

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890127

研究課題名(和文) 包括的かつ組織局所的代謝プロファイリングによる早期大腸がんバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarker discovery against early stage colorectal cancer by comprehensive metabolite profiling

研究代表者

吉江 智郎 (Yoshie, Tomoo)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：10631559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸がんに対してメタボローム解析を実施し、信頼性の高いバイオマーカーの探索を行った。大腸がんマウスモデルであるAPC^{min/+}マウスや大腸がん患者の血清検体や大腸組織検体の代謝物分析結果から、大腸がんの発症により、エネルギー代謝に関わる代謝物が変動することや、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンのリゾ体が増加することが明らかとなった。これらがバイオマーカー候補になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed metabolome analysis for colorectal cancer, and then searched for the reliable biomarker candidates against colorectal cancer. From the experiments using serum and colorectal tissues of APC^{min/+} mice and colorectal cancer patients, it was demonstrated that the pathogenesis of colorectal cancer leads to the alterations in levels of the metabolites related to energy metabolism and the increases in levels of lyso-phosphatidylcholine and lyso-phosphatidylethanolamine. These metabolites are considered as the reliable biomarker candidates against colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：大腸がん 代謝物 プロファイリング メタボローム解析

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。大腸がんは、種々のがんの中でも、男性では3番目、女性では1番目に多い死因となっており食生活の欧米化などがその原因と考えられている(2010年厚生労働省「人口動態統計」)。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。近年、医療診断や病因解析を目的としたオーム解析が精力的に実施されている。オーム解析の中でも、低分子代謝物総体を捉えるメタボロミクスは酵素の変動が生じて初めて変動し、タンパク質の活性にも依存することから、生体の表現形に近い変動を示すこと、種差がないため小動物実験系の結果をヒト臨床研究に外挿しやすいなどの利点を持つ。がんでは、健常人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ため、細胞内で誘発された様々な代謝物の変動を血液中的に、かつ、感度よく検出することができれば、がんの早期発見、治療効果予測、予後診断に役立つ画期的ながん診断法の開発の礎となると考えられる。

これまで研究代表者は、消化器疾患の実用的早期診断法の確立を目指し、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)による血清メタボローム解析を実施してきた。現在までに、潰瘍性大腸炎(Ooi et al. *Inflammation Res* 2011; Shiomi et al., *Inflamm Bowel Dis* 2011)、膵臓がん(Nishiumi et al., *Metabolomics* 2010)、大腸がん(Kondo et al., *Biomark Med* 2011)についての代謝物プロファイリングの研究結果を公表しており、さらには、大腸がん、胃がん、食道がんに関しては、各々のグループごとに特徴的な代謝物変動パターンも見出した(Ikeda et al., *Biomed Chromatogr* 2012)。さらに、大腸がんの発症に関連するAPC遺伝子を欠損させたSW480細胞、大腸発がんモデルAPCmin/+マウス、ヒト大腸がん由来細胞株移植ヌードマウスのGC/MSメタボローム解析により、APC遺伝子がアミノ酸代謝やエネルギー代謝を調節している可能性を示し、さらに、がん細胞の増殖に寄与する代謝物を見出した(Yoshie et al., *Cancer Sci* 2012)。これらの結果は、メタボローム解析が様々な疾患のバイオマーカー探索に利用できるだけでなく、代謝と疾患における作用機序の解明や新たな治療薬の開発に有用であることを示している。今後、メタボローム解析によるがんの早期診断を実用化させるためには、がん患者のGC/MSメタボロームデータを蓄積するとともに、診断精度をさらに上げる工夫が必要となる。GC/MSはヒト検体から糖・糖アルコール・

有機酸・アミノ酸・脂肪酸など約150種の代謝物を再現性良く観測できる優れた分析手法であるが、主幹代謝であるペントース・リン酸経路や解糖系の中間代謝物、例えば、糖リン酸などのリン酸基を有する高極性アニオン代謝物の測定は困難である。同様に、疎水性代謝物の代表である脂質類もその物性的特徴からGC/MSでの測定は不可能である。上記の代謝物を含む包括的な代謝プロファイリングが可能となれば、新たながんバイオマーカーが発見できるだけでなく、病態に対する代謝全体の変化を議論することができる。さらに、病原部位の局所的な代謝物情報を取得できれば病原部位と末梢血との関連性が明確となり、信頼性の高いバイオマーカーを選定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

遺伝的特徴の情報は身体の中で起きている酵素反応の状態に反映されているため、代謝物総体を捉えるメタボロミクスは様々な疾患の診断に有用であると考えられる。患者への負担が少ない血清を用いたメタボロミクスによって、がんのバイオマーカーを発見するためには、分析手法の感度や精度、観測する代謝物の網羅性が鍵となる。そこで、本研究では、糖、アミノ酸、核酸、有機酸、糖リン酸などの親水性代謝物と脂質などの疎水性代謝物を対象としたこれまでに類を見ない包括的な代謝プロファイリングにより、大腸がん特異的な血中代謝産物の変動をパターン解析することを目的とした。さらに、変動している代謝物に関しては、大腸がん組織における局所的代謝プロファイリングを行い、腫瘍組織と血液に含まれる代謝物の関連性を明確にすることで、信頼性の高い大腸がんバイオマーカーとして同定することも試みた。

具体的には、大腸がんの早期診断のための新規バイオマーカーの発見を目的とし、大腸がん患者から提供していただいた臨床検体と、大腸発がんモデルAPCmin/+マウスから採取した検体とを用いて包括的な代謝プロファイリングを行った。糖や糖アルコール、アミノ酸、有機酸などの親水性代謝物はGC/MSを用いて、糖リン酸、ヌクレオチド、補酵素類などの親水性アニオン代謝物はイオンペア高速液体クロマトグラフィー/トリプル四重極型質量分析(イオンペアLC/MS/MS)により、さらに、脂質分子種はLC/MS/MSを用いて分析を実施した。以上の3種のプラットフォームによる複合解析システムを使い、大腸がんの発症による一連の代謝産物の変動を網羅的に解析した。さらに、LESA NanoMate-QqQ-MS分析システムによる局所的超高度感度代謝物分析が、大腸がん組織に特徴的な代謝物の存在パターンを決定するのに

有用なのか否かについて、検証した。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん患者検体を用いた包括的代謝プロファイリング

GC/MS による親水性代謝物分析、イオンペア LC/MS/MS によるアニオン性代謝物分析、LC/MS/MS による脂質代謝物分析、そして、LC/MS/MS によるカチオン性代謝物分析により構成される複合的解析システムによる包括的代謝プロファイリングにより、次に示す実験を行った。

GC/MS による親水性代謝物分析に関しては、大腸がん患者から得られた 50 μ l の血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを 1:1:2.5 の容量比で混合した溶媒を用いて代謝物を抽出した。メトキシアミン溶液を用いてメトキシ化を行うとともに、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いて誘導體化を実施して、GC/MS 分析を実施した。なお、代謝物同定については、In-house の代謝物データベースを統合した解析システムを用いて実施した。

イオンペア LC/MS/MS によるアニオン性代謝物分析に関しては、大腸がん患者から得られた 50 μ l の血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを 1:1:2.5 の容量比で混合した溶媒を用いて代謝物抽出した。代謝物測定は、130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラフィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた LC/MS/MS によるマルチターゲットプロファイリング法により実施し、さらに、移動相にはイオンペア試薬を混合した。

LC/MS/MS による脂質代謝物分析に関しては、大腸がん患者から得られた 10 μ l の血清に対し、抽出溶媒としてメタノールを添加して脂質抽出を行った。脂質測定についても 130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラフィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた LC/MS/MS によるマルチターゲットプロファイリング法により実施した。

LC/MS/MS によるカチオン性代謝物分析に関しては、大腸がん患者から得られた 50 μ l の血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを 1:1:2.5 の容量比で混合した溶媒を用いて代謝物を抽出した。カチオン性代謝物測定についても、130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラ

フィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた LC/MS/MS によるマルチターゲットプロファイリング法により実施した。

続いて、大腸がん患者と健常人との間で変動する代謝物を明らかにしていき、早期診断に採用できるバイオマーカー候補を検討した。

(2) 大腸発がんモデル APCmin/+マウスを用いた包括的代謝プロファイリング

本項目では、大腸発がんモデル APCmin/+マウスを用いた腸管組織、および、血清の代謝プロファイリングを実施した。APCmin/+マウスは腸管腫瘍発症のモデルマウスとして研究に利用されており、大腸がん発症の早期に、小腸において多くのポリープが発生することが知られている。

具体的には、APCmin/+マウスの解剖を実施し、血液と小腸、大腸を採取するとともに、腸管の組織病理学的スコアも取得した。また、野生型のマウスからも同様に血清、および、小腸と大腸を回収した。得られた血清と腸組織から低分子代謝物を抽出し、続けて、質量分析計を用いた包括的代謝プロファイリングを実施することにより、大腸がんの発症により変動する血清、ならびに、腸管組織中での代謝物の同定を試みた。

(3) LESA NanoMate-QqQ-MS 分析システムによる局所的超高度代謝物分析

Advion 社の LESA と TriVersaTM NanoMate を融合した局所的解析システム LESA NanoMate-QqQ-MS を開発することを目的とした。当該解析システムは、凍結組織切片上で 1 mm 程度の空間分解能を伴い代謝物を抽出し、ナノエレクトロスプレーイオン化法により抽出液を直接、質量分析計に導入する手法である。組織切片内の局所部位から抽出できる分子数には制限があることが予想されるため、少量の分子を如何に感度よく検出するかが鍵となると考えられた。そこで、研究代表者はトリプル四重極型質量分析を検出器として使用し、高感度・高選択性の手法であるマルチプルリアクションモニタリング(MRM)によってデータを取得することで高感度プロファイリングが達成できると考え、分析システムの構築を実施した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん患者検体を用いた包括的代謝プロファイリング

大腸がん患者において、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂質解析では、25 種類のホスファチジルコリン、リゾホスファチジ

ルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、あるいは、アシルカルニチン類が、健常人と比較して有意に変動した。液体クロマトグラフ質量分析計を用いたカチオン・アニオン解析では、7種類の代謝物が有意な変動を示すことを明らかにできた。一方、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清代謝物解析では、アラニン、サルコシン、バリンなど43種類の代謝物が、有意に変動することが明らかとなった。ヒト大腸組織に関しては、がん部位において、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンのリゾ体が増加していることが確認できた。

(2)大腸発がんモデル APCmin/+マウスを用いた包括的代謝プロファイリング

大腸発がんモデル APCmin/+マウスの腸組織から、ポリープ部位と非ポリープ部位とを採取し、GC/MSによる親水性代謝物分析、イオンペア LC/MS/MSによるアニオン性代謝物分析、LC/MS/MSによる脂質代謝物分析、そして、LC/MS/MSによるカチオン性代謝物分析を実施した。また、野生型マウスから腸組織健常部位を採取し、同様に、代謝物分析を行った。その結果、ポリープ部位とともに、非ポリープ部位においても、健常部位と比較して、解糖系、TCA回路に基づいたエネルギー代謝経路の変動が起こっていることが明らかとなった。ポリープ部位と非ポリープ部位とを比較した結果、ポリープ部位と非ポリープ部位との間でもエネルギー代謝に違いがある傾向が確認できた。

(3)LESA NanoMate-QqQ-MS分析システムによる局所的超高感度代謝物分析

LESAとTriVersaTM NanoMateを融合した局所的な分析システムLESA NanoMate-QqQ-MSの構築はできたが、組織切片内の局所部位から抽出できる分子数が、組織から直接、代謝物を抽出した際の抽出できる分子数と比較して少なかったこともあり、ポリープ部位と非ポリープ部位と間に有意な変動を示す代謝物を決定することができなかった。

LESAとTriVersaTM NanoMateを融合した局所的な分析システムLESA NanoMate-QqQ-MSでは、いい結果を得られなかったが、大腸がんの発症とエネルギー代謝との関連性を示唆するデータを得ることができた。また、大腸がんとリン脂質のリゾ体との関係性についても、代謝物の変動から示唆することができた。これらの結果から、上記に関連するような代謝物がバイオマーカー候補となることが確認できたが、今回、血清と組織、両方の分析に基づき評価がなされており、信頼性の高いバイオマーカー候補と考えられる。今後、よ分子生物学的な評価なども進めていき、代謝物変動と大腸がんとの関連性をより詳細

に解明していくことで、バイオマーカー候補の信頼性をより高めることができる可能性がある。

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0件)

[学会発表](計1件)

吉江 智郎. APC 遺伝子変異が大腸癌の代謝プロファイルに与える影響についての検討. 第99回日本消化器病学会総会(鹿児島), 2013.3.21-23.

[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
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉江 智郎 (YOSHIE Tomoo)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号: 10631559

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：