

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462066

研究課題名(和文)メタボローム解析による膵癌特異的代謝産物の同定と分子診断マーカーへの展開

研究課題名(英文) Identification of pancreatic cancer specific metabolites by metabolome mapping and application possibility for diagnostic biomarker.

研究代表者

寅田 信博 (TORATA, Nobuhiro)

九州大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：00398075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺組織119サンプル(腫瘍84、正常35)を用いたメタボロームマッピングにおいて、1915個のピークを検出し、高いシグナルを示す185ピークを解析対象として検討を行った。対応代謝物が推定できた物質は18で、ATPなどエネルギー代謝に関するものであった。腫瘍、正常のEnergy Charge(EC)およびATP+ADP+AMP総和量(AXP)の比較で、いずれも腫瘍部において有意に高値を示したが、1個以上のリンパ節転移有無および組織型、腫瘍径とは明らかな相関は見られなかった。膵組織を用いた解析についても継続して行っている。

研究成果の概要(英文)：Six frozen tissue microarray(ftMA)blocks were constructed using 119 breast tissue sections from 99 patients, carcinoma, normal areas of individual tissues were confirmed by histology. We detected 1,915 endogenous metabolite peaks by direct tissue MALDI-MSI analysis of breast carcinoma ftMAs. Among them, 185 commonly detected peaks were subjected to further analysis, and 88.6% of peaks from carcinoma tissues were significantly different, 92.7% of which showed higher than normal intensities. We further identified 18 metabolites related to energy metabolism such as ATP. Comparing metabolite profiles from carcinoma and normal tissues, we found that the EC and the sum of AXP were significantly higher in cancerous tissues than normal tissues, but there were no significant differences between lymph node metastasis, histological type or tumor size. Comparing tumor subtypes, a higher EC was observed in ER+/HER2- tumors than other subtypes, but AXP showed no significant differences among subtypes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：MALDI-MSI Energy Charge 凍結組織アレイ バイオマーカー探索

### 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である(Matsuno, Pancreas, 2004)。一方で、20mm以下(TS1)の小膵癌の中には比較的予後良好なものがあるという報告があり(Maire, Gut, 2002)、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同定による治療成績向上への寄与が期待される。

従来、DNAやRNAおよびタンパク質を対象とした検索が行われてきたが、分析技術の発展に伴い、有機酸・アミノ酸など低分子化合物といった微量な代謝産物を分析できるようになった。代謝産物はゲノム情報の最終的形質発現の集合であり、それらを網羅的に分析するメタボローム解析は腫瘍細胞特異的な活性を特定・解明する上で重要な意味を持つと考えられている。

前述のように、従来の分析法では、組織内局在情報が失われていたが、MALDI-MSIにより、凍結組織切片を用いたマッピングが可能となった。しかし、凍結臨床サンプルはパラフィンブロックと比べて、サンプルの変化が最小限に抑えられるものの、温度上昇による融解など取り扱いが困難で、効率よく実験を行うための工夫が必要であった。

そこで、我々は、独自の凍結組織マイクロアレイブロック(fTMA)作成方法を考案し(図1)、MALDI-MSIで利用できることを確認した。また、fTMAの凍結切片は免疫染色、In Situ Hybridization等にも使用できることが確認できており、組織像に各種分析で得られた情報を重ねあわせ、画像分析手法を駆使し、マーカー候補代謝産物の臨床的意義について検討する。

### 2. 研究の目的

手術切除標本由来凍結膵組織(癌および非癌部)を用いて島津製作所が開発した質量分析装置であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MSI)を用いてメタボリックマッピングを行い、得られた網羅的情報から膵癌特異的代謝産物および代謝経路を同定する。さらに末梢血や膵液における、代謝産物の解析を行い、その診断的意義を検討する。また臨床経過に関する情報があるサンプルを用いて予後および治療効果予測指標としての有用性について評価する。

### 3. 研究の方法

新鮮凍結組織を配置した組織マイクロアレイブロックを作製し、MALDI-MSIによる網羅的な代謝産物の解析をおこない腫瘍・非腫瘍部でのシグナルを収集する。得られたシグナルは、統計学的手法をもちいて分析を行い、腫瘍・正常組織で異なる分布を示す代謝産物を絞りこむ。

上記で絞り込んだ代謝産物について、文献およびKEGG PATHWAY Database等で、機能および発現意義を調査・検討し、当該代謝産物発現に関連すると予想される因子(遺伝子、タンパク)を選定する。

それら関連因子の発現状態を免疫染色等で確認し、当該代謝産物発現との相関を調べる。

### 4. 研究成果

99症例から採取した乳腺組織119サンプル(腫瘍84、正常35)を用いて、凍結組織アレイブロックを作製し、メタボロームマッピングにおいて(図1)、1915個のピークを検出した。それらのうち、60%以上のサンプルで共通に検出され、高いシグナルを示す185ピークを解析対象として、さらなる検討を行った。それらのうち、対応する代謝物が推定できた物質は18で、その多くは、ATPなどエネルギー代謝に関するものであった。腫瘍、正常のEnergy Charge(EC)およびATP+ADP+AMP総和量(AXP)の比較で、いずれも腫瘍部において有意に高値を示し、(EC; T : N = 0.56 : 0.35、AXP; 17453 : 2066, p<0.0001)、ECシグナルを用いたマッピングイメージでも腫瘍部に強いシグナルを認めた(図2)。しかし1個以上のリンパ節転移有無および組織型、腫瘍径とは明らかな相関は見られなかった。

ここまでの研究成果は現在論文にまとめ投稿中である。

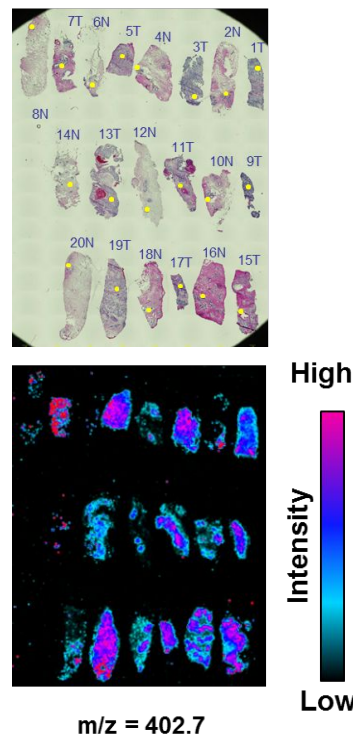


図1:凍結組織アレイブロック HE 染色像(上)とメタボリックマッピングイメージ(下)

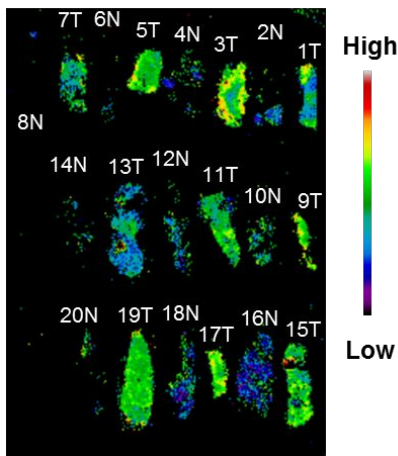
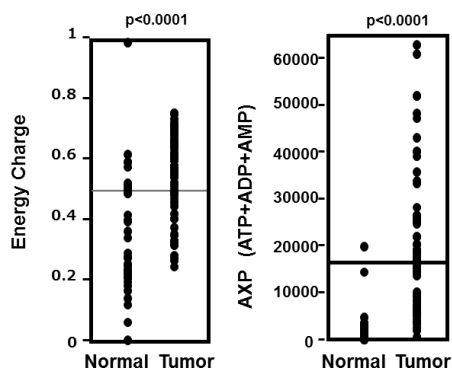


図 2: 腫瘍および正常部の EC、AXP 比較凍(上)  
EC マッピングイメージ(下)

### 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)

- Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama M, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment and released fatty acids enhance invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 8(11):18280-18295, 2017, doi:10.18632/oncotarget.15430. 査読有
- Li B, Baba T, Miyabayashi K, Sato T, Shima Y, Ichinose T, Miura D, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi K. Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells. *Endocrine J.* 64:315-324, 2017, doi:10.1507/endocrj.EJ16-0467. 査読有

- Nakamura J, Morikawa-Ichinose T, Fujimura Y, Hayakawa E, Takahashi K, Ishii T, Miura D, Wariishi H. Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). *Anal. Bioanal. Chem.* 409:1697-1706, 2017, doi:10.1007/s00216-016-0118-4 査読有
- Sato E, Mori T, Mishima E, Suzuki A, Sugawara S, Kurasawa N, Saigusa D, Miura D, Morikawa-Ichinose T, Saito R, Oba-Yabana I, Oe Y, Kisu K, Naganuma E, Koizumi K, Mokudai T, Niwano Y, Kudo T, Suzuki C, Takahashi N, Sato H, Abe T, Niwa T, Ito S. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci. Rep.* 6:36618, 2017, doi: 10.1038/srep36618. 査読有
- Setoyama D, Kato T, Hashimoto R, Kunugi H, Hattori K, Hayakawa K, Sato-Kasai M, Shimokawa N, Yoshida S, Goto Y, Yasuda Y, Yamamori H, Ohgidani M, Sagata N, Miura D, Kang D, Kanba S. Plasma metabolites predict severity of depression and suicidal ideation in psychiatric patients-A multicenter pilot analysis. *PLoS One.* 2016 Dec 16;11(12):e0165267. doi: 10.1371/journal.pone.0165267. eCollection 2016. 査読有
- Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. TM4SF1 as a prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma is involved in migration and invasion of cancer cells. *Int J Oncol* 47(2):490-498, 2015, doi:10.3892/ijo.2015.3022. 査読有

[学会発表](計 5 件)

- Torata N, Kubo M, Miura D, Ohuchida K, Miyazaki T, Fujimura Y, Hayakawa E, Kai M, Oda Y, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M. MALDI mass spectrometry imaging profile of low molecular metabolites in breast carcinoma tissues embedded in frozen tissue microarray. San Antonio Breast Cancer Symposium 2015, 2015/12/06, San Antonio, USA
- 寅田信博、久保 真、三浦大典、大内田研宙、宮崎哲之、藤村由紀、早川英介、大塚 隆生、宮坂義浩、真鍋達也、小田

- 義直、水元一博、中村雅史、MALDI mass spectrometry imaging による凍結組織アレイ包埋乳がん組織の低分子代謝産物プロファイリング第 40 回日本医用マススペクトル学会年会, 2015/09/17, 浜松市
3. Miura D., et al. MALDI-MS-based metabolomic imaging technique and its application to pathological analysis. RERF symposium. "Application of 'omics' to Radiation Research" 2014 年 12 月 3 日, Hiroshima, Japan
  4. Miura D., et al. MALDI-MS-based metabolite analysis for biomarker discovery and diagnosis. CIS workshop "Mass spectrometry for proteomics and imaging", 2014 年 10 月 24 日, Sapporo, Japan
  5. Miura D., et al. MALDI-MS-based metabolomic imaging technique and its application to pathological analysis DFG-JSPS Symposium "SHARED PATHWAYS IN CNS SIDORDERS", 2014 年 6 月 30 日, Munich, Germany

〔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

寅田 信博 (TARATA, Nobuhiro)  
九州大学・大学病院・臨床検査技師  
研究者番号：00398075

### (2) 研究分担者

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)  
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10611668  
(2014 年度)

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号：40532627

真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：60546464  
(2014 年度)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )