

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462042

研究課題名(和文)メタボローム解析による胃癌悪性度の予測

研究課題名(英文)Prediction of malignant phenotype using metabolome analysis in gastric cancer

研究代表者

寺島 雅典(Terashima, Masanori)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：40197794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行胃癌185例から腫瘍組織、非癌粘膜を採取し、CE-TOFMS法、LC-TOFMS法にてメタボローム解析を実施した。腫瘍組織においてlactateの濃度が高く、好氣的解糖(Warburg effect)が優位である事が示された。また、未分化型癌においてはATPやGTPが低値を示し、解糖系の代謝産物は分化型と非腫瘍組織の中間値をとり、分化型とは異なる傾向が認められた。

進行胃癌188例に対して全エクソン解析並びに全遺伝子発現解析を行った。ACRG分類に従って分類するとMSI群21例、EMT群22例、TP53+群15例、TP53-群130例となり、EMT群、TP53+群で生存転帰が不良であった。

研究成果の概要(英文)：Metabolome analysis using CE-TOFMS and LC-TOFMS methods in tumor and corresponding normal tissue was performed from in 185 advanced gastric cancers. The concentration of lactate was significantly higher in tumor tissue suggesting that the Warburg effect is predominantly observed in tumor. In addition, the levels of ATP and GTP were lower and most of the level of metabolite from glycolysis showed intermediate level between normal tissue and differentiated type in undifferentiated type. It is suggested that metabolomic profile is quite different between differentiated type and undifferentiated type.

Whole exam analysis and comprehensive expression analysis were performed in 188 gastric cancer.

Classification according to Asian Cancer Research Group (ACRG) was possible. We classified 21 in MSI, 22 in EMT, 15 in TP53+ and 130 in TP53-. Relapse-free survival was significantly worse in EMT and TP53+ patients.

研究分野：医師薬学

キーワード：メタボローム解析 miRNA splicing variant whole exome sequence

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は未だにわが国で最も罹患率の高い腫瘍であり、毎年 50,000 人が胃癌により死亡している。進行胃癌に対する外科的な手術療法に関してはわが国のレベルが世界で最も高く、わが国のリンパ節郭清術が世界の標準と認識されるに至っている。しかしながらこうした高い手術の技術を持ってしても進行胃癌の治療成績は未だ不良であり、転移や再発の予測マーカーの確立が切望されている。これまで、様々なバイオマーカーに関する研究が実施されているが、未だ有用なマーカーは確立されていない。我々も、これまえ腫瘍細胞に特異的に発現する splicing variant を用いた腫瘍特異的なマーカーの確立に関して科学研究費により研究してきたが、臨床的に有用なマーカーを確立するまでには至っていない。

一方、癌細胞は増殖活性が高い事や、低酸素状態に暴露されている事が多い事により、正常細胞とは異なる様々な代謝経路を有している事が知られている (M.G. Vander Heiden et al., Science 324,1029-1033, 2009)。近年のプロテオミクス技術の進歩により、腫瘍組織や体液中の代謝産物 (メタボローム) の網羅的な解析が可能となっている。しかし、これまで消化器癌におけるメタボローム解析の報告は少なく、とりわけ胃癌を対象とした網羅的解析の報告は Hirayama ら (Cancer Res 69(11) 4918-7925, 2009) による少数例 (n=12) を対象とした CE-TOFMS のよる報告のみである。

そこで、胃癌腫瘍組織、血清、尿の網羅的メタボローム解析を実施し、胃癌における転移・再発マーカーの確立を目的として本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

そこで、胃癌腫瘍組織、血清、尿の網羅的メタボローム解析を実施し、胃癌における転移・再発マーカーを確立する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

進行胃癌 200 例を対象として、術前に全血、血清、尿を採取し凍結保存。手術時摘出標本から癌組織、非癌部粘膜を採取し同様に凍結保存する。凍結保存した検体を溶解後にホモジナイズし、methanol/chloroform/water 法にて抽出し、CE-TOFMS 法、LC-TOFMS 法にてメタボロームを測定。得られた結果と臨床病理学的因子とを比較検討し、転移、再発と関連のあるメタボロームを探索する。また患者血液から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により網羅的に micro-RNA を解析する。転移や再発の予測因子となり得るメタボロームと関連のある micro-RNA を探索し、今後の治療標的の研究に備える。

### 4. 研究成果

#### 1) メタボローム解析

これまで進行胃癌 185 例から全血、血清、尿、腫瘍組織、非癌粘膜を採取し、CE-TOFMS 法、LC-TOFMS 法にてメタボローム解析を実施した。測定は既に終了しているが、これまで解析された検体における結果では、腫瘍組織において lactate の濃度が高く、好氣的解糖 (Warburg effect) が優位である事が示された。また、未分化型癌においては ATP や GTP が低値を示し、解糖系の代謝産物の多くは分化型と非腫瘍組織の中間値をとるなど、分化型とは異なる傾向が認められ (図 1、図 2) 分化型癌と未分化型癌では代謝を標的とした治療法の開発に際して異なるアプローチが必要となる可能性が示唆された。

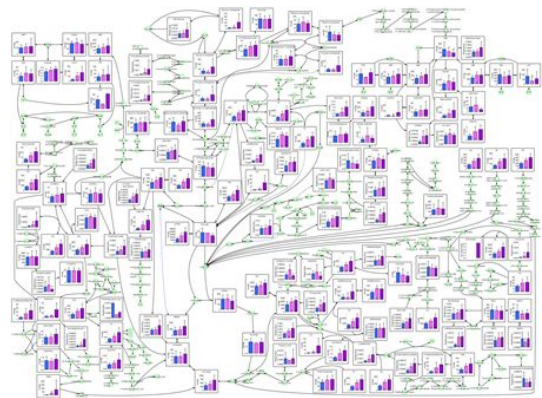


図 1 非腫瘍組織、分化型癌、未分化型癌におけるメタボローム解析

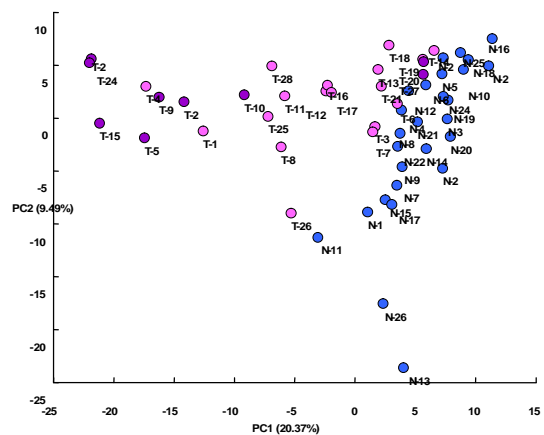


図 2 非腫瘍組織と腫瘍組織 (分化型、未分化型) におけるメタボライトの主成分分析

#### 2) 遺伝子発現解析による胃癌の分類

進行胃癌 188 例を対象として手術時摘出標本から癌組織、非癌部粘膜を採取し凍結保存。凍結保存した検体を用いて全エクソン解析 (Ion Proton, Life Technologies) および網羅的遺伝子発現解析 (DNA microarray, Agilent Technologies) を実施した。得られた結果を元に、ACRS のサブタイプモデルを当てはめ、我が国の胃癌分類における妥当性に関して検討した。その結果、胃癌は MSI(21 例)、MSS/EMT(22 例)、MSS/TP53+(15 例)、

MSS/TP53- (130 例) 分類可能であった(図3)。しかも MSI では高齢で、分化型癌が多く、L 領域の腫瘍が多いこと、EMT では若年者が多く、未分型で浸潤性増殖を呈する腫瘍が多いなど、これまでの報告と同様な傾向が認められた。また、観察期間は短いものの、EMT、MDSS/TP53+ で無再発生存期間が不良な傾向が認められた。

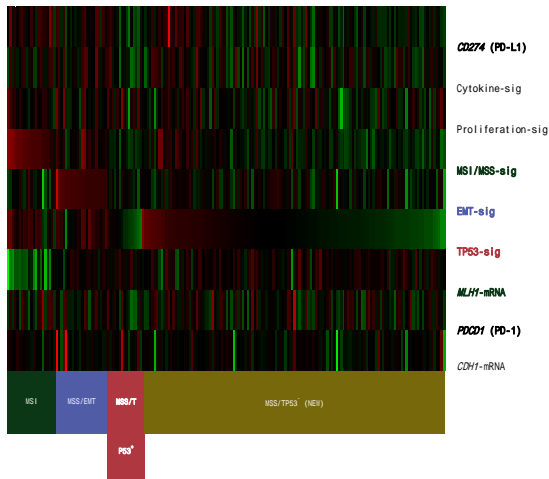


図3 遺伝子発現解析による胃癌の分類

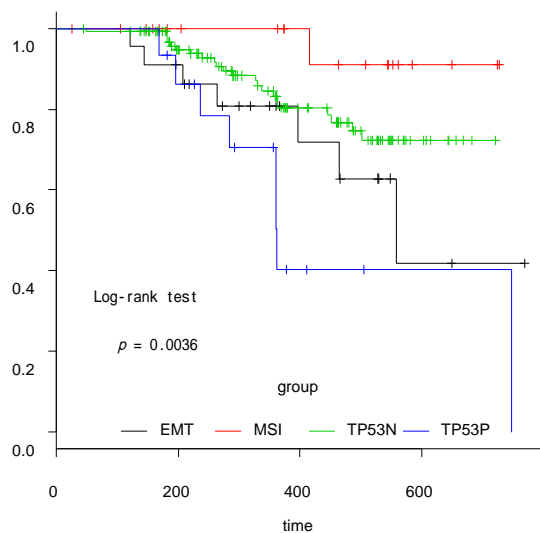


図4 遺伝子発現サブグループ別の無再発生存期間

### 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 14 件)

Terashima M, Tanabe K, Yoshida M, Kawahira H, Inada T, Okabe H, Urushihara T, Kawashima Y, Fukushima N, Nakada K. Postgastrectomy Syndrome Assessment Scale

(PGSAS)-45 and Changes in Body Weight are Useful Tools for Evaluation of Reconstruction Methods Following Distal Gastrectomy. *Ann Surg Oncol. Suppl 3: S370-8*, 2014. 査読有り DOI: 10.1245/s10434-014-3583-z

Kitagawa Y, Takeuchi H, Takagi Y, Natsugoe S, Terashima M, Murakami N, Fujimura T, Tsujimoto H, Hayashi H, Yoshimizu N, Takagane A, Mohri Y, Nabeshima K, Uenosono Y, Kinami S, Sakamoto J, Morita S, Aikou T, Miwa K, Kitajima M. Sentinel node mapping for gastric cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *J Clin Oncol. 31: 3704-10*, 2013. 査読有り DOI:10.1200/JCO.2013.50.3789

Takahari D, Hamaguchi T, Yoshimura K, Katai H, Ito S, Fuse N, Konishi M, Yasui H, Terashima M, Goto M, Tanigawa N, Shirao K, Sano T, Sasako M. Survival analysis of adjuvant chemotherapy with S-1 plus cisplatin for stage III gastric cancer. *Gastric Cancer. 17: 383-6*, 2014. 査読有り DOI: 10.1007/s10120-013-0264-8

Goto H, Tokunaga M, Miki Y, Makuuchi R, Sugisawa N, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Niihara M, Tsubosa Y, Terashima M, The optimal extent of lymph node dissection for adenocarcinoma of the esophagogastric junction differs between Siewert type II and Siewert type III patients. *Gastric cancer, 18: 375-381*, 2015. 査読有り DOI: 10.1007/s10120-014-0364-0

Miki Y, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Terashima M, Perioperative Risk Assessment for Gastrectomy by Surgical Apgar Score. *Annals of Surgical Oncology. 21: 2601-7*, 2014. 査読有り DOI: 10.1007/s00595-015-1201-8

Ohshima K, Kanto K, Hatakeyama K, Ide T, Wakabayashi-Nakao K, Watanabe Y, Sakura N, Terashima M, Yamaguchi K, Mochizuki T. Exosome-mediated extracellular release of polyadenylate-binding protein 1 in human metastatic duodenal cancer cells. *Proteomics. 14: 2297-306*, 2014. 査読有り DOI: 10.1002/pmic.201300477

Terashima M, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Miki Y, Makuuchi R, Honda S, Tatsubayashi T, Takagi W, Omori H, Hirata F. Robotic surgery for gastric cancer. *Gastric Cancer. 18: 449-57*, 2015. 査読有り DOI: 10.1007/s10120-015-0501-4

Hatakeyama K, Yamakawa Y, Fukuda Y, Ohshima K, Wakabayashi-Nakao K, Sakura N, Tanizawa Y, Kinugasa Y, Yamaguchi K, Terashima M, Mochizuki T. A novel splice variant of XIAP-associated factor 1 (XAF1) is expressed in peripheral blood containing gastric cancer-derived

circulating tumor cells. *Gastric Cancer*. 18: 751-761, 2015. 査読有り DOI:10.1007/s10120-014-0426-3  
Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, Sakuramoto S, Katai H, Sano T, Imamura H. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer*. 18: 538-48, 2015. 査読有り DOI:10.1007/s10120-014-0413-8  
Misawa K, Terashima M, Uenosono Y, Ota S, Hata H, Noro H, Yamaguchi K, Yajima H, Nitta T, Nakada K. Evaluation of postgastrectomy symptoms after distal gastrectomy with Billroth-I reconstruction using the Postgastrectomy Syndrome Assessment Scale-45 (PGSAS-45). *Gastric Cancer*. 18: 675-81, 2015. 査読有り DOI: 10.1007/s10120-014-0407-6  
Miki Y, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Terashima M. Staging Laparoscopy for Patients with cM0, Type 4, and Large Type 3 Gastric Cancer. *World J Surg*. 39: 2742-7, 2015. 査読有り DOI:10.1007/s00268-015-3144-z  
Miki Y, Kawamura T, Sugisawa N, Makuuchi R, Nakajima T, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Terashima M. Risk Classification using the Ki-67 Labeling Index for Surgically-Treated Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors. *Hepatogastroenterology*. 62: 919-23, 2015. 査読有り DOI: なし  
Sugisawa N, Tokunaga M, Makuuchi R, Miki Y, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Terashima M. A phase II study of an enhanced recovery after surgery protocol in gastric cancer surgery. *Gastric Cancer*. 19: 961-967, 2016. 査読有り DOI: 10.1007/s10120-015-0528-6  
Tokunaga M, Makuuchi R, Miki Y, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Terashima M. Late phase II study of robot-assisted gastrectomy with nodal dissection for clinical stage I gastric cancer. *Surg Endosc*. 40: 1172-7, 2016. 査読有り DOI: 10.1007/s00268-015-3398-5

〔学会発表〕(計 9 件)

Terashima M, et al: Survivin expression in circulating cells of patients with gastric cancer. *Gastrointestinal Cancer Symposium 2014*, 2014.01.16-18, San Francisco, (USA)  
Hatakeyama K, Oshima K, Terashima M, et al.: Identification of novel protein isoforms in secretome using combined analysis of microarray and mass spectrometry. 第 75 回日本癌学会、2013.20.03-02, 横浜  
Terashima M, et al.: Multi-omics profiling

of gastric cancer using High-tech Omics-based Patient Evaluation (HOPE). *Gastrointestinal Cancer Symposium*, 2015.01.15-17, San Francisco (USA).

寺島雅典他、胃癌に対するマルチオミクス解析を用いた癌患者評価 (プロジェクト HOPE)、第 25 回日本消化器癌発生学会、2014.11.13-14、福岡市

徳永正則、寺島雅典、他：食道癌の進行が代謝プロファイルに与える影響-CE-TOFMS を用いたメタボローム解析の結果から、第 115 回日本外科学会、2015.4.16-18、名古屋市

Terashima M, et al.: Conversion surgery after chemotherapy for unresectable advanced gastric cancer-What is the evidence. *Singapore Gastric Cancer Consortium 8<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting*, 2015.07.22-23, Singapore

幕内梨恵、寺島雅典、他：分子プロファイルに基づく胃癌の分類、第 53 回日本癌治療学会、2016.10.29-31、京都市

Terashima M, et al.: Gene expression profile of Japanese gastric cancer patients using Asian Cancer Research Group classification. 2016 *Gastrointestinal Cancer Symposium*, 2016.01.21-23, San Francisco (USA)

Makuchi R, Terashima M, et al: Whole exome sequencing and gene expression profiling of neuroendocrine carcinoma in the stomach. 2016 *Gastrointestinal Cancer Symposium*, 2016.01.21-23, San Francisco (USA)

〔図書〕(計 6 件)

寺島雅典、メジカルビュー社、胃外科のすべて、2014、351 頁

寺島雅典他、南山堂、がん患者の輸液・栄養療法、2014、278 頁

寺島雅典他、メディカルビュー社、イラストと写真で見る内視鏡医と外科医のコラボレーション手術、2015、175 頁

寺島雅典。南江堂、胃切除術後障害ハンドブック、2015、169 頁

寺島雅典、中外医学社、EBM 癌化学療法・分子標的治療法、2015、713 頁

寺島雅典、医薬ジャーナル、胃がん外来化学療法へのアプローチ、2016、123 頁

〔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

寺島 雅典 (Terashima Masanori)  
静岡県立静岡がんセンター・その他部  
局・研究員  
研究者番号：40197794

##### (2) 研究分担者

大島 啓一 (Oshima Keiichi)  
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究  
員  
研究者番号：10399587  
楠原正俊 (KusuharaMasatoshi)  
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究  
員  
研究者番号：40169991

##### (3) 連携研究者

なし