

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713020

研究課題名(和文) MALDI-MSを基盤とした疾病マーカー探索・同定プラットフォーム

研究課題名(英文) Development of MALDI-MS-based analytical technique for biomarker discovery and diagnosis

研究代表者

三浦 大典 (Miura, Daisuke)

九州大学・農学研究院・特任准教授

研究者番号：40532627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が独自に開発してきたマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法を基盤とした超高感度生体内化合物分析技術を先鋭化し、創薬・医療におけるイノベーション創出に資する革新的代謝解析トリニティ(三位一体)プラットフォームの創生を目的とする。「新規疾患関連因子の発見につながる超高感度検出技術、スループットを飛躍的に高める技術、多種因子同時分析技術および見出された因子の同定技術」を三位一体で実現する技術開発を行い、早期診断や予後診断・適切な治療戦略判断を可能とする疾病マーカー探索・同定プラットフォームの構築および創薬プロセスの加速化を実現する基盤技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：A platform for biomarker discovery and diagnosis with multiple mass spectrometry (MS)-driven metabolite analytical platform were developed. This platform includes, 1. high-throughput metabolite analysis system, 2. spatiotemporally-resolved metabolite analysis system, and 3. standard-independent identification method of elemental composition for metabolite annotation. By accelerating interdisciplinary technical fusion in diverse biomedical redox-related research fields, substantial development of drug discovery tool, diagnostic methodology and instrument is in progress, and thus which lead to the establishment of new discipline of pathological metabolomics.

研究分野：質量分析、メタボロミクス

キーワード：質量分析 イメージング メタボロミクス

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本が直面する経済環境や少子高齢化率を鑑みてこれらの状況(QOL)を変革する科学技術イノベーションの創出が強く求められている。特に、創薬における成功率の向上・迅速化・低コスト化による国際競争力の向上、病態マーカー探索・分析に対するスループットの向上、医療現場での適切かつ迅速な治療戦略判断を可能とする簡便・高感度な分析技術は、医療イノベーションにおけるキーテクノロジーになるであろう。

メタボロミクスはゲノムの物質的最終表現型である代謝物を対象とするため、疾病マーカー探索や創薬ターゲットの同定、疾病メカニズム解明における重要性が強く指摘されている。近年メタボローム解析は技術としても成熟期に入りつつあるが、分析基盤としてはGC-MSやLC-MS、CE-MS等を用いた一斉分析である。これらの手法は高い定量性・再現性を持つ一方で、下記のような欠点も存在する。

サンプル調製が煩雑かつ分析のスループットが低いため、多検体の一斉解析が困難

抽出により各分子の局在情報が失われてしまうため、組織・個体全体に対して適応は不可

標品の無い化合物は未知ピークとして放置されているのが現状

従って創薬・医療現場への応用を指向するメタボロミクスは新たなパラダイムシフトを必要とする段階に来ている。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに開発してきたマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法を基盤とした超高感度生体内化合物分析技術を先鋭化することで、創薬・医療におけるイノベーション創出に資する革新的代謝プロファイリングプラットフォームの基盤形成を目的とする。具体的には、「体液サンプルを用いた超ハイスループット代謝プロファイリング技術」、「空間情報を保持した疾病マーカー探索技術」、「標品非依存的代謝物同定技術」に関する技術開発を進め、早期診断や予後診断および適切な治療戦略の判断を可能とする疾病マーカー探索・同定プラットフォームの構築および創薬プロセスの加速化を実現する基盤技術の創生を目指す。

### 3. 研究の方法

本申請では、疾患を反映する生体内化合物に

対する超高速分析・空間分布情報の付与・標品非依存的同定を三位一体で実現できる革新的プラットフォームを構築し、創薬・診断プロセスの加速化に寄与する基盤技術の創生を目指す。要素技術として下記3点を挙げた。

「体液サンプルを用いた超ハイスループット代謝プロファイリング技術」

「空間分布情報を保持した疾病マーカー探索技術」

「標品非依存的代謝物同定技術」

### 4. 研究成果

「体液サンプルを用いた超ハイスループット代謝プロファイリング技術」

これまでに、申請者らは数十～数百細胞を用いて高い再現性(RSD10%以内)・定量性( $R^2 > 0.99$ )で運用可能な超高速代謝プロファイリング技術(サンプル調製1分、1検体の分析時間15秒、1536 wellプレートを一斉分析可能)の開発に成功した(Anal. Chem. 2010a)。本技術を用いる事で、抗がん剤の種類によって代謝応答が異なる事を短時間で見分けることが出来ること、細胞内で起こる代謝変動を秒スケールの時間分解能で追跡し得ること、また外的摂動が異なる際にはその代謝ネットワークに共通性(普遍性)と特異性を持つことを明らかとすることに成功した(Mol. Biosyst. 2015)。さらに、分析・データ解析法より精度良く簡便に行える分析プラットフォームの構築を完了した(Sci. Rep. 2017)。

「空間分布情報を保持した疾病マーカー探索技術」

MALDI-MSは固体表面にレーザーを照射することで試料表面の分子をイオン化し質量分析を行う技術である。この特性を生かした質量分析イメージングに関する技術開発が世界中で盛んに行われている。しかしながら、既存の研究例では汎用マトリックスを用いて「見えるもの」だけを分析した結果がほとんどであり、骨格タンパク質や脂質など組織中に豊富に存在する分子の定性的分布観察に留まっていた。疾病を反映するマーカー探索には中心代謝系分子をターゲットとした空間情報を有する代謝情報が不可欠であると考えた。そこで、上記1.にて開発した技術およびノウハウを質量分析イメージングに適用することで、世界に先駆けてメタボロームに時空間分解情報を付与し、疾病動物モデルを用いて組織内微小領域における代謝動態を明らかとする事に成功した(Sci. Rep. 2016, Anal. Bioanal. Chem. 2017, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018)。さらに、九州

大学病院および医学部第一外科と共同で 100 以上のヒト臨床サンプルを用いた疾病マーカー探索を進めており、新規腫瘍マーカー候補の同定に成功した（論文投稿中）。

「標品非依存的代謝物同定技術」

質量分析ではスペクトル上で検出したピークから化合物の同定が必須となるが、MALDI-MS にて得られるデータは一次元（ $m/z$  情報のみ）であり、化合物の同定は困難を極めた。そこで我々は、超高分解能質量分析により  $^{13}\text{C} \cdot ^{15}\text{N} \cdot ^{18}\text{O} \cdot ^{34}\text{S}$  由来の同位体ピークを定量的に測定することで、スペクトル情報から一義的に化合物の組成式を決定できる測定法の開発に成功した（*Anal. Chim. Acta* (2014)）。

## 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 18 件) 全て査読有り

1. Irie, M., Hayakawa, E., Fujimura, Y., Honda, Y., Setoyama, D., Wariishi, H., Hyodo, F. and Miura, D.\* Analysis of spatiotemporal metabolomic dynamics for sensitively monitoring biological alterations in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) 496, 140-146.
2. Fujimura, Y., Kawano, C., Maeda-Murayama, A., Nakamura, A., Koike-Miki, A., Yukihira, D., Hayakawa, E., Ishii, T., Tachibana, H., Wariishi, H. and Miura, D.\* A Chemometrics-driven Strategy for the Bioactivity Evaluation of Complex Multicomponent Systems and the Effective Selection of Bioactivity-predictive Chemical Combinations. *Sci. Rep.* (2017) 7, 2257.
3. Sato, E., Saigusa, D., Mishima, E., Uchida, T., Miura, D., Morikawa-Ichinose, T., Kisu, K., Sekimoto, A., Saito, R., Oe, Y., Matsumoto, Y., Tomioka, Y., Mori, T., Takahashi, N., Sato, H., Abe, T., Niwa, T. and Ito, S. Accumulation of uremic toxins in systemic organs and its attenuation by the oral adsorbent AST-120: LC-MS/MS and MS imaging techniques. *Toxins* (2018) 10, 19.
4. Li, B., Baba, T., Miyabayashi, K., Sato, T., Shima, Y., Ichinose, T., Miura, D., Ohkawa, Y., Suyama, M. and Morohashi, K. Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells. *Endocrine J.* (2017) 64, 315-324.
5. Okumura, T., Ohuchida, K., Sada, M., Abe, T., Endo, S., Koikawa, K., Iwamoto, C., Miura, D., Mizuuchi, Y., Moriyama, M., Nakata, K., Miyasaka, Y., Manabe, T., Ohtsuka, T., Nagai, E., Mizumoto, K., Oda, Y., Hashizume, M. and Nakamura, M. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment and released fatty acids enhance invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* (2017) 8, 18280-18295.
6. Nakamura, J., Morikawa-Ichinose, T., Fujimura, Y., Hayakawa, E., Takahashi, K., Ishii, T., Miura, D.\* and Wariishi, H. Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). *Anal. Bioanal. Chem.* (2017) 409, 1697-1706.
7. Sato, M., Mori, T., Mishima, E., Suzuki, A., Sugawara, S., Kurasawa, N., Saigusa, D., Miura, D., Morikawa-Ichinose, T., Saito, R., Oba-Yabana, I., Oe, Y., Kisu, K., Naganuma, E., Koizumi, K., Mokudai, T., Niwano, Y., Kudo, T., Suzuki, C., Takahashi, N., Sato, H., Abe, T., Niwa, T. and Ito, S. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci. Rep.* (2016) 6, 36618.
8. Setoyama, D., Kato, T., Hashimoto, R., Kunugi, H., Hattori, K., Hayakawa, K., Sato-Kasai, M., Shimokawa, N., Yoshida, S., Goto, Y., Yasuda, Y., Yamamori, H., Ohgidani, M., Sagata, N., Miura, D., Kang, D. and Kanba, S. Plasma metabolites predict severity of depression and suicidal ideation in psychiatric patients-A multicenter pilot analysis. *PLoS One*, (2016) 11, e0165267.
9. Hayakawa, E., Fujimura, Y. and Miura, D.\* MSIdV: a versatile tool to visualize biological indices from mass spectrometry imaging data. *Bioinformatics* (2016) 32, 3852-3854.
10. Kiyonari, S., Iimori, M., Matsuoka, K.,

- Watanabe, S., Morikawa-Ichinose, T., Miura, D., Niimi, S., Saeki, H., Tokunaga, E., Oki, E., Morita, M., Kadomatsu, K., Maehara, Y., and Kitao, H. The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis. *Mol. Cancer Ther.* (2015) **14**, 2332-2342
11. Tsukamoto, S., Huang, Y., Kumazoe, M., Lesnick, C., Yamada, S., Ueda, N., Suzuki, T., Yamashita, S., Kim, Y. H., Fujimura, Y., Miura, D., Kay, N. E., Shanafelt, T. D., and Tachibana, H. Sphingosine kinase-1 protects multiple myeloma from apoptosis driven by cancer specific inhibition of RTKs. *Mol. Cancer Ther.* (2015) **14**, 2303-2312
  12. Yukihira, D., Fujimura, Y., Wariishi, H. and Miura, D.\* Bacterial Metabolism in Immediate Response to Nutritional Perturbation with Temporal and Network View of Metabolites. *Mol. Biosyst.* (2015) **11**, 2473-2482
  13. Kumazoe, M., Fujimura, Y., Hidaka, S., Kim, Y.H., Murayama, K., Takai, M., Huang, Y., Yamashita, S., Murata, M., Miura, D., Wariishi, H., Maeda-Yamamoto, M. and Tachibana, H. Metabolic profiling-based data-mining for an effective chemical combination to induce apoptosis of cancer cells. *Sci. Rep.* (2015) **5**, 9474.
  14. Iwasa, K., Setoyama, D., Shimizu, H., Seta, H., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., Nagai, C., and Nakahara, K. Identification of 3-Methylbutanoyl Glycosides in Green *Coffea arabica* Beans as Causative Determinants for the Quality of Coffee Flavors. *J. Agric. Food Chem.* (2015) **63**, 3742–3751.
  15. Inoue, T., Kobayashi, K., Inoguchi, T., Sonoda, Hendarto, H., Makimura, H., Sasaki, S., Yokomizo, H., Fujimura, Y., Miura, D., and Takayanagi, R. GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats Atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2015) **240**, 250–259.
  16. Kim, Y. H., Fujimura, Y., Sasaki, M., Xue Y., Yukihira, D., Miura, D., Unno Y., Ogata K., Nakajima H., Yamashita S., Nakahara K., Murata M., Lin I. C., Wariishi, H., Yamada, K. and Tachibana, H. *In Situ* Label-Free Visualization of Orally Dosed Strictinin within Mouse Kidney by MALDI-MS Imaging. *J. Agric. Food Chem.* (2014) **62**, 9279–9285.
  17. Ohgidani, M., Kato, T.A., Setoyama, D., Sagata, N., Hashimoto, R., Shigenobu, K., Yoshida, T., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Miura, D., Utsumi, H., and Kanba, S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Sci. Rep.* (2014) **4**, 4957.
  18. Nagao, T., Yukihira, D., Fujimura, Y., Saito, K., Takahashi, K., Miura, D.\*, Wariishi, H. Power of Isotopic Fine Structure for Unambiguous Determination of Metabolite Elemental Compositions: in silico Evaluation and Metabolomic Application. *Anal. Chim. Acta* (2014) **813**, 70–76
- 〔学会発表〕(計 4 件)
1. Structure-Property Relationship and Strategic Synthesis of MALDI Matrix for Low-Molecular-Weight Metabolites Analysis, 三浦大典、石井孝典、行平大地、早川英介、藤村由紀、割石博之、新藤充, The 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio (USA), (2016.6)
  2. Functional Metabolic Multimodality Imaging by Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging and Mass Spectrometry Imaging”, 三浦大典、兵藤文紀、藤村由紀, The 63th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, St.Louis (USA), (2015.6)
  3. Power of Isotopic Fine Structure for Unambiguous Determination of Metabolite Elemental Compositions: in silico Evaluation and Metabolomic Application”, 三浦大典、永尾達彦、行平大地、藤村由紀、齋藤和徳、高橋勝利、割石博之, The 62th ASMS Conference, Baltimore (USA), (2014.6)
  4. Unambiguous Determination of Metabolite Elemental Compositions Using Isotopic Fine Structure: in silico Evaluation and Metabolomic Application”, 三浦大典、永尾達彦、行平大地、藤村由紀、齋藤和徳、高橋勝利、割石博之, Metabolomics2014, Tsuruoka (Japan), (2014.10)
- 〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)  
九州大学農学研究院・特任准教授  
研究者番号：40532627

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )