

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05227

研究課題名(和文) 新たながんプロファイリング診断としての超臨界流体質量分析システムの検証

研究課題名(英文) Validation of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry as novel cancer profiling diagnosis system

研究代表者

吉田 優 (Masaru, Yoshida)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00419475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：超臨界流体抽出(SFE)と超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)、そして、タンデム四重極型質量分析計(MS)を接続した新たな分析システムを構築し、ヒト検体中の生体内代謝物を分析することで、新たながん診断法として応用できるのかを検討した。構築したSFE-SFC-MS装置でヒト検体の分析手法のバリデーションを行い、網羅的に代謝物が分析できる手法を確立した。また、液体クロマトグラフ質量分析計を用いてがん患者と健常者検体の血中代謝物分析を実施し、がん代謝物バイオマーカー候補を決定し、本システムに応用した。その結果、構築したシステムは新たながん診断装置としての可能性があ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

低分子代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスは、生体分子を高感度で検出できる質量分析計が中核となっている。しかし、質量分析計の取り扱いが煩雑で、専門家でなければ扱えない複雑なものであり、医療応用が進んでいるとは言いがたく、より簡便、かつ、汎用性のある全行程を自動化したシステムの構築が不可欠である。本研究では、オンラインSFE-SFC-MS装置を用いて、DBSを用いて血中代謝物バイオマーカー候補を分析できる系を構築し、さらには、実際の患者検体の分析を実施し、このシステムの有用性について評価することを目的としている。これらは、医療への分析機器の実用化という観点からすれば、非常に有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have constructed a new analytical system that connects supercritical fluid extraction (SFE), supercritical fluid chromatography (SFC), and tandem quadrupole mass spectrometer (MS) to analyze in vivo metabolites in human specimens. It was examined whether the analysis could be applied as a new cancer diagnostic method. The constructed SFE-SFC-MS device was used to validate the analysis method for human samples, and a method for comprehensive analysis of metabolites was established. In addition, we analyzed the metabolites in blood of cancer patients and healthy subjects using a liquid chromatograph mass spectrometer, determined cancer metabolite biomarker candidates, and applied them to this system. As a result, it was suggested that the constructed system has the potential as a new cancer diagnostic device.

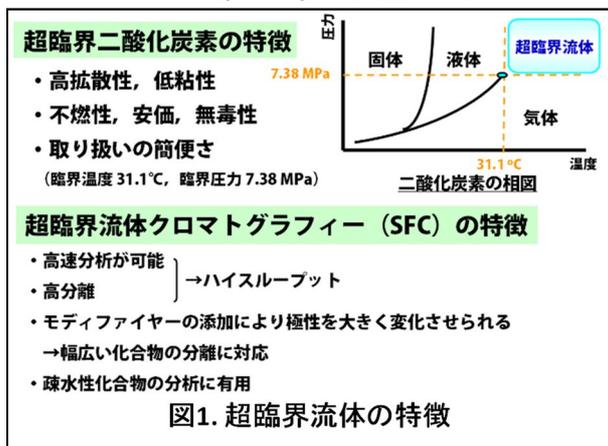
研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボローム解析 質量分析 超臨界流体 がん バイオマーカー

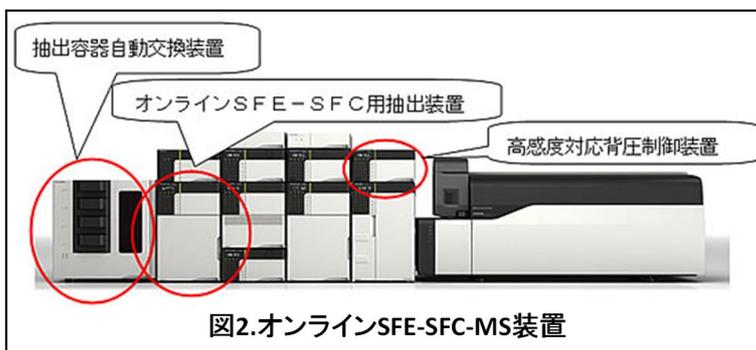
1. 研究開始当初の背景

日本社会の高年齢化に伴い、死因としてのがんは増加の一途を辿っており、昨今では日本人死因の3分の1を占めている。がん制圧は国の重要政策の一つであり、中でもがんの早期発見に役立つ、画期的な超早期診断法の開発が強く求められている。がんでは、健常者では見られないタンパク質の発現やその活性の変化により代謝経路に異常が認められている。その結果、細胞内で誘発された様々な代謝物の変動を血液中での確に、かつ、感度よく検出することができれば、様々な疾患診断が可能となる。研究代表者は、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計 (GC-MS) や液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて、血液検体中のがん特異的代謝物 (メタボローム) の変動パターンを高感度に検出し、さまざまながん特異的に早期から変動する代謝物を同定してきた。これまでにヒト膵がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん患者血清中の代謝物の網羅的解析により、診断に有効なバイオマーカーを同定し、これらの代謝物の変動パターンを用いた「がんプロファイリング診断システム」を開発している。しかし、研究レベルで、様々な診断システムを構築したとしても、その実用化へ向けた研究開発を行う場合、いくつかの問題点が挙がってくる。その中でも、一番の問題点は、ヒト検体の前処理 (代謝物抽出) から分析までを自動化できるのか否かである。これまでの研究では、各ステップを手動で行っており、ヒト血清・血漿検体の前処理 (代謝物抽出) では、特に、個人差などが出やすいステップである。そこで、研究代表者は、超臨界流体抽出 (SFE) と超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) に注目した。

SFE とは、有機溶媒の代わりに超臨界流体を用いて固体試料から化合物を抽出する手法である。一方、SFC とは、カラムクロマトグラフィーのひとつであり、移動相として超臨界流体を用いる手法である。超臨界流体は臨界温度、臨界圧力を超えた状態の物質であり、低粘性・高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好ましい性質を有している (図1)。



SFC は高速、かつ、高分離の分析が可能であり、極性有機溶媒 (モディファイヤー) の添加や温度、背圧を変化させることにより、GC や HPLC にない幅広い分離モードを選択できる (Smith RM. J Chromatogr A. 1999 Sep 24;856(1-2):83-115.)。そこで、研究代表者は、これら SFE と SFC と質量分析計とを結合させたシステムを構築することが必要でないかと考えた。SFE では、血液・血清・血漿を滴下したろ紙、すなわち、Dried Blood Spots (DBS: 乾燥血液スポット) が使用でき、この DBS は、取り扱いが簡便であり、そして、低侵襲のサンプリング法



である。SFE はまた、迅速、かつ、簡便な抽出方法であり、多検体処理を可能とする技術と位置付けることができる。すなわち、SFE と SFC、質量分析計をオンラインで結合させることがで

できれば、ヒト検体の前処理(代謝物抽出)から分析への適用に理想的な手法であると考えられる。この構想を基に、研究代表者は、研究分担者として、「JST 研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム機器開発タイプ(領域非特定型): 質量分析用超臨界流体抽出分離装置の開発(平成 24 年度 - 26 年度)」のプロジェクトに参画し、超臨界流体による抽出からの分析までを自動化したオンライン液体クロマトグラフ質量分析用超臨界流体抽出分離装置(オンライン SFE-SFC-MS 装置)を開発した。

2. 研究の目的

本研究では、このオンライン SFE-SFC-MS 装置を用いて、DBS を用いて血中代謝物バイオマーカー候補を分析できる系を構築し、さらには、実際の患者検体の分析を実施し、このシステムの有用性について評価する。また、SFC-MS(あるいは、SFE-SFC-MS)では、GC-MS や LC-MS では分析の困難である脂質、特に、酸化脂質の分析が可能であることから、酸化脂質を対象としたバイオマーカー探索も実施する。

3. 研究の方法

研究計画・方法(概要)

本研究では、オンライン SFE-SFC-MS 装置を用いた新たながんプロファイリング診断法を確立することを目的とする。はじめに、DBS を用いたオンライン SFE-SFC-MS 装置による血中代謝物分析系の構築を行い(課題 1)、さらに、SFC-MS(あるいは、SFE-SFC-MS)を用いて、代謝物バイオマーカー候補の探索を行う(課題 2)。引き続き、オンライン SFE-SFC-MS 装置による代謝物バイオマーカー候補の絶対定量分析系を構築するとともに(課題 3)その絶対定量分析系を用いて、代謝物バイオマーカー候補の検証試験を実施する(課題 4)。また、基礎的検証を行うことで、代謝物バイオマーカー候補に対するバイオロジックのエビデンスの取得を行い(課題 5)、その代謝物バイオマーカー候補の信頼性を高め、オンライン SFE-SFC-MS 装置に対する実用化研究の礎とする。

課題 1: DBS を用いたオンライン SFE-SFC-MS 装置による血中代謝物分析系の構築

課題 2: 酸化脂質のがんバイオマーカーとしての可能性の検証

課題 3: オンライン SFE-SFC-MS 装置による代謝物バイオマーカー候補の定量分析系の構築

課題 4: オンライン SFE-SFC-MS 装置によるがん患者検体分析

課題 5: 代謝物バイオマーカー候補の基礎的検証

4. 研究成果

超臨界流体抽出(SFE)と超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)、そして、タンデム四重極型質量分析計(MS)を接続した新たな分析システムを構築し、ヒト検体中の生体内代謝物を分析することで、新たながん診断法として応用できるのかを検討した。構築した SFE-SFC-MS 装置でヒト検体の分析手法のバリデーションを行い、網羅的に代謝物が分析できる手法を確立した。また、液体クロマトグラフ質量分析計を用いてがん患者と健常者検体の血中代謝物分析を実施し、がん代謝物バイオマーカー候補を決定し、本システムに応用した。その結果、構築したシステムは新たながん診断装置としての可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Nishiumi S., Izumi Y., Kobayashi T., Yoshida M. | 4. 巻 25(6) |
| 2. 論文標題 A pilot study: Effects of Kombu intake on lifestyle-related diseases -Possibility that an intake of Kombu is effective for the subjects with abnormally high serum triglyceride levels-. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Food Science and Technology Research | 6. 最初と最後の頁 827-834 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.25.827. | 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 Kibi M, Nishiumi S, Kobayashi T, Kodama Y, Yoshida M. | 4. 巻 65(1) |
| 2. 論文標題 GC/MS and LC/MS-based Tissue Metabolomic Analysis Detected Increased Levels of Antioxidant Metabolites in Colorectal Cancer. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Kobe J Med Sci. | 6. 最初と最後の頁 E19-E27. |
| 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 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 西海 信、吉田 優 | 4. 巻 148巻1号 |
| 2. 論文標題 実地医家のためのバイオマーカーの最新知識 (No.17) メタボロミクスの可能性. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本医師会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 74-75 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Nababan S.H.H., Nishiumi S., Kawano Y., Kobayashi T., Yoshida M., Azuma T. | 4. 巻 623-624 |
| 2. 論文標題 Adrenic acid as an inflammation enhancer in non-alcoholic fatty liver disease | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics | 6. 最初と最後の頁 64-75 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2017.04.009. | 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 Fukumoto T., Nishiumi S., Fujiwara S., Yoshida M., Nishigori C. | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Novel serum metabolomics-based approach by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for detection of human skin cancers: candidate biomarkers | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 1268-1275 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13921. | 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 Nishiumi S., Yoshida M., Azuma T. | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Alterations in metabolic pathways in stomach of mice infected with Helicobacter pylori | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis | 6. 最初と最後の頁 78-85 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2017.05.027. | 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 Yamashita Y., Nishiumi S., Kono S., Takao S., Azuma T., Yoshida M. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Differences in elongation of very long chain fatty acids and fatty acid metabolism between triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 BMC Cancer | 6. 最初と最後の頁 589 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-017-3554-4. | 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 Ezaki T., Nishiumi S., Azuma T., Yoshida M. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Metabolomics for the early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Toxicology Research | 6. 最初と最後の頁 843-853 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7TX00171A. | 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 西海 信, 吉田 優 | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 医学研究におけるメタボローム解析の活用と大腸がんスクリーニングに向けた代謝物バイオマーカーの実用化に向けた試み | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科 | 6. 最初と最後の頁 177-182 |
| 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 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 Nishiumi S., Kobayashi T., Kawana S., Unno Y., Sakai T., Okamoto K., Yamada Y., Sudo K., Yamaji T., Saito Y., Kanemitsu Y., Tsuda Okita N., Saito H., Tsugane S., Azuma T., Ojima N., Yoshida M. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 17115-17126 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.15081 | 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 Nishiumi S., Shima K., Azuma T., Yoshida M. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Evaluation of a novel system for analyzing hydrophilic blood metabolites | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2017.01.015 | 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 Hirata Y., Kobayashi T., Nishiumi S., Yamanaka K., Nakagawa T., Fujigaki S., Iemoto T., Kobayashi M., Okusaka T., Nakamori S., Shimahara M., Ueno T., Tsuchida A., Sata N., Ioka T., Yasunami Y., Kosuge T., Kaneda T., Kato T., Yagihara K., Fujita S., Yamada T., Honda K., Azuma T., Yoshida M. | 4. 巻 468 |
| 2. 論文標題 Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 98-104 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2017.02.011 | 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 Suzuki M., Nishiumi S., Kobayashi T., Sakai A., Iwata Y., Uchikata T., Izumi Y., Azuma T., Bamba T., Yoshida M. | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 The use of on-line SFE-SFC/MS/MS to analyze disease biomarkers in dried serum spots compared with serum analysis using LC/MS/MS. Rapid Communications in Mass Spectrometry | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry | 6. 最初と最後の頁 886-984 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.7857 | 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 - |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤垣 誠治、西海 信、吉田 優 |
| 2. 発表標題 標的メタボロミクスによる食道がんに対する術前化学療法の効果予測に有用な血清バイオマーカーの確立 |
| 3. 学会等名 第46回BMSコンファレンス |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 西海 信, 小林 隆, 吉田 優 |
| 2. 発表標題 2.採血後血液処理が血中代謝物レベルに与える影響 |
| 3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Fujigaki S, Nishiumi S, Kobayashi T, Yoshida M |
| 2. 発表標題 3.Serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer is identified by the targeted metabolomics approach. |
| 3. 学会等名 MSACL EU 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryoko Katagiri, Atsushi Goto, Shin Nishiumi, Takashi Kobayashi, Akihisa Hidaka, Sanjeev Budhathoki, Taiki Yamaji, Norie Sawada, Taichi Shimazu, Manami Inoue, Motoki Iwasaki, Masaru Yoshida, Shoichiro Tsugane. |
| 2. 発表標題 4.Association between plasma levels of branched-chain amino acid and risk of pancreatic cancer in a large cohort |
| 3. 学会等名 第 78 回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西海 信, 藤垣 誠 6.治, 小林 隆, 吉田 優 |
| 2. 発表標題 5.食道がん術前化学放射線療法の効果予測に有用な代謝物バイオマーカーの可能性 |
| 3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masaru Yoshida |
| 2. 発表標題 Serum metabolome analysis for early detection of colorectal cancer |
| 3. 学会等名 2017 Annual Symposium and General Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 吉田 優 |
| 2. 発表標題 メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索と実用化 |
| 3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shin Nishiumi, Keisuke Shima, Hidekazu Saiki, Takeshi Azuma, Masaru Yoshida |
| 2. 発表標題 Evaluation of an Automated LC-MS/MS System for Analyzing Hydrophilic Blood Metabolites |
| 3. 学会等名 The American Society for Mass Spectrometry (ASMS) 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Makoto Suzuki, Shin Nishiumi, Takashi Kobayashi, Yosuke Iwata, Takato Uchikata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Masaru Yoshida |
| 2. 発表標題 The use of on-line SFE-SFC/MS/MS to analyze disease biomarkers in dried serum spots |
| 3. 学会等名 SFC ASIA 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下 祐司, 西海 信, 河野 誠之, 高尾 信太郎, 東 健, 吉田 優 |
| 2. 発表標題 メタボロミクス分析を用いた、乳癌組織におけるコリン代謝および極長鎖脂肪酸代謝の変化の検討 |
| 3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西海 信, サウトホラスハトグアンナババン, 川野 佑輝, 小林 隆, 吉田 優 |
| 2. 発表標題 脂質分析による非アルコール性脂肪性肝炎病態関連因子の同定 |
| 3. 学会等名 第42回日本医用マススペクトル学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashi Kobayashi, Yuichi Hirata, Masaru Yoshida, Shin Nishiumi, Kazufumi Honda |
| 2. 発表標題 Validation of serum/plasma metabolomic biomarkers against pancreatic cancer by quantitative targeted GC/MS/MS |
| 3. 学会等名 25th United European Gastroenterology Week (UEGW2017) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉田 優 |
| 2. 発表標題 メタボロミクスによる早期大腸がんスクリーニングシステムの開発 |
| 3. 学会等名 第24回日本がん検診・診断学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Noriyuki Ojima, Shuichi Kawana, Yumi Unno, Yukihiro Kudo, Takero Sasaki, Takashi Kobayashi, Shin Nishiumi, Masaru Yoshida |
| 2. 発表標題 Evaluation of gas-chromatography tandem mass spectrometry system with automated TMS derivatization in analysis of plasma metabolites |
| 3. 学会等名 12th annual conference of the metabolomics society |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|