

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390263

研究課題名(和文) 新しい質量分析イメージング法を用いた消化器癌リンパ節転移最初期に生じる現象の解明

研究課題名(英文) Metabolic status of sentinel lymph node from gastrointestinal cancer

研究代表者

北川 雄光 (KITAGAWA YUKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20204878

研究成果の概要(和文)：癌織中で不均一に生じる変異を、MALDI-IMS を利用して同定すると同時に可視化することで、変異の局在を二次元情報として把握することが可能である。我々は乳癌における intrinsic subtype 別の代謝活性の違いを明らかにすることを目的として、サブタイプごとに CE-MS および MALDI-IMS を用いたメタボローム解析を行い、特にトリプルネガティブ乳癌における非常に特徴的な差異を検出することが可能であった。今後はこれら代謝解析の構築により、これらサブタイプ間の相違を利用した個別治療が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Metabolic status of each intrinsic subtypes was analyzed by MALDI-IMS and CE-MS. It was revealed that triple negative breast cancer has the specific metabolic status which is related to the mechanisms of cell proliferation and the sensitivity against chemotherapy. It was suggested that characterization of these metabolic difference contributes to further improvement of tailor-made therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：MALDI-IMS, センチネルリンパ節, 消化器癌, 乳癌

1. 研究開始当初の背景

センチネルリンパ節の概念が提唱され、1993年に乳癌において最初の症例が報告されて以来(Krag, Surg Oncol, 1993)、多くの検証がなされた結果、乳癌治療では標準的な手法となり、本研究代表者により世界で初めて消化器癌に対するセンチネルリンパ節生検の有用性が報告されるなど(Kitagawa, Surg Oncol Clin N Am.,2002)、消化器癌を含む様々な固形癌でその有用性が認められつつある。現在までにセンチネルリンパ節に関する多種多様な研究がなされてきたが、その大

部分は臨床的な適用の検討や、同定法に関するもので、『センチネルリンパ節へ転移した癌に特徴的な生物学的特性』に着目して、これを研究素材として使用し、リンパ節転移の機序を明らかにすることを試みた研究は希である。これは、センチネルリンパ節にアクセスが容易な外科医の興味が、多くの場合臨床における適応・有用性に向くことに起因すると考えられる。

現在までに、我々はこのリンパ節転移機構の解明に主眼をおいて研究を行ってきた。癌の転移は、多くの複雑な段階を経て成立する

ことが示唆されているが、リンパ管を経由して転移する癌が最初に転移するのがセンチネルリンパ節であり、これを研究素材とすることで、癌細胞における比較的シンプルな『転移の最初期に成立する事象が観察可能である』と考えられる。

そこで我々はリンパ節転移機構解明の為に基礎的検討として、消化器癌や悪性黒色腫のセンチネルリンパ節を対象に種々の研究を進めてきた。その結果、(1)VEGFや細胞周期調節遺伝子異常が食道扁平上皮癌のリンパ節転移と有意に相関していることを明らかにした。(Kitagawa, Clin Cancer Res 1996; Osaku, Oncol Rep 2001; Takeuchi, Int J Cancer, 2004) また、(2)悪性黒色腫において、転移巣における腫瘍細胞の differentiation melanoma-associated antigen の発現減弱が予後不良因子となることを初めて明らかにした。(Takeuchi, Cancer Res, 2003) さらに、(3)ケモカイン受容体の一種である CCR7 が悪性黒色腫に高率に発現しており、センチネルリンパ節内より分泌されるケモカイン (CCL21/SLC)により有意に細胞遊走能が亢進され、CCR7の高発現とリンパ節転移が相関することを明らかにした。(Takeuchi, Clin Cancer Res, 2004)

これら研究は、リンパ節転移に関与すると考えられた単一もしくは複数の因子に焦点を当てて施行され、獲得された成果である。我々は、次のステップとして、リンパ節転移の最初期に生じる現象、すなわち純粋な転移能獲得に必要な、癌細胞や微小環境の変化をより詳細に検証するためには、転移巣における遺伝情報・代謝産物の特徴的な変異を検出することが必要であると考えた。従来の解析法は組織より抽出された mRNA の変化をアレイ等によって検出し、標的遺伝子の変化を確認する方法が一般的であったが、この手法では組織全体の「平均値」としての変化を確認するに留まり、微小環境における変化の「局在情報」が欠失しているため、個々の細胞単位での真の変異を確認することが不可能であるという欠陥を持つ。

近年の著しいテクノロジーの進化により、二次元的な局在情報を維持しながら、これら変異を検出することが可能となった。以下に示す次世代を代表する機器を駆使し、消化器癌のセンチネルリンパ節転移サンプルを用いた解析を通じて、『臨床応用に必要なリンパ節転移最初期に生じる全く新しい重要な現象を抽出する』ことを試みた。

2. 研究の目的

癌組織より最初にリンパ流を受けるセンチネルリンパ節における癌転移巣では、転移の最初期に生じる現象が観察されると予想さ

れるが、癌細胞の不均一性の為に組織全体で同じ変異が生じ、これが継続することはない。この組織中で不均一に生じる変異を、最新の技術を利用して同定すると同時に可視化することで、変異の局在を二次元情報として把握することが可能である。この技術を利用して、消化器癌がリンパ節転移能を獲得するに至るための蛋白質発現・代謝産物の変化をプロテオーム・メタボローム解析の手法を用いて同定し、さらにその局在を示すことで、変異を示す細胞のみを対象とした遺伝子変異解析が可能となる。我々はこの手法を用いて、臨床的に応用可能な、リンパ節転移の指標となる現象を検索することを目的とした。対象とする癌種は当教室でセンチネルリンパ節の同定を臨床において日常的に行っている消化器癌である、食道癌及び胃癌とし、以下を具体的な目的として研究を行う。

① マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) と顕微鏡を組み合わせることで、分子の生体内における分布を観察しながら、物質同定が可能となる、MALDI 顕微質量分析イメージング (MALDI-IMS) が確立された。本大学に設置されたこの機器を用いることで、これまで不可能であった、局在情報を保持したプロテオーム解析を施行することが可能である。本課題ではこの解析により、転移巣とその微小環境に特異的な、蛋白質・代謝産物の変異と、その局在を明らかにし、これをイメージングすることで、転移の最初期に生じる現象を具象化する。

② Illumina 社により開発された、Genome Analyzer システムは、従来では不可能であった全ゲノムレベルでのシーケンスを短時間で安価に、かつ高品質な精度で実現する次世代シーケンサーの代表格である。本課題では①の解析により得られた変異の局在部位から laser capture micro dissection により、その部分のみのゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、対象となる蛋白質・代謝産物のゲノムの変異・遺伝子多型・発現情報等を明らかにする。

センチネルリンパ節を用いた縮小手術の「最終型」は、生検することなく、手術前に転移の有無を知ることである。これにより、多くの消化器癌患者の手術を簡略化もしくは省略し、患者に多大な利益をもたらすことが可能である。現段階でこの実現は不可能であるが、本研究による最新の機器を駆使して得られる知見により、これを臨床的に可能とするこれまでに知られていない新しい発想による技術が確立可能であると期待されると考えられた。

3. 研究の方法

細胞遊走・浸潤に関わる上皮間質移行 (EMT) 誘導因子、転移先での生着に関わる癌幹細胞

関連因子、微小環境に適応するための代謝経路の変化や、前述の我々が注目してきたケモカインなど、様々な既知の因子が消化器癌の転移に重要な働きを行うことが知られている。本研究においても、これらの候補となる因子に焦点を当てて、その発現と局在・遺伝子変異を解析すると同時に、原発巣とセンチネルリンパ節転移巣における、これまで全く未知であった差異をその局在情報と共に同定し、これを引き起こすに至る遺伝子変異を、差異を認める部分からのみ抽出したゲノムDNAを用いて解析する。同定された因子は、将来に渡り、個別の各論的な検証が分子生物学的・生化学的に行われ、さらに患者ごとの臨床病理学的背景と照らし合わせることで、リンパ節転移のみならず、遠隔転移や予後の指標として使用可能かを検証し、臨床に応用することを目指す。

① MALDI-IMS の概要

2002年に田中耕一氏がノーベル化学賞を受賞した、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)により、蛋白質等の高分子をイオン化させて質量分析を行う事が可能となり、この質量分析技術と顕微鏡を組み合わせることにより、MALDI-IMSが確立した。MALDI-IMSは生体組織切片などの材料をホモジナイズすることなく、組織切片のまま二次元平面上において位置情報を保持しながら質量分析を行い、得られたスペクトル群から任意のイオン強度を分布様態として画像化する手法である。

② 臨床検体の採取と前処理

本課題における目的は、センチネルリンパ節において観察されると予想される、癌転移最初期に生じる現象の解明であるため、上記の転移巣を有するセンチネルリンパ節検体と、原発巣の両者を以下の方法で採取する。

MALDI-IMSにて質量分析を行うためには、切除による代謝産物の経時的変化を防ぐため、速やかに包埋物質と共に凍結する必要があるが、病理診断等で一般的に凍結切片作成に用いられているOCTは質量分析においてノイズを与えることが知られている。我々はこの問題に対して基礎的な検討を独自に加えた結果、解析結果に影響を与えない最適な包埋物質を既に同定済みであり、これを用いて厚さ5 μ mの組織切片を作成する。

③ マトリクス処理とMALDI-IMSによる解析

MALDIは測定対象物質とマトリクスを混合して共結晶化し、レーザーを照射することによって分子をイオン化する方法である。よって、使用するマトリクスにより観察可能対象が変化するため、その選定は極めて重要である。我々の目的物質は蛋白質及び代謝産物であるため、前者を観察するためにシナピン酸

を、後者に対してはCHCA及びDHBを用いて観察する。

シナピン酸は4kDa~30kDaの物質を測定するのに適したマトリクスであり、現行のMALDI-IMSにおいて測定できる大きさの限界でもある。しかし、我々の対象物質はこれよりも遙かに大きい高分子量の蛋白質であるため、これを測定するために開発された、on-tissue digestion法を用いて酵素による消化処理を加え、巨大蛋白質を酵素消化断片として検出することができる。(Shimma, Anal Chem, 2008) これにより分子量とそのアミノ配列を同定し、データベースとの照合により分子同定が可能となる。

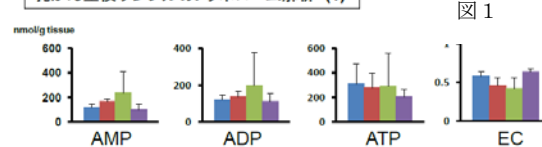
癌のセンチネルリンパ節転移検体と原発巣における検体は、上述のマトリクス処理後にMALDI-IMSにより、

- a) 蛋白及び代謝産物の発現ピーク及びその分子量
- b) それら物質の構造
- c) 組織切片の二次元情報に基づく発現分布パターン

が解析され、両者において特徴的な発現の差異を示す物質の同定と、組織におけるそれらの局在をイメージングする。MALDI-IMSが施行された組織切片は、全て連続切片として切り出してこれを保存し、以下に述べる次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異の検索のため、ゲノムDNAの抽出を行う。

Micro dissectionによって分離された、限られた試料を有効に活用するため、本研究ではゲノムDNA全領域を読むのではなく、MALDI-IMSにて同定した蛋白質・代謝産物とそれに関連する遺伝子群を対象として研究を進めていく。ヒトゲノム領域中、エクソン領域はわずか1.22%であり、さらにこの中から興味のある特定領域のみを高効率に捕捉し、他の不要なゲノム領域を排除することが可能である。(Agilent SureSelect Target Enrichment System) このシステムにより、MALDI-IMSで検出された物質に関連する特定のゲノム配列及びその上流・下流の転写調節領域を指定し、その領域の配列を持つゲノムだけを高効率に回収し、次世代シーケンサーを用いることで、解析効率を大幅に高めることができる。MALDI-IMSにより、多種多様なセンチネルリンパ節転移巣と原発巣における差異が同定されると予測されるが、このハイスループットな次世代シーケンサーを用いることで、これらを引き起こす原因遺伝子の変異を一括して特定することを目的とし、

乳がん生検サンプルのメタボローム解析 (1)



これを施行する。

4. 研究成果

当初の計画に則って、消化器癌のセンチネルリンパ節および、大腸癌肝転移症例の採取を行い、MALDI-IMSをはじめとするメタボローム解析を行った。その際に認められる現象として、手術操作による血管遮断と組織採取までの時間経過が長いこと、いわゆるエネルギーチャージの損耗が認められ、本研究にて観察すべき ATP/ADP 等をはじめとする代謝物質の分解が生じていると考えられた。

そこで、本解析に適した検体として穿刺吸引法（マンモトーム or VACNB）を行った乳癌組織が、① 採取後 30 秒以内に液体窒素への保存が可能であり、上記エネルギーチャージの損耗が認められない、② メタボローム解析および MALDI-IMS による解析に対する十分な組織量が採取可能である、ことから解析の第一段階として適切と判断された。

乳癌は Intrinsic subtype ごとにその治療法が異なるが、このサブタイプ別に臨床検体および細胞株における代謝特性にどのような違いが認められるかを検討した。

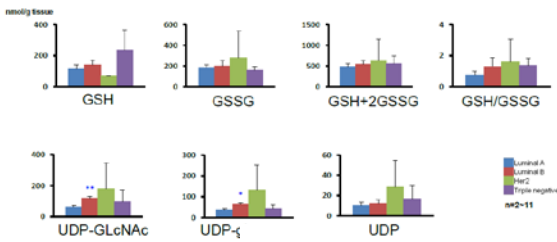


図 2

図 1 に示すように、穿刺吸引組織診を行い、30 秒以内に液体窒素へ保存した検体では、血管結紮を要する術中消化器組織検体と比較して、高いエネルギーチャージを維持することが確認された。

これらをサブタイプ別に CE-MS を用いて解析を行うと、各サブタイプ別に特徴的な代謝特性を示すことが示唆された。(図 2) 特に、ホルモン受容体陽性・HER2 陰性である Luminal type とホルモン受容体陰性・HER2 陰性である Triple negative type の間ではその代謝特性が大きく異なることが確認された。すなわち、Luminal A type の臨床検体においては、解糖系が亢進することで ATP 産生が大幅に亢進しているのに比較して (図 3)、Triple negative type では、メチレーション回路の代謝産物のほとんどにおいて高値を示すことが確認された。

特に、GSH/GSSG 比においては Triple negative type において高値を示し、これらサブタイプにおいて還元型である GSH 量が豊富に存在することで、抗癌剤感受性に影響を与えている可能性が示唆された。

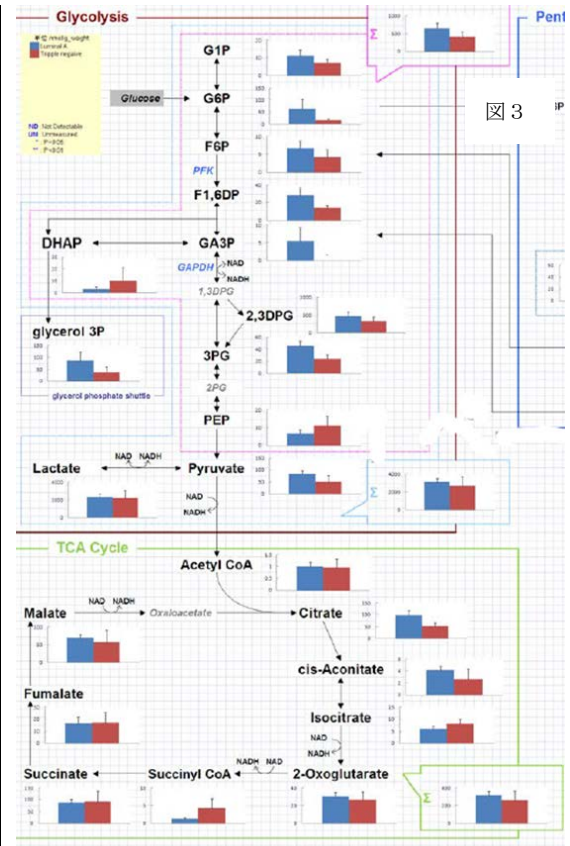


図 3

また、これらを MALDI-IMS において、癌部のみの代謝特性を比較したところ、やはり同様の代謝特性の差異が多く検出され、サブタイプごとに全く異なる細胞増殖のメカニズムが存在することが示唆された。(図 4)

これら臨床検体は患者個々の差異や heterogeneity が存在するため、これらサブ

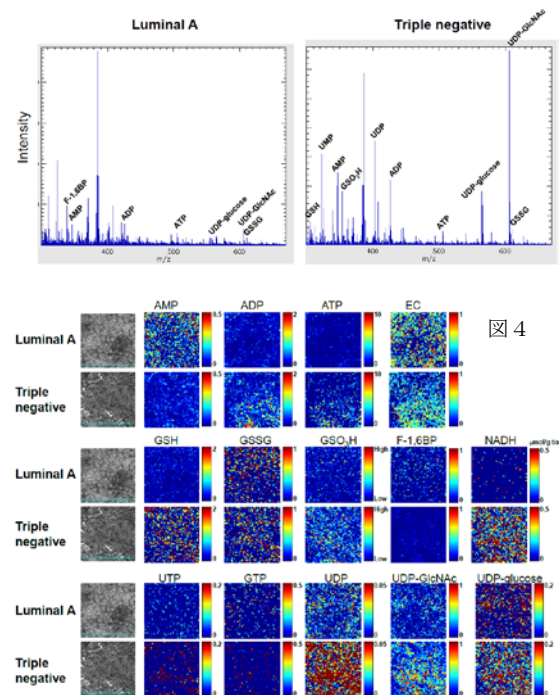


図 4

タイプ間における相違の検証を細胞株を用いて行った。免疫不全マウス乳腺 Fat-pad への移植により形成された腫瘍を、MALDI-IMS を用いて解析したところ、サブタイプ間に特徴的な差異が認められたが、必ずしも全ての代謝産物において臨床検体と同様の結果にはならなかった。特に、臨床検体では triple negative type に豊富に認められた UDP-GlcNAc の発現が、細胞株を用いた腫瘍では Luminal type に多く認められ、検体との結果の乖離が認められた。

これらの結果から、今後は複数の先端計測技術を用いた代謝解析の構築により、これらサブタイプ間の相違を利用した個別治療やより細かいテーラーメイド医療が可能となると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Hayashi R, Ishii Y, Ochiai H, Matsunaga A, Endo T, Hasegawa H, **Kitagawa Y.** Suppression of heat shock protein 27 expression promotes 5-fluorouracil sensitivity in colon cancer cells in a xenograft model. *Oncol Rep.* 2012 Oct;28(4):1269-74. doi: 10.3892/or.2012.1935. 査読あり

2) Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, Noji S, Tsukamoto N, Goshima N, Hasegawa H, **Takeuchi H**, Ueda M, **Kitagawa Y**, Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci.* 2012 Sep;103(9):1617-24. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02355.x. 査読あり

3) Fukuda K, **Saikawa Y**, Takahashi M, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, **Takeuchi H**, **Kitagawa Y.** Antitumor effect of cetuximab in combination with S-1 in EGFR-amplified gastric cancer cells. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):975-82. doi: 10.3892/ijo.2011.1279. 査読あり

4) Seki H, **Hayashida T**, Jinno H, Hirose S, Sakata M, Takahashi M, Maheswaran S, Mukai M, **Kitagawa Y.** HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis

is associated with clinical outcomes in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2012 Jun;19(6):1831-40. doi: 10.1245/s10434-012-2295-5. 査読あり

5) Ono Y, **Hayashida T**, Konagai A, Okazaki H, Miyao K, Kawachi S, Tanabe M, Shinoda M, Jinno H, Hasegawa H, Kitajima M, **Kitagawa Y.** Direct inhibition of the transforming growth factor- β pathway by protein-bound polysaccharide through inactivation of Smad2 signaling. *Cancer Sci.* 2012 Feb;103(2):317-24. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02133.x. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 雄光 (KITAGAWA YUKO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：20204878

(2) 研究分担者

竹内 裕也 (TAKEUCHI HIROYA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20265838

才川 義朗 (SAIKAWA YOSHIRO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00225682

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80234079

河地 茂之 (KAWACHI SHIGEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80234079
(2011年まで分担者として参画)

(3) 連携研究者

涌井 昌俊 (WAKUI MASATOSHI)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：90240465

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50161287