

がんの治療効果予測を目指した代謝物バイオマーカーの探索

吉田 優, 藤垣 誠治, 西海 信, 小林 隆

オミックス解析とは、DNA、RNA、タンパク質、低分子代謝物などの生体を構成する分子を網羅的に分析する手法である。その中でも、メタボローム解析は、低分子代謝物を網羅的に解析するもので、表現型に近いことから新たな病態の解明や代謝物バイオマーカーの発見につながる可能性がある。本稿では、筆者らが行っているメタボーム解析を用いた食道がんの化学放射線治療効果を予測する代謝物バイオマーカー研究について紹介する。

1 背景, 目的

食道がんは世界のがん死6番目のがんである¹⁾。局所に進行する病変では、通常、術前化学放射線療法などでがんを縮小させてから手術を行う^{2)~5)}。しかし、術前治療にて十分な治療効果が得られない場合には、術前治療なしですぐに外科的切除を行うほうがその予後がよい^{6)~9)}。そこで、事前に術前治療の効果を予測できれば、無益な術前治療を回避することが可能となり、その予後の改善が期待される。

がん細胞は、ワールブルグ効果に代表されるように正常細胞とは異なる代謝的特徴を有している¹⁰⁾。メタボローム解析は、DNA、RNA、タンパク質、低分子代謝物などの生体を構成する分子を網羅的に分析するオミックス解析の一つで、生体内の代謝物を網羅的に測定する技術である。代謝物は、遺伝子、または、タンパク質の発現によって影響を受けるので、実際の表現型と最も密接かつ直接的に関連している¹¹⁾¹²⁾。そのため、メタボローム解析は多くの疾患バイオマーカー研究^{12)~15)}に適用されており、筆者らも、がんを含むさまざまな疾患研究にその技術を適用している^{16)~21)}。本稿では、筆者らが行った食道がん患者の術前化学放射線療法の治療効果を予測する代謝物バイオマーカー研究について紹介する²²⁾。

2 対象と方法

患者と血清サンプル

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、シスプラチン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²³⁾。すべての患者に対して同一プロトコ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)²⁴⁾²⁵⁾、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)²¹⁾²⁶⁾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た定量解析を行い、検証した。

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(表1)。

食道がん患者26人の血清検体の網羅的メタボローム

表1 被験者の臨床情報と組織学的評価

臨床情報	組織学的評価		p-value (Fisher's exact t-test)
	不完全奏功群 (non-pCR) (N=13)	完全奏功群 (pCR) (N=13)	
年齢			
65歳未満	10	7	0.411
65歳以上	3	6	
性別			0.22
男性	10	13	
女性	3	0	
腫瘍部位 (Tumor location) [†]			0.428
Lt	4	7	
Mt	8	6	
Ut	1	0	
臨床病期 (Clinical stage) [*]			0.529
IIA	1	0	
IIB	2	5	
IIIA	6	4	
IIIB	4	4	

[†] Tumor location was classified according to the Guidelines for Clinical and Pathologic Studies on Carcinoma of Esophagus (9th edition).

^{*} Clinical stage classified according to the Union for International Cancer Control TNM cancer staging (7th edition).

(文献22より改定)

解析により 322 種類の代謝物が検出され、病学的完全奏功 (pCR) 群 ($n=13$) と病学的完全非奏功 (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。

その中でも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ーム解析による検証を行った²⁷⁾ (表 2)。その結果, arabitol, glycine, L-serine, L-arginine において pCR 群で有意に血清濃度が低く変動していた。

すべての患者の追跡調査を行ったところ (追跡期間中央値 55 か月), 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,

表 2 標的代謝物の定量値を用いた評価

代謝物	非完全奏功群 (non-pCR) (N=13)		完全奏功群 (pCR) (N=13)		Fold change†	p-value*
	Mean (μM)	SEM	Mean (μM)	SEM		
Arabitol	13.3	5.86	3.72	0.28	0.28	0.0086
Betaine	62.02	7.08	45.9	3.47	0.74	0.0613
Glycine	360.56	32.04	270.94	21.18	0.75	0.0345
L-Aspartate	42.57	3.50	34.05	2.62	0.8	0.0734
L-Serine	133.99	12.07	96.96	4.37	0.72	0.0106
L-Arginine	139.61	11.59	108.27	7.23	0.78	0.0373

Among the biomarker candidate metabolites identified with the comprehensive metabolomics analysis, 6 metabolites were subject into targeted metabolomics analysis using the corresponding stable isotopes.

† Fold change was calculated from the ratio of the pCR to the non-pCR.

* P-value was calculated from Student's t-test and Mann-Whitney U-test (Only arabitol was non-normal distribution).

(文献 22 より改定)

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。その結果, 無増悪期間 (the time to progression, TTP) において L-serine の血清濃度が予後因子となりうる可能性が示された (ハザード比 3.91; $p=0.0463$) (表 3)。そこで, 次に, 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い, 無増悪期間 (TTP) と補正生存率 (cause-specific survival, CSS) について検討した。その結果, 両者において, L-serine

表 3 臨床因子および血清代謝物の Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析

Variable	Univariate analysis		
	HR	95%CI	p-value*
年齢			
65 歳以上/65 歳未満	0.46	0.096-2.24	0.339
臨床病期 (Clinical stage)†			
IIIA and IIIB/IIA and IIB	5.33	0.97-99.3	0.0551
Arabitol			
>5.384 μM/≤5.384 μM	3.08	0.81-12.5	0.097
Glycine			
>336.3 μM/≤336.3 μM	2.34	0.62-9.52	0.2056
L-Serine			
>110.6 μM/≤110.6 μM	3.91	1.02-18.7	0.0463
L-Arginine			
>138.8 μM/≤138.8 μM	2.77	0.68-10.5	0.1463

Univariate analysis by the Cox proportional hazards model revealed serum L-serine (>110.6 μM vs. ≤110.6 μM; Hazard ratio, 3.91; $p=0.0463$) was significantly correlated with time to progression (TTP).

† Clinical stage classified according to the Union for International Cancer Control TNM cancer staging (7th edition).

* P-value was calculated by likelihood ratio test.

(文献 22 より改定)

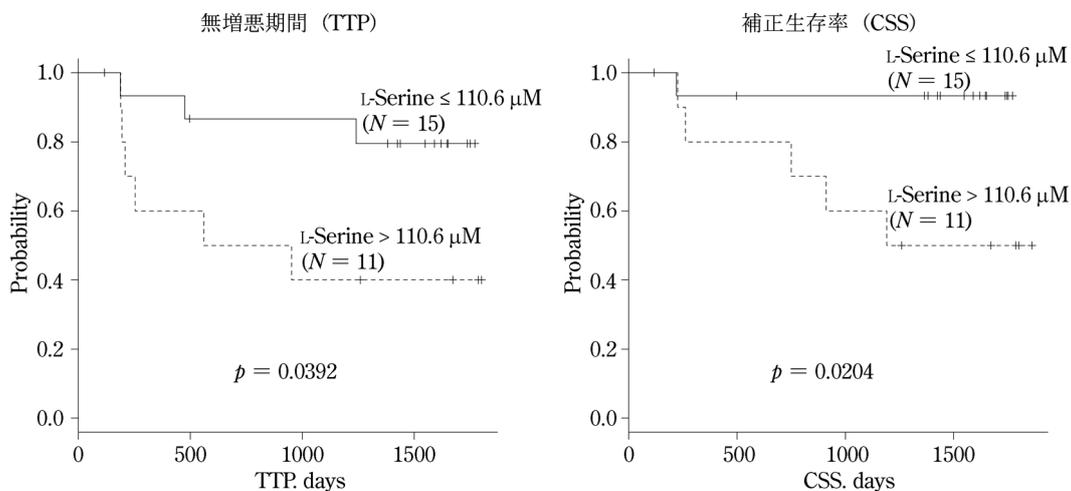


図 1 L-serine の血清濃度に基づいた患者のカプランマイヤー曲線。

生存患者の追跡期間中央値は 1652 日であった。(範囲 1260~1861, IQR 1580~1762)。110.6 μM を超える血清 L-serine 値の 11 人の患者では残りの 15 人の患者と比較して, 進行までの時間 ($p=0.0392$, ログランク検定), ならびに, 補正生存率 ($p=0.0204$, ログランク検定) が有意に短かった。(文献 22 より改定)。

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: $p=0.0204$) (図 1)。すなわち, L-serine の血清濃度が高い場合は, その長期予後が悪い可能性が示唆された。

4 最後 に

オミックス研究は, 従来の仮説証明型研究ではなく, データ先導型研究であり, 新しい知見を見いだすことができる可能性がある。なかでも代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析は, さまざまな疾患の診断マーカー探索で, 現在, 全世界で広く研究がすすめられている。本稿では, 食道がんの術前化学療法の治療効果を予測する代謝物バイオマーカー探索について筆者らの研究を紹介した。中でも, 今回同定された L-serine は, 食道がん治療後の予後にも関連している可能性があり, 今後の臨床での有用性が示唆される。

このようにメタボローム解析は, 疾患診断マーカーの探索だけでなく, 治療効果や毒性予測などにも利用できる可能性がある。臨床家だけでなく, 様々な分析化学に携わる研究者がメタボローム解析への理解を深めることで, 代謝物バイオマーカーの実用化の可能性が高まることが期待される。

謝辞 この研究は, 日本学術振興会科学研究費補助金 (MY) と国立研究開発法人日本医療研究開発機構の AMED-CREST [TK, SN, MY] によるものである。

文 献

- 1) L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-tieulent, A. Jemal : *CA a cancer J Clin.*, **65**, 87 (2015).
- 2) D. P. Kelsen, K. A. Winter, L. L. Gunderson, J. Mortimer, N. C. Estes, D. G. Haller, J. A. Ajani, W. Kochar, B. D. Minsky, J. A. Roth, C. G. Willett : *J Clin Oncol.*, **25**(24), 3719 (2007).
- 3) W. H. Allum, S. P. Stenning, J. Bancewicz, P. I. Clark, R. E. Langley : *J Clin Oncol.*, **27**(30), 5062 (2009).
- 4) P. van Hagen, M. C. Hulshof, J. J. van Lanschot, E. W. Steyerberg, M. I. van Berge Henegouwen, B. P. Wijnhoven, D. J. Richel, G. A. Nieuwenhuijzen, G. A. Hospers, J. J. Bonenkamp, M. A. Cuesta, R. J. Blaisse, O. R. Busch, F. J. ten Kate, G. J. Creemers, C. J. Punt, J. T. Plukker, H. M. Verheul, E. J. Spillenaar Bilgen, H. van Dekken, M. J. van der Sangen, T. Rozema, K. Biermann, J. C. Beukema, A. H. Piet, C. M. van Rij, J. G. Reinders, H. W. Tilanus, A. van der Gaast : *N Engl J Med.*, **366**(22), 2074 (2012).
- 5) J. Shapiro, J. J. B. van Lanschot, M. C. C. M. Hulshof, P. van Hagen, M. I. van Berge Henegouwen, B. P. L. Wijnhoven, H. W. M. van Laarhoven, G. A. P. Nieuwenhuijzen, G. A. P. Hospers, J. J. Bonenkamp, M. A. Cuesta, R. J. B. Blaisse, O. R. C. Busch, F. J. W. Ten Kate, G. M. Creemers, C. J. A. Punt, J. T. M. Plukker, H. M. W. Verheul, E. J. S. Bilgen, H. van Dekken, M. J. C. van der Sangen, T. Rozema, K. Biermann, J. C. Beukema, A. H. M.

- Piet, C. M. van Rij, J. G. Reinders, H. W. Tilanus, E. W. Steyerberg, A. van der Gaast : *Lancet Oncol.*, **16**(9), 1090 (2015).
- 6) A. C. Berger, J. Farma, W. J. Scott, G. Freedman, L. Weiner, J. D. Cheng, H. Wang, M. Goldberg : *J Clin Oncol.*, **23**(19), 4330 (2005).
- 7) M. K. Kim, S. B. Kim, J. H. Ahn, Y. H. Kim, J. H. Kim, H. Y. Jung, G. H. Lee, K. D. Choi, H. Y. Song, J. H. Shin, K. J. Cho, J. S. Ryu, S. I. Park : *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **71**, 725 (2008).
- 8) J. M. Donahue, F. C. Nichols, Z. Li, D. A. Schomas, M. S. Allen, S. D. Cassivi, A. Jatoi, R. C. Miller, D. A. Wigle, K. R. Shen, C. Deschamps : *Ann Thorac Surg.*, **87**, 392-8-9 (2009).
- 9) P. K. Hsu, L. I. Chien, C. S. Huang, C. C. Hsieh, Y. C. Wu, W. H. Hsu, T. Y. Chou : *Interact Cardiovasc Thorac Surg.*, **17**, 4-46660 (2013).
- 10) T. N. Seyfried, R. E. Flores, A. M. Poff : *Carcinogenesis*, **35**, 515 (2014).
- 11) J. L. Griffin, J. P. Shockcor : *Nat Rev Cancer.*, **4**, 551 (2004).
- 12) J. L. Spratlin, N. J. Serkova, S. G. Eckhardt : *Clin Cancer Res.*, **15**, 431 (2009).
- 13) A. Zhang, H. Sun, X. Wang : *Anal Bioanal Chem.*, **404**, 1239 (2012).
- 14) D. B. Liesenfeld, N. Habermann, R. W. Owen, A. Scalbert, C. M. Ulrich : *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **22**, 2182 (2013).
- 15) D. Wishart, R. Mandal, A. Stanislaus, M. Ramirez-Gaona : *Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. Metabolites.*, **6**, 10 (2016).
- 16) S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida : *Metabolomics.*, **6**, 518 (2010).
- 17) M. Ooi, S. Nishiumi, T. Yoshie, Y. Shiomi, M. Kohashi, K. Fukunaga, S. Nakamura, T. Matsumoto, N. Hatano, M. Shinohara, Y. Irino, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida : *Inflamm Res.*, **60**, 831 (2011).
- 18) Y. Shiomi, S. Nishiumi, M. Ooi, N. Hatano, M. Shinohara, T. Yoshie, Y. Kondo, K. Furumatsu, H. Shiomi, H. Kutsumi, T. Azuma, M. Yoshida : *Inflamm Bowel Dis.*, **17**, 2261 (2011).
- 19) S. Nishiumi, T. Kobayashi, A. Ikeda, T. Yoshie, M. Kibi, Y. Izumi, T. Okuno, N. Hayashi, S. Kawano, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida : *PLoS One.*, **7**, 1 (2012).
- 20) T. Kobayashi, S. Nishiumi, A. Ikeda, T. Yoshie, A. Sakai, A. Matsubara, Y. Izumi, H. Tsumura, M. Tsuda, H. Nishisaki, N. Hayashi, S. Kawano, Y. Fujiwara, H. Minami, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida : *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **22**, 571 (2013).
- 21) A. Sakai, M. Suzuki, T. Kobayashi, S. Nishiumi, K. Yamanaka, Y. Hirata, T. Nakagawa, T. Azuma, M. Yoshida : *Biomark Med.*, **10**, 577 (2016).
- 22) S. Fujigaki, S. Nishiumi, T. Kobayashi, M. Suzuki, T. Iemoto, T. Kojima, Y. Ito, H. Daiko, K. Kato, H. Shouji, K. Honda, T. Azuma, M. Yoshida : *Biomark Med.*, Aug. **12**, 827 (2018).
- 23) T. Kojima, J. Hashimoto, K. Kato, Y. Ito, H. Igaki, H. Daiko, M. Onozawa, Y. Hamamoto, H. Shimizu, S. Katano, H. Hara, Y. Tanaka, Y. Saito : *J Clin Oncol.*, **30**, (2012).

- 24) Y. Hirata, T. Kobayashi, S. Nishiumi, K. Yamanaka, T. Nakagawa, S. Fujigaki, T. Iemoto, M. Kobayashi, T. Okusaka, S. Nakamori, M. Shimahara, T. Ueno, A. Tsuchida, N. Sata, T. Ioka, Y. Yasunami, T. Kosuge, T. Kaneda, T. Kato, K. Yagihara, S. Fujita, T. Yamada, K. Honda, T. Azuma, M. Yoshida : *Clin Chim Acta.*, **468**, 98 (2017).
- 25) S. Nishiumi, T. Kobayashi, S. Kawana, Y. Unno, T. Sakai, K. Okamoto, Y. Yamada, K. Sudo, T. Yamaji, Y. Saito, Y. Kanemitsu, N. T. Okita, H. Saito, S. Tsugane, T. Azuma, N. Ojima, M. Yoshida: *Oncotarget; Adv Online Publ Page* 5 (2017).
- 26) A. Matsubara, Y. Izumi, S. Nishiumi, M. Suzuki, T. Azuma, E. Fukusaki, T. Bamba, M. Yoshida : *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed Life Sci.*, **969**, 199 (2014).
- 27) C. Bueschl, R. Krska, B. Kluger, R. Schuhmacher : *Anal Bioanal Chem.*, **405**, 27 (2013).



吉田 優 (Masaru YOSHIDA)

神戸大学大学院医学研究科内科系講座病因病態解析学分野・内科学講座消化器内科学分野 (〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1)。神戸大学医学部医学科。博士 (医学)。《現在の研究テーマ》メタボロミクスによる疾患診断・治療効果予測マーカーの開発。《主な著書》消化器疾患の質量分析。西海信, 吉田優。“医用質量分析ガイドブック”, (丹羽利充, 野村文夫 編) (診断と治療社). pp. 90-94 (2013)。《趣味》トレイルランニング・アウトドア・登山・釣り。

E-mail : myoshida@med.kobe-u.ac.jp

藤垣誠治 (Seiji FUJIGAKI)
製鉄記念広畑病院消化器内科 (〒671-1122 兵庫県姫路市広畑区夢前町 3-1)。神戸大学医学部医学科, 博士 (医学)。

西海 信 (Shin NISHIUMI)
兵庫医科大学疾患オミクス解析学講座 (〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町 1 番 1 号)。神戸大学大学院自然科学研究科。博士 (農学)。《現在の研究テーマ》メタボローム解析に基づいた代謝物バイオマーカー研究。《主な著書》“早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線 Frontier of Next-generation Cancer Testing Technology for Detection and Response” (分担執筆), (シーエムシー出版), (監修: (編集) 次世代がん検査技術企画部会), 担当: [第 3 編 消化器・泌尿器がん検査] 第 10 章 メタボロミクスによる早期大腸がんスクリーニングシステムの開発, p91-p98。

小林 隆 (Takashi KOBAYASHI)
神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野, 神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座地域医療ネットワーク学分野 (〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1)。神戸大学医学部医学科, 神戸大学大学院医学研究科。博士 (医学)。《現在の研究テーマ》膵がんのバイオマーカー開発。《主な著書》“【10 mm 以下膵癌の診断に挑む】膵癌早期発見をめざしたバイオマーカー探索と検診への展望”, 小林隆, 西海信, 吉田 優, 児玉裕三, 本田一文, 胆と膝 41 (4) 387-391, (医学図書出版)。《趣味》アクアリウム。
E-mail : kobatak@med.kobe-u.ac.jp

原稿募集

創案と開発欄の原稿を募集しています

内容: 新しい分析方法・技術を創案したときの着想, 新しい発見のきっかけ, 新装置開発上の苦心と問題点解決の経緯などを述べたもの。但し, 他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意: 1) 会員の研究活動, 技術の展開に参考になるよう, 体験をなるべく具体的に述べる。物語風でもよい。2) 従来の分析方法や装置の問題点に触れ, 記事中の創案や開発の意義, すなわち主題の背景を分かりやすく説明する。3) 図や表, 当時のスケッチなどを用いて理解しやす

くすることが望ましい。4) 原稿は図表を含めて 4000~8000 字 (図・表は 1 枚 500 字に換算) とする。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社) 日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]