の代謝物プロファイリングの結果、58 の血清代謝物と、71 の組織代謝物が確認された。58 の血清代謝物のうち 23 の代謝物が、健常ボランティアと肺癌患者間で有意な変化を認めた。

血清代謝物のうち、6 の代謝物は TCA サイクルに関与し、乳酸(×1.51; 倍, 以下同じ)、フマル酸(×1.76)、リンゴ酸(×1.40)は健常ボランティア血清に比較し、肺癌患者血清で有意に増加していた。同じく、組織代謝物のうち 7 の代謝物は TCA サイクルに関与し、乳酸(×1.22)、コハク酸(×1.84)、フマル酸(×1.86)、リンゴ酸(×1.84)は、非癌組織に比較し、癌組織で有意に増加していた。16 の血清代謝物は、アミノ酸、あるいは、アミノ酸由来代謝物であった。サルコシン(×1.17)、L-プロリン(×1.33)、L-スレオニン(×1.24)、4-ヒドロキシプロリン(×1.17)、アスパラギン酸(×0.64)、5-オキソプロリン(×0.85)、L-グルタミン酸(×0.72)は、健常ボランティア血清に比較し肺癌患者血清で有意に変化していた。L-プロリン(×2.02)、アスパラギン酸(×1.59)、5-オキソプロリン(×2.06)、L-グルタミン(×2.54)など 19 の組織代謝物は、非癌組織に比較し、癌組織で有意に増加していた。

病期に寄与する血清代謝物を見出すために多変量解析 (PLS-DA) を行った。乳酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、L-グリシン、サルコシン、安息香酸、オクタン酸、フマル酸、リンゴ酸、2-hexenedioic acid、2-プロピルグルタル酸は進行期肺癌に、3-ヒドロキシ酪酸、L-プロリン、4-ヒドロキシプロリン、尿酸は早期肺癌に、グリセリン酸、アスパラギン酸、5-オキソプロリン、リン酸、L-グルタミン酸は、健常ボランティアで高度に発現していた。

組織型の分類に寄与する代謝物の解析では、グリシン、2-ヒドロキシイソ吉草酸、メチオニン、フェニルアラニンは腺癌に、アコニット酸は扁平上皮癌に、ピルビン酸、安息香酸、オクタン酸、イソパレリルグリシン、2-hexenedioic acid、パルミトレイン酸は小細胞癌に、より高度に発現していた。

本研究にエントリーした患者血清の、腺癌に対する CEA の感度は 33%、小細胞癌に対する NSE の感度は 90.0%であった。一方、2-ヒドロキシイソ吉草酸の腺癌における感度は 91.7%、オクタン酸の小細胞癌における感度は 100%と、いずれも既存の腫瘍マーカーより感度が高かった。

今回の肺癌組織における代謝物の変化で特徴的であるのは、大腸癌や胃癌ではグルタミンの減少が報告されているが、肺癌組織では増加していることが判明した。これまでに遺伝子型と病理組織型、あるいは、タンパク表現型と病理組織型を比較検討した報告はあったが、今回の申請者ら研究は、肺癌の病理組織型と代謝物の関係を言及した初めての報告である。

本研究は GC/MS を用いた肺癌のメタボローム解析によって、血清や肺癌組織における様々な代謝物のレベルが変化することを示し、肺癌早期発見の新しいバイオマーカーにつながる重要な知見を得た価値ある研究であると認める。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。