

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430143

研究課題名(和文) 質量分析計を用いたがん転移早期検出法の開発

研究課題名(英文) Development of an early diagnostic system for metastasis using the mass spectrometer

研究代表者

波多野 直哉 (Hatano, Naoya)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：10332280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん(悪性腫瘍)は日本人の死亡原因の第1位で、約1/3を占めている。このがんで死に至るケースのほとんど(9割)で、がん転移を起こしていることが知られている。原発巣での外科治療や化学的療法によるコントロールに成功しても、最終的に転移巣が大きくなって予後不良となる。がん転移を早期に発見する有効な手段はほとんどなく、簡便で低コストかつ効率よくスクリーニングする方法が求められている。

がん転移は、上皮性のがん細胞が、より運動性の高い間葉系細胞の表現型を獲得する上皮間葉転換(EMT)がきっかけとなる。このEMTを誘導した乳がん細胞を用いて、がんの転移のバイオマーカー候補である代謝物を発見した。

研究成果の概要(英文)：Cancer is leading cause of death in Japan. It is known that the metastasis has occurred in most cases of death. There is no method to find the metastasis at an early stage. Therefore, a low-cost, easy-to-use, and high-sensitive cancer metastasis screening method is required.

Initiation metastasis required invasion, which is enabled by epithelial-mesenchymal transition(EMT). Here, we detected the biomarker candidates for metastasis using EMT-induced breast cancer cells.

研究分野：生化学

キーワード：バイオマーカー メタボローム がん

1. 研究開始当初の背景

(1) がん(悪性腫瘍)は、日本人の死亡原因の第1位である。このがんが死に至るケースのほとんど(9割)で、がん転移を起こしていることが知られている。がん細胞は増え続けるだけでなく、周囲の組織へ広がり(浸潤)、血液やリンパの流れに沿って、遠くの臓器へ引越して、やがてそこですみかを作って大きくなる。これが転移と呼ばれる現象で、がんが最初にできた場所(原発巣)のコントロール(外科治療、放射線治療、化学療法など)に成功しても、最終的に転移巣が大きくなって予後不良となる。よって、転移巣が小さなうちの早期に発見し、転移巣のがんを直ちに治療することが重要であると言われている。がんの転移にはパターンがあり、乳がんや前立腺がんは骨(骨髄)へ、大腸がんは肝臓へ、肺がんは脳へ転移することがよく知られている。しかし、このがん転移を早期に発見する効果的な方法は無く、簡便で低コストでかつ効率よくスクリーニングする方法が求められている。

(2) そこで、がん転移の早期スクリーニング法として、代謝物(生体内低分子化合物)のプロファイルを利用する「疾患プロファイリング」を用いることを考えた。これは、生体分子の網羅的な定量解析を得意とする質量分析計を用いて、がん転移時に特徴的な代謝物パターンを検出し、これをがん転移の早期診断に応用する方法である。がん転移の際には、通常時と異なり、糖代謝(解糖系)が減衰すると言われているので、これに関与する有機酸、アミノ酸、脂肪酸の検出を得意とするガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS)を利用する。この装置を使って、近年大きな問題となっている乳がん細胞の転移の早期スクリーニング法を開発することを最終的な目標とする。

2. 研究の目的

(1) がん転移の早期診断が可能な単独のバイオマーカーを得ることは、これまで長年にわたるバイオマーカー探索研究の結果から考えると、非常に困難であると考えられる。そこで、がん転移に伴う特徴的な代謝物の変動を総合的に捉える(代謝物プロファイル)ために、メタボロミクス解析を行う。

(2) がんの転移は、上皮性のがん細胞が、より運動性の高い間葉系細胞の表現型を獲得することがきっかけとなる。これを、上皮間葉転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)といい、このEMTをコントロールすることが、新しいがん治療戦略と考えられている。このEMTは、ヒトのがん由来の培養細胞においてTNF- と TGF- の同時投与により誘導できる。これによりEMTを

誘導したがん細胞とそうでない状態の細胞の代謝物パターンの比較を行う。

(3) 代謝物とは、主にエネルギーを得るためのタンパク質酵素反応によって生成される生体内の低分子化合物の総称であり、これを網羅的に解析する方法をメタボロミクスという。がん転移する細胞では、細胞型を変化させるために、糖代謝が減衰しているといわれている。そのため、有機酸、アミノ酸、脂肪酸等の代謝物に、アンバランスが生じこれが血中にも反映され、血清中代謝物で優位に差が見られる可能性が高いと考えられる。質量分析計は、生体分子を高感度に網羅的に解析できる機器であるが、中でもこれらの代謝物の検出を得意とするGC-MSを用いる。これにより、EMTを誘導した細胞とそうでないコントロール細胞を比較し、複数の代謝物量の差を総合的に捉え、がん転移に特徴的な代謝物プロファイルを検出し、最終的にがん転移の早期診断への応用を目指す。

(4) 同じくEMTを誘導した細胞を、安定同位体を含むアミノ酸を加えた細胞培養液中で培養(SILAC: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)し、乳がん細胞での転移における代謝物変動を担う代謝酵素タンパク質の増減を調べる。これには、液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)を用いる。

3. 研究の方法

(1) がん転移に特徴的な代謝物プロファイルを取得するために、転移がん細胞の特徴であるEMTを誘導した細胞とコントロール細胞を用いて、細胞中の水溶性代謝物(有機酸、アミノ酸、脂肪酸等)を抽出し、質量分析計でメタボロミクスデータを取得した。EMT誘導は、乳がん細胞であるMCF7を用い、5 nM TGF-、2 nM TNF- を加え、72時間培養で行った。

水溶性代謝物の抽出法としては、細胞をメタノール/クロロホルム混合液で処理し、タンパク質を沈殿させ、代謝物を含む上清を回収し、有機溶媒を揮発した後、凍結乾燥した。これをピリジン溶液に溶かしたメトキシアミンで糖類をオキシム化し、その後MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)試薬でトリメチルシリル(TMS)化し、熱安定性のある難揮発性物質を揮発性物質へ誘導体化し、質量分析計GCMS-QP 2010 Ultra(島津製作所)で測定した。あらかじめ代謝物抽出前にインターナルスタンダードを加えておき、抽出操作によるサンプル間のばらつきを補正を行った。

(2) EMT誘導において、代謝物プロファイルに違いが起こるメカニズムを調べるため、代謝酵素タンパク質量を網羅的に比較する方

法として、SILAC 法を使用した。これは、EMT 誘導した細胞に、安定同位体ラベルしたアミノ酸($^{13}\text{C}_6\text{-L-Lysine}$)を取り込ませて、タンパク質を抽出し、比較するコントロール細胞由来のタンパク質を等量混合し、質量分析計 LCMS-IT-TOF(島津製作所)で代謝酵素に由来するペプチドのピークを比較して、タンパク質量を比較した。

4. 研究成果

(1) ウェスタンブロッティングにより、今回の実験条件において、乳がん細胞 MCF7 で、EMT が誘導されていることを確認した。通常 EMT 誘導で見られる E-cadherin の減少を確認した(図 1)($\alpha\text{-Tubulin}$ はコントロール)。



図 1. EMT 誘導した細胞(EMT)と、コントロールの細胞(Cont)から抽出したタンパク質を用いたウェスタンブロッティング。

(2) EMT を誘導した細胞とコントロール細胞を用いて、細胞中の水溶性代謝物を抽出し、質量分析計でメタボロミクスデータを取得した。解析ソフト(GCMS Solution)と in-house の代謝物データベースを用いて、代謝物の同定・比較を行った。当研究室では、GC-MS 用の 438 種類の代謝物データベースを構築している。その結果、EMT 誘導により、大きく変動する代謝物として、ホスホエノールピルビン酸(phosphoenolpyruvic acid)とピルビン酸(pyruvic acid)が検出された。EMT 誘導により、ホスホエノールピルビン酸は約 1/4 に減少し、ピルビン酸(pyruvic acid)は約 3.5 倍増加することが判明した(図 2)。

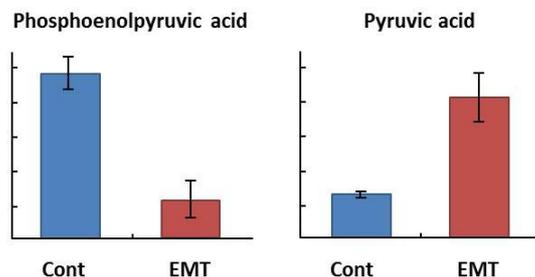


図 2. EMT 誘導した細胞(EMT)と、コントロールの細胞(Cont)から抽出した代謝物の比較

で、大きく変動が見られたもの。

(3) 上記で見られた代謝物の変動の原因を明らかにするため、EMT 誘導による代謝酵素の比較検討を行った。当研究室では、代謝に関わる酵素群について、SILAC 法を用いて網羅的に比較定量するプロテオミクス系を確立している。細胞抽出物を SDS-PAGE する前に、3100 OFFGEL Fractionator (Agilent) を用いた等電点電気泳動を行うことにより、安定的に 100 種類以上の代謝酵素タンパク質量の比較が可能となった。これには、代謝の主要経路である解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に関わる重要な酵素がほとんど含まれている。この解析を EMT 誘導した細胞に適用した。

その結果、EMT 誘導により増加した主な代謝酵素群として、キヌレニナーゼ(KYNU)、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (ACADVL)、UTP-グルコース-1-リン酸ウラジリルトランスフェラーゼ(UGP2)などが検出された(表 1)。

また、EMT 誘導により減少した主な代謝酵素群として、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ(PCK2)、イソクエン酸脱水素酵素(IDH3A, IDH2)、ATP 合成酵素のサブユニット(ATP5O, ATP5C1, ATP5B)などが検出された(表 1)。

表 1. EMT 誘導した細胞で、大きく増減した代謝酵素群

代謝酵素名	相対比
EMT 誘導で増加した代謝酵素	
KYNU	2.76
ASS1	2.67
PAM	1.57
ACADVL	1.48
UGP2	1.24
EMT 誘導で減少した代謝酵素	
PCK2	0.51
IDH3A	0.58
CMBL	0.59
PYCR1	0.62
HIBADH	0.63
MAT2B	0.64
UGDH	0.65
LTA4H	0.65
LPCAT1	0.65
ATP5O	0.65
UQCRC2	0.69
HIBCH	0.69
ATP5C1	0.69
DPM1	0.70
MHFD1	0.71
IDH2	0.71
FBP2	0.71
HSD17B10	0.72
AK2	0.72

ECHS1	0.73
ATP5B	0.73
DAK	0.74
GLUD1	0.75

解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路の主要な代謝経路に関する酵素群が軒並み減少しているのに加え、ミトコンドリアにある ATP 合成酵素のサブユニットも減少していることが判明した。

(4) これまでの EMT 誘導により変動した代謝物と代謝酵素の結果を代謝マップ上に示し、全体像を考察した(図 4)。

キヌレニナーゼ(KYNU)の増加により、キヌレニン(Kinurenine)から、アラニン(Ala)、グリシン(Gly)などを経て、ピルビン酸(Pyruvic acid)が合成される経路が活性化される。その結果として、ピルビン酸が増加する。ピルビン酸から生成されるオキサロ酢酸(Oxaloacetate)は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PCK2)が半減すること、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)の増進により、ホスホエノールピルビン酸の生成よりも、アスパラギン代謝を経て、アルギニノコハク酸(L-arginino-succinate)への代謝が活性化されることが予測された。

以上の代謝酵素の働きにより、EMT が誘導された細胞では、ピルビン酸が増加し、ホスホエノールピルビン酸が減少したと推察された。

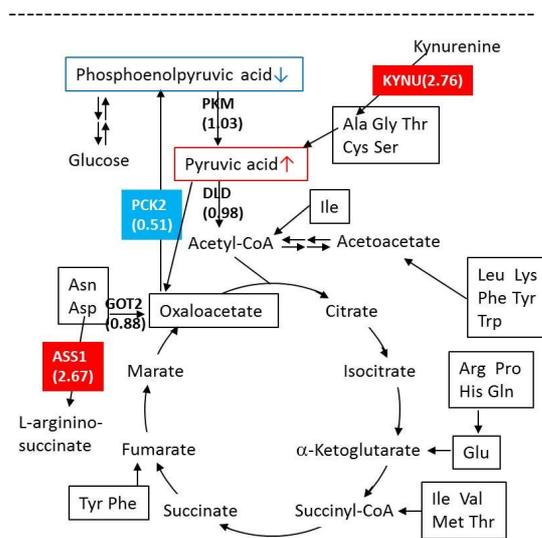


図 4. EMT 誘導した細胞において、大きな代謝変動に関わる主要な代謝経路を示した代謝マップ。

(4) 代謝酵素以外にも、ユビキチン化(Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7) (0.57 倍)や、脱リン酸化酵素(Receptor-type tyrosine-protein

phosphatase eta)(2.08 倍)、Serine/threonine(0.58 倍)など、翻訳後修飾に関するタンパク質変動が明らかとなった。これらのタンパク質が、EMT 誘導された細胞で、どのように代謝変動に関わっているかは不明である。

(5) 今回検出された EMT 誘導により大きく変動した代謝物が、実際のがん患者で、がん転移の有無と相関して変動しているかを調べるのは、今後の課題である。

今回用いた手法は、様々な疾患の早期発見・病態の進行度の確認などにも応用できる可能性がある。実際に、糖尿病に関わる膵細胞への応用で成果を挙げつつある。

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4件)

Ijuin T, Hatano N, Takenawa T. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP3 phosphatase SKIP and determines its localization. *Genes Cells*. 21(5), 457-465, 2016. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12353.

Ijuin T, Hatano N, Hosooka T, Takenawa T. Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta*. 1853(12), 3192-3201, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.009.

Yokoi, N, Beppu M, Yoshida E, Hoshikawa R, Hidaka S, Matsubara T, Shinohara M, Irino Y, Hatano N, Seino S. Identification of putative biomarkers for prediabetes by metabolome analysis of rat models of type 2 diabetes. *Metabolomics*. 11(5), 1277-1286, 2015. 査読有
DOI: 10.1007/s11306-015-0784-9

Gheni G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, Harada K, Hastoy B, Wu X, Takahashi H, Kimura K, Matsubara T, Hoshikawa R, Hatano N, Sugawara K, Shibasaki T, Inagaki N, Bamba T, Mizoguchi A, Fukusaki E, Rorsman P, Seino S. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Rep*. 9(2), 661-673, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.030.

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

波多野 直哉 (HATANO, Naoya)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：10332280