

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659654

研究課題名（和文）代謝物を指標とした膵癌早期診断・個別化治療の新展開 - メタボローム解析の臨床応用 -

研究課題名（英文）A novel approach for early diagnosis and personalized therapy to pancreatic cancer by metabolic profiling.

研究代表者

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

研究成果の概要（和文）：

2種のGemcitabine耐性膵癌細胞株およびその親株の代謝産物を液体クロマトグラフ質量分析計にてprofilingを行い約30%の代謝産物の発現相違を検出した。また、手術切除標本由来サンプルを用いた凍結組織マイクロアレイを用い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析にてProfile Mappingを行った。その結果、40種類以上の代謝産物をMappingすることができ、腫瘍部、正常部間で分布が異なる代謝産物を複数同定することができた。今後、同定した代謝産物について、早期診断、個別化治療の候補となるか引き続き、検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：

We performed metabolic profiling analysis with two Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines and their parent strains by Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, then detected variance in 30 % metabolic profiling between them. Furthermore, we also performed matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry with 12 resected specimens which arrayed in frozen tissue microarray. More than 40 kinds of metabolites were identified and mapped on the each section, and interestingly some of metabolites showed different distributions between normal and tumor tissue. We will investigate these identified metabolites continuously for possibility of early diagnosis and personalized medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌、代謝産物膵癌、治療抵抗性、ゲムシタビン耐性、MALDI-IMS、凍結組織マイクロアレイ、メタボリックプロファイリングマッピング

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占めながら100人中3人しか根治しない疾患であり、その診断法・治療法の開発は社会的要請や緊急性が高い。特に膵癌の早期診断は困難で8割の症例が診断時にStageIVであり(Pancreas, Matsuno, 2004)、早期診断および治療効果予測や効果

判定のためのマーカーの同定による治療成績向上への寄与が期待される。

現在膵癌の第一選択薬である Gemcitabine も、第三相試験で平均生存期間を2ヶ月延長するにとどまり(JAMA, Oettle 2007)、70%以上の症例では画像上その効果を認めない(J Clin Oncol, Heinemann 2006)。そのため治療成績向上には各治療の効果を予測・判定する

マーカーの同定による個別化治療と効果を改善する薬剤の開発が望まれる。

これまで、上記マーカーの候補として、DNA・RNAといった核酸や蛋白質、一部の有機化合物などが用いられているが、生体内に、数千から数十万存在するといわれる低分子化合物については、その分子量の小ささのため解析が困難で、永く分子生物学的検討の対象とならず、腫瘍学においてもその解析に焦点を当てたものはわずかであった。近年、最新の質量分析装置を用いることによって、このような低分子化合物を検出するだけでなく、組織切片上の非常に限定された範囲の細胞に含まれる分子集団を解析・マッピングできるようになった。

特に、膵癌組織は豊富な間質細胞を含んでおり、その混入が腫瘍細胞の分析の妨げとなってきたが、本手法により、煩雑な抽出作業を行うことなく、高スループットに解析を行うことができる。さらに、代表研究者が所属するチームが考案した凍結組織マイクロアレイは、5mm大の凍結サンプルを最大20個配置することができ、同一組織片に含まれる腫瘍および周囲の反応性組織の分析を行うことが可能である。

細胞の代謝活動により作り出される代謝産物は、ゲノム情報の最終的形質発現であり(CurrDrugMetab, Gomase, 2008)、多くの低分子化合物が含まれる。

本研究では、組織形態や蛋白発現特性といった従来の分析方法にメタボローム解析結果を加えることによって、癌関連新規マーカー発見の手法として有力であると考えられる。

2. 研究の目的

他の消化器癌における飛躍的な治療法の改善とは対照的に膵癌は欧米や日本でもここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。早期診断の難しさや早期の遠隔転移・播種、高い治療抵抗性などがその主因と考えられ、20mm以下(TS1)の小膵癌の予後は比較的良好であり(Gut, 2002, Maire)、その早期診断法・治療法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。代謝産物はゲノム情報の最終的表現である形質発現であり、細胞の働きを包括的に理解する時、代謝産物の網羅的解析であるメタボロミクスはきわめて重要な意味を持つ。しかし、癌の診断や治療感受性に関わるRNAの網羅的解析は複数の報告がある一方で、これらに関連する代謝産物を同定した報告はない。本研究は、癌細胞特異的あるいは治療感受性に関わる代謝産物を同定することで、新しい膵癌早期診断法と個別化治療の確立を目標とする挑戦的研究である。

3. 研究の方法

本研究では培養膵癌細胞、治療抵抗性細胞株(癌細胞および前癌細胞)を対象に島津製作所が開発した質量分析装置であるLCMS-IT-TOFおよびFT-ICR-MS(フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置)を用いてmetabolic profilingを行い、得られた網羅的情報から膵癌特異的代謝産物や治療感受性関連癌特異的代謝産物、代謝経路を同定する。さらにマイクロダイセクションにより単離した癌細胞あるいは前癌細胞、もしくは凍結切片上の特定の癌細胞や前癌細胞を対象に細胞特異的な代謝産物の解析を行い、膵液や膵液細胞診検体での新技術を用いた解析を確立しその診断的意義を検討する。また、治療感受性に関する情報がある臨床サンプルセットを用いて治療効果判定あるいは効果予測の指標としての意義などを検討するとともに、関連分子・代謝経路の癌細胞内での役割を明らかにして、治療効果増強を実現するための新規標的としての可能性をin vitro, in vivo実験にて検討する。

さらに、手術切除標本由来凍結腫瘍組織を使った凍結組織マイクロアレイを作製し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析を用いて、腫瘍組織のmetabolic profilingを行った。

4. 研究成果

膵癌の第一選択薬であるGemcitabine治療の効果を予測する分子マーカーを同定するため、膵癌細胞株であるSUIT-2、CAPAN-1においてそれぞれGemcitabine耐性膵癌細胞株を2種樹立し、その細胞中の代謝産物を液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS-IT-TOF)によりprofilingを行い正確かつ再現性のある結果を得た。Gemcitabine耐性膵癌細胞株と親株間の比較にて、aspartate、hydroxyproline、creatine、creatinineの増加、glutamine、prolineの低下等、約30%の代謝産物の発現相違を認めた。ここまでの研究成果は現在論文にまとめ投稿中である。

また、代謝産物の組織中での局在を調べるため、手術切除標本由来の凍結サンプルを用いた凍結組織マイクロアレイブロックを作製し(図1)、その凍結切片を用いてマトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析(MALDI-IMS)にてprofile Mappingを行った。(図2)

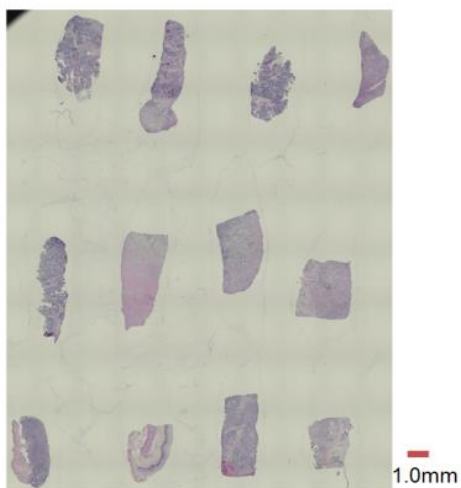


図1：作製した凍結組織アレイブロック (上) とHE染色像 (下)

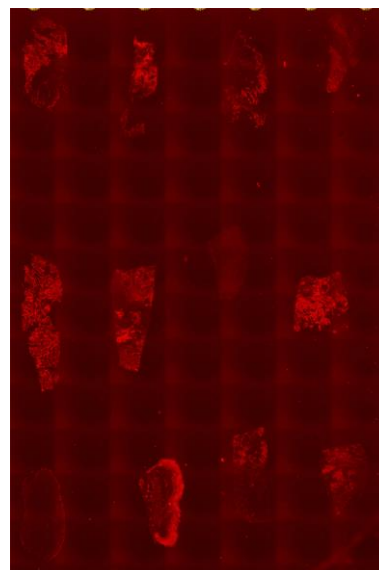
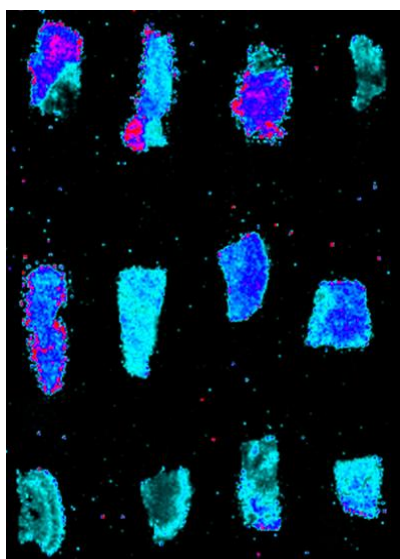


図2：マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析装置による profile Mapping (上) とIn situ Hybridization (下)

結果、核酸派生物等40種類以上の代謝産物を切片上にMappingすることができ、腫瘍部、正常部間で分布が異なる代謝産物を複数同定することができた。

今後、同定した代謝産物の意義について、免疫染色、In situ Hybridization 等を用い、タンパク、RNAレベルで解析を行い、早期診断、個別化治療の候補となるか引き続き、検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

1. 寅田 信博、大内田 研宙、崔 林、水元 一博、相島 慎一、小田 義直、田中 雅夫。
Tissue Tablet (組織タブレット) 法-手術切除組織の保存・管理のための新しいアプローチ-。第112回日本外科学会定期学術集会。2012/04/12 . 千葉市
2. 寅田 信博、大内田 研宙、崔 林、水元 一博、相島 慎一、小田 義直、田中 雅夫。Tissue Tablet 法-新鮮凍結サンプルの新しい保存・管理法-。第49回九州外科。2012/05/18. 佐賀市

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：90253418

(2) 研究分担者

鬼丸 学 (ONIMARU MANABU)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80529876
(2011 年)

井上 重隆 (INOUE SHIGETAKA)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：00529802

(3) 連携研究者

なし