

令和 2 年 4 月 3 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860083

氏 名 有馬 浩平

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ボストン（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
膵癌幹細胞を制御するアラキドン酸代謝物の統合解析
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 17 日 ～ 令和 2 年 3 月 4 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

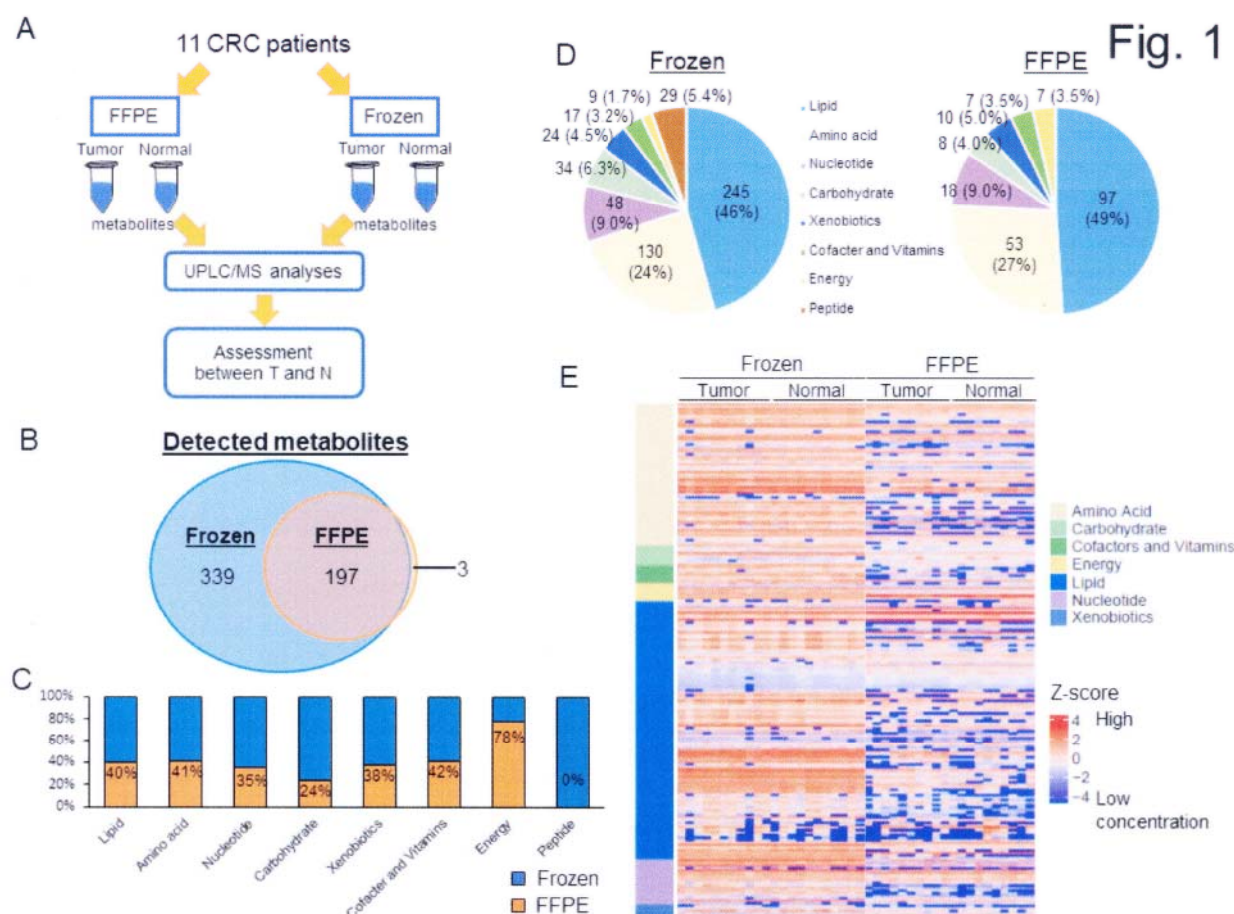
1. 代謝物網羅的解析における FFPE 切片の有用性

癌において特定の代謝経路が活性化していることはよく知られており、癌において活性化または不活性化された代謝物・代謝経路を同定・検出することにより、癌の早期発見および治療感受性のバイオマーカーとなり得る。代謝物は色々な影響を受けやすいため、解析に用いられるサンプルは凍結切片であることがほとんどである。一方で、日常診療において手術または生検を行った全症例に凍結切片を用意することは容易でなく、凍結切片を多数有する大規模コホートはほとんどないのが現状である。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルは病理診断に用いられるため、基本的に組織を有する全症例が利用可能であり、FFPE サンプルを代謝物解析に用いることができれば、大規模コホートサンプルへの応用もでき、1000 を超える大多数のサンプルを用いた信頼性のある解析が可能となり、今後の臨床応用も容易となる。そこで代謝物解析における FFPE サンプルの有用性について検討した。

まず当研究室で多くのサンプルを所有する大腸癌症例を用いて研究を開始した。11 症例の腫瘍組織、正常組織ペアを有する FFPE 切片、凍結切片、計 44 サンプルを用いて高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析器 (UPLC/MS/MS) を用いた代謝物の網羅的解析を行った。

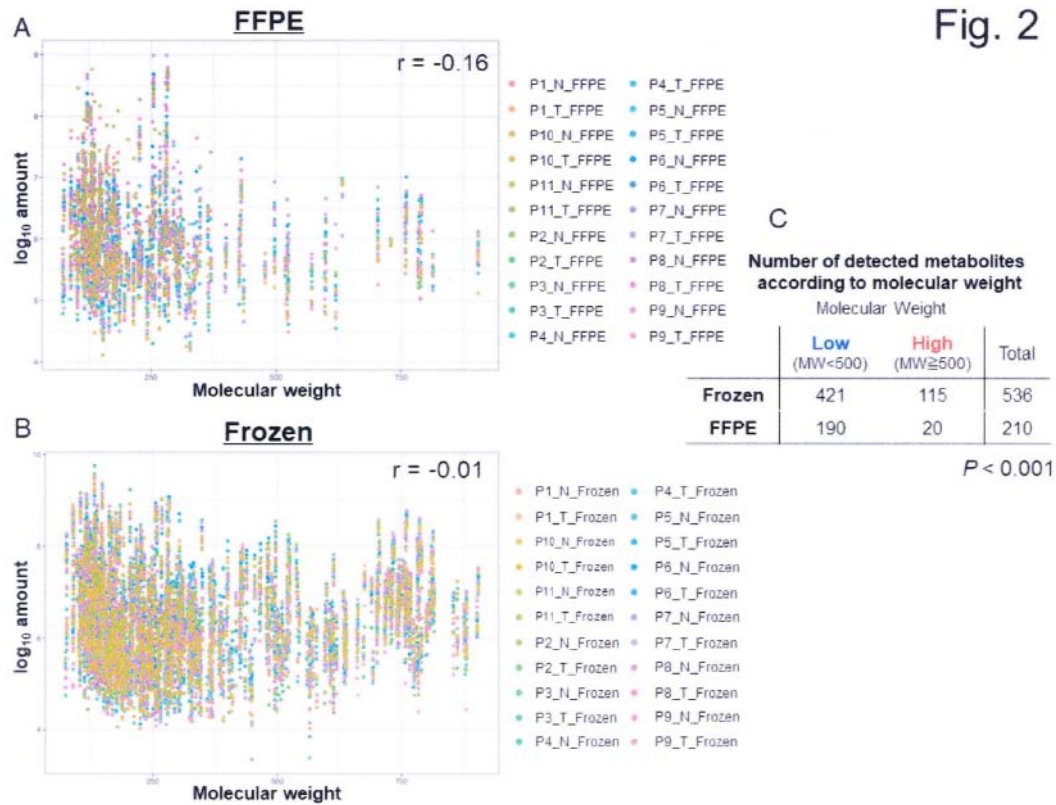
凍結切片に対する FFPE 切片における代謝物の保存率

解析の結果、凍結切片から 536 の代謝物、FFPE 切片から 200 の代謝物が検出でき、うち 197 の代謝物が共通であった。代謝物の性質によっても FFPE 切片での凍結切片に対する代謝物の保存率は異なっており、分子量の大きなペプチドは FFPE 切片からは全く検出できなかった。一方で、脂質やアミノ酸、エネルギー関連の代謝物は FFPE 切片での保存率が比較的高い傾向にあった。



さらに、代謝物の分子量と検出された代謝物量との関連をみてみると、凍結切片ではほとんど関連はないが、FFPE 切片において強い逆相関関係を認めた ($r = -0.16$)。分子量の大きい代謝物は組織が FFPE で保存される過程で失われやすいことがわかった。

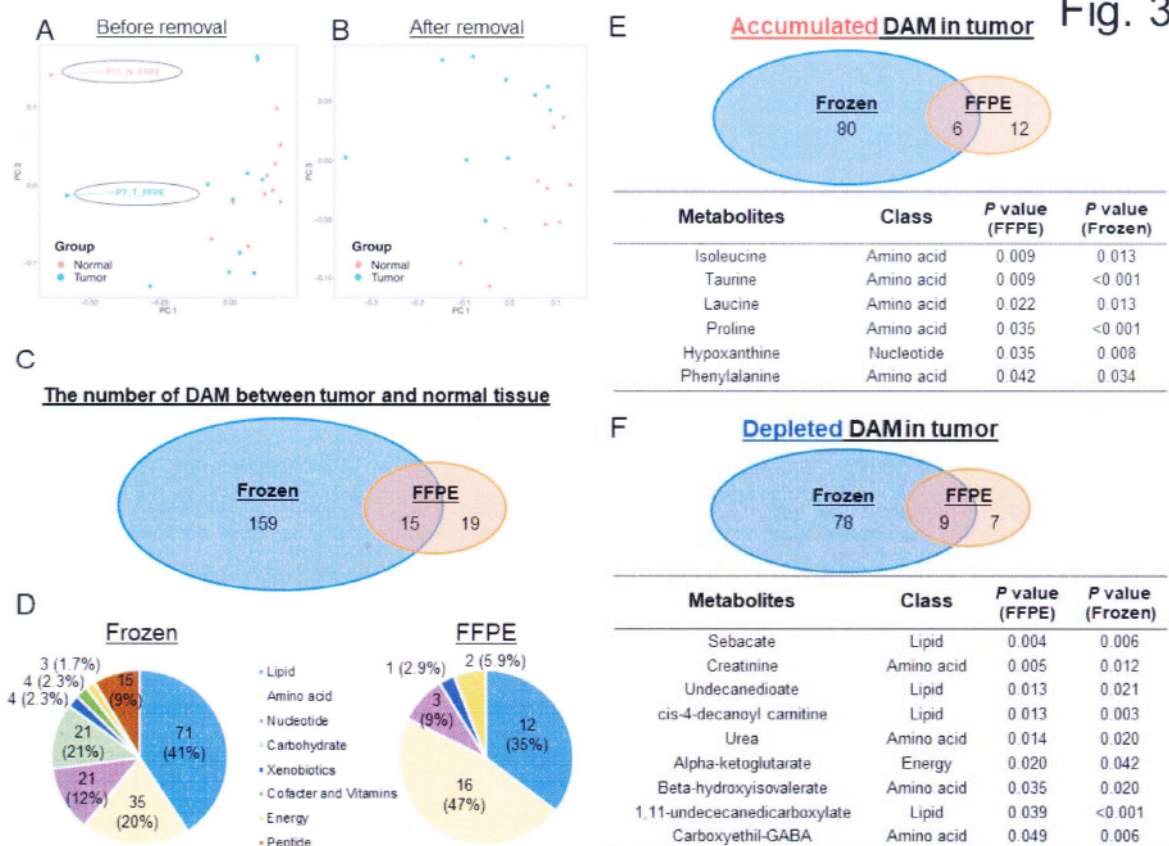
Fig. 2



癌部と正常部における代謝物の違い

癌部と正常部において発現の異なる代謝物に関して、凍結切片から 174、FFPE 切片から 34 の代謝物を同定することができ、うち 15 の代謝物が共通であった。このうち、6 つの代謝物が癌部で蓄積しており、9 つの代謝物が癌部で枯渇していた。蓄積していた代謝物として、分子鎖アミノ酸(BCAA)として知られるイソロイシン、ロイシンが含まれていた。一方、枯渇していた代謝物として、グルタミン酸代謝や TCA サイクルを構成する α -ケトグルタル酸が含まれており、過去の報告と矛盾しない結果であった。一部ではあるが、FFPE 切片由来の代謝物も生体における代謝プロファイルを捕捉できていることが示された。

Fig. 3



癌部と正常部における代謝経路の違い

Pathway analyses を用いて、癌部と正常部において活性度の異なる代謝経路を解析した。うち癌組織において活性化している 1 つの代謝経路 (Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、癌組織において不活性化している 3 つの代謝経路 (Glycine, serine, and threonine metabolism、Glycerophospholipid metabolism、Arginine and proline metabolism) が FFPE 切片と凍結切片において共通の活性度の異なる代謝経路として同定された。これら 4 つの同定された代謝経路はすでに報告されており、代謝経路としてみても、一部ではあるが FFPE 切片由来の代謝物も生体における代謝プロファイルを捕捉できていることが示された。

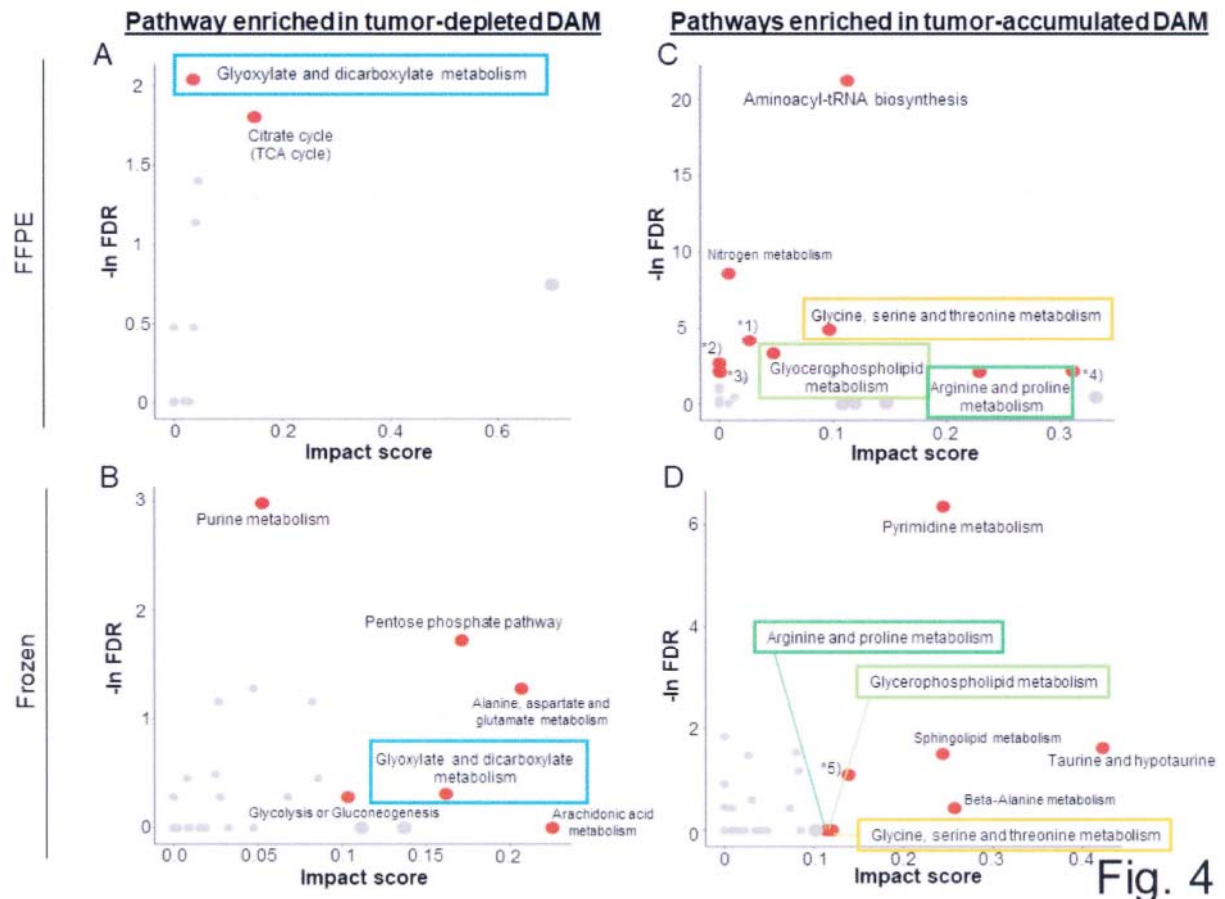


Fig. 4

まとめと今後の予定

大腸癌において、代謝物解析に FFPE 切片を用いても凍結切片と部分的に一致していることを明らかにした。分子量の小さい代謝物に限れば FFPE 切片を用いた代謝プロファイルは凍結切片を捕捉しており、応用が可能である可能性を示すことができた。本プロジェクトは *Molecular Cancer Research* 誌に accept された (Arima et al. *Mol Cancer Res.* 2020)。Metabolomics はますます注目を集めている最も新しい-omics 研究であり、今後膵癌における有用性も検討し、大規模前向きコホートを用いた解析についても試みたい。

2. 大腸癌における組織学的 Lymphocytic reaction の意義と予後に対する影響

免疫チェックポイント阻害薬の癌への治療効果が認められたことにより、宿主の癌に対する免疫反応は、現在非常に注目を集めている分野である。大腸癌においても、リンパ球浸潤が高度な症例では予後が良いことが知られている。リンパ球浸潤を詳細にみると、病理学的には Crohn's-like lymphoid reaction、Peritumoral lymphocytic reaction、intratumoral periglandular reaction、tumor-infiltrating lymphocytes の 4 つの組織学的 Lymphocytic reaction として分類できることが知られているが、それぞれがどのようなメカニズムで生じているかや、どのような大腸癌 subtype と関連しているかは未だ不明である。そこで、米国における 2 つの大規模前向きコホート研究 Nurses' Health Study

および Health Professionals Follow-up Study において発生した 4,420 例の大腸癌のうち、組織学的 Lymphocytic reaction の評価を行った 1,465 例を用いて、組織学的 Lymphocytic reaction と大腸癌 subtype および予後との関連を評価した。

組織学的 Lymphocytic reaction は近位側症例、早期癌症例、高分化型症例、MSI-high 症例、CIMP-high 症例、LINE-1 高メチル化症例、*BRAF* 遺伝子変異症例、CTNNB1 (β カテニン) 陰性症例、および高 neoantigen 症例において有意に高度であった ($P < 0.005$)。予後解析においては、すべてのタイプの組織学的 Lymphocytic reaction において、高度浸潤症例は有意に予後良好であった ($P_{\text{trend}} < 0.002$)。それぞれが独立予後因子である neoantigen、MSI status による影響を避けるため、これらによる subgroup 解析を行ったが、これら因子の影響に関係なく、それぞれが独立予後因子となった。

本プロジェクトは British Journal of Cancer 誌に accept された (Haruki K, Arima K et al. *Br J Cancer*. 2020)。それぞれの組織学的 Lymphocytic reaction がどのようなメカニズムで *BRAF* 遺伝子変異などの大腸癌 subtype と関連しているかは今後の課題である。

3. 大腸癌における Autophagy と *Fusobacterium nucleatum* の関連

近年、がんの発癌・進展において腸内細菌叢が多くの癌種において関連し、抗腫瘍免疫や癌幹細胞性などにも関与することが示唆されている。その1つとして *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は sequence 機器の発達によって大腸癌組織中および大腸癌患者の便中から同定されたグラム陰性桿菌であるが、癌細胞自体の増殖能の向上作用に加えて、抗腫瘍免疫能の低下など様々なメカニズムを介して大腸癌の発癌・進展に影響を与えることが報告されている。一方で、Autophagy は自身の細胞内のタンパク質をリソソームと融合させて分解する仕組みであり、過剰なタンパク質のリサイクルや細胞質内に侵入した病原微生物を排除して生体の恒常性維持に関与することが知られてきている。ただ癌における Autophagy の意義については controversial であり、未だ不明な点も多い。そこで、米国における 2 つの大規模前向きコホート研究 Nurses' Health Study および Health Professionals Follow-up Study において発生した 4,420 例の大腸癌のうち、大腸癌組織中の *F. nucleatum* DNA を qPCR 法にて測定し、かつ Autophagy の主要なマーカーであり BECN1 (beclin 1)、MAP1LC3 (LC3)、SQSTM1 (p62) を免疫組織学的染色にて測定を行った 724 例を用いて、Autophagy と大腸癌組織中 *F. nucleatum* との関連を評価した。また reference として、腸管内の常在菌の1つである *Bifidobacterium* DNA を用いて Autophagy との関連を評価した。

大腸癌組織における BECN1 の発現は、大腸癌組織中の *F. nucleatum* DNA 量と有意に逆相関関係を認めた ($P < 0.001$)。一方で、大腸癌組織における MAP1LC3 および SQSTM1 の発現は、*F. nucleatum* との有意な相関を認めなかった ($P > 0.061$)。また、BECN1、MAP1LC3、SQSTM1 のいずれも大腸癌組織中 *Bifidobacterium* DNA 量とは有意な相関を認めなかった ($P > 0.13$)。さらに、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行って Autophagy と *F. nucleatum* との関連を評価したところ、同様に有意に BECN1 発現と *F. nucleatum* DNA 量は逆相関することが示された ($P_{\text{trend}} < 0.001$) が、*Bifidobacterium* とは有意な相関を認めなかった。

本プロジェクトは Journal of Pathology 誌に accept された (Haruki K, Arima K et al. *J Pathol*. 2019)。大腸癌組織中の Autophagy がどのようなメカニズムで *F. nucleatum* を排除しているかは今後の課題であるが、今回の Population-based study は Autophagy および腸内細菌叢をターゲットとした新規治療戦略の架け橋となりうる。