

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25年 5月24日現在

機関番号：37111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22700907
 研究課題名（和文） 蛍光分析を利用したメタボロミクスによる新規癌治療効果判定法の開発
 研究課題名（英文） Development of novel diagnosis of cancer treatment using fluorescence analysis and metabolomics.

研究代表者

糸山 美紀（ITOYAMA MIKI）
 福岡大学・薬学部・助教
 研究者番号：60549690

研究成果の概要（和文）：メタボロミクスによる癌治療効果判定法の開発を目指し、以下に記す各種代謝物の蛍光分析法を開発した。

- (1) ポリアミン分析：エキシマー蛍光誘導体化により遊離体及びアセチル体の同時分析を達成
- (2) 有機酸分析：開発した FSD(Fluorous Scavengeing Derivatization)法により、糖尿病モデルマウス尿中の有機酸を分析し、主成分分析を行ったところ、比較対照群と異なるスコアプロットを取得
- (3) アミノ酸分析：NBD-F 試薬を用いたオンラインプレカラム誘導体化により健康人血中アミノ酸を分析
- (4) ペプチド分析：Arg 含有ペプチドのポストカラム分析を達成

研究成果の概要（英文）：Aims to develop cancer therapy evaluation method based metabolomics, we have developed some fluorescence analysis methods of various metabolites are described below.

- (1) Polyamines analysis: To achieve simultaneous analysis of acetyl body and free form by excimer fluorescence derivatization.
- (2) Organic acids analysis: Where the FSD was developed by (Fluorous Scavengeing Derivatization) method, to analyze the organic acid of diabetes model mouse urine, and subjected to principal component analysis, to get the score plot that is different from the comparison group.
- (3) Amino acids analysis: Analysis of the healthy human blood amino acids by on-line pre-column derivatization with NBD-F reagent.
- (4) Peptides analysis: Achieved post-column analysis of Arg-containing peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：癌、蛍光分析、ポリアミン、メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

癌の薬物治療成績向上のために、個々の患者の薬物反応性予測に基づく最適な薬剤選択と用法・用量の個別化がさらに必要不可欠になると予測されている。そのためには、客観的データに基づいた細胞・組織レベルでの高精度な薬剤反応性予測技術が要求される。このような要求に応えるためのアプローチとして最も有力とされているのが、ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスといったいわゆる「オミクス」研究である。なかでもメタボロミクスは、薬物・環境などの外因的刺激、疾患等を内因性代謝物レベルで網羅的に解析する手法であり、薬効・毒性メカニズムの解明ならびに薬効バイオマーカー開発への応用が期待されている。現在では、研究対象が診断や治療に近い臨床メタボロミクスが盛んに行われおり、メタボロミクスの薬剤応答予測への適用については、その有用性が示唆されている。いくつかの先行研究が報告されているが、これらの殆どは基礎的な研究で留まっており、今後ますます研究の進展が要求される分野である。近年では、ヒト血中の複数のアミノ酸存在量の組み合わせを統計的に解析することで、アミノ酸濃度からなる指標（アミノインデックス）を作成し、健康状態を判断できる可能性が味の素(株)の研究グループによって報告された。このアミノインデックスを利用することで、糖尿病モデル動物と健常動物との判別、さらにはC型肝炎による肝線維化進行状況（ステージング）が予測可能であることも発表された。このような臨床メタボロミクスでは、多くの代謝物を網羅的に分析する必要があることから、現在ではNMRやLC-MS等の分析装置による測定が主流となっている。NMRを用いる測定法では、誘導体化せずに、生体試料中に多量に存在する糖鎖や有機酸等を各化合物のスペクトルの重なりとして直接解析可能である。しかし、NMR法では絶対的な測定感度に乏しく、微量の活性代謝物を捉えきれないという問題点がある。また、高分解能測定のためには1検体あたりの積算時間を増やす必要があり、多検体解析は不向きである。一方、LC-MS法では、化合物ごとにイオン化効率が異なることや、共存する塩の影響によりイオン化が抑制されるといった問題点がある。また、アミノ酸・ポリアミン等のアミン類、有機酸、糖、核酸類などの代表的な内因性代謝物の多くは高極性であり、一般に用いられているLCカラムで保持・分離させることは容易ではない。そのためLC-MSでのメタボロミクス研究は、比較的疎水性の高い代謝物や脂質メタボロミクスへの適用に限定されること

が多かった。

一方でこれまでに当研究室では、蛍光誘導体化を伴う数々のHPLC分析法を開発してきた。この方法は、目的成分を蛍光物質へと変換しHPLCで分析するため、フェムト(10^{-15}) molレベルと低分子代謝物の高感度分析が容易に可能となる。さらに、同一官能基を複数個有する化合物群（ポリアミン、ペプチド、ジカルボン酸、ビスフェノール等）に特異的な分析法であるエキシマー蛍光誘導体化-HPLC分析法を開発してきた（図1）。

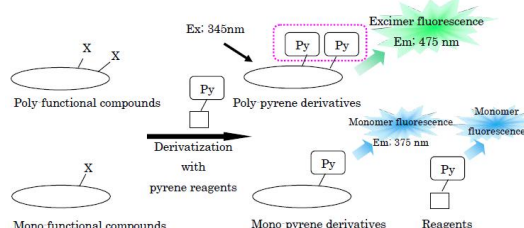


図1 エキシマー蛍光誘導体化によるHPLC分析

2. 研究の目的

血中代謝物の網羅的分析による新規癌治療効果判定法を確立する。当研究室が確立してきた数種の蛍光誘導体化-HPLC分析法を組み合わせることで、血中の代謝物（アミノ酸、ポリアミン、有機酸、ペプチド）の網羅的解析（メタボロミクス）を実施する。癌細胞を用いて、細胞の内外に存在する代謝物質の総体変動に着目し、抗癌剤投与に起因する癌の薬剤応答解明を目指した研究を進めていく。最終的には患者の血中代謝物濃度から健康状態を判別できる二次元グラフを作成し、患者にも一目で抗癌剤治療の効果が判り、医師は患者の薬剤応答判別が可能となる評価法にする。

3. 研究の方法

蛍光誘導体化-HPLC法による細胞培地・細胞中代謝物（アミノ酸、ポリアミン、有機酸、ペプチド）の網羅的分析法を確立する。最適化した分析条件を用い、複数の培養細胞培地・細胞中の代謝物濃度を経時的に分析し、さらにその結果を多変量解析することで、細胞・組織レベルにおける代謝パターンの違いを視覚化する。それらの培養細胞培地に作用機序の異なる抗癌剤を投与したときの代謝パターンの違いから抗癌剤応答性の違いについても明らかにしていく。さらに癌患者血中濃度分析を行い、抗癌剤投与もしくは外科的手術により代謝物濃度はどう変化するかを解析・パターン化、データを蓄積し、臨床での治療効果判定法としての適用を目指す。

4. 研究成果

(1) ポリアミン分析

エキシマー蛍光誘導体化-HPLC法によるポリアミン (Put, Cad, Spd, Spm) 分析を行った。これまで用いていた蛍光誘導体化試薬は反応性に優れていたものの、試薬の安定性が低く、ロット間のバラつきが大きいといった問題点があった。本研究では試薬の安定性に優れた4-(1-pyrene)butanoic acidを用いた。標準系において直線性、再現性ともに良好であり、細胞中ポリアミンの分析に十分な感度を有していたが、生体や細胞中ではアミン性夾雑物に比べポリアミン類は極微量でしか存在せず、実試料を直接誘導体化しても試薬が大過剰に存在するモノアミン類と反応し、Spd、Spmが十分に誘導体化できなかった。そこで、前処理操作の最適化を行った。細胞を分取後、過塩素酸処理により細胞を溶解し、弱陽イオン交換カートリッジによる固相抽出を行うことで細胞中Put、Spd、Spmを分離・検出することができた。この前処理操作を組み合わせることで本法を白血病培養細胞中ポリアミン分析へと適用した。

培養した白血病培養細胞10種(Jurkat、MOLT-3、U937、MOLM-13、THP-1、HV4-11、OCI-AML3、RPMI8226、Raji、U266BI)及び乳がん細胞3種(2326、2336、HTB)を各 1×10^6 個採取し、過塩素酸にて細胞を溶解し、エキシマー蛍光誘導体化後、HPLC分析した。その結果、内在性のPut、SpdおよびSpmを定量でき、いくつかの細胞株で特徴的なポリアミンの発現パターンがあることが分かった(図2)。今後、ポリアミン量と薬剤耐性や癌種、細胞の大きさ等の関連性を明らかにしていく。

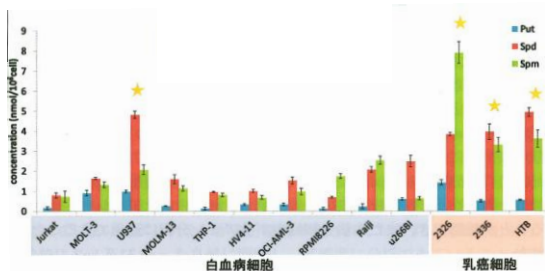


図2 細胞中ポリアミンの分析結果

また、これまで、ポリアミンアセチル体は140度で10時間の加水分解処理を行った後にエキシマー蛍光誘導体化後アセチル体及び遊離体の総量として測定し、遊離体のみの測定値を差し引いて求める必要があったため、煩雑で再現性が悪いという問題点があった。そこで、アセチル体及び遊離体のアミノ基を直接ピレン誘導体化し、エキシマー蛍光波長(475 nm)及びモノマー蛍光波長(375 nm)で同時に測定することで測定対象としたアセチル体の5種(AcPut、AcSpd、AcSpm、DiAcSpd

及びDiAcSpm)及び遊離体の4種(Put、Cad、Spd及びSpm)全てを同時に分離検出することができたが、癌患者血液分析を行うに至らなかった。

(2) 有機酸分析

Fluorous Scavenging Derivatization (FDS)法を用いた有機酸分析法の確立を行った。これまで報告されていた蛍光誘導体化試薬は未反応試薬ピークにより高極性、短鎖有機酸の検出が妨害されていたが、今回、フルオラス分離技術の応用により試薬ピークを除去し、高感度かつ高精度にTCAサイクル中間体などの体内に存在するモノカルボン酸、ジカルボン酸、トリカルボン酸(図3)を一斉分析することができた。これをマウス量試料分析へ適応した。

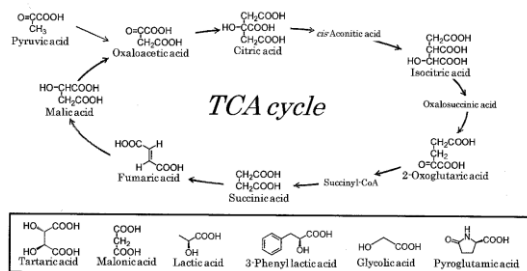


図3 TCAサイクル中間体のカルボン酸

2型糖尿病モデルTSODマウスと、比較対象としてTSNOマウスの24時間尿中有機酸を蛍光誘導体化後、オンラインFSD-HPLC分析したところ、酒石酸およびリンゴ酸を除く12種の各有機酸においてTSODマウスとTSNOマウスの間にはt検定において有意差($p < 0.01$)が認められた。その定量結果を元に主成分分析を行ったところ、スコアプロット上でTSODマウス群とTSNO群は離れた位置にプロットされ、それぞれの尿中に含まれる有機酸量に違いがあることが視覚的に示された(図4)。

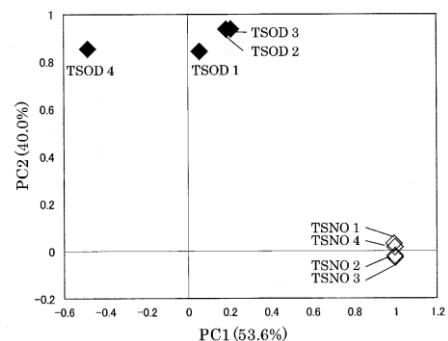


図4 スコアプロット(有機酸分析)

また、ローディングプロットでは乳酸、3-フェニル乳酸、ピルビン酸およびオキサロ酢酸等がPC1およびPC2に大きく寄与しており、これらはいずれも糖新生、解糖系に参与する

化合物であることから、2型糖尿病モデル動物である TSOD マウスの糖代謝異常を有機酸レベルで示すことができる可能性が示唆された (図 5)。

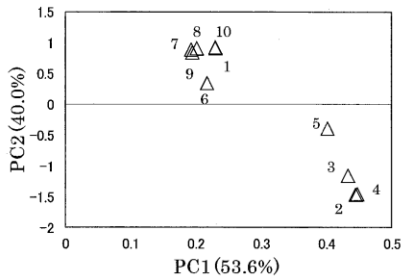


図 5 ローディングプロット (有機酸分析)

(3) アミノ酸分析

① AccQ・Tag™によるアミノ酸分析-主成分分析: AccQ・Tag™法による蛍光誘導体化-HPLC法を用いて、副腎髄質由来の神経芽細胞NH-12をRPMI164培地にて、分化誘導剤であるATRA及びAm80処理を行い、培養した。デジタル光学顕微鏡にて観察したところ、形態学的分化誘導すなわち神経突起進展作用を示すことができた。その培養培地中のアミノ酸21種、L-2-アミノ酪酸及びNH₃の分析結果に神経突起長を加えて主成分分析を行ったところ、分化誘導剤処置群を上方に座標位置の違ひとして細胞分化における変化を理解することができた (スコアプロット; 図6、ローディングプロット; 図7)。

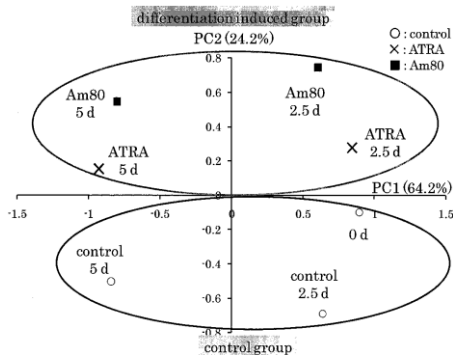


図 6 スコアプロット (アミノ酸分析)

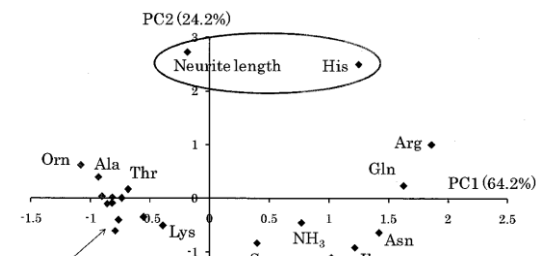


図 7 ローディングプロット (アミノ酸分析)

② アミノ酸オンライン分析: NBD-F(4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)を用いたオンラインプレカラム誘導体化分析法を開発した (図 8)。NBD-F 誘導体化

後、イオン交換と逆相のミックスモードカラムをトラップカラムとしてアミノ酸を捕集、モノリス-ODS カラムを用いて健康人血中アミノ酸を分析することができた。

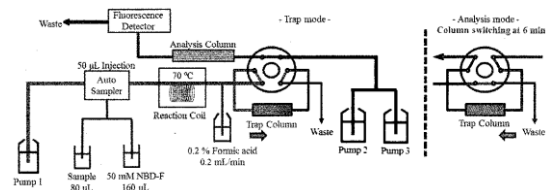


図 8 アミノ酸のオンライン分析システム図

(4) ペプチド分析

Pyrene-4,5-dioneを用いて Arg 含有ペプチドである Tuftsin, Angiotensin II, Neurotensin 及び Dynorphin A をピレン試薬によるポストカラム誘導体化法を開発した (図 9)。

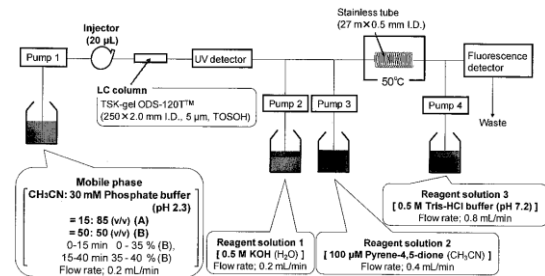


図 9 ペプチドのポストカラム分析システム図

チロシンやフェニルアラニンを含まない Tuftsin のようなペプチドは UV 検出器では検出できないが、蛍光検出を行うことで良好に分析できた (図 10)。

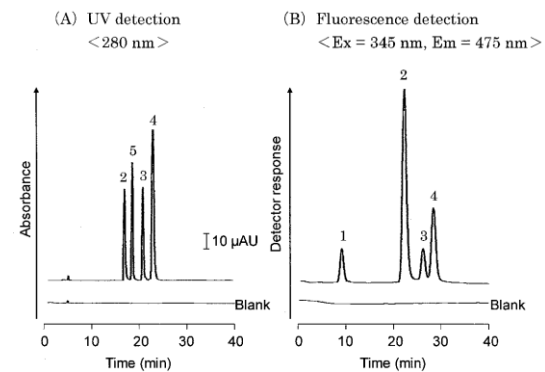


図 10 クロマトグラム

(1: Tuftsin, 2: Dynorphin A, 3: Angiotensin II, 4: Neurotensin)

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 20 件)

① K. Todoroki, H. Hashimoto, K. Machida, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H.

- Nohta, M. Nakashima, M. Yamaguchi: "Fully automated reagent peak-free liquid chromatography fluorescence analysis of highly polar carboxylic acids using a column-switching system and fluoruous scavenging derivatization" *Journal of Separation science*, 36, 232-238 (2013), DOI: 10.1002/jssc.201200692 (査読有)
- ② Y. Sakaguchi, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta: "Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluoruous derivatization" *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5581-5586(2011)., DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.076 (査読有)
- ③ T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, Binary fluoruous alkylation of biogenic primary amines with perfluorinated aldehyde followed by fluoruous liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *Analytical chemistry*, 84(19), 8407-8414(2012)., DOI: 10.1021/ac3020092 (査読有)
- ④ K. Todoroki, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, H. Nohta, M. Yamaguchi : "Highly sensitive and selective derivatization LC method for biomolecules based on fluorescence interactions and fluoruous separations" *Journal of Chromatography B*, 879(17-18), 1325-1337(2011), DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.11.038 (査読有)
- ⑤ K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, E. Kojima, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi: " Reagent Peak-Free Liquid Chromatography- Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging Derivatization Method" *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 397, 2409-2416(2010), DOI: 10.1007/s00216-010-3813-6 (査読有)

[学会発表] (計 67 件)

- ① 河北俊和、森岡深雪、吉田秀幸、糸山美紀、巴山 忠、轟木堅一郎、能田 均、山口政俊: "アルギニン含有ペプチドの蛍光誘導体化 LC 分析法の開発" 第 21 回クロマトグラフィー科学会議、2012 年 10 月 22 日、武庫川女子大 (西宮市)
- ② 糸山美紀、平野裕梨奈、門田奈緒、巴山 忠、

轟木堅一郎、吉田秀幸、能田 均、山口政俊: "エキシマー蛍光誘導体化-HPLC 法による白血病細胞中ポリアミンの分析" 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、グランシップ (静岡市)

- ③ 轟木堅一郎、橋本裕輝、内藤展江、糸山美紀、巴山 忠、吉田秀幸、能田 均、山口政俊 : "Fluorous Scavenging Derivatization(FSD)法による試薬ピークの検出されない高極性有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析" 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2010 年 7 月 21 日、宮城県宮城郡松島町
- ④ K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi: "Reagent Peak-Free Liquid Chromatography-Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging Derivatization Method" 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques, 2010.6.22, Boston, MA USA
- ⑤ 近藤晋司、富田陵子、轟木堅一郎、町田和之、糸山美紀、巴山 忠、吉田秀幸、能田 均、中島 学、山口政俊: "蛍光誘導体化-HPLC法による神経芽細胞腫メタボロミクス解析" 第71回分析化学討論会、2010年5月15日、島根大学 (松江市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/bunseki/web/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸山 美紀 (ITOYAMA MIKI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号 : 60549690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし