

平成 22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20890124
研究課題名（和文） メタボローム解析による大腸がんのバイオマーカー探索
研究課題名（英文） Metabolomics in human colon cancer
研究代表者
奥野 達也（OKUNO TATSUYA）
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号：50464269

研究成果の概要（和文）：

病態時における細胞においては、疾患関連タンパク質の分泌およびプロテアーゼなどの分解により、さまざまに代謝・分解された代謝産物が生成される。このような疾患特異的な低分子量代謝産物を網羅的、包括的に解析した研究は、さまざまな問題から十分に成果を達成していない。申請者は、消化器がんに発現、生成が認められる低分子量代謝産物を中心に網羅的に解析してがんバイオマーカーを同定し、将来の臨床応用をめざす。

研究成果の概要（英文）：

In the cells with pathological conditions, various metabolites are produced through the secretion of disease-related proteins and the protein degradation by proteases. However, the comprehensive study of these disease-specific low-molecule metabolites has not shown the adequate results yet due to various problems. Therefore, the experiments to comprehensively analyze the low-molecule metabolites derived from gastroenterological carcinomas followed by identification of the novel cancer-specific biomarkers was designed, and then it was investigated whether the identified biomarkers can be actually used in clinical practice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：大腸癌、メタボローム、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は近年、日本人の死亡原因の第1位となっている。全がん患者の死亡率統計(2004年度)によれば、消化器癌領域における胃癌(死亡率 男性:第2位 女性死亡率:第2位)、大腸(結腸・直腸)癌(死亡率 男性:第4位 女性:第1位)、食道癌(死亡率 男性:第6位)は、死亡頻度の高い癌種である。これらの疾患に対し、外科的切除困難な患者に対する抗がん剤治療や、癌種によっては放射線療法の併用を行うことによって、担がん患者の生存期間の延長ならびにQOLの向上を目標に診療を行ってきた。一方、過去50年に渡る新規抗がん剤治療の開発と平行して、薬理遺伝学の研究分野においては、患者個人の遺伝子型背景を解析することにより、抗がん剤の治療効果や副作用、至適投与量を予測する試みがなされており、これまでの画一化された治療法から、患者個々の遺伝子型に応じた薬物の投与が検討されている。これまで、申請者は抗がん剤の薬物動態学/薬物力学解析の知見を理解し、患者個人の Genotype(遺伝子型)がもたらす薬物動態の影響を考慮することで、患者個人に対するオーダーメイド治療への臨床応用の可能性について検討してきた。

近年、ヒトゲノム塩基配列の完全解読が宣言され、ポストゲノムシーケンス研究の重要性が示唆され、タンパク質解析によるゲノムの解析機能、診断や治療に SNPs などの遺伝子多型や遺伝子の発現量をマーカーとして利用する試み、さらにゲノム創薬にむけてのホモロジー解析を中心としたゲノミクス研究や、X線、NMR等の構造生物学関連の構造プロテオーム研究も進められている。これらのことから、機能に関連したプロテオーム研究により、タンパク質の量的、質的変動に関する情報が得られ、相互に作用するタンパク

質のリンケージ解析が行われ、その生理機能がより詳細に解明されるものと期待される。今後、このような具体的なタンパク質の機能解析に加えて、タンパク質以外の細胞内低分子の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析(メタボローム解析)が必要になると思われ、この分野を自分の研究分野に応用しようと思つた。

病態時における細胞においては、疾患関連タンパク質の分泌、プロテアーゼなどによる酵素による分解、代謝が行われており、ペプチドやさまざまな分解産物が生成されている。しかし、このような低分子量のペプチドや代謝産物を網羅的、包括的にメタボローム解析した研究は、これまでの質量分析計の精度、ならびにその解析ソフトの問題から、まだ十分な成果を上げていない。また、現在用いられているプロテオミクス手法は、2次元電気泳動と質量分析計を組み合わせたものである。しかしながら、これらの手法を用いた分析法では、比較的溶解性の高いタンパク質に限られ、しかも分析できるタンパク質の種類も5000以下で、微量に発現しているタンパク質は分析不可能である。ヒト細胞には、10000個以上のタンパク質が発現しているといわれており、また、それぞれの作業が煩雑であり、経験を積んだ研究員が多数必要であるため、多量のサンプルを分析するには多くの困難が伴う。近年、高感度液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせた複合解析システムが開発され、このシステムでは生体試料中の発現タンパク質を単離する工程なしに、混合物の状態で高速かつ確実なタンパク質の同定ならびに代謝産物の測定、定量が可能となった。そこで、この新たに開発された HPLC システムと質量分析計、ならびにその解析ソフトを含めた統合システムを使い、モデルがん細胞を用いて分子標的治療

薬前後でのメタボローム解析を行う。これらより、がん特異的ペプチド性代謝産物を明らかにし、新たなバイオマーカーの同定ならびに将来の臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

生命の設計図は遺伝子から構成されているが、実際には多くのタンパク質やその代謝産物はその生命活動を担っている。そのため、各種疾患におけるタンパク質代謝産物の変化は遺伝子の発現量よりも、ダイナミックである可能性がある。近年開発されたメタボローム解析システムは定量性が高いため、病態や薬剤効果などをより正確に把握できる可能性があり、超早期診断や治療効果判定に大きな威力を発揮することが期待される。そこで、今回申請者は、高感度な統合質量分析システムを使い、がん患者の生体試料を用いた網羅的ペプチドメタボローム解析を行い、新たな大腸がん特異的バイオマーカーの同定およびその臨床応用を目指すため、以下の実験を行う。

(1) 大腸がんペプチドメタボロミクスの確立

① nanoHPLC-MALDI-TOF-MS 解析システムの開発

② AXIMA-TOF2 ならびに LCMS-IT-TOF による MS/MS 解析での構造決定システムの確立

③ 大腸がん細胞株特異的バイオマーカーペプチドの同定

(2) 大腸がん臨床ペプチドメタボロミクスの確立

① 進行大腸がん患者のがん細胞を用いたペプチドメタボローム解析

② 進行大腸がん患者の血清試料を用いたバイオマーカーペプチドの測定

③ 大腸がん臨床検体を用いたペプチドメタボロミクス解析の総合評価

3. 研究の方法

(1) 各種大腸がん細胞株を用いたペプチドメタボロミクスの確立

メタボローム解析においては、各種大腸がん細胞株に発現、生成が認められる分子量 3000 以下のペプチドを中心に網羅的に解析することを平成 20 年度の目標とした。このため、初年度において、これらの一連の作業を自動化した nanoHPLC-MALDI-TOF-MS 解析システムを開発する。さらに、得られたデータの定量比較解析を行い、変化のあるピーク（ペプチド）を同定し AXIMA-TOF2 ならびに LCMS-IT-TOF による MS/MS 測定でペプチドの配列ならびに由来するタンパク質を決定するまでのシステムを確立する。さらに、上記のシステムを用いて、各種大腸がん細胞株に発現、生成が認められる分子量 3000 以下のペプチドを中心に網羅的に解析する。上記と同様に MS/MS 測定によりペプチドの構造決定を行い、疾患特異的バイオマーカーの検索を行うことで、実際に開発したペプチドメタボローム分析法が様々な大腸がん細胞に適応可能である事を証明する。

① nanoHPLC-MALDI-TOF-MS 解析システムの開発

まずモデルがん細胞株を用いて、がん細胞が培養液中に産生するペプチドを解析するために、それぞれの培養液からペプチドを濃縮後、逆相カラムを用いた全自動 nanoHPLC システムにより約 1200 フラクションに分画する。それぞれの分画を MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) 法にてイオン化し TOF-MS のサンプルプレートに自動的にスポッティングして質量分析を施行し、その結果をディファレンシャル解析ツールにて、一連の作業を自動化した nanoHPLC-MALDI-TOF-MS 解析システムを開発

する。

②AXIMA-TOF2ならびにLCMS-IT-TOFによるMS/MS解析での構造決定システムの確立

得られたデータの定量比較解析を行い、変化のあるピーク（ペプチド）を同定し、AXIMA-TOF2ならびにLCMS-IT-TOFによるMS/MS測定で、ペプチドの配列ならびに由来するタンパク質を決定するまでのシステムを確立する。

③各種大腸がん細胞株特異的バイオマーカーペプチドの同定

上記のシステムを用いて、各種大腸がん細胞株に発現、生成が認められる分子量3000以下のペプチドを中心に網羅的に解析する。上記と同様に行い、MS/MS測定によりペプチドの構造決定を行い、疾患特異的バイオマーカーの検索を行い、実際に開発したペプチドメタボローム分析法が様々な大腸がん細胞に適応可能である事を証明する。

(2) 大腸がん臨床ペプチドメタボロミクスの確立

実際の大腸がん患者のサンプルを用いたペプチドメタボローム解析を行う。進行大腸がん患者のがん組織ならびに血清などの臨床検体を用いてメタボローム解析し、新たな大腸がん特異的バイオマーカーの検索を行い、臨床的評価を行う。特に、各種大腸がんの進行度、悪性度、抗がん剤の効果などの臨床的カテゴリーに照らし合わせ、本メタボロミクスにより確立したバイオマーカーの適応可能領域を検討し、どの程度実用的であるかの判断を行う。

①進行大腸がん患者のがん細胞を用いたペプチドメタボローム解析

上記のモデルがん細胞株を用いて確立した方法を用いて、以下の検討を行う。進行大腸がん患者のがん組織を外科的に採取する。同時に同患者の血清も採取する。In vitroで

患者から得られた大腸がん細胞株の培養液をペプチドメタボローム解析し、モデルがん細胞株を用いた時と同様に、開発したペプチドメタボローム解析法がさまざまな臨床検体から得られたがん細胞試料にも適応可能であることを証明する。

②進行大腸がん患者の血清試料を用いたバイオマーカーペプチドの測定

上記の in vitro で培養した時に得られたペプチドマーカーをそれぞれ、個々の患者の血清から同定できるシステムを確立する。血清には、細胞培養液と異なり、アルブミンを中心として多量のタンパク質やさまざまな代謝産物が存在する。そのため、これらの多量の介在物から、目的とするペプチドマーカーを同定可能な試料の前処理システムならびに解析システムを構築する。

③大腸がん臨床検体を用いた大腸がんペプチドメタボロミクス解析の総合評価

大腸がんの進行度、悪性度、抗がん剤の効果などの臨床的カテゴリーに照らし合わせ、本メタボロミクスにより確立したバイオマーカーの適応可能領域を検討し、どの程度実用的であるかの判断を行う。同時に、これまでの検討で明らかにされた血清ならびに尿中の新規バイオマーカーの臨床応用に向けての技術開発をさらに推進する。また、本研究で得られた成果を日本発の産業技術として世界へ波及するために、癌患者を対象として多くの医療機関から多数の検体を集め、これらのバイオマーカーの超早期診断への有用性、抗がん剤の感受性などにどのように役立つかも検討する。これらの研究を通じて、がんの超早期診断、病態の解明、創薬を目指し、がん診断、治療システムを構築する。

4. 研究成果

nanoHPLC-MALDI-TOF-MS 解析システム、

AXIMA-TOF2 ならびに LCMS-IT-TOF による MS/MS 解析での構造決定システムの確立した。予備実験にて、大腸がん細胞を移植したヌードマウスより、大腸がん細胞株に特異的に検出される低分子代謝産物を同定しつつある。現在、さらなる検討を進めている。

5. 主な発表論文等

1. Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Okuno T, Chayahara N, Miki I, Tamura T, Inokuma T, Takemoto Y, Nakamura T, Kataoka K, Sakaeda T. Int J Med Sci. 2009 28;6(6):305-11. (査読有)
2. Phase I and pharmacokinetic study of tegafur-uracil/leucovorin combined with 5-fluorouracil/leucovorin and irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. Chayahara N, Tamura T, Yamamori M, Kadowaki Y, Okuno T, Miki I, Tsuda M, Nishisaki H, Maeda T, Inoue Y, Okumura K, Azuma T, Kasuga M, Sakaeda T, Hirai M. Am J Clin Oncol. 2009 Feb;32(1):56-60. (査読有)
3. VEGF G-1154A is predictive of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese patients. Sakaeda T, Yamamori M, Kuwahara A, Hiroe S, Nakamura T, Okumura K, Okuno T, Miki I, Chayahara N, Okamura N, Tamura T. Ther Drug Monit. 2008;30(4):497-503. (査読有)
4. Role of metallothionein in Helicobacter pylori-positive gastric mucosa with or without early gastric cancer and the effect on its expression after eradication therapy. Mitani T, Shirasaka D, Aoyama N, Miki I, Morita Y, Ikehara N, Matsumoto Y, Okuno T, Toyoda M, Miyachi H, Yoshida S, Chayahara N, Hori J, Tamura T, Azuma T, Kasuga M. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Aug;23(8 Pt 2):e334-9. (査読有)
5. 食道がん化学放射線療法における5-フルオロウラシル血漿中濃度と治療効果との相関. 栗原晶子、山森元博、門脇祐子、八木敬子、中村任、奥野達哉、茶屋原菜穂子、三木生也、田村孝雄、平井みどり、柴田敏之. TDM研究、2008; 25(4):145-151. (査読無)
6. 栗原晶子、山森元博、榎本博雄、西口工司、八木敬子、奥野達哉、茶屋原菜穂子、三木生也、田村孝雄、平井みどり、柴田敏之、食道がん化学放射線療法における病期、奏効と予後との相関. 医療薬学 2008;34(1):, 13-19. (査読無)

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥野 達也 (OKUNO TATSUYA)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50464269