

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791394

研究課題名(和文)メタボローム解析による乳癌サブタイプ別の代謝特性の解析と新規個別化治療戦略の確立

研究課題名(英文) Subtype-specific metabolic characteristics and tailor-made treatment strategy in breast cancer by metabolome analysis

研究代表者

松本 暁子 (Matsumoto, Akiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70573418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌はintrinsic subtypeごとに治療方針が異なるが、サブタイプ別に臨床検体および細胞株に生じる代謝特性の違いについて検討した。穿刺吸引組織診検体をCE-MSを用いて解析すると、ホルモン受容体陽性・HER2陰性のluminal typeとホルモン受容体陰性・HER2陰性のTriple negative typeでは代謝特性が大きく異なっていた。また免疫不全マウスへの乳癌細胞株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。今後は先端計測技術による代謝解析の構築により、乳癌のテーラーメイド治療が可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Currently treatments are decided based on subtypes in breast cancer, however, metabolic alterations of subtypes remain to be elucidated.

Here, we analyzed subtype-specific metabolic alterations by using clinical specimens and cell lines of breast cancer. The most different metabolic characteristics were observed between luminal and triple negative type when we analyzed aspiration biopsy specimens by CE-MS. We also prepared tumor tissue which was obtained from transplanting cell lines of human breast cancer into immunodeficient mouse. As a result, we revealed distinctive metabolic patterns according to subtypes when we use MALDI-IMS.

Our results provided novel insights into tailor-made treatment for breast cancer using metabolome analysis by the leading edge of measurement technology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌 メタボローム解析 MALDI-MS

1. 研究開始当初の背景

乳癌は均一な疾患ではなく、臨床的に多種多様な病態と転帰を認めるのが通常であり、詳細な遺伝子発現プロファイルによる乳癌の分類、いわゆる intrinsic subtype として Luminal A, B, HER2-enriched, Basal-like 等へのカテゴリー分類による乳癌の性質と予後の違いが報告されている。(Sørlie, PNAS 2003) 乳癌臨床においては、エストロゲン受容体 (ER)・プロゲステロン受容体 (PgR)・HER2 受容体、及び EGFR・CK5/6 の発現パターンにより擬似的に分類し (Nielsen, Clin Cancer Res 2004)、治療方針の決定や予後の予測に使用されている。

上記サブタイプ間の相違は、遺伝子発現パターンに起因するため、結果として酵素活性物質を含む蛋白発現パターンの違いを産み、さらに細胞内の活動、代謝経路や産物の相違となって細胞の性質を決定づけていると考えられる。すなわち、サブタイプごとに特徴的な代謝特性が存在する可能性が示唆され、我々はこれに着目して研究を行ってきた。

メタボロームは代謝産物の網羅的プロファイルである。我々は、CE-MS (Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry) による乳癌生検検体のメタボローム解析を通じた intrinsic subtype 別の代謝特性の相違の検証に着手した。

予備的検討の結果から、我々はまず Luminal type と Basal-like type の差異に着目した。スペルミン・スペルミジンは、オルニチン回路より精製され、従来より DNA 安定性に関わる物質であることが知られている。Luminal に比して Basal ではこれら物質の著明な低下が認められ、ゲノム安定性の低下が示唆される。これは BRCA1/2 変異や、PARP 阻害剤が triple negative 乳癌でより有効であることと合致する。このゲノムの不安定性は、細胞に対する酸化ストレス (oxidative stress) の増加を誘発する。これに対する鎧として、最も重要な細胞性抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) は Luminal に比して Basal で高く、GSH を還元状態に保つ NADPH も同時に高値を示した。すなわち、これらをより多く保持することで、酸化ストレスに対する強力な防護作用を保持していると考えられた。

遺伝子発現解析の所見に立脚した intrinsic subtype については、サブタイプ間におけるメタボロームの特徴的差異を明らかにした研究は未だ報告されていない。共同研究を行う慶應義塾大学医学部医化学教室には、CE-MS のみならず、LC-MS 等、メタボローム解析を行うにあたり、最高の機器が備えられている。また、MALDI-IMS に至っては解像度 100 μm の従来型に加え、世界に 3 台しか存在しない、解像度 5-10 μm の先端開発プロトタイプ機器が設置されており、これらの機器を用いて、乳癌臨床検体から得られるデータは未だかつて無く、極めて独創性が

高く、新規性に満ちた研究を展開し得ると考えられる。このデータを蓄積することで、各サブタイプ間の代謝特性の特徴を利用した、新しい乳癌の個別化治療戦略が数多く生み出されることが可能である。

これら背景と、予備的検討から得られた知見を基にして、以下に述べる目的を設定し、研究を遂行した。

2. 研究の目的

メタボロームは代謝産物の網羅的プロファイルであり、本研究の目的は、CE-MS (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry) による乳癌生検検体のメタボローム解析を通じた intrinsic subtype 別の代謝特性の相違の検証である。本研究課題で明らかにされるべき詳細は以下の通りである。

- (1) 細胞株を用いて同様の知見が得られるか否かの検討
乳癌細胞株のうち、Luminal A, B の細胞である MCF7・T47D、Basal-like である MDA-MB231・MDA-MB468 を *in vitro* 及び、免疫不全マウスへ異種移植を行った *in vivo* の環境でそれぞれ採取した。これらを用いてメタボローム解析を施行し、上記の臨床検体と同様の代謝産物生成パターンを示すか否かを検証する。
- (2) MALDI-IMS を用いて、代謝産物の相違が癌組織で生じているか否かを検証
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、これまで不可能であった、局在情報を保持した網羅的な質量分析及びメタボローム解析を施行することが可能である。乳癌臨床検体を用いてイメージングを行い、CE-MS で得られた物質の増減が、間質や正常組織では無く、癌細胞特異的に生じていることを視覚的に示すことを目指す。
- (3) GSH 産生量の減少が、Basal-like 乳癌の進展抑制を誘導するか否かの検証
GSH は簡便に測定することが可能であり、現在までに蓄積した約 300 例の乳癌凍結検体においてこれを測定し、各サブタイプ間の量的な差異を検証する。ゲノム不安定性によって生じる酸化ストレスを、GSH の生成によって防御しているという仮説を検証するため、細胞内 GSH レベルに影響を与える γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) の阻害剤 GGT₁ 及びアシピシンを、1) で使用する細胞株・異種移植モデルへ適用する。我々は各種細胞へ *in vivo* での腫瘍量・転移の有無を検知することが可能であり、Basal 乳癌に対

して GGT 阻害剤と抗癌剤の併用が効果的であるか否かを検証することで、トリプルネガティブ乳癌に対する新しい治療戦略の確立を目指す。

- (4) 臨床検体のメタボローム解析への適用数を増やし、サブタイプ別の代謝特性の差異を検証する
上記の前実験で得られた代謝産物に関する考察は、得られた知見のほんの一部である。乳癌臨床検体の数をさらに増やすことで、上記に例を見るような、各サブタイプ間の代謝特性の特徴を確定し、新しい治療戦略へ応用可能か否かを検討していく。

3. 研究の方法

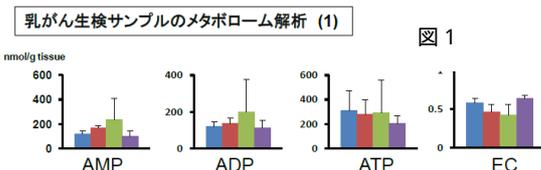
- (1) 乳癌生検検体の解析数を増やし、サブタイプ別の代謝特性の差異を検証する
実際の臨床検体を用いてメタボローム解析を行っている施設は極めて少ないが、その理由として、検体のクオリティコントロールが極めて難しい事が挙げられる。手術的に時間をかけて血管結紮を行い、切除された検体では代謝産物の生体内での正常な状態が失われてしまう。すなわち代謝産物が失活しないよう短時間（30 秒～1 分以内）で採取から凍結保存を行う必要があるが、Vacora®を用いた乳癌に対する穿刺吸引組織診では、充分量が採取可能であり、かつ即座に液体窒素で凍結されるため、メタボローム解析を行う検体として理想的である。我々は慶應義塾大学医学部の倫理審査を経て、十分なインフォームドコンセントの下に患者の同意を得た症例に対し、上記検体採取を施行した。メタボローム解析時には、Energy Charge を測定し、検体のクオリティを数値化することで、基準値以下の症例を除外する厳しいクライテリアを設定して解析を行った。
- (2) 各サブタイプに属する細胞株を用いた代謝特性が臨床検体と一致するか否かの検証
各サブタイプに属する乳癌細胞株を複数保有しており、これらを用いて、上記メタボローム解析のサンプルを作成し、臨床検体との整合性および相違点の検証を行った。培養細胞からのサンプル採取のみならず、GFP 改良遺伝子 Venus-Luciferase を各細胞へ導入後、

NOD/Scid/ null マウス (NOG マウス) の乳腺組織へ異種移植による腫瘍形成を行い、これをメタボローム解析のサンプルとして採取すると同時に、後述の顕微質量イメージングにおけるサンプルとしても使用を行った。

- (3) 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。すなわち、2 次元的な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。
このように、通常のメタボローム解析では、代謝産物の変化が癌部・間質・血管内皮等のどの部位で生じているかを確定することは不可能であったが、この手法を用いることで、代謝産物の変化の局在を同定可能である。当然のことながら MALDI-IMS 自体でも網羅的解析が実施可能であり、CE-MS 等の知見と比較することを行った。

4. 研究成果

手術による切除検体をサンプルとして用いる場合、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 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。



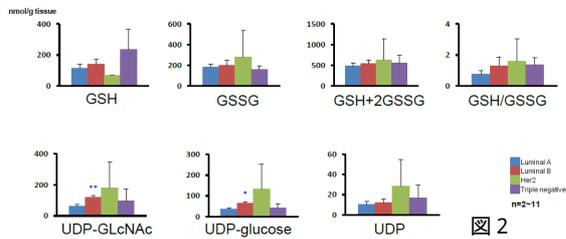


図 2

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。

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

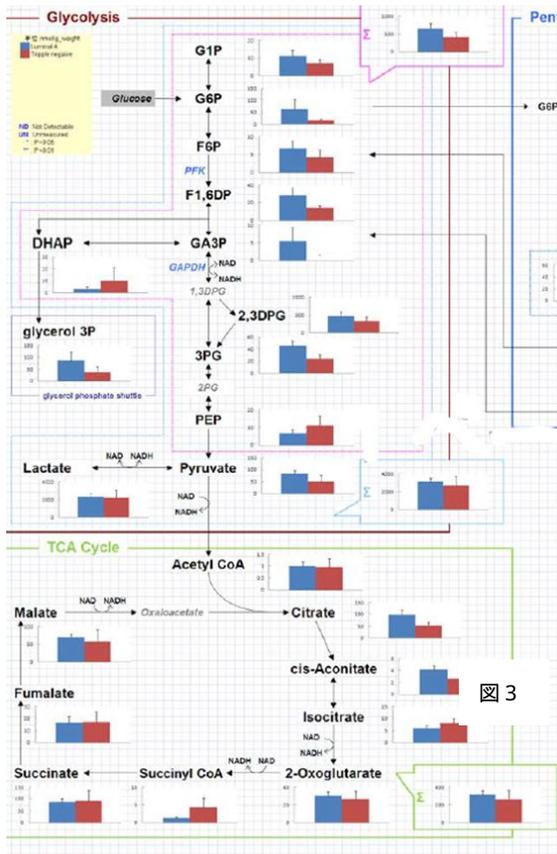


図 3

heterogeneity が存在するため、これらサブ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。

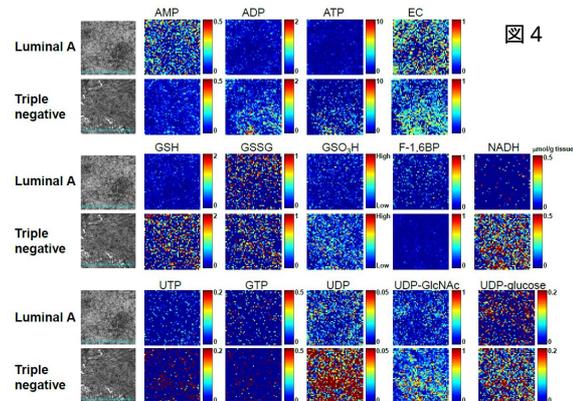
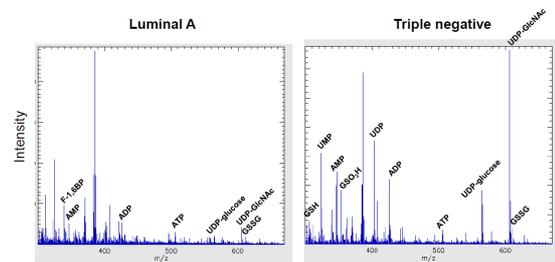


図 4

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松本 暁子 (Akiko Matsumoto)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70573418