

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Investigation of innovative preemptive medical seeds for hormone  
dependent cancers by integration of lipidomics and genomics database
- 研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 泌尿器科 教授 小川 修  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. Urology, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Professor Osamu Ogawa
- 実施期間： 平成26年5月1日～平成29年3月31日
- 研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 乳腺外科 教授 戸井雅和  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. Breast Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Professor Masakazu Toi
- 研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学 教授 萩原正敏  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. Anatomy and Development Biology, Kyoto University Graduate  
School of Medicine, Professor Masatoshi Hagihara
- 研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 泌尿器科 准教授 井上貴博  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. Urology, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Associate Professor Takahiro Inoue
- 研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 乳腺外科 准教授 佐藤史顕  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. Breast Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Associate Professor Fumiaki Sato

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 泌尿器科 助教 寺田直樹  
所属 役職 氏名: (英語) Dept. Urology, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Assistant Professor Naoki Terada

研究開発担当者 (日本語) 独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター 乳腺外科  
医長 増田 慎三  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Breast Surgery, National Hospital Organization Osaka  
National Hospital, Head Physician Norikazu Masuda

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### ➤ 前立腺癌

- 前立腺癌全摘標本(OCT 包埋凍結標本)31 症例を対象に IMS を用いて脂質の網羅的解析を行った。癌と正常腺管とで信号強度を各々算出し、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ところ、m/z 496、518、534、690、703 が有意に差を認め、いずれも癌部でシグナルの低下を認めた。この前者 4 つのシグナルはいずれも lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) とその付加体であり、m/z 703 は shingomyelin(d18:1/16:0)であった。lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) の付加体のシグナル強度は相互に相関していたので、lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH+H<sup>+</sup>) を lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) 代表分子として前立腺全摘術後の PSA 再発に関わる臨床・病理学的因子を Cox 回帰分析で解析した。その結果、lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) のシグナル強度が唯一 PSA 再発と関連しており、lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) のシグナルが低下している症例ほど予後不良である傾向にあった。以上の結果を論文として報告した(Goto T, Ogawa O et al. Prostate; 75, 1821-1830, 2015)。
- 前立腺癌(PC)患者 30 例、非癌症例(BPH)30 例の血液を対象に、前分離装置 UPLC H-class(Waters)、質量分析装置 Xevo G2-S Q-Tof システム(Waters)を組み合わせた測定系による Untargeted metabolomics 解析を行った。PC と BPH とで有意差のあるマススペクトルを見出した。データベース検索や MS/MS 解析を行った結果、これまで前立腺癌や他癌腫でも疾患マーカーとして報告のない前立腺癌特異的に増加する血中分子を同定することに成功した。
- 継代可能な新規 5 種類の前立腺癌 PDX を樹立し Androgen receptor やその下流遺伝子産物である PSA の発現解析を行った。さらにこれらの新規 PDX と既存の PDX モデル(KUCaP2)および前立腺癌の代表的細胞株 LNCaP 細胞の xenograft それぞれから RNA を採取して RNA-Seq による遺伝子発現解析を行った。その結果 PDX にて脂質合成に関わる遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした。

### ➤ 乳癌

- 乳癌の臨床組織検体と患者由来ゼノグラフトを用いて組織の脂質組成解析および網羅的遺伝子発現解析を行い、乳癌の進展に関わる脂質組成の変化と、それに伴い変化する脂質代謝関連遺伝子および腫瘍免疫関連遺伝子経路を同定した。また、低酸素と性ホルモンシグナルが脂質代謝経路に関与する可能性も見出した。以上の結果については現在論文投稿中である。また、上記で同定した分子が乳癌の進展および腫瘍免疫に与える影響を検証するために、遺伝子改変細胞株を樹立するとともに、患者

由来ゼノグラフトの治療抵抗性獲得モデルおよびヒト免疫を有したヒト化マウスモデルを樹立した。今後はこれらのモデルを使用して上記分子の機能解析を行う予定である。

➤ Prostate cancer

- Prostate tissues derived from 31 Japanese males with clinically localized prostate cancer who underwent radical prostatectomy, which were embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound, were evaluated. The tissues were analyzed using the 10 $\mu$ m pitch of high-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (HR-MALDI-IMS) as described previously (Goto T et al. PLoS ONE 2014; 9:e90242) in positive mode in the mass range of m/z 490-1000. A comparison of the signal intensities between cancer and benign epithelium revealed that five molecules were significantly lower in the former than the latter with m/z measurements of 496, 518, 543, 690, and 703, respectively. The structures of these molecules were examined by MS/MS analyses of the peaks of their precursor ions, showing that the molecules at m/z 496, 518, 543, and 690 were lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0/OH) with various ion adducts. On the other hand, m/z 703 was shingomyelin(d18:1/16:0). Since the levels of expression of LPC (16:0/OH+H<sup>+</sup>) in these samples strongly correlated with the levels of the others, and therefore, the level of expression of LPC (16:0/OH+H<sup>+</sup>) was considered representative of LPC (16:0/OH). Multivariate Cox regression analyses, including clinic-pathological factor together with the expression of LPC (16:0/OH+H<sup>+</sup>) and shingomyelin(d18:1/16:0), to assess the correlation with PSA recurrence free survival after radical prostatectomy, revealed that the only significant predictor of PSA recurrence was the expression level of LPC (16:0/OH+H<sup>+</sup>). The results were described and published as Goto T, Ogawa O et al. Prostate; 75, 1821-1830, 2015.
- Serum samples derived from 30 prostate cancer (PCa) patients and 30 non-PCa patients (benign hypertrophy: BPH) were prepared for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. Metabolites were separated and analyzed by the analytical platform consisted of a UPLC H-class (Waters) connected online to Xevo G2-S Q-ToF system (Waters) followed by multivariate statistical analysis for detecting molecules to discriminate PCa and BPH. One molecule which clearly discriminate PCa and BPH was discovered. Tentative identification of the molecule was performed by database search and that was finally confirmed by using the synthetic molecule. The molecule has not been reported elsewhere as a diagnostic marker of PCa and of other malignancies and can be a novel molecular target for PCa diagnosis.
- New five prostate cancer patient-derived xenografts (PDXs) have been established and evaluated androgen receptor and PSA expression. RNA was extracted from the PDXs and LNCaP xenografts, and RNA Seq was performed for the expression analysis. We have identified that various genes related to lipid synthesis and metabolism were up-regulated or down-regulated in the new PDXs. We are now performing integrative analysis of the gene and lipid expressions to evaluate abnormalities exist in PCa progression.

➤ Breast cancer

- Using human breast cancer tissues and new breast cancer PDX tumors established, we have performed integrative analysis of the gene and lipid expressions. We identified that fatty acid composition in phosphatidylinositols (PIs) may change according to breast cancer progression. We also found that genes related to lipid metabolism and tumor-associated immune system were correlated with changes in the fatty acid composition in breast cancer progression. We also identified that hypoxic stress exerted on cancer cells and hormonal stimulation may have some roles in breast progression through lipid metabolic changes. In order to confirm the results, we have established some cell lines which over-/down-regulated in the target genes related with changes in lipid metabolism. We also established some therapeutic resistant-PDX models in breast cancer and humanized mice to elucidate immune response to the tumors.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3 件、国際誌 1 件）

1. Goto T, Terada N, Inoue T, Kobayashi T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Utsunomiya N, Makino Y, Sumiyoshi S, Yamasaki T, Kamba T, Ogawa Q. Decreased expression of lysophosphatidylcholine (16:0/OH) in high resolution imaging mass spectrometry independently predicts biochemical recurrence after surgical treatment for prostate cancer. *Prostate*. 2015 Dec;75(16):1821-30.
2. 後藤崇之、井上貴博、小川 修 高解像度マスマスペクトロメトリーによる前立腺がん脂質バイオマーカーの探索 腎臓内科・泌尿器科 2016 4(6), 594-598
3. 井上貴博、小川 修 前立腺癌の基礎研究の現況 2016 日本臨床 74(1): 7-12
4. リン脂質による乳癌の分子診断. 川島雅央、戸井雅和. 医学のあゆみ. 2016, 257(12), 1203-9.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 質量顕微鏡を用いた乳がんの脂質バイオマーカー探索, 口頭 (招待口演), 川島雅央, 戸井雅和, 『第 104 回 日本病理学会総会』シンポジウム: 光科学の進歩と医学・病理学研究, 2015/5/2, 国内.
2. 質量顕微鏡を用いた乳がんのバイオマーカー探索, 口頭 (依頼口演), 川島雅央, 『第 87 回 日本生化学会大会』シンポジウム: 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, 国内.
3. High-resolution MALDI imaging mass spectrometry demonstrated the correlation between phosphatidylinositol profiles and invasion/metastasis in human breast cancer. Kawashima

M, Kawaguchi-Sakita N, Sugimoto M, Sato TA, Tanaka K, Toi M. AACR Annual Meeting 2014/4/9, 国外

4. 高解像度質量顕微鏡を用いた前立腺癌組織 *in situ* 脂質分布解析による新規バイオマーカー探索、ポスター：研究奨励賞受賞 後藤崇之、寺田直樹、井上貴博、小林恭、岡田能幸、宮崎有、植垣正幸、宇都宮紀明、牧野雄樹、山崎俊成、神波大己、小川修 第24回泌尿器分子細胞研究会 2016/2/27、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願