

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16212

研究課題名(和文) 頭部血管肉腫患者の血漿におけるメタボロミクス解析と腫瘍増殖機序の解明

研究課題名(英文) Metabolomics analysis of plasma from patients with head hemangiosarcoma and elucidation of the mechanism of tumor growth

研究代表者

神保 晴紀 (Jimbo, Haruki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70896894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭部血管肉腫患者の血漿検体のメタボロミクス(低分子化合物を網羅的に解析する手法)を行い、L-グルタミン酸が上昇していることが明らかとなった。L-グルタミン酸が血管肉腫の増殖に関与している可能性を考慮し、L-グルタミンをL-グルタミン酸に変換する酵素であるglutaminase 1(GLS 1)に着目した。ヒト血管肉腫細胞株の増殖がGLS 1阻害剤の添加により有意に抑制された。その機序を解明する目的で、マイクロアレイを用いて同細胞株において変化したmRNA発現を網羅的に解析した。血管肉腫患者の腫瘍検体でのGLS免疫染色では腫瘍細胞に陽性であったが、同一検体の正常血管内皮細胞では陰性であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部血管肉腫は稀少な皮膚原発の悪性腫瘍であり、高齢者に生じやすく皮膚に生じる悪性腫瘍の中では最も予後が悪い。

治療に関しては現行の化学療法(抗がん剤)では投与を継続するも薬剤耐性により再発する例が多く、新規薬剤の発見が待たれる状況である。本研究では、血管肉腫の腫瘍細胞ではGLS 1の発現が亢進しGLS 1阻害剤により増殖が阻害されるという結果が得られたことから、GLS 1阻害剤が頭部血管肉腫の新規薬剤の候補の一つになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics (a method for comprehensive analysis of small molecular compounds) of plasma samples from patients with head angiosarcoma revealed elevated levels of L-glutamic acid. Considering the possibility that L-glutamate may be involved in the growth of angiosarcoma, we focused on glutaminase 1(GLS 1), the enzyme that converts L-glutamine to L-glutamic acid. The growth of a human angiosarcoma cell line was significantly inhibited by the addition of a GLS 1 inhibitor. To elucidate the mechanism, we comprehensively analyzed the altered mRNA expression in the cell line using microarrays. GLS immunostaining in tumor specimens from angiosarcoma patients was positive for tumor cells, but negative for normal vascular endothelial cells from the same specimens.

研究分野：医学(皮膚悪性腫瘍 尋常性白斑)

キーワード：血管肉腫 メタボロミクス グルタミン酸 glutaminase 1 GLS1阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭部血管肉腫は稀少な皮膚原発の悪性腫瘍であり、高齢者に生じやすく年間の発症率は 100 万人に 2~3 人と報告されている。皮膚に生じる悪性腫瘍の中では最も予後が悪く、頭頸部皮膚血管肉腫を対象としたメタアナリシスでは、5 年生存率は 33.5%(Head Neck 2017; 39: 380-386)と予後は極めて悪い。

(2) 全身化学療法ではタキサン系が中心として用いられているが 2 nd line 以降としてマルチキナーゼ阻害剤であるパゾパニブや微小管阻害剤であるエリブリンが続く。治療開始時には奏功する例をよく経験するが、継続により高齢者であることから化学療法による副作用が許容できず減量や中止を余儀なくされる例、投与を継続するも薬剤耐性により再発する例が多く、最終的には略全例で化学療法を断念せざるを得ない状況となる。こういった背景から新規薬剤の発見が待たれる状況である。

2. 研究の目的

本研究では、1 頭部血管肉腫患者の血漿検体のメタボロミクスを行い、同腫瘍の無い健常者の血漿検体と比較し、有意に変化している低分子代謝物(特に、予備実験で有意差があったグルタミン酸に着目)があるのかどうか、2 in vitro でその低分子代謝物が腫瘍増殖に直接関与しているのかどうかを解明すること、3 in vivo でそれが治療標的となり得るかを検証し最終的には新規薬剤の発見につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) メタボロミクス解析

血管肉腫患者 10 例、及び対照として悪性腫瘍の無い、年齢・性別を一致させた健常者コントロール 10 例の血漿検体を採取した。血液中の低分子代謝産物の濃度には日内変動があり、かつ食事の影響を大きく受けるため、採取条件を早朝の空腹時と厳格に設定した。ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いて、その検体中の低分子代謝産物計 438 種を網羅的に解析した。

(2) 細胞培養実験

ヒト由来の cell lines としては、頭部血管肉腫由来である ISO-HAS-B、リンパ管肉腫由来である MO-LAS-B を用い、マウス由来の cell lines としては、血管内皮腫由来である EOMA、血管肉腫由来の ISOS-1 を用いた。GLS1 阻害剤(CB-839, BPTES)を添加し、生細胞率を WST-8 assay、細胞増殖を Colony formation assay を用いて評価する。

(3) マイクロアレイ

ISO-HAS-B に対し、GLS1 阻害剤である CB-839(0.2 μ M)を添加し、12 時間後に RNA を抽出しマイクロアレイで解析した。

(4) マウス実験

血管肉腫細胞株がマウスに十分に生着し腫瘍が増殖するマウスモデルを確立させるために、BALB/c, C57BL/6J に対し、EOMA, および ISOS-1 を皮下接種、腹腔内接種を行った。

(5) 免疫染色

ヒト血管肉腫のパラフィン包埋、ホルマリン固定された腫瘍組織標本を用いて、GLS 免疫染色を行なった。

4. 研究成果

(1) メタボロミクス解析

悪性黒色腫 25 例、乳房外パジェット病 8 例、頭部血管肉腫 7 例)間での解析を先行実験として行い、血管肉腫患者では L-グルタミン酸が他の 2 種の腫瘍患者と比較し有意に上昇していた。(図 1)

血管肉腫患者 10 例と年齢・性別を一致させた健常者コントロール 10 例との比較では有意差は認めないものの血管肉腫患者では上昇する傾向があった。

この結果から、L-グルタミン酸が血管肉腫の増殖に関与している可能性を考慮し、L-グルタミンを L-グルタミン酸に変換する酵素である glutaminase 1(GLS 1)に着目し、下記の実験を行った。

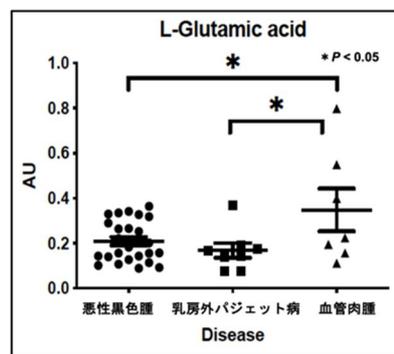


図 1 L-グルタミン酸

(2) 細胞培養実験

ISO-HAS-B、MO-LAS-B に対し、GLS1 阻害剤である CB-839 0.2 μM を滴下すると有意に生細胞率が低下した(図2) 細胞増殖に関しても同様の結果であった。グルタミンを含まない培地では生細胞率が低く、グルタミンを細胞内に取り入れることが細胞の生存に重要であることも同時に確認した。

同様の細胞株に対し、別の GLS1 阻害剤である BPTES 50 nM を滴下し、生細胞率および細胞増殖が有意に低下した(図3)

CB-839 0.2 μM に加え L-グルタミン酸も滴下すると、生細胞率の低下が解除された(図4)

このことから、L-グルタミン酸の存在下ではこれらの増殖抑制が解除されることが示され、GLS1 阻害剤が増殖を抑制する機序に、L-グルタミン酸の欠乏が関与していることが解明された。

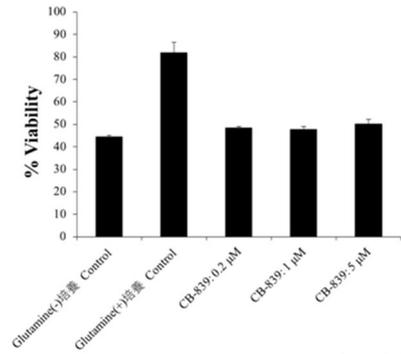


図2 ISO-HAS-B に CB-839 が及ぼす生細胞率への影響

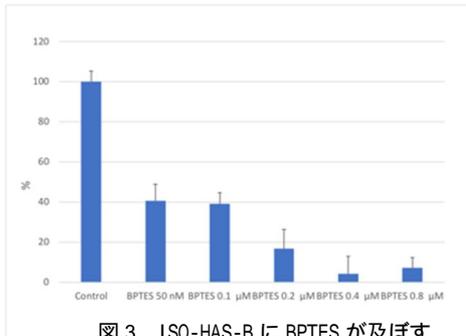


図3 ISO-HAS-B に BPTES が及ぼす

細胞増殖への影響

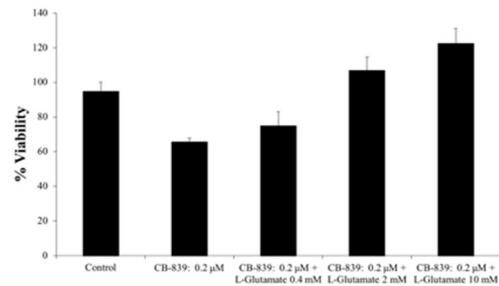


図4 ISO-HAS-B に生細胞率を低下させる

CB-839 滴下への L-グルタミン酸の影響

(3) マイクロアレイ

ISO-HAS-B に対し、CB-839 を添加することで mRNA 発現が有意に上昇したのが上位から *HMG3*, *NUPR1*, *ASNS*, *CHAC1*、発現が有意に低下したのが *CDH15*, *CACNA1G-AS1*, *HSPA8*, *CELF2-AS2* という結果が得られた。

(4) マウス実験

各種細胞株、および各種マウスに対し、皮下接種、および腹腔内接種を試行錯誤してみたが、一時的に生着するものの自然消滅するものが多く、マウスモデルを確立することが出来なかった。

(5) 免疫染色

ヒト血管肉腫の腫瘍組織に対する GLS 免疫染色では、細胞質に Dot 状に陽性であった。(図5)同一検体での正常血管では、陰性であった。

このことから、正常血管が腫瘍化すると GLS の発現が亢進し L-グルタミン酸の産生が上昇している可能性を考えた。

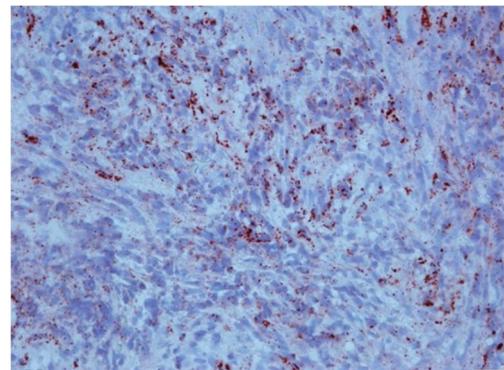


図5 ヒト血管肉腫の腫瘍組織での GLS 染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究に関して今後論文投稿などを検討中である。

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
研究協力者	福本 毅 (FUKUMOTO Takeshi)		

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