

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882023

研究課題名(和文) 超臨界流体クロマトグラフィー質量分析を用いた大腸がん早期診断法の開発

研究課題名(英文) Development of early diagnosis method for colorectal cancer using supercritical fluid chromatography/ mass spectrometry

研究代表者

松原 惇起 (Matsubara, Atsuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・薬剤師

研究者番号：90709677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：代謝物総体(メタボローム)解析は、疾患バイオマーカー探索や病態解析における有望技術とされるが、分析の困難さゆえにさまざまな疾患に関連すると考えられるある種の脂溶性代謝物は対象とされてこなかった。本申請課題では、超臨界流体クロマトグラフィーや超臨界抽出を世界に先駆けて検体の分析に応用し、重要であるにも関わらず解析されてこなかった分子群を分析対象に加えることでがんの早期診断に向けた分析技術の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Metabolome analysis is one of the promising approach for biomarker discovery and pathophysiological analysis. However, due to analytical difficulty, some kind of hydrophobic metabolites which are deeply involved in various diseases have not been targeted for analysis. In this study, supercritical fluid chromatography and extraction were applied for construction of analytical system for these important metabolites to construct early diagnosis of cancers.

研究分野：超臨界流体メタボロミクス

キーワード：超臨界流体クロマトグラフィー メタボロミクス 質量分析 超臨界流体抽出

1. 研究開始当初の背景

日本社会の高年齢化に伴い、がんによる死者数は増加の一途を辿っている。そのため、治療可能ながんを簡便、かつ、非侵襲的に、より早期に発見できる診断法の開発が求められている。がんを含む多くの疾患で、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。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ことから、代謝物総体解析であるメタボローム解析はバイオマーカーの探索の有望技術とされている。

2007年度の世界がん研究基金(WCRF)と米国がん研究協会(AICR)の評価では、牛、豚、羊などの動物性脂質に富む赤肉の摂取が大腸がんリスクを上昇させるのは確実であると確認された。一方、n-3系多価不飽和脂肪酸の豊富な魚類の摂取は、大腸がんを予防する可能性が示唆されると判定されている。このことから、構成脂肪酸を含めた脂質の“質”をプロファイルすることで、大腸がん特有の代謝変動を捉えることができる可能性がある。また、近年、大腸がんにおける前がん状態からの悪性化へのリゾフォスファチジン酸受容体の関与(Lin S. et al. Gastroenterology 2009 Jan;136(5):1711-20)が指摘されており、大腸がん発生への脂質の関与が注目されている。さらに、一連の脂質過酸化反応によって生成した過酸化脂質は、変異原性を有し発がんへの関与が指摘されていることから、酸化脂質ががん特有の変動を示す可能性がある。また、胆汁酸は脂質吸収を促進し脂質の代謝変動に関与するだけでなく、腸内細菌による代謝により生じる二次胆汁酸であるリトコール酸が大腸がんの発生に関与するという報告がある(Kozoni V. et al. Carcinogenesis 2000 May;21(5):999-1005)。これらの報告は、脂溶性物質がさまざまな疾患に深く関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

しかし、これまでの分析システムでは、さまざまな疾患に深く関与すると想定されている脂溶性物質(脂質、酸化脂質、胆汁酸など)を網羅的に解析することができなかった。そこで申請者は、移動相として超臨界流体を用いる超臨界流体クロマトグラフィー(Supercritical Fluid Chromatography: SFC)のメタボロミクスへの応用を試みた。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。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、ガスクロマトグラフィー

(GC)や液体クロマトグラフィー(LC)にない幅広い分離モードを選択できる。SFCを用いることで、ある種の疾患において重要であるが、従来分析が困難であるために解析されてこなかった分子群をメタボローム解析の対象に加えることで、より簡便かつ低侵襲的で信頼性のあるがんの超早期診断法を開発のための分析技術構築を試みた。

3. 研究の方法

まず、超臨界流体クロマトグラフィータンデム型質量分析(SFC/MS/MS)を用いて、様々な脂溶性代謝物の分析系を構築する。次に、構築した分析系のバリデーションテストを行い、直線性や再現性など、実用に耐えうる分析システムであることを確認する。また、血清や組織など生体試料への適用性も評価する。しかし、脂質の中には抽出・精製段階で容易に酸化され安定に測定することが困難な代謝物が存在することが予想される。そのような代謝物に対しては、気体様の高い拡散性、および、液体様の物質溶解性を併せ持つという超臨界流体のユニークな性質を活かしたオンライン超臨界流体抽出(SFE)システムの適用を検討する。オンラインSFEシステムでは、抽出/分離/分析を一工程で行うことを可能であり、抽出物が酸素や光に触れることがないため、不安定な代謝物の分析に有用である。さらに、オンラインSFE-SFCは煩雑な前処理を必要とせず、分析の完全自動化が可能であることから、多検体連続分析が必要とされる臨床検体分析には理想的な手法である。

4. 研究成果

SFC/MS/MSによる代謝物分析システム構築に関しては、標準品を用いて質量電荷比、保持時間に関する情報を得た。これまでに、脂質、カロテノイド、および、それらの酸化物などの誘導体、胆汁酸、脂溶性ビタミン類など、重要な生理活性を持った脂溶性代謝物の分析系を構築した。次に、構築した分析系のバリデーションテストを行い、直線性や再現性など、実用に耐えうる分析システムであることを確認した。また、血清や組織など生体試料への適用性も評価し、問題のないことを確認した。また、オンライン超臨界流体抽出(SFE)システム構築に資する検討に取り組んだ。試料としては侵襲度が低く保存運搬などの取扱いが簡便なことから近年注目されているろ紙血清を用いることとし、各種分析条件の最適化や、生体試料への適用性を評価した。まずSFEによりどのような代謝物が抽出されるのか、抽出物をLC/MSにより分析することにより調べた。SFEに用いる超臨界流体二酸化炭素は極性が低いとされるため、対象代謝物は脂溶性代謝物に限定されることが予想されたが、少量のメタノールを加えて

抽出を行うことで、アミノ酸やベタイン、核酸関連代謝物などの水溶性代謝物に関して抽出が行えることを明らかとした。次に、モディファイヤー、温度、圧力、ならびに、抽出時間などのSFEによる代謝物の抽出条件を最適化した。最後にヒト血清への適用性を検討し、従来の有機溶媒抽出法と比較した。その結果、SFEにより脂溶性、水溶性代謝物合わせて200種以上が抽出され、そのうち160種類以上の代謝物が安定に分析できることを明らかにした。

	水溶性代謝物		脂溶性代謝物	
	Detected	RSD<20	Detected	RSD<20
超臨界流体抽出	37	17	195	144
有機溶媒抽出	40	24	185	127

表 1

超臨界流体抽出および従来の有機溶媒抽出法により血清から検出 (Detected)、あるいは安定に分析された (RSD<20) 水溶性、および、脂溶性代謝物の数

超臨界流体抽出 で有意に高かった	有機溶媒抽出 で有意に高かった
LPC_14-0 (sn-1)	Glycine
PC_16-0e_16-0	Guanosine
PC_16-0_18-2 PC_16-1_18-1	Hypoxanthine
PC_18-1_18-1 PC_18-0_18-2	L-Alanine
PC_17-0_20-4	L-Arginine
PC_18-0_20-4	L-Citrulline
PC_18-1_22-6	L-Glutamate
PE_16-1_18-1 PE_16-0_18-2	L-Histidine
PE_16-0_18-1	L-Homoserine
PE_16-0_20-4	L-Lysine
PE_18-1_18-2	L-Serine
PE_18-1_18-1 PE_18-0_18-2	L-Threonine
FA_14-1_Myristoleic acid	L-Tryptophan
FA_14-0_Myristic acid	L-Tyrosine
FA_15-0_Pentadecylic acid	DMG
FA_16-1_Palmitoleic acid	Taurine
FA_17-1_10-Heptadecanoic acid	L-Kynurenine
FA_21-0_Heneicosanoic acid	Phosphocholine
FA_22-1 (n-9)_Erucic acid	
FA_23-0_Tricosanoic acid	
FA_24-1 (n-9)_Nervonic acid	
FA_24-0_Lignoceric acid	
FA_25-0_Pentacosanoic acid	
FA_27-0_Heptacosanoic acid	

表 2

超臨界流体抽出および有機溶媒抽出で有意に高く検出された代謝物のリスト。赤字はその抽出法でのみ検出されたことを示す。LPC: リゾホスファチジルコリン、PC: ホスファチジルコリン、PE: ホスファチジルエタノールアミン、FA: 脂肪酸。代謝物名の後

は結合している脂肪酸の炭素数および不飽和度を示している。

超臨界流体抽出と有機溶媒抽出を比較すると、超臨界流体抽出では脂溶性代謝物が、有機溶媒抽出では水溶性代謝物が効率よく抽出できることが明らかになった。これは、先にも述べた通り、超臨界流体抽出の抽出溶媒である超臨界流体二酸化炭素の極性が低いことが影響しているものと考えられる。ただし、超臨界流体抽出でも、水溶性代謝物の検出数は有機溶媒抽出と比べても遜色なく、また、数種の脂肪酸については、超臨界流体抽出によってのみ抽出されることが分かった。さらに、全血のろ紙血に適用した。全血は保存が難しいため、乾燥血斑でなければ取扱いが難しいサンプルといえる。結果、多くのホスファチジルエタノールアミン (PE) の分子種が全血からのみ検出された。

血清からのみ 検出された代謝物	全血からのみ 検出された代謝物
LPC_17-1 (sn-2)	LPE_22-6 (sn-1)
LPC_19-0 (sn-1)	LPE_22-6 (sn-2)
	PE_16-0_16-1 PE_14-0_18-1
	PE_16-0_16-0
	PE_16-0p_18-1
	PE_16-1_18-2 PE_16-0_18-3
	PE_16-0p_20-5
	PE_18-0p_18-1
	PE_17-0_18-1
	PE_18-0e_18-1
	PE_18-2_18-3
	PE_16-0_20-5
	PE_16-0_22-4
	PE_18-1_20-3 PE_18-2_20-2
	AC_18-0
	AC_18-1
	AC_18-2

表 3

ろ紙血清およびろ紙全血からのみ検出された代謝物。LPC: リゾホスファチジルコリン、LPE: リゾホスファチジルエタノールアミン、PE: ホスファチジルエタノールアミン、AC: アシルカルニチン。代謝物名の後は結合している脂肪酸の炭素数および不飽和度を示している。

血清では取り除かれている赤血球などの血球成分の影響であると考えられる。通常血清をサンプルとしたときには対象にならないような脂溶性成分も分析することができることから、バイオマーカー探索などにおいて、有用となる可能性がある。

以上によりオンライン SFE-SFC/MS/MS による全自動高精度メタボロム解析システム構築の礎となるデータを蓄積できた。今後、本システムの発展により従来の代謝物情報とともに易分解代謝物、重要脂溶性代謝物などの情報を獲得し、治療効果予測や予後判定を含む新たながん早期診断法の開発へ向けた研究を行われることが期待される。

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 1 件)

Atsuki Matsubara, Yoshihiro Izumi, Shin Nishiumi, Makoto Suzuki, Takeshi Azuma, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, Masaru Yoshida, Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots, Journal of Chromatography B, 査読有, Vol. 969, 2014, pp.199-204
doi:10.1016/j.jchromb.2014.08.013

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原 惇起 (MATSUBARA Atsuki)

研究者番号 : 90709677