

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461998

研究課題名(和文)メタボロミクスを活用した食道癌特異的代謝機構の解明と新しいバイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Metabolome analysis of esophageal cancer tissues using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry to search for new biomarker

研究代表者

小澤 壯治(OZAWA, Soji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10169287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌35例の切除標本についてCE-TOFMSを用いてメタボローム測定を行った。腫瘍組織と非腫瘍組織で代謝プロファイルの違いが認められた。Gln以外のアミノ酸レベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて高く、ATP、CTP、GTP、UTPの濃度は腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて低く、GMP濃度はより高かった。Lactateレベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて高く、citrateレベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて低かった。Malic acid とcitric acidはpT3-4腫瘍ではpT1-2腫瘍よりも濃度が低かった。食道癌において腫瘍増殖進展に関する新しい代謝産物のセットを同定できた。

研究成果の概要(英文)：We conducted metabolome analysis of paired tumor(Ts) and non-tumor esophageal tissues (NTs) using CE-TOFMS). Ts and surrounding NTs were surgically excised pair-wise from 35 esophageal cancer patients. Following tissue homogenization and metabolite extraction, a total of 110 compounds were absolutely quantified by CE-TOFMS. There were clear metabolomic differences between Ts and NTs. Lactate and citrate levels in Ts were higher and lower, respectively, than those in NTs, which corroborated the Warburg effect in Ts. Concentrations of most amino acids except glutamine were higher in Ts than in NTs, presumably due to hyperactive glutaminolysis in Ts. Concentrations of malic acid and citric acid were lower in pT3-4 than in pT1-2, suggesting down-regulated TCA cycle activity in pT3-4. We showed significantly different metabolomic characteristics between tumor and non-tumor tissues and identified a novel set of metabolites that strongly correlated with the degree of tumor progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：バイオマーカー メタボローム 食道癌

1. 研究開始当初の背景

1) 食道癌の悪性度診断

最新の全国がん罹患モニタリング集計によれば、食道癌の5年相対生存率は消化器癌の中で肝胆膵癌に次いで男女とも2番目に低率(男性32.3%、女性41.3%)であり、食道癌は治療に難渋する悪性度の高い疾患である。これまでわれわれは、食道癌の悪性度を評価するために分子生物学的手法などを用いて、食道癌の臓器転移には cyclinD1 遺伝子異常が関与し、リンパ節転移には EGFR 遺伝子異常、p16 遺伝子異常、VEGF 発現が関与することを報告してきた。さらに免疫療法で注目されている新規腫瘍抗原 (IMP3, LY6K, CDCA1) 発現が予後因子であることを報告した。また、癌細胞の浸潤形態により悪性度が増すことも明らかにした。

このように癌細胞の遺伝子や分子の異常や浸潤形態から悪性度研究を進めてきたが、生体には、DNA、RNA、タンパクなどの高分子の他にも、比較的分子量が低くアミノ酸、有機酸、脂肪酸などの物質も多く含まれ、これら低分子の物質を解析することも癌細胞の働きすなわち悪性度を包括的に理解するためには必要不可欠となる。

(2) 癌細胞のエネルギー代謝

正常細胞はグルコースから酸化リン酸化によってエネルギー(ATP)を得ているのに対し、癌細胞は酸化リン酸化ではなく好氣的解糖によってエネルギーを得ている。酸化リン酸化と比較してグルコースから ATP を産出する能力が著しく低下するにも関わらず、癌細胞は好氣的解糖を行う現象はワールブルグ効果として報告された。癌細胞では解糖系酵素群が高発現したり転写因子が解糖系の亢進に関与していることが明らかになり、胃癌や大腸癌の腫瘍部と非腫瘍部を比較した検討では、癌細胞の解糖系代謝の亢進やオートファジーによるアミノ酸類の供給の可能性が報告された。

(3) メタボローム解析

生体内に存在する全代謝産物を網羅的に解析することを「メタボローム解析」という。ワールブルグ効果に関連する解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝に関連する代謝中間物質や代謝産物はイオン性低分子物質であるため、それらの解析には高感度高分離能であるキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析器 (capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, CE-TOFMS) が適していると考えられている。食道癌患者の手術材料などを用いた包括的なメタボローム解析の報告はない。

2. 研究の目的

悪性度の新しい評価方法の確立を目的として癌細胞の代謝に焦点を当て、低分子代謝産物を測定するメタボローム解析技術を用い

て、食道癌組織に特徴的な代謝産物や代謝経路、化学療法による代謝変化などを探索し、悪性度との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 食道癌患者の手術時摘出標本から腫瘍組織と非腫瘍組織を採取し、-80 で凍結保存する。

(2) 組織を前処理し、CE-TOFMS を用いてメタボローム測定を行う。

(3) 代謝産物について主成分分析、階層的クラスタリング解析を行い、食道癌に特徴的な代謝産物や代謝経路を探索し、悪性度(T, N, M, 分化度, ly, v, INF, 予後など)との関連性を明らかにする。

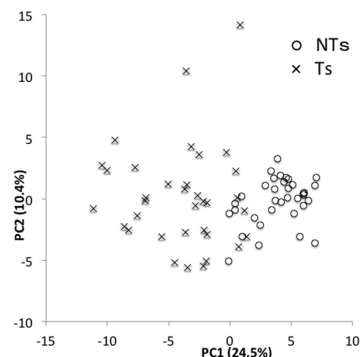
(4) 術前化学療法の有無別に主成分分析、階層的クラスタリング解析も追加し、化学療法による代謝変化を探索し、悪性度との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 食道癌患者計 35 例の手術時摘出標本から採取した腫瘍組織と非腫瘍組織を-80 で凍結保存し、組織を前処理し、CE-TOFMS を用いてメタボローム測定を行い、詳細な検討を加えた。

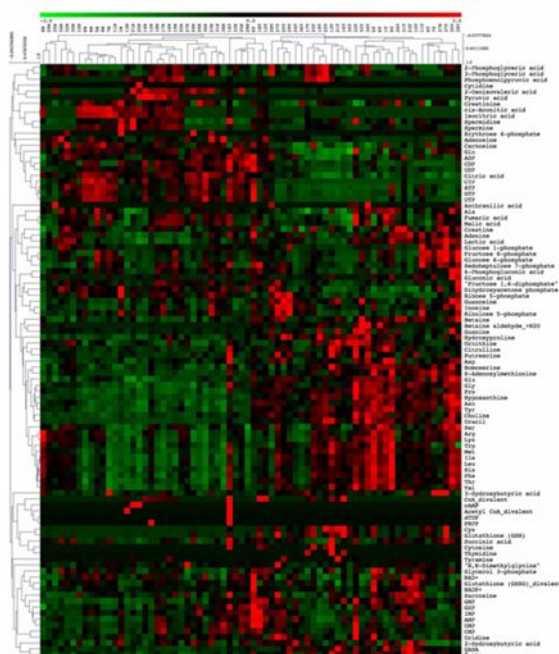
(2) 患者背景は全例が扁平上皮癌であり、高分化 13 例、中分化 18 例、低分化 4 例、術前補助化学療法(CDDP + 5-FU)施行 17 例、非施行 18 例、T1:1 例、T2:7 例、T3:23 例、T4:4 例、N0:8 例、N1:5 例、N2:16 例、N3:5 例、N4:1 例、StageI:0 例、StageII:8 例、StageIII:22 例、StageIVa:5 例。235 種類の代謝産物が解析対象となり、詳細な検討の結果、絶対定量が可能な 110 種類の代謝産物を抽出した。

(3) Principle component analysis (PCA) と hierarchical clustering analysis (HCA) では腫瘍組織と非腫瘍組織で明らかに代謝プロファイルの違いが認められた(図1)。



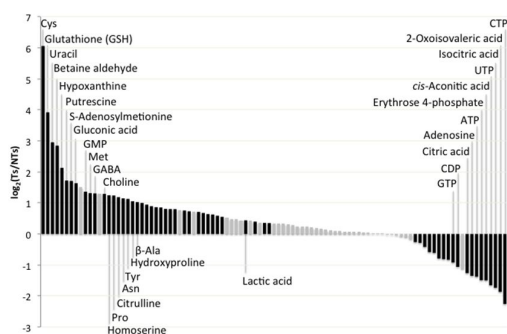
(図1)

さらに腫瘍組織では heterogenous な代謝プロフィールを示し、約 2/3 の代謝産物は腫瘍組織の方が非腫瘍組織よりも高値であった (図 2)



(図 2)

99 種類の代謝産物のうち、58 種類の代謝産物で腫瘍組織と非腫瘍組織に濃度に差が認められた (図 3)

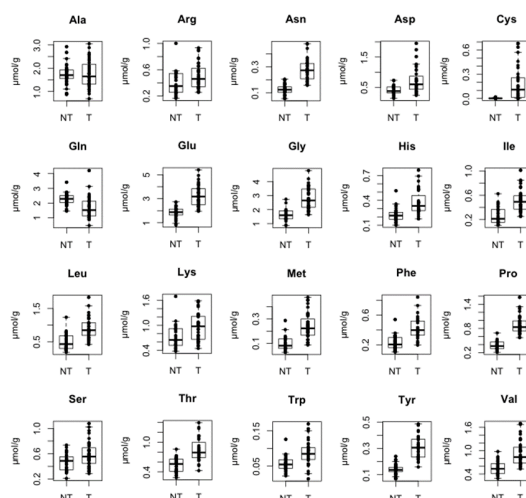


(図 3)

Gln 以外のアミノ酸レベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて高く、これは Glutaminolysis と autophagic protein degradation が腫瘍組織で亢進しているためと考えられた (図 4)

ATP, CTP, GTP, UTP の濃度は腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて低く、一方 GMP 濃度はより高かった。Lactate レベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて高く (P=0.001)、一方 citrate レベルは腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて低かった (P<0.001)。これらは腫瘍組

織内では、低酸素な微小環境が存在し、Warburg effect と考えられた。



(図 4)

(4) pT3-4 腫瘍では pT1-2 腫瘍よりも濃度が高い代謝産物が 7 種類、低い代謝産物が 21 種類認められた。Malic acid (P=0.015) と citric acid (P=0.008) は pT3-4 腫瘍では pT1-2 腫瘍よりも濃度が低く、pT3-4 腫瘍における TCA cycle の down regulation を意味していると考えられた。

(5) 本研究により、食道癌において腫瘍組織と非腫瘍組織では代謝プロフィールが異なり、腫瘍増殖進展に関する新しい代謝産物のセットを同定できた。癌の代謝産物を詳細に検討することは、適切な治療戦略、すなわち個別化治療の選択に貢献するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

徳永正則、小澤壯治、紙健次郎、宮地勇人、蒲池健一、林 勉、数野暁人、伊東英輔、大橋由明、藤森玉輝、星 綾、楠原正俊、寺島雅典。食道癌組織における CE-TOFMS を用いたメタボローム解析。第 114 回日本外科学会定期学術集会。2014 年 4 月 4 日。国立京都国際会館 (京都府京都市)

徳永正則、小澤壯治、宮地勇人、小熊潤也、二宮大和、安田聖栄、大橋由明、藤森玉輝、星 綾、楠原正俊、寺島雅典。食道癌組織を用いたメタボローム解析。第 73 回日本癌学会学術総会。2014 年 9 月 26 日。パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

藤井旬子、ダムディスレン・アナラ、小澤壯治、宮地勇人食道がんにおける末梢血液中のがん特異的遺伝子の検出について。第 61

回日本臨床検査医学会学術集会．2014年11月23日．福岡国際会議場（福岡県福岡市）
徳永正則、小澤壯治、紙健次郎、宮地勇人、數野暁人、山崎康、小熊潤也、二宮大和、大橋由明、藤森玉輝、星綾、楠原正俊、寺島雅典．食道癌の進行が代謝プロファイルに与える影響-CE-TOFMSを用いたメタボローム解析の結果から-．第115回日本外科学会定期学術集会．2015年4月16日．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小澤 壯治 (OZAWA, Soji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10169287

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

宮地 勇人 (MIYACHI, Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196

(4)研究協力者

なし