

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659612

研究課題名(和文) 網羅的メタボローム解析を用いた膵臓癌に関する代謝反応の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Comprehensive metabolome analysis of pancreatic cancer for identifying the pancreatic cancer-specific metabolic traits

研究代表者

谷内田 真一 (Yachida, Shinichi)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：20359920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がんは依然として、難治がんの代表格である。膵臓がん組織(26例)におけるメタボローム解析を、キャピラリー電気泳動質量分析装置を用いて行った。がん組織において、グルコース濃度は有意に減少し、乳酸濃度の有意な上昇を認め、グルコースが解糖系により乳酸の産生を来したと考えられた(Warburg効果)。さらに、がん組織において多くのアミノ酸濃度の上昇を認めた。一方で、TCA回路による酸化リン酸化に関する代謝物質の減少を認めた。これらの知見をもとに、新規の血液バイオマーカーや画像診断装置の開発に応用する予定である。

研究成果の概要(英文)：The pancreatic cancer is a devastating disease. We have performed the comprehensive metabolome analysis method based on capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS), which allows quantitative analysis of thousands of charged metabolites. This approach was applied to simultaneous analysis of metabolite levels in tumor and normal counterparts obtained from 24 patients with pancreatic cancer. Enhanced glycolysis was found in tumor tissues, indicating the Warburg effect, which is the enhanced conversion of glucose to lactate observed in tumor cells, even in the presence of normal levels of oxygen. In addition, quantification of hundred metabolites resulted in the identification of pancreatic cancer-specific metabolic traits. The amino acid concentrations were increased in tumor tissues. These data will apply into advanced imaging methods and blood tests to detect pancreatic cancer-specific metabolomes, which offer hope for such non-invasive early detection.

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：膵臓癌 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは、近年、本邦で増加傾向にあるが、依然として極めて予後不良のがん腫である。診断後の5年生存率は、この四半世紀でほとんど改善していない。診断時に遠隔転移を認めたり、局所で主要血管に浸潤したりすることから、手術適応となるのは全体の約20～30%である。しかし、膵臓がんの自然史を、突然変異の頻度と細胞分裂の速度から数理解析した我々の報告では、最初の突然変異から転移巣を形成し死亡するまでのタイムスケールは約20年である (Yachida *S et al*, 2010)。したがって、膵臓がんの治療戦略においては、早期発見可能な新たな画像診断装置や血液バイオマーカーの開発が急務である。

メタボロームまたはメタボロミクスは、代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定して、環境や疾患をはじめとする様々な要因により変化する代謝物から細胞の機能解析や、各疾患の診断応用などを研究する最も新しいオミックスである。

近年の質量分析計の発達により、血液や体液などの臨床試料を用いたメタボローム解析、すなわち網羅的に代謝産物、代謝反応を解析することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この新しいテクノロジーを用いて、膵臓がんの特徴的な代謝産物や代謝反応を同定し、これらの成果を膵臓がんの早期発見に有益である新たな画像診断法や血液バイオマーカーの開発に応用することである。

3. 研究の方法

組織サンプルを用いた研究

我々は、本プロジェクトの研究計画書を香川大学医学部の倫理審査委員会に提出し、その承認を得た (承認番号:平成 23-9)。インフォームド・コンセントのもとに、香川大学医学部・消化器外科で、2000年以降に手術によって摘出された膵臓がんの余剰試料 (新鮮凍結組織) を研究試料とした。Discovery Screen として、26症例の膵臓がん組織と非がん部膵組織を使用した。それぞれの凍結組織から、凍結切片スライドを作成し、膵臓がん病巣と非がん部膵組織であることを組織学的に確認した。

それぞれの凍結組織 (60 mg) を、ビーズ式細胞破砕装置を用いてホモジナイズし、フェノール・メタノール法で組織試料由来の抽出液を作成した。この抽出液を慶應義塾大学・先端生命科学研究所 (山形県・鶴岡市) に凍結したまま送付し、高感度・高速のメタボローム解析装置 (キャピラリー電気泳動・質量分析装置) で細胞内の物質を一斉に測定した。質量分析計で得られた膨大なデータは、メタボローム・ライブラリを用いて解析し、同一症例の膵臓がん病巣

と非がん部病巣で比較・検討した。さらに、これらのデータと臨床・病理学的な因子との関連性について検討している。

Validation Screen として、さらに30例の膵臓がん患者の手術で摘出された組織の余剰試料の新鮮凍結組織を用いて、その代謝反応や代謝物質を測定し、検証実験を行っている。

血液サンプルを用いた研究

国立がん研究センターにおいても、研究計画書を研究倫理審査委員会に提出し、その承認を得た (課題番号:2012-045)。

平成24年7月1日より8月31日までの間に、国立がん研究センター 中央病院を受診し「診療目的で採取された血液・組織などの医学研究への利用と、研究用採血へのご協力をお願い (新包括同意)」に同意した患者の内、膵臓がん患者を電子カルテから抽出した。その結果、対象患者は22例であった。同時に、がん予防・検診研究センターを同時期 (平成24年7月1日～8月31日) に受診し検体提供された受検者の検査結果を検討し、がんが発見されない症例を健常者 (対照 コントロール) とし、それらの患者を年齢ごとに層別化を行った。具体的には、40～44歳、45～49歳、50歳～54歳、55歳～59歳、60歳～64歳、65歳～69歳、70歳～74歳、75歳～79歳に割振りを行い、患者の年齢と性別が一致する健常者をマッチングさせた。

収集した患者血漿 (膵臓がん22例) と健常者血漿 (22例) は、冷凍保存したまま慶應義塾大学に郵送した。

また、血漿を用いた膵臓がん患者を対象に、バイオマーカー探索に必要な臨床情報 (性別、年齢、既往歴、臨床病期、治療など) 病理学的情報 (がんの大きさ、深達度、リンパ節転移など) を収集し、連結可能匿名化のもとでファイリングを行った。

4. 研究成果

組織サンプルを用いた研究

26症例の膵臓がん組織と非がん部膵組織を使用して、メタボローム解析を行った。約200の代謝物質を、質量分析計上でピークとして認めた。がん組織においてグルコース濃度は有意に減少し、がん組織における糖代謝の亢進が推察された。一方、がん組織において乳酸濃度の有意な上昇を認め、グルコースが解糖系により乳酸の産生を来したと考えられた。

今回のメタボローム解析の結果、膵臓がん組織においてグルコースの量が著明に減少し、乳酸の著明な上昇を認めたことより、膵臓がんにおいても Warburg 効果が推測された。膵臓がん組織においては、初めて観察されたことになる。

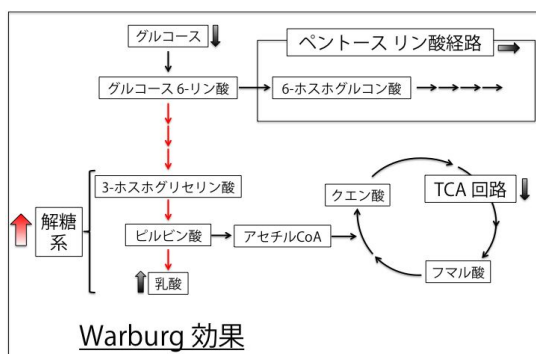
このように糖代謝の亢進を疑わせる所見は、临床上、膵臓がんにおける¹⁸F-FDG-PET検査の有用性を裏付ける結果であり、大変興

味深い。

ペントース・リン酸経路はがん組織と非がん部組織を比較して、有意な差はみられなかった。TCA 回路の代謝産物は、いずれもがん部で非がん部膵組織と比較して、減少傾向を認めた。

アミノ酸解析においては、ほとんど全てのアミノ酸が、がん部で非がん部と比較してその濃度の上昇を認めた。これは、これまでの大腸がんや胃がんにおける報告と一致するものである (Hirayama A *et al.* 2009)。

現在、これらのメタボローム解析の結果と臨床・病理学的因子との関連性を検討し、膵臓がんの特徴的な代謝産物や代謝反応を同定中である。



<膵臓がん組織における解糖系ならびにペントースリン酸経路、酸化的リン酸化 (TCA 回路) のまとめ>

血液サンプルを用いた研究

血漿サンプルからは、組織サンプルと同様に約 200 の代謝物質を、質量分析計上でピークとして認めた。また、未知のピークも認められた。膵臓がん患者の血漿 22 サンプルと、年齢と性別をマッチさせた健常者の血漿 22 サンプルとを比較したところ、乳酸等で有意な差が認められた。

しかし、その後に膵臓がん患者の血漿と健常者の血漿で、採血から冷蔵までの時間にわずかな違いがあることが判明した。特定された代謝産物が、採血後の冷凍までの時間の影響の可能性を否定するために、もう一度、採血から前処理までのプロセスを全く同じにして、再検討を行っている。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Kim MS, Zhong Y, Yachida S, Rajeshkumar NV, Abel ML, Marimuthu A, Mudgal K, Hruban RH, Poling JS, Tyner JW, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Pandey A. Heterogeneity of pancreatic cancer metastases in a single patient revealed by quantitative proteomics.

Mol Cell Proteomics 2014, in press. 査読あり

pii: mcp.M114.038547.

Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, Yachida S.

Immunohistochemically detected expression of three major genes (*CDKN2A/p16*, *TP53* and *SMAD4/DPC4*) strongly predicts survival in patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* 2013, 258: 336-346. 査読あり

doi:10.1097/SLA.0b013e3182827a6.

Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. *Oncogene* 2013, 32: 5253-5260. 査読あり

doi: 10.1038/onc.2013.29.

Yamamoto N, Okano K, Kushida Y, Deguchi A, Yachida S, Suzuki Y.

Clinicopathology of recurrent hepatocellular carcinomas after radiofrequency ablation treated with salvage surgery. *Hepatol Res* 2013, Aug 19. [Epub ahead of print]. 査読あり

doi: 10.1111/hepr.12223.

Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM,

Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, Hruban RH, Klein AP, Jones S, Velculescu V, Wolfgang CL, Iacobuzio-Donahue CA. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* 2012, 18: 6339-47. 査読あり

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1215.

Yachida S. Novel therapeutic approaches in pancreatic cancer based on genomic alterations. *Curr Pharm Des* 2012, 18: 2452-63. 査読あり

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内田 真一 (YACHIDA, Shinichi)
国立がん研究センター研究所・難治がん研
究分野・ユニット長
研究者番号：20359920

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：