

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07769

研究課題名（和文）担がん状態と薬剤耐性に関わるゲノム異常・エピゲノム変化を基盤とした代謝機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of metabolic mechanisms focusing on genomic abnormalities and epigenomic changes related to tumor-bearing state and drug resistance

研究代表者

藤井 誠志（FUJII, Satoshi）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30314743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、がん細胞の特異的な機能に係る代謝物やゲノム異常、エピゲノム変化に特徴的な代謝物の同定であり、メタボローム解析を通して担がん患者の検出と治療標的になり得る代謝物生成機構の解明を目指す。ゲノム異常、エピゲノム変化によって発生したがん細胞の生存、増殖に必要なエネルギーは代謝を経て産生されると同時に、表現形質に係る機能蛋白をつくる過程で代謝物が生成される。頭頸部の4領域（口腔、喉頭、中咽頭、下咽頭）のいずれかを原発とする頭頸部扁平上皮癌の手術検体150検体と食道扁平上皮癌患者8名と非癌患者8名の血漿を用いた。エピゲノム制御に係る物質である代謝物X、Yを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌や食道扁平上皮癌には明確なドライバー遺伝子が見出されておらず、遺伝子異常に基づいた分子標的薬の開発が進んでいないがんのひとつである。メタボローム解析は、代謝経路の理解から、がんが生存するメカニズムを解明する有効な手段として注目されている。代謝経路とともにがんの生態を俯瞰的に理解することで、がんの新たな生物像を明らかにし、遺伝子異常のみに頼らない新しい治療法が期待される。我々の検討では、エピゲノム制御に係る代謝物を見出していることから、代謝の変化とエピゲノム変化が連動し、その結果がんの形質が作られる可能性を指摘でき、新しい視点からのがんの生物像の理解と治療法の発展に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify metabolites related to specific functions of cancer cells, and metabolites characteristic of genomic abnormalities and epigenomic changes. Then, we aim to detect cancer-bearing patients and elucidate the metabolite formation mechanism that can be a therapeutic target through metabolome analysis. The energy required for the survival and proliferation of cancer cells caused by genomic abnormalities and epigenetic changes is produced through metabolism, and metabolites are produced in the process of producing functional proteins related to cancer phenotype. 150 surgical specimens of head and neck squamous cell carcinomas originating in the four regions (oral cavity, larynx, oropharynx, hypopharynx) and plasma from 8 patients with esophageal squamous cell carcinoma and plasma from 8 non-cancer patients were used for the analysis of this study. Metabolites X and Y, which are involved in epigenetic regulation, were identified in this study.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス メタボローム解析

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り、種々の技術を組み合わせて生体を構成する要素である、ゲノミクス、トランスクリプトーム、プロテオームの情報を収集し、その要素の相互作用の解析を通じて生体内での現象を包括的に解明しようとするマルチオミックス解析が発展した。さらにタンパク質を構成するアミノ酸の網羅的測定（メタボローム解析）が可能になり、がん細胞が産生する低分子代謝物（メタボローム）の解析が可能になった。

ゲノム異常、エピゲノム変化によって発生したがん細胞は自律性増殖を維持し、低酸素、低栄養環境に適応して生存するだけでなく、周囲組織に進展する。それを可能にするために代謝を経てエネルギーを産生する。その過程で生じた代謝物はがん細胞の生存、増殖、進展に働く機能的蛋白質である可能性や、がん特有の代謝物であれば担がんの証拠としてのバイオマーカーになる可能性を持つ。加えてこの代謝物が血中にて検出可能であれば、侵襲度の低い採血によるモニタリングが可能になり臨床上的有用性が高い。しかしながら、これらの条件を充足する代謝物は未だ同定されていない。がんはゲノム異常、エピゲノム変化によって発生して増殖能、転移能を獲得する。そしてゲノムとエピゲノムの解析結果によって治療選択や治療奏効性が決定されることから、ゲノム異常、エピゲノム変化に特異的な代謝物の同定とそれが産生されるメカニズムの解明と生成の制御が、がん細胞の根幹的制御につながると考える。しかしながら、治療開発が期待される標的のゲノム異常とエピゲノム変化に特異的な代謝物は未だ同定されていない。

頭頸部扁平上皮癌や食道扁平上皮癌には明確なドライバー遺伝子が見出されておらず、両者ともに遺伝子異常に基づいた分子標的薬の開発が進んでいないがんのひとつである。頭頸部扁平上皮癌や食道扁平上皮癌の遺伝子異常は多彩であるため、単一の遺伝子を見出そうとするアプローチよりは、多角的な解析による包括的理解が必要である。解析手法のひとつとして、代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析は、がんにおける代謝経路の理解から、がんが生存するメカニズムの解明に有効な手段として注目されている。がんには Warburg effect による解糖系優位な代謝をはじめとする特異的な代謝が環境に応じた生存、増殖、進展機構に関わることが知られており、遺伝子異常のみならず代謝経路とともにがんの生態を俯瞰的に理解することで、がんの新たな生物像を明らかにし、遺伝子異常に基づく分子標的薬のみに頼らない新しい治療法が期待される。

我々は代謝物がエピゲノムの変化に影響を与える可能性に着目している。今回の我々の検討において、エピゲノム制御に関わる代謝物が見出されていることから、代謝の変化とエピゲノム変化が連動し、その結果がんの形質が作られる可能性を指摘できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞の特異的な機能に関係する代謝物やゲノム異常、エピゲノム変化に特徴的な代謝物の同定であり、メタボローム解析を通して担がん患者の検出と治療標的になり得る代謝物生成機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 頭頸部扁平上皮癌組織のメタボローム解析

頭頸部の4領域（口腔、喉頭、中咽頭、下咽頭）のいずれかを発生部位とする頭頸部扁平上皮癌の手術検体150検体（口腔48、喉頭24、中咽頭27、下咽頭51）を用いる。手術検体から腫瘍部と非腫瘍部の組織検体を採取し、合計300検体に対してキャピラリー電気泳動-飛行時間型質

量分析計 (CE-TOFMS) 及びキャピラリー電気泳動-三連四重極型質量分析計 (CE-QqQMS) を用いメタボローム解析を施行する。データ解析には Master Hands ver. 2.17.3.18 を用いる。

#### (2) 腫瘍組織で変動する代謝物の解析

メタボローム解析により網羅的に得られた代謝物の測定結果に関して、探索コホート 150 検体 (口腔非腫瘍 24, 口腔腫瘍 24, 喉頭非腫瘍 12, 喉頭腫瘍 12, 中咽頭非腫瘍 14, 中咽頭腫瘍 14, 下咽頭非腫瘍 25, 下咽頭腫瘍 25)、検証コホート 150 検体 (口腔非腫瘍 24, 口腔腫瘍 24, 喉頭非腫瘍 12, 喉頭腫瘍 12, 中咽頭非腫瘍 13, 中咽頭腫瘍 13, 下咽非腫瘍 26, 下咽頭腫瘍 26) に分けて解析を行う。

#### (3) 代謝物 X の添加による頭頸部扁平上皮癌細胞株の増殖活性の変動解析

頭頸部扁平上皮癌の細胞株として SCC9 (舌扁平上皮癌由来細胞) と FaDu (下咽頭扁平上皮癌由来細胞) を用いる。腫瘍組織で有意に多く認められた代謝物の中から、エピゲノム制御に関わる物質である代謝物 X を同定し、それを添加して培養して増殖能の変化を調べる。

#### (4) 代謝物 X の添加により発現が変動する遺伝子の探索

代謝物 X の添加の有無で変動する遺伝子を同定するため、代謝物 X の添加、非添加の条件で 96 時間培養した頭頸部扁平上皮癌細胞株のそれぞれから核酸を抽出し、RNA-seq(RNA-Sequencing), ATAC-seq(Assay for Transposase-Accessible Chromatin-Sequencing)による網羅的な遺伝子解析を行う。

#### (5) 食道扁平上皮癌患者血漿のメタボローム解析

食道癌患者 8 人と非癌健常者血漿 8 人の血漿のメタボローム解析を行う。

#### (6) 食道扁平上皮癌患者血漿の変動する代謝物の解析

食道扁平上皮癌患者と非癌健常者の血漿を比較し、fold change で有意な差を認めた代謝物質を検出する。

#### (7) 代謝物 Y の添加による頭頸部扁平上皮癌細胞株の増殖活性の変動解析

食道扁平上皮癌の細胞株として OE21 (中分化型扁平上皮癌) と KYSE70 (低分化型扁平上皮癌由来細胞) を用いる。食道扁平上皮癌患者で有意に多く認められた代謝物の中から、エピゲノム制御に関わる物質である代謝物 Y を同定し、それを添加して培養し、増殖能の変化を調べる。

#### (8) 代謝物 Y の添加により発現が変動する遺伝子の探索

代謝物 Y の添加の有無で変動する遺伝子を同定するため、代謝物 Y の添加、非添加の条件で 96 時間培養した頭頸部扁平上皮癌細胞株のそれぞれから核酸を抽出し、RNA-seq(RNA-Sequencing), ATAC-seq(Assay for Transposase-Accessible Chromatin-Sequencing)による網羅的な遺伝子解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 頭頸部扁平上皮癌のメタボローム解析

陰イオン 235 個, 陽イオン 272 個の計 507 物質を検出した(図 1)。

#### (2) 腫瘍組織で変動する代謝物の解析

腫瘍部と非腫瘍部を比較し、探索コホートおよび検証コホートともにいずれの部位においても t 検定で有意な差を認めた物質は、陰イオン 12 個, 陽イオン 40 個であった。その中でエピゲノム制御に関わる物質である代謝物 X に着目した(図 2)。

#### (3) 代謝物 X の添加による頭頸部がん細胞株の増殖活性の変動解析

いずれの細胞株においても代謝物 X の濃度に依存して増殖が抑制された(図 3)。

#### (4) 代謝物 X の添加により発現が変動する遺伝子の探索

RNA-Seq 解析では 26485 遺伝子に関する結果を得た。ATAC-Seq 解析では 86036~109255 のピークを得た。SCC9 では FaDu に比して多くの遺伝子に変動を認めた。RNA-Seq および ATAC-Seq により標的候補遺伝子を多数得た。

(5) 食道扁平上皮癌患者血漿のメタボローム解析

グルコース・陰イオン性代謝物質 238 個、陽イオン性代謝物質 272 個の計 510 物質を検出した。

(6) 食道扁平上皮癌患者血漿の変動する代謝物の解析

食道扁平上皮癌患者と健常者の血漿を比較し、fold change で有意な差を認めた代謝物質は 13 個であった。その中でエピゲノム制御に関わる物質である代謝物 Y に着目した。

(7) 代謝物 Y の添加による食道扁平上皮癌細胞株の増殖活性の変動解析

OE21 および KYSE70 いずれの細胞株においても代謝物 Y を一定濃度に添加すると増殖が抑制された。

(8) 代謝物 Y の添加により発現が変動する遺伝子の探索

RNA-Seq 解析では 26485 遺伝子に関する結果を得た。ATAC-Seq 解析では 66,734~101,241 のピークを得た。細胞株 KYSE70 では細胞株 OE21 に比して多くの遺伝子に変動を認めた。RNA-Seq および ATAC-Seq により標的候補遺伝子を多数得た。

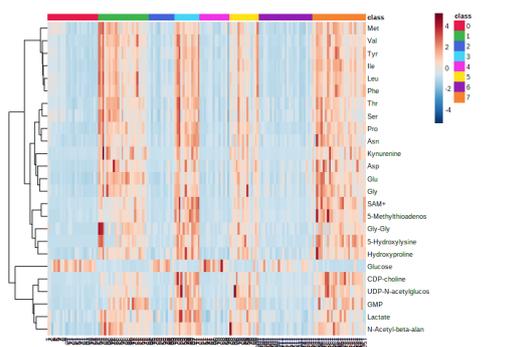


図 1. 主要な代謝物のクラスター解析

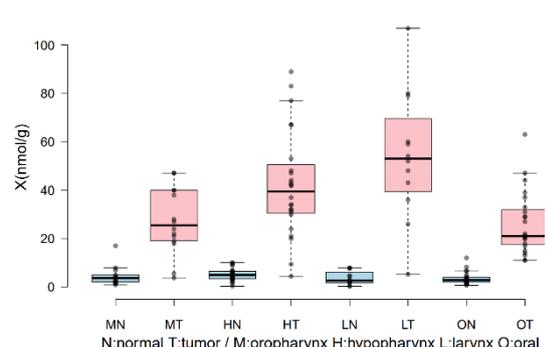


図 2. 組織中の X 濃度

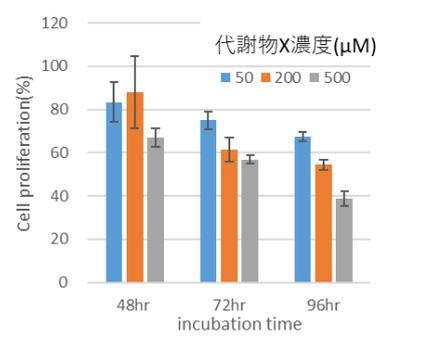


図 3. SCC9 の X 添加後増殖能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井誠志
2. 発表標題 Pathology of superficial squamous cell carcinoma of head and neck
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------