

令和 5 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：2020～2022
課題番号：20K08960
研究課題名(和文) 多領域検体・多層オミックス解析で多様性を凌駕する真の肝内胆管がん治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of true intrahepatic cholangiocarcinoma therapeutic targets that outperform diversity by multidisciplinary specimen and multilayer omics analysis.

研究代表者
内田 博喜(Uchida, Hiroki)
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30448550
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肝内胆管癌(ICC)の進化を解明し、ICC発症に関連する代謝経路を調査することを目的とした。腫瘍サンプルと正常サンプルについてオミックス解析を実施した。その結果、1例ごとに異なるドライバー遺伝子を持つICCの腫瘍内不均一性が中立的な進化を示すことが示された。BCAT1とBCAT2の過剰発現は、「Val Leu Ile分解経路」の関与を示唆した。ICCでは、分枝鎖アミノ酸などのユビキタスな代謝物が蓄積し、がんの予後に悪影響を及ぼすことが知られている。我々は、この代謝経路が全症例でほぼユビキタスに変化しており、腫瘍の進行に重要な役割を果たし新たな治療標的になり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における重要な課題のひとつは治療抵抗性の克服である。標準治療を終えた症例についてはがんゲノム医療が実装化され、アクションラブル変異が同定された症例には確かに有用性は示している。しかしゲノム変異の症例間・腫瘍内多様性など創薬困難な変異が対象となることが多く薬剤到達率は低く治療抵抗性の克服には到っていない。したがって、がん薬剤到達率を高めるために、ゲノム変異ではない全く新しいアプローチで治療標的を探索することが求められている。われわれの研究によりゲノム変異よりもセントラルドグマの上層階にある転写産物あるいは蛋白として代謝産物に注目して治療標的を探索することが重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to unravel the evolution of ICC and identify ICC-specific metabolic characteristics to investigate the metabolic pathway associated with ICC development. We performed the genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of ICC tumor samples and eleven normal samples. Further, we analysed their cell proliferation and viability. We demonstrated that intra-tumoral heterogeneity of ICCs with distinct driver genes per case exhibited neutral evolution, regardless of their tumour stage. Upregulation of BCAT1 and BCAT2 indicated the involvement of 'Val Leu Ile degradation pathway'. ICCs exhibit the accumulation of ubiquitous metabolites, such as branched-chain amino acids to negatively affect cancer prognosis. We revealed that this metabolic pathway was almost ubiquitously altered in all cases with genomic diversity and might play important roles in tumor progression and the pathway could enable the development of new therapeutic interventions.

研究分野：消化器外科 がんゲノム医療 がん多様性

キーワード：がんゲノム医療 代謝産物 iMPAQ法 メタボローム法 タフターゲット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管がん (ICC) は、肝臓から発生する悪性腫瘍の中で 2 番目に多いタイプで原発性肝がんの 15% を占める。近年、ICC 罹患率は増加傾向にあるが、化学療法や放射線療法などの一般的な治療法には治療抵抗性であり外科的切除が依然として主要な治療法であるが厳しい転帰を辿る。したがって、新たな治療戦略を開発するためには、ICC の病因と腫瘍代謝の変化を理解する必要がある。

がん治療における重要な課題のひとつは治療抵抗性の克服である。特に抗がん剤の開発は高度進行再発期のがん患者を対象に進められ多くのエビデンスを得ることで標準治療を確立してきた。また標準治療を終えた症例についてはがんゲノム医療が実装化され、アクションナブル変異が同定された症例には確かに有用性は示している。しかしゲノム変異の症例間・腫瘍内多様性、KRAS 変異、転写因子など創薬困難な変異が対象となることが多く薬剤到達率は低く治療抵抗性の克服には到っていない。したがって、がん治療抵抗性を克服するために、これまでにないゲノム変異ではない、全く新しいアプローチで治療標的を探索することが求められている。

2. 研究の目的

われわれはゲノム変異よりもセントラルドグマの上層階にある転写産物、あるいは蛋白そして代謝産物に注目して治療標的を探索する。

3. 研究の方法

1) われわれはまず最初に「がんゲノム医療」への展開が期待できるアクションナブル変異の同定を期待してゲノムシーケンス (WES) を施行した。特に ICC の進化においてクローナリティの高い治療標的を明らかにするため全 10 症例についてマルチサンプリング (各検体 3~9 検体、合計 57 個) を行い WES を実施した。

2) ICC 患者 10 名から腫瘍 39 検体と正常 10 検体についてプロテオーム解析を実施した。用いたアッセイは iMPAQ Tassay を採用し、網羅的かつタンパク質発現の絶対定量を同時に行うことが可能なグローバル解析を実施した。ICC に特異的な 324 種類の一次代謝タンパク質を測定し、このうち N/D (not detected) を 20% 以上含む約 40 種類のタンパク質は除外したため、195 種類のタンパク質に注目した。

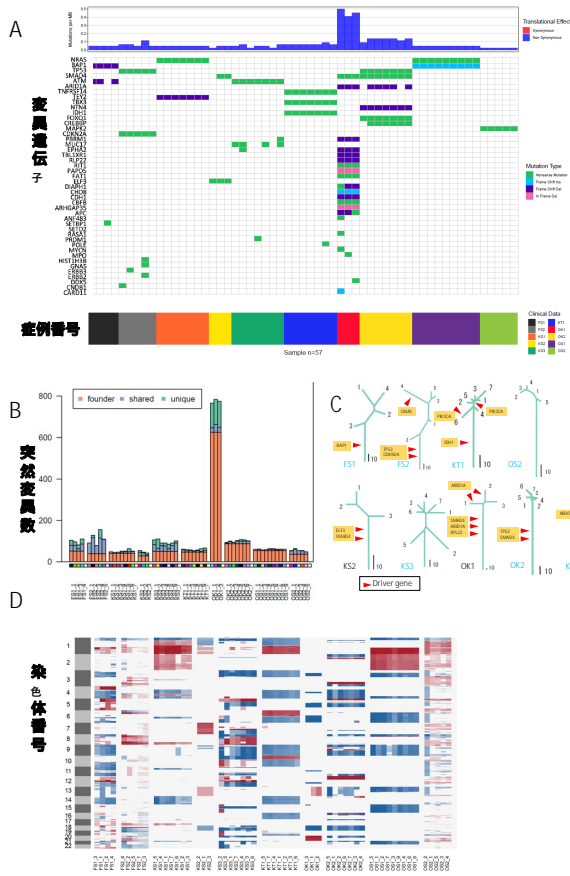
次に、各症例に共通する代謝タンパク質に注目した。iMPaLA (<http://impala.molgen.mpg.de/>) を用いて、腫瘍サンプルと正常肝組織サンプルの一致する遺伝子発現の差分を求め、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) に照合して分子を特定した。

3) BCAA 分解経路の中間体に関する転写産物の発現を調べ、ICC 進行の制御ネットワークの解明を試みた。

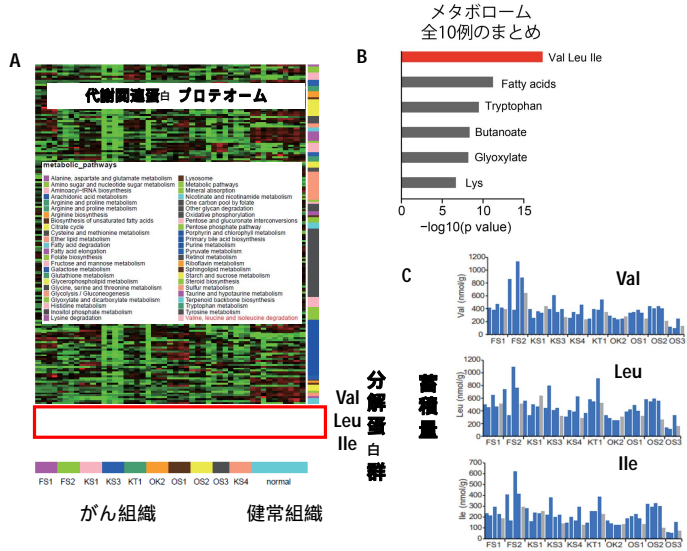
4) ICC において BCAA が mTOR シグナルを介して細胞の増殖と浸潤を促進するかどうかを検討するために、ヒト ICC 細胞株 (SSP-25、RBE) における BCAA の主要触媒酵素である BCAT1 および BCAT2 の発現を正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) における発現と比較した。

4. 研究成果

1) カバレッジの中央値が 128.39 (範囲: 80.25-189.91) で、各サンプルについて中央値 63 (範囲: 42-781) 個の変異を検出した。症例の中には hyper mutated タイプが存在し中央値で 763 (範囲: 751-781) 個の変異を有していた。ICC は 1 腫瘍内多様性よりも症例間多様性が大きかった。また突然変異のクローナリティを調べたところ、クローナルな変異が多くを占めており、進化系統樹ではドライバー変異がサブクローナルよりもクローナルに存在する中立進化型を呈しており無数のマイナー変異により強靭さを保持していた。また KRAS、IDH、TP53 の変異は相互に排他的に存在していた。さらに WES データからコピー数変化 (CNA) を推定し、多領域の CNA プロファイルを解析した。突然変異と同様に CNA も症例間における多様性が大きかった。



2) 例えばある症例は 44 個の共通代謝タンパク質が検出され、「Val Leu Ile」(分岐鎖アミノ酸[BCAA]分解経路)が有意に影響を受けた(変化した)代謝経路であることが明らかとなった。ほぼ 10 例の ICC に共通して BCAA 分解が最も有意なパスウェイであることを確認した。



メタボローム
全10例のまとめ

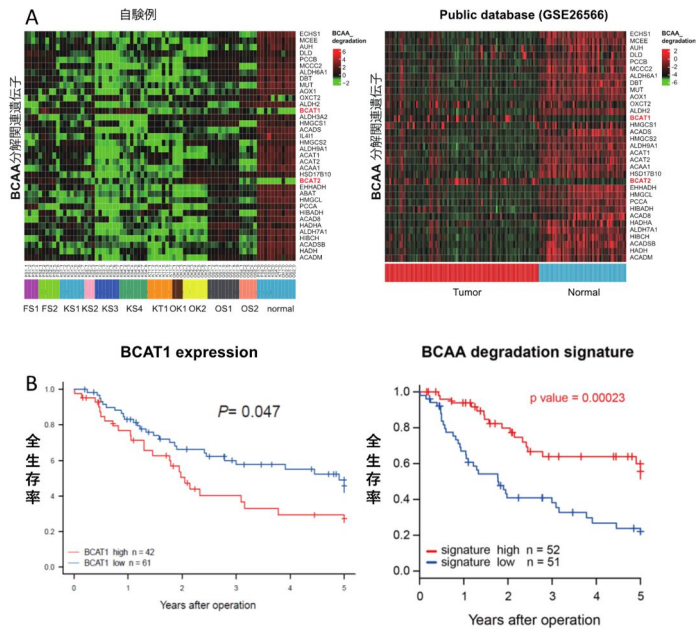
分解蛋白質群
Val
Leu
Ile

蓄積量

3)BCAA 異化に関する転写物の発現変化を Gene Expression Omnibus (GSE26566) で解析したところ BCAA の分解に関する遺伝子群の発現は GSE26566 コホートの腫瘍組織で減少した。一方トランスアミノ酸化酵素 BCAT1 と BCAT2 自身の発現は、我々のコホートと GSE26566 の腫瘍で上昇していた (図 3A)。BCAT1 および BCAT2 は、WB および免疫染色において高発現していることを確認した。

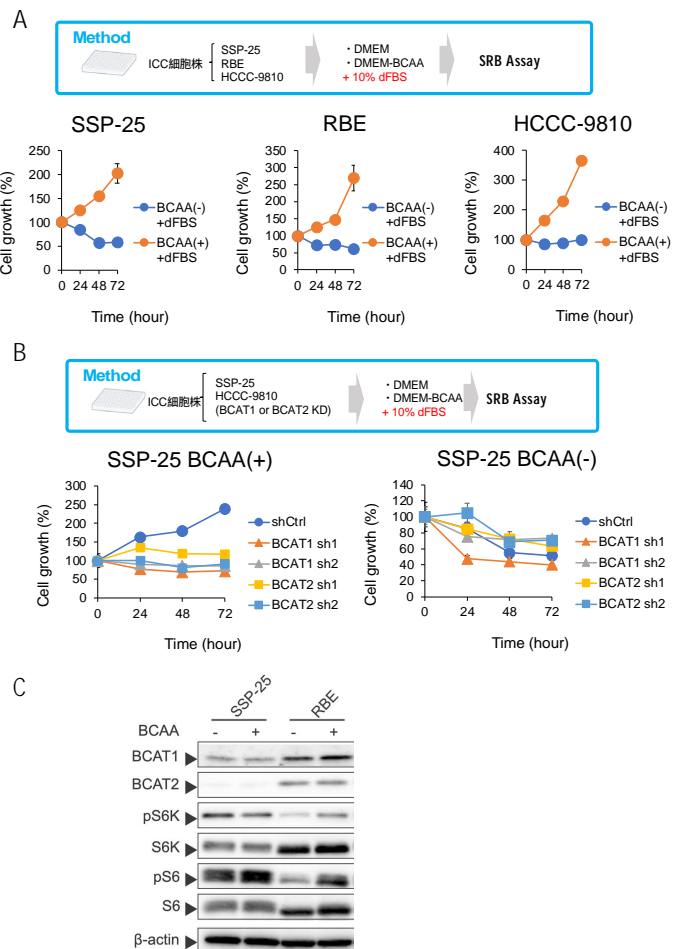
さらに、BCAA の分解に関する遺伝子群と BCAT1 遺伝子発現の臨床的意義について肝内胆管癌の臨床検体を用いて解析した。胆嚢がん 28 例を有する shibata コホート{Nakamura, 2015 #6}の ICC 腫瘍 103 例について生存情報の解析を行った。KEGG パスウェイデータベースで「BCAA 分解」

に関連する 44 遺伝子を選択し、各症例について BCAA 分解経路の活性を算出した。スコアが 50% 未満の症例を「BCAA 分解経路低活性症例群」、スコアが 50%以上の症例を「BCAA 分解経路高活性症例群」と分類した。両群を比較したところ、BCAA 分解経路活性が低い群の方が全生存率が低かった。



4) ICC において BCAA が mTOR シグナルを介して細胞の増殖と浸潤を促進するかどうかを検討するために、ヒト ICC 細胞株 (SSP-25、RBE) における BCAA の主要触媒酵素である BCAT1 および BCAT2 の発現を正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) における発現と比較した。その結果、ICC 細胞株は、BCAA 不含培地で培養すると増殖が抑制される。次に BCAT1 または BCAT2 をノックダウンした SSP-25 細胞は、BCAA 含有培地で培養すると増殖が抑制された。一般に慢性骨髄性白血病や肝細胞癌では BCAA 産生が亢進し、mTOR (mammalian target of rapamycin) 活性化を促進することが明らかである {Hattori, 2017 #7}。mTOR 経路の活性化を評価するために、p-mTOR および mTORC1 の下流エフェクターである p-S6k の蛋白解析を行い、p-mTOR と p-S6k は腫瘍サンプルで高発現していることを明らかにした。以上より BCAA を介した ICC 細胞の mTOR シグナルの刺激における BCAT1 および BCAT2 の役割を明らかにした。

一般にがん細胞は代謝経路を変化させて、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質など豊富な栄養素を効率よく細胞内に取り込み、持続的に増殖



し、特定の代謝環境下で生存できるように微少環境を構築する。これは発がん性とは無関係に、悪性度の高い腫瘍の普遍的な特徴である{Vander Heiden, 2009 #3}。このような代謝のリプログラミングが増殖細胞の一般的な表現型なのか、それともがん細胞特異的なシグナル伝達の結果なのか？リプログラミングが機能的に発癌に関与しているかどうかはまだ解明されていない。また、今回オミックス解析でセントラルドグマの階層に応じた治療標的の探索を試みたが、がんの進行や悪性化に影響を与える代謝経路はゲノム同様に多様なのか？あるいは ICC が示した様に、如何なる癌腫においても症例間に違いなく新たな治療標的となるがん関連代謝因子が存在するか？今後の更なる報告が待たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugimachi K, Araki H, Saito H, Masuda T, Miura F, Inoue K, Shimagaki T, Mano Y, Iguchi T, Morita M, Toh Y, Yoshizumi T, Ito T, Mimori K.	4. 巻 6(12)
2. 論文標題 Persistent epigenetic alterations in transcription factors after a sustained virological response in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open.	6. 最初と最後の頁 854-863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12833.	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 Sakano Y, Noda T, Kobayashi S, Kitagawa A, Iwagami Y, Yamada D, Tomimaru Y, Akita H, Gotoh K, Asaoka T, Tanemura M, Umeshita K, Mimori K, Doki Y, Eguchi H.	4. 巻 67(8)
2. 論文標題 Clinical Significance of Acylphosphatase 1 Expression in Combined HCC-iCCA, HCC, and iCCA.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci.	6. 最初と最後の頁 3817-3830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-021-07266-x.	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 Takahashi J, Masuda T, Kitagawa A, Tobo T, Nakano Y, Abe T, Ando Y, Kosai K, Kobayashi Y, Matsumoto Y, Yoshizumi T, Mori M, Mimori K.	4. 巻 100(2)
2. 論文標題 Fanconi Anemia Complementation Group E, a DNA Repair-Related Gene, Is a Potential Marker of Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology.	6. 最初と最後の頁 101-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000520582.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masuda T, Tsuruda Y, Matsumoto Y, Uchida H, Nakayama KI, Mimori K.	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1039-1046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14318.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田博喜、北川彰洋、高橋純一、梅田健二、江頭明典、折田博之、増田隆明、三森功士
2. 発表標題 肝内胆管癌における新規ドライバー遺伝子NTSR1の同定とその臨床的意義
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、阿部正、斉藤秀幸、大里祐樹、安東由貴、中野貴文、小齋啓祐、小林雄太、倉光正太郎、藤井昌志、野田美和、鶴田祐介、松本佳大、大津 甫、黒田陽介、内田博喜、武石一樹、米村祐輔、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 高発現は肝細胞癌（HCC）において予後不良マーカーである
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林雄太、増田 隆明、中野 貴文、小齋 啓祐、高橋 純一、倉光 正太郎、藤井 昌志、北川 彰洋、野田 美和、鶴田 祐介、大津 甫、松本佳大、内田 博喜、水島 恒和、土岐 祐一郎、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 新規癌遺伝子ribonucleic acid export1 (RAE1) はapoptosis抑制を介して大腸癌の増殖を促進する
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、中野貴文、小齋啓祐、小林雄太、倉光正太郎、藤井昌志、野田美和、鶴田祐介、松本佳大、大津 甫、黒田陽介、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 DNA修復関連遺伝子FANCEの高発現は肝細胞癌において予後不良マーカーである
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川彰洋、増田 隆明、高橋 純一、小斎 啓祐、中野 貴文、小林 雄太、倉光 正太郎、藤井 昌志、野田 美和、鶴田 祐介、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、江口 英利、土岐 祐一郎、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 肝内胆管癌の多様な蛋白・代謝物プロファイルにおける普遍的癌進展機構の解明
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野貴文、増田 隆明、小斎啓祐、高橋 純一、小林 雄太、倉光 正太郎、藤井 昌志、北川 彰洋、野田 美和、鶴田 祐介、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、矢永 勝彦、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌における7番染色体長腕に存在する新規癌遺伝子候補Solute carrier family12 member9 (SLC12A9) の同定とその臨床的意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田博喜、北川 彰洋、中野 貴文、小斎 啓祐、高橋 純一、小林 雄太、倉光 正太郎、藤井 昌志、野田 美和、鶴田 祐介、松本 佳大、大津 甫、増田 隆明、三森 功士
2. 発表標題 がんゲノム医療の抱える課題克服のためのオミックス・進化解析法の確立
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田隆明、鶴田 祐介、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、三森 功士
2. 発表標題 Precision medicineのための外科医の役割～ゲノム医療のより有効な実践のために～
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小齊啓祐、増田 隆明、高橋 純一、中野 貴文、小林 雄太、倉光 正太郎、藤井 昌志、北川 彰洋、野田 美和、鶴田 祐介、松本 佳大、 大津 甫、内田 博喜、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 肺腺癌における小胞体局在蛋白Transducin beta like2 (TBL2) 発現の予後予測バイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本佳大、小齋 啓祐、高橋 純一、中野 貴文、小林 雄太、倉光 正太郎、北川 彰洋、藤井 昌志、野田 美和、鶴田 祐介、大津 甫、内 田 博喜、増田 隆明、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 食道癌に対するスルファサラジン併用放射線療法の治療効果に関する検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津甫、増田 隆明、鶴田 祐介、松本 佳大、小齊 啓祐、中野 貴文、小林 雄太、高橋 純一、北川 彰洋、倉光 正太郎、藤井 昌志、野 田 美和、内田 博喜、三森 功士
2. 発表標題 これからの散発性大腸がんに対するICB免疫療法の適応に関する提案
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小齊啓祐、増田 隆明、安東 由貴、高尾 誠一朗、加藤 一樹、小林 雄太、小池 健輔、高橋 純一、本村 有史、大津 甫、武石 一樹、米村 祐輔、内田 博喜、田川 哲三、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 Transducin beta-like 2(TBL2)は肺腺癌における新規候補がん遺伝子である。
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野貴文、増田 隆明、斉藤 秀幸、大里 祐樹、小齊 啓祐、高尾 誠一朗、加藤 一樹、小林 雄太、本村 有史、小池 健輔、高橋 純一、安東 由貴、大津 甫、武石 一樹、米村 祐輔、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌の増殖を促進する新規がん遺伝子候補SLC12A9の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林雄太、増田 隆明、中野 貴文、高橋 純一、松本佳大、大津甫、内田博喜、水島 恒和、土岐 祐一郎、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 20番染色体長腕上の大腸癌新規癌遺伝子RAE1 (ribonucleic acid export 1) の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、小林雄太、倉光正太郎、松本佳大、大津 甫、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌(HCC)におけるDNA修復関連遺伝子FANCE高発現の臨床的意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津 甫、南原 翔、増田 隆明、中野 貴文、小林 雄太、高橋 純一、倉光 正太郎、松本 佳大、内田 博喜、三森 功士
2. 発表標題 血液中MicroRNA-196b-3pは、早期胃癌、前癌病変に対する診断バイオマーカーとなり得る
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 佳大、大里 祐樹、中野 貴文、小林 雄太、倉光 正太郎、高橋 純一、大津 甫、内田 博喜、増田 隆明、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌における新規ドライバー遺伝子GET4の臨床的意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 貴文、増田 隆明、高橋 純一、小林 雄太、倉光 正太郎、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、矢永 勝彦、三森 功士
2. 発表標題 7番染色体長腕に存在する大腸癌新規癌遺伝子候補Solute carrier family12 member9(SLC12A9)の検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 博喜、増田 隆明、大里 祐樹、中野 貴文、小林 雄太、高橋 純一、倉光 正太郎、松本 佳大、大津 甫、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌における新規癌関連遺伝子5MP1の臨床的意義とドラッグリポジショニング薬の同定
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 隆明、大里 祐樹、中野 貴文、小林 雄太、高橋 純一、倉光 正太郎、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌における新規ドライバー遺伝子PDX1の同定とIL6を介した造腫瘍能の可能性
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大里 祐樹、増田 隆明、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、水島 恒和、江口 英利、森 正樹、土岐 祐一郎、三森 功士
2. 発表標題 大腸癌におけるスプライシング異常を引き起こすDEAD-Box Helicase 56 (DDX56)の同定とその臨床的意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川 彰洋、小林 雄太、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、増田 隆明、江口 英利、土岐 祐一郎、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 肝内胆管癌のゲノム多様性を凌駕する普遍的治療標的の同定のためのマルチオミクスアプローチ
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 純一、増田 隆明、北川 彰洋、小林 雄太、倉光 正太郎、松本 佳大、大津 甫、内田 博喜、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 肝細胞癌(HCC)におけるDNA修復関連遺伝子FANCE高発現の臨床的意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌でのDNA修復関連遺伝子FANCE発現の臨床的意義の研究
3. 学会等名 第8回 がん代謝研究会 in 佐渡
4. 発表年 2020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	三森 功士 (Mimori Koshi) (50322748)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	
研究 分担者	江口 英利 (Eguchi Hidetoshi) (90542118)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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
---------	---------