

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03798

研究課題名（和文）簡易迅速な尿中低分子バイオマーカー計測による疾病診断技術基盤の構築

研究課題名（英文）Study on a rapid diagnosis method of metabolic disorders using small metabolites in urine

研究代表者

田中 充（Tanaka, Mitsuru）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70584209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪酸をはじめとする代謝物、簡便・迅速かつ網羅的に測定可能な新たな測定技術基盤（ラマン分光法および質量分析法）を構築するとともに、疾患臓器を特定可能な新たな疾病診断技術の確立を目的としている。グラファイトカーボンブラックを用いた質量分析法を開発し、ヒト尿検体中の代謝物の迅速簡便な分析法を確立した。本法による尿中代謝物計測によりがん患者（N=7）と非がん患者（N=8）の尿検体を識別可能であることを見出している。さらに、尿検体の非破壊分析法として、メルトブロー不織布を用いた新たな表面増強ラマン散乱（SERS）基盤による高感度ラマン分光法を構築するに至っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん探知犬や線虫など、生物の嗅覚応答を利用した新規がん診断法が注目されているが、動物の状態やトレーニングの必要性、変動が大きいこと、さらにはスループット性に著しく欠けること等の検知技術における問題点に加え、がんの存在は明らかになっても、どの部位のがんかわからないことは、結果的に臨床現場に混乱を生じ極めて大きな問題となる。したがって、本研究で確立する非侵襲検体である尿を用いた迅速簡便な代謝物計測法とその情報に基づく診断法は、機器分析を基本としていることから再現性に優れており、代謝物の同定とその代謝機序の解明が可能となれば、その診断の原理の理解を伴う信頼の高い診断法の実現につながる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish a new measurement technology platform (Raman spectroscopy and mass spectrometry) that enables simple, rapid, and comprehensive measurement of metabolites, including fatty acids, and to establish a new disease diagnosis technology that can identify disease organs. We have developed a mass spectrometry method using graphite carbon black and established a rapid and simple analysis method for metabolites in human urine samples. We have found that urinary metabolites measured by this method can discriminate between cancer patients (N=7) and non-cancer patients (N=8). In addition, we have established a new non-destructive method for the analysis of urine samples using a new surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) platform based on melt-blown non-woven fabrics.

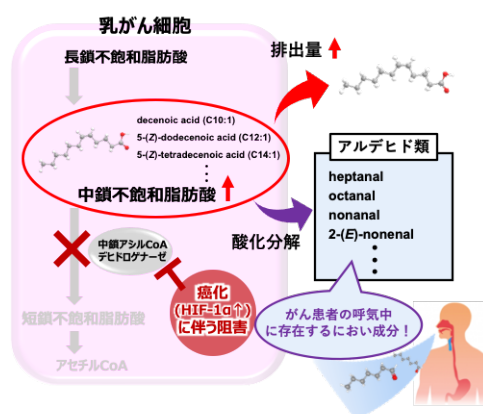
研究分野：食品分析学

キーワード：バイオマーカー がん診断 ラマン分光 質量分析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに正常細胞株に比べて、遺伝子型の異なる3種の乳がん細胞株の培養液に共通して高濃度に存在する中鎖不飽和脂肪酸群の同定に成功した (*Plos One* 15, 6, e0235442, 2020、九大プレスリリース発表 2020/06/29、右図)。また、これらの中鎖不飽和脂肪酸は、がん患者呼気に含まれる特徴的なにおい成分へと酸化分解されたことから、がん患者特有の呼気臭の発生との関連が推察される。驚くべきことに、質量分析計による網羅解析の結果見出した中鎖不飽和脂肪酸群(炭素鎖 C8-14)は、中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (MCAD) の基質として分解されるが、この MCAD は細胞のがん化に伴う HIF-1 α シグナルの増大により発現低下する (*Cell Reports* 8, 1930, 2014)。つまり、申請者らの同定した中鎖不飽和脂肪酸群は、がん化のマーカーといえる。



さらに、4種の血漿中脂肪酸 (C16:0, C20:2, C20:5, C22:6) の測定により、空腹時血糖値が低値を示す2型糖尿病患者の診断を可能にすること (*Chemom. Intell. Lab. Syst.* 118, 173, 2012)、および、血清中 DHA (C22:6), C18:0 がアルツハイマー病患者のバイオマーカーとして機能すること (*Neurobiol. Aging* 33, 1057, 2012) を考慮すると、脂肪酸計測により、がんのみならず各種疾病状態の把握が可能と考えられる。

現状(従来)の遊離脂肪酸計測方法は、血清からジエチルエーテル等の有機溶媒を用いて液液抽出し、メチル化等の誘導体化により揮発性を付与した後に、GC-MS 分析に供するのが一般的とされており、尿などの非侵襲体液試料での計測例は極僅かである。その問題点としては、

- 感度が低い ($\mu\text{mol/mL}$ -血漿レベル) \Rightarrow 尿などの非侵襲体液試料への適用は不可能
- 液液抽出など前処理が煩雑で、スループット性に欠ける

ことなどが挙げられる。

加えて近年、がん探知犬 (*Gut*, 60, 814, 2011) や線虫 (*Biomark. Cancer.* 11, 1179299X19896551, 2019) など、生物の嗅覚応答を利用した新規がん診断法が注目されているが、動物の状態やトレーニングの必要性、変動が大きいこと、さらにはスループット性に著しく欠けること等の検知技術における問題点に加え、2次検査への方向性が明らかでない状況(がんの存在は明らかになっても、どの部位のがん?)は、結果的に臨床現場に混乱を生じ極めて大きな問題(結果として過剰検査が必要)となる。

したがって、本研究の学術的「問い」は、鎖長・不飽和度の組み合わせで複雑多岐に渡る脂肪酸をはじめとする多様な尿中代謝物を、簡便・迅速かつ網羅的に測定可能な新たな測定技術基盤を構築するとともに、疾患臓器(がん部位)を特定可能な新たな疾病状態診断技術を確認するか?である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿などの非侵襲体液試料中の脂肪酸をはじめとする低分子バイオマーカーをどこでも、だれでも、安価に(僻地・診療所レベルで)計測可能な検出系を構築し、二次精密検査への道を明確にするため(過剰検査のリスク低減)、疾病への特異性を高めた尿中脂肪酸計測技術の構築である。

具体的には、以下の項目について検討を行った。

- ① 表面増強ラマン分光法により、迅速・簡便、かつ低コストに、尿1滴に含まれる標的マーカー脂肪酸を定量する技術の確立
- ② レーザー脱離イオン化-質量分析計を用いて、尿1滴に含まれる脂肪酸をはじめとするあらゆるバイオマーカーを、迅速・簡便かつ網羅的に定量する技術の確立
- ③ 各種代謝異常疾患のマーカー分子の特定と代謝物計測による疾病診断法の確立

3. 研究の方法

ポリプロピレン製のメルトブロー不織布を、Ag ナノコロイド溶液に浸漬することで、PP 不織布による表面増強ラマン散乱 (SERS) 基板を作製した。作製した基板の SERS 応答性を評価するために、4-アミノチオフェノールの頭微ラマン分光測定を実施した。

グラファイトカーボンブラック (GCB) をイオン化支援材として用いたレーザー脱離イオン化質量分析 (LDI-MS) を用いて、揮発性・不揮発性化合物の一斉検出の可否を検討した。導電性の ITO コートスライドガラス上に、GCB (5 mg/mL) を滴下・風乾し、当該スポットの上にサンプルを滴下・風乾した後に、LDI-MS 分析に供した。

尿検体としては、非がん患者および乳がん患者由来の尿検体を用いた。

4. 研究成果

新たな尿中バイオマーカーの簡易・迅速検出法（簡易一次スクリーニング用）として、ラマン分光法に着目し、SERS 基板を適用した検出強度の増強を試みた。4-ATP を計測した結果、 10^{-7} M 4-ATP の SERS スペクトルを検出でき、 10^{-7} M から 10^{-3} M までの範囲において濃度依存性を確認することができた。従って、本研究で試作した PP メルトブロー不織布が低コストで簡便に作製可能な SERS 基板に利用できることが示された。本研究で提案する PP 不織布 SERS 基板は、半導体プロセスのような精密なナノ構造を制御した SERS 基板の感度よりも劣ると考えられた。しかしながら、低コストで環境に優しいということは、実用性の観点から優れた測定手法に成りうるかと期待できる。現在は、この独自の SERS 基板を用いた尿検体分析によるがん診断法の構築を目指している。

精密二次スクリーニング検査を想定した早期がん診断技術として、GCB を用いた簡易・迅速かつ網羅的な尿中代謝物一斉解析法の構築を試みた。アミノ酸混合溶液を GCB-LDI-MS 分析に供したところ、正イオンおよび負イオンモードの両モードにおいて、すべてのアミノ酸を検出可能であることが明らかになった。次いで、実際の尿検体（1-1000 倍希釈）を GCB-LDI-MS に供したところ 50 倍希釈尿において、もっとも多くの代謝物由来ピークが検出されることが明らかになった。さらに、 $[^{13}\text{C}_6]$ -Glucose を内標準として用いて、尿中クレアチニンの測定を行ったところ、本 GCB-LDI-MS 分析にて得られた相対ピーク強度と従来法（検査会社での受託分析）での定量値との間に良好な相関係数 ($R^2 > 0.99$) が認められ、本法による半定量性が示された。

そこで、非がん患者 (n=8) および乳がん患者 (n=8) 由来の尿検体を GCB-LDI-MS に供し、尿中クレアチニンを基準とした相対 MS シグナルを得た。得られた代謝物シグナルを尿中クレアチニンを基準に補正し、O-PLS 判別分析に供したところ、極めて明瞭な識別を達成した。

以上の結果より、本 GCB-LDI-MS は尿中代謝物の迅速簡便な分析が可能であり、その MS 情報を用いることで、がん患者由来尿検体の識別が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田中 充	4. 巻 61
2. 論文標題 食品成分の体内吸収・代謝挙動評価技術	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.61.23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hahm Tae Hun, Matsui Toshiro, Tanaka Mitsuru	4. 巻 94
2. 論文標題 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Tissues via the Formation of Reproducible Matrix Crystals by the Fluorescence-Assisted Spraying Method: A Quantification Approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1990 ~ 1998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.1c03369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田原 祐助, 西山 貴史, 山本 純也, 富澤 錬, 園田 英人, 田中 充	4. 巻 144
2. 論文標題 ポリプロピレンメルトブロー不織布を用いたAg表面増強ラマン散乱基板の開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 生体利用性を可視化する新たな食機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 質量分析イメージングで見るポリフェノールの生体利用性
3. 学会等名 2022年度 (公社)日本食品科学工学会西日本支部および(公社)日本栄養食糧学会九州沖縄支部合同大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 日本アミノ酸学会 第9回夏のシンポジウム
3. 学会等名 機能性ペプチドの体内吸収評価の重要性(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 腸管吸収・体内吸収動態評価のための質量分析イメージング技術
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大工キ正隆、Nguyen Thi Doan、田中 充、松井利郎
2. 発表標題 LC-MSを用いた中鎖・長鎖脂肪酸の一斉定量法の確立
3. 学会等名 第68回日本食品科学工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 啓伍, 田中 充, 園田 英人, 田原祐助
2. 発表標題 生体物質計測に用いるマルチアレイ表面増強ラマン散乱基板作製の基礎的検討
3. 学会等名 第33回ライフサポート学会第33回フロンティア講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 食品品質および健康機能の評価・予測を可能にするフードミクス技術の確立
3. 学会等名 「九州大学学術研究都市」セミナー in 東京 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中充
2. 発表標題 食品成分の生体利用性評価のための分析化学的研究
3. 学会等名 第34回クロマトグラフィー科学会議 (SCS34) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 園田英人・田中充・松井利郎・沖英次
2. 発表標題 がんの二オイ発生の分子機序解明と新しいがん診断法の開発
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第13回 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中充
2. 発表標題 食品成分の高度可視化技術の開発と食機能・品質評価への応用
3. 学会等名 日本食品分析学会 令和5年度学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 充
2. 発表標題 分析化学的アプローチで食の機能と品質に迫る ―新たな食科学研究を目指して―
3. 学会等名 令和5年度日本農芸化学会西日本支部例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 結晶性グラファイト基板及び該結晶性グラファイト基板を用いた測定用デバイス	発明者 西木直巳、桑原涼、 鶴田崇、松野行壮、 松井利郎、田中充、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-104410	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田原 祐助 (Tahara Yusuke) (80585927)	信州大学・学術研究院繊維学系・助教 (13601)	
研究分担者	園田 英人 (Sonoda Hideto) (00465725)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小川 剛伸 (Ogawa Takenobu) (10793359)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関