慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Imaging Mass-spectrometryの癌領域での臨床応用へ向けて
Sub Title	Clinical application of Imaging Mass-spectrometry in cancer field
Author	安田, 浩之(Yasuda, Hiroyuki)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	癌患者の予後は依然不良で, その改善のためには多方面から癌医療を改善する必要がある。Imaging Mass-spectrometry(MS)は, 組織切片内の各局在部位(ピクセル)での標的分子を質量分析器を用いて網羅的に定量し, それを「可視化」することができる最新の工学的technologyです。本研究の中で我々は, 血管新生阻害薬が癌細胞にどのような影響を与えるかを明らかにしました。Imaging MSを用いて抗癌剤がどのように効果を発揮するかを明らかにすることで, 抗癌剤の効率的な使用方法の確立につながる可能性があると考えている。 The prognosis of cancer patients is poor. To improve the prognosis of cancer patients, variable approaches are necessary. Imaging mass-spectrometry (IMS) is a novel technology, which enables one to viisualize the distribution of hundreds of metabloite in tissues. Using this novel technology, we treid to clarify the mechansims of efficacy of some anti-cancer agents. We focused on anti-angiogenic agents such as nintedanib or bevacizumab. We partly clarified the mechanisms of efficacy of these agents by in vivo experiments with IMS. The findings will help developing an effective and appropriate treatement using anti-angiogenic agents.
Notes	研究種目 : 挑戦的萌芽研究 研究期間 : 2015 ~ 2016 課題番号 : 15K14398 研究分野 : 癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K14398seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２７　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１４３９８

研究課題名（和文）Imaging Mass-spectrometryの癌領域での臨床応用へ向けて

研究課題名（英文）Clinical application of Imaging Mass-spectrometry in cancer fileld

研究代表者

安田　浩之（Yasuda, Hiroyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：７０３６５２６１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：癌患者の予後は依然不良で、その改善のためには多方面から癌医療を改善する必要がある。Imaging Mass-spectrometry (MS)は、組織切片内の各局在部位（ピクセル）での標的分子を質量分析器を用いて網羅的に定量し、それを「可視化」することができる最新の工学的technologyです。本研究の中で我々は、血管新生阻害薬が癌細胞にどのような影響を与えるかを明らかにしました。Imaging MSを用いて抗癌剤がどのように効果を発揮するかを明らかにすることで、抗癌剤の効率的な使用方法の確立につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：The prognosis of cancer patients is poor. To improve the prognosis of cancer patients, variable approaches are necessary. Imaging mass-spectrometry (IMS) is a novel technology, which enables one to viisualize the distribution of hundreds of metabloite in tissues. Using this novel technology, we treid to clarify the mechansims of efficacy of some anti-cancer agents. We focused on anti-angiogenic agents such as nintedanib or bevacizumab. We partly clarified the mechanisms of efficacy of these agents by in vivo experiments with IMS. The findings will help developing an effective and appropriate treatement using anti-angiogenic agents.

研究分野：　癌

キーワード：　癌　血管新生阻害薬　代謝

１．研究開始当初の背景

我々は、今まで臨床現場で肺癌患者に抗癌剤治療を行うとともに、抗癌剤の感受性に関する研究を精力的に行ってきた。その中で、より効果的な抗癌剤治療を行うためには、「生体内」に近い状態で抗癌剤が癌組織に「何をしているのか」を、詳細に解明することが必要であると考えた。

Imaging MS は、組織切片内の各局在部位（ピクセル）での標的分子を質量分析器を用いて網羅的に定量し、それを可視化することができる最新の工学的 technology である。我々は、一回の解析で約 200 種類に及ぶ代謝因子を生体内に近い状態で定量化、imaging する(代謝マッピング)独自の実験基盤を確立している。代謝因子を定量することで、どの細胞が解糖系や酸化的リン酸化などの代謝経路を活発に動かしているか、抗癌剤による酸化ストレスに対抗するためにグルタチオン（還元型）を産生しているのかなど細胞の「生きの良さ」を評価することが可能である。

これを抗癌剤投与後の癌組織に用いることで、抗癌剤が癌組織に「何をしているか」を把握することが可能になる。さらに Imaging MS で用いた腫瘍切片と連続した切片を用いて、アポトーシスマーカーなどとの免疫組織染色(IHC)と組み合わせることで、単なる descriptive な計測のみでなく、生物学的な意味の「理解」も可能になる。

我々は、Imaging MS が癌医療を大きく改善する、強力な「武器」になると感じている。

２．研究の目的

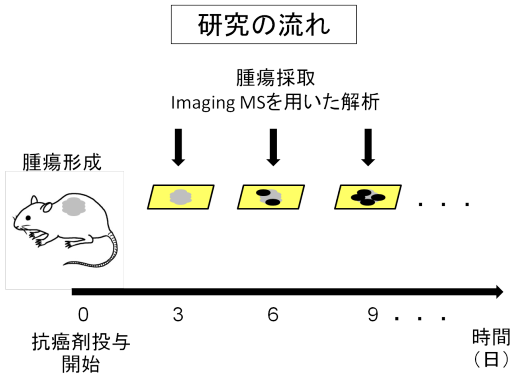
本研究の目的は、「Imaging MS を用いて、抗癌剤の効果を可視化し、それによって抗癌剤がどのように効果を発揮するのか POC(Proof of Concept)を取得することである。

３．研究の方法

本研究では、研究期間を通して免疫不全マウスの皮下に癌細胞株を移植し腫瘍を形成させるマウス xenograft model を用いる。本研究の前半部分では、Imaging MS による解析を xenograft tumor に適応するための実験系の確立を行う。抗癌剤投与前の xenograft tumor に対して Imaging MS とアポトーシスマーカー、増殖マーカー、血管内皮細胞マーカー等に対する IHC とも組み合わせ、腫瘍内の代謝因子の分布を明らかにし、腫瘍内局所でどのような部位（辺縁部？血管の近く？）にある細胞が健康的なのか、どのような代謝パターンを示すのかを detect できる実験系の確立を目指す。

抗癌剤投与を行うマウス研究の流れは次の通りである。

免疫不全マウス(Balb-c nu)に癌細胞株を皮下移植し腫瘍形成後、抗癌剤（コントロール群は溶媒のみ）の投与を一定期間行い、その間腫瘍径をモニターする。複数の time point でマウスを犠牲死させるとともに腫瘍を採取(harvest)し、Imaging MS に供する(下図)。本研究中に、多くの抗癌剤を用いて研究をするのは困難であり、抗癌剤は数種類に絞って行う。具体的には臨床の現場で汎用されているシスプラチンおよび EGFR に対する分子標的治療薬である erlotinib、近年盛んに開発されている血管新生阻害薬を使用する。



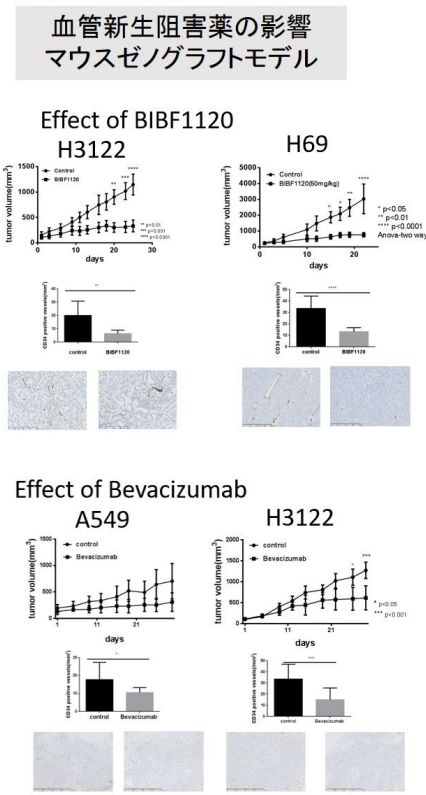
４．研究成果

・血管新生阻害薬が肺癌細胞に与える影響の評価。

我々は、血管新生阻害薬が肺癌細胞に与える影響を Imaging MS などの解析手法を用いて評価した。具体的には、nintedanib (BIBF1120)および bevacizumab の２つの薬剤が肺癌細胞に与える影響を評価した。

両薬剤ともに、コントロール群に比べて腫瘍抑制効果を発揮した。また、両薬剤ともに血管密度が低下することが明らかになった。

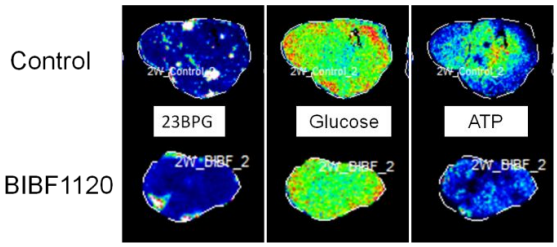
前の図に示した通り、血管新生阻害薬が腫瘍



の増殖しているのが分かる。また、腫瘍内の血管密度が低下していることもわかる。

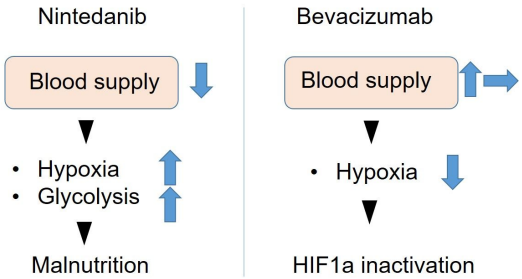
次に、この抗腫瘍効果がいかにして発揮されるのかを理解するためにImaging MSを用いた解析を行った。
その結果、nintedanibでは、腫瘍組織での血流が低下するとともに、嫌気的代謝の活性化、ATP 濃度の低下が起こることが明らかになった。（次図）

血管新生阻害薬BIBF1120のPOC



一方、bevacizumab群では、血流の低下は認められず、逆にATP濃度の上昇を認めた。本知見は、同じ血管新生阻害薬に入る薬剤の中でもnintedanibとbevacizumabでは作用機序が異なることを示した新たな知見である。
現時点で我々が考えているnintedanibとbevacizumabの作用機序の違いは以下の図に示した通りである。
つまりnintedanibでは腫瘍内での血流が

血管新生阻害薬の作用機序の違い

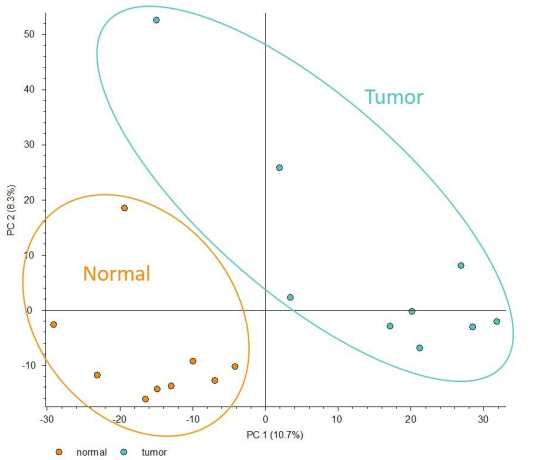


低下しそれに伴い、酸素化の低下、嫌気的代謝経路の活性化が起こりいわゆる低栄養によって抗腫瘍効果を発揮する（兵糧攻め）のに対して、bevacizumabは、血流はむしろ正常化し、腫瘍局所での酸素化が改善することで、癌細胞にとって重要な経路であるHIF1aの経路の不活性化を誘導しそれによって抗腫瘍効果を発揮しているのではないかと考えている。
本研究結果は、血管新生阻害薬を用いたより有効な併用療法などの開発につながる可能性がある。

・ヒト肺癌組織への応用
我々は、構築した研究基盤をヒト肺癌検体に適応できるかを評価した。その結果、癌組織由来の代謝産物を高精度で定量できることが明らかになった。

下の図は、肺癌患者から採取した癌組織および近接する非癌部組織を用いて行ったメタボローム解析の結果の一部である。
この結果からも、ヒトの癌組織と非癌部組織で代謝産物のパターンが明確に異なることが明らかである。

癌と非癌部組織の代謝因子の違い



今後、上記知見をもとにヒトの癌組織で抗癌剤の効果を評価するなどの研究につなげていく予定である。
また、癌領域でImaging MSを臨床応用するために多方面からのアプローチで研究を続けていく予定である。

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 3 件）

1: Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. Cancer Res. 2017 Apr 15;77(8):2078-2089. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2359. Epub 2017 Feb 15. PubMed PMID: 28202511.（査読あり）

2: Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Hayashi Y, Betsuyaku T, Soejima K. Overcoming EGFR Bypass Signal-Induced Acquired Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors in ALK-Translocated Lung Cancer. Mol Cancer Res. 2017 Jan;15(1):106-114. doi:

10.1158/1541-7786.MCR-16-0211. Epub 2016 Oct 5. PubMed PMID: 27707887. （査読あり）

3: Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, Arai D, Nukaga S, Miyawaki M, Kawada I, Naoki K, Costa DB, Kobayashi SS, Betsuyaku T, Soejima K. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. Oncotarget. 2015 Nov 17;6(36):38789-803. doi: 10.18632/oncotarget.5887.PubMed PMID: 26515464; PubMed Central PMCID: PMC4770737. （査読あり）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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
安田 浩之 （YASUDA HIROYUKI ）
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：70365261

(2)研究分担者
なし （ ）

研究者番号：

(3)連携研究者
なし （ ）

研究者番号：

(4)研究協力者
なし （ ）