

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K10699  
研究課題名(和文) 膵癌自然発生マウス発癌における傍腫瘍間質の可視化メタボロームマッピング解析

研究課題名(英文) Metabolome mapping analysis of tumor associated stroma in genetically engineered pancreatic cancer mouse model

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来膵組織(膵癌、膵炎、正常膵)を用いて、低分子代謝産物を対象としたメタボロームマッピングでの検討において、ATP、ADP、AMPの分布は、正常組織で最もシグナルが高く、ついで、腫瘍組織、膵炎組織の順である傾向がみられたが、エネルギーとして利用できる割合を表すEnergy charge( $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ )は、腫瘍組織でもっとも高い傾向がみられ、細胞外マトリックスにも細胞活動に必要なエネルギーが存在することが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外マトリックスのエネルギー状態については、腫瘍関連間質から乳酸およびピルビン酸が腫瘍細胞に供給されることをPavlidis S (Cell Cycle, 2009)らが報告しているが、膵炎組織でも同様の傾向がみられることから、炎症等の刺激を受けた間質組織は高いEnergy chargeを維持し、組織の再生だけでなく腫瘍増殖に関与している可能性がある。そのメカニズムが解明できれば、新たな治療戦略標的につながることを期待でき、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We detected metabolites related to energy metabolism such as ATP by direct tissue MALDI-MSI analysis of pancreas Tissue. By comparison of metabolite profiles obtained from carcinoma, pancreatitis and normal tissues, we found that the energy charge (EC; which is related to ATP, ADP and AMP concentrations) of carcinoma and pancreatitis were higher than that of normal tissue even though normal tissue had the highest these adenosine phosphate compound intensities. It indicates that extracellular matrix has some amount of energies for cell activity.

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 Metabolome mapping

## 1. 研究開始当初の背景

固形癌の特徴の一つに、間質が豊富で硬い腫瘍を形成することがあげられる。膵癌では desmoplasia と呼ばれる間質増生を認め、膵星細胞が中心的な役割を果たしている。線維化が亢進した環境は治療抵抗性に関与し、薬剤送達率を低下することが報告されている。(Olive et al. 2009. Science, Provenzano et al. 2011. Cell.)。また、間質増生に伴う癌間質相互作用により、腫瘍細胞の悪性度に関わる浸潤能・転移能獲得を促しており(Nature, 2012, Amai Lujambio&Scott W.Lowe) 我々も膵癌で同様の報告を行っている(Gastroenterology, 2010.)。癌間質相互作用については、接着因子および液性因子、細胞外基質に関する報告が多数なされているが、近年、腫瘍および間質から放出される代謝産物が、放出した細胞以外の細胞のエネルギーとして活用されていることを示唆する報告がなされている(Pavlidis S, Cell Cycle, 2009, Sousa, Nature, 2016)。細胞のエネルギー供給については、従来、ワールブルク効果による解糖系の亢進により ATP を産生するとされていたが、Pavlidis S (Cell Cycle, 2009) らは、腫瘍関連間質から乳酸およびピルビン酸が腫瘍細胞に供給されることを報告し、Sousa (Nature, 2016) らは、アラニンが供給されていると報告している。我々は、膵癌自然発生モデルである KPC マウスを導入し、前癌病変 発癌 浸潤 転移という腫瘍進展の経過を追跡している(Hingorani S.R., et al. 2005. Cancer Cell)。これらマウスモデルを使用した報告は前癌病変や浸潤癌そのものに着目した研究(Guerra C. et al. Cancer Cell, Phillip B. 2013. Gastroenterology)が中心で、傍腫瘍間質を含む腫瘍関連間質については、浸潤リンパ球に関する報告(Carolyn E, 2007, Cancer Res)があるものの、代謝産物に着目したものはない。

近年、機器の発展に伴い、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、腫瘍および傍腫瘍間質から放出される物質を解明する上で重要な意味を持つ。従来の質量分析法では、組織内局在情報が失われていたが、MALDI-MSI を用いることにより、凍結組織切片を用いたマッピングが可能となり、免疫染色(IHC)など他の実験で得られた結果の相互参照が可能である。当研究室で腫瘍組織を用いた MALDI-MSI による低分子代謝産物をターゲットとしたメタボロームマッピングをおこなった。その過程で、腫瘍だけでなく、腫瘍近傍の間質も正常間質と比較して、強いシグナルを呈していることに着目した。そこで、膵癌自然発生マウスモデルを用い、発癌プロセスでの、腫瘍およびその近傍間質の低分子代謝産物変化をメタボリックマッピングで可視化し、癌間質相互作用を代謝産物の視点から明らかにできると考え、本研究計画を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

メタボローム解析はゲノムの物質的最終表現型である代謝産物を対象とし、疾病マーカー探索等において重要性が増している。従来の質量分析法では、代謝産物の抽出・濃縮が必須で、組織内局在情報が失われる。我々は凍結切片にレーザーを照射し分析を行うマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(MALDI-MSI)を用い、メタボローム情報を組織像上にマッピングすることに成功した。膵癌自然発生遺伝子改変マウス(KPC マウス)は、ヒト膵癌に類似した発癌過程と間質に富む腫瘍を形成するため、癌微小環境の解析に適している。本研究では、発癌過程における傍腫瘍間質に特異的な代謝産物を可視化し、対応するトランスポーター発現解析とあわせ、腫瘍と間質におけるそれらのフロー・役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では膵癌自然発生マウスモデル由来の前癌病変および早期膵癌組織を中心に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、前癌病変、早期病変を含む発癌プロセスにおける傍腫瘍間質の代謝産物を測定・可視化する。各種染色等で腫瘍進展に伴う変化をとらえ、得られた情報から発癌、浸潤に関わる代謝産物を同定し、対応するトランスポーター発現と併せて、腫瘍と傍腫瘍間質間の代謝産物の流れを解明する。さらに同定代謝産物を標的に膵癌細胞株や手術切除標本の解析を行い、良悪性鑑別を含む臨床病理学因子および、治療効果・予後予測など臨床的指標との相関を検討する。さらに、治療標的としての有用性についてオルガノイドモデルや KPC マウスなどを用いて、in vitro、in vivo の各種機能解析により評価する。

## 4. 研究成果

膵癌は desmoplasia と呼ばれる細胞外マトリックスに富んだ組織を有しており、癌の浸潤等への関与が指摘されている。そのような細胞外マトリックスのリモデリングにおける代謝物の変化を分析することが本研究の目的の一つである。

ヒト由来膵組織(膵癌、膵炎、正常膵)を用いて(図1)、低分子代謝産物を対象としたメタボロームマッピングでの検討において、ATP、ADP、AMP の分布は、正常組織で最もシグナルが高く、

ついで、腫瘍組織、膵炎組織の順である傾向がみられたが(図2) エネルギーとして利用できる割合を表す Energy charge  $((ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP))$  は、腫瘍組織でもっとも高い傾向がみられ、細胞外マトリックスにも細胞活動に必要なエネルギーが存在することが示唆された。(図3) MALDI-IMS によるメタボロームマッピングで同定できる物質は限られおり、細胞外マトリックスリモデリングとの関連を示唆する物質の絞り込みはできなかった。

ヒト由来乳がん組織を用いた、低分子代謝産物を対象としたメタボロームマッピングでの検討において、乳癌組織において、Energy charge が高いことを見出し、原著論文として報告し、さらに、ウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)が高値であることを見出し、特許を出願した。

当研究室では、三次元共培養よりも実際の組織を模倣しているとされるオルガノイドを用いて、細胞外マトリックス環境の再現を行っており、ヒト膵癌切除標本から樹立したヒト膵癌オルガノイドを膵星細胞と共培養することによって、オルガノイド単培養と比較して基底膜・腺管構造を失いコラーゲンマトリックスに浸潤することを明らかにした。また、それら膵星細胞は、Endo180 を強発現しており、マトリックスに含まれるコラーゲンを細胞内に取り込み、新たにコラーゲンを産生することによって、細胞外マトリックスをリモデリングするだけでなく、腫瘍細胞に先導して癌細胞の浸潤を誘導することを明らかにした。その膵星細胞が活性化される要因について、オートファジーが関連することを明らかにし、阻害剤の添加によって、膵星細胞内の脂肪滴が増加し、細胞静止化を誘導することを確認した。

さらに、膵星細胞からも分泌される IL-6 により、リンパ管上皮の S100P 発現が亢進し、遊走能・および癌細胞集団がリンパ管内皮を押しよけるように浸潤していく CCID formation 形成能が上昇することを確認し、両者に関連がある可能性を示した。

また、線維芽細胞様に形態変化したマクロファージが基底膜の破壊に関与することが確認され、in vivo においても、膵癌オルガノイドをマクロファージと共にマウスへ同所移植した群で基底膜破壊および膵癌細胞浸潤を有意に多く認めたことから、骨髄由来のマクロファージが細胞外マトリックスのリモデリングに関与していることが示唆された。

ヒト膵癌オルガノイドを用いた膵星細胞との 3 次元共培養モデルで形態学的分類を行った 3 つの subtype (低分化型・中分化型・高分化型) において、高分化型膵癌オルガノイドは、微小環境因子への依存性が高く、膵星細胞と共培養によって、依存性が低下することから、ホメオスタシスの維持に膵星細胞が関与していることが示唆された。さらに、マイクロアレイ発現解析において、phenotype 間の細胞増殖パスウェイを比較したところ、高分化型 phenotype ではメバロン酸代謝を中心とした脂肪酸代謝が亢進しており、膵星細胞および微小環境因子との関連が期待される。

微小環境因子の研究は、質量分析による代謝産物同定がボトルネックとなることがあるが、われわれは、ヒト由来胃がん組織を用いたプロテオミクス解析を行い、スキルスがんと非スキルスがんの比較において、複数の酵素で有意な発現量の違いを確認できた。今後は、代謝物だけでなく、DNA, RNA・タンパク質の情報を組み合わせて、検討を続けたい。



図1：膵凍結組織アレイブロック

上段：膵炎 中段：正常膵 下段：膵癌

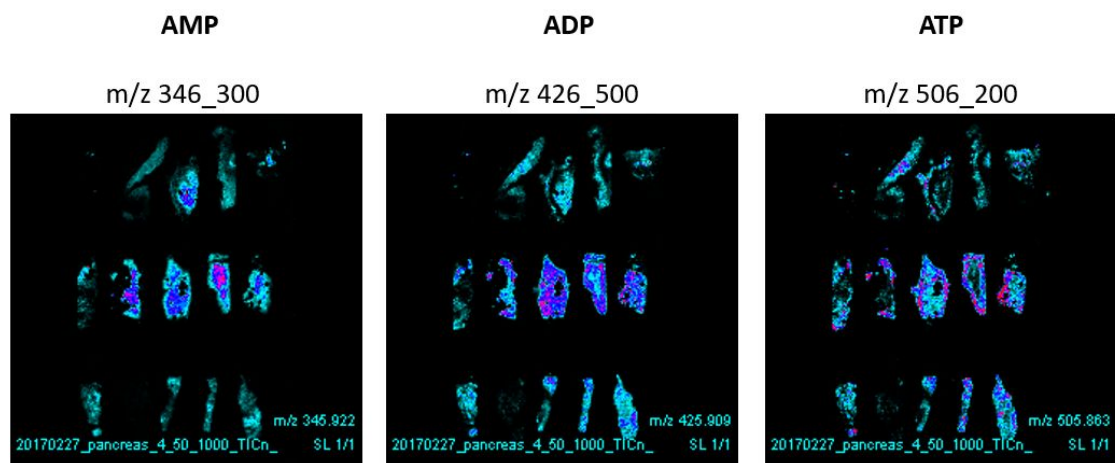


図 2 : MALDI-IMS により可視化された ATP、ADP、AMP の分布

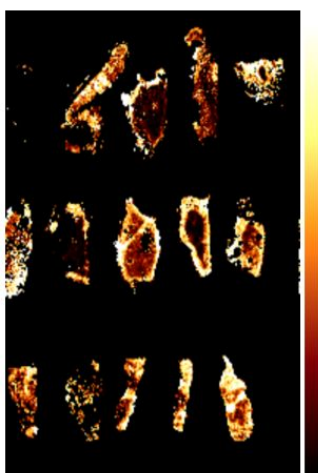


図 3 : Energy charge マッピング像

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtsuka T, Tomosugi T, Kimura R, Nakamura S, Miyasaka Y, Nakata K, Mori Y, Morita M, Torata N, Shindo K, Ohuchida K, Nakamura M	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical Assessment of the GNAS Mutation Status in Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 887 ~ 893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01797-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大塚隆生、渡邊雄介、森泰寿、池永直樹、仲田興平、寅田信博、中村雅史	4. 巻 79
2. 論文標題 【腹腔鏡下肝胆膵手術の新時代-ラパロからロボティクスへ-】日本における腹腔鏡下膵切除術の現況	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝・胆・膵	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 TORATA NOBUHIRO, KUBO MAKOTO, MIURA DAISUKE, OHUCHIDA KENOKI, MIZUUCHI YUSUKE, FUJIMURA YOSHINORI, HAYAKAWA EISUKE, KAI MASAYA, ODA YOSHINAO, MIZUMOTO KAZUHIRO, HASHIZUME MAKOTO, NAKAMURA MASAFUMI	4. 巻 38
2. 論文標題 Visualizing Energy Charge in Breast Carcinoma Tissues by MALDI Mass-spectrometry Imaging Profiles of Low-molecular-weight Metabolites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4267 ~ 4272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.12723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Date Kenjiro, Ohtsuka Takao, Nakamura So, Mochidome Naoki, Mori Yasuhisa, Miyasaka Yoshihiro, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 163
2. 論文標題 Surveillance of patients with intraductal papillary mucinous neoplasm with and without pancreatotomy with special reference to the incidence of concomitant pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 291 ~ 299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2017.09.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsuka T, Mori Y, Fujimoto T, Miyasaka Y, Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Oda Y, Shimizu S, Nakamura M.	4. 巻 84
2. 論文標題 Feasibility of Prophylactic Pancreatojejunostomy in Possible High-Risk Patients for Prevention of Pancreatic Fistula during Enucleation or Limited Pancreatic Resection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Surg	6. 最初と最後の頁 149 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 寅田信博、大内田研宙、久保真、永井俊太郎、三好圭、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 機械学習を用いた外科切除標本写真に対応した画像認識システムの開発
3. 学会等名 第2回日本メディカルAI学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama H, Ohuchida K, Takesue S, Kibe S, Ando Y, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shirahane K, Tominaga Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 A novel mechanism in lymphatic metastasis of pancreatic cancer
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yan Z, Ohuchida K, Guan W, Feng S, Kibe S, Ando Y, Nakata K, Shindo K, Toma H, Tominaga Y, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Inhibition of ERK1/2 Targeting Cancer-Associated Fibroblasts Suppresses Pancreatic Cancer-Stromal Interaction
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakashima Y, Miyasaka Y, et al
2. 発表標題 Analysis of risk factors for recurrence after curative resection of well differentiated nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors
3. 学会等名 21st Asian Congress of Surgery
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寅田信博 他
2. 発表標題 MALDI mass spectrometry imagingを用いた低分子代謝物プロファイリングによる乳癌組織中のenergy charge可視化
3. 学会等名 第21回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮坂 義浩  (MIYASAKA Yoshihiro)  (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員   (17102)	
研究分担者	藤田 逸人  (FUJITA Hayato)  (40611281)	九州大学・医学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	大内田 研宙  (OHUCHIDA Kenoki)  (20452708)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	