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

Title	表面増強ラマンイメージングを用いた薬剤耐性がんにおけるポリスルフィドの機能解明
Sub Title	Investigation of the functional role of polysulfides in drug-resistant cancers using surface-enhanced Raman imaging
Author	菱木, 貴子(Hishiki, Takako)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	申請者は、表面増強ラマンイメージング技術により、膵癌組織内ではポリスルフィド(R-Sn-R:PS)が増加していること、さらにそのPSの消去により抗癌剤耐性能が減弱することを見出した。そこで、PS増加機構の解明を目的として、ヒト凍結手術検体を用い、PS産生酵素であるCSEの発現について検討を行った。その結果、膵癌細胞ではCSEの発現はむしろ低下傾向にあり、一方で膵癌細胞近傍の癌関連線維芽細胞(CAF)でCSEが高発現していた。さらにそのような症例では無再発生存期間、全生存期間が短かった。以上より、膵癌組織ではCAFと膵癌細胞の相互作用により、PS合成酵素がCAFに誘導されていることが示唆された。 The applicant discovered using surface-enhanced Raman imaging that polysulfides (R-Sn-R: PS), a type of reactive sulfur species, are increased in pancreatic cancer tissues. Elimination of PS reduced resistance to chemotherapy, suggesting a role for PS in treatment resistance. To explore how PS levels increase, human frozen surgical specimens were analyzed for expression of cystathionine γ-lyase (CSE), a PS-producing enzyme. Interestingly, CSE was not highly expressed in cancer cells but was strongly expressed in cancer-associated fibroblasts (CAFs) surrounding the tumor. High CSE expression in CAFs was linked to shorter recurrence-free and overall survival. These findings suggest that interactions between cancer cells and CAFs induce PS production in the tumor microenvironment, which may promote cancer progression and chemoresistance. This study reveals a novel mechanism in pancreatic cancer and may provide a new therapeutic target by disrupting PS metabolism in stromal cells.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2021～2024 課題番号：21K05294 研究分野：代謝生化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K05294seika

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

令和　７ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０５２９４

研究課題名（和文）表面増強ラマンイメージングを用いた薬剤耐性がんにおけるポリスルフィドの機能解明

研究課題名（英文）Investigation of the Functional Role of Polysulfides in Drug-Resistant Cancers Using Surface-Enhanced Raman Imaging

研究代表者

菱木　貴子（HISHIKI, Takako）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：１０３３８０２２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、表面増強ラマンイメージング技術により、膵癌組織内ではポリスルフィド(R-Sn-R:PS)が増加していること、さらにそのPSの消去により抗癌剤耐性能が減弱することを見出した。そこで、PS増加機構の解明を目的として、ヒト凍結手術検体を用い、PS産生酵素であるCSEの発現について検討を行った。その結果、膵癌細胞ではCSEの発現はむしろ低下傾向にあり、一方で膵癌細胞近傍の癌関連線維芽細胞(CAF)でCSEが高発現していた。さらにそのような症例では無再発生存期間、全生存期間が短かった。以上より、膵癌組織ではCAFと膵癌細胞の相互作用により、PS合成酵素がCAFに誘導されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
PSを標的とした癌の治療介入は前例がなく極めて新しい試みである。また膵癌の特徴として癌細胞塊が他癌種に比べて小さく複数箇所に散らばることが知られ、膵癌の検査法である「超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診」では採取された組織に癌細胞が含まれず癌関連線維芽細胞(CAF)のみが採取され、初期の膵癌に罹患していても見過ごされる可能性が高い。一方でPSの増加は癌細胞のみならずその周辺のCAF でも確認されたことから、PSが膵癌の診断マーカーとしても有効であることが期待される。さらに申請者等の先行研究から卵巣明細胞癌や浸潤性乳癌でもPSの増加が認められており、PSを標的とした治療法の他癌種への応用も期待出来る。

研究成果の概要（英文）：The applicant discovered using surface-enhanced Raman imaging that polysulfides (R-Sn-R: PS), a type of reactive sulfur species, are increased in pancreatic cancer tissues. Elimination of PS reduced resistance to chemotherapy, suggesting a role for PS in treatment resistance. To explore how PS levels increase, human frozen surgical specimens were analyzed for expression of cystathionine γ-lyase (CSE), a PS-producing enzyme. Interestingly, CSE was not highly expressed in cancer cells but was strongly expressed in cancer-associated fibroblasts (CAFs) surrounding the tumor. High CSE expression in CAFs was linked to shorter recurrence-free and overall survival. These findings suggest that interactions between cancer cells and CAFs induce PS production in the tumor microenvironment, which may promote cancer progression and chemoresistance. This study reveals a novel mechanism in pancreatic cancer and may provide a new therapeutic target by disrupting PS metabolism in stromal cells.

研究分野：代謝生化学

キーワード：ポリスルフィド

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

ポリスルフィド（R-Sn-R : PS)は活性硫黄分子種（Reactive sulfur species : RSS）の一種であり、通常のチオール化合物に比べて高い求核性と抗酸化活性を有することから、細胞内レドックスの恒常性の維持や細胞保護作用において重要な役割を担うことがわかっているが、反応性が高く不安定であるため非修飾での適切な分析ツールがなく機能の詳細は不明であった。そのような中申請者等は、金ナノ粒子基板を用いた表面増強ラマンイメージング（Surface enhanced Raman Spectroscopy imaging : SERS imaging）技術を駆使し、PS を含む RSS の相対定量と組織内分布を非修飾・無染色で画像化することに成功した（Shiota M, et al., Nat Commun, 2018)。SERS imaging 技術を用いたこれまでの研究から、がん組織において PS が増加し、さらに PS の増加ががんの悪性度と薬剤耐性に寄与していることを示唆する結果を得た。そこで本研究では、SERS imaging 技術を駆使したがん組織における PS の機能解明とがんの悪性度・薬剤耐性との相関、さらに PS を標的としたがんの治療介入の可能性について検証する。

２．研究の目的

本研究では、がん組織における PS の機能解明と、がんの悪性度・薬剤耐性と PS との相関について検証を行う。さらに PS 消去効果を持つ既存医薬品を単独あるいは抗がん剤と併用することによりがんの増殖は抑制されるか、薬剤耐性効果は減弱するか検証する。
以下の項目を実施する。
①がん組織中の PS 量に対してがんの悪性度（ステージ、術後生存日数等）や薬剤耐性との相関は認められるか検証する。②がん組織における PS 増加のメカニズム解明のため、PS の産生に関与することが知られている酵素群、cystathionine gamma-lyase (CTH)、cystathionine beta-synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)、cysteinyl-tRNA synthetases (CARSs)とがん組織中の PS 量との相関について検証する。③PS 自体が抗がん剤による細胞障害作用を抑制する効果があるか検証する。④PS を分解する去痰剤（アンブロキソール、エチ ルシステインなど）の単独投与、あるいは抗がん剤との併用によりがんの増殖は抑制されるか、また抗がん剤の効果は増強されるか検証する。

３．研究の方法

(1) がん組織中 PS 量とがんの悪性度・薬剤耐性との相関：
国立がん研究センターバイオバンクのヒト卵巣がんの凍結手術検体を用いた SERS imaging の結果と各症例の臨床情報との照合から、がん組織中の PS 量に対してがんの悪性度（ステージ、術後生存日数等）や薬剤耐性との相関は認められるか検証する。国立がん研究センターとの共同研究契約は締結済みで、バンク検体とその検体に付随する臨床情報を得られる環境は整っている。凍結手術検体の SERS imaging はすでに開始しているが、組織型に偏りがあり症例数も不足していることから継続して実施する。

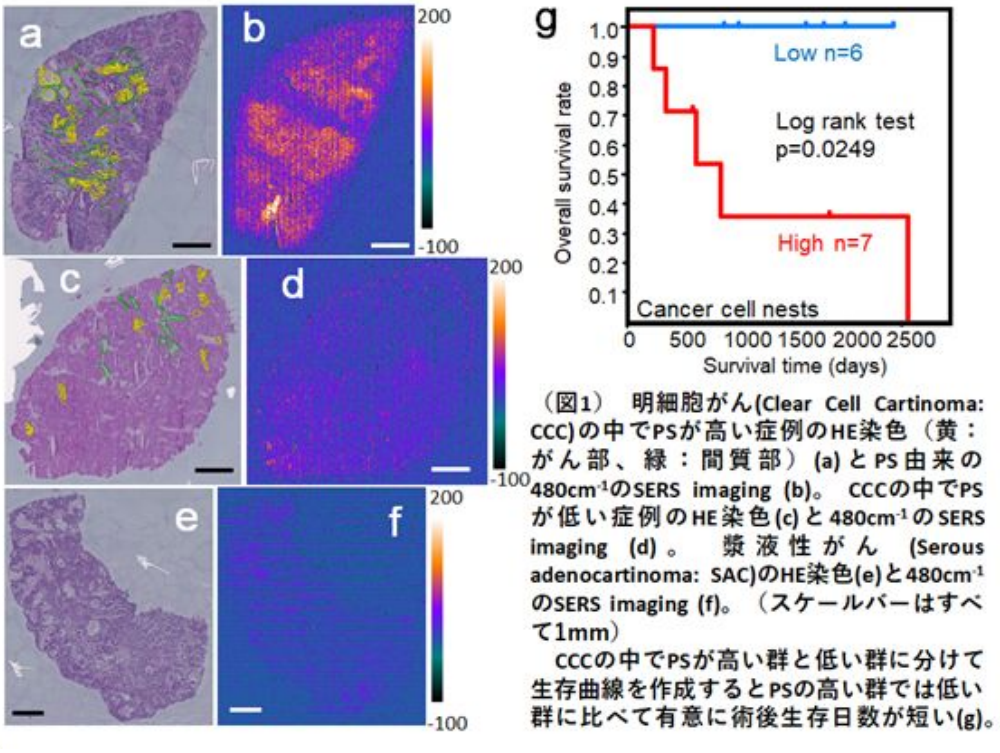
(2) PS が抗がん剤による細胞障害作用を抑制するメカニズムの解明：
ゲルシフトアッセイ法（Zorbas-Seifriend S et al., Biochemistry, 2006)による予備検討の結果から、in vitro で白金製 剤であるシスプラチン(CDDP)の DNA 損傷作用が PS により阻害されることが示され、さらにこの阻害効果は PS の S 原子の数が多い程強いことがわかった。この PS による阻害効果はシスプラチン以外の他の抗がん剤でも共通か、また PS 以外の RSS ではどうか検証する。

(3) PS を標的としたがんの治療介入の可能性についての検証：
PS を分解することが知られている去痰剤（アンブロキソール、エチルシステインなど）の単独投与によりがん細胞の増殖は抑制されるか、またこれらの薬剤を抗がん剤と併用することにより抗がん剤の効果は増強されるか、培養細胞株を用いた in vitro 実験と免疫不全マウスに OVISE を皮下移植した Xenograft モデルによる in vivo 実験から検証する。

４．研究成果

薬剤抵抗性が高く難治性癌として知られる卵巣明細胞癌と薬剤治療効果が高い卵巣漿液性癌のヒト凍結手術検体の SERS imaging を実施した結果、漿液性癌に比べて明細胞癌では組織中の PS 濃 度が高かった。一方で、明細胞癌は PS が高い群と低い群でばらつきが大きく、高い群は

薬剤抵抗性が高く術後生存期間が短い一方で、低い群では薬剤治療効果が高いことも明らかとなった（図 1)。そこで次に癌組織における PS 産生メカニズムの解明を目的として、PS の産生に関与することが知られている酵素群についてヒト凍結手術検体を用いた免疫染色を行った結果、PS 産生酵素のひとつである cystathionine gamma-lyase(CTH)の発現量と術後生存日数との間に相関が認められ、CTH の発現が高い症例では化学療 法抵抗性が高く予後不良となることが示された。　また PS を標的とした癌の治療介入の可能性について検証するため PS を消去する既存薬を探索したところ、去痰薬である Ambroxol に PS の分解作用があることが SERS imging 技術により確認出来た。そこで卵巣明細胞癌の細胞株である OVISE に Ambroxol を添加したところ、OVISE の細胞増殖が抑制され、さらに OVISE を免疫不 全マウスの皮下に移植した Xenograft モデルに白金製剤である Cisplatin と Ambroxol を併用投与した結果、Ambroxol は Cisplatin による腫瘍退縮効果を増強することが明らかとなった(Honda K and Hishiki T et al, Redox Biology, 2021)。



（図1） 明細胞がん(Clear Cell Cartinoma: CCC)の中でPSが高い症例のHE染色（黄：がん部、緑：間質部）(a)とPS由来の480cm^{-1}のSERS imaging (b)。 CCCの中でPSが低い症例のHE染色(c)と480cm^{-1}のSERS imaging (d)。 漿液性がん (Serous adenocartinoma: SAC)のHE染色(e)と480cm^{-1}のSERS imaging (f)。（スケールバーはすべて1mm）
CCCの中でPSが高い群と低い群に分けて生存曲線を作成するとPSの高い群では低い群に比べて有意に術後生存日数が短い(g)。

さらにヒト乳がんの針生検サンプルによる SERS imaging の結果から、非浸潤性乳管癌に比べて浸潤性乳がんではがん細胞中の PS 濃度が高いことがわかり、PS が浸潤性乳がんの診断マーカーとなり得ることを示した(Kubo A et al, Antioxidants 2023)。

そこで次に乳がんの中でも抗がん剤耐性能が高く予後不良であるトリプルネガティブ乳がん(TNBC)に着目した。針生検サンプルの SERS imaging データからは TNBC に特徴的な知見は得られなかったが、TNBC の培養細胞株を用いた検証から、抗がん剤耐性能を持つ細胞ではセリン合成経路が活性化していることがわかった。セリン合成経路は解糖系から分岐し、チオールや PS の産生経路である Transsulfuration 経路や、核酸合成経路、脂肪酸合成経路へと繋がる経路である。どの経路が抗がん剤耐性に重要であるか検証を行ったところ、抗がん剤耐性能が高い細胞では脂肪酸合成経路が活性化し、細胞の増殖に必要な脂肪酸が増加していることがわかった。さらに脂肪酸合成経路を阻害することにより抗がん剤耐性能を解除することに成功した。本成果は脂肪酸代謝制御による新規乳癌治療法開発への発展が期待出来る(Yamamoto T et al, Cancer Research 20024)。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Yamamoto T、Hayashida T、Masugi Y、Oshikawa K、Hayakawa N、Itoh M、Nishime C、Suzuki M、Nagayama A、Kawai Y、Hishiki T、Suematsu M、et al.	４．巻 84
２．論文標題 PRMT1 Sustains De Novo Fatty Acid Synthesis by Methylating PHGDH to Drive Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Cancer Research	６．最初と最後の頁 1065～1083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-23-2266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kubo Akiko、Masugi Yohei、Hase Takeshi、Nagashima Kengo、Kawai Yuko、Takizawa Minako、Hishiki Takako、Shiota Megumi、Wakui Masatoshi、Kitagawa Yuko、Kabe Yasuaki、Sakamoto Michiie、Yachie Ayako、Hayashida Tetsu、Suematsu Makoto	４．巻 12
２．論文標題 Polysulfide Serves as a Hallmark of Desmoplastic Reaction to Differentially Diagnose Ductal Carcinoma In Situ and Invasive Breast Cancer by SERS Imaging	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Antioxidants	６．最初と最後の頁 240～240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox12020240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Ogawa Eri、Hishiki Takako、Hayakawa Noriyo、Suzuki Hisato、Kosaki Kenjiro、Suematsu Makoto、Takenouchi Toshiki	４．巻 35
２．論文標題 Ketogenic diet in action: Metabolic profiling of pyruvate dehydrogenase deficiency	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	６．最初と最後の頁 100968～100968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2023.100968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Honda Kazufumi、Hishiki Takako、Yamamoto Sohei、Yamamoto Takehiro、Miura Nami、Kubo Akiko、Shiota Megumi、Koike Daisuke、Naya Masayuki、Iwaisako Keiko、Ida Tomoaki、Akaike Takaaki、Masugi Yohei、Sakamoto Michiie、Yoshida Hiroshi、Tsuda Hitoshi、Hiraoka Nobuyoshi、Kabe Yasuaki、Suematsu Makoto, et.al.	４．巻 41
２．論文標題 On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Redox Biology	６．最初と最後の頁 101926～101926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2021.101926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Mukai Kuniaki、Sugimoto Hiroshi、Kamiya Katsumasa、Suzuki Reiko、Matsuura Tomomi、Hishiki Takako、Shimada Hideo、Shiro Yoshitsugu、Suematsu Makoto、Kagawa Norio	4．巻 3
2．論文標題 Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Current Research in Structural Biology	6．最初と最後の頁 192～205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crstbi.2021.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Mizota Takamasa、Hishiki Takako、Shinoda Masahiro、Naito Yoshiko、Hirukawa Kazuya、Masugi Yohei、Itano Osamu、Obara Hideaki、Kitago Minoru、Yagi Hiroshi、Abe Yuta、Matsubara Kentaro、Suematsu Makoto、Kitagawa Yuko	4．巻 70
2．論文標題 The hypotaurine-taurine pathway as an antioxidative mechanism in patients with acute liver failure	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6．最初と最後の頁 54～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.21-50	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 菱木貴子	4．巻 54
2．論文標題 SERS imaging技術による活性硫黄分子種の検出と医学応用	5．発行年 2022年
3．雑誌名 月刊「細胞」	6．最初と最後の頁 130~133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関