

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09532

研究課題名（和文）メタボローム解析に基づいた卵巣癌腹水におけるがん微小環境の解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapeutic Methods Based on Metabolomic and Genetic Analysis for the Control of Ovarian Cancer Cachexia

研究代表者

永瀬 智（Nagase, Satoru）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：00292326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌の腹水中では、アミノ酸代謝、尿素回路（ポリアミン経路）、糖代謝・TCA代謝などのエネルギー代謝、コリン代謝などのone carbon metabolism、核酸代謝経路が良性疾患の腹水と比較して亢進していた。これらの代謝経路の亢進は腫瘍組織中でも同様に認められた。また、腫瘍組織では、多くのアミノ酸が正常組織と比較して有意に産生が上昇していたが、腹水では、キヌレニンのみが良性疾患中の腹水と比較して有意に上昇していることが明らかになった。遠隔転移能を獲得する上でアミノ酸プロファイルが変化し、特に腹水中でのキヌレニン産生の上昇が他臓器への転移病巣形成に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は初期に自覚症状が乏しく、発見時には腹膜播種や腹水貯留を来した、進行した状態で見つかることが多い。腹水量は腫瘍の摘出達成の予測や治療戦略に影響を与え、再発の指標にもなるため、重要な指標とされるが、腹膜播種や腹水貯留が多い症例の最適な治療法は確立されていない。本研究では、卵巣癌腹水中では遠隔転移能を獲得する上でアミノ酸プロファイルが変化し、特にキヌレニン産生の上昇が他臓器への転移病巣形成に重要である可能性が示唆された。キヌレニン産生を阻害することで腹水産生と播種を抑制する新たな治療法となり得る可能性を示した点で学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that amino acid metabolism, urea circuit (polyamine pathway), energy metabolism such as sugar and TCA metabolism, one carbon metabolism such as choline metabolism, and nucleic acid metabolism pathways were enhanced in ascites obtained from patients with ovarian cancer compared to ascites from patients with benign disease. These metabolic pathways were also enhanced in tumor tissues. In addition, the production of many amino acids was significantly elevated in tumor tissues compared to normal tissues, but only kynurenine was significantly elevated in ascites fluid of ovarian cancer compared to ascites of benign disease. It is suggested that the amino acid profile is altered in acquiring distant metastatic potential and that the increased production of kynurenine, especially in ascites, may be important in the formation of metastasis to other organs.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腹水 メタボローム解析 アミノ酸代謝 ポリアミン経路

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、発症初期に自覚症状が乏しいことから早期発見が難しく、初診時には腹膜播種を伴い、腹水貯留による腹部膨満感を自覚していることが多い。そのため、半数以上が Ⅰ 期の進行した状態で発見される。腫瘍の完全摘出術が卵巣がんの予後を向上させる最大の因子であるが、多数の腹膜播種病巣を有し腹水貯留を呈した症例に対する治療戦略においては最適解を見いだせないのが現状である。特に、腹水の量は腹膜播種病変の多寡や広がりに関連するものとされ、腹水量は、腫瘍の完全摘出達成を予測する重要な指標となっている (Harter P, et al. Ann Surg Oncol 2006)。さらには、腹水貯留は治療開始時の治療戦略に影響を与えるのみならず、骨盤内の少量の腹水が卵巣癌再発の発見契機となり、また、再発卵巣癌患者の終末期における腹水貯留は患者の「生活の質」を大きく低下させる。このように、腹水は卵巣癌の治療過程において病状の進展を反映する重要な指標と位置付けられている。

腹水産生の大きな要因として腹膜播種の形成が挙げられるが、腹膜播種は、原発巣からのがん細胞の分離、腹腔内で足場非依存性に生存、腹膜中皮細胞などへの接着、免疫細胞からの逃避と血管新生による間質への浸潤、の過程を経て成立する (Juliette O, et al. J. Histochem. Cytochem. 2018)。腹膜播種の発症機序を解明する研究は決して目新しいものではなく、これまでも様々な知見が得られている。他臓器や腹膜に接着する点に関してだけでも、上皮間葉系転換を経て大網に転移する機序には Errb3 が強く関与していること (Pradeep S. Cancer Cell, 2014)、卵巣癌細胞が分泌するエクソソーム中の MMP1 がアポトーシスを誘導することにより腹膜の中皮細胞を破壊し、腹膜播種転移を促進すること (Yokoi A. et al. Nat Commun 2017) といった重要な知見が蓄積している。卵巣癌の転移では血行性やリンパ行性は少なく、前述した多段階のステップを経て腹腔内に播種することが特徴であり、その初期の段階において、腹水は腹膜中皮細胞や他臓器への到達を仲介し促進している。がん細胞が足場非依存性に生存する環境を生み出しているのが腹水といえるが、「腹水ががん微小環境の培地である」といった視点での研究はほとんどない。

腫瘍組織では、がん細胞に加え、免疫細胞、炎症細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などの細胞ががん微小環境を形成していることが知られている。この微小環境は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子が様々な細胞から分泌される代謝産物を介して相互作用を引き起こすと考えられている (Motohara T. et al. Oncogene 2019)。代謝産物は生理活性に直接結びつく分子であり、様々な遺伝子変化やタンパク質発現異常に対する代償的働きの結果が反映され治療に直結する利点を有するが、腹水中の代謝経路の相互作用を詳細に解析した研究や原発巣・血液の代謝産物との比較については報告されていない。

2. 研究の目的

卵巣癌患者腹水の代謝物や代謝経路を、卵巣境界悪性腫瘍や良性腫瘍の腹水または原発巣や血液中のそれと比較することで、癌性腹水に特徴的な代謝物・代謝経路を同定し、腹膜播種発症機序を新たな視点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腹水における腹膜播種に関連した代謝物・代謝経路の同定

初発卵巣癌患者 (OC) 4 例、卵巣境界悪性腫瘍患者 (BOT) 2 例、子宮筋腫患者 (Control) 4 例から腹水穿刺時または手術時に腹水を採取して、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計) のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。子宮筋腫患者より採取した腹水をコントロールとした。

(2) 卵巣癌腫瘍組織における代謝物・代謝経路の検討

同一患者から得た腫瘍組織と正常組織のペア検体 (24 例) を CE-TOFMS と LC-QQQMS で測定した。

(3) 卵巣癌患者の血液における代謝物・代謝経路の検討

卵巣癌患者 37 例、良性疾患患者 (コントロール) 30 例から検体を採取し、CE-TOFMS と LC-QQQMS で測定した。

4. 研究成果

(1) OC, BOT, Control の腹水における階層的クラスタ解析

OC, BOT, Control の腹水について CE-

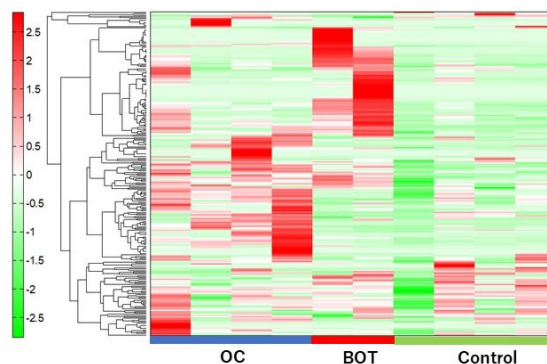


図 1

TOFMS によるメタボローム解析を行ったところ、251 (カチオン 176, アニオン 75) ピークに候補化合物が同定された。

それらの化合物について 3 群間で階層的クラスター解析を行った結果を図 1 に示した。3 群間で代謝プロファイルに明らかな相違を認めた。

(2) OC, BOT, Control の腹水における主成分解析(PCA)

CE-TOFMS 分析により得られたメタボロームデータを主成分分析 (PCA) により解析し、得られたスコアプロットを図 2 に示した。横軸の第 1 主成分 (PC 1) では BOT と OC, Control のサンプルが分離され、縦軸の第 2 主成分 (PC 2) では OC と BOT, Control のサンプルが分離された。

PC1 では Hypoxanthine, Inosine などの核酸代謝に関連した物質、Sedoheptulose 7-phosphate (糖代謝), 1-Methylhistamine (グルタミン代謝), Taurine (コリン代謝) の因子負荷量は高かった。PC2 では 4-Methyl-2-oxovaleric acid, 3-Methyl-2-oxovaleric acid, Pyruvic acid などの TCA 代謝によるエネルギー転換・脂肪酸の異化反応と分岐鎖アミノ酸の代謝に関連した物質、Proline, Urea などのグルタミン酸代謝と尿素経路に関連した物質の因子負荷量が高かった。

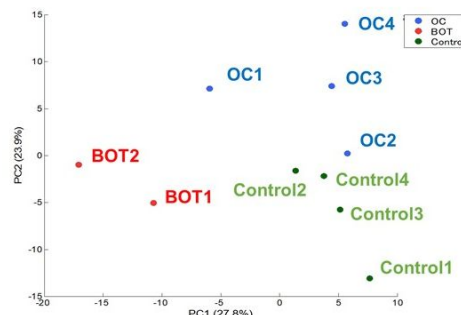


図 2

(3) OC, BOT, Control の腹水における代謝物と代謝経路の比較

OC と Control 群における代謝物を比較して有意差のあった物質とその代謝経路を表 1 に示した。OC の腹水中では Control の腹水と比較して Kynurenine, N⁸-Acetylspermidine, Uridine, S-Adenosylmethionine, Malic acid などの物質が有意に上昇しており、主な代謝経路としてはトリプトファン代謝、グルタミン酸代謝と尿素回路 (ポリアミン経路), 糖代謝・TCA 代謝、コリン代謝、核酸代謝経路が亢進していた。

表 1. OC vs Control

Compound name	Ratio	p-value	Pathway
Kynurenine	5.8	0.017	芳香族アミノ酸:トリプトファン代謝
N ⁸ -Acetylspermidine	4.4	0.002	グルタミン酸代謝と尿素回路(ポリアミン経路)
S-Adenosylmethionine	2.8	0.005	グルタミン酸代謝と尿素回路(ポリアミン経路)
Ornithine	1.8	0.041	グルタミン酸代謝と尿素回路(ポリアミン経路)
Pro	1.8	0.031	グルタミン酸代謝と尿素回路(ポリアミン経路)
Malic acid	2.2	0.029	糖代謝と糖新生代謝・TCA代謝・脂肪酸の異化反応と分岐鎖アミノ酸代謝
Cis-Aconitic acid	1.4	0.04	TCA代謝・脂肪酸の異化反応と分岐鎖アミノ酸代謝
Ethanolamine	2.1	0.034	コリン代謝・メチオニン回路
Ethanolamine phosphate	2.1	0.012	コリン代謝・メチオニン回路
Uridine	4.4	0.025	核酸代謝-ピリミジン代謝
Adenosine	2.4	0.007	核酸代謝-プリン代謝-アデニン
Uric acid	1.7	0.042	核酸代謝-プリン代謝-アデニン/グアニン

また、OC と BOT 群における代謝物の比較では、11 物質に有意差を認め、主な代謝物としては N,N-Dimethylglycine (BOT 比 2.8 倍), Uric acid (BOT 比 2.6 倍), Pyruvic acid (BOT 比 2.2 倍), 3-Methyl-2-oxovaleric acid (BOT 比 2.1 倍), 4-Methyl-2-oxovaleric acid (BOT 比 2.1 倍) が有意に OC 腹水中で上昇しており、代謝経路としてはコリン代謝、核酸代謝、糖代謝・TCA 代謝が亢進していた。BOT と Control 群における比較では 3 物質 (Hypo taurine, Lactic acid, Taurine) が BOT の腹水中で Control と比較して上昇しており、代謝経路としてはコリン代謝、糖代謝・TCA 代謝の亢進を認めた。

(4) 卵巣癌腫瘍組織における代謝物・代謝経路の検討

同一患者から得た腫瘍組織 (OT 群) と正常組織 (NT 群) のペア検体 (24 対) のメタボロー

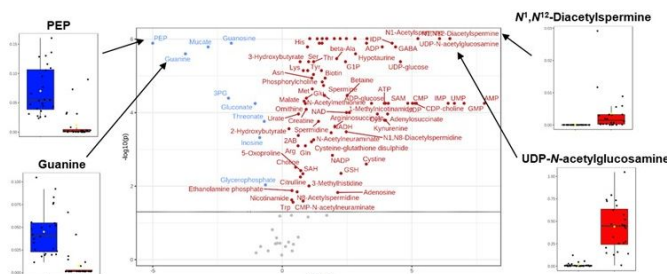


図 3

△解析により、組織検体では130代謝物が定量された。その結果、96代謝物がOT群とNT群で有意な差を示した(図3)。N¹,N¹²-diacetylspermine, UDP-N-acetylglucosamine, adenosine monophosphate (AMP) など、ほとんどの代謝物がOT群で高濃度を示し、phosphoenolpyruvate (PEP) など9つの代謝物だけが低濃度を示した。

(5) 卵巣癌患者の血液における代謝物・代謝経路の検討

卵巣癌患者37例、良性疾患患者(コントロール)30例から血液を採取し、血漿で行ったメタボローム解析では、84の代謝物が定量され、7つの代謝物がOC群とC群で有意に異なることが明らかになった(図4)。例えば、ベタインとN¹,N¹²-diacetylspermineはOC群で高濃度であったが、4-methyl-2-oxopentanoateとhistidine(His)は低濃度であった。

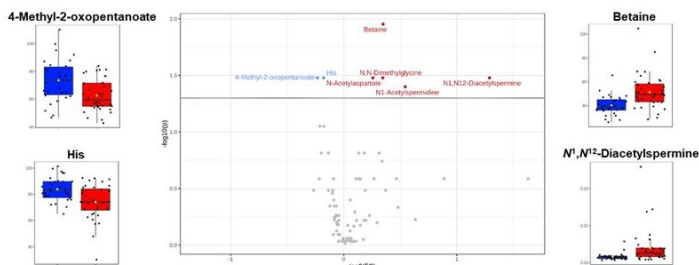


図4

(6) 腹水と腫瘍組織におけるアミノ酸代謝プロファイルの検討

腫瘍組織(T)では、正常組織(N)と比較してcystine, グルタミン酸(Glu), histidine(His), Kynurenine, leucine(Leu), Methionine(Met), tryptophan(Trp)など多くのアミノ酸が有意に産生が上昇していた(図5)。一方、転移病巣を形成するうえでの培地として着目した腹水のメタボローム解析では、多くのアミノ酸がコントロールと比較して変化がなかったが、キヌレニンのみが有意に上昇していることが明らかになった。測定対象が腫瘍組織、腹水と異なるものの、遠隔転移能を獲得する上でアミノ酸プロファイルが変化し、特に腹水中でのキヌレニン産生の上昇が他臓器への転移病巣形成に重要である可能性が示唆された。

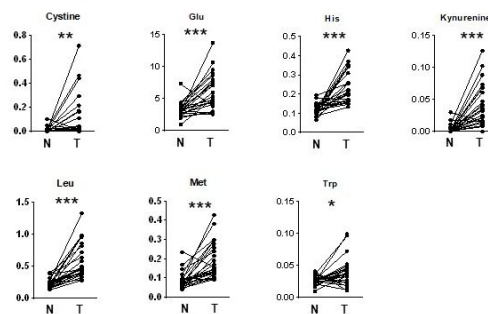


図5

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 堀川翔太、立花由花、奥井陽介、榊 宏諭、清野 学、太田 剛、永瀬 智
2. 発表標題 卵巣癌の腹水メタボローム解析に関する検討
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023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	清野 学 (Seino Manabu) (40594320)	山形大学・医学部・講師 (11501)	
研究分担者	太田 剛 (Ohta Tsuyoshi) (50375341)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	

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