



Pancreatic cancer screening using a multiplatform human serum metabolomics system

Sakai, Arata

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6706号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006706>

※ 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

Pancreatic cancer screening using a multiplatform human serum metabolomics system

ヒト血清マルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いた
膵癌スクリーニング法の開発

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)

酒井 新

1. はじめに

膵癌は先進国では癌死亡の上位を占め、5年生存率5-6%と予後の悪い癌である。膵癌は早期発見が難しく、80%以上の患者は手術ができない進行した段階で発見されている。CA19-9は膵癌に最もよく用いられる血清マーカーであるが、早期の膵癌に対する感度が低く、早期発見には有用ではない。

近年、癌のバイオマーカー研究において、メタボロミクスという手法が注目されている。メタボロミクスは低分子量代謝物を網羅的に解析する手法で、患者の表現型をよく反映しているとされている。我々は、これまでに、メタボロミクス研究を進めており、膵癌についても、ガスクロマトグラフィ質量分析(GC/MS)を用いた血清メタボロミクス解析結果をもとに、多重ロジスティック回帰分析によって診断予測モデルを作成し、良好な成績を示している。しかし、GC/MSにより検出される代謝物の種類は、質量分析機器の特性のため限られている。そこで、我々は、より多くの種類の代謝物を同定するために、GC/MSとともに、液体クロマトグラフィ質量分析(LC/MS)による膵癌の血清メタボロミクス解析を行い、新たな膵癌スクリーニング法を開発することを目的とした。

2. 対象と方法

本研究では、膵癌患者(PC)59例、健常者(HV)59例を対象とし、血清サンプルを採取した。いずれの検体も多施設から採取された。PCとHVは、学習セットと検証セットに割りつけ、我々が構築したGC/MS、および、LC/MSからなるマルチプラットフォームメタボロミクスシステムで、代謝物の解析を行った。

学習セットでは、PCとHVの血清代謝物レベルを、Wilcoxonの順位和検定を用いて比較検討し、p値が0.05未満を有意差ありとした。両群間で有意差をみとめた各代謝物について、ロジスティック回帰分析を用いて診断モデルを作成した。それぞれの診断モデルについて、Receiver operating characteristic(ROC)解析を行い、至適cut off値を求め、Area under curve(AUC)、感度、特異度、正診率を算出した。さらに、新たな診断モデルとしての2-phase screening

法の可能性を提唱し、その評価を実施した。検証セットにおいて、学習セットで作成された診断モデルの評価を行った。

3. 結果

マルチプラットフォームメタボロミクスシステムにより、対象の血清サンプルから 385 種の代謝物が検出された。このうち分析定量性が不安定であると判断された 149 種の代謝物を除外し、残りの 236 の代謝物を評価に供した。はじめに、学習セットで、PC と HV の血清代謝物を Wilcoxon の順位和検定を用いて有意差検定を行った結果、75 種の代謝物において、統計学的に有意差を認めた。これら 75 種の代謝物を、それぞれの測定データに基づいて、ロジスティック回帰分析を用いて診断モデルを作成した結果、25 種の単代謝物診断モデルで高い診断能(脂質分析で AUC>0.80、その他の分析で AUC>0.70 を指標)を示した。これら 25 種の単代謝物診断モデルを検証セットで評価した結果、このうち 6 種の単代謝物診断モデルでは AUC>0.70 を示したが、感度・特異度がともに 80%を超える単代謝物診断モデルは存在しなかった。

次に、より診断能が高い診断モデルを作成するため、多変量解析を実施した。ステップワイズ法により、Mannose と 1,5-anhydro-D-glucitol の 2 種の代謝物を選択し、多重ロジスティック回帰分析により診断モデルを作成した。

$$p=1/[1+e^{-\{3.87-8.28(1,5\text{-anhydro-D-glucitol})+42.33(\text{Mannose})\}}]$$

学習セットにおける診断モデルの AUC、感度、特異度、正診率はそれぞれ 0.9511、100%、80.0%、90.0%であった。次に、この診断モデルを検証セットで評価した結果、AUC、感度、特異度、正診率はそれぞれ 0.8512、72.7%、84.1%、78.4%であった。

続いて、2-phase screening 法という、2つの診断能の高い単代謝物診断モデルを組み合わせた診断モデルを提唱し、その有用性について検証した。学習セット・検証セットともに高い診断能を示した 6 種の単代謝物診断モデルを組み合わせることで新たに診断モデルを作成し、

学習セットで評価した結果、16 パターンの組み合わせで感度・特異度ともに 80%を超える成績であった。この 16 パターンの組み合わせ診断モデルを検証セットで評価した結果、1 つの組み合わせ(第 1 スクリーニング : Mannose+第 2 スクリーニング : LPC18-0(sn-1))で感度・特異度ともに 80%を超える成績であった。この診断モデルは、学習セットで感度 100%、特異度 80%、正診率 90%、検証セットで感度 84.1%、特異度 84.1%、正診率 84.1%と高い診断能を示した。

4. 考察

この研究で、GC/MS と LC/MS とを使用したマルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いて、対象の血清サンプルから 385 種の代謝物を検出し、感度の高い膵癌のバイオマーカー候補を検索した。血清代謝物のデータは、食事や身体活動の影響を受けるので、その評価は慎重に行わなければならないが、我々の研究では、学習セットの PC 検体は絶食下の検体のみとし、一方、検証セットの PC 検体は絶食下とそうでない検体とで構成された。この方法により、採血前の絶食の有無に影響されない強固な診断モデルを作成することができると考えられる。

最近の研究で、膵癌の原因の多様性が明らかにされており、現在の膵癌の腫瘍マーカーは感度、特異度ともに低く、複数のマーカーを組み合わせることは必要不可欠である。我々の先行研究において、GC/MS による血清メタボロミクス、および、ステップワイズ法と多重ロジスティック回帰分析を用いて膵癌の診断モデルを作成し、検証セットで感度 71.4%、特異度 78.1%の成績を示した。今回の研究においても、我々は、GC/MS、および、LC/MS から得られたデータを用いて、ステップワイズ法と多重ロジスティック回帰分析による膵癌の診断モデルを構築し、検証セットで感度 72.7%、特異度 84.1%と高い診断能を示すことができた。しかし、膵癌の進展には、様々な遺伝的因子と環境因子が相互に関わっているため、1つの診断モデルを用いると、1つの独立した膵癌の原因となる因子から引き起こされる代謝の変化を同定しているにすぎない可能性があり、このこと

が膵癌のマーカーの診断感度を下げる原因になっているかもしれない。そこで、我々は、2-phase screening 法という、2つの診断能の高い単代謝物診断モデルを組み合わせた診断モデルを提唱し、その有用性について検証した。この診断モデルは、検証セットで感度 84.1%、特異度 84.1%、正診率 84.1%と非常に高い診断能を示した。

我々の研究では、PC で phosphatidylcholine と lysophosphatidylcholine の血清レベルが低下しており、LPC18-0(sn-1)が、2-phase screening 法における重要な代謝物であると明らかとなった。Phosphatidylcholine は choline から合成されるリン脂質の一つで、生体膜の主な構成成分である。Lysophosphatidylcholine は phosphatidylcholine に由来する化学物質である。choline を含む代謝物はすでに、膵癌を含む様々な癌において、バイオマーカー候補として見出されている。PC でみられる phosphatidylcholine と lysophosphatidylcholine の血清レベルの変化は、おそらく癌細胞の増殖に伴う、生体膜の構成成分の盛んな利用と関係があると思われる。

2-phase screening 法における重要な代謝物の一つとして同定された Mannose は、タンパク質のグリコシル化において重要な役割を果たしているが、癌代謝との関連は明らかではない。しかし、食道癌や乳癌において、血清 Mannose レベルの上昇が報告されている。一方、糖尿病患者においても、空腹時血清 Mannose レベルの上昇が報告されている。我々の研究では、PC では HbA1c が平均 6.6%であり、耐糖能異常の存在が示唆される。血清代謝物の変化は、局所の代謝の変化のみならず、膵癌に対する全身の反応も反映されているものと思われる。すなわち、血清代謝物におけるこれらの変化の理由については、さらなる検討で明らかにする必要がある。

我々は、これまで、GC/MS を用いて膵癌に関する研究を行ってきたが、今回の研究では、GC/MS に加えて LC/MS も採用することで、バイオマーカー候補として、より幅広い代謝物のスクリーニングを実施した。その結果、膵癌の新たなスクリーニング法を提唱し、この診断モデルは高い感度と特異度を示した。この研究結果の臨床応用のためには、良性膵疾患など他の疾患を含む、多検体大規模研究

を行い、我々の研究結果を検証する必要がある。さらに、将来的には、膵癌の治療効果判定や、治療後の予後予測についても評価が必要である。

5. 結論

我々はこの研究で、マルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いて、新たな膵癌診断モデルを作成することができた。この診断法により、膵癌患者の予後の改善が期待できるが、診断モデルの信頼性をより高めるには、多検体、ならびに、多施設検体による大規模研究による厳格な評価が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2608号	氏 名	酒井 新
論文題目 Title of Dissertation	ヒト血清マルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いた膵癌スクリーニング法の開発 Pancreatic cancer screening using a multiplatform human serum metabolomics system		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	南 博 信	
	副 査 Vice-examiner	南 康 博	
	副 査 Vice-examiner	平 岡 健 一	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

膵癌は早期発見が困難な予後の悪い癌である。メタボロミクスを用いた早期診断法の開発が期待されている。ガスクロマトグラフィ質量分析(GC/MS)に加えて液体クロマトグラフィ質量分析(LC/MS)を併用して膵癌の血清メタボロミクス解析を行い、新たな膵癌スクリーニング法の開発を試みた。

【対象と方法】

膵癌患者(PC)59例、健常者(HV)59例より血清サンプルを採取し、GC/MSおよびLC/MSからなるマルチプラットフォームメタボロミクスシステムで代謝物を解析した。PCとHVのデータを学習セットと検証セットに分け、学習セットではPCとHVの血清代謝物レベルをWilcoxonの順位和検定を用いて比較し、有意差(p<0.05)を認めた各代謝物について、ロジスティック回帰分析により診断モデルを作成した。それぞれのモデルをReceiver operating characteristic(ROC)解析によるArea under curve(AUC)、至適cut off値による感度、特異度、正診率で評価した。さらに、新たな診断モデルとしての2-phase screening法を開発した。検証セットを用いて作成した診断モデルを評価した。

【結果】

マルチプラットフォームメタボロミクスシステムにより、対象の血清サンプルから385種の代謝物が検出された。このうち分析定量性が不安定である149種を除外した236の代謝物を検討した。学習セットでPCとHVを比較したところ、75種の代謝物に差を認めた。これらについてロジスティック回帰分析で単代謝物診断モデルを作成し検証セットで評価した。このうち6種の単代謝物診断モデルでAUC>0.70を示したが、感度・特異度がともに80%を超えるものはなかった。

より高い診断能のモデルを作成するため、ステップワイズ法によりMannoseと1,5-anhydro-D-glucitolを選択し、多重ロジスティック回帰分析により診断モデルを作成した。

$$p=1/[1+e^{-\{3.87-8.28(1,5\text{-anhydro-D-glucitol})+42.33(\text{Mannose})\}}]$$

このモデルを検証セットで評価したところ、AUC、感度、特異度、正診率はそれぞれ0.8512、72.7%、84.1%、78.4%であった。

続いて、診断能の高い2つの単代謝物診断モデルを組み合わせた2-phase screening法を開発し検証した。学習セットで高い診断能を示した6種の代謝物を組み合わせて2-phase screening法で診断モデルを作成した。学習セットでは16パターンの組み合わせで感度・特異度もともに80%を超えた。これらを検証セットで評価した結果、感度84.1%、特異度84.1%、正診率84.1%と高い診断能を示した組み合わせ(第1スクリーニング: Mannose+第2スクリーニング: LPC18-0(sn-1))が得られた。

【考察】

血清代謝物は食事や身体活動の影響を受けるが、今回の研究では学習セットのPC検体は絶食下の検体のみとし、検証セットのPC検体は絶食下とそれ以外の検体を含んでいた。

膵癌は多様性が高く、現在の腫瘍マーカーは感度、特異度ともに低い。本研究では2-phase screening法という2つの診断能の高い単代謝物診断モデルを組み合わせる方法を提唱し、検証セットで感度84.1%、特異度84.1%、正診率84.1%と診断能が高いモデルを得ることができた。

2-phase screening法で同定されたmannoseは、タンパク質のグリコシル化に重要であり、食道癌や乳癌で血清mannoseレベルの上昇が報告されている。一方、糖尿病患者においても空腹時血清mannoseレベルの上昇が報告されている。本研究のPCのHbA1cは平均6.6%と耐糖能異常が示唆され、mannoseの意義は今後さらに検討する必要がある。

今回の研究ではGC/MSに加えてLC/MSも併用することで、バイオマーカー候補としてより幅広い代謝物のスクリーニングが可能であった。その結果、膵癌の新たなスクリーニング法を提唱し、本研究で作成した診断モデルは高い感度と特異度を示した。この研究結果を臨床応用するためには、良性膵疾患など他の疾患を含む多検体大規模研究にて検証する必要がある。

【結語】

本研究はマルチプラットフォームメタボロミクスシステムを用いて、2-phase screening法を開発して新たな膵癌診断モデルを作成したものである。膵癌の新しいスクリーニングに発展しうる可能性を秘めた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。