

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22859

研究課題名（和文）早期食道がんに対するメタボローム解析

研究課題名（英文）Metabolome analysis for early stage esophageal cancer

研究代表者

坂下 信悟（SAKASHITA, SHINGO）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：40620638

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌の発生に代謝を含む微小環境が悪性化の素地を形成しているのではないかと考え、解析を行った。食道の粘膜切除検体を用い、上皮内病変(Tis-1a)と粘膜下浸潤病変(T1b)の低酸素環境について免疫染色、血管、低酸素内視鏡の3つを用いて解析を行った。それぞれ、正常と腫瘍の間で有意差がるマーカー、Tis-1aとT1bとの間で差があるマーカーなどが存在したが、総じてT1aとT1bとの間に大きな差がある事がわかった。また、メタボローム解析においても、T1aとT1bとの間に差がある多数の代謝産物が見つかり、食道癌では非浸潤癌と非浸潤癌とで代謝環境が大きく異なる事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期の食道癌において、リンパ節転移をしない非浸潤性の食道癌とリンパ節転移をきたしうる浸潤性の食道癌の低酸素環境、代謝環境が異なる事を示した。これは、食道癌の初期悪性化のメカニズム解明につながる可能性がある、非常に重要な発見である。特に、癌の発生に関わるとされるDriver mutationと思われるような共通する遺伝子異常が見つかっておらず、癌の発生は未だ謎に包まれている。今回の発見は、食道癌の予防という観点からも非常に重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that the microenvironment, including metabolism, may form a predisposition for malignant transformation in the development of esophageal carcinoma. Using mucosectomy specimens of the esophagus, we analyzed the hypoxic environment of intraepithelial lesions (Tis-1a) and submucosal invasive lesions (T1b) using immunostaining, vascular, and hypoxic endoscopy. There were some markers that differed significantly between normal and tumor, and some markers that differed between Tis-1a and T1b, but in general, a large difference was found between T1a and T1b. Metabolomic analysis also revealed a number of metabolites that differ between T1a and T1b, and in esophageal cancer, the metabolic environment is different between non-invasive and invasive cancer. The metabolic environment of esophageal cancer differs significantly between non-invasive and invasive cancers.

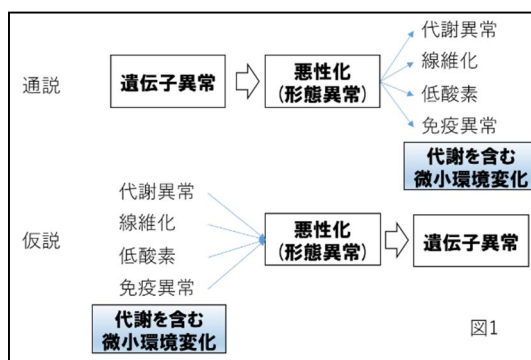
研究分野：診断病理

キーワード：早期食道癌

1. 研究開始当初の背景

申請者は現在まで、肺がんの初期悪性化に関わる分子生物学的検討を行い、多くの遺伝子検索を行ってきた。がんの発生について遺伝子異常の積み重ねという理論で説明できるのは肺がんのごく一部であり、特に扁平上皮がんの発生進展については説明できていないことがわかった。この点について私は、微小環境も腫瘍発生に非常に重要な関与をしているのではないかと考えている。本研究には前がん病変および早期がん病変のサンプル採取が重要になるため、内視鏡的に観察・生検が可能な食道がんを選択し、検討することとした。

初期食道がんは病理学的に上皮内異形成病変(Dysplasia)からはじまる。それらの細胞は増殖能が高いと推測されているが、ポリープ状、乳頭状など、細胞の数が増えて起こるような肉眼的な形態変化は起きていない。それにも関わらず早期の段階で代謝異常が起こっていることが示唆される現象が認められる。その一つが、内視鏡的に、ルゴール添加後に不染帯を示すという現象である。つまり、早期からすでにグリコーゲンが枯渇している。もう一つ、初期の段階で低酸素状態であることが国立がん研究センター東病院と富士フィルム社と共同で開発した「酸素飽和度イメージング内視鏡」より、明らかになった。以上のことから、がんの発生には今まで考えられていた、遺伝子異常に端を発するような悪性化メカニズムだけではなく、代謝異常を含む、微小環境が悪性化の素地を形成しているのではないかと、特に扁平上皮がんに関してはそうなのではないかと、とも考えられる。これが今回の私の学術的背景であり、学術的「問い」である。



2. 研究の目的

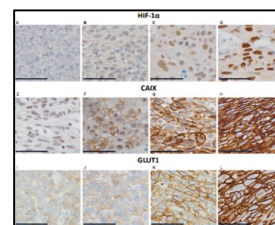
本研究の目的は、「**食道前がん病変における代謝微小環境**」を解析することである。しかし、腫瘍発生に関わる微小環境因子は代謝だけではなく、様々な因子が関係している可能性がある。現在までそのような早期病変、微小な病変に対して様々な解析を行うことが難しかった。しかし近年、低酸素内視鏡などの内視鏡技術の進歩により、より確実なサンプル採取が可能になり、また、解析技術の進歩により、今回行うメタボロームをはじめとする高度な解析が、微小な検体に対して可能になった。したがって、今回このような基盤構築がされることによって、遺伝子解析や発現解析などの他のオミックス解析など、様々な検討を追加することが可能になる。それにより、前がん病変というもの、がんの発生というものにおける微小環境を俯瞰的にとらえることが可能になる。これが、私の研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 早期食道癌の低酸素環境と深達度との比較検討

「患者」

国立がん研究センター東病院にて2019年3月から2019年10月内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)を受けた食道癌患者で、組織学的に水平・垂直断端陰性と診断され、の病理病期がpTisまたはpT1a、病理病期がpT1bの患者を対象とした。食道がんおよび頭頸部がんに対する化学療法および放射線療法の既往がある患者は、本試験から除外した。

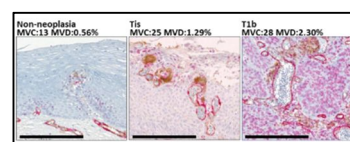


「免疫染色による評価」

HIF-1, CAIX, and GLUT1の抗体を用い、免疫染色を行って評価を行った。評価はHScoreで行った。

「血管の評価」

CD31, SMAの染色を行い、微小血管数(MVC)と微小血管密度の測定を行った。



「低酸素内視鏡による評価」

低酸素内視鏡を用いて、StO2の測定を行った

(2) 早期食道癌のメタボローム解析と深達度との比較検討

「酸素飽和度イメージングを用いた臨床検体採取」

申請者の所属する国立がん研究センター東病院と富士フィルム社は、共同で「酸素飽和度イメージング内視鏡」というものを共同開発しており、低酸素状態の病変からの検体採取が可能である。酸素飽和度を測定後、同時に複数の検体を採取し、1個はメタボローム解析用、1個は病理学的検索用に、サンプルを選定する。

「病理学的評価」

サンプリングされた組織については、その後の内視鏡下粘膜切除および手術材料にて改めて深達度の評価が行われる。その後、放射線療法など、深達度評価ができない治療に移行した症例に関しては、除外する。

「メタボローム解析」

国立がん研究センター・鶴岡連携研究拠点、がんメタボロミクス研究室所属の牧野嶋先生に依頼して解析する。正常と腫瘍との比較だけでなく、深達度の違いと相関する代謝産物についても解析を行う。

1. 研究成果

(1) 早期食道癌の低酸素環境と深達度との比較検討

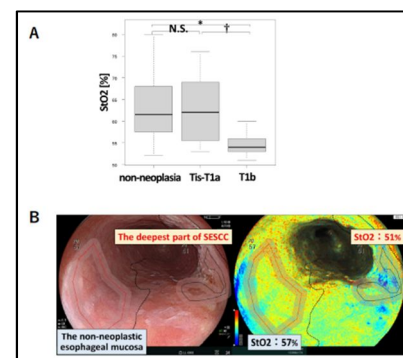
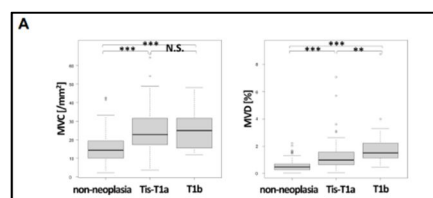
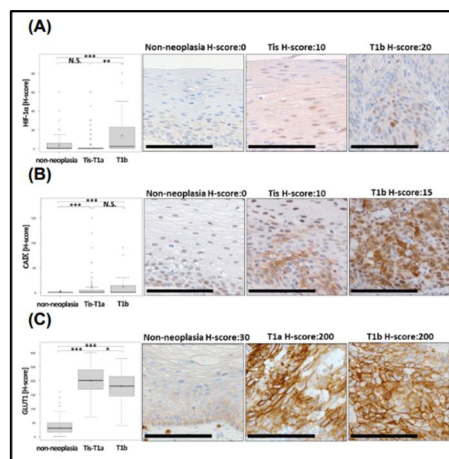
低酸素マーカーに対する免疫染色による検討では、HIF-1 の平均(範囲)Hスコアは、正常、pTis-T1a、pT1bで、それぞれ4.95(0-60)、5.51(0-60)、16.0(0-90)であり、HIF-1 の発現は、非新生物よりもpT1bで($P < 0.001$ 、図2A) pTis-T1aよりもpT1bで($P = 0.00472$ 、図2A)有意に高値であった。

CAIXの平均(範囲)Hスコアは、正常、pTis-T1a、pT1bにおいてそれぞれ0.290(0-3)、13.0(0-170)、15.6(0-170)、GLUT1の平均(範囲)Hスコアは、正常、pTis-T1a、pT1bにおいて、それぞれ37.6(0-160)、199(70-300)、177(40-280)であり、CAIXとGLUT1の発現は、SESCCでは非新生物よりも有意に高かった。

正常、pTis-T1a、pT1bのMVCの中央値(範囲)はそれぞれ14.2/mm²(2.14-42.5/mm²)、22.7/mm²(3.46-66.3/mm²)、24.8/mm²(11.8-48.1/mm²)であり、MVCは、非新生物よりもSESCCで有意に高かった($P < 0.001$ 、図3A)。正常、pTis-T1a、pT1bのMVDの中央値(範囲)は、それぞれ0.478%(0.0391-2.24%)、0.991%(0.0639-7.09%)および1.51%(0.447-8.80%)であり、MVDは、SESCCでは非新生物よりも有意に高く($P < 0.001$) pT1bではpTis-T1aよりも高い($P = 0.00479$)ことが示された。

正常、pTis-T1a、pT1bのStO₂の中央値(範囲)はそれぞれ61.5%(52-80%)、62%(53-75%)、54%(51-60%)であった。StO₂は正常に比べpT1bで有意に低く($P = 0.00131$) pTis-T1aよりpT1bで低い傾向にあった($P = 0.0606$) pTis-T1aとpT1bのStO₂の中央値(範囲)はそれぞれ-1%(-5~+3%)と-7%(-13~-5%)であった。StO₂はpTis-T1aよりpT1bで有意に低かった($P = 0.00260$)。

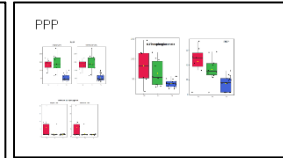
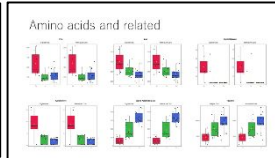
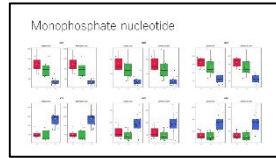
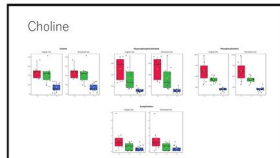
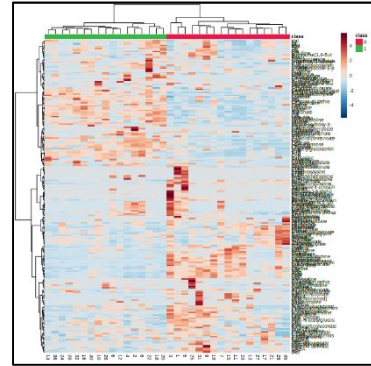
以上の結果については、Cancer medicineに受理された(In press)。



(2) 早期食道癌のメタボローム解析と深達度との比較検討

正常と腫瘍に関して、クラスタリング解析を行い、分かれる事を確認した。

メタボローム解析にて、4つの代謝産物に変化がある事がわかった。1. コリン(一種のアミノ酸) 2. AMP と ATP の比率 3. アミノ酸とその関連物質 4. ペントースリン酸経路



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroe Takashi, Watanabe Reiko, Morisue Ryo, Miyazaki Saori, Kojima Motohiro, Murata Shawhay Charles, Nakai Tokiko, Taki Tetsuro, Sakashita Shingo, Sakamoto Naoya, Matsubara Nobuaki, Masuda Hitoshi, Ushiku Tetsuo, Ishii Genichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Dirty necrosis in renal cell carcinoma is associated with NETosis and systemic inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 4557 ~ 4567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5249	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Masahiro, Aoyama Naoki, Kojima Motohiro, Sakamoto Naoya, Miyazaki Saori, Taki Tetsuro, Watanabe Reiko, Matsuura Kazuto, Kotani Daisuke, Kojima Takashi, Fujita Takeo, Tabuchi Keiji, Ishii Genichiro, Sakashita Shingo	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 The area of residual tumor predicts esophageal squamous cell carcinoma prognosis following neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-04366-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakashita Shingo, Sakamoto Naoya, Kojima Motohiro, Taki Tetsuro, Miyazaki Saori, Minakata Nobuhisa, Sasabe Maasa, Kinoshita Takahiro, Ishii Genichiro, Ochiai Atsushi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Requirement of image standardization for AI-based macroscopic diagnosis for surgical specimens of gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-04570-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ong Quang, Sakashita Shingo, Hanawa Emi, Kaneko Naomi, Noguchi Masayuki, Muratani Masafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Integrative RNA-Seq and H3 Trimethylation ChIP-Seq Analysis of Human Lung Cancer Cells Isolated by Laser-Microdissection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1719 ~ 1719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13071719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakashita Mai, Sakashita Shingo, Uesugi Noriko, Tokunaga Chiho, Hiramatsu Yuji, Noguchi Masayuki, Sakamoto Noriaki	4. 巻 71
2. 論文標題 An autopsy case of aortic dissection due to giant cell arteritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 204 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------