

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501296

研究課題名(和文)代謝物プロファイリングによる膵臓がん早期診断システムの開発

研究課題名(英文)Development of an early diagnostic system of human pancreatic cancer using metabolite profiling

研究代表者

波多野 直哉 (Hatano, Naoya)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんは日本人の死亡原因の第1位である。この予防には、がんの疑いのある方を早期発見し、病院で精密検査を受けることが重要である。簡便で低コストかつ高感度な早期スクリーニング法として、がん患者特有の血中代謝物のプロファイルを用いることを考えた。このため、質量分析計を用いたヒト血清メタボロミクス解析法の確立を行った。これを、膵臓がん患者と健常者の数十例の血清サンプルで実施したところ、複数の代謝物で統計的に有意な変動が見られた。さらに、この代謝物プロファイルの変化のメカニズムを明らかにするため、質量分析計を用いた代謝酵素を網羅的に比較定量するプロテオミクス法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Cancer is leading cause of death in Japan. So, it is important to find patients with suspected cancer and take them to the hospital earlier. To find the patients, a low-cost, easy-to-use, and high-sensitive cancer screening method is required. Therefore, we proposed metabolite profiling using mass spectrometry as a cancer screening method. We established a method for human serum metabolomics. The method was applied to pancreatic cancer patients and healthy controls. Several metabolites were changed statistically significantly and contributed to the grouping. In order to understand how the metabolic changes occur, we also established the comparison proteomics method, which targeted the important metabolic enzyme group.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍診断学

キーワード：メタボロミクス プロテオミクス 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位であり、その中でも膵臓がんによる年間死亡者数は約2万人で、男女ともがん種の中で第5位を占めている(平成19年度)。近年、食生活の欧米化による脂肪摂取量の増加に伴い、罹患数・死亡数とも増加傾向を示している。膵臓がんの腫瘍マーカーとして、CA19-9やCEAが用いられている。これらは早期のステージでは陽性を示さないことから、抗がん剤等での治療効果の判定には有効であるが、早期発見には有効とされていない。このように、膵臓がんは早期発見ができる簡便な検査方法はなく、進行も早い。そのため、治療成績も5年生存率が著しく不良で、他のがんとは異なり罹患数と死亡者数がほぼ等しく、非常に厄介な疾患である。国内では、CT、MRI、PETなどの画像診断技術、内視鏡検査の技術が優れており、治療可能な早期がんのうちにこれらの機器によりスクリーニングされることが望ましい。しかしながら、一般的な健康診断のように、ある年齢以上の全国民にこれらの診断を実施することは、人材面、コスト面から考慮して現実的ではない。よって、簡便に低コストでかつ効率よく、がんの疑いのある方をスクリーニングする方法が求められている。

(2) そこで、膵臓がんの初期スクリーニング法として、がん患者特有の血中代謝物(生体内低分子化合物)のプロファイルを利用する「代謝物プロファイリング」を用いることを考えた。この代謝物プロファイリングとは、代謝物の定量データのプロファイルの類似性によりサンプルをクラス分けする方法で、高級茶葉の官能試験などに応用され、専門家(鑑定士)の評価に匹敵する結果を得ている。この方法は、生体分子の高感度かつ網羅的な定量解析を得意とする質量分析計により実施され、これを医学診断に応用する。すなわち、ある特定の疾患に特徴的な血中代謝物パターンを検出し、そのプロファイルを疾患の診断に応用する。一般的に“病気”といわれる状態では、患者の病変部位に関わる生体組織に含まれる生体分子が、酵素タンパク質により代謝の変動が起こり、健常者とは異なる疾患特有のパターンを呈しており、それが血中や尿中の代謝物に反映していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 質量分析計を用いたヒト血清メタボロミクス(代謝物の網羅的解析)法を確立し、健常者をコントロールとして、膵臓がん患者特有の代謝物プロファイルを取得する。

(2) 膵臓がん患者で得られる代謝物プロファイルにより、がんの進行度を示すステージが予測できるかどうかを調べるため、各ステージ群の代謝物プロファイルと比較する。

(3) がん患者と健常者群の間で、代謝物プロファイルの違いが起こるメカニズムを調べるため、質量分析計を用いた代謝酵素を網羅的に比較定量するプロテオミクス法と、代謝酵素の活性に影響を及ぼすリン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾の決定法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 質量分析計を用いた血清メタボロミクスでは、対象とする代謝物は水溶性代謝物とし、主にアミノ酸、脂肪酸、有機酸などを調べた。質量分析計は、ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS)を用いた。四重極型のGC-MSは、ダイナミックレンジ(識別可能な信号の最小値と最大値の比率)が大きく、血中代謝物のように、含有物に量のばらつきが大きなサンプルを解析するのに最も適している。

血清中の水溶性代謝物抽出は、以下のように行った。各サンプル間の抽出効率を補正するため、50 µlの血清に等量の内部標準物質を加えた。次に、メタノール・クロロホルム・水混合液を加え、ボルテックス後の遠心によりタンパク質を除去し、上清を回収した。これに再度水を加え、水溶性抽出物を抽出した。これを真空下での遠心濃縮処理後、凍結乾燥により脱水し、誘導体化で熱安定性を高めて、GC-MSで測定した。

(2) 代謝物プロファイルの違いが起こるメカニズムを調べるため、質量分析計を用いた代謝酵素を比較する方法として、安定同位体ラベルしたアミノ酸を用いるSILAC(Stable isotope labeling with amino acids in cell culture)法を使用した。これは、比較するサンプルのうちの片方に、安定同位体ラベルしたアミノ酸を取りこませる。その後、比較するサンプル由来のタンパク質を等量混合し、質量分析計で代謝酵素に由来するペプチドのピークを比較して、タンパク質量の比較定量を行った。翻訳後修飾の違いの検出に関しては、リン酸化やアセチル化を認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行い、比較するサンプルで大きく違いのあるタンパク質を同定した。これには、プロットとしたメンブレンから直接タンパク質を溶出し、プロテアーゼ処理後、タンデムマス解析でタンパク質を同定する方法を用いた。これらの解析に用いた質量分析計は、イオントラップ(IT)型-飛行時間型(TOF)のハイブリッド型を用いた。

4. 研究成果

(1) 上記の方法で得られたデータを解析ソフト(GCMS Solution)と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。このデータベースは、ヒトの尿に含まれる代謝物から構築したもので、アミノ酸・脂肪酸・有機酸を含む178種の水溶性代謝物が含まれている。このうち、EIスペクトルピークの m/z の一致度を示すシミュラリティスコアが80以

上を示す(信頼性が高い)60種類の代謝物に関して、膵臓がん患者(ステージ III 以降)と健常者の血清を比較した。サンプルは、比較対象の健常者の平均年齢を患者のものと合わせ、全て早朝空腹時に採血した血清サンプルを用いた。この結果、複数の代謝物に関して、膵臓がん患者と健常者の間で統計的に有意差が認められた。具体的には、がん患者の血清中で増加したもので、チオグリコール酸、3-ヒドロキシ酪酸、L-グルタミン酸、N-アセチルチロシン、アコニット酸、乳酸が含まれ、がん患者で減少したものに、グリセリン酸、尿酸が含まれることが判明した(表 1)。

表 1 膵臓がん患者と健常者で、血清中で量に大きな差が見られた代謝物群

代謝物名	相対比*	RT**
がん患者で増加した代謝物		
チオグリコール酸	6.3	24.6
3-ヒドロキシ酪酸	2.5	12.1
L-グルタミン酸	2.2	27.4
N-アセチルチロシン	1.6	40.2
アコニット酸	1.5	31.0
乳酸	1.5	8.8
がん患者で減少した代謝物		
グリセリン酸	0.5	18.3
尿酸	0.6	40.4

* 健常者平均を 1 とする。

** Retention Time (カラム保持時間(分))

膵臓がんの初期ステージ I の患者血清で同様の解析を実施したところ、これらの代謝物と同様の変動を示すことが示された、この結果は、GC-MS を用いた血清メタボローム解析が、膵臓がんの早期診断へと応用・発展する可能性を示した。

(2) 次に、この代謝物プロファイリングにより、がんの進行度を予測できるかどうかを調べるため、がんの進行度を示すステージ別にグループ分けして代謝物量の比較を行った。

その結果、膵臓がん患者の各ステージ群(III, IVa, IVb; この順で進行が進む)と健常者群で、統計的に有意な差が見られる代謝物がいくつか検出された。このうち、顕著な差が見られた 3 つの代謝物の定量データを示す(図 1)。

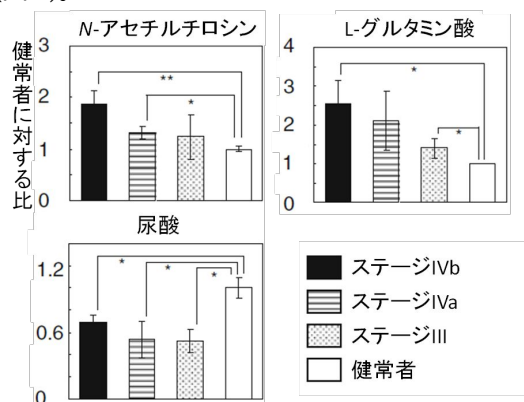


図 1. がんのステージ別で差のある代謝物
*および**は、t 検定で、P 値が 0.05 未満、0.01 未満を意味する。

N-アセチルチロシンと L-グルタミン酸は、がんのステージが進行するとともに増加することが示された。また、尿酸は膵臓がん患者ではどのステージでも半減していた。これらの結果により、膵臓がん患者の血清メタボロミクスにより、がんの進行度が予測できる可能性が示唆された。

がん患者と健常者で大きな変動が見られた代謝物を用い、多重ロジスティック回帰分析による診断予測モデルを作成したが、実用レベルの感度・特異度を出すことはできなかった。これを克服するためには、数百症例のサンプルを用いて、検証することが必要と考えられる。

(3) この血清メタボロミクス法を用いて、様々ながん患者のサンプルで、代謝物プロファイルに違いが生じることが判明した。しかし、そのメカニズムについては不明である。この違いの原因を明らかにするため、代謝に関わる酵素群についても網羅的に比較定量するプロテオミクスの系を確立した。モデルとしてヒト乳がんの培養細胞を用いて、前処理に等電点電気泳動装置を使用することにより、安定的に 100 種類以上の代謝酵素のタンパク質量の測定が可能となった。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ぼ含まれていた。この解析法を用いて、細胞増殖時と抗がん活性を有する PI3K 阻害剤を用いた細胞増殖抑制時に、相反する挙動を示す酵素(脂肪酸合成酵素(FASN)、乳酸脱水素酵素(LDHA)、ATP-クエン酸リアゼ(ACLY))が判明した。将来的にはがん生検したサンプルを用いることを想定おり、抗がん剤の効果や患者に対する治療効果の判定に役立つと考えている。

(4) 代謝に関わる酵素群を網羅的に比較定量するプロテオミクスの系と共に、酵素の活性化に関わるリン酸化・アセチル化などのタンパク質の翻訳後修飾を比較・決定する系を確立した。実際にこの解析法をヒト乳がん由来の細胞に、抗がん活性を有する 2 種類の薬剤を投与したサンプルに用いたところ、翻訳後修飾に違いが生じるタンパク質(翻訳伸長因子 II(EF2)、熱ショックタンパク質(60kDa Heat shock protein))が判明した。EF2 に関しては、さらにこのタンパク質の翻訳後修飾部位に特異的な抗体で確認を行った。この結果、様々な組織由来のがん細胞を用いることで、がん種ごとの代謝物プロファイルの違いの原因を明らかにできる可能性が示唆された。

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10件)

Sekiguchi M, Katayama S, Hatano N, Shigeri Y, Sueyoshi N, Kameshita I. Identification of amphiphysin 1 as an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorder. *Arch. Biochem. Biophys.* 535(2), 257-267, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.abb.2013.04.012.

Katayama S, Sugiyama Y, Hatano N, Terachi T, Sueyoshi N, Kameshita I. PKL01, an Ndr kinase homologue in plant, shows tyrosine kinase activity. *J. Biochem.* 152(4), 347-353, 2012. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvs075.

Song T, Hatano N, Sugimoto K, Horii M, Yamaguchi E, Tokuda M, Miyamoto Y, Kambe T, Watanabe Y. Nitric oxide prevents phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at serine 1412 by inhibiting the Akt/PKB and CaM-KII signaling pathways. *Int. J. Mol. Med.* 30(1), 15-20, 2012. 査読有
DOI: 10.3892/ijmm.2012.971.

Nagara Y, Hagiya M, Hatano N, Futai E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ito A, Ishiura S. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by γ -secretase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417(1), 462-467, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.140.

Yoshida M, Hatano N, Nishiumi S, Irino Y, Izumi Y, Takenawa T, Azuma T. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Gastroenterol.* 47(1), 9-20, 2012. 査読有
DOI: 10.1007/s00535-011-0493-8.

Ikeda A, Nishiumi S, Shinohara M, Yoshie T, Hatano N, Okuno T, Bamba T, Fukusaki E, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomed. Chromatogr.* 26(5), 548-558, 2012. 査読有
DOI: 10.1002/bmc.1671.

Kondo Y, Nishiumi S, Shinohara M, Hatano N, Ikeda A, Yoshie T, Kobayashi T, Shiomi Y, Irino Y, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomark. Med.* 5(4), 451-460, 2011. 査読有
DOI: 10.2217/bmm.11.41.

Tokumitsu H, Hatano N, Fujimoto T, Yurimoto S, Kobayashi R. Generation of autonomous activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β by autophosphorylation. *Biochemistry.* 50(38), 8193-8201, 2011. 査読有
DOI: 10.1021/bi201005g.

Fujimoto T, Hatano N, Nozaki N, Yurimoto S, Kobayashi R, Tokumitsu H. Identification of a novel CaMKK substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410(1), 45-51, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.102.

Ooi M, Nishiumi S, Yoshie T, Shiomi Y, Kohashi M, Fukunaga K, Nakamura S, Matsumoto T, Hatano N, Shinohara M, Irino Y, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflamm. Res.* 60(9), 831-840, 2011. 査読有
DOI: 10.1007/s00011-011-0340-7.

[学会発表](計4件)

波多野 直哉、入野 康宏、竹縄 忠臣「乳がん細胞でのPI3Kインヒビターによる代謝変化」第86回日本生化学大会、2013年9月12日、横浜・パシフィコ横浜

波多野 直哉、Metabolome and proteome analysis of cancer. 2013年3月29日、SYMPOSIUM: A career in calcium signaling.(招待講演)、高松・香川大学医学部

入野 康宏、平田 悠、竹内 由紀子、波多野 直哉、竹縄 忠臣 Characterization of breast cancer cells with metabolic profiling. 85回日本生化学大会、2012年12月15日、福岡・マリンメッセ福岡

波多野 直哉、入野 康宏、竹縄 忠臣 The establishment of metabolic proteome analysis by stable isotope. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡・マリンメッセ福岡

[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