

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670681

研究課題名(和文) 質量顕微鏡を用いた低分子メタボローム解析の、前立腺癌画像診断への応用

研究課題名(英文) The application to image diagnosis of prostate cancer by metabolomic analysis using high resolution imaging mass spectrometry

研究代表者

神波 大己 (Tomomi, Kamba)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20402836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺特異抗原(PSA)は広く使われている前立腺癌の腫瘍マーカーだが、特異度が低く悪性度と相関しない等の短所があり、PSAを補完する新たな腫瘍マーカーが望まれている。本研究では高感度質量顕微鏡を用いた低分子メタボローム解析を行い、癌特異的に発現している分子を同定し画像診断への応用を目指した。前立腺癌組織では正常前立腺上皮に比べ特定の3種類のフォスファチジルイノシトール(PI)の発現亢進を同定し、これらのPI発現プロファイルの違いが新たな前立腺癌診断ツールとして期待された。しかし、MRスペクトロメトリーではこれらの分子を認識することは困難であった。今後は同定した分子の機能解析を検討している。

研究成果の概要(英文)：Prostate specific antigen (PSA) is widely accepted as a serum biomarker for the diagnosis of PCa. However, due to its low specificity and lack of relevance with aggressiveness, novel biomarkers to complement PSA are needed. Our aim was to identify new biomarker for prostate cancer by metabolomic analysis using high resolution imaging mass spectrometry. And we aimed at application to diagnostic imaging of new biomarker candidate. We identified that the expression of three phosphatidylinositols (PIs) was significantly higher in cancer tissue than in benign epithelium. These differences in PI expression profiles may serve as a novel diagnostic tool for prostate cancer. However, it was difficult to recognize the difference of these PIs' expression between cancer and benign epithelium by using Magnetic Resonance Spectrometry (MRS). We are planning to investigate these PIs function.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：前立腺癌 バイオマーカー メタボロミクス 質量顕微鏡 リン脂質

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦においても罹患率、死亡率ともに上昇している疾患であるが、その初期の診断、治療効果判定および再発の診断のいずれにおいても前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen, 以下PSA)に依存する程度が高い。PSAには、特異度が低い、悪性度を反映しない、といった短所があり、これらの短所を補完するマーカーは近年強く求められている。現在、前立腺癌組織や前立腺癌患者血清を用いた各種オミックス解析により、マーカー候補分子の同定がなされているが、実用的なマーカーの開発には至っていない。それらの研究の多くはタンパク質を対象としており、リン脂質を中心とした低分子物質についてはほとんど検討されていない。前立腺癌はその臨床的不均一性および組織学的な不均一性により、発癌メカニズムに関しては依然として不明な点が多いが、脂質代謝は細胞の成長や分裂・分化・運動性等の細胞過程に作用することでヒトの発がんに関して重要な役割を果たしており、癌部と非癌部でリン脂質の発現パターンが異なるという報告もある。

一方でMagnetic Resonance Imaging (以下MRI)やエコーなどの画像診断が前立腺癌の診断に用いられており、それらは腫瘍を形成するような大きな病巣の場合には有用であるが、微小な病変の局在診断は困難である。現在用いられているMagnetic Resonance Spectroscopy (以下MRS)は、通常のMRIよりも高度な診断率が報告されているものの、十分とは言えない。

これらの状況を背景に、本研究では、臨床検体を用いた *in situ* 低分子メタボローム網羅的解析による、新たな前立腺癌画像診断法の探索を行った。

### 2. 研究の目的

高解像度の質量顕微鏡(Imaging Mass Spectrometry 以下IMS)を用いて、前立腺癌細胞において特異的に発現しているリン脂質を同定し、その代謝をMRSの技術で画像化することにより、前立腺癌の新たな診断方法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

1) 前立腺癌に対する前立腺全摘除術を施行した症例の組織標本をOptimal cutting temperature compound (Tissue-Tek<sup>®</sup>; Sakura Finetek)を用いて凍結包埋。クライオスタットを用いて10 $\mu$ m厚に薄切しIndium-Tin Oxide-coated glass (以下ITOガラス)に乗せた後、matrixとして9-aminoacridine hemihydrates (以下9-AA)を選択し真空蒸着装置を用いて上記組織に蒸着。これを分解能10 $\mu$ mの高解像度質量顕微鏡を用いてMS/MS解析を行い、低分子メタボロームをターゲットとした網羅的解析を行い、

候補となる低分子を絞り込む。

2) 解析に用いたセットとは異なる症例の組織標本でvalidationを行う。

3) 当該低分子の発現が持つ分子生物学的意義を解明する。

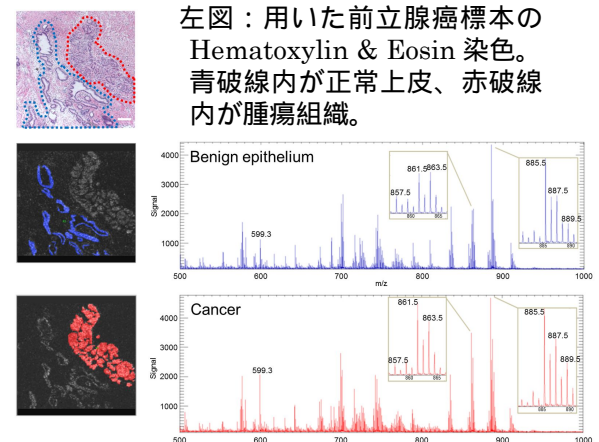
4) 当該低分子の発現を同定しうるMRSの条件検討を行う。

5) 臨床症例にMRSを行い、全摘標本、針生検との比較を行って、その有用性を検討する。

### 4. 研究成果

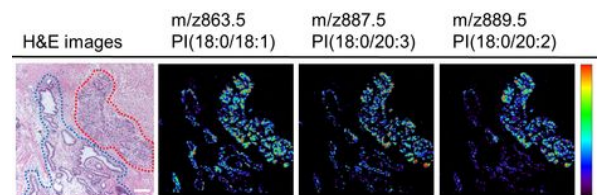
1) 14症例分の前立腺癌臨床検体を用いた高解像度質量顕微鏡による  $m/z$  1000以下の低分子を標的とした網羅的質量分析法(図1-1.)で、前立腺によく発現する26分子を同定し、MS/MS解析によりそれらのうち14分子はPIと同定された。また、PI(18:0/18:1), PI(18:0/20:3), PI(18:0/20:2)は正常腺管に比べ前立腺癌部で特異的に亢進していることを同定した(図1-2.)

図1-1. 臨床検体を用いた高解像度質量顕微鏡による  $m/z$  1000以下の低分子を標的とした網羅的質量分析



左図：用いた前立腺癌標本のHematoxylin & Eosin染色。青破線内が正常上皮、赤破線内が腫瘍組織。  
上図：H&E染色に対応する部位の質量顕微鏡像と得られたMass profile.

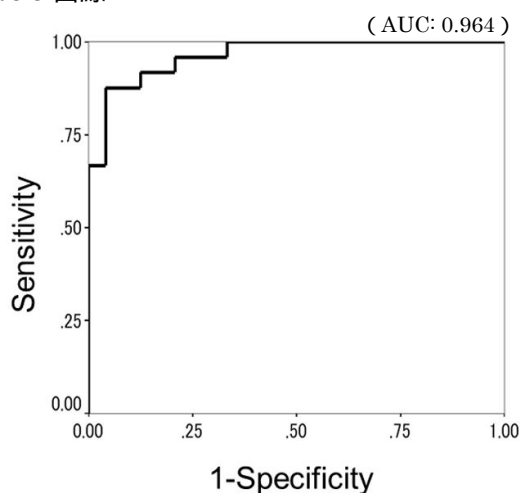
図1-2. 前立腺癌部でのPI発現解析



2) 上記14症例から得られたプロファイルを元に、統計解析ソフトSIMCA(Umetrics AB, Umeå, Sweden)を用いてorthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)法でPI発現プロファイルによる癌部の診断アルゴリズムを作成した。前立腺癌のため全摘除術を施行された異なる24症

例の検体を用いて作成した診断アルゴリズムを評価すると感度 87.5%, 特異度 91.7%と高い診断率を有することが判った(図 2.)

図 2. 得られたアルゴリズムから作成した ROC 曲線



3) 上記により得られた脂質プロファイルと予後の関係を解析することで、リゾフォスファチジルコリン (LPC) の発現が正常前立腺上皮に対し前立腺癌部で有意に低下していることが判明した。

4) および 5) 上記で得られた知見を元に前立腺の脂質の発現を MRS で画像化すべく条件を設定し様々な検討を行ったが、得られるデータはノイズが多く脂質の発現差に基づいた画像解析には至らなかった。

#### 結語

前立腺癌に対する前立腺全摘除術を施行した症例の組織標本から、高感度質量顕微鏡を用いて低分子メタボローム解析を行った。得られた Mass Profile から候補となる脂質分子を同定した。今後は予後との関連・分子の作用機序をさらに解析するとともに、画像診断への応用を検討していくことが今後の研究課題である。

#### 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)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Japanese phase I study of cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer. Nozawa M, Kamba T(他 21 名, 11 番目). *Int J Clin Oncol*. 査読有 2015 Mar 26. [Epub ahead of print]

2. Prognosis of Japanese patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma in the era of molecular-targeted therapy. Shinohara N, Kamba T(他 10 名, 5 番目). *Cancer Sci*. 査読有 2015 May;106(5):618-26. doi: 10.1111/cas.12646. Epub 2015 Mar 19.
3. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. Fukudo M, Kamba T(他 9 名, 7 番目), Yamasaki T. *Clin Pharmacokinet*. 査読有 Feb;53(2):185-96, 2014. doi: 10.1007/s40262-013-0108-z
4. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Maeno A, Kamba T(他 7 名, 7 番目). *Prostate*. 査読有 2014 Dec;74(16):1604-12. doi: 10.1002/pros.22877. Epub 2014 Aug 29
5. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. Goto T, Naoki Terada, Kamba T(他 11 名, 11 番目). *PLoS One*. 査読有 28;9(2):e90242, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0090242. eCollection 2014.
6. Improvement of prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma and Memorial Sloan-Kettering Cancer Center intermediate risk features by modern strategy including molecular-targeted therapy in clinical practice. Kamba T(他 8 名, 1 番目), Yamasaki T. *Int J Clin Oncol*. 査読有 19(3):505-15, 2014. doi: 10.1007/s10147-013-0581-2. Epub 2013 Jun 28.
7. The effect of ABCG2 genotype on the population pharmacokinetics of sunitinib in patients with renal cell

- carcinoma. Mizuno T, **Kamba T**(他 8 名、6 番目), Yamasaki T, Ogawa O. ***Ther Drug Monit.*** 査読有 Jun;36(3):310-6, 2014  
doi: 10.1097/FTD.0000000000000025.
8. Long-term outcomes of dynamic conformal arc irradiation combined with neoadjuvant hormonal therapy in Japanese patients with T1c-T2N0M0 prostate cancer: case series study. Ikeda I, **Kamba T**(他 8 名、5 番目). ***Jpn J Clin Oncol.*** 査読有 ;44(2):180-5. 2014  
doi: 10.1093/jjco/hyt197. Epub 2013 Dec 29.
9. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. Kobayashi T, Inoue T, **Kamba T**, Ogawa O. ***Int J Mol Sci.*** 査読有 14(8):15615-35, 2013  
doi: 10.3390/ijms140815615.
10. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon- $\alpha$  therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Eto M, **Kamba T**(他 11 名、2 番目). ***Eur Urol.*** 査読有 63(4):745-52, 2013  
doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.052. Epub 2012 Sep 28.
11. Role of mammalian target of rapamycin inhibitor in the treatment of metastatic epithelioid angiomyolipoma: A case report. Kohno J, **Kamba T**(他 7 名、5 番目). ***Int J Urol.*** 査読有 20(9):938-41, 2013  
doi: 10.1111/iju.12095. Epub 2013 Jan 24.
- [学会発表](計 5 件)
1. 後藤崇之、寺田直樹、神波大己ほか  
「*In situ* lipid profiling of prostate cancer tissues using high resolution imaging mass spectrometry」, 『第 72 回日本癌学会学術総会』、P3297、横浜、2013 年 10 月
2. 後藤崇之、寺田直樹、神波大己ほか  
「高解像度質量顕微鏡を用いた前立腺癌組織の *in situ* 脂質プロファイリング」, 『第 23 回泌尿器科分子細胞研究会』、P-05、山形、2014 年 3 月
3. Takayuki Goto, Naoki Terada, Tomomi Kamba, et al.  
「*In situ* lipid profiling of prostate cancer tissues using high resolution imaging mass spectrometry」, 『The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Pacific Prostate Society』, P-105, 沖縄、2014 年 3 月
4. Takayuki Goto, Naoki Terada, Tomomi Kamba, et al.  
「The expression profile of phosphatidylinositol in high resolution imaging mass spectrometry is a potential biomarker for prostate cancer.」, 『29<sup>th</sup> Annual EAU (European Association of Urology) Congress』, P-110, Stockholm, 2014 年 4 月
5. 後藤崇之、寺田直樹、山崎俊成、神波大己ほか  
「高解像度質量顕微鏡を用いた *in situ* 脂質発現プロファイル解析による前立腺癌バイオマーカー探索」, 『第 73 回日本癌学会学術集会』、P-1380、横浜、2014 年 9 月
- [その他]  
ホームページ等  
京都大学医学研究科泌尿器科学教室 HP  
<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
神波 大己 (Kamba Tomomi)  
京都大学 医学研究科 准教授  
研究者番号 : 20402836
- (2)研究分担者  
山崎 俊成 (Yamasaki Toshinari)  
京都大学 医学研究科 助教  
研究者番号 : 00607749
- 寺田 直樹 (Terada Naoki)  
京都大学 医学研究科 助教  
研究者番号 : 80511881