

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22134007

研究課題名（和文）メタボローム解析に基づくがんの代謝の理解、診断法の開発

研究課題名（英文）Understanding cancer cell metabolism and biomarker discovery using metabolome analysis

研究代表者

曾我 朋義（SOGA, Tomoyoshi）

慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号：60338217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 117,400,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞が代謝をシフトしてATPや生体高分子の前駆体を生成するが、その理由や機序は謎であった。我々は、シーレスCE-MS法という高感度なメタボローム（全代謝産物）一斉分析法を開発し、トランスクリプトーム、プロテオームなどのシステム生物学的手法とともに、（遺伝性平滑筋腫症-腎細胞がん症候群）の原因であるフマル酸ヒドラターゼ遺伝子（FH）の変異を模倣した細胞株やノックアウトマウスを解析した。その結果、FH遺伝子の変異で蓄積したフマル酸が転写因子を安定化したり、代謝酵素に結合したり、代謝物に結合して代謝を制御していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Although cancer cells produce ATP and the precursors of macromolecules by switching metabolism, underlying mechanisms have been poorly understood. Here, we have developed a highly sensitive metabolome analysis method based on sheathless CE-MS device. This approach and together with systems biological technologies such as transcriptomics and proteomics were applied to fumarate hydratase (FH) knock out mouse and FH deficient cell lines, which mimic Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma that develops benign cutaneous and uterine leiomyomas, renal cysts and kidney cancer. Consequently, we found that accumulated fumarate caused by FH deletion regulated metabolism by activation transcription factor, inactivation of metabolic enzymes and conjugation to metabolites.

研究分野：分析化学、メタボロミクス、がんの代謝研究

キーワード：癌 生体分子 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は酸素が存在するにも関わらず、解糖系を亢進して ATP を合成していることが明らかになってきた。しかし、何故がん細胞がエネルギー効率の悪い解糖系を使うか、また、グルコースや酸素の供給源である血管のないところで増殖するがん細胞はどのようにエネルギーを生産するかなど、がん細胞の代謝や生存戦略には謎が多かった。

2. 研究の目的

本研究は、メタボローム（代謝物の総称）解析、トランスクリプトーム、プロテオームなどのシステム生物学的解析によって、がん細胞のエネルギー生産経路を特定し、抗がん剤の新規ターゲットを探索しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、CE-MS によるメタボローム測定のさらなる高感度化や各成分を同定、定量する自動解析ソフトを開発する。開発されたメタボローム解析技術を用いて、がん患者から採取されたがん組織と正常組織のメタボローム測定を行い、大規模なメタボロームデータを取得する。次に、動的パスウェイのモデリング・シミュレーションソフトウェアを用いてパスウェイモデル上に統合・可視化し、がんの代謝やその調節因子に関わる複雑なネットワークを解明する。また生体分子ネットワーク推定技術を用い、計測されたデータをスーパーコンピュータにより解析することで、がん細胞に特異的なエネルギー生産経路やがんの生存戦略に関わる生体分子ネットワークを描出する。さらに遺伝子発現、エピジェネティック解析などを併せた統合的ゲノム・エピゲノム解析によって、がんの個別化診断バイオマーカーや治療標的分子シーズとして有用な遺伝子・パスウェイを同定し、抗がん剤の新規ターゲットを発見する。本手法で発見された標的ターゲットを低分子などで阻害する実験を行い、がん細胞の増殖を抑える効果を検証し、システム生物学的解析法によるがんの治療標的基盤を確立する。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析技術の高感度化

研究代表者の曾我らは、細胞内に存在する代謝物のほとんどがイオン性物質であることに着目し、イオン性化合物に対して、高分離能を有するキャピラリー電気泳動(CE)と高い選択性と感度を有する質量分析計(MS)を組み合わせた CE-MS 法を世界に先駆けて開発し、一度に数千種類の代謝物の一斉分析を可能にした。しかし、CE-MS 法では、電気泳動用の泳動バッファの電気分解によってキャピラリーの出口側に水素や酸素の気泡が発生し、これによってバックグラウンドノイズが大きくなる問題がある。この問題を解

決するため CE-MS 法では、スプレイヤーにシース液を加えて発生した気泡を吸収することによって、安定したイオン化を実現している。しかし、シース液によって試料が 200 倍希釈されるため(図 1)、感度が約 200 倍低下するという問題があった。

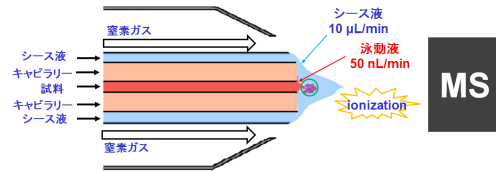


図1 シース液 CE-MS 法のスプレイヤー(キャピラリー出口)の構造

本研究では、高感度化を達成するため、シース液を使わないシースレス CE-MS 法の開発を行った。CE-MS 法で問題となる電気分解による気泡発生の影響をなくすためデザインを検討した結果、白金電極の入ったリザーバをキャピラリーの出口から 1cm 以上離れたところに置いたシースレス CE-MS デバイスを考案した(図 2)。この方法では、電気分解による気泡の発生はリザーバで起こるため(図 3)、試料成分のイオン化に全く影響せず、安定した測定が可能になった(特許出願中)。

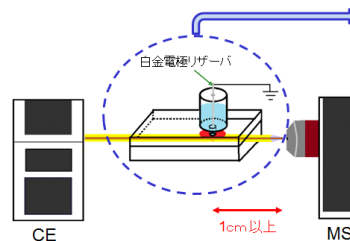


図2 試作したシースレス CE-MS システム

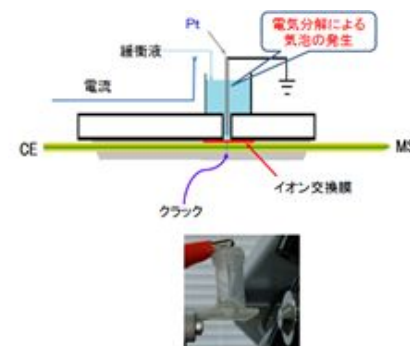


図3 シースレス CE-MS デバイスの構造

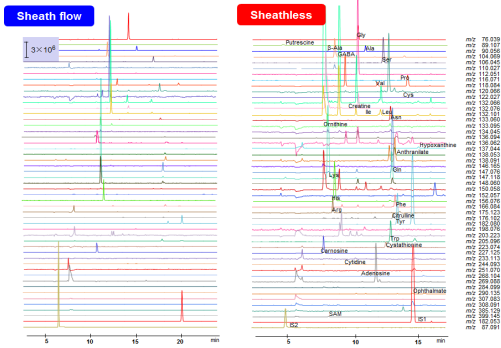


図4 シース液とシースレス CE-TOFMS 法によるヒト尿の測定に比較

図4左にシース液法、図4右にシースレス CE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計)法で測定したヒトの尿(10倍希釈液)中の陽イオン性代謝産物の測定結果を示した。従来のシース液 CE-TOFMS 法に比べ、シースレス CE-TOFMS 法は、多くの代謝物の検出が可能になった。

シースレス CE-TOFMS 法では 53 成分の平均で感度が 3.8 倍向上した(図 5)

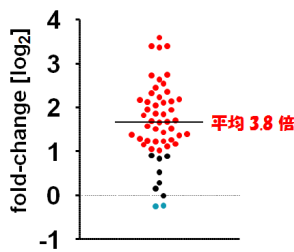


図5 シースレス CE-TOFMS での感度

また特定の測定対象については三連四重極質量分析計(QqQMS)のMRMモードを用いると感度が向上することが知られている。そこでシースレス CE に QqQMS を接続し MRM モードで測定したところ、従来のシース液 CE-TOFMS 法に比べ、平均で感度が 49 倍向上し、研究開始時に目標としていた 105 個オーダーの細胞数を上回る 104 個レベルの細胞数で可能になった。陰イオン性代謝物用の CE-MS デバイスに関しては現在開発中である。

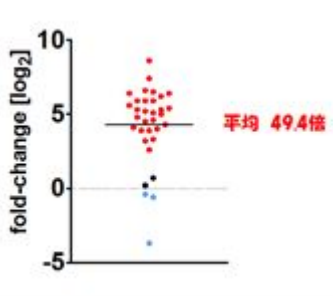


図6 シースレス CE-QqQMS での感度

(2) フマル酸によるがんの代謝制御機構の解明

ミトコンドリアのフマル酸をリンゴ酸に変換する酵素フマル酸ヒドラターゼをコードする FH 遺伝子に変異を持つ患者(遺伝性平滑筋腫症-腎細胞がん症候群;HLRCC)は、対立遺伝子にも変異が入ると腎嚢胞の形成や多彩な腎腫瘍を発症することが知られているが、がん化の機序は不明であった。研究代表者らは Oxford 大との共同研究でフマル酸ヒドラターゼ(Fh1)ノックアウトマウス、Fh1 を欠失したマウス胎児繊維芽細胞

(MEF)などを作製し、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの網羅的な生体分子の測定技術や分子生物学的実験手法を駆使して FH の変異と発がんの機序の解明を試みた。Fh1 ノックアウトマウスでは 13 週で腎嚢胞が現れ、その後嚢胞が拡大することが観察された。Fh1 欠失 MEF、Fh1 ノックアウトマウスではフマル酸の著しい蓄積が観察された。次に、Fh1 ノックアウトマウスの腎臓組織を DNA マイクロアレイ解析によって測定したところ、Nrf2 のターゲットである酸化ストレス防御遺伝子群が軒並み高発現した(図7ヒートマップ右)。これらは、フマル酸の蓄積による結果と考えられた。しかし、フマル酸は、低酸素誘導因子である HIF1 を水酸化する酵素(PHD)を抑制し、HIF1 が安定化することが知られており、それによって酸化ストレス防御遺伝子群を転写する可能性も考えられた。そこで、Fh1 および HIF1- α のダブルノックアウトマウスを作成したところ、このマウスでも酸化ストレス防御遺伝子群の発現が観察されたことから(図7ヒートマップ中央)、HIF1- α 非依存的に起きる現象であることが確認された。

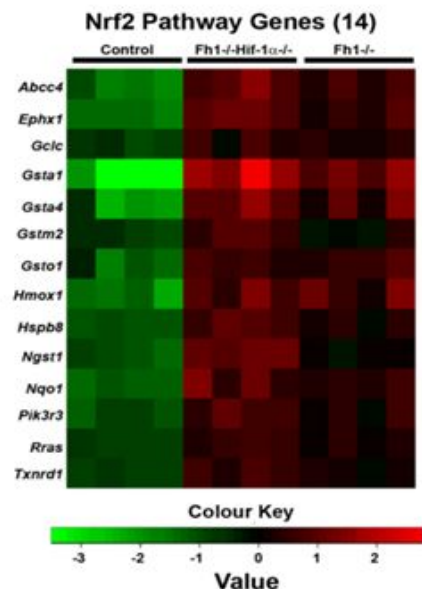


図7 Fh1KO マウス腎臓での Nrf2 の標的遺伝子の発現

次にフマル酸の蓄積と Nrf2 の発現の関係を調べるため、Fh1 欠失 MEF 細胞を用いて、フマル酸および Nrf2 とその関連のタンパク質の発現量を測定した (図 8)。MEF 野生株 (Fh1^{+/+}) に比べて Fh1 欠失 MEF 細胞 (Fh1^{-/-}) ではフマル酸の蓄積とともに核内および細胞質で Nrf2 が高発現していることが確認された。また Nrf2 のターゲットである Nqo1 の発現が高いことも観察された。一方、Fh1 欠失 MEF 細胞にヒトの FH 遺伝子を導入した株 (Fh1^{-/-}+FH) では、フマル酸が減少するとともに核内および細胞質での Nrf2 や Nqo1 の発現量も減少し、MEF 野生株 (Fh1^{+/+}) と同等であった (図 8)。

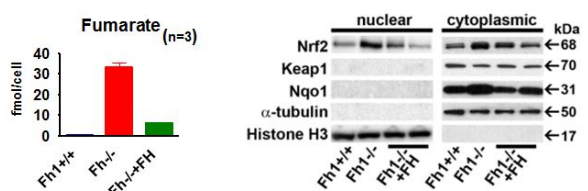


図 8 Fh 欠失 MEF でのフマル酸量と Nrf2 関連タンパク質の発現量

続いて Fh1 欠失 MEF 細胞 (Fh1^{-/-}) を用いて siRNA による Nrf1 および Nrf2 のノックダウン実験を行った。Nrf2 をノックダウンすると酸化ストレス防御遺伝子群の発現が著しく低下し、これらの遺伝子の発現は Nrf2 に制御されていることが判明した。

次に Fh1 の欠失株で Nrf2 の発現量が増大する原因について検討した。Fh1 の欠失株で蓄積するフマル酸は多くのタンパク質のシステイン残基に非酵素反応で付加する (フマル酸の二重結合が開いてコハク酸の構造となつて結合するため、コハク酸修飾と呼ばれる) ことが報告されている。そこで、LC-MS/MS を用いて Fh1 欠失 MEF 細胞 (Fh1^{-/-}) 中の Keap1 のアミノ酸配列解析を行った。その結果、Keap1 の 6 箇所のシステイン残基がフマル酸によってコハク酸修飾されており、その内の 3 箇所のシステイン残基は Nrf2 と相互作用する部分に存在した。

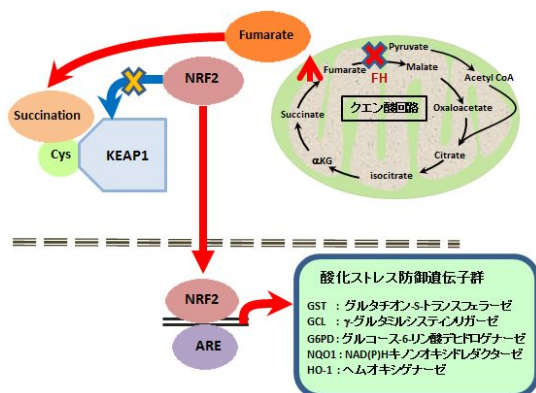


図 9 FH 欠失によるフマル酸の蓄積と NRF2 のターゲット遺伝子群の発現の機序

これらの結果をまとめると、図 9 に示したように FH の欠失でミトコンドリアに蓄積したフマル酸が細胞質に輸送され、Keap1 のシステイン残基を修飾することで Keap1 の立体構造が変化し、Keap1 に結合できなくなった Nrf2 が核に移行し、標的である酸化ストレス防御遺伝子群を転写、翻訳することが示唆された (Adam J. et al. Cancer Cell, 2011)。

FH の変異で細胞質に蓄積したフマル酸は Keap1 タンパク質のシステイン残基にコハク酸修飾した。このことは、フマル酸が他のタンパク質のシステイン残基も修飾するのではという新たな疑問を投げかけた。そこで確認を行うため、Fh1 欠失 MEF 細胞のミトコンドリア、核、細胞質画分および Fh1 ノックアウトマウスの腎臓から全部で 8,000 種類のタンパク質を抽出した。続いてタンパク質のアミノ酸の配列解析を LC-MS/MS を用いて行い、フマル酸が付加して 116.011Da 質量が高くなっているシステイン残基を探索した。その結果、94 種類のタンパク質のシステイン残基がフマル酸によってコハク酸修飾を受けていることが判明した。代謝酵素としては、クエン酸回路のアコニターゼ 2 の 3 箇所のシステイン残基がコハク酸修飾を受けていた。このフマル酸修飾によってアコニターゼ 2 の活性が低下し、クエン酸回路が抑制されていることも明らかになった。また、乳酸脱水素酵素 A (LDHA)、グルタチオンシステインリガーゼ (GCLC) などの代謝酵素もフマル酸によるコハク酸修飾を受けていることが判明した (Ternette N. et al. Cell Rep, 2013)。

さらに、コントロールマウスおよび Fh1 ノックアウトマウスの腎臓から抽出された代謝産物をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いて網羅的に測定した。予想通り、コントロールマウスに比べ、Fh1 ノックアウトマウスの腎臓ではフマル酸の著しい蓄積が観察された。また、クエン酸回路の代謝産物は、Fh1 ノックアウトマウスの腎臓で顕著に増加した。他の経路の代謝産物では、アデニロコハク酸とアルギノコハク酸がフマル酸同様に Fh1 ノックアウトマウスで大幅に増加した。興味深いことにこの二つの代謝産物は、化合物名にコハク酸という名前が付いていた。代謝経路を確認したところ、アデニロコハク酸もアルギノコハク酸もフマル酸の隣に位置しており、フマル酸から直接生合成される経路が考えられた (図 10)。そこで、アデニロコハク酸とアルギノコハク酸がフマル酸から直接生合成されるか、あるいは通常の経路でアスパラギン酸から生合成されるか確認できる方法を検討した。その結果、グルタミンの 2,3,3,4,4 の水素が重水素に置換された同位体 (Gln-2,3,3,4,4-d5) を培地に加えて追跡実験を行うことで、アデニロコハク酸とアルギノ

コハク酸の生合成経路を確認することができた。実験結果を図 10 に示したが、フマル酸の C12、重水素 1 個、重水素 2 個の同位体パターンとアデニロコハク酸とアルギノコハク酸の同位体パターンは一致した。しかし、通常の経路のアスパラギン酸の同位体パターン (C12 以外ほとんど検出されず) とは異なった。これらの結果は、Fh1 欠失 MEF 細胞では、アデニロコハク酸とアルギノコハク酸はフマル酸から直性生合成されることを示した。またそれによって、尿素回路が抑制されることも判明した (Adam J. et al. Cell Rep, 2013)。

以上の実験結果をまとめると、HLRCC の原因である FH 遺伝子の欠失によって蓄積したフマル酸が Keap1 のシステイン残基に付加することによって、Nrf2 の結を阻害して Nrf2 を安定化し、その標的である酸化ストレス防御遺伝子群を転写させることを見出した (図 9)。さらにフマル酸が代謝酵素であるアコニターゼ 2 に結合して TCA 回路を制御したり、AMP やアルギニンにも結合して尿素回路を抑制したりしていることも明らかになった。

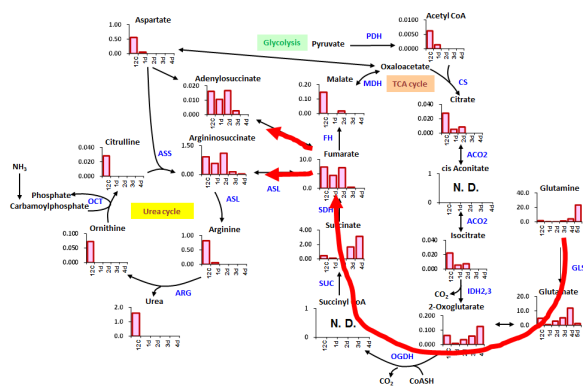


図 10 グルタミン酸同位体によるアデニロコハク酸とアルギノコハク酸代謝経路の同定

本研究結果は、代謝産物であるフマル酸がエピジェネティックに転写因子を安定化したり、代謝酵素の活性を抑制したり、代謝産物に結合することによって代謝の調節に関与することを示した先駆的な研究である。

本研究で見出された新規事実は、HLRCC の発がん機序を解明するための新たな糸口になるかもしれない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 63 件)

Hirayama, A., **Soga, T.**, et al. (4 名中 4 番目) “Development of quantitative method for determination of γ -glutamyl peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: An efficient approach avoiding matrix effect” **J Chromatogr A**,

1369, 161-169, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.007

Adam, J., **Soga, T.**, et al. (23 名中 22 番目) “A Role for Cytosolic Fumarate Hydratase in Urea Cycle Metabolism and Renal Neoplasia” **Cell Rep.** 3, 1440-1448, 2013. 査読有 DOI:10.1016/j.celrep.2013.04.006

Ternette N., **Soga, T.**, et al. (16 名中 15 番目) “Inhibition of Mitochondrial Aconitase by Succination in Fumarate Hydratase Deficiency”, **Cell Rep.** 3, 689-700, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2013.02.01

Kasukawa, T., **Sugimoto, M.**, **Soga, T.**, et al. (10 名中 9 番目) “Human blood metabolite timetable indicates internal body time” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 109, 15036-15041, 2012. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1207768109

Hirayama, A., Tomita, M., **Soga, T.**, “Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis” **Analyst** 137, 5026-5033, 2012. 査読有 DOI: 10.1039/C2AN35492F

Adam, J., **Soga, T.**, et al. (21 名中 17 番目) “Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling” **Cancer Cell** 20, 524-537, 2011. 査読有 DOI 10.1016/j.ccr.2011.09.006

平山明由、曾我朋義、メタボローム解析技術とがんの代謝解析への応用、「実験医学」、羊土社, Vol.32(8), pp1205-1209, 2014. 査読無

曾我朋義、オンコメタボライト-フマル酸によるがんの代謝制御、「細胞工学」、学研メディカル秀潤社, Vol.33(2), pp133-138, 2014. 査読無

〔学会発表〕(計 47 件)

Tomoyoshi Soga, “Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry”, Metabolomics 2013, 9th Annual International Conference of the Metabolomics Society, Scottish Exhibition & Conference Centre, Glasgow, Scotland, UK, Jul 1, 2013.

Tomoyoshi Soga, “Biomedical Research by CE-MS Metabolomics”, 4th International Conference on Foundations of Systems Biology in Engineering 2012”, Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Japan, Oct 23, 2012.

Tomoyoshi Soga, Key Note symposium “CE-MS Metabolomics in Biomedical Research”, 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, MSB2012, Geneva, Switzerland, Feb 13, 2012.

曾我朋義、「オンコメタボライトとがんの代謝」第37回日本分子生物学会年会、ワークショップ：がんの代謝の分子メカニズム、パシフィコ横浜(横浜市)、2014年11月26日

曾我朋義、「オンコメタボライト-フマル酸によるがんの代謝制御」第87回日本生化学会大会、シンポジウム：がんにおける代謝リプログラミング、国立京都国際会館(京都府)、2014年10月16日

曾我朋義、「オンコメタボライト-フマル酸によるがんのエピジェネティック制御」第2回がん代謝研究会、東京理科大学葛飾キャンパス講堂(葛飾区)、2014年7月10日

曾我朋義、「がん抑制遺伝子の変異とがんの代謝」第36回日本分子生物学会ワークショップ：がんの代謝はどこまで解明されたか?、神戸国際展示場(神戸市)、2013年12月5日

曾我朋義、「がん抑制遺伝子とがんの代謝」第1回がん代謝研究会、鶴岡メタボロームキャンパスレクチャーホール(山形県鶴岡市)、2013年10月30日

曾我朋義、「Metabolomics and Cancer Metabolism」第72回日本癌学会学術総会、Cancer Cell Metabolism Symposium、パシフィコ横浜(横浜市)、2013年10月5日

曾我朋義、「メタボロミクスによるがんの代謝解析」第86回日本生化学会大会、シンポジウム：がんのシステム制御、パシフィコ横浜(横浜市)、2013年9月12日

曾我朋義、「メタボロミクスによるがんの代謝解析」第35回日本分子生物学会年会、ワークショップ：メタボロミクスが解き明かす生命科学、福岡国際会議場(福岡市)、2012年12月12日

曾我朋義、「メタボローム解析によるがん研究」第71回日本癌学会学術総会、さつばろ芸文館(札幌市)、2012年9月20日

曾我朋義、「メタボロミクスとがんの代謝」第16回日本がん分子標的治療学会、北九州市西日本総合展示場、2012年6月29日

曾我朋義、「メタボロミクスによるがんの代謝解明」第84回日本生化学会大会、シンポジウム：がんの代謝制御、国立京都国際会館、2011年9月24日

〔図書〕(計 1件)

Bjerrum, J.T., Wakayama, M., Hirayama, A., Soga, T., et.al. Humana Press, Metabolomics: Methods and Protocols, 2015, 259(pp.113-122)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：シースレス CE-MS 用スプレーデバイスの作成方法、シースレス CE-MS スプレーデバイス、およびシースレス CE-MS 装置
発明者：曾我朋義、平山明由、阿部弘
権利者：学校法人 慶應義塾
種類：特許

番号：特願 2015-75494 号
出願年月日：平成 27 年 4 月 1 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www.iab.keio.ac.jp/>
<http://metabolome.iab.keio.ac.jp/>

新聞

2015年2月12日日本経済産業新聞10面「ヒト代謝物メタボローム解析」慶大、50倍の感度に

2015年2月5日日本経済新聞25面「知識産業、地方で興す」

2012年8月28日日本経済新聞12面「人間の体内時計 血液成分で推定 理研と慶大」

2011年5月5日朝日新聞17面「科学 探究人 数千の代謝物質30分で測定」

2011年3月10日朝日新聞1面「肝臓の病気 血1滴で即判定」

テレビ

TBS「夢の扉+」：唾液からがん発見！1滴の血液から肝臓疾患を判定！生命科学に革命を起こす、「究極の成分分析技術」、富田勝、曾我朋義他、2013年10月6日

NHK サイエンス ZERO：病気になる前に治す！血中「極小物質」の謎、曾我朋義他、2012年7月15日

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾我 朋義 (SOGA, Tomoyoshi)
慶應義塾大学・環境情報学部および先端生命科学研究所・教授
研究者番号：60338217

(2)連携研究者

杉本 昌弘 (SUGIMOTO, Masahiro)
慶應義塾大学・政策メディア研究科および先端生命科学研究所・特任准教授
研究者番号：30458963

平山 明由 (HIRAYAMA, Akiyoshi)
慶應義塾大学・政策メディア研究科および先端生命科学研究所・特任助教
研究者番号：00572405

佐藤 清敏 (SATO, Kiyotoshi)
慶應義塾大学・政策メディア研究科および先端生命科学研究所・特任助教
研究者番号：50401386

田畑 祥 (Tabata, Sho)
慶應義塾大学・政策メディア研究科および先端生命科学研究所・特任助教
研究者番号：30708342