



Serum level of octanoic acid predicts the efficacy of chemotherapy for colorectal cancer

Iemoto, Takao

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7323号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007323>

※ 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

Serum level of octanoic acid predicts the efficacy of chemotherapy
for colorectal cancer

血清オクタン酸レベルによる大腸がんに対する化学療法の効果予測の可能性

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：児玉 裕三 教授)

家本 孝雄

背景

日本では大腸がんの死亡率が増加しており、2015年の人口動態統計によると、全がん死亡のうち大腸がんは女性で第1位、男性では第3位であった。また、治癒切除後の5年生存率は80%以上であったが、切除不能例では10～20%であった。

近年、イリノテカンやオキサリプラチンが導入されたことで、進行大腸がんの生存期間は1～2年程度まで延長した。また、分子標的薬であるセツキシマブの導入により、遠隔転移を有する大腸がん患者の生存期間が延長した。しかし、大腸がん患者における化学療法施行前の効果予測の手法は確立されていない。もし医師が事前に各患者の治療効果予測を行うことができれば、個別化医療の可能性も模索でき、患者のQOLや予後を改善できる可能性がある。

メタボロミクスは低分子化合物を調べる研究領域で、特定の器官や臓器における代謝物の分析が可能であり、その種類や濃度を調べることで生体内の状態を把握することができる。しかし、メタボロミクスを用いた悪性腫瘍に対する治療効果予測に関する論文は、まだ少ない。我々はガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)や液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いて、大腸がんに対する化学療法である、セツキシマブとイリノテカンの併用療法、および、セツキシマブ単剤療法における治療効果予測のバイオマーカー探索を行った。まず、患者の血清検体を用いて、半定量解析による血清中代謝物の網羅的解析を行い、バイオマーカー候補を探査した。次に、候補となった代謝物に対する安定同位体を用いて定量解析を行い、効果予測について検証した。

対象と方法

この研究は国立がんセンターで施行された化学療法の第2相試験の付随研究である。患者登録期間は2008年12月から2015年3月までで、適格基準として組織学的に切除不能あるいは再発大腸がんであること、以前にイリノテカンやオキサリプラチン、フルオロウラシルを用いた化学療法を受けたことがあること、KRAS遺伝子が野生型であることが挙げられる。患者はセツキシマブとイリノテカンの併用療法を行うA群、セツキシマブ単剤療法を行うB群に分けられ、セツキシマブは毎週、イリノテカンは隔週に投与された。これらの治療は、病状の増悪、あるいは、重篤な副作用が見られるまで継続され、治療効果の評価のため8週毎にCT検査が施行された。

血清検体は化学療法1週から4週までの薬剤投与直前に計4回採取された。血清検体を用いて、既報と同様の手順で、GC/MSによる水溶性化合物分析を、LC/MSによ

る脂質、あるいは、アニオン、カチオン分析を行った。治療効果の比較のため Mann-Whitney's U test を用いて単変量解析を行った。標的代謝産物の濃度曲線下面積、感度、特異度を評価するために ROC 解析を行い、カットオフ値を算出した。無増悪期間の評価を行うため、コックス比例ハザード分析やカプランマイヤー分析、ログランクテストを行った。P 値が 0.05 未満を有意差ありと判断した。

結果

計 31 例の患者が研究に参加し、セツキシマブとイリノテカンの併用療法、あるいは、セツキシマブ単剤の化学療法を受けた。観察期間中に 2 例が死亡し、うち 1 例は原病死であったが、もう 1 例の死因は不明であった。観察期間中央値は 781.5 日、平均生存期間は 390 日、無増悪期間は 152 日であった。合計で 123 個の血清検体が集められた。

化学療法の治療効果は、完全奏功例ではなく、部分奏功が 7 例(22.6 %)、不变が 14 例(45.2 %)、増悪が 9 例(29.0%)であった。1 例(3.2 %)は 8 週後の CT 撮影前に死亡したため病変の評価は困難であったが、非 PR 群に含めた。以上より、非奏功群は 24 例(77.4 %)であった。

GC/MS の半定量解析において、我々は 110 個の代謝物を同定し、Mann-Whitney's U test を用いて PR 群と非 PR 群間で治療効果の比較を行った。治療前の検体において、計 2 個(オクタン酸と 1,5-アンドロゲルシトール:1,5-AG)の代謝物に有意差が見られた。安定同位体を用いることで正確な定量化が可能であることから、上記代謝物の安定同位体を用いて定量解析を行った。オクタン酸の血清濃度は PR 群で低く($p=0.043$)、1,5-AG の血清濃度は PR 群で高い($p=0.026$)結果であった。

効果予測の正確性評価のため、ROC 分析で濃度曲線下面積、感度、特異度を算出した。オクタン酸は感度 100 %、特異度 62.5 %、カットオフ値 $4.8 \mu M$ であった。また、1,5-AG は感度 57.1 %、特異度 91.7 %、カットオフ値 $154.5 \mu M$ であった。観察期間中の死亡は 2 例のみと少数であったため、生存期間ではなく、無増悪期間について解析を行った。観察期間中に病状の増悪が見られた患者は 31 例中 14 例であり、無増悪期間は PR 群 162 日、非 PR 群 102.5 日であった。コックス比例ハザード分析を用いた単変量解析では、オクタン酸のみ無増悪期間と相関が見られた($\leq 4.80 \mu M / > 4.80 \mu M$; ハザード比: 3.3; 95% 信頼区間: 1.1-12; $p=0.033$)。

LC/MS の半定量解析では、脂質分析で 200 個の代謝物を、アニオン、および、カチオン分析で 49 個の代謝物を同定し、Mann-Whitney's U test を用いて PR 群と非

PR 群間で治療効果の比較を行った。治療前の検体において、脂質分析で 18 個、アニオン分析で 1 個の代謝物に有意差が見られた。一方、カチオン分析では有意差のある代謝物は確認されなかった。これらの代謝物の安定同位体を入手できなかつたため、定量分析は施行しなかった。同定できた全脂質に対して volcano plot による評価を行った結果、治療前の検体において、非 PR 群で遊離脂肪酸の血清中濃度が高いという傾向が確認できた。

考察

本研究では、メタボロミクスを用いて、治療前に大腸がんの治療効果を予測するための血清バイオマーカー探索を行った。GC/MS の半定量解析では、バイオマーカー候補として、オクタン酸と 1,5-AG が同定された。これらの安定同位体を用いた定量解析では、PR 群と非 PR 群間で治療前の血清オクタン酸濃度に有意な差を認めた。つまり、治療前のオクタン酸濃度は無増悪期間に関係している可能性があり、オクタン酸濃度が低い患者は化学療法により良好な予後を得る可能性があると考えられた。

オクタン酸には *in vitro* 大腸がん、皮膚がん、乳がん細胞の増殖抑制効果が見られ、細胞周期に重要な遺伝子や大腸がんの増殖に必要なサイクリンキナーゼを抑制したと報告されている。一方で、濃度依存性に膀胱がん細胞の増殖を抑制したが、浸潤や転移は抑制できなかったという報告やオクタン酸を含む高脂肪食品の摂取を継続することで肺がん発症の危険性が増加するといった報告もある。上記結果の差異は、がん腫やオクタン酸濃度による相違かもしれないが、さらなる詳細な検討が必要である。

1,5-AG は生体内で代謝されない血漿中のブドウ糖類似物質であり、糖尿病患者の血糖コントロールの指標として利用されている。また、抗インスリン血症やインスリン抵抗性は大腸がんを含めた多くのがん種の危険因子である。本研究では、治療前に血清 1,5-AG 濃度が低い患者では、濃度が高い患者に比べ予後が悪い傾向が観察された。しかし、糖尿病であった患者は 31 人中 1 人のみであり、基礎疾患として糖尿病が影響した可能性は低いと考えられた。一方で、食事の質問票や glycemic index values を調べることで、高脂肪食の摂取がステージ 3 の大腸がんの再発率および死亡率上昇の危険因子であったとの報告があり、この結果は本研究と合致する内容であるが、関連性を確認するためにはさらなる検討が必要である。

本研究における LC/MS の脂質分析では、遊離不飽和脂肪酸が血清サンプルで同定され、非 PR 群で不飽和脂肪酸の血清濃度が高い結果であった。つまり、治療前の不飽和脂肪酸の濃度が低い患者は化学療法により良好な予後を得る可能性があると

考えられた。

この研究にはいくつかの制約があり、標的とした代謝物が化学療法の影響のみでなく病状悪化に伴う全身状態の悪化でも変動しうること、既報が少なく今回対象となった代謝物がなぜ有用であるのかを明らかにできていないこと、これらのバイオマーカーがセツキシマブ主体の化学療法に特異的なのか明らかにできていないこと、サンプルサイズが小さいことが挙げられる。

上記のような制約があるが、オクタン酸濃度は大腸がんに対する化学療法の効果予測に有用であり、患者の QOL や予後を改善でき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2816号	氏名	家本 孝雄
論文題目 Title of Dissertation	<p>Serum level of octanoic acid predicts the efficacy of chemotherapy for colorectal cancer</p> <p>血清オクタン酸レベルによる大腸がんに対する化学療法の効果予測の可能性</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner</p> <p>科地 ひろ 古屋 敏之 河 伸信</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

背景

我々はガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)や液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いて、大腸がんに対する化学療法である、セツキシマブとイリノテカンの併用療法、および、セツキシマブ単剤療法における治療効果予測のバイオマーカー探索を行った。まず、患者の血清検体を用いて、半定量解析による血清中代謝物の網羅的解析を行い、バイオマーカー候補を探査した。次に、候補となった代謝物に対する安定同位体を用いて定量解析を行い、効果予測について検証した。

対象と方法

この研究は国立がんセンターで施行された化学療法の第2相試験の付随研究である。血清検体を用いて、既報と同様の手順で、GC/MSによる水溶性化合物分析を、LC/MSによる脂質、あるいは、アニオン、カチオン分析を行った。標的代謝産物の濃度曲線下面積、感度、特異度を評価するためにROC解析を行い、カットオフ値を算出した。

結果

計31例の患者が研究に参加し、セツキシマブとイリノテカンの併用療法、あるいは、セツキシマブ単剤の化学療法を受けた。合計で123個の血清検体が集められた。

化学療法の治療効果は、完全奏功例ではなく、部分奏功が7例(22.6%)、不変が14例(45.2%)、増悪が9例(29.0%)であった。非奏功群は24例(77.4%)であった。GC/MSの半定量解析において、我々は110個の代謝物を同定し、Mann-Whitney's U testを用いてPR群と非PR群間で治療効果の比較を行った。治療前の検体において、計2個(オクタン酸と1,5-アンヒドログルシトール: 1,5-AG)の代謝物に有意差が見られた。オクタン酸の血清濃度はPR群で低く($p=0.043$)、1,5-AGの血清濃度はPR群で高い($p=0.026$)結果であった。オクタン酸は感度 100%、特異度 62.5%、カットオフ値 4.8 μM であった。また、1,5-AGは感度 57.1%、特異度 91.7%、カットオフ値 154.5 μM であった。コックス比例ハザード分析法を用いた単変量解析では、オクタン酸のみ増悪期間と相関が見られた($\leq 4.80 \mu\text{M} > 4.80 \mu\text{M}$: ハザード比: 3.3; 95%信頼区間: 1.1-12; $p=0.033$)。

LC/MSの半定量解析では、脂質分析で200個の代謝物を、アニオン、および、カチオン分析で49個の代謝物を同定し、Mann-Whitney's U testを用いてPR群と非PR群間で治療効果の比較を行った。治療前の検体において、脂質分析で18個、アニオン分析で1個の代謝物に有意差が見られた。一方、カチオン分析では有意差のある代謝物は確認されなかった。同定できた全脂質に対してvolcano plotによる評価を行った結果、治療前の検体において、非PR群で遊離脂肪酸の血清中濃度が高いという傾向が確認できた。

考察

本研究では、メタボロミクスを用いて、治療前に大腸がんの治療効果を予測するための血清バイオマーカー探索を行った。GC/MS の半定量解析では、バイオマーカー候補として、オクタン酸と 1,5-AG が同定された。治療前のオクタン酸濃度は無増悪期間に関係している可能性があり、オクタン酸濃度が低い患者は化学療法により良好な予後を得る可能性があると考えられた。

オクタン酸には *in vitro* で大腸がん、皮膚がん、乳がん細胞の増殖抑制効果が見られ、細胞周期に重要な遺伝子や大腸がんの増殖に必要なサイクリンキナーゼを抑制したと報告されている。上記結果の差異は、がん腫やオクタン酸濃度による相違かもしれないが、さらなる詳細な検討が必要である。

1,5-AG は生体内で代謝されない血漿中のブドウ糖類似物質であり、糖尿病患者の血糖コントロールの指標として利用されている。また、抗インスリン血症やインスリン抵抗性は大腸がんを含めた多くのがん種の危険因子である。本研究では、治療前に 血清 1,5-AG 濃度が低い患者では、濃度が高い患者に比べ予後が悪い傾向が観察された。しかし、糖尿病であった患者は 31 人中 1 人のみであり、基礎疾患として糖尿病が影響した可能性は低いと考えられた。一方で、食事の質問票や glycemic index values を調べることで、高脂肪食の摂取がステージ 3 の大腸がんの再発率および死亡率上昇の危険因子であったとの報告があり、この結果は本研究と合致する内容であるが、関連性を確認するためにはさらなる検討が必要である。

本研究における LC/MS の脂質分析では、遊離不飽和脂肪酸が血清サンプルで同定され、非 PR 群で不飽和脂肪酸の血清濃度が高い結果であった。つまり、治療前の不飽和脂肪酸の濃度が低い患者は化学療法により良好な予後を得る可能性があると考えられた。オクタン酸濃度は大腸がんに対する化学療法の効果予測に有用であり、患者の QOL や予後を改善できる可能性が示唆された。

以上、本研究は、メタボロミクスの手法を用いて、大腸癌患者で不飽和脂肪酸の濃度が低い患者は化学療法により良好な予後を得る可能性があることを明らかにした。オクタン酸濃度は大腸がんに対する化学療法の効果予測に有用であり、患者の QOL や予後を改善できる可能性を示すなど重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。