

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：21K16482
研究課題名（和文）大腸癌における硫黄代謝物に関する研究

研究課題名（英文）Sulfur metabolism of colon cancer

研究代表者

小澤 真由美（OZAWA, Mayumi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20806393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞では硫黄呼吸が亢進している可能性があり、硫黄呼吸に関連する酵素（SQR・CARS2）を過剰発現させた細胞の硫黄代謝物を測定しHSS-Cysと硫化水素の動態を測定した。人体の癌細胞において、通常組織とは異なる硫黄代謝能力が、癌細胞の成長速度と関連している可能性があり、より明確な硫黄代謝物動態を把握するため、癌部と非癌部の硫黄代謝物を比較した。結果、癌組織中では正常組織と比較し硫黄呼吸関連代謝物であるシステインおよび過酸化システイン誘導体の観測レベルが上昇していたことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌組織においては通常組織と異なる硫黄代謝能力が癌細胞の成長速度と関連している可能性が示唆された。ただし腫瘍の中心部の代謝物は正常粘膜組織と有意な差異が認められなかったなど解明しきれなかった点も多い。本研究者としては今後、腫瘍のもつ不均一性を考慮し、分裂能の高い癌細胞において更に硫黄呼吸経路を解明する必要があると判断し継続的な研究を予定している。この経路が解明されることで、成長速度のコントロールする新規薬剤開発の可能性、また発癌を早期に発見する予防学的研究に繋がれる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Since sulfur respiration may be enhanced in cancer cells, we measured sulfur metabolites in cells overexpressing enzymes related to sulfur respiration (SQR and CARS2) and determined HSS-Cys and hydrogen sulfide dynamics. We compared sulfur metabolites in cancerous and noncancerous parts of the human body to obtain a clearer picture of sulfur metabolite kinetics, since the ability to metabolize sulfur in cancerous cells may be different from that in normal tissues and may be related to the growth rate of cancer cells. The results confirmed that the observed levels of the sulfur respiration-related metabolites, cysteine and a derivative of cysteine persulfide, were elevated in cancerous tissues compared to normal tissues.

研究分野：大腸癌

キーワード：硫黄呼吸 大腸癌 硫黄関連代謝物

1. 研究開始当初の背景

癌細胞のエネルギー産生の疑問点

癌細胞の増殖には多量のエネルギーが必要になる。一般的に真核細胞の細胞は、解糖系・TCA回路・酸化リン酸化を通して生命活動維持に必要なエネルギーを産生し、最終的に酸素に電子が供与される(細胞呼吸)。一方、筋肉などの酸素消費が大きい組織、造血幹細胞、悪性度の高いがんでは低酸素状態になることが多く、酸素に依存しないエネルギー産生経路の存在が示唆されてきた。また癌細胞は、有酸素下であってもミトコンドリアでの酸化リン酸化よりもエネルギー産生効率の悪い解糖系でATPを産生する(ワールブルグ効果)ことが知られており、そのエネルギー産生には不明点が多い。

新規エネルギー産生経路としての硫黄呼吸の発見

イオウ元素(硫黄、元素記号:S)は、ヒトの生体内に体重の約0.2%程度存在しており、生体内の酸化還元反応において、高いレドックス活性を発揮する元素である。近年、親電子性を有する硫黄化合物であるシステインパースフィルド(HSS-Cys)が、システイン(HS-Cys)から翻訳酵素であるシステイニル tRNA 合成酵素(cysteinyl tRNA synthetase: CARS2)により生成されること、また、HSS-Cysはミトコンドリアの膜電位形成を介してエネルギー代謝に関与しており、電子伝達系により電子受容体として還元され、硫化水素に変換されていることが判明した(Akaike et.al. Nat Commun 2017)。さらに、ミトコンドリア内には硫化水素のプロトンと電子をミトコンドリアのユビキノンサイクルに供与する酵素 sulfide quinone oxidoreductase (SQR)が存在し、ユビキノンサイクルを介してATPを産生することが判明した(硫黄呼吸)(赤池ら 創薬のひろば 2019)。

大腸癌と硫黄関連物質の関係性

研究代表者らは、便潜血検査に代わる新たな大腸癌検診方法を開発するために行った研究の中で、大腸癌患者の排便時の排ガス成分にはイオウ元素を含むメチルメルカプタンが健常者と比較して有意に多いことを発見した(Ishibe A, et al. Ann Gastroenterol Surg. 2018)。これは、大腸癌では硫黄呼吸に関連する硫黄代謝物の産生が正常組織に比べて亢進している可能性を示すと考える。また近年、「健常者」、「良性の大腸腺腫」、「大腸癌の早期から進行期のステージごと」の菌叢と代謝物が解析され、早期大腸癌組織では正常組織と比較して硫酸還元細菌などの硫黄化合物を還元し硫化水素を生成する微生物群が高頻度で分布していることが報告された(Yachida et.al. Nat Med 2019)。

研究代表者らは、癌細胞では硫黄呼吸が亢進しているとの仮説のもと、硫黄呼吸に関連する酵素(SQR・CARS2)を過剰発現させた細胞の硫黄代謝物を測定しHSS-Cysと硫化水素の動態を測定した。人体の癌細胞において、通常組織とは異なる硫黄代謝能力が、癌細胞の成長速度と関連している可能性があり、本研究を通じて、より明確な硫黄代謝物動態を把握できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、癌部と非癌部の硫黄代謝物を比較することにより、癌細胞における硫黄呼吸に関連する硫黄代謝物産生の亢進状況を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 20歳以上の大腸癌患者のうち、腸管切除を伴う外科的切除術を行う患者を対象とするパイロット研究となる。本研究はヘルシンキ宣言に従って実施された。研究計画書は横浜市立大学倫理委員会の承認を受け(B190600051)UMINに登録された(UMIN000038703)。さらに、患者のデータと結果の施設利用に関して、患者から書面による同意を得た。

(2). 大腸癌切除検体の摘出後は滅菌清潔操作で組織を採取した。腸管内の付着した糞便が混ざらないように慎重に長軸方向に展開し、メスを用いて癌組織と正常組織を採取した。付着した糞便が代謝物測定に影響しないように、生理食塩水で洗浄し、迅速に液体窒素で急速冷凍した上で保管した。

(3). 組織は、誘導化試薬入りメタノール10mlに浸漬後、37℃で1時間保温することで誘導化反応を行い、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS/MS)で硫黄代謝物を測定した。癌組織と正常粘膜組織の代謝物を測定し、比較した。

4. 研究成果

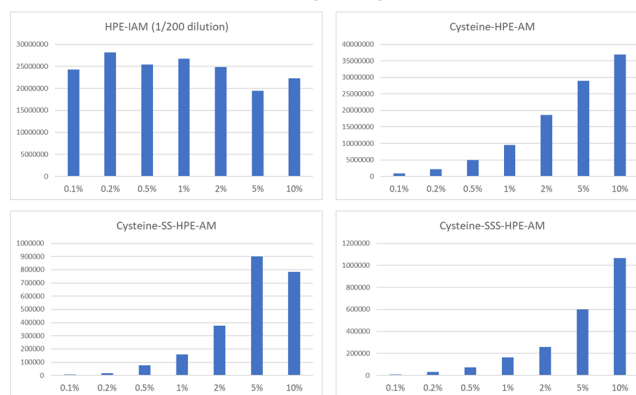
(1). 大腸癌のメタボローム評価の前処理評価

大腸がんの硫黄呼吸のメタボローム解析に適した方法はまだ報告されていないため、まずメタボローム評価の前処理として組織サンプルのホモジナイズを行った。組織は10%メタノール(w/v)中、ShakeMaster Auto (BMS-A20TP, Bio Medical Science, Tokyo, Japan)を用いて1,100rpm、2分間ホモジナイズした。次に、各サンプルのホモジネート50µLをプールし、10%

品質管理(QC)ホモジネートを作成した。10%QC ホモジネートをさらに希釈し、0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%、5%のQC ホモジネートを得た。これらのホモジネートを2 mmol/L (4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM)で処理し、21,500 g、5分間、4 で遠心した。上清を400mM ギ酸アンモニウム(010-03122、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本)と19:1の割合で混合し、UHPLC Nexera LCシステム(株式会社島津製作所、京都、日本)と5500QTRAP質量分析計(AB Sciex Pte. Ltd., Concord, ON, Canada)を用いて、タンデム質量分析を伴う液体クロマトグラフィー(LC/MS/MS)で分析した。クロマトグラフィー分離は、ZIC-cHILICカラム(2.1×100mm、3µm、Merck Millipore、Darmstadt、ドイツ)を用い、移動相A(10mM ギ酸アンモニウム)とB(100%アセトニトリル)のグラジエント溶出により、カラム温度30で行った。グラジエントプログラムは以下の通り：0-1.5分、97%B；1.5-5分、97-75%B；5-7分、75%B；7-10分、75-40%B；10-12分、40%B；12-13分、40-10%B；13-16分、10%B；および16-25分、97%B、流速0.4mL/分。LC溶出液は、同時に極性を切り替えながら、直接ターボスプレーイオン化にかけた。過硫化物およびトリルスフィドの検出には多重反応モニタリングを用いた。LC/MS/MSデータはMultiQuant 3.0(AB Sciex, Pte. Ltd.)を用いて処理した。試験したすべての条件において、HPE-IAMが混合物中に残存していることが確認され、試験した条件では誘導体が関連化合物と反応するのに十分な過剰量であったことが示された。ホモジナイズしたサンプル中の組織標本の量を増やすと、システインおよび過酸化システイン誘導体の観測レベルが上昇し、測定シグナルは組織濃度 $\geq 2\%$ で飽和した(図1)。シグナル飽和は本実験で使用したMSの定量上限を示すため、以降の測定にはすべて組織濃度1%を使用した。

(図1)

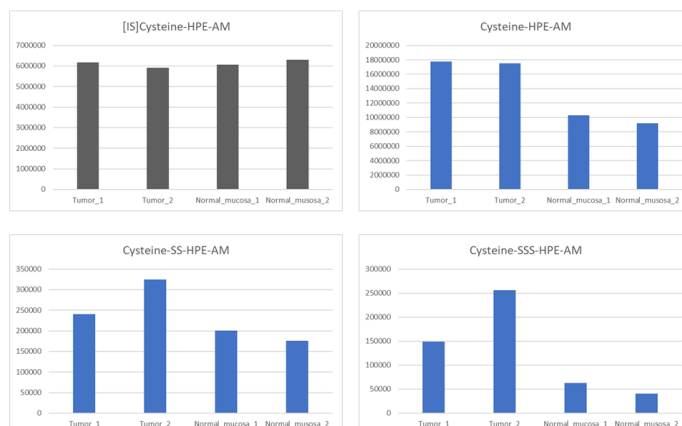
その後、すべてのサンプルをホモジネート濃度に基づいて前処理した。QCサンプルについては、1% QC サンプル700µLを内部標準物質(IS) [13C3, 15N1] L-cysteine; CNLM-3871-H-0.25, Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA)70µLと混合した。次に、この溶液に20 mM HPE-IAMメタノール溶液(N-iodoacetyltyramine; I685880, TRC, Toronto, ON, Canada)を70µL加え、ヒーティングブロックまたは恒温槽を用いて37で1時間インキュベートした後、ボルテックスした。サンプルを21,500gで5分間遠心し、上清570µLを1.5mLチューブ(Click-cap tube; 96.07514.9.01, Nolato Treff AG, Degersheim, Switzerland)に集めた。次に、30µLの400mM ギ酸アンモニウムを加え、混合物をボルテックスした。



(2) 大腸サンプルを用いた硫黄呼吸関連代謝物の測定

組織サンプルの場合、150µLの1%ホモジネートと15µLのISを混合し、15µLの20mM HPE-IAMメタノール溶液を加えた。恒温槽を用いて37で1時間インキュベートした後、ボルテックスした。ボルテックス後、サンプルを21,500×gで5分間遠心し、各上清114µLを1.5mLチューブに移した。約6µLの400mM ギ酸アンモニウムを上清に加え、混合物をボルテックスした。各サンプルはLC/MS/MSを用いて3連で分析した。結果は3回の測定の平均値である。等量で外来的に添加されたISのレベルは、各サンプルで一貫しており[平均範囲：591,412-6,292,013 count per seconds(cps)]信頼性の高い測定であることが示された。内因性システインとその過硫化物および三硫化物化合物のサンプル間のレベルの違いが観察され、その平均レベルは、正常粘膜組織よりも癌組織でかなり高かった(腫瘍 vs. 正常粘膜：システイン、過硫化物および三硫化物化合物；システイン：17,640,838対9,719,277.5cps、過酸化システイン：282,652対188,443.5cps、三硫化システイン：202,599対52,168.5cps)(図2)。

(図2)



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hironori Fukuoka, Tomohiro Andou, Takeo Moriya, Koji Narita, Ken Kasahara, Daisuke Miura, Yuji Sekiguchi, Shinsuke Suzuki, Kazuya Nakagawa, Mayumi Ozawa, Atsushi Ishibe, Itaru Endo	4. 巻 49
2. 論文標題 Sulphur metabolism in colon cancer tissues: a case report and literature review.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	6. 最初と最後の頁 1,9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03000605211059936.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福岡宏倫、安藤智広、守谷岳郎、大矢浩貴、鳥谷建一郎、鈴木紳祐、中川和也、小澤真由美、石部敦士、遠藤 格
2. 発表標題 大腸癌組織における硫黄呼吸に関する代謝物について case report
3. 学会等名 第77回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------