

## 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 31 日現在

機関番号：14501  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659795  
 研究課題名（和文） 網羅的プロテオソーム解析による頭頸部癌早期診断法の開発  
 研究課題名（英文） Metabolome analysis of head and neck cancer to identify the clinical markers  
 研究代表者  
 丹生 健一（KEN-ICHI NIBU）  
 神戸大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：20251283

研究成果の概要（和文）：本研究では、頭頸部癌の早期発見や治療効果判定、再発の発見につながる腫瘍マーカー探索を目的とし、頭頸部癌患者の手術前後の血液および腫瘍組織を用いたメタボローム解析を行った。頭頸部癌患者 17 人の血清と 19 人の腫瘍組織をメタボローム解析したところ、血清からのメタボローム解析では、112 種類の代謝産物を同定することができ、うち 9 種類は再発患者に特異的であった。一方、腫瘍組織を用いたメタボローム解析では、109 種類の代謝産物が同定された。そのうち 41 種類については、正常組織と比較して腫瘍細胞に優位に増加し、15 種類の代謝産物は減少していることが明らかになった。また、口腔癌に限定すると、32 種類の代謝物が増加し、7 種類が優位に減少していることが明らかになった。これらの結果から、メタボローム解析は、腫瘍マーカー探索に有用な実験方法であること、腫瘍特異的に詳細な差異を見出すことにより、癌種ごとの判断に有効な腫瘍マーカー発見が可能であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, metabolome analysis of the patients with HNSCC was performed using gas chromatography mass spectrometry. Serum and tissue samples were analyzed. In serum, levels of several metabolites related to the glycolytic pathway were revealed to be higher in the patients with HNSCC, and the levels of several amino acids were lower. In contrast to the sera, the levels of several metabolites related to the glycolytic pathway were revealed to be lower in the tumor tissues of HNSCC than the non-tumor tissues, and the levels of several amino acids were higher. Our results demonstrate that changes in the metabolite pattern are useful for assessing the clinical characteristics of HNSCC, and will hopefully lead to the establishment of novel diagnostic tools.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、プロテオソーム、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景  
前立腺のPSAに代表されるように、担癌患者の

血液中には様々な癌種特異的腫瘍マーカーが  
検出さる。抗癌剤や放射線治療、手術などの

治療により、マーカー値が低下し、治療効果や再発の早期発見の指標として用いられている。頭頸部癌患者においてもSCC抗原やp53抗体など、いくつかのマーカー候補因子が同定されているが、陽性率が低く早期癌では陰性のことが多いため、腫瘍マーカーとしての実用性は乏しい。

## 2. 研究の目的

本研究では、頭頸部癌の早期発見や治療効果判定、再発の発見につながる腫瘍マーカー探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

頭頸部癌患者の手術前後の血液および腫瘍組織を対象に、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GCMS-QP2010、島津製作所) を用いてメタボローム解析を行った。

Primary Site	No. of Pts	No. of Relaps
Oral Cavity	7	4
Oropharynx	1	0
Hypopharynx	8	0
Larynx	0	0
Cervical Esophagus	1	1

Stage	No. of Pts	No. of Relaps
I	2	0
II	5	3
III	1	1
IV	9	1

## 4. 研究成果

頭頸部癌患者 17 人の血清と 19 人の腫瘍組織をメタボローム解析したところ、血清からのメタボローム解析では、112 種類の代謝産物を同定することができ、うち 8 種類は再発患者に特異的であった。

Compound	再発+	再発-	<i>P</i>
Lysine	0.6943	0.9633	0.010
Glucose	1.208	0.9190	0.011
Ribose	1.810	1.116	0.012
Tagatose	2.063	1.096	0.014
Sorbopyranose	1.610	0.8825	0.018
Hippurate	0.6060	1.907	0.021
Hydoxy-proline	0.7578	1.793	0.028
HydroxyMandelate	0.5739	3.609	0.029

更に、口腔癌に限定すると 4 種類の代謝産物で有意な変動がみられた。

Compound	再発+	再発-	<i>P</i>
Glucose	1.170	0.7600	0.003
Methionine	0.6286	0.9672	0.013
Ribosome	1.489	0.3953	0.016
Ketoisoleucine	0.9094	1.170	0.016

一方、腫瘍組織を用いたメタボローム解析では、109 種類の代謝産物が同定された。そのうち 51 種類については、正常組織と腫瘍組織とで有意に濃度が異なっていた。

Compound	Tumor/Normal	<i>P</i>
Coniferyl aldehyde	0.546	<0.0001
Pipecolic acid	0.550	<0.0001
Hydroxyisovaleric acid	0.557	<0.0001
Malonic acid	0.558	<0.0001
Phosphate	1.740	<0.0001
Inosine	1.877	<0.0001
Aminoethanol	2.741	<0.0001
Hypoxanthine	3.405	<0.0001
Putrescine	4.233	<0.0001
Homoserine	4.488	<0.0001
Dehydro-D-gluconate	5.150	<0.0001
Uracil	6.229	<0.0001
Propanediamine	1.130	<0.001
Cysteine Sulfoic acid	1.719	<0.001
Oxalate	1.736	<0.001
Citrulline	2.133	<0.001
Glyceraldehyde	2.342	<0.001
Phenylalanine	2.510	<0.001
Valine	2.562	<0.001
Xylitol	2.564	<0.001
Threonine	2.569	<0.001
Tyrosine	2.951	<0.001
Glycine	3.218	<0.001
Asparagine	5.518	<0.001
Lysine	2.368	<0.002
Serine	2.168	<0.004
Hydroxy-L-proline	2.795	<0.004
Cytosine	0.427	0.005
Deoxyuridine	0.706	0.005
Methionine	2.219	0.005
Glucose	0.180	0.006
Glucarate	1.673	0.006

Phosphoethanolamine	2.213	0.007
Glycerol	1.384	0.009
Glycerolic acid	0.538	0.009
Pyroglutamic acid	1.734	0.010
Sorbopyranose	0.464	0.011
Sarcosine	2.057	0.012
Cystathionine	3.100	0.012
Fructose Phosphate	0.700	0.012
Fructose	0.432	0.013
Hydroxypyridine	0.711	0.013
Cytosine 2	1.043	0.015
Ornithine	2.463	0.018
Trehalose	2.748	0.018
Benzyl-Cysteine	0.669	0.020
Alanine	1.647	0.020
Melibiose	0.181	0.029
Methyl amino alanine	0.706	0.038
Ribose	1.554	0.040
Taurine	2.012	0.044

更に、口腔癌に絞って調べた結果、以下の代謝物が正常組織と腫瘍組織とで有意に異なっていた。

Compound	Tumor/ Normal	<i>P</i>
Glycerol	1.482	<0.001
Xylitol	2.793	<0.001
Aminoethanol	3.912	<0.001
Oxalate	1.959	0.001
Homoserine	2.568	0.002
Uracil	6,188	0.002
Putrescine	4,596	0.003
Inosine	2.144	0.003
Glycine	3.849	0.003
Hypoxanthin	3.457	0.003
Valine	2.542	0.004
Aspartic acid	5.504	0.005
Glutamic acid	5.945	0.005
Proline	3.168	0.006
Hydroxyisovaleric acid	0.419	0.007
Ascorbic acid	0.419	0.007
Coniferyl aldehyde	0.419	0.007
Malonic acide	0.419	0.007
Pipecolic acid	0.419	0.007

これらの結果から、メタボローム解析は、腫瘍マーカー探索に有用な実験方法であること、腫瘍特異的に詳細な差異を見出すことにより、癌種ごとの判断に有効な腫瘍マーカー発見が可能であることを示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

①Adhim Z, Otsuki N, Kitamoto J, Morishita N, Kawabata M, Shirakawa T, Nibu KI. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention against head and neck cancer-containing HPV16 cell lines. Acta Otolaryngol.2013 掲載確定

②Adhim Z, Lin X, Huang W, Morishita N, Nakamura T, Yasui H, Otsuki N, Shigemura K, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T. E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. Cancer Gene Ther.19: 144-152 2012

③ Adhim Z, Matsuoka T, Bito T, Shigemura K, Lee KM, Kawabata M, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T In vitro and in vivo inhibitory effect of three Cox-2 inhibitors and epithelial-to-mesenchymal transition in human bladder cancer cell lines. Br J Cancer.105: 393-402 2011

[学会発表] (計2件)

①Yonezawa K, Otsuki N, Nibu K, et al. Serum and tissue metabolomics of head and neck cancer. the 11<sup>th</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology- Head and Neck Surgery. Dec. 25 2011 Kobe, Japan

②米澤宏一郎 吉田 優 丹生健一 他 頭頸部癌におけるメタボローム解析 第3回臨床メタボロミクス研究会 2011年10月25日 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹生 健一(KEN-ICHI NIBU)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20251283

(2)研究分担者

大月 直樹 (NAOKI OTSUKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40343264

吉田 優 (SUGURU YOSHIDA)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00419475

米澤 宏一郎 (KOICHIRO YONEZAWA)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：20533714