



Identification of serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer via the targeted metabolomics approach.

Fujigaki, Seiji

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7253号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007253>

※ 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

Identification of serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer via the targeted metabolomics approach.

標的メタボロミクスによる食道がんに対する術前化学放射線療法の効果予測に有用な血清バイオマーカーの確立

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座消化器内科学分野
(指導教員: 西 慎一 教授)

藤垣 誠治

1. 背景、目的

2012年の報告では、全世界の食道がんによる死亡数は年間400,000人であり、部位別では第6位である。外科的切除が最も優れた治療法はあるが、多くの食道がんは術後早期に局所再発や遠隔転移をおこし、このような患者の予後は不良である。局所進行食道がんにおいて、完全切除率の向上や予後の改善を目指し、様々な術前化学療法や術前化学放射線療法が試みられてきた。幾つかの臨床研究やメタ解析において、術前化学放射線療法と外科的切除が全生存率を改善させることができて示されているが、術前化学放射線療法に反応せず、効果不良であった患者の予後は、術前療法を施行せずに外科的切除を行った患者よりも悪く、術前化学放射線療法は全ての患者にとって有益なものとは言い難い。よって、治療開始前に術前化学放射線療法の効果予測因子が明らかになれば、治療効果不良と予測される患者においては無益な術前治療を回避し、外科的切除を優先することにより予後の改善が期待される。

近年、がん細胞は急速な細胞増殖を実現するために積極的に代謝的変化を引き起こし、ワールブルグ効果に代表されるような、正常細胞とは異なる代謝的特徴を有することが報告されている。がんの早期診断などにおいては、このような代謝物の変化を解析するメタボローム解析の有用性がすでに報告されており、我々の研究グループにおいてもガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)、ならびに、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)を用いたバイオマーカー探索に関する報告を行ってきた。本研究では、網羅的に血清内の代謝物を解析し、食道がん患者の術前化学放射線療法に対する治療効果予測に有用なバイオマーカーとなり得る代謝物の同定を試み、候補となった代謝物においては定量性の優れる安定同位体を用いた標的メタボロミクスを行った。

2. 対象と方法

2010年から2011年にかけて国立がんセンター中央病院、ならびに、国立がんセンター東病院にて行われた臨床病期II/III期(T4を除く)胸部食道がんに対する5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチニン(CDDP)と放射線同時併用療法による術前化学放射線療法の実施可能性試験(第2相試験)に参加した26人の食道扁平上皮がん患者の血清検体を用いた。全ての患者に対して同一プロトコールの術前化学放射線療法、および、外科的切除が行われ、化学放射線療法における効果判定は手術検体の病理組織学的判定により行った。

血清検体の網羅的メタボローム解析を実施するにあたり、トリプル四重極ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040(島津製作所)、ならびに、トリプル四重極液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8040(島津製作所)を用いた。網羅的メタボローム解析によりバイオマーカー候補となった代謝物に関しては、内部標準として安定同位体標識代謝物を用いて定量解析を行い、検証した。

得られたメタボロームデータを用いて、術前化学放射線療法完全奏効群(pCR群)と不完全奏効群(non-pCR群)に分けて統計解析を行い、2群間に血清濃度に有意差を示す代謝物を探査した。さ

らに、OPLS-DA (直交部分最小二乗法判別分析: Orthogonal partial least squares-data analysis) を用いて、pCR 群と non-pCR 群の判別に寄与した代謝物の同定を行った。Cox 比例ハザードモデルに基づく単変量解析を用いて、予後因子となりうる血清代謝物の探索、ならびに、ハザード比の推定を行い、無増悪期間 (TPP: Time to progression)、および、疾患特異的生存率 (CSS: Cause specific survival) を Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log-rank 検定にて有意差検定を行った。これらの評価で、代謝物の血清濃度と予後との関連を検討した。

3. 結果

手術検体の病理組織学的検討の結果、26 人の食道がん患者のうち 13 人は術前化学放射線療法により病理学的完全奏功 (pCR) を達成していた。

食道がん患者 26 人の血清検体の網羅的メタボローム解析により 322 種類の代謝物が検出され、pCR 群 ($n=13$) と non-pCR 群 ($n=13$) における比較で 19 種類の代謝物に有意差が認められた。このうち、10 種類の代謝物は Phosphatidylethanolamine、Phosphatidylcholine、Lysophosphatidylcholine などの脂質代謝物であったが、OPLS-DA により单一の脂質代謝物は pCR 群と non-pCR 群の判別への寄与度が低いことが示された。残り 9 種類の代謝物のうち安定同位体を得ることができた arabitol、betaine、glycine、L-aspartate、L-serine、L-arginine の 6 種類の代謝物に関して標的メタボロミクスによる検証を行った。結果は arabitol、glycine、L-serine、L-arginineにおいて pCR 群で有意に血清濃度が低く、betaine、L-aspartateにおいても有意差は示されなかったが、網羅的メタボローム解析で得られた結果と同様の傾向が示された。

全ての患者の追跡調査の結果 (追跡期間中央値 55 ヶ月)、26 人の患者のうち 16 人は生存し 10 人は死亡していた。年齢、臨床病期、arabitol、glycine、L-serine、L-arginine の血清濃度の 6 因子に関して Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析を行った結果、TPP において L-serine の血清濃度が予後因子となりうることが示された (ハザード比 3.91; $p=0.0463$)。血清濃度のカットオフ値は、pCR 群と non-pCR 群の判別における receiver operating characteristic curve (ROC 曲線) から求めた。TPP、CSS ともに L-serine の血清濃度が有意に影響していることが示された (Log-rank 検定; TPP: $p=0.0392$, CSS: $p=0.0204$)。L-serine の血清濃度で k 平均法によって求めた三分位値によって群別し、比較した場合においてもこの傾向は同様に認められ、L-serine の血清濃度が高い場合は長期予後が悪い可能性が示唆された。

4. 考察

近年、がん細胞は急速な増殖を可能するために、積極的に代謝の変化を起こすことが報告されており、がんと代謝の関係が注目されている。今回、pCR 群と non-pCR 群で差が認められた代謝物の中で、serine、glycine、betaine は one-carbon metabolism に関与する代謝物であった。One-carbon metabolism は葉酸代謝、および、メチオニン代謝を含む代謝経路であり、アミノ酸、糖、

ビタミン代謝を統制し、がん細胞の増殖、転移に必要な様々な代謝物 (脂質、核酸、蛋白質) の合成に関与している。

本研究に参加した 26 人の患者に対しては 5-FU と CDDP を含む術前化学放射線療法が行われた。5-FU は deoxyuridine monophosphate (dUMP) の deoxythymidine monophosphate (dTMP) への変換酵素である thymidylate synthetase を阻害することで DNA 純製を阻害する。5-FU 感受性と one-carbon metabolism の関係に関する報告もあり、one carbon metabolism に関連した代謝物が血清中で低濃度であることは、がん細胞の増殖を妨げる面と薬剤感受性を高める面で都合が良い可能性がある。

One-carbon metabolism に関する代謝物の中で serine に関しては、がん細胞において glucose、glutamine に次いで 3 番目に多く消費される代謝物とされており、細胞外の serine が欠乏した状態ではがん細胞の増殖能が低下することが報告されている。また、過去には食道扁平上皮がんに対する化学放射線療法の効果予測に関するバイオマーカー研究において細胞内抗酸化の重要な調整因子である Nrf2 やがん抑制タンパク p53 の主要な抑制制御因子である MDM2 の過剰発現が治療抵抗性と関連しているとの報告がある。Nrf2、MDM2 とともに serine 代謝との関連が報告されており、serine の血清濃度と治療抵抗性は関連する可能性がある。

本研究ではメタボロミクスの手法を用いて、食道がんの術前化学放射線療法における効果予測に有用な可能性がある代謝物を同定し、特に L-serine に関しては、治療後の予後にも関連している可能性が示唆されたが、臨床応用に向けては何点か課題が残る。統計処理における多重性の調整や全生存率での長期予後の検討などを可能にするために多検体による検証が、今後、必要と考える。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2798 号	氏名	藤垣 誠治
論文題目 Title of Dissertation	<p>Identification of serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer via the targeted metabolomics approach. 標的メタボロミクスによる食道がんに対する術前化学放射線療法の効果予測に有用な血清バイオマーカーの確立</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p>	<p>古屋 敏之 佐々木 知弘 高橋 博行</p>	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

局所進行食道がんにおいて、術前化学放射線療法と外科的切除が全生存率を改善させることが示され欧米では標準治療とされているが、術前化学放射線療法に反応せず効果不良であった患者の予後は、術前療法を施行せず外科的切除を行った患者よりも悪く、術前化学放射線療法は全ての患者にとって有益なものとは言い難い。治療開始前に採取した血清検体を用いたメタボローム解析により術前化学放射線療法の効果予測因子を明らかにすることが本研究の目的である。

【方法】

国立がんセンター中央病院ならびに国立がんセンター東病院にて行われた臨床病期II/III期（T4 を除く）胸部食道がんに対する 5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチニン(CDDP)と放射線同時併用療法による術前化学放射線療法の実施可能性試験（第2相試験）に参加した 26 人の食道扁平上皮がん患者の血清検体について、トリプル四重極ガスクロマトグラフ質量分析計、ならびにトリプル四重極液体クロマトグラフ質量分析計にて網羅的メタボローム解析を行った。得られたメタボロームデータを用いて、患者を術前化学放射線療法完全奏効群（pCR 群）と不完全奏効群（non-pCR 群）に分けて統計解析を行い、2 群間で血清濃度に有意差を示す代謝物を探索した。網羅的メタボローム解析によりバイオマーカー候補となった代謝物に関しては、内部標準として安定同位体標識代謝物を用いた標的メタボロミクスにより定量解析を行い検証した。Cox 比例ハザードモデルに基づく単変量解析を用いて、予後因子となりうる血清代謝物の探索を行い、無増悪期間（TTP: Time to progression）および疾患特異的生存率（CSS: Cause specific survival）を Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log-rank 検定にて有意差検定を行った。これらの評価で代謝物の血清濃度と予後との関連を検討した。

【結果】

食道がん患者 26 人の血清検体の網羅的メタボローム解析により 322 種類の代謝物が検出され、pCR 群（n=13）と non-pCR 群（n=13）における比較で 19 種類の代謝物に有意差が認められた。このうち安定同位体を得ることができた arabitol、betaine、glycine、L-aspartate、L-serine、L-arginine の 6 種類の代謝物に関して標的メタボロミクスによる検証を行った。結果は arabitol、glycine、L-serine、L-arginine において pCR 群で有意に血清濃度が低く、betaine、L-aspartate においても有意差は示されなかったが、網羅的メタボローム解析で得られた結果と同様の傾向が示された。

全ての患者の追跡調査の結果（追跡期間中央値 55 ヶ月）、26 人の患者のうち 16 人は生存し 10 人は死亡していた。年齢、臨床病期、arabitol、glycine、L-serine、L-arginine の血清濃度の 6 因子に関して Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析を行った結果、TTP において L-serine の血清濃度が予後因子となりうることが示された（ハザード比 3.91; p=0.0463）。TTP、CSS ともに L-serine の血清濃度が有意に影響していることが示された（Log-rank 検定；TTP:p=0.0392、CSS:p=0.0204）。

【結論】

網羅的メタボローム解析により術前化学放射線療法の効果予測に有用な可能性がある血清代謝物を同定し、そのうち 6 種類の代謝物に関して安定同位体標識代謝物を用いた標的メタボロミクスを行った。arabitol, glycine, L-serine, L-arginine の血清濃度が有意に pCR 群で低く、特に L-serine の血清濃度は長期予後にも関連している可能性が示唆された。

がん細胞は急速な増殖を可能とするために、積極的に代謝の変化を起こすことが報告されており、がんと代謝の関係が注目されている。今回、バイオマーカー候補となった代謝物は近年、がん細胞において亢進していることで注目されている one-carbon metabolism と呼ばれる代謝経路に関連していた。過去には、食道扁平上皮がんに対する化学放射線療法の効果予測に関するバイオマーカー研究において細胞内抗酸化の重要な調整因子である Nrf2 やがん抑制タンパク p53 の主要な抑制制御因子である MDM2 の過剰発現が治療抵抗性と関連しているとの報告がある。Nrf2, MDM2 ともに serine 代謝との関連が報告されており、serine の血清濃度と治療抵抗性が関連する可能性がある。

以上、本研究は、食道がんに対する化学放射線療法の効果予測に有用な血清代謝物を明らかにしたものであり、生体内代謝の観点から食道がん患者における化学放射線療法に対する治療抵抗性を理解する上で重要な貢献をしたものとし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。