

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09724

研究課題名(和文) 分子サブタイプとメタボロミクスに基づく尿路上皮癌の診断・治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel therapeutic molecules for urothelial cancer based on the molecular subtypes and metabolomics

研究代表者

土谷 順彦 (Tsuchiya, Norihiko)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70282176

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)：本研究は、メタボローム解析によって尿路上皮癌の分子サブタイプにおける代謝物の細胞内ダイナミクスの特徴を明らかにすることと、治療反応性・抵抗性を予測するバイオマーカーや治療標的分子をメタボロミクスの視点から同定することを目的とした。その結果、2つの代謝物(isopropylmalic acidとgluconic acid)によりLuminal、p53-likeBasal/squamousの3つのサブタイプが分類できることが明らかになった。特に、Gluconic acidはシスプラチン耐性株で共通した増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで進行性または転移性尿路上皮癌に対して白金製剤を中心とする画一的な治療が行われてきた。最近、免疫チェックポイント阻害剤や分子標的治療の新たな治療薬に関するエビデンスが報告されたが、個別化治療のためのバイオマーカーはない。本研究では、分子サブタイプまたはシスプラチン耐性とメタボロームの関連を示したことで、従来網羅的遺伝子発現解析が必要であったサブタイプ分類を簡便に行うことを可能にし、シスプラチン耐性のバイオマーカーや治療標的分子の探索に使用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to characterize the intracellular dynamics of metabolites in molecular subtypes of urothelial carcinoma by metabolomics analysis and to identify biomarkers and therapeutic target molecules that predict response and resistance of treatments from a metabolomics perspective. The results revealed that the two metabolites (isopropylmalic acid and gluconic acid) can be classified into three subtypes: Luminal, p53-like, and Basal/squamous. In particular, a common increase in gluconic acid was observed in cisplatin-resistant cell lines.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 メタボロミクス 分子サブタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

これまで進行性または転移性尿路上皮癌に対して、一次治療では全ての症例に対して白金製剤を中心とする画一的な治療が行われ、二次治療以降の全身療法に関しては全くエビデンスがない状況が続いていた。最近、癌免疫 (I-O) 療法の尿路上皮癌への有効性が明らかにされ、ようやく高いエビデンスを最近、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体などの癌免疫 (I-O) 療法の尿路上皮癌への有効性が明らかにされ (Bellmunt J, et al. N Eng J Med. 2017)、pembrolizumab が化学療法後の二次治療薬として実臨床でも使用されている。しかし、I-O 薬単独では二次療法開始から 1 年以内に 80% が再発し 70% は死亡する。一次療法でも 1 年で 40 - 50% が死に至り、その効果は十分とは言えない。進行性または転移性尿路上皮癌において、薬物療法への反応性を予測するバイオマーカーと新たな治療薬の開発が望まれている。

一方、尿路上皮癌の網羅的遺伝子発現解析におけるクラスター解析により、3 ないし 4 つの分子サブタイプに分類されることが明らかにされた (Wezel F, et al. Transl Androl Urol, 2017)。これらの分子サブタイプと予後、化学療法や I-O 療法への反応性の間には密接な関連が示唆されており、今後尿路上皮癌の薬物療法の個別化への利用が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、網羅的メタボローム解析によって、尿路上皮癌のそれぞれの分子サブタイプにおける代謝物の細胞内ダイナミクス (細胞内代謝経路ならびに代謝関連分子) の特徴を明らかにすることと、各分子サブタイプあるいは治療反応性・抵抗性を予測する新たなバイオマーカーや治療標的分子をメタボロミクスの視点から同定することである。単なる尿路上皮癌における網羅的メタボローム解析ではなく、薬物療法への反応性に関わる分子サブタイプとの関連をみることによって、癌の自然史のみならず予後や治療反応性に関わる癌の多様性をメタボロミクスの視点から理解することで、尿路上皮癌におけるメタボローム解析に基づく新たな治療反応性を予測するバイオマーカーの開発や従来とは異なる方法で探索された分子を標的とした新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 1) 尿路上皮癌細胞株の分子サブタイプにおける特徴的な細胞内代謝のメタボローム解析

これまで、既存の尿路上皮癌細胞株の分子サブタイプ解析が行われている (Warrick JI, Scientific Rep, 2016)。これらの各分子サブタイプを代表する複数の細胞株を培養し、メタボローム解析を行う。各分子サブタイプに特徴的な細胞内代謝を探索的に検討することにより、バイオマーカーあるいは治療標的となる代謝経路・代謝物を同定する。

方法: Luminal サブタイプ (RT4)、p53-like サブタイプ (T24)、Basal/squamous サブタイプ (SCaBER、HT1376) の各々の細胞を培養し、前処理後、GC/MS で代謝物の網羅的メタボローム解析を行う。

各細胞株の代謝産物の量を標準化する。差が見られた代謝物を抽出して主成分分析を行い、同じ分子サブタイプに属する細胞株に共通して増減している代謝経路を同定する。また、階層的クラスター分析によりメタボローム解析から見た細胞株の系統分類を行い、分子サブタイプとの一貫性を検討する。

### 2) 臨床検体を用いたメタボローム解析

膀胱癌で経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) を施行した患者から採取した膀胱癌組織を用いて、分子サブタイプと細胞内代謝との関連を検討する。特に、細胞株で各分子サブタイプに特異的に変化の見られた細胞内代謝物に関して、そのプロファイルと分子サブタイプとの関連をみる。

方法: TURBT 時に熱凝固せずに採取した膀胱癌組織を採取後直ちに液体窒素で凍結し、100~200ug ずつメタボローム解析に共する。

### 3) シスプラチン耐性化による細胞内メタボロームダイナミクス

各分子サブタイプの代表的な細胞株のシスプラチン耐性株を作製し、親株と耐性株での細胞内代謝物の変化をメタボローム解析で検討する。耐性株で変化する代謝物、あるいはそれらの分子サブタイプによる挙動の違いをみることにより、メタボロミクスの視点からシスプラチン耐性を予測するバイオマーカーを同定し、その機序を推察する。

方法: 各分子サブタイプを代表する RT4、T24、SCaBER、HT1376 の細胞株に対して、培地にシスプラチンを 3 週間毎に漸増 (0.2ug/mL ~ 4.0ug/mL) させながら加えることでシスプラチン耐性株を樹立する。これらの耐性株と親株について GC/MS を用いた網羅的メタボローム解析を行う。得られた結果から、シスプラチン耐性に関わる代謝物ならびに代謝経路を同定する。また、シスプラチン耐性化における各分子サブタイプによる細胞内代謝ダイナミクスの共通点と相違点を検討する。

#### 4. 研究成果

1) 尿路上皮癌細胞株の分子サブタイプにおける特徴的な細胞内代謝のメタボローム解析  
各細胞株についてメタボローム解析を3回ずつ施行した。測定された代謝物のデータクリーニングを施行した結果、185代謝物が解析可能であった。RT4、T24、SCaBER、HT1376の4株において代謝物の主成分分析を行った結果、92.8%が第一主成分で分類可能であり、これらは分子サブタイプ分類と一致していた。第二主成分はSCaBERとHT1376の分類に寄与していた(図1)。クラスター解析では、4種類の細胞株に特徴的な代謝物のパターンが見られた(図2)。

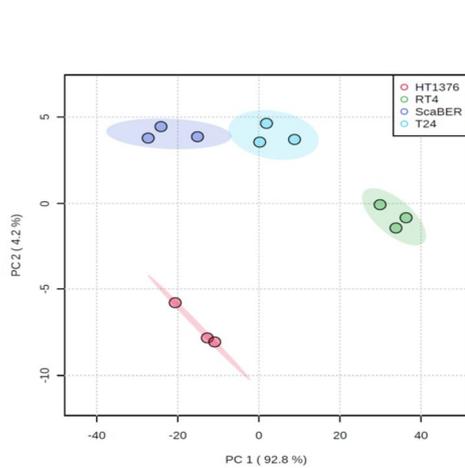


図1 尿路上皮癌細胞株のメタボロームを特徴量とした主成分分析

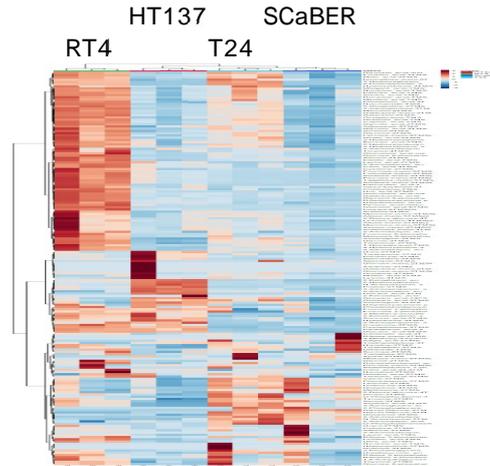


図2 尿路上皮癌細胞株におけるメタボロームを用いたクラスター解析

続いて、4種類の細胞株で有意に濃度の異なる代謝物を検索したところ、2つの代謝物( Isopropylmalic acid [IPA]と Gluconic acid [GA])により Luminal、p53-like、Basal/squamousの3つのサブタイプが分類できることが明らかとなった(図3)。すなわち、Luminal サブタイプでは IPA-high、GA-high、p53-like サブタイプでは IPA-high、GA-low、Basal/squamous サブタイプでは IPA-low、GA-low の特徴を有していた。

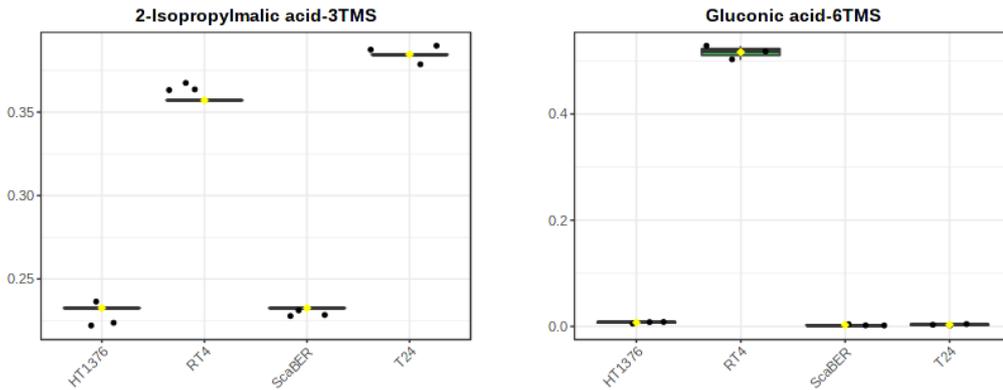


図3 分子サブタイプで異なるメタボローム

## 2) 臨床検体を用いたメタボローム解析

腫瘍と正常部のメタボローム解析を行うことができた 21 症例 (42 検体) を対象とした。測定された代謝物のデータクリーニングを施行した結果、236 代謝物が解析可能であった。腫瘍と正常部における代謝物の主因子分析を行った結果、67.1%が第一主成分で分類可能であり、第二主成分の 16.7%と合わせて 83.3%が分類可能であった (図 4)。クラスター解析では、4 種類の細胞株に特徴的な代謝物のパターンが見られた (図 5)。

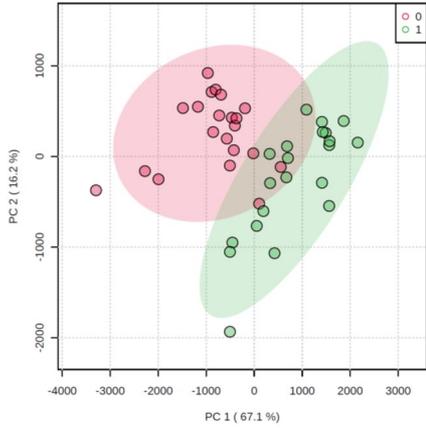


図 4 臨床検体のメタボロームを特徴量とした主成分分析

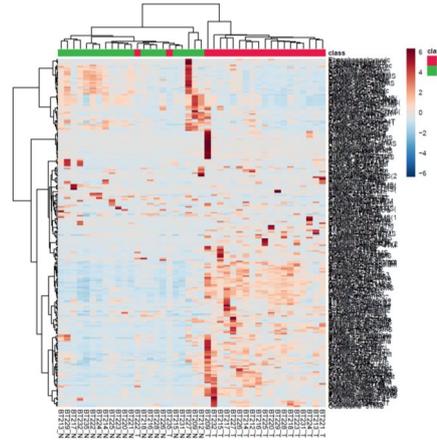


図 5 臨床検体におけるメタボロームを用いたクラスター解析

続いて、機械学習による分類を試みた。ランダムフォレストモデルによる分類では正解率は 39/42 (93%) と良好に分離可能であった。これにより同定された有意なメタボロームを図 6 に示す。

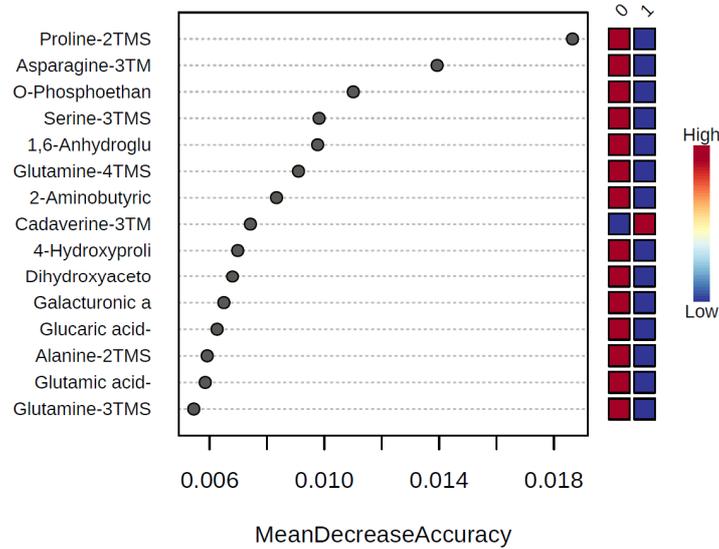


図 6 ランダムフォレストにより同定された有意なメタボローム

### 3) シスプラチン耐性化による細胞内メタボロームダイナミクス

4種類の細胞株のうち、T24、HT1376、SCaBERでシスプラチン耐性株を作製した(それぞれT24 CR、HT1376 CR、SCaBER CR)。これら3細胞株についてそれぞれの親株と耐性株のメタボロームの変化を解析した。それぞれの耐性株で有意に( $P < 0.1$ )増加していた代謝物の上位20までを図7に示した。

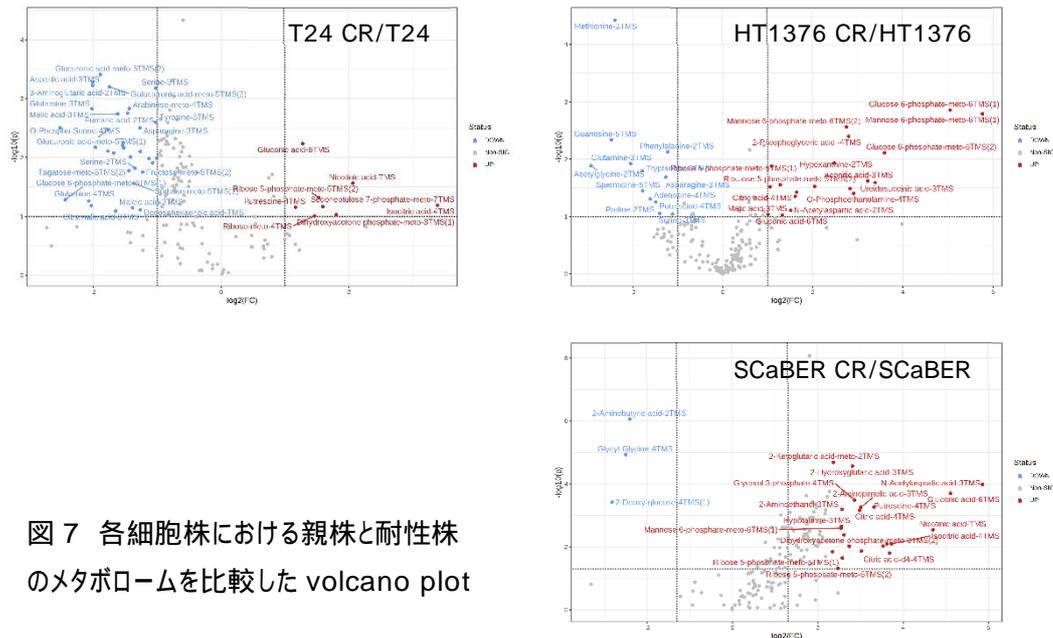


図7 各細胞株における親株と耐性株のメタボロームを比較した volcano plot

3種類の耐性株に共通して増加していた代謝物は、gluconic acid-6TMS、ribose 5-phosphate-5TMSであった。HT1376とSCaBERのみに共通して増加していた代謝物は、mannose 6-phosphate-meto-6TMSとCitric acid-4TMS、T24とSCaBERのみに共通して増加していた代謝物は、nitric acid-TMS、putrescine-4TMS、isocitric acid-4TMSであった(図8)。

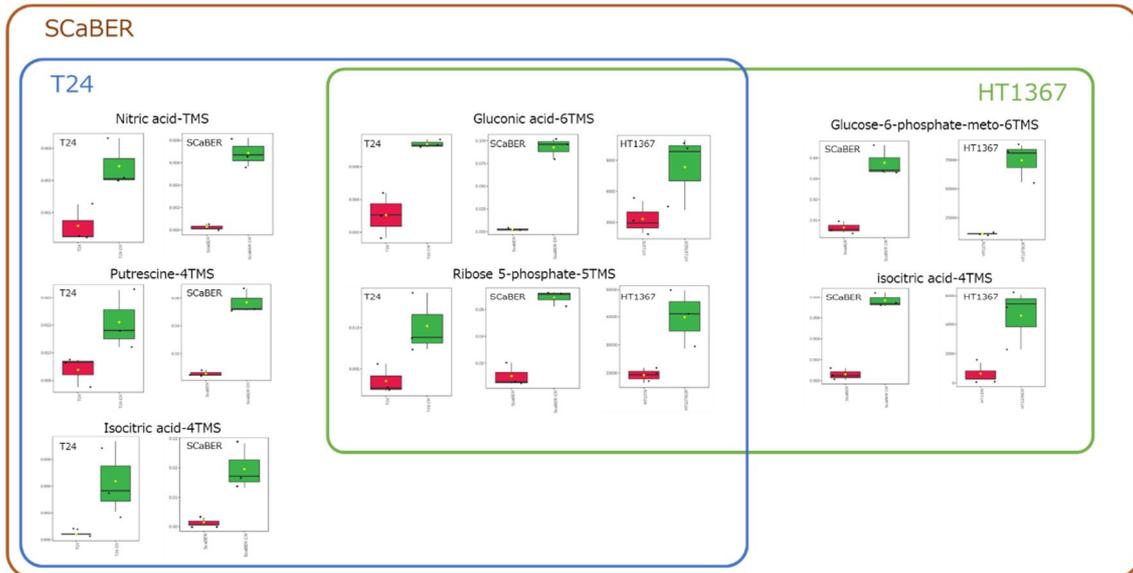


図8 耐性株で共通して増加を認めたメタボローム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	内藤 整  (Naito Sei)  (00431643)	山形大学・医学部・講師   (11501)	
研究分担者	櫻井 俊彦  (Sakurai Toshihiko)  (60534154)	山形大学・医学部・助教   (11501)	

	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
研究協力者	牧野嶋 秀樹  (Makinoshima Hideki)		

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