

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713042

研究課題名(和文)食道癌の新規バイオマーカー開発を目指したがん代謝のエピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenome analysis of cancer metabolism for the development of new biomarkers in esophageal cancer.

研究代表者

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：20599708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、食道癌のがん代謝に関するepigenetic biomarker について探索することである。細胞外フラックスアナライザーを用いて細胞内のがん代謝プロファイルを検証したところ、LSD1は解糖系の指標であるECAR、ミトコンドリア呼吸の指標であるOCRの変化に寄与することが分かった(Int J Cancer 2016)。次に、食道癌においてCNC転写因子ファミリーNrf2が代謝リプログラミングを制御し、がんの増殖に関与していることを示した。がんに特徴的な代謝メカニズムを明らかにすることは新たながん治療のターゲットの発見に繋がる可能性がある (Cancer Lett 2016)。

研究成果の概要(英文)：First, for revealing the role of LSD1 in cancer metabolism, we evaluated two major energy pathways by measuring the extracellular acidification rate (ECAR) and the oxygen consumption rate (OCR) with an extracellular flux analyzer. LSD1 knockdown significantly suppressed the invasive activity and glucose uptake of cancerous cells, reduced their ECAR and increased their OCR and OCR/ECAR (Int J Cancer 2016). Second, we focused on Nrf2 which is a master transcription regulator of stress responses. We found that metabolic reprogramming to glutathione metabolism, and ROS detoxification by activation of Nrf2, enhanced cancer progression and led to poor clinical outcome in esophageal cancer patients. The identification of new prognostic or predictive markers for esophageal cancer could improve the use of risk-adapted treatment strategies and help to stratify patients for drugs targeting these tumor characteristics in future clinical trials (Cancer Lett 2016).

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：がん代謝 エピジェネティクス 食道癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

“エピジェネティクス”は、遺伝子発現の調節において非常に重要な役割を担っている。癌におけるエピジェネティックな異常には、DNAメチル化の異常、ヒストン修飾の異常、ゲノムインプリンティングの異常などがあげられる。癌におけるDNAメチル化異常の特徴として、ゲノム全体の低メチル化とある特定の遺伝子プロモーターの CpG island における部分的な高メチル化がある。重要なのは、メチル化異常を含むエピジェネティックな異常は可逆的な反応であり、癌治療や癌化学予防の target として有望であるということである。

がん細胞は酸素の有無に関係なくエネルギー産生に解糖系を利用し、この特徴的な代謝は好氣的解糖あるいは Warburg 効果とよばれている。我々は、食道癌におけるがん代謝のメカニズムを PPAR γ 、GLUT などを中心に網羅的に解析してきた。近年では、がん代謝とエピゲノムとの関連が注目を集めている。がん代謝異常には様々な遺伝子異常が関わっているが、このうち最も頻度が高く、研究が進んでいるのは IDH 遺伝子である。IDH 遺伝子の変異によって産生される 2-HG は oncometabolite (悪性代謝物)とよばれ、ジオキシゲナーゼなどの酵素群を阻害することにより発癌・浸潤転移などに影響を与える。興味深いのは、ジオキシゲナーゼ群には、TET ファミリー、JmJc 領域を有するヒストン修飾酵素群、プロリン水酸化酵素群からなる PHD ファミリーといったエピゲノムに関わる酵素が多く含まれることである。食道癌における TET 発現レベルの検討を行ったところ、癌部において正常部よりも発現レベルが低下していることという結果が得られた。これらの酵素が、がん代謝とエピゲノムを繋ぐ有望なターゲットであると考えている。

手術、化学療法、放射線療法、化学放射線療法などを含む集学的治療の発達にも関わらず、食道扁平上皮癌の予後は未だに不良である。そのため、基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法に代表される革新的な治療法の開発が模索されている。メチル化異常を含む“エピジェネティックな異常”は可逆的な反応であり、癌治療のターゲットとして非常に有望である。さらに、予後と関連するエピジェネティックな変化を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。また、FDG-PET は食道癌の病期診断・治療効果判定などにおいて汎用されており、“がん代謝”はこの点においても食道癌と大きく関わっている。しかしながら、食道癌のがん代謝とエピゲノムに関して網羅的に解析した研究は皆無である。

2. 研究の目的

“食道癌データバンク”及び“Pyrosequencing technology”を用いて食道癌のがん代謝に關与する epigenomic biomarker について網羅的に探索することが本研究の目的である。がんに特徴的な代謝メカニズムを明らかにすることは、新たながん治療のターゲットの発見に繋がる可能性がある。近年では、がん代謝における TET ファミリー、PHD ファミリーなどエピゲノム関連酵素の重要性が注目を集めているが、食道癌のがん代謝とエピゲノムに関して網羅的に解析した研究は皆無である。癌細胞におけるエピジェネティックな変化は癌治療・癌化学予防の target として注目を集めているので、この研究による成果は translational research として臨床に直結する意義深いものになると考えられる。

3. 研究の方法

我々の施設は、年間 60 例以上の食道癌手術を行っており、臨床検体は豊富である。そして、それらの切除組織、臨床データは系統的に管理されている。現時点で我々のデータベースにおいて食道癌の PET 検査の結果が得られる症例は 200 例以上ある。

食道癌におけるがん代謝に関わるマーカーとして、LSD1 と Nrf2 に着目して研究を開始した。

4. 研究成果

■ Lysine specific demethylase1(LSD1)

● 背景・目的

LSD1 は最初に発見されたヒストン脱メチル化酵素であり、フラビン依存性にヒストン H3 の 4 番目リジン残基の mono/di-メチル化体を脱メチル化する (図 1)。

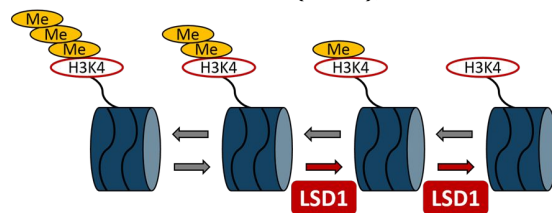


図 1. LSD1 の機能

LSD1 は、多くの癌腫で細胞増殖・浸潤及び上皮間葉転換に關与する可能性がある。また、LSD1 が脂肪細胞においてエネルギー消費遺伝子の発現を制御することも報告され、がん代謝への關与も示唆される。がん代謝において『Warburg effect』は重要な代謝シフトであり、解糖系亢進及びミトコンドリア呼吸抑制が特徴である。癌細胞においては、有酸素環境下においても『Warburg effect』を示す事が重要である。本研究の目的は、食道癌における LSD1 発現意義をがん代謝の観点から明らかにすることである。

● 方法

2005年～2012年の間、熊本大学消化器外科にて切除術を行った食道癌113例（前治療なし）を対象とし、食道癌癌部のLSD1発現レベルを免疫染色（**図2**）にて評価し、臨床病理学的因子との検討を行った。

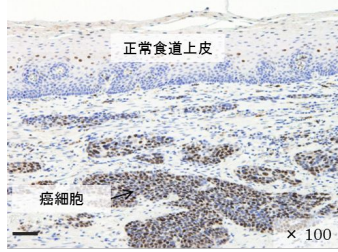


図2. LSD1の免疫染色

食道癌細胞株

を用いて、In vitro でLSD1の機能解析（細胞増殖能、細胞浸潤能、糖取り込み能）を評価した。また、細胞外フラックスアナライザーを用いて細胞外酸化速度（ECAR、解糖系の指標）、酸素消費量（OCR、ミトコンドリア呼吸の指標）を測定した。

● 結果

食道癌113例を対象に食道癌癌部のLSD1発現レベルを免疫染色にて評価、2群に分類した（高発現群60例、低発現群53例）。臨床病理学的因子との関連を解析した結果、LSD1高発現は、深達度、脈管侵襲、予後不良（全生存、無病生存）FDG-PET SUV値と有意に相関した（**図3**）。

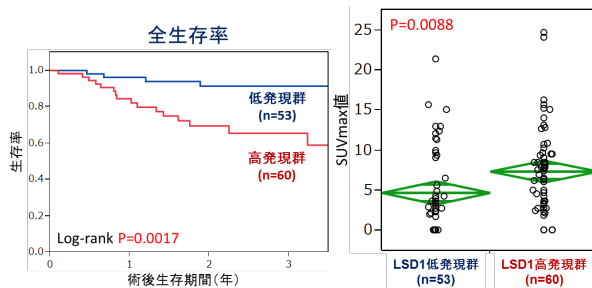


図3. LSD1と予後・SUVmax

In vitro では、siLSD1により細胞増殖能に変化は認めなかったものの、細胞浸潤能、糖取り込み能はsiLSD1によって有意に抑制された（**図4**）。

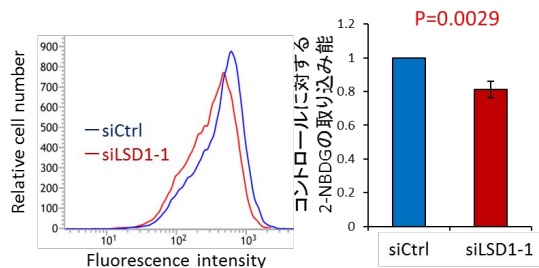


図4. LSD1と予後・SUVmax

細胞外フラックスアナライザーによる解析の結果、siLSD1によりECARが有意に低下し、OCRが有意に増加した。ミトコンドリア代謝への依存度を示すOCR/ECARも有意に増加した（**図5**）。

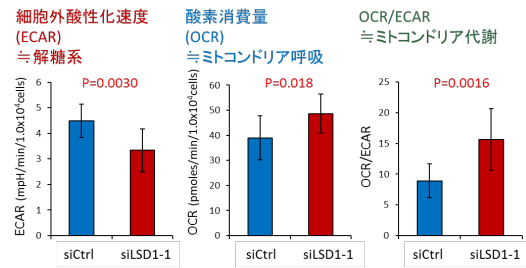


図5. 細胞外フラックスアナライザーによる解析結果

解糖系関連遺伝子であるGLUT1、HK2、LDHAはsiLSD1により有意に抑制され（**図6**）、ChIPによりLSD1がそれぞれのプロモーターに有意に結合することが示された（**図7**）。

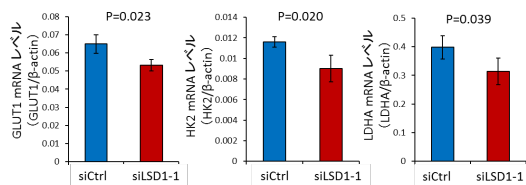


図6. LSD1と解糖系酵素（qPCR）

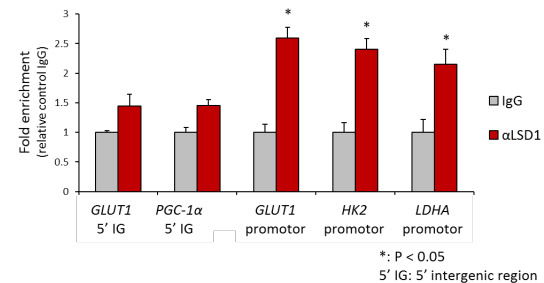


図7. LSD1と解糖系酵素（ChIP）

● 考察

LSD1が癌浸潤能亢進に関わる機序として以下が考えられる。E-cadherinのプロモーター領域においてH3K4me2のレベルを直接減少させる（Nat cell Biol 2000, Oncogene 2010, Dig Dis Sci 2013）。Snail/Slug転写抑制因子を阻害する（Oncogene 2010, Cancer Res 2013）。Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)のプロモーター領域に結合し、VEGFAを制御する（Mol Oncol 2013）。

一方、LSD1が解糖系関連の遺伝子発現亢進に関わる機序として、以下の可能性がある。

LSD1がGLUT1、HK2のプロモーター領域に結合する（Cancer Res 2015）。LSD1がHIF-1関連のトランスクリプトームをプロテアソーム分解から回避する事で、解糖系酵素の維持・亢進に関与する（Cancer Lett 2014, Cancer Res 2015）。

● 結論

食道癌において、LSD1は細胞浸潤能亢進、および代謝シフト（解糖系亢進・ミトコンド

リア呼吸抑制)を起こすことで癌悪性度、予後不良に寄与する可能性がある。

● 今後の展望

現在、LSD1は癌の治療標的として多くの注目を集めており、その理由として幾つか挙げられる。一つ目は、LSD1が非癌部に比べて癌部で発現が強いことである。本研究のみならず、多くの報告で癌部におけるLSD1の発現上昇が明らかになっている。従って、LSD1を治療標的とすることで、より癌特異的に治療を行うことが可能となり、しかも多くの癌種に応用できることが重要である。二つ目は、LSD1は幾つかの癌種で発癌との関与している可能性があることである。Hayamiらの報告によると、LSD1高発現がクロマチン修飾を介して発癌へとつながる可能性を示唆している。さらにHuangらは、LSD1がWnt/cateninシグナル抑制作用のあるDickkopf-1を抑制することでWnt/cateninシグナルを安定化させ、大腸癌の発癌に関与することを報告した。また、肝細胞癌の多能性癌幹細胞に関しては、癌幹細胞の治療標的としてLSD1が有用である可能性が報告されている。以上のことから、LSD1は癌進展のみならず、幾つかの機序を介して発癌にも関与している可能性がある。LSD1は、癌治療そして癌予防の標的として有望であり、我々はその開発に向けて今後も研究を推進していく。

■ NRF2 (NF-E2-related factor 2)

転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2)は生体の酸化ストレス防御機構において中心的役割を果たしているが、様々ながんにおいてNrf2が恒常的に活性化し、予後不良因子となることが明らかになっている。恒常的に活性化したNrf2はグルタミン代謝やペントースリン酸経路を活性化し、がん細胞に有利な代謝環境を実現し、がんの増殖・進展に貢献している。しかし食道癌におけるNrf2の機能的役割は未だ明らかになっていない。

10種の食道癌細胞株を用いてin vitro実験(Growth assay, Apoptosis assay, ROS detection assay)を行なった。質量分析器を用いて、食道癌細胞株TE-11と食道癌切除サンプルのmetabolite測定を行った。さらに201例の食道癌切除サンプルを用いて免疫組織染色を行い、臨床病理学的予後との相関を解析した。

食道癌細胞株におけるNrf2発現量をreal time PCR法とWestern Blot法にて確認した(図8)。

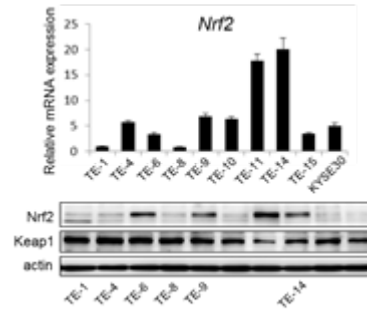


図8

高発現株のNrf2 knockdownにて増殖能が著明に低下することをGrowth assayで確認した(図9)。

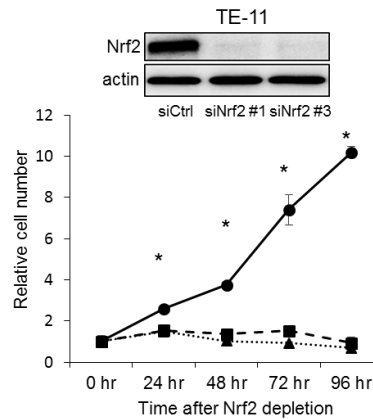


図9

さらに、フローサイトメトリーにてG0/G1 Cell cycle arrest、アポトーシスの増加を認めた(図10)。

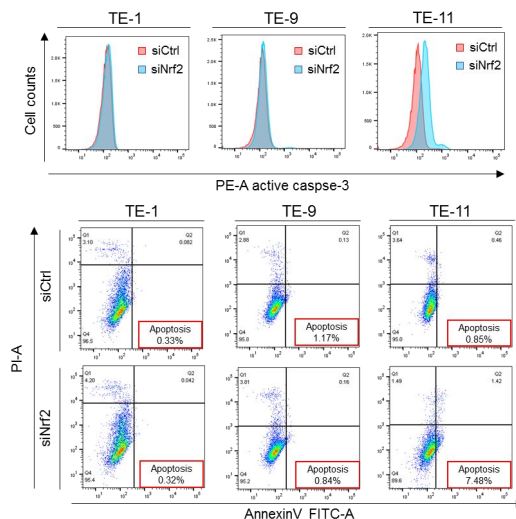


図10

またNrf2 knockdownにてROS活性が上がり、その結果p38MAPKのリン酸化を介してCyclinD1を抑制することを確認した(図11)。

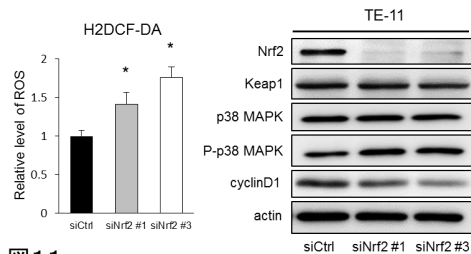


図 11

食道癌細胞株を用いた質量分析器によるメタボローム解析の結果、Nrf2 はグルタチオン代謝を著名に誘導していることが分かり(図 1 2)、食道癌切除サンプル 20 例においても、Nrf2 高発現症例では有意にグルタチオン含有量が多かった (P=0.009)。

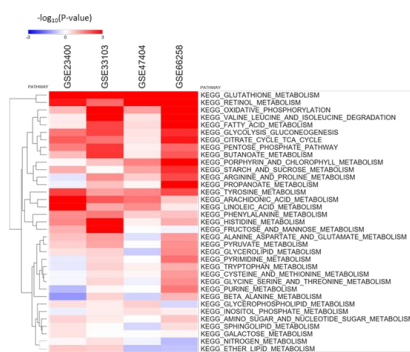


図 12

最後に食道癌切除サンプルの免疫組織染色では、非癌部に比べ癌部で Nrf2 は高発現であり (P<0.0001) (図 13)、癌部の高発現群が 91 例、低発現群が 110 例であった。

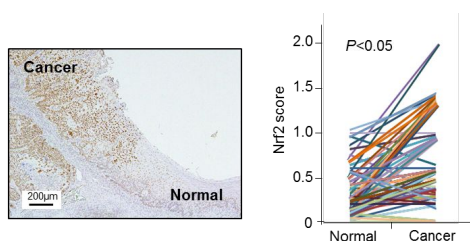


図 13

病理組織学的因子では Nrf2 発現量は深達度(P=0.04)、リンパ節転移陽性率(P=0.002)、Stage(P=0.001)と相関を認め、無再発生存率(HR=2.9, P=0.0004)、全生存率(HR=2.6, P<0.0001)と予後との相関も認めた(図 14)。

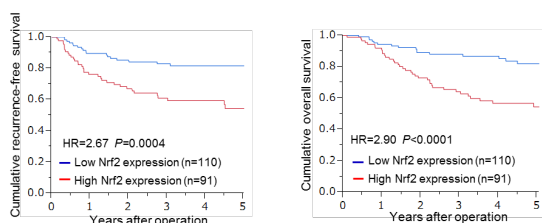


図 14

食道癌において Nrf2 がグルタチオン代謝への代謝リプログラミングを促進し、ROS を制御することでがんの増殖に関与しており、また臨床サンプルを用いた免疫染色においても Nrf2 高発現は予後不良因子となることが明らかになった。今後 Nrf2 を標的とした治療戦略の確立に向けさらに詳細な検討を行いたい。

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 4 件) 全て査読有

- 1) Baba Y, Ishimoto T, Kurashige J, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* 2016 1;375:360-6 [IF, 5.992] DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.009.
- 2) Kosumi K, Baba Y, Sakamoto A, Ishimoto T, Harada K, Nakamura K, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Hino S, Nakao M, Baba H*. Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. *Int J Cancer.* 2016 15;138:428-39. [IF, 5.085] DOI: 10.1002/ijc.29714.
- 3) Baba Y, Yoshida N, Kinoshita K, Iwatsuki M, Yamashita YI, Chikamoto A, Watanabe M, Baba H*. Clinical and Prognostic Features of Patients With Esophageal Cancer and Multiple Primary Cancers: A Retrospective Single-institution Study. *Ann Surg.* 2017 in press [IF, 8.569] DOI : 10.1097/SLA.0000000000002118.
- 4) Baba Y, Yoshida N, Shigaki H, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Watanabe M, Baba H*. Prognostic impact of postoperative complications in 502 patients with surgically-resected esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective single institution study. *Ann Surg* 2016 Aug;264(2):305-11 [IF, 8.569; citation, 3] DOI : 10.1097/SLA.0000000000001510.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) AACR Annual Meeting 2017 (2017 年 4 月 4 日 ワシントン・米国)

Genetic and Epigenetic Characteristics of Esophageal Cancer Tissues with Microbiome *Fusobacterium Nucleatum*

Yoshifumi Baba, Kensuke Yamamura, Shigeki Nakagawa, Kosuke Mima, Kenichi Nakamura, Hiroshi Sawayama, Koichi Kinoshita, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yasuo Sakamoto, Yoichi Yamashita, Naoya Yoshida, Hideo Baba

2) 2016 年 JDDW (2016 年 11 月 5 日 神戸コンベンションセンター・兵庫県神戸市)

ワークショップ 20 消化器癌におけるバイオマーカーの開発と応用

“食道癌における microbiome (*Fusobacterium*) のバイオマーカーとしての有用性”

馬場祥史、原田和人、小澄敬祐、徳永竜馬、志垣博信、蔵重淳二、岩槻政晃、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫

3) 第 71 回日本消化器外科学会総会 (2016 年 7 月 16 日 アスティとくしま・徳島県徳島市)

Workshop 6 消化管癌診療におけるバイオマーカーの役割

“LINE-1 メチル化レベルの prognostic biomarker としての意義”

-CGH array、Expression array によるメカニズム解析-

馬場祥史、小澄敬祐、徳永竜馬、志垣博信、蔵重淳二、岩槻政晃、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫

4) 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (2016 年 4 月 16 日 リーガロイヤルホテル大阪・大阪府大阪市)

シンポジウム 15.ゲノム研究が外科診療にもたらしたもの

“消化器癌の網羅的エピゲノム解析：個別化治療を目指した biomarker としての意義”

馬場祥史、原田和人、小澄敬祐、徳永竜馬、志垣博信、蔵重淳二、岩槻政晃、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫

〔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

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：20599708

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

小澄 敬祐 (KOSUMI, Keisuke)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50594884

原田 和人 (HARADA, Kazuto)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70608869

北野 雄希 (KITANO, Yuki)

熊本大学・大学院医学教育部・大学院生

研究者番号：無し