

(a) 従来マーカーHVA/VMAによる予測値
 (b) 新規マーカー3-MTS、CTN、CORによる予測値

新たな神経芽腫尿中バイオマーカーの特定

名古屋大学大学院医学系研究科小児外科学の横田 一樹 助教、内田 広夫教授、希少性・難治性がん解析研究講座の檜 顕成 特任教授は、(株)日立製作所の協力のもと、神経芽腫患児の尿中代謝物の網羅解析（液体クロマトグラフ質量分析計^{※1}）により、神経芽腫に重要な3つの代謝経路を特定し、これら3つのバイオマーカー（3-methoxytyramine sulphate（3-MTS）、cystathionine（CTN）、cortisol（COR））の予測値^{※2}を使用することで神経芽腫患児（15例）と対照群（39例）を区別することに成功しました。

神経芽腫は脳腫瘍を除いた小児期発症の固形腫瘍のなかで最も頻度が高く、高リスク神経芽腫の5年無増悪生存率は30-40%と予後不良で小児がんによる死亡原因第2位の疾患です。神経芽腫の診断にはHVA/VMAが使用されますが、時にこれらのバイオマーカーが偽陰性となる神経芽腫症例を認めていました。

本研究では神経芽腫患児15例において従来のバイオマーカーであるHVA/VMAの予測値を使用した場合、予測値が偽陰性となる症例を2例認めました。一方、網羅解析で特定した3種類（3-MTS、CTN、COR）の新たなバイオマーカーの予測値は神経芽腫患児15例全例で陽性となりました。以上より、網羅解析で同定した異なる代謝系の3種類の尿中代謝物は神経芽腫の診断に有用なバイオマーカーとなる可能性が示されました。

同様に、他のがん種においてもがん種特有の代謝経路を特定し、各がん種に貢献度の高い尿中代謝物を組み合わせることで、がんの診断に有用なバイオマーカーとなることが期待されます。本研究成果は、2021年2月18日付（日本時間19時）国際科学雑誌Scientific Reportsに掲載されました。

ポイント

- 神経芽腫患児の尿中代謝物の網羅解析（液体クロマトグラフ質量分析計）により、神経芽腫に重要な3つの代謝経路を特定し、これら3つのバイオマーカー（3-methoxytyramine sulphate（3-MTS）、cystathionine(CTN)、cortisol(COR)）の予測値で神経芽腫患児と対照群を区別することに成功しました。
- 神経芽腫患児 15 例において従来のバイオマーカーである HVA/VMA の予測値を使用した場合、予測値が偽陰性となる症例を2例認めました。一方、網羅解析で特定した3種類（3-MTS、CTN、COR）の新たなバイオマーカーの予測値は神経芽腫患児15例全例で陽性となりました。
- 他のがん種においてもがん種特有の代謝経路を特定し、各がん種に貢献度の高い代謝物を組み合わせることで、がんの診断に有用な新たなバイオマーカーとなることが期待されます。

1. 背景

小児がんは稀な疾患でありがん全体の1パーセント未満に過ぎませんが、小児の死亡原因第2位であるため早期診断を可能とする検査法が望まれています。一般的にがん検査の主流は、血液検査や画像検査（CT/PET等）ですが、これらの検査は小児にとって侵襲的であり、痛み、放射線暴露を伴い、時に検査に伴う鎮静が必要となります。リキッドバイオプシー^{※3}に関する最近の研究の主流も血液サンプルですが、小児にとっては血液検査より尿検査などのより低侵襲な検査法が望ましいと考えています。実際に尿には多数の代謝物が含まれているため、小児がん領域に限らず様々な領域で、尿を用いたポリアミン^{※4}やマイクロRNAによる研究等が行われています。

私たちは、腫瘍の性状と尿中代謝物（HVA/VMA）との関連性が証明されている神経芽腫について、HVA/VMA以外の尿中代謝物に着目しました。神経芽腫の診断にはHVA/VMAが使用されますが、時にこれらのバイオマーカーが偽陰性となる症例を認めていました。そこで神経芽腫患児の尿中代謝物の網羅解析（液体クロマトグラフ質量分析計）により神経芽腫に重要な代謝経路を特定し、それらの代表的な代謝物をバイオマーカーとして使用することで、より正確な神経芽腫の早期診断につながる可能性があると考えました。

2. 研究成果

神経芽腫患児（15例）と対照群（39例）の尿中代謝物を網羅解析し998種類の尿中代謝物を確認しました。これら代謝物のうち外因性物質を除去し、神経芽腫群で有意に増加した代謝物の代謝経路（チロシン代謝、メチオニン代謝、ステロイド代謝、ロイシン代謝）を特定しました。

次いで、OPLS-DA^{※5}により、神経芽腫群と対照群との判別を試みました。異なる代謝系の物質を様々な組み合わせで検討した結果、3-メトキシチラミン硫酸塩（3-MTS）、シスタチオニン（CTN）、コルチゾール（COR）を組み合わせたところ、適合度と予測性能が高いモデルが得られることがわかりました。以上より、この3種類の組み合わせを新たな神経芽腫尿中バイオマーカーとしました。従来の腫瘍マーカーであるHVA、VMAと、3種類の新たな神経芽腫尿中バイオマーカー（3-MTS、CTN、およびCOR）において神経芽腫のリスクを比較検討したところ、従

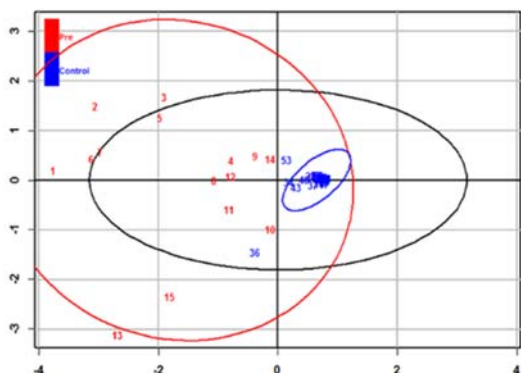
来の腫瘍マーカーである HVA、VMA の予測値は神経芽腫患児 15 例中 2 例で偽陰性を示しましたが、新たな神経芽腫尿中バイオマーカー（3-MTS、CTN、および COR）の予測値は神経芽腫患児（15 例）全例で陽性となりました。一方、対照群では、生後 7 か月の症例で偽陽性となりました。1 歳未満ではこれら代謝物の濃度が高めである可能性が示唆されています。尚、予測値は正の値で神経芽腫のリスクが高いことを、負の値でリスクが低いことを示します。

表 1：ランダムフォレスト法によって評価した神経芽腫に貢献度の高い 19 種類の代謝物

Rank	Metabolites	Fold-change (neuroblastoma/control)	Increase or Decrease	p value	Super pathway	Sub pathway
1	homovanillate (HVA)	17	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
2	3-methoxytyramine sulfate	12	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
3	vanillylmandelate (VMA)	27	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
4	vanillactate	31	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
9	3-methoxy-4- hydroxyphenylglycol	19	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
10	cystathionine	11	increase	<0.01	Amino Acid	Methionine Metabolism
11	3,4- dihydroxyphenylacetat e	19.	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
13	3,4- dihydroxyphenylacetat e sulfate	9.3	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
14	dopamine 3-O-sulfate	7.8	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
17	dehydroascorbate	0.29	decrease	0.02	Cofactors	Ascorbate Metabolism
18	3-methoxytyrosine	13	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
19	alpha- hydroxyisovalerate	3.6	increase	<0.01	Amino Acid	Leucine Metabolism
23	N2,N5-	0.56	decrease	<0.01	Amino	Arginine

	diacetylmethionine				Acid	Metabolism
24	urea	0.77	decrease	<0.01	Amino Acid	Arginine Metabolism
25	cortisol	10	increase	<0.01	Lipid	Corticosteroids
26	3-methoxytyramine	10	increase	<0.01	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
28	homocitrulline	0.33	decrease	<0.01	Amino Acid	Arginine Metabolism
29	tylgly carnitine (C5)	0.77	decrease	0.018	Amino Acid	Leucine Metabolism
30	xanthurenate	0.49	decrease	<0.01	Amino Acid	Tryptophan Metabolism

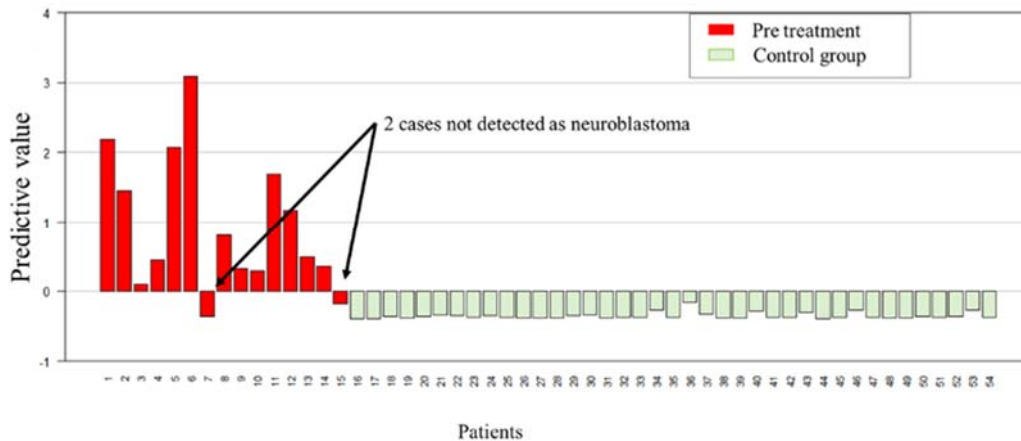
図 1



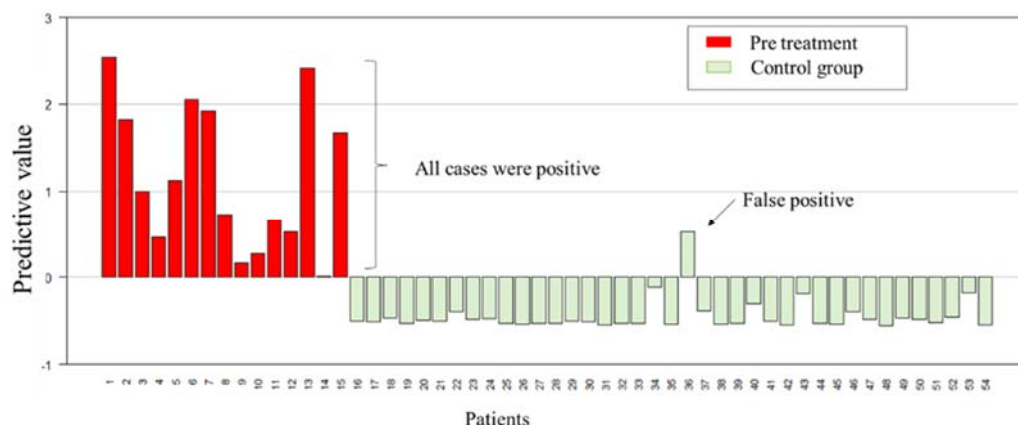
3-MTS、CTN、COR をマーカーとした OPLS-DA による判別分析の結果

図 2

(a)



(b)



(a) 従来マーカーHVA/VMAによる予測値

(b) 新規マーカー3-MTS、CTN、CORによる予測値

3. 今後の展開

質量分析計をはじめ医療機器の進歩により、これまで測定できなかった低濃度の代謝物の測定が可能になっています。本研究ではHVA/VMA以外の新たなバイオマーカーを特定するために、尿中代謝物の網羅解析を行い、重要な代謝経路と代謝物を特定することで予測値による神経芽腫リスクの分析方法を考案しました。今後は本研究で特定した神経芽腫尿中バイオマーカー（3-MTS、CTN、およびCOR）の有効性を検証していきます。また、本手法は今後のさらなる研究展開により、有効なバイオマーカーが発見されていないがん種において、新たなバイオマーカーの特定に繋がる有力な手法となる可能性があります。

4. 用語説明

※1 液体クロマトグラフ質量分析計

液体クロマトグラフ（HPLC）に量分析計（MS）を結合させた装置で、質量スペクトルによる分子構造や分子量の推定、成分の同定・定量の分析が可能

※2 予測値

予測値 = 係数 × バイオマーカー1の相対強度 + 係数 × バイオマーカー2の相対強度 + 係数 × バイオマーカー3の相対強度

※3 リキッドバイオプシー

身体への負担が少ない低侵襲性の液性検体（血漿や尿など）を利用して主にがん診断に役立つ技術

※4 ポリアミン

分子中にアミンを複数含む、低分子の塩基性物質。全ての細胞内で作られる物質で、細胞の増殖に深く関連しており、細胞分裂がさかんな組織では高濃度存在する。

※5 OPLS-DA

Orthogonal Partial Least Squares -Discriminant Analysis 直交部分的最小二乗回帰判別分析

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Scientific Reports

論文タイトル : Identification of novel neuroblastoma biomarkers in urine samples

著者 : Kazuki Yokota¹, Hiroo Uchida^{1*}, Minoru Sakairi^{2,3}, Mayumi Abe², Yujiro Tanaka¹, Takahisa Tainaka¹, Chiyo Shirota¹, Wataru Sumida¹, Kazuo Oshima¹, Satoshi Makita¹, Hizuru Amano¹, Akinari Hinoki³

所属 : ¹ Department of Pediatric Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan.

² Hitachi, Ltd., R & D Group, Centre for Exploratory Research, Tokyo 185-8601, Japan

³ Department of Rare/ Intractable Cancer Analysis Research, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

DOI : 10.1038/s41598-021-83619-w

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Sci_Rep_210218en.pdf