

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590846

研究課題名（和文） 質量分析機器を用いた肝がんの超早期診断方法の開発

研究課題名（英文） Establishment of the novel diagnostic method for hepatic carcinoma via mass spectrometry

研究代表者

瀬尾 靖 (SEO YASUSHI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90362772

研究成果の概要（和文）：

病態時における細胞においては、疾患に関連したタンパク質の発現および活性の変動により、代謝・分解された新たな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の代謝産物を網羅的、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。研究代表者は、肝がんを発現、生成が認められる代謝産物を中心に網羅的に分析して、代謝産物の変動パターン解析ならびに肝がん特異的バイオマーカーの同定を実施し、将来的な質量分析計を用いた早期診断法の開発を目指した。

研究成果の概要（英文）：

In the cells along with pathological conditions, some metabolites are produced through the secretion of disease-related proteins and the protein degradation via each type of proteases, but the comprehensive study on these disease-specific low-molecular weight metabolites has not gotten remarkable performances yet. Therefore, we tried to discovery the novel cancer-specific biomarkers via the comprehensive analysis of the low-molecular weight metabolites derived from hepatic carcinomas. In addition, it was investigated whether the novel early diagnosing system can be actually used in the clinical practice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：メタボロミクス・質量分析計・肝がん・早期診断

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本人の死亡原因の第1位であり、その中でも原発性肝がんは男性で第3位を、女性では第5位を占める〔18年度〕。こ

れほど肝がんによる死亡者数が多い原因としては、肝発がんのリスクファクターである慢性肝炎の有病者が慢性B型肝炎で120万人、慢性C型肝炎で200万人と多数にわたること、未だ根治的な治療法が存在しないことがあ

げられる。B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスはいずれも肝細胞に慢性持続性感染をもたらし、感染すると慢性肝炎から徐々に肝硬変へと至る。両ウイルスは発がんウイルスとしても知られており、感染すると高率に肝臓がんを引き起こす。一般に肝臓がん率は、慢性肝炎からは年率1%、肝硬変からは年率3~8%とされる。世界的に見ても、年間約60~70万人が肝臓がんで亡くなっている。しかし未だにB型肝炎キャリアは全世界に3億5000万人、C型肝炎キャリアは全世界に約1億2000万人いるとされ、今後も世界的に肝臓がんは増加していくものと推計されている。このような疾患に対し、様々な治療方法を選択し、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着想した。

2. 研究の目的

病態時における細胞においては、疾患に関連したタンパク質の発現および活性の変動により、代謝・分解された新たな代謝産物が生成される。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。しかし近年、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、高速かつ精確な代謝産物の測定、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、治療前後でのメタボローム解析を行う。これにより、メタボリックフィンガープリンティング(代謝産物の変動パターン解析)、ならび、メタボライトプロファイリング(新規肝がん特異的バイオマーカーの同定)、さらには質量分析装置を用いた早期診断法の臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

生命の設計図は遺伝子から構成されているが、実際には遺伝的のみならず環境的要因が反映された多くのタンパク質や代謝産物と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。本提案課題では、質量分析機器を用いて、肝がんに対するメタボローム解析を実施した。これらより、肝がん特異的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、にその臨床への応用を目指した。本提案課題で用いられる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。本提案課題では、肝がんの早期診断に有用な新規バイオマーカーを同定(メタボライトプロファイリング)し、さらには、肝がんの発症による一連の代謝産物の変動をパターン解析(メタボリックフィンガープリンティング)することから、得られた成果により肝がんの超早期診断システムの開発へと発展可能だと考えた。

(1) 平成21年度

- ① 超早期診断法としてのメタボリックフィンガープリンティングの適用性の検討
- ① -1: 培養細胞を用いたメタボリックフィンガープリンティング

研究代表者の所属する研究室では既に、数種のヒト由来肝がん細胞株を保有している。これらには、実際の担がん患者で見られるように、抗がん剤や放射線照射などに耐性のあるものもある。①-1では、まず、モデルがん細胞株を用いて、がん細胞が産生する代謝産物を脂溶性化合物、水溶性化合物に分けて網羅的に解析した。

具体的には、モデルがん細胞株の培養液と培地からそれぞれ代謝産物を抽出し、得られた抽出液を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) に供する。得られたクロマトグラムを主成分分析により比較解析を行った。

① -2: 担がんマウスを用いたメタボリックフィンガープリンティング

次に、ヌードマウスにヒト肝がん由来細胞株を移植することで担がんマウスを作成し、動物モデルにおけるメタボリックフィンガープリンティングの適用性について検討した。

具体的には、ヌードマウス体内にヒト肝がん由来細胞株を移植し定着させた。移植開始から1週間毎に血清を回収した。また、ヒト肝がん由来細胞株を移植していないヌードマウスからも同様に血清を回収した。得られた血清からそれぞれ代謝産物を抽出し、その抽出液をLC/MSによる測定して、得られたデータを主成分分析により比較解析を行った。

上記の実験結果により、肝がんに対するメタボリックフィンガープリンティングの手法の確立を試みた。

① -3: ヒト臨床検体を用いたメタボリックフィンガープリンティング

肝がんに対する治療方法としては、肝動脈塞栓療法やエタノール注入、肝臓の部分切除、持続動注化学療法などが存在する。そこで、肝がん患者から治療前後での血清、および尿を提供していただき、①-1、および、①-2で確立した方法を用いて、LC/MSを用いた比較解析を実施した。得られた解析結果と、肝がんの進行度、悪性度、抗がん剤の効果などの臨床的カテゴリーとを照らし合わせることで、肝がん特異的な代謝産物の変動パターンを明らかにするとともに、メタボリックフィンガープリンティングの手法の超早期診断としての適用性について検討した。

(2) 平成22年度以降

② 肝がんに対するメタボライトプロファイリングの適用性の検討

② -1: 肝がん特異的バイオマーカーの探索

上記の実験で得られたクロマトグラムのパターン解析の結果より、TAE治療前にのみ存在するピークを抽出し、LC/MSに対するライブラリー検索によりピーク同定を行うことで、肝がん特異的バイオマーカーの探索を実施した。ライブラリー検索で該当する化合物が決定できなかった場合には、MALDI-TOF2-MS、ならびに、LCMS-IT-TOFによるMS/MS解析を実施し、化合物の化学構造を

決定することで、肝がん特異的バイオマーカーを検討した。

② -2: 代謝産物の変動からみた肝がん発症機構の解明

LC/MSによる解析結果とKEGG代謝マップ等のデータベースとを比較検討することで、肝がんが発症した際に誘導される代謝変動を検討した。

4. 研究成果

今回我々は質量分析計を用いて、肝がん患者、ならびに、実験動物から採取した血清を用いて網羅的な代謝産物の解析を行った。測定は島津製作所製のLCMS-IT-TOF、ならびに、GC-MSQP2010を用いた。血清サンプルを用いた予備実験を行うことで、適切な条件設定、ならびに、検体前処理方法を確立した。血清サンプルからの代謝産物の抽出方法として、50 μ lの血清を用いて、メタノール・クロロホルム溶液に溶解し水溶性代謝産物を分離し凍結乾燥させ、LCMSでは5%アセトニトリル溶液に溶解し、GCMSではピリジン溶液を用いてオキシム化、ならびに、誘導體化を行い、分析を行った。測定結果に対しては内標を用いて半定量化し、主成分分析によるフィンガープリンティングを行った。この方法を用いて、はじめに、実験動物を用いて測定を行った。ヒト肝臓がん細胞株 (Hep3B) をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍径が2 cmを超えた時点で血清を採取し、質量分析計による網羅的解析を行った。クロマトグラムでコントロール血清と比較したところ変動するピークを検出し、がん環境では血清中の代謝産物に変化を来すことが示唆された。次に、ヒト肝がん患者の冠動脈塞栓術 (TAE) 前後の血清に対する解析を行った。主成分分析を用いた解析では、肝がん患者と健康人とは異なる代謝物分布を示した。また、TAE前後と健康人の血清を比較した結果、それぞれ異なる代謝物分布を示し、治療後のデータは、健康人に近づくことが明らかとなった。

次に、代謝産物ライブラリーが豊富なガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いてメタボローム解析を実施した。その結果、ヌードマウスへの肝がん由来細胞株の移植により変動する数種類の代謝産物を同定できた。続けて、ヒト臨床検体を用いたGCMSによるメタボローム解析を実施した。本研究のテーマである肝細胞がんは、正常肝に発生することはまれであり、その95%が基礎に慢性肝炎 (75%がC型慢性肝炎、20%がB型慢性肝炎) を伴っている。肝炎の活動性・線維化の程度は多種多様であり、線維化が強いほど

年間発がん率は上昇すると言われている。そこで、はじめに、慢性肝炎による代謝産物の変動について検討した。神戸大学附属病院で肝生検を施行され病理組織学的に確認されているC型肝炎患者22名と健常人26名の血清中代謝産物をGCMSにより網羅的に解析した。その結果、280個の代謝産物由来ピークが検出され、化合物同定も可能であった。そして、C型肝炎患者と健常人との間で有意な差のあるピークは44個存在し、そのうち、26個が化合物同定できた。今回、我々は、GCMSによる代謝産物の網羅的解析を実施し、数十種類の慢性肝炎発症により変動する代謝産物を見出した。肝がん患者の大部分が肝炎を伴うことから、肝細胞がん患者のメタボローム解析を実施する上で、代謝産物の変動が肝がん依存するものなのか、それとも、肝炎に由来するものなのかをより詳細に分析することは非常に重要である。

最後に、健常人、慢性肝炎患者、肝細胞がん患者の検体数を増やし、血清代謝物の変動を総合的に分析した。健康診断で肝疾患のないことが確認できた健常人40名、当院で肝生検を施行され病理学的に慢性肝炎と確認したC型慢性患者37名、生化学的・画像的に肝細胞がんと診断され当院へ入院した肝細胞がん患者37名の血清中代謝物をGC/MSにより網羅的に解析した。その結果、血清中において130種類の代謝物を検出できた。その中で、健常人→慢性肝炎→肝細胞がんで段階的に増加する、あるいは、段階的に減少する、また、一旦減少し肝細胞がんで増加する、あるいは、一旦増加しその後減少するなど、代謝物のうちいくつかは、その病態に応じて様々な変動パターンを示すことを見出した。健常人、慢性肝炎と比較し肝細胞がんで有意に増加していた代謝物は25種類、有意に減少していた代謝物は19種類存在し、これらの代謝物の変動は肝炎によるものではなく肝細胞がんによるものであると考えた。

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1件)

- ① Saito Masaya, Seo Yasushi, Yano Yoshihiko, Miki Akira, Yoshida Masaru, Azuma Takeshi. Short-term reductions in non-protein respiratory quotient and prealbumin can be associated with the long-term deterioration of liver function after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. J

Gastroenterol. 2012, in press. DOI: 10.1007/s00535-012-0535-x

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 靖 (SEO YASUSHI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90362772