



Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics

Hirata, Yuichi

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6973号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006973>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Identification of highly sensitive biomarkers
that can aid the early detection of pancreatic cancer
using GC/MS/MS-based targeted metabolomics

ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析計に基づく
標的メタボロミクスを用いた膵がん早期発見を支援し得る
高感度バイオマーカーの開発

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)

平田祐一

ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析計に基づく標的メタボロミクスを用いた膵がん早期発見を支援し得る高感度バイオマーカーの開発

Introduction

膵がん (PC) は癌関連死を引き起こす原因の一つである。PC は致死的な固形癌と考えられており、早期発見の難しさからその 5 年生存率は 8% 未満である。唯一の根治治療は外科的切除であるが、80% 以上の PC 患者は診断時に切除不能の病変を伴っている。PC 患者の臨床症状は、癌が進行するまで不明瞭ことが多い。さらに、PC の早期発見に有用なスクリーニング法が存在しない。PC の腫瘍マーカーとして用いられる CA19-9 は、早期の病変に対する感度の低さより、早期発見には向きであり、さらに、他の消化管癌や良性の胆管疾患においても上昇することがある。CT、MRCP や超音波内視鏡などの画像検査は、費用対効果の観点からスクリーニング法としては適さない。そのため PC の早期発見のための新規のスクリーニング法の開発が求められている。

我々の研究グループでは、様々な疾患の診断や病態解析のためにメタボロミクスが有用であることを示してきた。PC に関しては、以前にガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を用いて早期発見のバイオマーカーの候補代謝物を同定した。PC と健常者 (HV) の間で複数の血中代謝物が有意差を持ち、ステップワイズ法で選択した 4 つの代謝物を用いて構築した診断モデルが PC と HV を区別するのに有用であったことを報告した。しかし、この研究にはいくつかの限界があった。既報では、すべての臨床病期の PC を対象としたが、早期の PC の検体数が少なかった。また、検証セットの血液検体は、トレーニングセットと同一施設で収集され、完全には独立していなかった。さらに、既報では、シングル四重極質量分析計を有する GC/MS を用いて代謝物の網羅的解析を行ったが、血液のような多くの代謝物を含む生体試料の解析においては、他の代謝物による干渉の影響で質的評価が不十分である可能性があった。また、既報では単一の内部標準物質を指標にした半定量解析であったため、量的評価も不十分である可能性があった。これらの限界により、既報の再現性は十分には確かめられていなかった。

今回、我々は PC の早期発見に焦点を当て、多施設から収集された臨床病期が 0 から IIIB までの PC 検体を用いて解析を行った。シングル四重極質量分析計により、他の代謝物の干渉を排除し物質特異的なイオンの検出が可能なトリプル四重極質量分析計 (MS/MS) を用いて、質的評価の向上を図った。また、単一の内部標準物質ではなく、既報に基づいて評価対象とした 16 の候補代謝物それぞれに対する安定同位体を用いて、量的評価の向上を図った。以上の手法で、PC の早期発見を支援し得る有用なバイオマーカーの開発を行った。

多重ロジスティック回帰分析で診断モデルを構築した（Model Y : $p=1/[1+\exp^{-(8.15-0.08(\text{histidine})-0.10(\text{xyloitol}))}]$ ）。Model Y の ROC 曲線の AUC 値 0.83008、cut-off 値 0.6048、感度 70.4%、特異度 89.5% であった。CA19-9 は日常診療で用いられる 37 U/ml を cut-off 値とすると、感度 68.5%、特異度 93.0% であった。GC/MS/MS に基づく診断モデルは、CA19-9 より高い感度を示した。

さらに、model Y と CA19-9 を組み合わせることで、PC に対する感度・特異度が上昇することが示された。多重ロジスティック回帰分析を用いて model Y と CA19-9 を組み合わせた診断モデルを構築した結果、ROC 曲線の AUC 値 0.93112、cut-off 値 0.4172、感度 90.7%、特異度 89.5% であった。同様の結果は、model X においても確認された。

統いて、これらの診断能を 2nd セットで評価した。Model X の AUC 値 0.84375、cut-off 値 0.9173、感度 81.3%、特異度 87.5% であった。Model Y の AUC 値 0.89453、cut-off 値 0.9227、感度 75.0%、特異度 100% であった。CA19-9 の感度 75.0%、特異度 81.3% であった。Model X + CA19-9 の AUC 値 0.89063、cut-off 値 0.8860、感度 81.3%、特異度 93.8% であった。Model Y + CA19-9 の AUC 値 0.91797、cut-off 値 0.8369、感度 81.3%、特異度 93.8% であった。2nd セットでは CA19-9 との組み合わせの有無の間で感度・特異度に有意差はなかったが、いずれも CA19-9 の組み合わせで上昇する傾向が見られた。さらに、臨床病期 0 から IIB に限定すれば、その感度は model X、model Y、CA19-9、model X + CA19-9、model Y + CA19-9 でそれぞれ、100%、85.7%、85.7%、100%、100% であった。

Discussion

Model X では、PC に対する感度が既報より低値であった。その理由の 1 つ目は臨床病期の違いである。既報の診断モデルは進行癌の影響が大きなモデルであったため、早期の検体で構成された model X は感度が低下したと考えられた。2 つ目は測定法の違いである。GC/MS による網羅的解析および単一の内部標準物質を用いた半定量解析を行った既報と異なり、本研究では GC/MS/MS による MRM (multiple reaction monitoring)、および、安定同位体を用いた定量解析を行ったことで、より厳密に評価できた結果と考えられた。

既報では 1,5-AG が、PC と HV 間で最も有意差が大きかったが、本研究では 1,5-AG は model Y の変数として選択されなかった。1,5-AG は代謝的に安定した物質で、主に食事に由来し腸管で吸収される。1,5-AG は短期的な血糖コントロールのマーカーとして用いられる。健常者では、吸収、尿の再吸収、腸管での分泌のバランスで血中 1,5-AG 濃度は一定に保たれており、生体内で生化学的な変換はほぼない。高血糖の状態下では、尿中 1,5-AG の再吸収が障害されるこ

析を用いて、早期の PC に対する有用な診断モデルを構築した。CA19-9 より感度が高く、また、CA19-9 と組み合わせることでより高感度のマーカーとなることを示した。この発見が PC の早期発見を支援することで、予後を改善できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2702 号	氏名	平田 祐一
論文題目 Title of Dissertation	ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析計に基づく標的メタボロミクスを用いた肺がん早期発見を支援し得る高感度バイオマーカーの開発		
			Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	菊池 信彦	
	副査 Vice-examiner	味木 敏夫	
	副査 Vice-examiner	佐々木 伸子	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【背景】

肺がんの5年生存率は8%未満であり早期発見の方法を確立する必要がある。以前にガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を用いて早期発見のための候補代謝物を同定したが、再現性は十分ではなかった。本研究では特異的なイオンの検出が可能なトリプル四重極質量分析計 (MS/MS) に評価対象物の安定同位体を併用することにより質的・量的向上を図り、肺がんの早期発見を可能にするバイオマーカーの開発を試みた。

【方法】

年齢・性別をマッチさせた肺がん患者と健常人の血清検体について、既報で有意となった16代謝物を解析した。2006年10月から2015年1月に国立がんセンター研究所とその関連施設で収集された検体を1stセット、2015年1月から2016年1月に神戸大学医学部附属病院とその関連施設で収集された検体を2ndセットとした。検体を前処理した後にGC/MS/MSで検出された評価対象代謝物と安定同位体のピーク面積値の比から血中濃度を算出し、肺がん患者と健常人を Bonferroni's correctionで多重性を調整したMann-Whitney's U testで比較した。多重ロジスティック回帰分析で診断モデルを構築し、ROC曲線のAUC値、cut-off値、感度、特異度で評価した。

【結果】

1stセットのうち代謝物のピークに飽和がみられた1例を除外した肺がん54例と健常人58例を比較したところ、16代謝物のうち11代謝物で差を認めた。既報の診断モデル (Model X) を1stセットで評価したところ、ROC曲線のAUC値0.86062、cut-off値0.5677、感度74.1%、特異度86.0%であった。本研究で新たに16代謝物を用いて検討したところ histidine と xylitol が有意な因子となり、これを用いた多重ロジスティックモデル (Model Y) のAUC値0.893008、cut-off値0.6048、感度70.4%、特異度89.5%であった。さらに Model Y に CA19-9 を組み合わせたところ、AUC 値 0.93112、cut-off 値 0.4172、感度 90.7%、特異度 89.5% と向上した。同様に Model X も CA19-9 を併用することにより改善した。

これらの Model を 2ndセットで評価したところ、Model X の AUC 値 0.84375、cut-off 値 0.9173、感度 81.3%、特異度 87.5% で、Model Y の AUC 値 0.89453、cut-off 値 0.9227、感度 75.0%、特異度 100% であった。肺がんの腫瘍マーカーとして汎用されている CA19-9 を組み合わせた Model X + CA19-9 は AUC 値 0.89063、cut-off 値 0.8860、感度 81.3%、特異度 93.8% で、Model Y + CA19-9 は AUC 値 0.91797、cut-off 値 0.8369、感度 81.3%、特異度 93.8% であった。臨床病期を IIB までに限定すれば、その感度は Model X、Model Y、CA19-9、Model X + CA19-9、Model Y + CA19-9 でそれぞれ、100%、85.7%、85.7%、100%、100% であった。

【考察】

本研究では、既報の Model X の感度は低値であったが、早期肺がんの検出に histidine の有用性が示唆された。Histidine は histamine の前駆物質で、histamine は細胞周期を休止期に向かわせ肺がん細胞の増殖を抑制するとされている。本研究の1stセットは血清で2ndセットは血漿であり、2つのセットで cut-off 値は異なっていた。血清は血漿より代謝物濃度が高いと言われ、検体と cut-off 値の最適化が必要である。また、健常人とした対照群の中に微小ながん病変がないことの証明が不可能なことや 2ndセットの検体数が少なかったことなどの問題点もあり、大規模な研究が必要である。

【結語】

本研究は GC/MS/MS に基づいたメタボロミクス、および、多重ロジスティック回帰分析を用いて、早期の肺がんに対する診断モデルを提案し、CA19-9 と併用することにより診断能が向上する可能性を示唆したものであり、肺がんを早期発見するための診断法を確立する基礎情報となる可能性が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。