

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791395

研究課題名(和文) 臨床検体を用いた顕微質量分析法による消化器癌特異的代謝機構の可視化と解析

研究課題名(英文) Imaging mass spectrometry using clinical specimen.

研究代表者

田中 真之(Tanaka, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30573414

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)：本研究はヒト肝細胞癌・胆管細胞癌の臨床検体組織に対して、新たに開発されたマトリックス支援レーザー脱離イオン法顕微質量分析イメージング(MALDI-IMS)を用いて代謝中間体の組織空間的プロフィールを検証することにより、悪性腫瘍に特異的な代謝産物の同定、バイオマーカーの検索、新規PET診断プローブ開発、新たな組織臨床病理検査への応用、新薬の開発を目指した。しかし、十分な検体の確保が困難であったため、現在肝癌患者より周術期に尿・血液検体を採取し、現在メタボローム解析を行っている。これにより、肝癌のバイオマーカー同定を目指している。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at a search of specific metabolic products of malignant tumor by using imaging mass spectrometry for clinical specimen of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma. But It was difficult to secure an enough sample, we now collect perioperative urine and blood sample of hepatocellular carcinoma and we are doing metabolomics of these sample. We now aim at new biomarker of hepatocellular carcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：顕微質量分析イメージング メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

がん特異的代謝機構(リプログラミング)の存在について、1920年代にはじめて Warburg より報告がなされた。Warburg 効果とは、がん細胞における好氣的解糖系の亢進と乳酸産生の増加を示す(Warburg et al., 1924)。その後、がん細胞における糖の取りこみ増加を利用した FDG-PET が開発され、臨床上極めて有用な検査として知られている(Mankoff et al., 2007.)。

がんによる代謝のリプログラミングは、がん発生に関わる遺伝子・タンパク発現異常の結果あるいは原因としてもたらされる(Guido et al., Cancer Cell 13:472-482, 2008.)。悪性腫瘍における代謝機構の変化を解明することで、新たなバイオマーカーの検索、組織臨床検査への応用、新薬の開発といった臨床的意義を見出すことができる。近年の網羅的解析技術によりがんの分子代謝特性に関する研究は大きな展開をむかえているが、その多くはがん細胞レベルの実験からの知見である。ごく最近、臨床検体を用いたがん病変部と、非がん部組織とのメタボローム解析が報告され、生体内におけるがん代謝特性を網羅的に把握する試みが始まっている(Hirayama et al., Cancer Res 69:4918-4925, 2009.)。これらは、組織・細胞の溶解物を対象とした質量分析の解析によりもたらされており、腫瘍代謝産物の局在を顕微レベルで検証することができないため、heterogeneity に富む腫瘍組織における代謝の本態を解明することは困難である。近年レーザーによる顕微切断で組織内局所のみ取り出して遺伝子・タンパク発現やゲノム異常の解析が行われているが、顕微切断操作の時間経過で大きく代謝変動があると考えられ、局所的代謝中間体のプロファイリングには不適切である。

質量分析イメージングは、検体を溶解物化することなく空間情報を保持したまま多数の分子をプロファイリングすることで画像として把握する方法である。免疫染色や in situ hybridization のような特定分子の分布情報を獲得するのではなく、タンパク・ペプチド・核酸に加えて、従来の抗体・プローブによる検出不能な脂質・低分子性代謝物の検出も可能である。我々は、顕微質量分析イメージングを用いて、糖代謝、TCA 回路、アミノ酸代謝、ヌクレオチド代謝、脂質代謝等の低分子代謝中間体に焦点を当てて研究を行っている。胆管細胞癌臨床検体の検討によりがん部、非がん部のコレステロールや胆汁酸の発現が異なっていることが示唆される実験結果を得た(図1)。このことは、肝腫瘍の悪性度、胆管細胞への分化度を代謝の観点から臨床応用できる可能性を十分に示唆す

る。また、免疫不全マウスを宿主とするヒト大腸癌肝転移モデルにおける担癌肝臓切片の検討により、一部の解糖中間体、ヌクレオチド、糖ヌクレオチド、グルタチオンなどの検出に成功している(図2)。このように、顕微質量分析イメージングを用いることにより、腫瘍組織およびその隣接組織における顕微レベルでの代謝中間体の発現分布状況を組織切片上の位置情報として検出できる。

図1 胆管細胞癌の質量イメージング解析結果

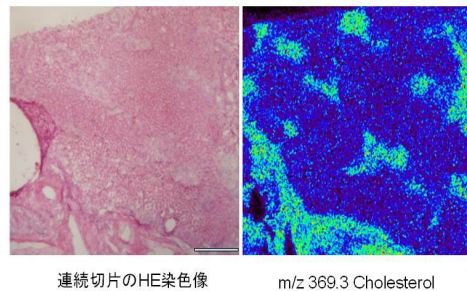
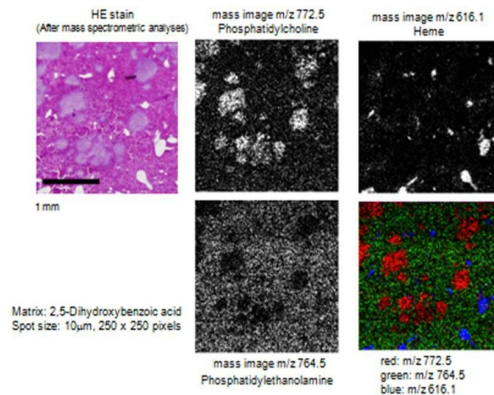


図2: 担癌肝臓切片における顕微質量分析



2. 研究の目的

がん細胞の生存において、エネルギー代謝機構の変化は極めて重要である。近年、がんは、その増殖、浸潤、転移といった様々な局面で特異的代謝を行い、その特性の獲得と維持を行うことが、実験的検討により解明されつつある。本研究は、ヒト肝細胞癌・胆管細胞癌の臨床検体組織に対して、新たに開発されたマトリックス支援レーザー脱離イオン法顕微質量分析イメージング(MALDI-IMS)を用いて代謝中間体の組織空間的プロファイルを検証することにより、悪性腫瘍に特異

的な代謝産物を同定し、バイオマーカーの検索、新規 PET 診断プローブ開発、新たな組織臨床病理検査への応用、新薬の開発といった臨床的意義の探求を目指す。

3. 研究の方法

顕微質量分析イメージングは、全ての代謝中間体が一度に検出できるわけではなく、組織切片の前処理や、マトリックスの種類、質量分析のモードに左右される。免疫不全マウスを宿主とするヒト大腸癌肝転移モデル由来の腫瘍組織切片で得られた測定条件に関する経験を利用し、ヒト大腸癌肝転移臨床検体を用いて凍結切片を作成、顕微質量分析イメージングを実施して、主に、低分子化合物に焦点をしばった代謝中間体分布プロファイリングを検証する。これに並行して同切片の組織学的悪性度の検討、免疫染色、遺伝子・タンパク発現解析、CE-MS（溶解物を用いた質量分析）によるメタボローム解析の結果と照合しその分子生物学的・臨床的意義との関連づけを行う。これらの成果をもとに、がん細胞の代謝リプログラミングに基づくがんバイオマーカーの検索、新規 PET プローブ物質の探索、病理組織における診断性を向上させる手法の模索、新たな治療戦略開発の要となる分子代謝機構の同定を通じて臨床応用への基盤作りをめざす。

4. 研究成果

当教室では年間 100 例近くの肝切除を行っている。しかし感染制御の面を考慮すると、肝炎ウイルスを etiology とした肝癌の検体を扱うことは困難であり、また術前に患者本人から同意を得た上で臨床検体を採取しているため、検体の数は非常に限られたものとなってしまった。さらに、検体採取にあたっては、癌部と非癌部の境界領域から検体を採取する予定であったが、十分な検体 volume が確保できないこともあった。そこで 2014 年度からは臨床試験「肝切除の周術期栄養介入の有用性と肝再生に関する研究」(承認番号: 20130452)を開始し、肝癌周術期の血液・尿の検体を採取している。現在これらの血液・尿検体に対するメタボローム解析を行っており、これにより周術期の各種パラメーターの変化及び肝癌のバイオマーカー同定を目指している。

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 4 件)

- (1) 高木知聡,阿部雄太,板野理,篠田昌宏,北郷実,八木洋,日比泰造,門田由恵,香月優亮,田中真之,岸田憲弘,猪股研太,石井正嗣,雨宮隆介,藤田優裕,皆川卓也,北川雄光.多発肝癌に対して外科的切除が有用である因子の検討.第 50 回日本肝癌研究会,国立京都国際会館,京都府京都市, 2014.6.5
- (2) 藤田優裕,日比泰造,板野理,香月優亮,田中真之,門田由恵,八木洋,阿部雄太,篠田昌宏,北郷実,北川雄光.肝内胆管癌における系統的リンパ節郭清の意義.第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会,和歌山県民文化会館,ホテルアパローム紀の国,和歌山県和歌山市, 2014.6.12
- (3) 田中真之,板野理,田邊稔,篠田昌宏,北郷実,八木洋,阿部雄太,日比泰造,大平正典,藤村知智,門田由恵,永滋教,香月優亮,筒井りな,石井正嗣,岸田憲弘,猪股研太,北川雄光.当科における肝外胆管癌切除例の臨床病理学的因子からみた Borderline resectability の定義と治療方針.第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会,ホテル東日本宇都宮・栃木県総合文化センター 栃木県宇都宮市, 2013.06.12
- (4) 岸田憲弘,板野理,辻川華子,真杉洋平,田邊稔,篠田昌宏,北郷実,日比泰造,阿部雄太,八木洋,大平正典,藤村知智,門田由恵,田中真之,香月優亮,永滋教,筒井りな,石井正嗣,猪股研太,坂元享宇,北川雄光.当院における Nonalcoholic Steatohepatitis(NASH)肝癌の検討.第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会,ホテル東日本宇都宮・栃木県総合文化センター 栃木県宇都宮市, 2013.06.12

[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：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真之 (Tanaka Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 30573414