

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870719

研究課題名(和文)メタボロミクスを活用した膵臓がん特異的代謝機構の解明とマルチバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Elucidation of pancreatic cancer specific metabolism and biomarker discovery using metabolomics

研究代表者

平山 明由(Hirayama, Akiyoshi)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号：00572405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キャピラリー電気泳動-質量分析法(CE-MS)を用いて、膵臓がん組織、膵液、血清中のイオン性代謝物の一斉分析を行い、がん特異的な代謝、ならびにバイオマーカーの探索を行った。本研究によって、5つのがん特異的な代謝経路、ならびに24個の血清バイオマーカー候補の抽出が可能であった。得られた知見は、新たな膵臓がん代謝メカニズム解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, comprehensive analysis of charged metabolites extracted from pancreatic tumor tissue, pancreatic fluid and blood serum were performed by using capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) in order to discover novel cancer-specific metabolism and biomarker candidates.

As a result, five pancreatic cancer-specific pathways and 24 serum biomarker candidates were highlighted in this study. This information will help to elucidate the metabolic mechanisms underlying pancreatic cancer.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボロミクス 膵臓がん バイオマーカー探索 がん組織 血清 膵液

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵臓がんには、通常型膵癌や膵管内乳頭粘液性腺癌、膵内内分泌癌などがあるが、いずれも予後不良である。中でも、通常型膵癌は日本人の癌死の第5位を占め、近年も増加の一途を辿っている。通常型膵癌の罹患数は死亡数とほぼ同等であり、また5年生存率は5%以下と極めて不良である。このように膵臓がんが難治性である理由の一つは早期診断の困難さにあり、診断時にすでに局所進行していたり、他臓器への転移や腹膜播種のある切除不能例が80%を占め、放射線療法や全身化学療法の適用となっている。従来、血清中のCA19-9やCEA、SPAN-1、DUPAN-2などの腫瘍マーカーが膵臓がんの診断の補助として用いられているが、これらは感度は比較的高いものの、特異度は低い。従って、これらを凌駕する腫瘍マーカーの開発が強く求められている。

(2) 急速に増大するがん組織で、がん細胞は常に低酸素、貧栄養による細胞死の危険にさらされている。しかし不思議なことに、がん細胞は低酸素であるほど悪性度(増殖能)が高い。古くから、がん細胞が好氣的条件下においても酸素を必要としない解糖系にエネルギー産生の多くを依存するという現象は、ワールブルグ効果として知られていた(Warburg, Science, 1956)。最近の研究によって、がん細胞ではGLUT(グルコーストランスポーター)や各種の解糖系酵素群が高発現していることや、p53、c-Myc、HIF1(hypoxia induced factor 1)などの転写因子が解糖系の亢進に深く関与していることが明らかになってきた。従って、がんと代謝の関係性に注目が集まるようになり、がんの特異的な代謝経路の探索が世界中で精力的に行われている。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 外科手術時に摘出された膵臓がん組織の腫瘍部と非腫瘍部の比較メタボローム解析を行い、腫瘍組織特異的な代謝産物・代謝経路の探索、および新規治療標的を探索する。(2) 膵液、血清検体も同様にメタボローム解析を行い、これらの体液から、早期発見、腫瘍タイプ判別・ステージ予測等の各種バイオマーカーを探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究に用いたサンプル

膵臓がん組織検体  
外科手術で切除されたIPMA(膵管内乳頭粘液性腺腫)6例、IPMC(膵管内乳頭粘液性腫瘍)17例、PK(膵臓がん)27例の腫瘍部、非腫瘍部を用いた。なお、PKはステージによってさらに細分化され、ステージIBが1検体、ステージAが6検体、ステージBが9検

体、ステージが11検体であった。

### 膵臓がん血液検体

IPMC7例、PK57例、健常コントロール96例の血清検体を用いた。なお、PKの内訳はステージが6例、ステージが51例であった。

### 膵臓がん膵液検体

IPMA11例、IPMC7例、PK13例、CP(慢性膵炎)12例の膵液検体を用いた。

## (2) サンプル前処理

### 組織の前処理

約30mgの大きさに切り分けた組織は、凍結した状態のままメタノール溶液に浸漬した後、ジルコニアビーズを入れ細胞破碎装置を用いて破碎を行った。次いで、クロロホルム、MilliQ水を順次追加して分液操作を行うことにより、大きなタンパク質や脂質などの疎水性代謝物を除去した。水相を分画分子量5,000の限外ろ過フィルターに通し、ろ液を減圧乾固し、測定を行うまで-80のフリーザーで保管を行った。

### 血清、膵液の前処理

50 $\mu$ Lの血清、膵液に450 $\mu$ Lのメタノール溶液を加えて代謝酵素を失活させた後、クロロホルム、MilliQ水を加えて分液操作を行った。水相を分画分子量5,000の限外ろ過フィルターに通し、ろ液を減圧乾固し、測定を行うまで-80のフリーザーで保管を行った。

## (3) CE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計)による細胞内代謝物の一斉測定

上述の方法で前処理した検体は、測定前に50 $\mu$ LのMilliQ水に再溶解し、陽イオン分析および陰イオン分析の2種類のCE-TOFMS条件にて測定を行った。

各代謝物の量は、組織の場合は組織1gあたりのモル数(nmol/g tissue)、血清、膵液の場合はモル濃度( $\mu$ M)に換算して解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 膵臓がん組織の比較メタボローム解析による特異的な代謝経路の抽出

CE-TOFMSを用いて、膵臓がん組織のメタボローム解析を行った結果、188種のイオン性代謝物を同定、定量することが可能であった。

解糖系代謝物の結果について図1に示す。他のがん種同様、膵臓がんにおいても解糖系の亢進が見られた。さらに、Lactateの蓄積量がIPMA、IPMC、PKの順に増加することも判明し、腫瘍の悪性度が高くなるにつれて解糖系により依存した代謝を行っていることが明らかとなった。

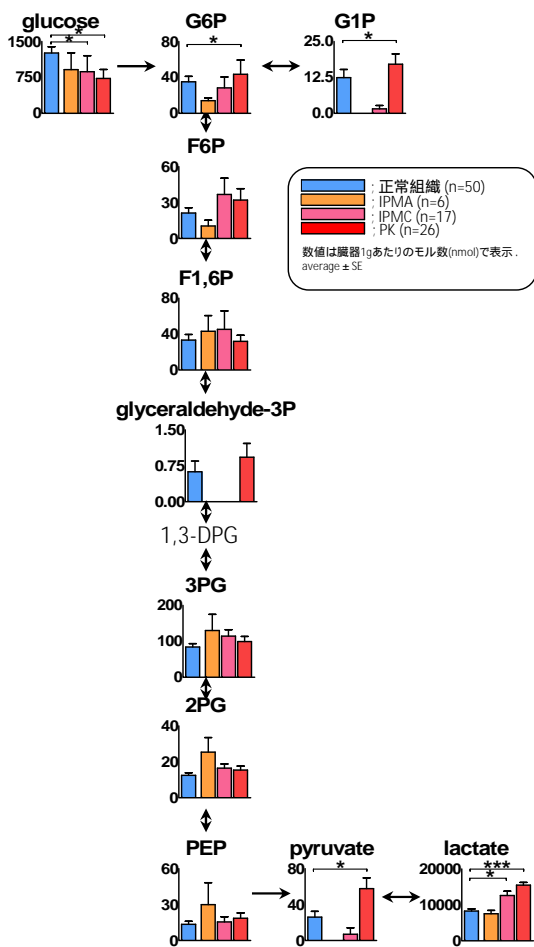


図1 膵臓がん組織における解糖系中間代謝物の蓄積量

一方、腫瘍組織中のアミノ酸量は、ほぼ全てにおいて減少していた。以前の別の研究では、大腸がんや胃がんの組織中ではほぼ全てのアミノ酸が増加していたことから、すい臓がんは特殊なアミノ酸代謝を行っている可能性が示唆された。

また、今回測定可能であった代謝物は代謝マップ上へのマッピングを行い、特徴的な代謝経路の抽出を行った。その結果5つの特徴的な代謝経路の抽出を行うことができ、一例を図2に示す。

アミノ酸の一種であるオルニチンは、脱炭酸されてプトレッシンというアミンに代謝され、一部はアセチル化されてN-アセチルプトレッシンになる。プトレッシンからN-アセチルプトレッシンへの代謝は腫瘍組織と非腫瘍組織における比率が両者とも変化していないが、オルニチンからプトレッシンへの代謝においては明らかにその蓄積量が逆転していた。この代謝を司る酵素はオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)であるが、メタボローム解析の結果から腫瘍組織において ODC が亢進したため基質であるオルニチンが減少し、反応性生物であるプトレッシンが増加したのではないかと考えられた。

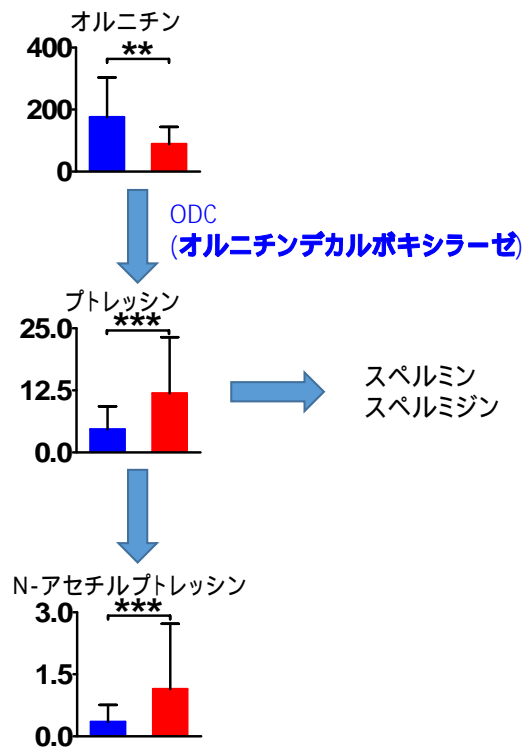


図2 ポリアミン生合成経路に関する代謝物の蓄積量

### (2) 膵液検体を用いたバイオマーカー探索

はじめに、採取した膵液の保存に通常用いられるプロテアーゼインヒビター(PI)のメタローム解析結果への影響について検討を行った。7つの膵液検体について、PIの有無によって代謝物プロファイルが変化するかどうかを検討したが、影響が無かったため以降の実験においては PI ありの検体を用いることとした。

IPMA、IPMC、PK、CPの膵液検体をメタローム解析した結果、約80種のイオン性代謝物を検出することが可能であった。しかしながら、同じ病態においても膵液中の代謝物濃度が数百倍異なるケースがあり、尿中クレアチニンのように濃度を補正する代謝物が必要であると考えられた。従って、本研究においては詳細なマーカー探索を行うことができなかった。

### (3) 血清検体を用いたバイオマーカー探索

健常人とPK患者の血清を主成分分析(PCA)した結果を図3に示す。イオン性代謝物のプロファイルは両者で明確に異なることが示唆された。

各病態群における血中濃度の比較を行い、24種類のバイオマーカー候補を得ることができた。その一例を図4に示す。PK血清中において増加する代謝物が多かったが、減少する代謝物も見つかリ、将来的にはこれらを組み合わせることによって、さらに判別精度を高めることが可能であると思われる。

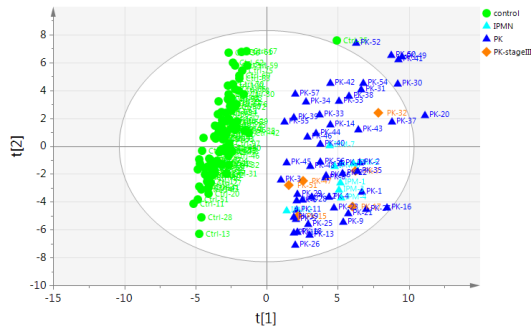


図3 膵臓がん血清のPCA結果

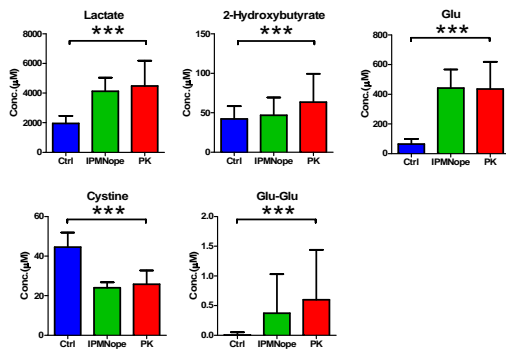


図4 膵臓がん血清中で増減する代謝物

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 明由 (HIRAYAMA AKIYOSHI)  
慶應義塾大学 政策・メディア研究科 特任助教  
研究者番号：00572405

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3件)

平山明由、三方林太郎、曾我朋義 キャピラリー電気泳動 - 質量分析法(CE-MS)を用いたメタボローム解析 第87回日本生化学会 2014年10月16日 国立京都国際会館(京都)

平山明由、曾我朋義 CE-MS metabolomics; toward comprehensive understanding of central metabolism 日本分子生物学会 2013年12月3日 神戸ポートピアホテル(神戸)

平山明由、多田素久、富田勝、曾我朋義 キャピラリー電気泳動 - 質量分析法(CE-MS)を用いた膵臓がんのメタボローム解析 日本分析化学会第62年会 2013年9月12日 近畿大学(大阪)

〔図書〕(計1件)

平山明由、曾我朋義 株式会社羊土社 トランスオミクスが拓く次世代の生命科学 (2014), 1205-1209.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)