

C. 研究結果

1. ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プロープの開発

低酸素環境下の過還元状態において、4-nitrobenzyl 基が還元・脱離し、その結果、水溶性でかつ負電荷をもつ化合物が生じるような化合物を 12 種類作成して、その体内動態を検討した結果、10 種類が血清とのインキュベーションで 1 時間以上安定であることを確認した。

これらの化合物の体内動態を評価したところ、SD-128 (図 2) が最も良好な腫瘍血液比を示した。

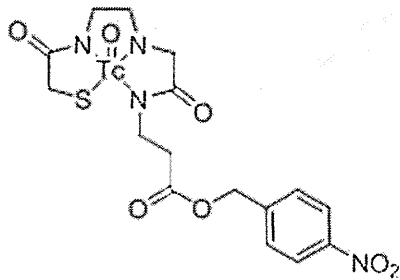


図 2 SD-128 の分子構造

EMT6 腫瘍を移植した Balb/c マウスに SD-128 を投与して SPECT 撮像を行ったところ、SD-128 が腫瘍部に不均一に分布していることが確認できた (図 3)。



図 3 SD-128 を投与した EMT6 移植腫瘍の SPECT/CT 画像

SD-128 を投与した EMT6 腫瘍のオートラジオグラフィ画像とピモニダゾール染色の所見の比較から、SD-128 が腫瘍内低酸素領域に親和性を示していることが示唆された (図 4 a, b)。



図 4a SD-128 を投与した EMT6 移植腫瘍のオートラジオグラフィ

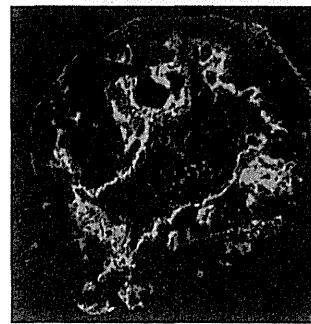


図 4b SD-128 を投与した EMT6 移植腫瘍のピモニダゾール染色

SD-128 化合物を含めて、我々が開発した ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プロープに関して特許出願を行った。

2. アルクチゲニンの抗腫瘍効果の機序解明のための修飾化合物の合成

研究方法の項に示したアルクチゲニンの抗腫瘍効果に関与している可能性がある OH 基およびその周囲構造を修飾するプローブとして以下のような化合物を合成した (図 5~8)。

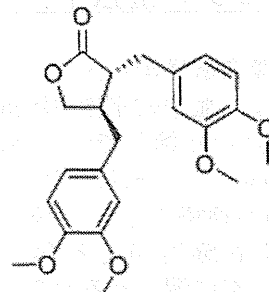


図 5 SD-95

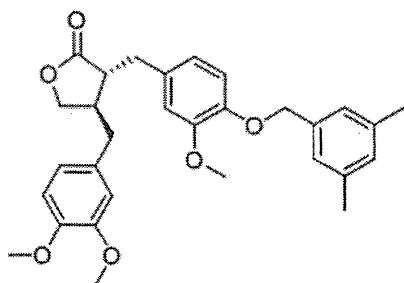


図 6 SD-96

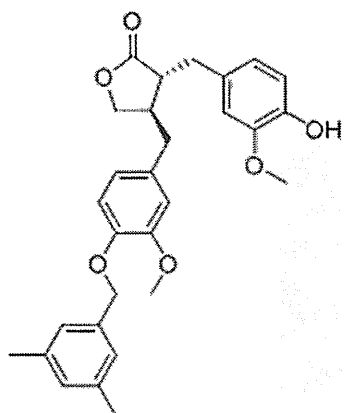


図 7 SD-102

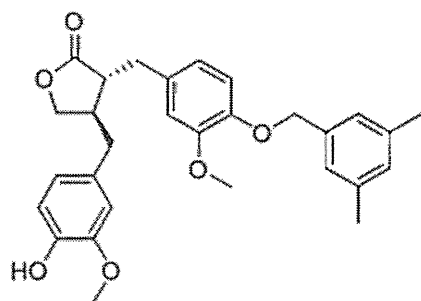


図 8 SD-103

D. 考察

1. ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プロブの開発

今回、開発した ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プロブ SD-128 は、血中安定性や腫瘍移行性に優れ、担癌マウスを用いた検討では、その腫瘍内分布を SPECT で *in vivo* イメージングすることができたため、臨床応用が期待できる。今後、小動物用 SPECT 装置よりも感度が劣る臨床用 SPECT 装置でのイメージングに耐えうるか等の検討を行っていく必要がある。

2. アルクチゲニンの抗腫瘍効果の機序解明のための修飾化合物の合成

アルクチゲニンの抗腫瘍効果の発現に関する

と考えられる水酸基およびその周囲構造を修飾した複数の化合物を合成することができたため、これらの化合物の抗腫瘍効果を評価することにより、アルクチゲニンの抗腫瘍効果の機序の解明に役立つことが期待できる。

E. 結論

アルクチゲニンに対する感受性の予測に有用性が期待できる ^{99m}Tc 標識低酸素イメージング SPECT プロブ SD-128 を合成した。今後、臨床応用を視野に入れて検討を進めていく予定である。また、アルクチゲニンの作用機序の検証に有用と考えられる複数のアルクチゲニンを修飾した化合物を合成した。今後、これらの化合物を、アルクチゲニンの作用機序の検証に応用していく予定である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

1) Kimura S, Fujii H, et al: A novel tumor hypoxia PET probe, ^{18}F -FPINI, with high selectivity and rapid background clearance. Kimura S, Kuriyama T, Kojima Y, Umeda IO, Fujii H, SNMMI 2013 Annual Meeting, Vancouver, BC, Canada, 2013/6/9

2) Fujii H, Yoshimoto M, et al: Cu-ATSM hypoxia PET to evaluate the radiosensitivity. The 6th CJK conference on nuclear medicine, Jeju, South Korea, 2013/11/15

3) 梅田泉, 藤井博史, 他: 腫瘍内低酸素領域を *in vivo* 可視化する新規 ^{99m}Tc 標識分子プロブの開発. 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014/3/28

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

放射性テクネチウムの結合部位を有する化合物、及び、その放射性テクネチウム錯体(特願 2013-178801)(発明者:木村禎亮、藤井博史、梅田泉、出願人:国立がん研究センター)

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

適応決定のためのスクリーニング技術の開発

研究分担者 佐竹 光夫 独立行政法人国立がん研究センター東病院 放射線診断科長

研究要旨

Dual Energy CT (DECT) は、2つの異なるエネルギーを用いて情報を収集することにより、従来にはない組織組成の弁別、ヨード強調像や減算画像も作成できるとともに、ハードニングアーチファクトの低減した画質改善を可能にする。また、電子密度などの定量値を算出することで、膵がんと周囲組織のコントラストの向上に寄与できる画像を提供できると考える。

A. 研究目的

Dual Energy CT (DECT)は、2つの異なるエネルギーを用いて情報を収集することにより、画像情報として組織組成の弁別、ヨード強調や減算画像を作成する事ができ、Raw-data の処理により仮想単色 X 線画像、実効原子番号と電子密度の定量化が可能な、新しい CT 装置である。この DECT を用いて適応決定のためのスクリーニング技術の開発を行った。

Dual Energy 解析により、CT 検査で最も問題となるものの一つである金属が存在することで生じるハードニングアーチファクトの低減した画質改善と電子密度などの定量値を算出することで、膵がんと周囲組織のコントラストの向上に寄与できる新しい画像の作成について研究した。

B. 研究方法

Aquilion ONE(東芝メディカルシステム株式会社)を使用し、実効原子番号画像を得るためにさまざまな組織を封入した京都科学社製のタフファントムを用いた。タフファントムでは化合物や混合物に X 線を照射し、相互作用が起きた場合、ある原子番号だけで構成されていると仮定して、平均的に原子番号が何番目の物質相当なのかを求めることで算出できる。この原理を利用してハードニングアーチファクトの原因となる物質の特定を試みる。X 線の減衰の程度は物質中の電子密度に比例することを利用した電子密度画像を作成し、両画像のハードニングアーチファクトの低減について視覚的に比較した。前回に引き続き、非切除進行膵がん症例に対して膵管を基準軸とする画像を作成し、最適評価断面について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。患者に対しては説明文書を用いて十分な説明を行い、患者自身による同意を本人より文書で取

得した。また、患者のプライバシー保護に最大の努力を払っている。

患者データの利用に関しては直接個人を識別できる情報を用いず、解析を行う時は患者の個人情報の保護を遵守した状態で研究を行っている。

C. 研究結果

実効原子番号画像では(表 1)の結果で平均誤差は 2.8%であった。電子密度画像では(表 2)に示し、平均誤差は 1.7%であった。

非切除進行膵がん症例に対して、膵管を基準軸とする画像評価は病変の進行による腫瘍血管への侵潤の評価に優れていた。病変の進行状況により、最適評価断面は変更した方が病勢の評価に有効であるが、体積で情報を取得しているため、随時最適評価画像を作成可能でスクリーニング時に取得した画像が治療効果判定に有効であることが判明した。

(表 1)

		真値	測定値	差(%)
緻密骨	BE-T	13.179	13.32	1.1
皮質骨	BE-H	11.697	11.97	2.4
筋肉	SZ-208	6.090	7.39	1.9
軟部組織	SZ-207	7.010	7.07	0.9
軟骨	SZ-160	7.350	7.98	8.6
脂肪	SZ-49	6.090	5.76	5.4
水		7.420	7.31	1.5

(表 2)

平均誤差(%)	1.7
軟部組織	0.8
骨組織	0.4
肺組織	2.8

D. 考察

CT の時間分解能に関して極限に近い進歩が遂げられている。しかし、CT 画像独自のアーチファクトであるハードニングアーチファクトの発生については、ほぼ CT 装置開発当時と変わらない問題として取り残されていた。特に術後再発例では、手術で用いられたメタルクリップが再発病変の評価に障害になることも多く経験される。難治性の再発症例を対象とする画像評価では、アーチファクトの発生は対象症例の選択にも影響を与え、アーチファクトを軽減することで症例数の拡張に寄与できる。

DECT は、2 つの異なるエネルギーを用いて情報を収集することにより、画像情報として組織組成の弁別、ヨード強調や減算画像を作成する事ができ、Raw-data の処理により仮想単色 X 線画像、実効原子番号と電子密度の定量化が可能で、ハードニングアーチファクトの原因となる金属は、その同定が可能であればその物質に特有のアーチファクトの発生に応じた軽減の方法が可能で、ハードニングアーチファクトの発生に最も大きな影響を与える金属の原子番号の弁別はハードニングアーチファクトの低減に寄与できる可能性が示唆される。

膵がんでは、正常膵と腫瘍部とのコントラストが低く、がんの存在範囲が不明瞭になることがある。従来の CT 診断に加え、電子密度の定量化を画像診断に付加できる技術の開発はがんの範囲を特定し、付随する 2 次性変化である膵炎の存在を顕在化することが可能となる。

通常、CT 診断は横断像で行うのが一般的であるが、膵臓の形態は個人差が大きく、病変の存在部位により読影の難易度が異なることも多い。屈曲した断面で作成した画像では、存在部位による認識の差は生じにくく、病変の大きさと正常膵とのコントラストが病変認識の要因となる。

主膵管を座標軸として膵臓の画像を作成することで、浸潤性膵管がんで問題となる血管への侵潤も再現

3. その他

なし

性を持って容易に認識することができる。主病変の変容に対しても治療効果の客観的な評価ができることも利点の一つである。今後この方法を活用し、スクリーニング時に取得した画像が治療効果判定に応用できる。

E. 結論

DECT は従来診断が困難なハードニングアーチファクトの低減を図り、さらに造影域の強調を取得することで、病変の認識が向上する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

01. 中神佳宏, 佐竹光夫: P201 陽子線治療の効果判定に FDG-PET/CT が有益であった食道癌の 2 例. 核医学 50(3):5244-5244, 2013.

02. K. Sekiya, H. Kuno, S. Fujii, M. Suemitsu, T. Kaneda, M. Satake.: LL-NRE4373: The Role of MR Imaging in Tongue Cancer Based on Therapeutic Outcomes. RSNA2013. (Cum Laude)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究要旨

アルクチゲニンは、栄養飢餓状態で有効性を示すという独創的なコンセプトを持つ画期的な抗がん剤であり、非臨床だけでなく臨床試験結果からも高い安全性と有効性が期待されている。また、アルクチゲニンを含有する牛蒡子は、原材料も安価であり医療経済性にも優れている。

本研究では、第Ⅰ相試験での推奨用量を用いて、国立がん研究センター東病院・中央病院、癌研有明病院を参加施設として実施する GBS01 の第Ⅱ相試験において、血漿中アルクチゲニン（AG）濃度及びその主代謝物であるアルクチゲニン-グルクロン酸抱合体（AGG）濃度を測定し、第Ⅰ相試験での結果との比較を行った。その結果、第Ⅰ/Ⅱ相試験間での AG 及び AGG 濃度に有意な違いは認められない事が確認された。

A. 研究目的

ゲムシタビン不応膵がん患者を対象とした GBS-01 の第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験において、膵がん患者のアルクチゲニン（AG）及び主代謝物であるアルクチゲニン-グルクロン酸抱合体（AGG）の血中動態を明らかにする。特に、第Ⅰ相試験の推奨用量（Level 3: 牛蒡子エキスとして 4.0 g）を用いた第Ⅱ相試験での AG 及び AGG の薬物動態を検討し、第Ⅰ相試験結果との相同性を評価する。

B. 研究方法

1. 対象試料

血漿

2. 検体採取法

第Ⅰ相臨床試験: 牛蒡子エキスとして 4.0 g を投与（Level 3）、症例数 9 症例（採血ポイント: 189）。

尚、血液サンプルは、患者の状態に鑑み、経口投与1日目と8日目の投与前、投与後0.5、1、1.5、2、3、4、6、12時間に採取した。また、投与2日目、5日目、9日目は投与前に採取した。

第Ⅱ相臨床試験: 第Ⅰ相試験の結果から推奨用量とされた 4.0 g（牛蒡子エキスとして）を投与、症例数 21 症例（採血ポイント: 104）。

尚、血液サンプルは、経口投与1日目の投与後 1.5、3、6、12時間と8日目の投与前に採取した。

3. 血漿中濃度の測定法

血漿中AG濃度及びAGG濃度は、質量分析器付き高速液体クロマトグラフィー（LC-MS）法にて測定した。尚、本定量法の真度及び精度は、全て

基準の範囲内（真度: 85~115%、精度: 15%以内）であった。

4. PK パラメータ

最高血漿中濃度（C max）、最低血漿中濃度（C min）は、血漿中濃度推移より求めた。

C. 研究結果

1. 第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験で確認された血漿中濃度及びPKパラメータ

(1) 血漿中 AG 及び AGG 濃度推移

第Ⅰ相試験でゲムシタビン不応膵がん患者を対象に GBS-01 を牛蒡子エキスとして 4.0 g（Level 3）を1日1回単回投与した際の AG、AGG の血中濃度推移を図 1、2 に示す。両者とも、患者間で血中濃度推移に顕著な違いが認められた。

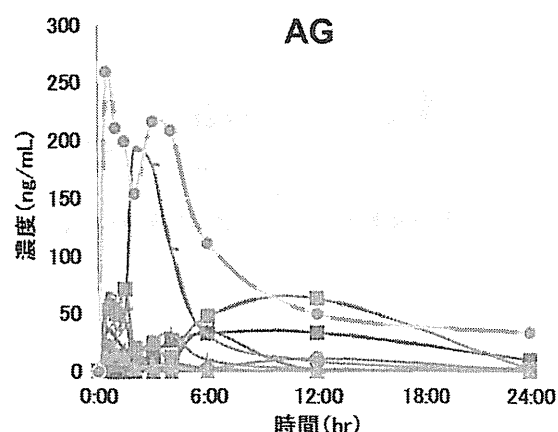


図 1 第Ⅰ相試験における血漿中 AG 濃度推移

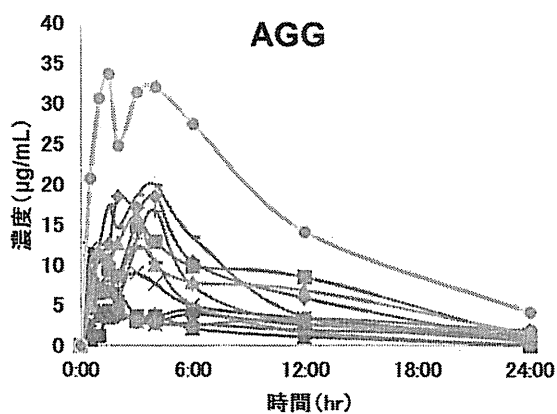


図2 第I相試験における血漿中AGG濃度推移

第II相臨床試験における血中AG、AGG濃度の分布を図3、4に、Cmin、Cmaxの箱ひげ図を図5、6に示す。GBS-01は、服用後速やかにAGあるいはAGGとして血漿中に検出されたが、第I相試験での結果と同様、血漿中AG濃度は患者間で異なる傾向が認められた。一方、血漿中AGG濃度は血漿中AG濃度ほど患者間での違いは認められなかった。

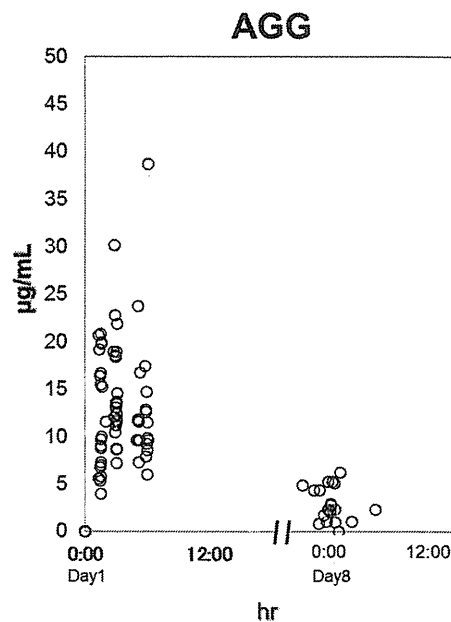


図4 第II相試験における血漿中AGG濃度

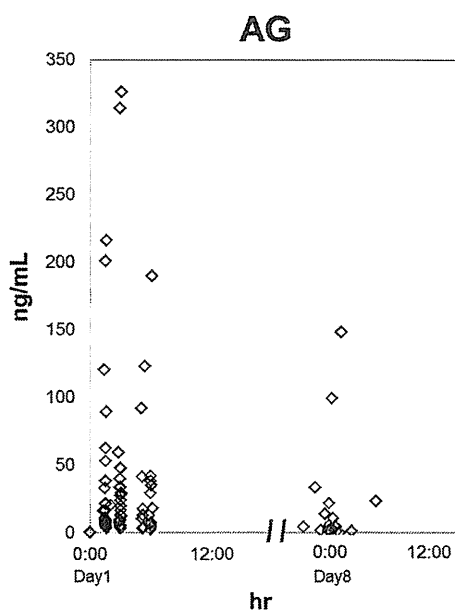


図3 第II相試験における血漿中AG濃度

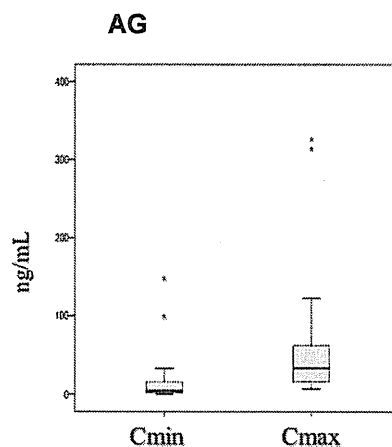


図5 第II相試験における血漿中AG濃度(Cmin、Cmax)

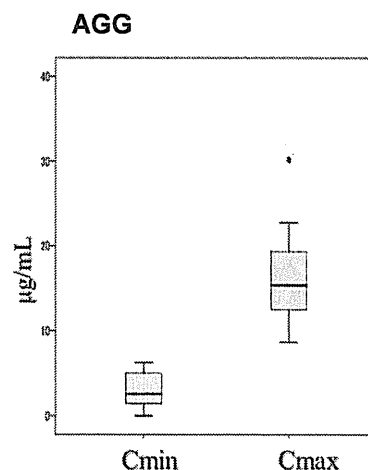


図6 第II相試験における血漿中AGG濃度(Cmin、Cmax)

(2) 第 I / II 相試験の比較

ゲムシタビン不応膵がん患者を対象に、第 I 相試験では 9 例の患者に、第 II 相試験では 21 例の患者に GBS-01 を牛蒡子エキスとして 4 g を 1 日 1 回経口投与した。第 I / II 相試験の血漿中 AG 及び AGG 濃度を比較した結果を図 7、8 に示す。第 I / II 相試験の間では、血漿中 AG、及び AGG 濃度に有意な違いは認められなかった。

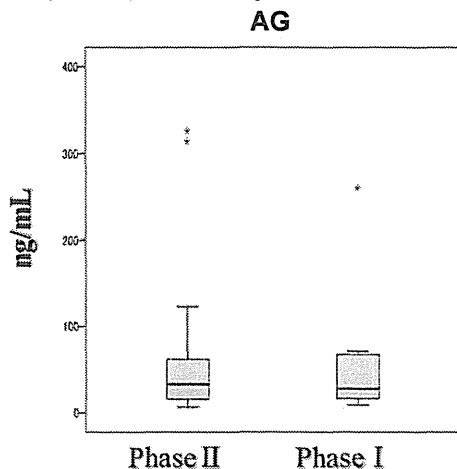


図 7 第 I / II 相試験における血漿中 AG 濃度 (Cmax)

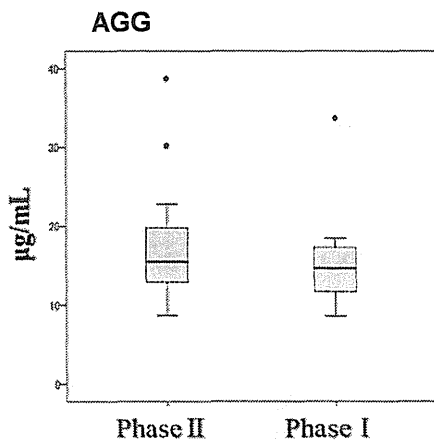


図 8 第 I / II 相試験における血漿中 AGG 濃度 (Cmax)

D. 考察

ゲムシタビン不応膵がん患者を対象とした GBS-01 の第 I / II 相試験において、血漿中 AG 及びその主代謝物 AGG の動態学的解析を行なった。前年度で報告した第 I 相試験において、GBS-01 は牛蒡子エキスとして 1.0~4.0 g まで投与した時、吸収は線形を示し用量に依存した C max 及び AUC の上昇を確認しているが、第 II 相試験では 21 例の患者に第 I

相試験での推奨用量(牛蒡子エキスとして 4.0 g)を 1 日 1 回経口投与し、第 I 相試験での結果との比較を行った結果、第 I/II 相試験間での AG 及び AGG 濃度に有意な違いは認められない事が確認された。しかし、血漿中 AG 濃度は第 I 相臨床試験と同様、第 II 相試験においても患者で異なる傾向が認められた。

したがって、今後はこれらの変動要因を詳細に検討する必要性が強く示唆された。

E. 結論

第 I 相試験での推奨用量(牛蒡子エキスとして 4.0 g)を用いた第 II 相試験より、血漿中 AG 濃度及びその主代謝物である AGG 濃度は、第 I / II 相試験の間で有意な違いは認められない事が確認された。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

なし

分担研究報告書

我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服

病理学的検討

研究分担者 小嶋基寛 国立がん研究センター東病院

研究要旨

アルクチゲニン有効症例の臨床病理学的特徴を明らかにし、有効性を予測するマーカーを検索する目的で、外科切除検体を伴う、臨床第Ⅰ相試験の対象症例7例に関し、臨床病理学的検討及び免疫組織学的検討を施行した。腺扁平上皮癌で non-PD 症例が1例認められた以外には PD 群とそれ以外 (non-PD 群)の二群で明らかな組織学的な違いを認めず、アルクチゲニン有効症例の病理学的な特徴の把握にはいたらなかった。免疫染色の検討においては前年度施行した β -グルクロニダーゼと GRP78 発現をスコア化し詳細に検討したところ PD 群と比較して non-PD 群では発現が高い傾向があることが判明し、症例の蓄積が望ましいと考えられた。

A. 研究目的

アルクチゲニン有効症例の臨床病理学的特徴を明らかにし、有効性を予測するマーカーを検索する。

B. 研究方法

臨床第Ⅰ相試験の対象となった症例のうち、外科切除検体のある症例7例に関して臨床病理学的検討及び免疫組織学的検討を施行した。免疫染色は既存の文献から β -グルクロニダーゼ、GRP78 を選択した。 β -グルクロニダーゼ発現は細胞質に見られ、神経の染色を positive control とし、それより強いものを 2+、それ以下を 1+とし、陽性領域のパーセントと発現スコア (腫瘍内 2+の(%))X2+(腫瘍内 1+の(%))X1 で評価した。GRP78 はラ氏島を positive control とし、細胞質の発現がラ氏島と同等かそれ以上の場合を 3+、膵管上皮や腸上皮と同等の染色を 2+、それより弱い、血管内皮程度の染色を 1+としてそれぞれの領域のパーセントを算出し、発現スコア (腫瘍内 3+の(%))X3+(腫瘍内 2+の(%))X2 で算出した。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言および厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針及び、疫学研究に関する倫理指針に従って行った(共同 K22-9)。

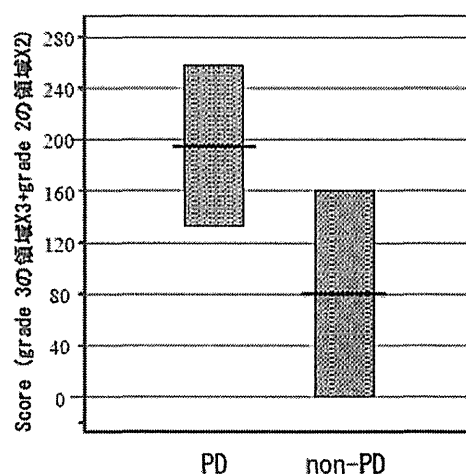
C. 研究結果

臨床的有効性は PD 群とそれ以外 (non-PD 群)の二群に分けて検討を行った。両群間で progression free survival に有意な差を認めたが、性別、年齢、over-all survival、腫瘍部位、組織分化度、腫瘍最大径、胆管浸潤

など腫瘍進展度との相関を認めなかった。実験的に観察される上皮間葉系移行との関連性が報告されている budding や低分化胞巣の検討も行ったが、両群間に差を認めなかった。

免疫組織学的な検討としては、 β -グルクロニダーゼ発現は PD 群、non-PD 群の間に差を認めなかった。GRP78 においては non-PD 群の発現スコアが平均 80.0、PD 群の発現スコアが平均 195 であり、統計学的な有意差は示されなかったが(P=0.08)、non-PD 群で低い傾向があった(下図)。

GRP78 発現スコア



P=0.08

D. 考察

本年度は病理組織学的検討を詳細に加えることによりアルクチゲニンが有効な腫瘍の特徴を把握したいと考えた。腺扁平上皮癌で non-PD 症例が1例認められ、今後も症

例の蓄積が必要とは考えられたが、現状の症例数で有効症例の病理学的な特徴を把握することは困難であった。

免疫染色に関しては昨年度よりさらに詳細な検討を行った結果、GRP78 に関しては効果予測マーカーとしての有用である可能性が示唆され、さらに多数の症例で検討する必要性があると考えられた。

E. 結論

臨床病理学的検討と免疫組織学的検討を臨床第 II 相試験においても詳細に行うことが肝要であると考えられた。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

2. 学会発表

1. 小嶋 基寛ら、Consensus development method を用いた脈管侵襲病理判定基準作成の試み 大腸癌研究会プロジェクトより。

日本病理学会会誌 102 巻 1 号 Page322, 2013.

2. 北口 和彦, 小嶋 基寛ら、早期肝門部及び肝外胆管癌の肉眼型に関する検討。日本病理学会会誌 102 巻 1 号 Page350, 2013.

3. 佐藤 雄, 小嶋 基寛ら、局所進行下部直腸癌に対する術前 FOLFOX 療法併用 ISR の短期治療成績。日本大腸肛門病学会雑誌 66 巻 6 号 Page446, 2013.

4. 北口 和彦, 小嶋 基寛ら、膵 ITPN(Intraductal tubulopapillary neoplasm) の 1 切除例。日本肝胆膵外科学会・学術集会プログラム・抄録集 25 回 Page505, 2013.

5. 秋田 恵一, 小嶋 基寛ら、いわゆる Treitz の筋の本態について。日本大腸肛門病学会雑誌 66 巻 9 号 Page737, 2013.

6. 塚田 祐一郎, 小嶋 基寛ら、ISR 施行時に必要な肛門管解剖。日本大腸肛門病学会雑誌 66 巻 9 号 Page737, 2013.

7. 落合 淳志, 小嶋 基寛ら、光の臨床応用レーザー内視鏡によるヒト消化管腫瘍の低酸素イメージング。JSMI Report 6 巻 2 号 Page60, 2013.

8. 柵山 尚紀, 小嶋 基寛ら、S 状結腸癌に日本住血吸虫卵が併存した 1 例。日本臨床外科学会雑誌 74 巻増刊 Page740, 2013.

9. 榎本 直記, 小嶋 基寛ら、肝原発神経内分泌癌の 1 切除例。日本臨床外科学会雑誌 74 巻増刊 Page870, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2013-252528 膵癌血清診断マーカー

特願 2014-015878 胆道癌血清マーカー

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (外国語)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Esumi H.	S'ils n'ont pas de pain, qu'ils mangent de la brioche	American Journal of Physiology Cell Physiology	306	C320-321	2014
Kami K, Fujimori T, Sato H, Sato M, Yamamoto H, Ohashi Y, Sugiyama N, Ishihama Y, Onozuka H, Ochiai A, Esumi H, Soga T, and Tomita M.	Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry	Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society	9	444-453	2013
Kudou N, Taniguchi A, Sugimoto K, Matsuya Y, Kawasaki M, Toyooka N, Miyoshi C, Awale S, Dibe DF, Esumi H, Kadota S, and Tezuka Y.	Synthesis and antitumor evaluation of arctigenin derivatives based on antiausterity strategy	European journal of medicinal chemistry	60	76-88	2013
Owada S, Shimoda Y, Tsuchihara K, and Esumi H.	Critical role of H ₂ O ₂ generated by NOX4 during cellular response under glucose deprivation	PloS one	8(3)	e56628	2013
Ueda JY, Athikomkulchai S, Miyatake R, Saiki I, Esumi H, and Awale S	(+)-Grandifloracin, an antiausterity agent, induces autophagic PANC-1 pancreatic cancer cell death	Drug design, development and therapy	8	39-47	2014
Suzuki M., Makinoshima H., Matsumoto S., Suzuki A., Mima ki S., Matsushima K., Yo K., Goto K., Suzuki Y., Ishii G., Ochiai A., Tsuta K., Shibata T., Kohno T., EsumiH., Tsuchihara K	Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo	Cancer Science	104(7)	896-903	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

Suzuki A, Mimaki S, Yamane Y, Kawase A, Matsushima K, Suzuki M, Goto K, Sugano S, Esumi H, Suzuki Y, Tsuchihara K.	Identification and characterization of cancer mutations in Japanese lung adenocarcinoma without sequencing of normal tissue counterparts	PLoS One	8(9)	e73484	2013
Nasuno T, Mimaki S, Okamoto M, Esumi H, Tsuchihara K.	Effect of a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against esophageal squamous cell carcinoma cell lines.	Cancer Science	105(2)	202-210	2014
Awale S, Kato M, Dibwe DF, Li F, Miyoshi C, Esumi H, Kadota S, Tezuka Y.	Antiausterity activity of arctigenin enantiomers: Importance of (2R, 3R)-absolute configuration.	Nat. Prod Commun	9(1)	79-82	2014
Yamashita T, Uehara S, Udagawa N., Li F., Kadota S., Esumi H., Kobayashi Y., Takahashi N.	Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways	PloS one	9(1)	e85878	2014
Ikeda M, Ioka T, Ito Y, Yonemoto N, Nagase M, Yamao K, Miyakawa H, Ishii H, Furuse J, Sato K, Sato T, Okusaka T.	A Multicenter Phase II Trial of S-1 With Concurrent Radiation Therapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer.	Int J Radiat Oncol Biol Phys.	85	163-169	2013
Ueno H, Ioka T, Ikeda M, Ohkawa S, Yanagimoto H, Bokun N, Fukutomi A, Sugimori K, Baba H, Yamao K, Shimamura T, Sho M, Kitano M, Cheng AL, Mizumoto K, Chen JS, Furuse J, Funakoshi A, Hatori T, Yamaguchi T, Egawa S, Sato A, Ohashi Y, Okusaka T, Tanaka M.	Randomized Phase III Study of Gemcitabine Plus S-1, S-1 Alone, or Gemcitabine Alone in Patients With Locally Advanced and Metastatic Pancreatic Cancer in Japan and Taiwan: GEST Study.	J Clin Oncol.	31	1640-8	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Furuse J, Inagaki M, Higashi S, Kato H, Terao K, Ochiai A.	Serum levels of IL-6 and IL-1 β can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer	Br J Cancer	108	2063-9	2013
Otsuka T, Morizane C, Nara S, Ueno H, Kondo S, Shimada K, Kosuge T, Ikeda M, Hiraoka N, Okusaka T.	Gemcitabine in Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm With an Associated Invasive Carcinoma of the Pancreas.	Pancreas	42	889-92	2013
Ueno H, Ioka T, Ikeda M, et al	Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study.	J Clin Oncol	31	1640-8	2013
Kondo S, Ueno H, Hosoi H, et al	Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma	Br J Cancer	109	739-46	2013
Lin Y, Ueda J, Yagyu K, Ishii H, Ueno M, Egawa N, Nakao H, Mori M, Matsuo K, Kikuchi S.	Association between variations in the fat mass and obesity-associated gene and pancreatic cancer risk: a case-control study in Japan	BMC Cancer	13	337	2013
Matsuyama M, Ishii H, Kuraoka K, Yukisawa S, Kasuga A, Ozaka M, Suzuki S, Takano K, Sugiyama Y, Itoi T.	Ultrasound-guided vs endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for pancreatic cancer diagnosis	World J Gastroenterol	19(15)	2368-73	2013
Takeda A, Fujii H, et al	Maximum Standardized Uptake Value on FDG-PET Is a Strong Predictor of Overall and Disease-Free Survival for Non-Small-Cell Lung Cancer Patients after Stereotactic Body Radiotherapy	J Thorac Oncol	9 (1)	65-73	2014
Ahmed S. Maklad, M.Matsuhiro, H.Suzuki, Y.Kawata, N.Niki, M.Satake, N.Moriyama, T.Utsunomiya, M.Shimada.	Blood vessel-based liver segmentation using the portal phase of an abdominal CT dataset.	Medical Physics	40(11)	113501-1-17	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

M.Ikeda, T.Okusaka, J.Furuse, S.Mitsunaga, H.Ueno, H.Yamaura, Y.Inaba, Y.Takeuchi, M.Satake, Y.Arai.	A multi-institutional phase II trial of hepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis.	Cancer Chemother Pharmacol	72	463-470	2013
M.Ikeda, S.Mitsunaga, S.Shimizu, I.Ohno, H.Takahashi, H.Okuyama, A.Kuwahara, S.Kondo, C.Morizane, H.Ueno, M.Satake, Y.Arai, T.Okusaka.	Efficacy of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial chemoembolization.	J Gastroenterol	DOI 10.1007/s00535-013-0853-7	1-7	2013
H.Kunoo, H.Onaya, S.Fujii, H.Ojiri, K.Otanie, M.Satake.	Primary staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer:CT, MR imaging and dual-energy CT.	European Journal of Radiology	83	e23-e35	2014
Y Akashi, T Oda, Y Ohara, R Miyamoto, T Kurokawa, S Hashimoto, T Enomoto, K Yamada, M Satake and N Ohkouchi	Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1.	BRITISH JOURNAL OF CANCER	doi: 10.1038/bjc.2014.49	1-7	2014
Kojima M, et al.	Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis.	PLoS One	9(2)	e88018	2014
Kojima M, et al.	Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum.	Journal of Clinical Pathology	66(7)	551-558	2013
Kojima M, et al.	Practical utility and objectivity: does evaluation of peritoneal elastic lamina invasion in colorectal cancer overcome these contrary problems?	American Journal of Surgical Pathology	38(1)	144-145	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌（日本語）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐々木満仁, 上野秀樹, 林秀幸, 他	膵がんに対する術後補助療法のエビデンスと今後の展望	腫瘍内科	12	259-65	2013
森実千種, 奥坂拓志, 上野秀樹, 他	【外科医が知っておくべき癌治療の薬物療法】 抗癌薬各論 胆管癌・膵癌の薬物療法 切除不能・再発癌	外科	75	1369-74	2013
林秀幸, 上野秀樹, 柴知史	【膵・胆道癌薬物療法:臨床試験を読む!-最新の動向と実地診療へのインパクト-】 局所進行または転移性膵癌に対するGEM+S-1併用療法、S-1単剤療法、またはgem単剤療法のランダム化第Ⅲ相試験 GEST試験	胆と膵	34	601-06	2013
梅田泉、藤井博史	臨床応用を目指した分子イメージング研究の現状と今後の展望	日本耳鼻咽喉科学会会報	116 (8)	933-940	2013
小嶋基寛、落合淳志	【大腸癌の最新治療-治癒に向けた最先端研究-】 大腸癌の浸潤・転移機構	日本臨床	72巻1号	2-6	2014

IV.研究成果の刊行物・別刷

“*S’ils n’ont pas de pain, qu’ils mangent de la brioche.*” Focus on “Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane potential in a prolyl hydroxylase pathway-activated cancer cell line in a hypoxic microenvironment”

Hiroyasu Esumi

Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Yamazaki, Noda, Chiba, Japan

IN THEIR ARTICLE, published in this issue of the *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Takahashi and Sato (7) point to the possibility that anaerobic respiration depends on complex II activity in mammalian cells, especially cancer cells. Fumarate respiration is established in parasites and shellfish but has not been unequivocally demonstrated in mammalian cells. What cancer cells are eating to generate energy for survival without oxygen and glucose is one challenging subject.

Cancer cells depend on glycolysis for their energy production, even during sufficient oxygen supply, and this dependence on glycolysis for energy production, i.e., the Warburg effect, has long been believed to be one of the most general characteristics of cancer (8). On the other hand, tumor angiogenesis is also strongly activated in most cancer tissues through activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1-dependent and -independent pathways, and tumor angiogenesis is often closely associated with poor prognosis for patients with various types of cancer (5). However, many clinical investigations have revealed that most cancer tissues are strongly hypoxic, despite vigorous angiogenesis and the preference of cancer cells for glycolysis. Therefore, cancer tissue hypoxia is assumed to be a result of insufficient blood supply. Tumor vasculature might be subjected to structural distortion by continuous tumor growth and death, resulting in structural and functional immaturity. The main energy production pathway of mammalian cells in an anaerobic environment is believed to be glycolysis, but, in the case of tumor hypoxia, glucose and other nutrient supplies might also be limited. Information about how cancer cells produce energy to maintain their proliferation and/or life under such harsh conditions is limited (2, 3).

Several authors have proposed the possibility of anaerobic respiration by renal cells and cancer cells, but its biochemical mechanisms and significance remain to be established (5, 6). Takahashi and Sato (7) used an elegant experimental system to demonstrate the possibility of an alternative anaerobic respiration. They developed a two-dimensional tissue model in which a monolayer of cultured cells expressing green fluorescent protein was placed under a coverslip so that oxygen is supplied only from the edge of the coverslip. In this system, an oxygen gradient was formed and visualized as the red shift of fluorescence, which depends on oxygen tension (6). When mitochondrial membrane potential was also visualized by a cationic fluorescent dye, the point at which the oxygen supply became limiting for mitochondrial function could be established. Using

this system, they showed that the maximum distance for diffusion of oxygen was ~ 500 μm from the oxygen source (the edge of the coverslip), at which point mitochondrial membrane potential was abolished [the anoxic front (AF)]. When prolyl hydroxylase domain-containing proteins were inhibited by dimethylxalylglycine (DMOG), the AF was extended to 1,500–2,000 μm , and the effect was much more prominent in a cancer cell line than in a fibroblast-like cell line. DMOG pretreatment significantly reduced tissue oxygen gradients, indicating sustained mitochondrial membrane potential with reduced respiration. In addition, DMOG effects were completely abolished by pharmacological inhibition of complex II, but not complex III, suggesting that complex II (probably with complex I) sustains mitochondrial membrane potential in the absence of oxygen (anaerobic respiration) in cells in which PHD activity is inhibited.

Recently, the importance of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases in biology has been widely accepted, and this is especially true for the HIF-1 pathway in cancer and epigenetic regulation of cellular function. In the work of Takahashi and Sato (7), DMOG was used to activate hypoxic adaptation, and “cellular anaerobic respiration” was found to be activated. HIF-1 is the most important and well-studied transcription factor regulating a wide variety of cellular adaptations to the hypoxic environment. However, α -ketoglutarate-dependent dioxygenases include a large number of family members, and DMOG is not highly specific for the prolyl hydroxylases that regulate HIF-1 α . The recent discovery of isocitrate dehydrogenase mutations, which produce large increases in the levels of the “onco-metabolite” D-2-hydroxyglutarate, raised the following question: How does this metabolite exert its oncogenic effect? HIF-1 activation is a strong candidate, but more extensive genetic and biochemical analyses, including effects on TET dioxygenases, histone demethylases, and prolyl hydroxylases, are needed to explore the biological relevance of D-2-hydroxyglutarate (1) and the work of Takahashi and Sato (7).

The work of Takahashi and Sato (7) points to the possibility that anaerobic respiration depends on complex II activity in mammalian cells, especially cancer cells, and this is one of the most interesting possibilities. Fumarate respiration is established in parasites and shellfish but has not been unequivocally demonstrated in mammalian cells (4). What cancer cells are eating to generate energy for survival without oxygen and glucose is one challenging subject. Additional genetic and biochemical studies are needed.

Address for reprint requests and other correspondence: H. Esumi, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo Univ. of Science, 2669 Yamazaki, Noda, Chiba 278-0022, Japan (e-mail: hesumi@rs.tus.ac.jp).

DISCLOSURES

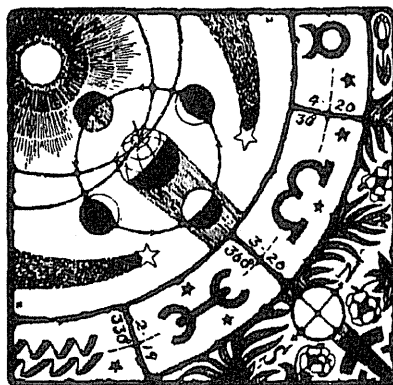
No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.E. drafted the manuscript; H.E. approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov* 3: 730–741, 2013.
2. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11–20, 2008.
3. Esumi H, Izuishi K, Kato K, Hashimoto K, Kurashima Y, Kishimoto A, Ogura T, Ozawa T. Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 277: 32791–32798, 2002.
4. Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, Harada S, Kita K. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1820: 643–651, 2012.
5. Semenza GL. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 347–353, 2011.
6. Takahashi E, Sato M. Imaging of oxygen gradients in monolayer cultured cells using green fluorescent protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C1318–C1323, 2010.
7. Takahashi E, Sato M. Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane potential in a prolyl hydroxylase pathway-activated cancer cell line in a hypoxic microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol* (September 18, 2013). doi:10.1152/ajpcell.00255.2013.
8. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314, 1956.



Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry

Kenjiro Kami · Tamaki Fujimori · Hajime Sato · Mutsuko Sato ·
Hiroyuki Yamamoto · Yoshiaki Ohashi · Naoyuki Sugiyama · Yasushi Ishihama ·
Hiroko Onozuka · Atsushi Ochiai · Hiroyasu Esumi · Tomoyoshi Soga ·
Masaru Tomita

Received: 11 June 2012 / Accepted: 27 July 2012 / Published online: 2 November 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Metabolic microenvironment of tumor cells is influenced by oncogenic signaling and tissue-specific metabolic demands, blood supply, and enzyme expression. To elucidate tumor-specific metabolism, we compared the metabolomics of normal and tumor tissues surgically resected pairwise from nine lung and seven prostate cancer patients, using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS). Phosphorylation levels of enzymes involved in central carbon metabolism were also quantified. Metabolomic profiles of lung and prostate tissues comprised 114 and 86 metabolites, respectively, and the profiles not only well distinguished tumor from normal

tissues, but also squamous cell carcinoma from the other tumor types in lung cancer and poorly differentiated tumors from moderately differentiated tumors in prostate cancer. Concentrations of most amino acids, especially branched-chain amino acids, were significantly higher in tumor tissues, independent of organ type, but of essential amino acids were particularly higher in poorly differentiated than moderately differentiated prostate cancers. Organ-dependent differences were prominent at the levels of glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates and associated energy status. Significantly high lactate concentrations and elevated activating phosphorylation levels of phosphofructokinase and pyruvate kinase in lung tumors confirmed hyperactive glycolysis. We highlighted the potential of CE-TOFMS-based metabolomics combined with phosphorylated enzyme analysis for understanding tissue-specific tumor microenvironments, which may lead to the development of more effective and specific anticancer therapeutics.

Kenjiro Kami and Tamaki Fujimori contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11306-012-0452-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Kami · Y. Ohashi · N. Sugiyama · T. Soga · M. Tomita
Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka,
Yamagata, Japan

K. Kami · T. Soga · M. Tomita
Systems Biology Program, Graduate School of Media and
Governance, Keio University, Fujisawa, Kanagawa, Japan

T. Fujimori · H. Sato · M. Sato · H. Yamamoto · Y. Ohashi
(✉) · T. Soga · M. Tomita
Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Yamagata,
Japan
e-mail: ohashi@humanmetabolome.com

Y. Ishihama
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Kyoto, Japan

H. Onozuka · A. Ochiai · H. Esumi (✉)
National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Chiba, Japan
e-mail: hesumi@ncc.go.jp

Keywords Metabolomics · CE-MS ·
Phosphoproteomics · Lung cancer · Prostate cancer ·
Tumor microenvironment

1 Introduction

Hyperactivity of glycolysis independent of oxygen availability is a hallmark of cancer metabolism (Warburg effect) (Warburg 1956). Glycolytic energy metabolism of tumor cells is advantageous for perpetual proliferation and meeting the high demand for non-essential amino acids, fatty acids, and nucleotides, although not for efficient production of ATP. Besides glucose, glutamine is significantly consumed by most tumor cells and metabolized to

alanine, lactate, and ammonium ions, which are secreted out of the cells, in a process called glutaminolysis (Heiden et al. 2009). Corroborating these features of cancer metabolism, our previous metabolome analyses of colon and stomach tumor tissues, using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS), have revealed significantly high tumor concentrations of glycolytic intermediates including lactate, tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates, and amino acids (Hirayama et al. 2009). Moreover, inter-organ metabolomic differences were more significant than normal-versus-tumor differences within the same organ, which revealed the complexity in generalizing a tumor-specific, organ-independent metabolic profile. This suggested that cells alter their metabolism along with tumorigenesis while retaining much of the metabolism that is unique to their organs of origin. To test this hypothesis further and gain an insight into cancer metabolism, we analyzed metabolomic profiles of normal and tumor tissues obtained from lung and prostate cancer patients.

Deciphering the difference in the flow of energy metabolism between cancer and normal cells solely from the tissue metabolome data is often difficult. The activities of most glycolytic enzymes are known to be regulated by phosphorylation; therefore, we used nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) to quantify phosphorylation levels of 13 sites contained in ten selected enzymes involved in glycolysis and the TCA cycle. The results indicate that tumor metabolomic profile is highly dependent on its organ of origin, and exhibits unique patterns dependent on cancer type as well as differentiation status. This demonstrates the potential of CE-TOFMS-based metabolomics complemented by

phosphorylated enzyme analysis for gaining further insight into the complexity and heterogeneity of tumor metabolism.

2 Materials and methods

2.1 Sampling and metabolite extraction

All the experiments were conducted according to the study protocol that was approved by the Institution Review Board of the National Cancer Center, Japan. Informed consent was obtained from all the participants.

Tumor and surrounding tissues were surgically resected from nine lung and seven prostate cancer patients, who had been administered with no anticancer drugs or medications that could greatly modify their metabolisms previous to the surgical treatments. Clinical information on the patients is listed in Table 1. The resected tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until metabolite extraction. Sample tissues were weighed and completely homogenized by multi-beads shocker (Yasuikikai, Osaka, Japan) at 2,000 rpm for 3 min, after adding 0.5 ml ice-cold methanol containing $50\ \mu\text{M}$ methionine sulfone and camphor-10-sulfonic acid as internal standards. The homogenates were mixed with 0.5 ml chloroform and 0.2 ml ice-cold Milli-Q water. After centrifugation at $2,300\times g$ for 5 min, the supernatant was centrifugally filtrated through 5-kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA, USA) at $9,100\times g$ for 3 h to remove proteins. The filtrate was centrifugally concentrated in a vacuum evaporator, dissolved with Milli-Q water, and analyzed by CE-TOFMS.

Table 1 Clinicopathological information of patients and their tumor tissues. W, M, and P in the differentiation status indicate well-, moderately-, and poorly- differentiated tumors, respectively

Organ	ID	Age	Sex	Type	Stage	Differentiation
Lung	L1	82	Male	Squamous cell carcinoma	2B	M
	L2	82	Male	Squamous cell carcinoma	1B	M
	L3	77	Male	Squamous cell carcinoma	1B	P
	L4	80	Female	Adenocarcinoma	1B	M
	L5	78	Male	Pleomorphic carcinoma	3B	N/A
	L6	81	Male	Adenocarcinoma	1A	W
	L7	56	Male	Squamous cell carcinoma	3B	M-P
	L8	61	Male	Large cell carcinoma	1B	N/A
	L9	57	Male	Adenocarcinoma	1B	P
Prostrate	P1	68	Male	Adenocarcinoma	2	M
	P2	66	Male	Adenocarcinoma	2	P
	P3	67	Male	Adenocarcinoma	2	P
	P4	63	Male	Adenocarcinoma	3	P
	P5	62	Male	Adenocarcinoma	2	M
	P6	65	Male	Adenocarcinoma	2	M
	P7	58	Male	Adenocarcinoma	2	M