

201438004A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目) 統合リポミクス・ゲノミクスを用いたホルモン感受性癌における革新的
先制医療シーズの探索に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小川 修

平成27 (2015) 年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人 学長 山極壽一が実施した平成26年度「統合リポミクス・ゲノミクスを用いたホルモン感受性癌における革新的先制医療シーズの探索」の成果を取りまとめたものです。

目次

研究要旨	4
研究担当者.....	4
研究目的	4
研究方法（前立腺癌）	5
研究方法（乳癌）	6
倫理面への配慮	6
研究結果（前立腺癌）	7
研究結果（乳癌）	8
考察（前立腺癌）	9
考察（乳癌）	10
結論（前立腺癌）	10
結論（乳癌）	10
学会発表（前立腺癌・乳癌）	10
論文発表（前立腺癌・乳癌）	10
知的財産権の出願・登録状況（前立腺癌・乳癌）	10

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書

統合リポミクス・ゲノミクスを用いたホルモン感受性癌における革新的先制医療シーズの
探索に関する研究

業務主任者 小川 修 京都大学大学院医学研究科泌尿器科 教授

研究要旨

近年の乳癌・前立腺癌の罹患率の急増の背景に、生活習慣の欧米化による高脂肪食や肥満の影響があることから、脂質代謝と癌の発育進展との関連が指摘されている。また、組織中の脂質代謝は性ホルモンの影響を強く受けており、性ホルモン環境と癌の脂質代謝の関連を解明することは、これらホルモン感受性癌の発症予防や治療法開発を行う上で重要な研究課題である。本研究では乳癌・前立腺癌の臨床組織検体と患者由来ゼノグラフトを用いて、リポミクスとゲノミクスを統合した解析を行い、癌の進展と治療抵抗性獲得に関わる脂質代謝機構を解明し、その臨床応用を目指している。今年度は臨床検体をターゲットに高解像度質量顕微鏡を用いて、脂質の網羅的解析を行った。乳癌では癌の進行度による脂質成分の変化を、前立腺癌においては癌と正常腺管での脂質の発現の差異を見だし、その発現の程度と癌の予後との関連性を示した。来年度以降は、今年度ターゲットにした脂質の発現・代謝機構を解明する予定である。

研究担当者

1. 小川 修 京都大学大学院医学研究科
泌尿器科教授
前立腺癌研究総括
2. 戸井雅和 京都大学大学院医学研究科
乳腺外科教授
乳癌研究総括
3. 萩原正敏 京都大学大学院医学研究科
形態形成機構学教授
遺伝子スクリーニング
4. 増田慎三 国立病院機構大阪医療セン
ター乳腺外科医長
乳癌臨床検体の収集
5. 佐藤史顕 京都大学大学院医学研究科
乳腺外科准教授
乳癌実験の実施と臨床検体収集
6. 井上貴博 京都大学大学院医学研究科

泌尿器科講師

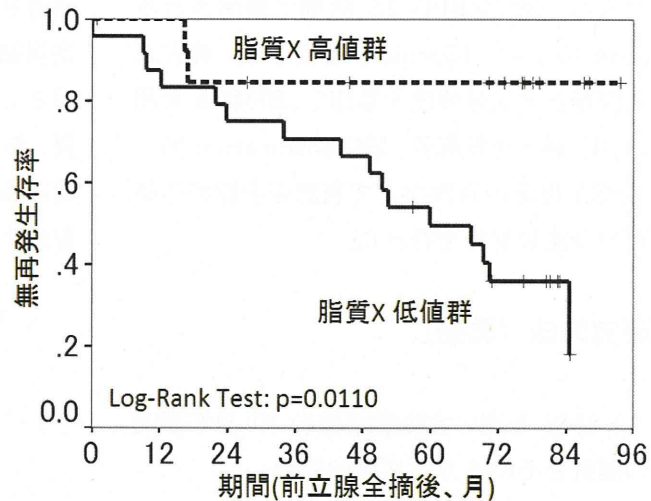
7. 寺田直樹 京都大学大学院医学研究科
泌尿器科助教
前立腺癌実験の実施と臨床検体の収集

研究目的

脂質分析では従来、抽出作業が必要であり、組織上で脂質分布を直接評価することは困難であったが、質量顕微鏡(Imaging mass spectrometry; IMS)はサンプルの抽出なしに組織切片上の生体分子の発現を部位特異的かつ網羅的に評価することが可能である。我々は、産学共同研究である田中耕一FIRST program において、島津製作所の開発した 10 μ m レベルの解像度を持つ次世代高解像度 IMS(Shimadzu:RK27-4050C; the

prototype model of iMScope)を用いて、従来型 IMS では困難であった前立腺癌・乳癌部、正常腺管部、間質部の詳細な部位別の脂質解析方法を確立した(図1) (Kawashima M, *Cancer Sci* 2013, Goto T, *Plos One* 2014)。この技術をもとに、我々はこれまでに、乳癌・前立腺癌組織切片上の脂質の網羅的解析を行い、1)癌細胞に特異的な脂質組成が存在すること(図2)、2)同じ癌細胞でも進展の段階によって脂質組成が異なりうること(図2)、3)特定の脂質組成が癌の転移や患者予後と相関しうること(図3)を見出しており、ホルモン感受性癌における脂質代謝の変化は癌の進展に影響を与え、結果として治療抵抗性獲得を規定しうると思われる。

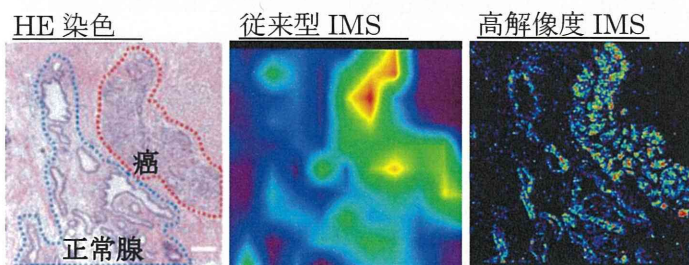
図3：脂質の組成変化が術後再発と関わる



一方で我々は、患者の癌組織を免疫不全マウスに移植する患者由来ゼノグラフト (Patient-derived xenograft; PDX)を作成し、ここからホルモン療法抵抗性に関係するいくつかの遺伝子発現の変化を同定している。

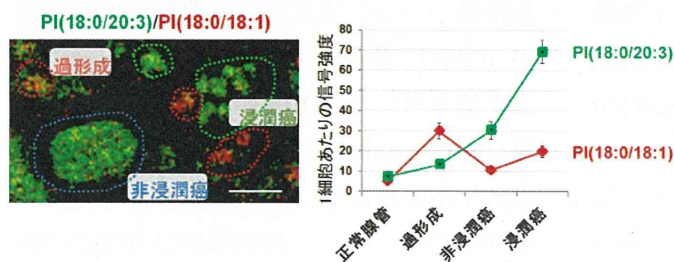
本研究の目的は、乳癌・前立腺癌の臨床組織検体と患者由来ゼノグラフトを

図1 従来型と高解像度 IMS による解像度の比較



用いて、リポドミクスとゲノミクスを統合した解析を行い、癌の進展と治療抵抗性獲得に関わる脂質代謝機構を解明し、その臨床応用を目指すことである。

図2：癌の進行段階により脂質(PI)の組成が異なる



研究方法 (前立腺癌)

前立腺癌全摘標本(OCT 包埋凍結標本)32 症例を対象に IMS を用いた脂質網羅的解析を行った。今年度は positive mode での評価を行った。測定結果を normalize (TIC

法) したのち、それぞれの標本において上位 50 に検出される peak を拾い出した。そのうち、32 症例中 25 症例で検出される peak のうち、15peak に着目した。癌と正常腺管とで信号強度を算出し、SIMCA を用い、1) 癌と正常腺管、2) Gleason score 別、3) PSA 再発の有無などで有意差を認める脂質の多変量解析を行った。

研究方法 (乳癌)

1) IMS を用いた乳腺組織の PI 分布傾向の解析とそのメカニズムの探索

乳腺生検・手術時に採取された、新鮮凍結組織 65 症例分を使用。10 μ m 厚の薄切切片を作成し、IMS の測定に供した。連続切片を用いた HE 染色標本を作製し、測定評価部位を決定。各病変の病理学的診断は病理専門医によって行われた。IMS 測定は先行研究と同様、9-aminoacridine をイオン化用マトリックスとして用い、測定ピッチ 7.7 μ m の negative ion mode にて全 10 種類の Phosphatidylinositol (PI) の分布と病理組織像を比較し、その分布傾向の特徴を評価した。また、各病変で見られた PI の分布傾向の特徴と患者背景 (年齢や閉経状態、BMI など) や病変の進行度 (浸潤・転移の有無)、各病変の病理学的特徴 (組織学的悪性度、ホルモン受容体発現など) との相関を評価した。また、十分量の残組織が得られた症例については組織中から遺伝子変異や発現解析を行うための DNA・RNA 抽出を行った。抽出された RNA を用いて mRNA microarray (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2 Array) による網羅的遺伝子発現解析を行い、PI 分布傾向と相関する遺伝

子発現の検討を行った。

2) 乳癌 PDX モデルの樹立

患者乳癌組織を免疫不全マウスに移植。乳癌組織の生着率の検討を行った。また、足場としてマトリゲルなどの異なる数種の基質、および手術検体から isolation した脂肪組織脂肪由来幹細胞を同時移植し、生着率を向上させる足場の評価を行った。

倫理面への配慮

乳癌および前立腺癌患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の疾患を持つ患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、試料提供、個人情報 を厳格に管理、保存した。既提供検体の使用については各施設の医の倫理委員会により審査されたプロトコル内で遺伝子解析に関わる同意を得たうえで採取された検体を使用する。実験動物に関しては「動物の保護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) および「実験動物の飼育および保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律および基準の他、「大学等における動物実験について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情報第 141 号) の通知を踏まえつつ、実験動物が有効かつ適

切に行われるように配慮した。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し、承認を得た後に実施した。遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)を遵守して実施した。

研究結果 (前立腺癌)

IMSにて検出できた15peakの正常腺管と癌部との信号強度は下記の通りである。これらのうち、正常腺管と癌とで有意に差のあるシグナルを多変量解析にて検索した。その結果、m/z496、534、690が有意に差を認め、癌部でシグナルの低下を認めた(図4)。この3つのシグナルはすべて同じ分子 脂質X(confidential)であることが推察された。

そこでこれらの分子のシグナル強度を前立腺癌の病理学的悪性度の指標であるGleason score別に解析してみた。その結果Gleason score7以下と8以上とで有意に悪性度の高いGleason score8以上の癌でシグナルの強度の低下を認めた(図5)。さらに前立腺全摘後のPSA再発の有無とこれらの

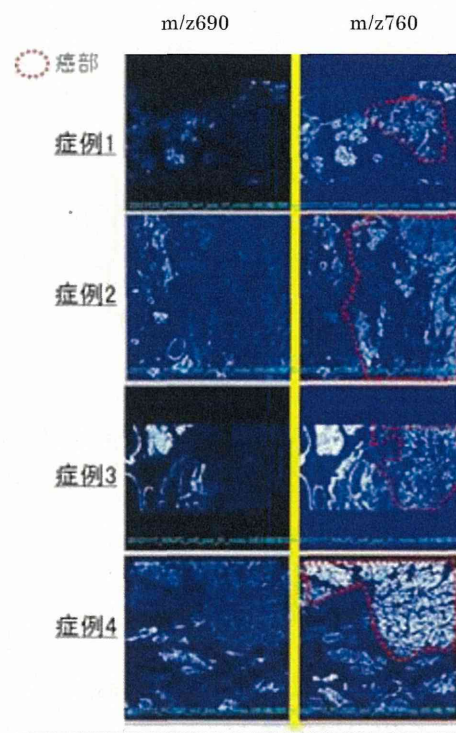


図4 癌部で有意にm/z、690のシグナル低下を認めた。

シグナル強度の低下との関連性を検討した。その結果、PSA再発と来した症例ほど、これらの分子のシグナル強度の低下を有意に認めた。以上の結果から脂質Xの発現低下が前立腺癌の発症や悪性度に関連性があることが示唆された。

N=32	正常腺管		癌部	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
mz496	5067.7	2367.2	2533.5	1674.3
mz518	1262.6	759.1	545.7	343.2
mz524	977.6	383.8	601.4	323.0
mz534	1043.5	678.2	456.3	392.6
mz595	711.9	362.2	660.5	262.6
mz690	2614.4	1541.7	1391.7	961.9
mz703	921.9	456.0	670.1	274.5
mz758	817.6	299.2	878.7	495.8
mz760	2374.5	974.3	2850.3	1451.3
mz782	1515.6	825.7	1403.2	741.0
mz786	597.9	228.2	667.4	361.4
mz798	1160.0	588.9	1020.8	454.4
mz952	847.4	364.4	905.3	545.9
mz954	2644.5	1022.8	3189.0	1732.0
mz980	665.8	250.0	729.5	413.6

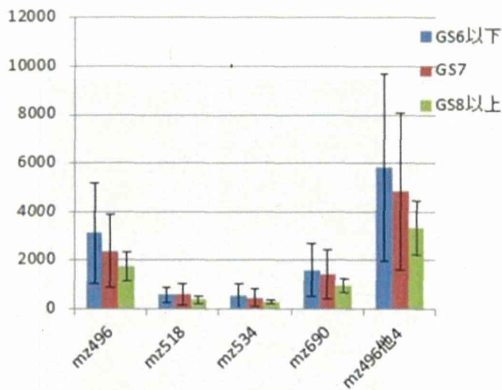


図5 Gleason score8以上の癌で有意に m/z496、518、534、690 のシグナル低下を認めた。

研究結果（乳癌）

1) IMS を用いた乳腺組織のPI分布傾向の解析とそのメカニズムの探索

これまでに全 65 症例から標本が採取された。解析に適さない 9 症例が除外され（目的病変が含まれない 4 症例、極小サンプル 3 症例、測定不良 2 症例）、全 56 症例（浸潤癌 52 病変、非浸潤癌 10 病変、正常腺管 5 病変）の測定結果が解析された。56 症例中 23 症例で DNA・RNA の抽出が可能であった。

病変別の PI 分布の評価では、間質の部分では PI 組成上の特徴にほとんど変化が生じない一方で、癌部では癌の進行度に伴って PI 組成パターンが異なっていることが分かった（図 6）。正常腺管においては 4 価不飽和

図7 1価不飽和PIの集積によって正常腺管と間質、非浸潤癌部を見分けることができる。

和 PI が大半を占めているが、非浸潤癌の癌部では 4 価不飽和 PI の割合は著しく減少し、1 価不飽和 PI の集積が生じており、この分布上の特徴により癌部と間質/正常腺管部を見分けることができることがわかった。（図 6、7）。

一方浸潤癌では 1 価不飽和 PI の他に、多価不飽和 PI の割合が増加する傾向が確認された。（図 6）。浸潤癌においては 1 価不飽和 PI が主に癌部に集積するものと、多価不飽和 PI が癌部に集積するものに傾向が分かれ、症例毎に異なる PI の代謝が行われている可能性が示唆された（図 8）。浸潤癌に

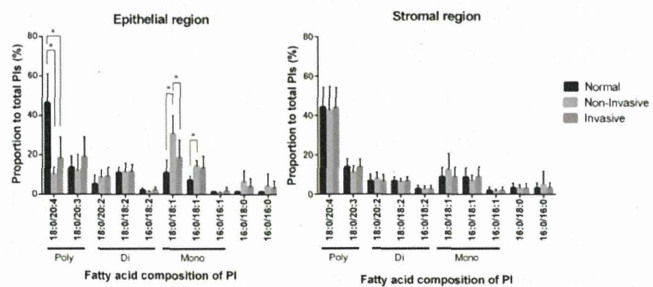
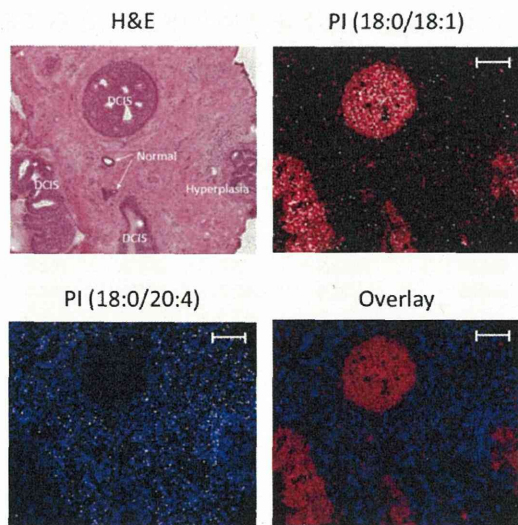


図6 非浸潤癌の癌部では1価不飽和PIの集積が生じている。浸潤癌では多価不飽和PIが増える傾向にある。間質ではPI組成に目立った変化は見られない。



Scale bar; 200 μm

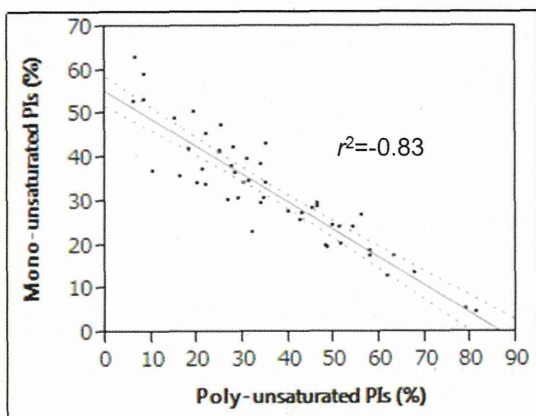


図8 浸潤癌では1価不飽和PI優位の集積と多価不飽和PI優位の集積の2通りの傾向が見られる。

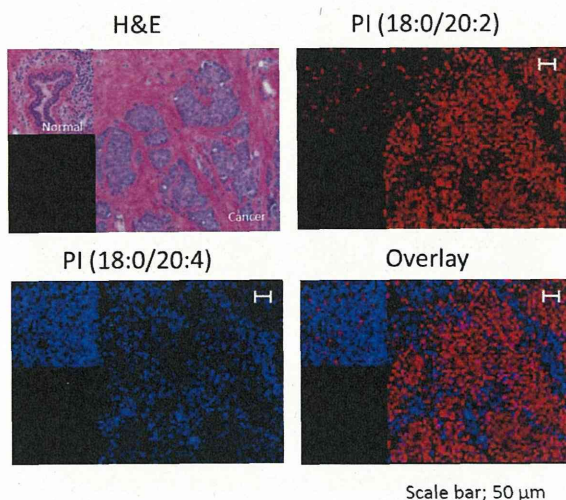


図9 PIの分布で浸潤癌の癌部と周囲間質、正常腺管が区別できる。

においては4価不飽和PI以外のPIの集積によって癌部と間質/正常腺管部を見分けることが可能であった(図9)。

浸潤癌において、1価不飽和PI/多価不飽和PIの組成比とよく相関する因子として、プロゲステロン受容体(PgR)の発現状況、リンパ節転移の有無が独立した因子として抽出された(図10)。また、mRNA microarray

	odd ratio	p-value	95% CI
ER	4.1	0.262	(0.37-106.20)
PgR	0.024	0.0058*	(0.0007-0.369)
Her2	0.192	0.128	(0.017-1.59)
N	4.52	0.0408*	(1.06-24.83)

図10 浸潤癌の多価/1価PI比との相関についての多変量解析結果

に結果から、1価/多価不飽和PIの組成比と相関する遺伝子群が同定されており現在その解析を進めている。

2) 乳癌PDXモデルの樹立

これまでに乳癌原発巣由来のPDXを8症例分(マウス:平均2.25匹/症例)、リンパ節転移を含めた転移巣由来のPDXを4症例分(マウス:平均2匹/症例)作成した。移植後平均5週(range:2-9週)経過した時点で、明らかな腫瘍の生着を認めているのは1症例(マウス1/2匹)である。今後、移植後16週まで観察し、PDXの生着率の向上に関与すると思われる宿主側および腫瘍側の因子を解析する予定である。

考察(前立腺癌)

先行研究ではnegative modeを用いた前立腺癌部と正常腺幹部とでの脂質の網羅的解析を行ったが、今年度は別の検出法(positive mode)にて脂質の変化を検討した。その結果、ある脂質Xが再現性をもって有意に正常腺管に比べ癌部でシグナルの低下を認めた。

この分子の発現低下は前立腺癌の悪性度や術後再発とも相関があるので、前立腺癌への生物学的な意義が示唆された。来年度以降この脂質Xの発現・代謝機構を探索して、前立腺癌での役割を検討する予定である。

考察（乳癌）

我々が先行して行った少数例の検討で、癌部で PI の組成が変化している可能性が示唆されていたが、本検討においてもその傾向は良好な再現性をもって確認された。新たな知見として、非浸潤癌の特徴として 1 価不飽和 PI の著明な集積が生じることが明らかにされた。さらに、癌の浸潤とリンパ節転移とよく相関する形で、癌部の PI の不飽和度が上昇する傾向が示された。また、癌部での PI の不飽和度の上昇と PgR 発現が強い相関を示し、これは PI のリモデリングが女性ホルモンの中でも特にプロゲステロンによる調節を受けている可能性を示唆する結果であった。現在解析を進めている mRNA の発現解析の結果などと組み合わせることで、浸潤・転移を規定する PI リモデリングに関わる遺伝子調整機

構を明らかにしていく。さらに、現在樹立を試みている乳癌 PDX モデルを用いて内分泌療法が PI リモデリングに与える影響について検証を進めていく。

結論（前立腺癌）

前立腺癌と正常腺管とでは脂質の発現に差異を認め、これらが診断や治療ターゲットになる可能性が示唆された。

結論（乳癌）

乳癌の癌部の PI の不飽和度は癌の浸潤転移状態に応じて異なることが示された。PI の不飽和度の違いはプロゲステロンによる制御を受けている可能性が示唆された。

ム：イメージング質量分析の最前線：
創薬と生命科学への応用 2014/10/18
京都

学会発表（前立腺癌・乳癌）

1. 後藤崇之、小川 修 他：高解像度質量顕微鏡を用いた in situ 脂質発現プロファイル解析による前立腺癌バイオマーカー探索 2014/9/25 第 73 回日本癌学会総会 横浜

2. 川島雅央、戸井雅和「質量顕微鏡を用いた乳がんのバイオマーカー探索」『第 87 回 日本生化学会大会』シンポジウ

3. Kawashima M, Kawaguchi-Sakita N, Sugimoto M, Sato TA, Tanaka K, Toi M. High-resolution MALDI imaging mass spectrometry demonstrated the correlation between phosphatidylinositol profiles and invasion/metastasis in human breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 9th, 2014, San Diego, CA.

論文発表（前立腺癌・乳癌）

今年度は該当なし

知的財産権の出願・登録状況（前立腺癌・乳癌）

今年度は該当なし

