

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659034

研究課題名（和文）がんのメタボロームに着目した抗がん剤耐性克服へのアプローチ

研究課題名（英文）An approach focused on cancer metabolome for overcoming drug resistance

## 研究代表者

西牟田 章戸 (NISHIMUTA AKITO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：00424135

研究成果の概要（和文）：抗がん剤（シスプラチン）耐性株と耐性獲得前の細胞の細胞内メタボローム（代謝物の総体）を一斉解析し、これまで未知の抗がん剤耐性化メカニズムの解明・耐性化に関わる代謝経路および耐性因子同定を試みた。本研究により、シスプラチン耐性化に伴うがん細胞の変化を、これまであまり論じられることのなかったメタボロームの視点から明らかにすることができた。得られた知見は、これまで未知の抗がん剤耐性化メカニズム解明の一助となる。

## 研究成果の概要（英文）：

This study attempted to elucidate unknown mechanisms of cancer drug resistance and to identify drug resistance determinants by simultaneously analyzing intracellular metabolome of cancer cells resistant to the anticancer agent cisplatin and their parental cells. This study clarified the change of the cancer cell accompanying the acquirement of cisplatin resistance by metabolomic analysis. The knowledge and information obtained by this study will help to elucidate unknown mechanisms of cancer drug resistance.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	270,000	3,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、医療系薬学

キーワード：メタボローム、抗がん剤耐性、個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法において薬剤耐性は臨床上の大きな障害であり、抗がん剤耐性克服は治療成績を向上させる上で重要である。抗がん剤による治療成績を向上させるためには、治療が奏効するがんと奏効しないがんの薬剤反応性の差がどのような要因に基づくのかを理解する必要がある。抗がん剤耐性メカニズムについては、これまで多くの検討から、それを説明する遺伝子、蛋白質が同定され、一定の成果を得たが、抗がん剤耐性診断等、臨床へ応用された例は少ない。たとえ遺伝子や蛋白質の発現変動が認められたとしても、何らかの代償的機構が働くことにより、それが必ずしも代謝物量の変化にまで反映されていない可能性がある。もし遺伝子や蛋白質（特に代謝酵素・トランスポーター）の発現情報に加え、さらにその下流の、酵素などによって作り出される細胞内の低分子化合物群（メタボローム）の情報があれば、抗がん剤耐性メカニズムの全容解明が期待できる。

これまでの薬剤耐性研究は、遺伝子や蛋白質を対象としたもの、あるいは代謝の一部を対象としたものが主であったが、本研究は細胞内に存在する代謝物全体の挙動から薬剤耐性機構を理解しようとする点に特色があり、抗がん剤耐性化に伴う薬剤反応性の変化をメタボローム解析により明らかにしようとした例は国内外を問わず存在しない。がん細胞の抗がん剤耐性化を、メタボロームというこれまでとは全く異なる視点から解析することにより、全く予想の出来なかった未知の薬剤耐性機序を明らかにできる可能性がある。さらに、耐性克服方法の開発、抗がん剤耐性診断への臨床応用は抗がん剤化学療法の治療成績の向上、オーダーメイド医療実現に寄与する。さらに、メタボローム解析の情報は、従来のゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析の情報と併せることにより、生体反応の統合的解析（遺伝子変異、遺伝子発現、蛋白質発現、細胞内代謝の変動）を可能とし、これまで明らかにできなかった真に重要な生体反応プロセスの解明が期待できる。

## 2. 研究の目的

抗がん剤耐性株と耐性獲得前の細胞の細胞内メタボローム（代謝物の総体）を Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS)により一斉解析する。親株と耐性株の細胞内メタボロームプロファイルの比較により、メタボロームの視点から、これまで未知の抗がん剤耐性化メカニズムの解明・耐性化に関わる代謝経路および耐性因子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

ヒト肺癌細胞株 MOR およびシスプラチン抵抗性 MOR (MOR-CPR) を用いた。

### (2) 薬剤耐性度の評価

各細胞の抗がん剤に対する耐性度は、MTS assay により評価した。

### (3) メタボローム解析

#### ①細胞処理

代謝が盛んな対数増殖期の細胞に対して、細胞を洗浄後、素早くメタノール(4℃、内部標準物質含有)を添加することにより酵素を失活させ、以下の処理を行う。なお、細胞数算出用の細胞を代謝物抽出用の細胞とは別に準備し、同様の処理を行った後セルカウントを行い、細胞数補正に用いる。

#### ②細胞内代謝物の抽出・濃縮

水-メタノール-クロロホルムの液-液分配により夾雑部分を除去し、イオン性代謝物質が分配されている水相を限外ろ過（分画分子量:5 kDa）することによりタンパク質を除去する。ろ液を乾燥後、CE-TOFMS 測定試料とする。

#### ③CE-TOFMS 法による細胞内代謝物質の測定

上記の方法により抽出した細胞内代謝物を 50 $\mu$ L の MilliQ 水に溶解後、CE-TOFMS に注入し、細胞内の内因性代謝産物および抗がん剤代謝物を一斉に定量分析する。

#### ④データ解析

検出されたピークについて、すでにキャピラリー電気泳動の移動時間および m/z が明らかとなっている約 500 成分（アミノ酸代謝、核酸代謝、解糖系、TCA 回路、ポリアミン代謝等に関わる代謝物）の分析データとの照合により同定を行った。なお、定量的評価はピーク面積より行った。

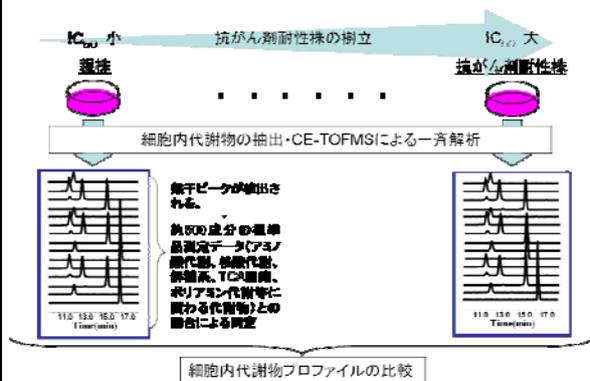


図1. 研究方法

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①薬剤耐性度の評価

各細胞の抗がん剤に対する耐性度は、MTS assay により評価した。シスプラチンを添加後 72 時間培養し、50 %増殖阻害に要する薬剤濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した (図 2)。

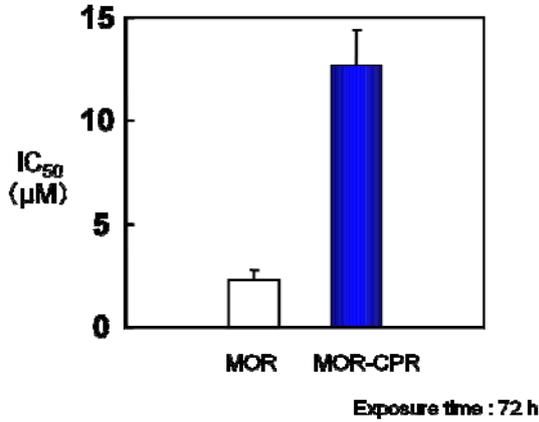


図2. ヒト肺癌細胞MORおよびシスプラチン抵抗性MOR (MOR-CPR)のシスプラチンに対する感受性の評価

②ヒト肺癌細胞株 MOR とシスプラチン抵抗性 MOR (MOR-CPR) の細胞内メタボロームプロファイルの比較

ヒト肺癌細胞株 MOR とシスプラチン抵抗性 MOR (MOR-CPR) について、抽出した細胞内代謝物を CE-TOFMS により一斉分析し、親株と耐性株の細胞内メタボロームプロファイルの比較検討を進めた。検出されたピークについて、すでにキャピラリー電気泳動の移動時間および m/z が明らかとなっている約 500 成分 (アミノ酸代謝、核酸代謝、解糖系、TCA 回路、ポリアミン代謝等に関する代謝物) の分析データとの照合により同定を行った。同定できた代謝物について MOR と MOR/CPR の細胞内メタボロームプロファイルを比較解析した結果、耐性細胞でアミノ酸群の細胞内レベルが低下していることを見出した。特にタンパク質を構成する 20 のアミノ酸の中では、アスパラギン酸、グリシン、リシン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、バリンの耐性細胞における細胞内レベルの低下が顕著であった。一方、両細胞で DNA 合成の材料となるヌクレオチドの細胞内レベルに顕著な差は認められなかった。

Pathway	Metabolite	MOR	MOR-CPR	Ratio (MOR-CPR/MOR)
Group 1: Amino acid	Ala	196.48	110.00	0.56 ↓
	Arg	208.31	133.11	0.64 ↓
	Asn	196.54	152.88	0.78 ↓
	Asp	31.81	13.44	0.42 ↓↓
	beta-Ala	104.85	90.32	0.86 ↓
	Citrulline	1.83	0.84	0.46 ↓↓
	Cys	0.30	0.09	0.30 ↓↓
	Gln	146.19	86.78	0.59 ↓
	Glu	180.39	201.98	1.12 ↓
	Gly	224.04	47.09	0.21 ↓↓
	His	51.93	35.36	0.68 ↓
	Ile	253.47	153.71	0.61 ↓
	Leu	257.67	135.66	0.53 ↓
	Lys	19.63	4.03	0.21 ↓↓
	Met	35.26	18.04	0.51 ↓
	Ornithine	25.23	18.05	0.72 ↓
	Phe	60.81	18.99	0.31 ↓↓
	Pro	338.01	267.63	0.79 ↓
Group 2: Modified amino acid	Ser	35.92	3.19	0.09 ↓↓
	Thr	65.55	30.13	0.46 ↓↓
	Trp	12.34	3.57	0.29 ↓↓
	Tyr	55.46	31.49	0.57 ↓
	Val	80.42	20.86	0.26 ↓↓
	3-Methylhistidine	4.51	4.84	1.07 ↓
	5-Oxoproline	42.19	47.80	1.13 ↓
	Hydroxyproline	129.23	124.42	0.96 ↓
	N,N-Dimethylglycine	0.18	0.16	0.86 ↓
	N5-Ethylglutamine	0.84	0.81	0.97 ↓
	N6-Acetylysine	0.17	0.26	1.53 ↑
	N6,N6-Trimethyllysine	0.81	0.61	0.76 ↓
	N-Acetylaspartic acid	4.76	3.24	0.68 ↓
	N-Acetyl-beta-alanine	0.82	0.79	0.96 ↓
	N-Acetylglutamic acid	0.14	0.24	1.79 ↑
	N-Acetylhistidine	0.14	0.02	0.16 ↓↓
	N-Acetylmethionine	0.37	0.21	0.57 ↓
	N-Methylalanine	0.00	0.03	∞ ↑↑
S-Adenosylmethionine	3.59	2.77	0.77 ↓	
Group 3: Peptide	Carnosine	0.16	0.10	0.63 ↓
	Glu-Glu	0.19	0.12	0.62 ↓
	Gly-Gly	0.42	0.42	1.00 ↓
	Gly-Leu	0.16	0.09	0.58 ↓
	Glutathione (GSH)	41.43	3.75	0.09 ↓↓
	Glutathione (GSSG) divalent	288.73	198.69	0.69 ↓
Group 4: Amino acid metabolism	Cysteine-glutathione disulphide	5.50	13.44	2.44 ↑↑
	S-Lactoylglutathione	0.22	0.16	0.76 ↓
	2-Amino adipic acid	1.07	0.42	0.39 ↓↓
	gamma-Butyrobetaine	1.92	2.72	1.41 ↓
	3-Phenylpropionic acid	2.07	1.09	0.52 ↓
	Pantothenic acid	3.48	3.01	0.87 ↓
	Creatine	131.66	163.11	1.24 ↓
	Creatinine	1.73	1.51	0.87 ↓
	Cysteic acid	0.02	0.02	1.02 ↓
	gamma-Aminobutyric acid	49.95	63.05	1.26 ↓
	Kynurenine	0.42	0.42	0.99 ↓
	S-Adenosylhomocysteine	0.05	0.04	0.89 ↓
Group 5: Nucleotide metabolism	trans-Cinnamic acid	1.91	2.32	1.21 ↓
	Adenine	0.39	0.40	1.02 ↓
	Adenosine	0.03	0.01	0.30 ↓↓
	1-Methyladenosine	0.04	0.04	0.81 ↓
	AMP+dGMP	0.93	0.87	0.94 ↓
	ATP+dGTP	82.47	54.25	0.66 ↓
	CDP	0.12	0.14	1.21 ↓
	CMP	0.06	0.03	0.49 ↓↓
	CTP	4.45	3.00	0.67 ↓
	dATP	0.27	0.24	0.90 ↓
	dCTP	0.11	0.07	0.66 ↓
	dTTP	0.34	0.35	1.05 ↓
	GMP	0.10	0.06	0.64 ↓
	GDP	0.80	0.76	0.95 ↓
	GTP	7.42	5.99	0.81 ↓
	IMP	0.03	0.03	0.99 ↓
	UDP	0.82	0.74	0.90 ↓
	UMP	0.63	0.56	0.90 ↓
UTP	28.67	20.27	0.71 ↓	
Group 6: Glycolysis and Pentose phosphate pathway	2-Aminobutyric acid	3.08	3.01	0.98 ↓
	2,3-Diphosphoglyceric acid	0.38	0.10	0.26 ↓↓
	3-Phosphoglyceric acid	0.86	0.58	0.68 ↓
	Dihydroxyacetone phosphate	2.95	2.09	0.71 ↓
	Gluconic acid	3.12	4.99	1.60 ↑
	Glyceric acid	0.41	0.23	0.55 ↓
Group 7: TCA cycle	Lactic acid	599.23	447.24	0.75 ↓
	PRPP	0.54	0.61	1.12 ↓
	Sedoheptulose 7-phosphate	0.17	0.12	0.68 ↓
	cis-Aconitic acid	0.45	0.32	0.72 ↓
Group 8: Polyamine metabolism	Fumaric acid	1.63	1.14	0.70 ↓
	Malic acid	15.82	11.53	0.73 ↓
	Succinic acid	8.65	5.12	0.59 ↓
	N-Acetylputrescine	0.81	1.07	1.32 ↓
Group 8: Polyamine metabolism	N1-Acetylspermine	0.04	0.02	0.50 ↓
	N8-Acetylspermidine	6.83	5.18	0.76 ↓
	Putrescine	2.33	0.83	0.36 ↓↓
	Spermidine	1.67	1.15	0.68 ↓
Spermine	0.34	0.22	0.64 ↓	

図3. ヒト肺癌細胞MORとシスプラチン耐性細胞MOR-CPRの細胞内メタボローム比較。各細胞の代謝物レベルを Peak area (IS ratio/10<sup>6</sup> cells)で示している。Ratio (MOR-CPR/MOR)については、↑↑:2.0以上、↑:1.5~2.0、↓:0.5~0.67、↓↓:0.5以下を示している。

※IS: Internal standard

(2) 今後の展望

抗がん剤耐性株と耐性獲得前の細胞の細胞内メタボロームを比較することにより、これまで論じられることの少なかった、抗がん剤（シスプラチン）耐性化に伴う細胞内代謝変化を明らかにすることができた。シスプラチン耐性化に伴うがん細胞の変化をメタボローム解析により明らかにしようとした例は本研究を除き国内外を問わず存在しない。本研究で得られた知見は、これまで未知の抗がん剤耐性化メカニズム解明の一助となる。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 西牟田章戸、杉本昌弘、曾我朋義、谷川原 祐介. Metabolomic responses relating to chemosensitivity to oxaliplatin of human colorectal cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月4日. 名古屋国際会議場(愛知県)
- ② 西牟田 章戸、大谷勇紀、杉本 昌弘、曾我 朋義、谷川原 祐介. メタボローム解析によるヒト大腸癌細胞のオキサリプラチン感受性バイオマーカー探索. 第28回日本TDM学会・学術大会. 2011年6月19日. 広島国際会議場(広島県)
- ③ 西牟田章戸、杉本昌弘、曾我朋義、谷川原 祐介. Metabolomics to discover potential biomarkers relating to chemosensitivity to CPT-11 of human colorectal cancer cells. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月22日. 大阪国際会議場(大阪府)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①

名称: 抗がん剤感受性の判定マーカー

発明者: 谷川原祐介、西牟田章戸、大谷勇紀、松尾光寿

権利者: 学校法人慶應義塾、株式会社ヤクルト本社

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/54633 (基礎出願: 特願2011-65993号)

出願年月日: 2012年2月24日 (2011年3月24日)

国内外の別: 外国 (国内含む)

②

名称: 併用抗がん剤の感受性判定マーカー

発明者: 谷川原祐介、西牟田章戸、津崎盾哉、

高橋寛行

権利者: 学校法人慶應義塾、株式会社ヤクルト本社

種類: 特許

番号: 特願 2012-37448 号

出願年月日: 2012年2月23日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西牟田 章戸 (NISHIMUTA AKITO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 00424135

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし