

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07147

研究課題名（和文）one carbon metabolismによる膵癌制御の可能性

研究課題名（英文）Possible treatment strategy of one-carbon metabolism on pancreatic cancer management

研究代表者

林 真路（HAYASHI, Masamichi）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70755503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌32例の血清検において、葉酸高値症例ではリンパ節転移頻度が低く術後無再発生存率が良い傾向、SAM高値症例は膵頭部癌に多く、術前化学療法による腫瘍消失率が良い傾向を認めた。また37例の膵癌症例の尿検体と25例の健常者の尿検体に含まれる代謝物をLC/MS法で解析して比較したところ、Choline、betaine、methionine、SAM、s-adenosylhomocysteineが膵癌症例で軒並み低値を示しており、癌化過程においてone carbon metabolism cycleの停滞が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌治療はまだまだ発展途上にあり、また罹患率も確実に上昇傾向にある。その早期発見の困難さゆえに、手術を含めた集学的治療を行っても治癒困難な難治癌と呼ばれて久しい。そこで、発癌進行メカニズムについての新知見に基づいた新規治療の開発が必要と考え、今回one carbon metabolismの観点から膵癌症例、予後不良症例の特徴を検討した。

膵癌症例の術前血清検体、尿検体を用いた検討では、Folateやs-adenosylmethionineの含有量低下がone carbon metabolism回路の活性低下をきたし、膵癌発癌や癌進行に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We initially examined the Folate and s-adenosylmethionine (SAM) concentrations in preoperative serum samples from 32 pancreatic cancer cases. High folate cases showed less frequent lymphatic node metastasis and relatively favorable postoperative survival outcomes. High SAM cases were found in pancreatic head cancers and were relatively sensitive to preoperative chemotherapy.

Next, we checked whether the one carbon metabolism cycle is downregulated in 37 preoperative pancreatic cancer cases compared with 25 healthy control cases by LC/MS data of their urine samples.

Concentrations of choline, betaine, methionine, SAM and s-adenosylhomocysteine were concordantly downregulated in cancer cases, which implies that weakened one-carbon metabolism may cause carcinogenesis or enhance cancer malignant potentials.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 one carbon metabolism メチル化 葉酸

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は、慢性炎症、老化や代謝異常に関連して後天的に生じる遺伝子修飾機構であり、遺伝子の不安定性の起因となって発癌に関与する。これまで個々の遺伝子メチル化による発癌や悪性度との相関は多く研究されているが、もう少し広い視点でメチル化と癌の関係をとらえなおす必要があると考え、DNA メチル化制御機構の1つとして one carbon metabolism (一炭素代謝) に注目した。

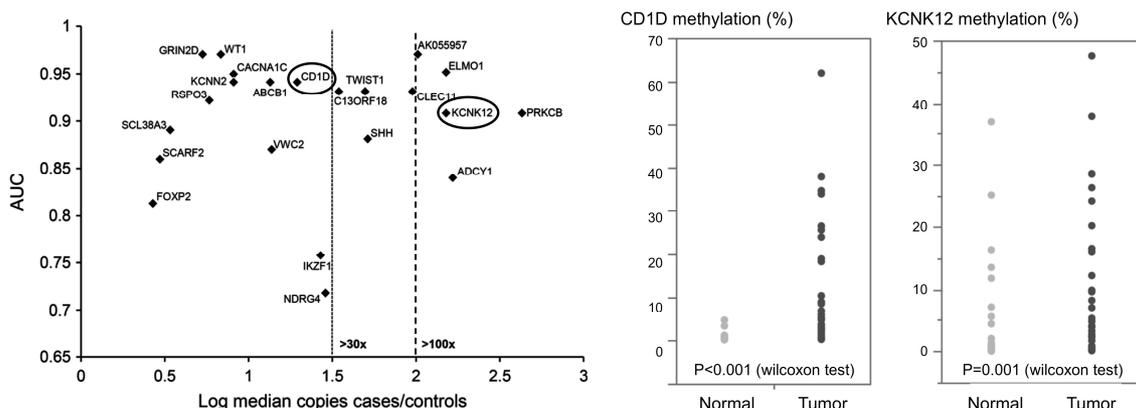
膵癌は KRAS mutation を特異的に持つ癌として知られているが、同等の癌特異性を持つメチル化マーカーも知られている。我々もメチル化マーカーを用いて膵癌の外科的切除断端の molecular margin を評価し、術後の癌再発に関与することを以前報告している (Clin Epigenetics, 2021 年)。

One carbon metabolism の概念自体は古くから指摘されているが、近年の癌と代謝の相関が注目される中で再び脚光を浴びている。栄養摂取が直接関与する回路であり、癌の治療に加えて予防の点からも重要な意味がある。膵癌と one carbon metabolism については、葉酸やメチオニン摂取量に伴う発癌頻度の疫学的な比較研究は散見され、いずれもこれらの摂取量を高めることで回路が亢進し、発癌頻度を抑制する旨の結果となっている。しかし膵癌におけるこれらの現象の分子生物学的な機序を明確にする解析の報告はこれまで皆無であり、我々は特に、one carbon metabolism の亢進でどのような遺伝子のメチル化が進むのか、それが発癌促進的に働くのか抑制的に働くのかについて明らかにし、治療応用への礎にする必要があると考えた。

2. 研究の目的

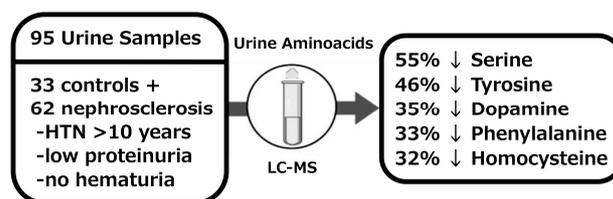
膵臓癌発生の分子生物学的背景として KRAS、TP53、CDKN2、SMAD4 など共通する mutation 遺伝子が明らかになっている。一方で疫学的には多量飲酒、喫煙、肥満、糖尿病、慢性膵炎が挙げられており、いずれもメチル化に深くかかわる因子である。膵臓癌における癌特異的メチル化マーカーは、過去の網羅的解析により多数同定されている (Kisiel JB et al. Clin Cancer Res, 2015, 下図左)。このうち CD1D と KCNK12 (下図左黒囲い) について、名古屋大学医学部附属病院・消化器外科学教室の過去の手術検体を用いても、文献通り再現性よく観察でき (下図右)、膵臓癌でも特定の遺伝子のメチル化は高頻度、かつ癌特異的に起きていることが分かる。

そのメチル化機序をコントロールする one carbon metabolism の停滞が、どのような癌遺伝子のメチル化を抑制し、膵臓癌発生に寄与するのかについて明らかにすることを本研究の目的とした。加えて、メチル化遺伝子は膵臓癌における化学療法の感受性にも影響することから、one carbon metabolism の亢進の程度が化学療法感受性の指標になる可能性についても検討した。



3. 研究の方法

尿検体について液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) を行うと、含有されるアミノ酸を定量的に測定することができる (Ovrehus MA et al. Kidney Int Rep, 2018, 右図)。膵癌症例から術前採取した尿検体を用いて同様に分析し、one carbon metabolism に関与する代謝物について膵癌症例と健常者間で含有量を比較する。



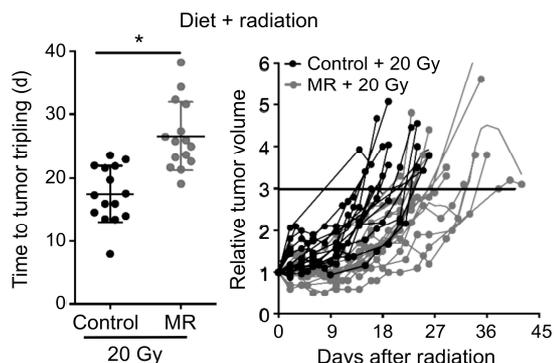
One carbon metabolism においては、SAM の増産を経て DNA methylation が亢進する。膵癌症例の血清中 SAM 含有量が多い A 群と少ない B 群について 4 検体ずつ膵癌組織由来 DNA を抽出し、網

羅的メチル化解析を行う。B 群と比較して A 群で有意に高メチル化が観察される遺伝子群を同定し、膵癌発癌に関わる候補遺伝子 X とする。

膵癌細胞株 10 種類について候補遺伝子 X のメチル化頻度を定量的メチル化特異的 PCR で測定し、頻度が高いものと低いものについて遺伝子 X の inhibition、overexpression を行い、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能について比較検討する。これにより遺伝子 X が本来 oncogenic に働く遺伝子かどうかを調べる。

またこの遺伝子のメチル化頻度の上昇が本当に one carbon metabolism の亢進によって起きた事象であるかを確認するため、膵臓癌マウスモデルにおいてメチオニン高用量摂取マウスとそうでないマウスで、投与後腫瘍サイズの変化と腫瘍内遺伝子 X のメチル化の程度を調べる。メチオニン高用量摂取マウスで oncogenic な遺伝子群 X のメチル化が亢進し、タンパク発現の抑制が起こった場合、腫瘍増殖抑制にも寄与する可能性があると考えられる。ただし腫瘍にはその heterogeneity によりメチオニン依存性の複数のメチル化遺伝子が存在していると考えられるため、遺伝子 X も複数の遺伝子群として同定されると考えられ、その遺伝子それぞれについて、同様の機能解析を行い、より影響力の強い遺伝子を同定する。

一方で、メチオニン低用量摂取マウス (MR) では、しばしば治療抵抗性の原因となるメチル化遺伝子が低減するため、化学放射線療法感受性となり有意に腫瘍増大時間が延長する事が報告されている (Gao X et al. Nature, 2019, 右図)。メチオニン低用量摂取群 B 群において著明にメチル化が低減する遺伝子を抽出し、化学療法感受性関連候補遺伝子 Y として、同様に機能解析や薬剤感受性試験を行う。こちらは抗癌剤治療効果予測バイオマーカーとしての確立を目指す。



4. 研究成果

< R3 年度 >

トレーニングコホートとして膵癌症例 37 例と、健常者 (非担癌症例) 25 例の尿検体コホートを作成した。各尿検体に含まれる代謝産物を、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MC) にかけて網羅的に調べた結果から、One carbon metabolism に関与するメチオニン pathway の関連物質である、代謝物 S-Adenosylmethionine、S-Adenosylhomocysteine、Choline、Betaine は膵癌症例で低値の傾向を認めた。

< R4 年度 >

R3 年度に得られた尿検体における代謝物の解析と並行して、血清検体を用いた one carbon metabolism の更新状態を評価することも必要と考えられたため、32 例の膵癌切除検体について、Folic acid (葉酸) および Adenosylmethionine (SAM) の血清値を定量的に測定し、病理学的因子と比較した。その結果、術前血清 Folate が高値の症例群は術前治療を施行していない症例が有意に多く、また病理学的リンパ節転移陽性症例は有意に少なかった。これは術前治療が血清 Folate を減少させる可能性がある点と、血清 Folate 高値症例は比較的進行度の低い膵癌であることを示唆している。血清 SAM 値高値症例では、膵頭部症例、術前胆汁ドレナージ施行症例が多い傾向で、T1 症例が多い傾向にあった。これも、血清 SAM は膵癌の進行に伴う栄養不良により低下傾向となることを示唆している。

また血清 SAM 高値症例は、術前治療による tumor disappearance ratio が有意に高く、SAM 高値による One carbon metabolism の亢進は、術前治療の抗腫瘍効果の向上に寄与している可能性が示唆された。

< R5 年度 >

膵癌症例群内での検討で、血清中 SAM が高い A 群、低い B 群について、4 例ずつ、各膵癌組織検体 DNA を抽出し、網羅的メチル化アレイを行った。結果より A 群で hypermethylation をきたす複数の DNA メチル化マーカー群を抽出し、それぞれの既知の役割および public database を用いた発現と予後の相関について検討を行った。その結果、遺伝子 L は血清 SAM 高値群で 82.6% のメチル化が起こっている一方で SAM 低値群では 21.6% のメチル化傾向で、高メチル化群は有意に予後良好 (P=0.033) な遺伝子として同定できた。遺伝子 B も SAM 高値群で 67.5% のメチル化傾向、SAM 低値群で 22.2% のメチル化傾向で、高メチル化群が予後良好な傾向 (P=0.083) であり、SAM 高値による One carbon metabolism の亢進が、これらのメチル化を引き起こし、癌悪性度の軽減化に寄与している可能性が考えられた。

今回同定した SAM 高値に有意に相関するメチル化遺伝子群が、抗腫瘍効果に関わる作用機序を詳

しく同定することで、癌化あるいは癌進行における One carbon metabolism 制御の重要性がさらに高まることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 林 真路, 高見秀樹, 猪川祥邦, 園原史訓, 田中伸孟, 神田光郎, 田中千恵, 中山吾郎, 小池聖彦, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 膵癌におけるEat me signalの関与 |
| 3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 林 真路, 高見秀樹, 猪川祥邦, 田中伸孟, 栗本景介, 服部憲史, 神田光郎, 田中千恵, 中山吾郎, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 膵癌症例における尿中代謝物を用いたOne carbon metabolismのモニタリング |
| 3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879) | 名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 猪川 祥邦 (INOKAWA Yoshikuni) (80772863) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 檜 顕成 (HINOKI Akinari) (90383257) | 名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901) | |

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 |
|---------|---------|
| | |