

メタボロミクスのバイオマーカー探索への応用

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部第2室長 齊藤 公亮

代謝物を網羅的に測定・解析するメタボロミクスは、分析機器性能・技術の向上により様々な分野への応用が広がっている。疾患や医薬品による有害作用のバイオマーカー探索もそのひとつで、著者らを含めて論文が数多く報告されてきた。一方、メタボロミクスによって同定されたバイオマーカーが表立って実用化された例は未だ存在しない。そこで本稿では、著者らが実施したメタボロミクスによるバイオマーカー探索の実例と、実用化に至らない原因、そして普及に向けた動きについて著者らの経験を含めて紹介したい。



1 はじめに

メタボロミクスは代謝物を網羅的に解析するオミックス手法（網羅的解析手法）のひとつであり、セントラルドグマの最下流に位置するタンパク発現変動によって引き起こされる代謝物の変動を眺望可能にする。ここ20年における解析システムの飛躍的な進歩に伴って分析可能な代謝物数が飛躍的に増加し、医学、薬学、農学をはじめ様々な分野へと応用が広がってきた。疾患や医薬品による有害作用などのバイオマーカー探索もそのひとつで、“metabolomics/lipidomics”と“biomarker”をキーワードにして検索すると、2002年の5報から年々飛躍的に増加し、2020年は2,345報が報告されるに至っている（図1）。バイオマー

カーを探索するうえでのメタボロミクスの利点は、代謝物はタンパク発現変動の下流に位置し、表現型との関連性が各種オミックスの中で最も高いと考えられる点、体内を循環するため、血液、尿や脳脊髄液など、リキッドバイオプシーによって評価ができる点があげられる。

一方で、ヒトから検出された代謝物は現在のところ10万分子を超えるが¹⁾、ひとつのプラットフォーム（以降、PFと略す）で連続的かつ定量的に評価できる分子は最大でも1,000分子に満たない。また、1検体あたりの代謝物カバレッジ（測定代謝物数）とスループット（検体数・測定時間）は相反関係にあり、目的に応じてPF構成（試料導入力、前処理法、測定対象代謝物、分離法、分析時間など）の調整が必要となる。

メタボロミクスを用いて代謝物バイオマーカー探索を行う場合、まず解析対象となる検体数と種類、病態などの特性から、PF構成を選択する。ただ解析PFは一朝一夕で構築できるものではなく、保有しているPFのうち有効そうなものを直接あるいはマイナーチェンジして用いたり、論文等で公開されているPFから導入できそうなものを模倣したりするが多い。最近では受託機関も増えてきており、外注するという手段もある。いずれにせよ選択したPFについて、定量性や測定分子の同定確度などの特性をよく理解したうえで用いることが有用なバイオマーカー候補を得るうえで重要である。例えば、質量電荷比 m/z や MS^2 情報のみで代謝物をライブラリー照合した場合は、同一保持時間にて得られる別分子のフラグメントやアダクト、あるいは構造

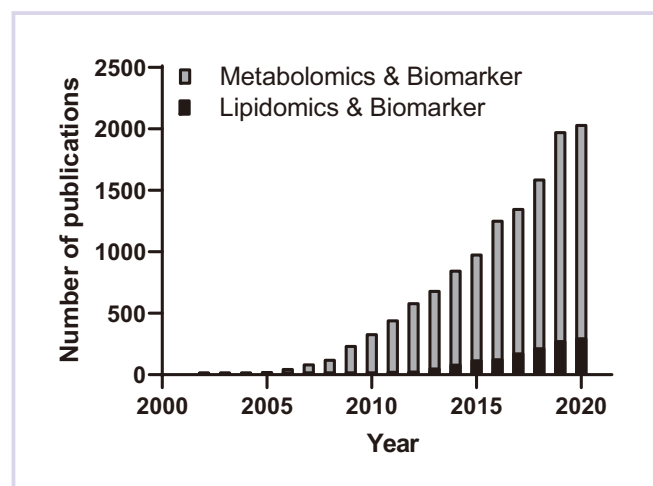


図1 キーワードによるPubmed検索結果

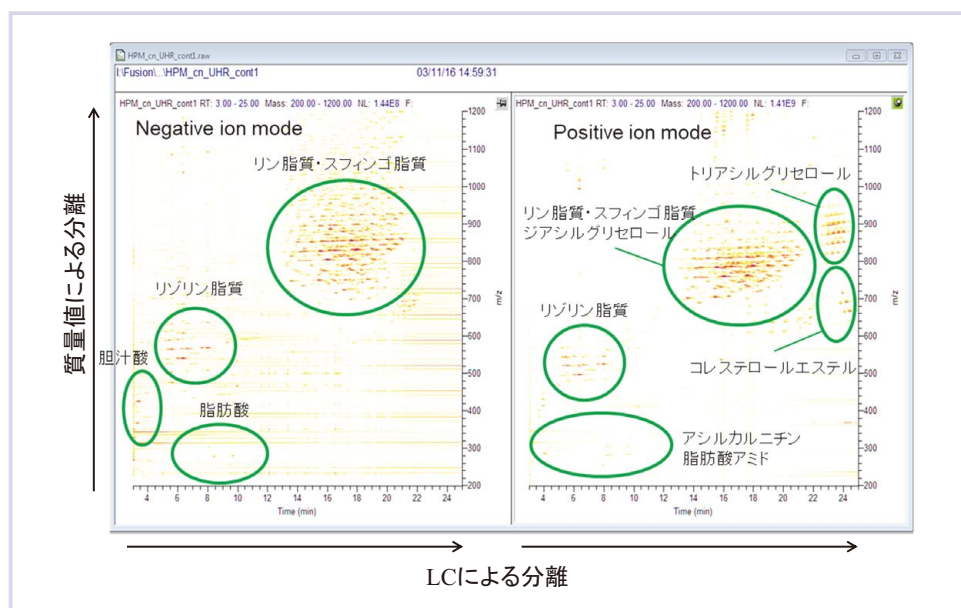


図2 ヒト血漿のメタボロミクスデータ取得例

異性体であることがありうるし、標準品で照合したとしても分離が不十分な場合は、構造異性体のような別分子をバイオマーカー候補として取り違えてしまうこともありうる。

2 代謝物バイオマーカー探索の実例

以上を踏まえて、脂質を対象としたノンターゲットPFを用いてヒト血漿を解析すると、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、中性脂質を中心に数百分子の測定結果を得ることができる(図2)。分離部の保持時間と質量電荷比(m/z)をxy軸に取り、検出イオン量に応じた色の濃淡をつけるとちょうど2次元電気泳動のような図になる。当然アダクトやフラグメントを含むが、この図の1ドットが1分子に相当することとなる。導入量を増やせば測定可能な分子数を1,000分子以上に増やすことは可能であるが、質量分析計の汚れによる感度低下やイオン量の飽和のため、連続測定や定量的な評価が難しくなる。図3は薬物性肝障害症例の急性期検体と回復期検体から得られた網羅的な脂質分子を、効果量 g と有意水準 p を用いてプロットした結果を示す。同図における効果量の絶対値が高く、有意水準の低い分子がバイオマーカー候補になるが、PLS-DA (partial least squares - discriminant analysis) や OPLS (orthogonal projections to latent

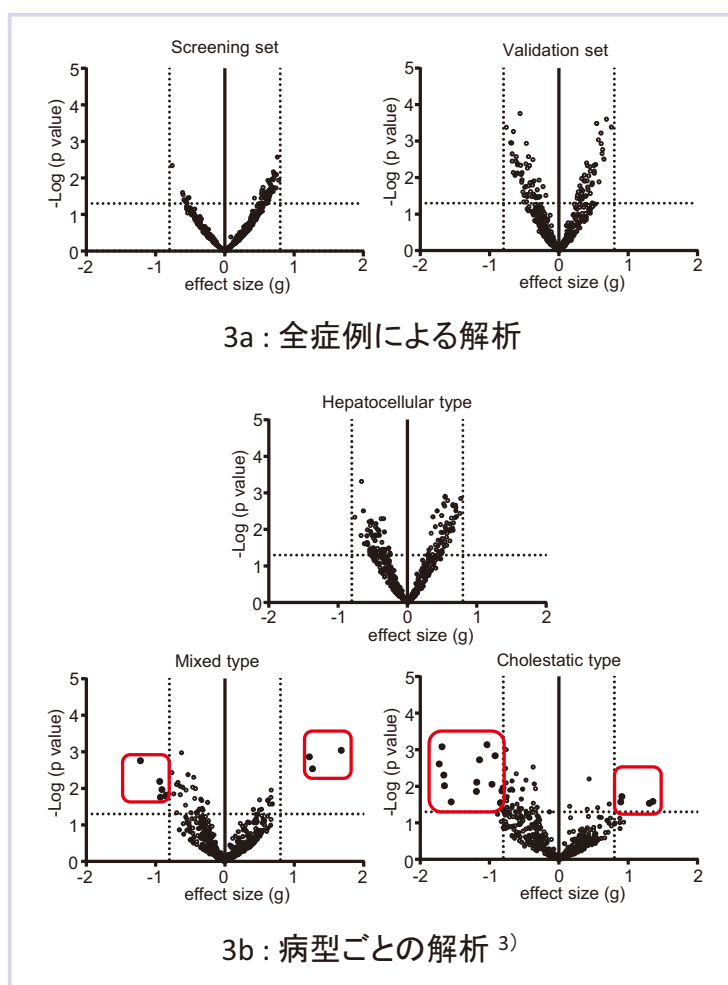


図3 薬物性肝障害急性期と回復期における血漿中脂質レベルの比較
2群間の比較結果を有意水準(p)の $-\text{Log}$ 値と効果量(g)でプロットした。効果量0.8以上、有意水準0.05以下を有望なバイオマーカー候補として抽出している(赤枠内)

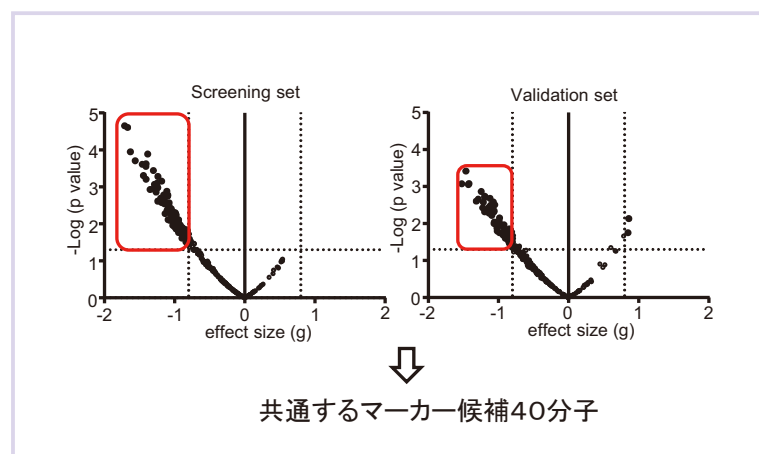


図4 薬剤性間質性肺炎急性期と回復期における血漿中脂質レベルの比較
2群間の比較結果を有意水準 (p) の $-\log$ 値と効果量 (g) でプロットした。効果量0.8以上、有意水準0.05以下を有望なバイオマーカー候補として抽出している (赤枠内)。

structures) -DA を行い、ローディングプロットや VIP (variable importance for prediction) から寄与の大きい分子を選ぶ方法もある²⁾。図 3a に示す通り、薬物性肝障害全症例を収集施設からスクリーニングセットとバリデーションセットに分けると、設定した閾値 ($|g| \geq 0.8$ および $p \leq 0.05$) を満たす分子は存在しなかった。一方、図 3b に示す通り、薬物性肝障害症例をタイプごとに分けると混合型および胆汁うっ滞型で閾値を満たす分子が存在し、症例数が少ないため検証はできていないが、混合型および胆汁うっ滞型のバイオマーカー候補として、それぞれセラミドおよび奇数長脂肪酸含有ホスファチジルコリンを得た³⁾。

一方、図 4 は薬剤性間質性肺炎症例の急性期検体と回復期検体から得られた網羅的な脂質分子を効果量 g と有意水準 p を用いてプロットした結果を示す。図に示す通り、薬物性間質性肺炎症例を収集施設からスクリーニングセットとバリデーションセットに分けると設定した閾値 ($|g| \geq 0.8$ および $p \leq 0.05$) を満たす分子が存在した。現在論文投稿中のため分子名は出すことができないが、有望な分子について、非発症例や健康成人との比較、その他の肺疾患の比較、既存バイオマーカーとの比較を行い、その結果をもとに医薬品医療機器総合機構 (PMDA) のバイオマーカーとしての適格性評価を受ける予定である。

3 代謝物バイオマーカーが実用化に至らない原因

上述の通り、実用化に有望な薬物性間質性肺炎症例の発症を反映するバイオマーカーを得ることができた。しかしながら、筆者らの研究グループを含めて、年間 2,000 報以上も論文報告があるものの、メタボロミクスによって

同定されたバイオマーカーが、アメリカ食品医薬品局 (FDA) や欧州医薬品庁 (EMA) の qualified biomarker (PMDA の適格性評価は未公開) として収載されたケースはいまだに存在せず、体外診断薬として承認されたものもほとんど存在しない。従って、論文化から実用化には大きな壁が存在しており、その壁の要因は大きく分けて A) バイオマーカー探索過程に起因する要因と B) バイオマーカーの特性に起因する要因に大別できると考えられる。その代表的な例を以下で述べる。

3-A バイオマーカー探索過程に起因する要因

実用化に至らないケースはまず、得られたはずのバイオマーカー候補がそもそも症例群と対照群の差を反映しないバイオマーカーであるケースが考えられる。このようなケースでは探索過程になんらかの問題が存在することが多い。例えば、用いた検体の質や数が不十分である場合には、症例群と対照群の本来の差ではなく、単純な個人差の偏りや、検体の採取保管条件の差をバイオマーカー候補として選択してしまうことがありうる。実際に過去の論文では、採血から血漿あるいは血清分離までの条件 (時間、温度、遠心速度、検体保管温度等) のわずかな差によっても消失や生成が起きる分子が存在することが示唆されているが^{4)~6)}、検体収集施設が異なる例、偏りがある例、同一の収集施設であっても採取からの保管期間・条件が異なる例が論文で散見されることから、このようなケースでは異なる検体セットでのバリデーションをしたうえでないと実用化を目指すことも難しい。

この他にも、2 項でもふれた同定の確度の低さや、症例群あるいは対照群に特異的なマトリックス効果やボイド効果など、取得したメタボロミクスデータの特性に関する理解不足も症例群と対照群の差を反映しないバイオマーカーを選択してしまう要因としてあげられる。

3-B バイオマーカーの特性に起因する要因

次に、選択したバイオマーカー候補が実際に症例群と対照群の差を反映するバイオマーカーであったとしても、得られる分析結果が実用化に資さないケースが考えられる。まず挙げられるケースが、前処理を含めた分析の再現性や信頼性が得られないケースである。原因は多様ではあるが、例を挙げると、選択したバイオマーカーが採取・保管を含めて前処理において不安定であるケースや、物性や存在量の

少なさから複雑な前処理が必要であり安定的な回収ができないケースなどがある。

また、選択したバイオマーカー候補にバイオリジカルな（統計的な）差は明らかであっても、実際に臨床で識別・判別に供せるほどの差がないケースも多い。図5は抗がん剤奏効性の事前予測バイオマーカー候補として報告した分子の血中レベルを示しているが、全体を見れば差は明確であるものの、個々の症例に目を移せば有効か無効か判断がつかない症例がでてくる。このようなバイオマーカー候補では知見としては有用なので論文化は可能であっても、実用化の意義は小さい。

さらに、バイオマーカー候補の性能が高いとしても、既存のバイオマーカーの性能がより高く、より広く普及しており、用途の使い分けができないケースもある。代表的な例としては、代謝物ではないが GLDH（グルタミン酸デヒドロゲナーゼ）が上げられ、肝障害のバイオマーカーとしての性能は高く、ミトコンドリア障害というメカニズムを示唆することができるものの、今のところ ALT などの既存バイオマーカーに対する優位性を示せておらず、FDA qualified biomarker として収載されるには至っていない。既存バイオマーカーに有用なものが無い症例こそメタボロミクスによるバイオマーカー探索が活用され、そのうえで安定的に分析でき、単純に症例と対象の識別・判別性能が高いバイオマーカー候補の探索を行うことが必要と考えられる。

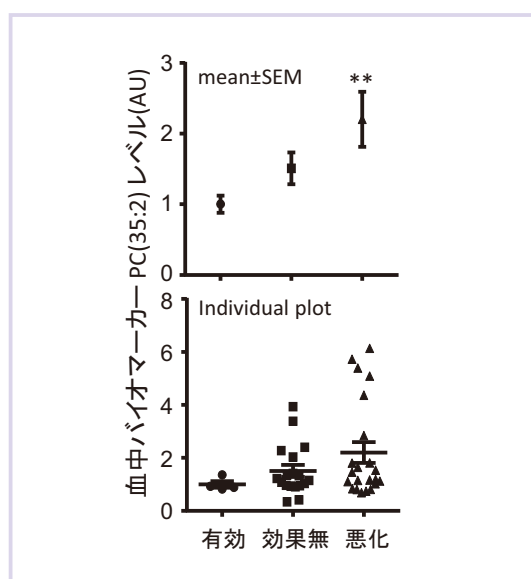


図5 ソラフェニブの奏効性を予測する代謝物バイオマーカーの投薬前血中レベル

ソラフェニブ投薬前血漿を用いて代謝物レベルを測定し、投薬後のフォローアップにより判定した奏効性との関連性を評価して得たバイオマーカーについて、各群をまとめたプロットと個別の症例データを表示。

4 おわりに

前述した通り、メタボロミクス解析を用いたバイオマーカー探索はまだ道半ばという状況である。一方で、その重要性は認知されつつあり、代謝物バイオマーカーなどを対象とした分析バリデーション法に関する留意点文書がFDAの関連機関であるCritical Path Instituteから公表された⁷⁾。また、我が国においても筆者も参画している産官共同によるAMED 研究班において「バイオマーカーの分析法バリデーションに関する概念文書」が作成されて近日公開予定であり、メタボロミクス解析によって得られたバイオマーカーが普及していく基盤が整いつつある。また、エクソソームのような精製された血中画分からバイオマーカーを探索する手法も開発され、より標的とする臓器などにおける変動・変化を反映する画分を捉えることが可能になってきた。有用なバイオマーカーが存在しない疾患や医薬品等による有害作用の判別・識別、早期診断、予測に対して、メタボロミクス解析が、新たなバイオマーカーを生み出していく原動力となることに期待したい。

なお、本稿は経験に基づく個人的な見解を述べており、必ずしも厚生労働省や国立医薬品食品衛生研究所の公式見解と同じではないことを末尾に付させていただきます。

文 献

- 1) D. S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu et al.: "HMDB 4.0 : the human metabolome database for 2018", p.608, (2018), (Nucleic Acids Research).
- 2) K. Saito, K. Goda, A. Kobayashi et al.: *J Appl Toxicol.*, **37**, 943 (2017).
- 3) K. Saito, T. Kagawa, K. Tsuji et al.: *Metabolites*, **10**, 355, (2020).
- 4) S. Takehana, H. Yoshida, S. Ozawa et al.: *Clin Chim Acta*, **455**, 68, (2016).
- 5) B. Burla, M. Arita, M. Arita et al.: *J Lipid Res.*, **59**, 2001, (2018).
- 6) K. Saito, S. Ueno, A. Nakayama, et al.: *J Pharm Sci.*, **108**, 3737, (2019).
- 7) S. P. Piccoli, J. M. Sauer: "Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices", (2019), (Critical Path Institute).

著者略歴

2008年～ National Institutes of Health, National Institute of Environmental Health Science, Predoctoral Fellow
 2010年 千葉大学 医学薬学府 創薬生命科学専攻 博士課程修了 博士(薬学)
 2010年～ National Institutes of Health, National Institute of Environmental Health Science, Postdoctoral Fellow
 2012年～ 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 研究員
 2014年～ 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官
 2017年～ 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長
 〈研究領域〉
 メタボロミクスを用いたバイオマーカー探索
 バイオマーカー分析の標準手法の開発
 〈学会活動等〉
 2018年～ 日本薬物動態学会 代議員
 2021年～ 日本薬学会 関東支部会 幹事