

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 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591567

研究課題名（和文） リアルタイム細胞分子動態解析法による肺がんの低酸素バイオロジーの解明

研究課題名（英文） Analysis of tumor hypoxia in lung cancer using real time mass spectrometry

研究代表者

宮田義浩（MIYATA YOSHIHIRO）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：50397965

研究成果の概要（和文）：

肺癌切除例で、HIF-1、Glut-1 発現を定量化したところ、HIF-1、Glut-1 発現と SUVmax、再発率は、腺癌症例にて有意な相関が認められたが、扁平上皮癌では認められなかった。肺腺癌において低酸素環境下に誘導される HIF-1、Glut-1 発現が FDG-PET を反映し、更に腫瘍の悪性度の指標となる。また細胞低分子動態解析法により 5-FU の細胞死誘導にプロリン-グルタミン酸代謝が密接に関連していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In lung adenocarcinoma, the SUVmax and the expression of HIF1 α and GLUT1 correlated with various clinicopathological factors relating to malignancy and disease free survival. We conclude that in lung adenocarcinoma, but not squamous cell carcinoma, HIF1 α -induced GLUT1 expression indicates tumor aggressiveness pathologically, and might explain high FDG uptake on PET and correlate with poor prognosis. We also show that proline and glutamate metabolism may play a role in 5-FU induced cell death using real time mass spectrometry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学、FDG-PET

1. 研究開始当初の背景

〈FDG-PET の位置づけ〉

肺癌診療において FDG-PET は、主に転移などの病期診断に用いられる。FDG は glucose 類似体で、細胞膜に発現した Glut-1 (glucose transporter-1) を介して細胞内に輸送されるが、glucose とは異なりリン酸化された後代

謝されずに細胞内にとどまる。この FDG からの放射線を捕らえることで FDG-PET 画像は構成されるが、細胞レベルからみたその詳細なメカニズムについては未解明である。

〈癌の低酸素バイオロジー〉

癌細胞はその増殖に伴い必然的に低酸素ストレスにさらされる。それに適応するため、

癌細胞は転写因子 HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) を介して、細胞膜の Glut-1 を発現させ、低酸素下でのエネルギー産生可能な解糖系代謝を促す。さらには血管新生を介し癌細胞周囲の微小環境をも変化させ、転移浸潤能を獲得することが知られている。この低酸素抵抗性こそが癌の悪性度の本態とされ、癌の低酸素バイオロジーの研究が最近注目を集めている。さらに TKI (Gefitinib, Erlotinib)、taxol、CPT-11 などの抗腫瘍剤は、その下流に存在する癌低酸素応答の要である HIF-1 の機能制御を標的としている。

〈肺癌の低酸素応答と FDG-PET〉

FDG の細胞内輸送の鍵である Glut-1 は、癌の低酸素応答の要である HIF-1 を介して発現が増強され、解糖系代謝の亢進により癌の増殖に寄与すると仮定される。すなわち FDG-PET は癌の低酸素応答の結果を悪性度の指標として検出しているという仮説が成立する。

〈生きた個々の細胞のリアルタイム分子動態解析システム「ビデオマススコープ」〉

広島大学で本研究分担者により開発されたビデオマススコープは、生きた細胞をビデオ光学顕微鏡で観察しながら、超微量の細胞内成分を超微細な針 (ナノスプレーチップ) で吸い取り、これを高電圧で一気に噴射し分子をイオン化することで、細胞内の分子を効率よく質量分析するものである。従来の遺伝子やプロテオーム研究などは細胞の集合体や組織をすり潰して解析したものだが、この新技術により個々の生細胞内の分子の局在や代謝の追跡がリアルタイムに可能となった。

2. 研究の目的

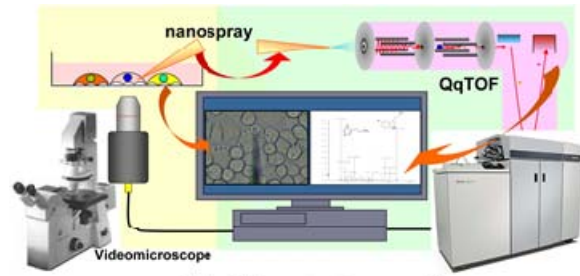
本研究は生きた個々の細胞をビデオ顕微鏡で観察しながら、リアルタイムで細胞内物質の質量分析が可能な画期的な新技術、「ビデオマススコープ」を用いて、低酸素や抗癌剤により肺癌細胞内で起こる糖代謝産物や FDG (fluoro-2-deoxy-D-glucose) の蓄積を経時的に追跡する。これにより肺癌細胞の低酸素応答メカニズムを解析し、肺癌の悪性度評価に対する FDG-PET の役割を細胞一つのレベルから明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) HIF-1, Glut-1 発現の定量化
 広島大学呼吸器外科で完全切除された非小細胞肺癌 94 例について HIF-1, Glut-1 発現を定量化し解析し、FDG-PET 集積との相関、予後規定因子である脈管侵襲やリンパ節転移の関与を検討する。

2) 質量分析システムを用いた肺癌細胞内解糖系代謝分子・抗癌剤・FDG 測定法の確立
 各種肺癌培養細胞をビデオ光学顕微鏡で観察しながら、経時的に細胞内成分を細胞質、

核に分けてナノスプレーチップで吸い取り、糖代謝分子、抗癌剤代謝産物、FDG を質量分析により定量化する方法を確立する。



ビデオマススコープ

この際、測定に最適と思われる肺癌細胞株を、Western blot による Glut-1, HIF-1 発現強度により選択する。

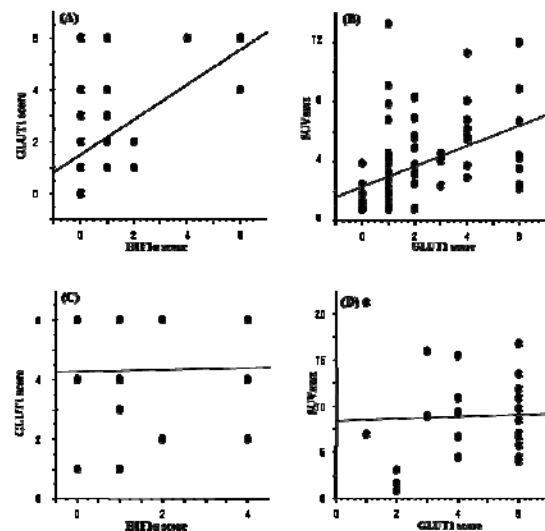
3) 低酸素応答を指標とした抗癌剤耐性メカニズムの解明

我々は研究室に各種抗癌剤 (5FU, CPT-11, platinum) に耐性細胞株を親株からクローニングしている。この細胞株を用いて、低酸素、抗癌剤刺激下に、質量分析システムによる解糖系代謝分子や抗癌剤代謝分子、その細胞内局在、及び FDG の細胞内への蓄積を定量化し、親株と耐性株の比較から、抗癌剤耐性のメカニズムを探る。

4. 研究成果

癌細胞はその増殖に伴い低酸素ストレスにさらされるため、転写因子 HIF-1 を介して、細胞膜に Glut-1 を発現させ、低酸素下でのエネルギー産生可能な解糖系代謝を促す。FDG は Glut-1 を介して細胞内に輸送され、PET 画像に反映される。本研究は細胞低分子動態解析法を用いて、低酸素や抗癌剤治療などのストレスにより癌細胞内に起こる FDG の蓄積を観察し、低酸素関連因子発現や浸潤増殖能との相関を観察することにより、肺癌の悪性度評価に対する FDG-PET の可能性を明らかにすることを目的とした。

図 1



肺腺癌 70 例、扁平上皮癌 24 例、計 94 例を対象とし、免疫組織化学的染色を行い、低酸素環境下に誘導される HIF-1、Glut-1 の発現を定量的に示した。HIF-1、Glut-1 発現と SUVmax、脈管浸潤、リンパ節転移、再発率は、腺癌症例にて相関が認められたが (図 1 (A), (B))、扁平上皮癌では有意な相関は認められなかった (図 1 (C), (D))。図 2 では HRCT (A), FDG-PET (B), H & E (C), Acinar subtype H & E (D), Acinar subtype HIF-1 (E), Acinar subtype Glut-1 (F), Lepidic subtype H & E (G), Lepidic subtype HIF-1 (H), Lepidic subtype Glut-1 (I), Acinar subtype H & E (D), Acinar subtype HIF-1 (E), Acinar subtype Glut-1 (F) で示すように、HRCT, FDG-PET, 免疫染色結果が良く相関していた。扁平上皮癌では図 2 の H & E (J), HIF-1 (K), Glut-1 (L) に示す通り関連は薄かった。腺癌については非小細胞肺癌、特に腺癌においては Glut-1 の発現と SUVmax はその予後を層別化することが可能であった (図 3)。低酸素環境下に誘導される HIF-1、Glut-1 発現は腫瘍の増殖能、悪性度の強力な指標となることが示唆された。

図 2

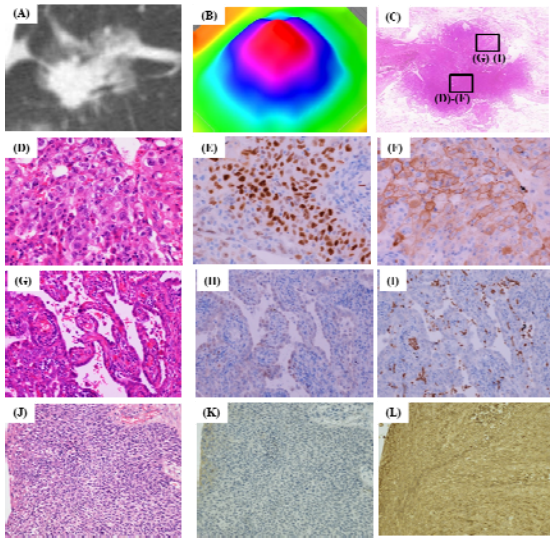
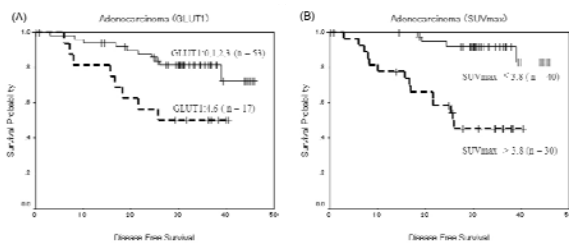


図 3

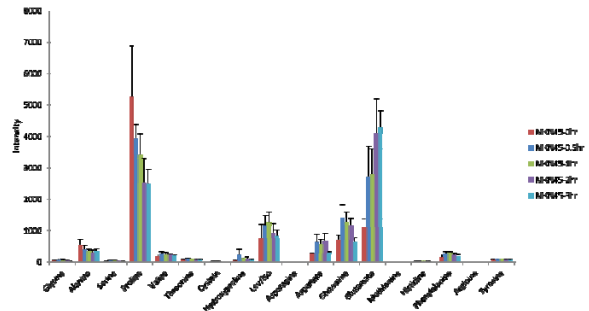


また癌細胞内での低酸素、抗癌剤ストレスによる低酸素関連因子の変化を観察するため、5-FU 感受性が異なる 2 種類のヒト癌細胞株を樹立した。これらの癌細胞株に 5-FU を曝露

したのち、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて経時的に細胞内の低分子動態を網羅的に一斉解析し、5-FU の細胞死誘導にプロリン-グルタミン酸代謝が密接に関連していることを見出した

(図 4)。これらの代謝を媒介する PRODH 発現量を RT-PCR を用解析したところ、耐性株で優位に低値であり、superoxide 産生も減少することを確認した。今後、細胞低分子動態解析法による癌の浸潤増殖のメタボローム解析が進めば、新たな関連因子の発見が期待される。

図 4



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 6 件)

1: Sasada S, Miyata Y, Tsutani Y, Tsuyama N, Masujima T, Hihara J, Okada M. Metabolomic analysis of dynamic response and drug resistance of gastric cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncol Rep.* 2013;29(3):925-31. 査読有

2: Tsutani Y, Takuwa T, Miyata Y, Fukuoka K, Hasegawa S, Nakano T, Okada M. Prognostic significance of metabolic response by positron emission tomography after neoadjuvant chemotherapy for resectable malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2013;24(4):1005-10. 査読有

3: Tsutani Y, Miyata Y, Yamanaka T, Nakayama H, Okumura S, Adachi S, Yoshimura M, Okada M. Solid tumors versus mixed tumors with a ground-glass opacity component in patients with clinical stage IA lung adenocarcinoma: Prognostic comparison using high-resolution computed tomography findings. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 [Epubahead of print] 査読有

4: Tsutani Y, Miyata Y, Nakayama H, Okumura S, Adachi S, Yoshimura M, Okada M. Prediction of pathologic node-negative clinical stage IA lung

adenocarcinoma for optimal candidates undergoing sublobar resection. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012;144(6):1365-71. 査読有

5: Miyata Y, Tsutani Y, Okada M. Use of high-resolution computed tomography and positron emission tomography/computed tomography in the management of stage IA adenocarcinoma. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2012;24(4):267-74. 査読有

6: Tsutani Y, Miyata Y, Nakayama H, Okumura S, Adachi S, Yoshimura M, Okada M. Prognostic significance of using solid versus whole tumor size on high-resolution computed tomography for predicting pathologic malignant grade of tumors in clinical stage IA lung adenocarcinoma: a multicenter study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012;143(3):607-12. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Miyata Y, Furukawa T, Tsutani Y, Mima T, Misumi K, Yoshiya T, Ibuki Y, Okada M. Expression of HIF1 α and GLUT1 correlates with FDG uptake on PET and tumor aggressiveness in different histologic subtypes of lung adenocarcinomas. ESMO2012, Sep 28-Oct 2, 2012, Vienna, Austria

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genge/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 義浩 (MIYATA YOSHIHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：50397965

(2) 研究分担者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045

(3) 連携研究者

()

研究者番号：