

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15日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790645

研究課題名（和文） 質量分析計を用いたメタボローム解析による大腸がんバイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Search for biomarkers against colorectal cancer by the mass spectrometry-based metabolome analysis

研究代表者

奥野 達哉（OKUNO TATSUYA）

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50464269

研究成果の概要（和文）：

病態時における細胞においては、疾患関連タンパク質の分泌や各種酵素を介したタンパク質分解により、さまざまに代謝・分解された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。申請者は、大腸がんを発現、生成が認められる低分子代謝産物を中心に網羅的に解析してがんバイオマーカーを同定し、将来の臨床応用について検討した。

研究成果の概要（英文）：

In the cells with pathological conditions, a variety of metabolites are produced via the secretion of disease-related proteins and the protein degradation by proteases. However, the comprehensive study on these disease-specific low-molecular weight metabolites has not obtained the good and interesting results yet because of various problems. Therefore, the experiments to comprehensively analyze the low-molecular weight metabolites derived from colorectal carcinomas was designed, and the novel cancer-specific biomarkers was searched. In addition, it was investigated whether the identified biomarkers 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
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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・バイオマーカー・早期診断・がん・質量分析

1. 研究開始当初の背景

現在の国民を悩ます疾患として、がん、心血管系疾患、高血圧、糖尿病などがある。中

でも、がんは1981年以来、悪性腫瘍は近年、日本人の死亡原因の第1位となっている。国民の3人に一人はがんで尊い生命を失っている。このように、がんは国民にとって重大な脅威であり、その克服に対する社会的ニーズは極めて高いと想定される。「第3次対がん10カ年総合戦略」に代表されるように、がん制圧は国の重要政策の一つであり、中でもがんの早期発見に役立つ、画期的な超早期診断法の開発が強く求められている。消化器がんは全がん種の中でも、頻度が最も高い。全がん患者の死亡率統計（2004年度）によれば、消化器がん領域における胃がん（死亡率 男性：第2位 女性：第2位）、大腸（結腸・直腸）がん（死亡率 男性：第4位 女性：第1位）、食道がん（死亡率 男性：第6位）は、死亡頻度の高いがん種である。

本提案課題では、大腸がんに関心し研究を計画した。大腸がんは、早期であればほぼ100%の確率で完治するが、一般的には、その自覚症状はない。これまでの大腸がん検診の代表的なものは、糞便の免疫学的潜血反応である。この方法は、大腸がんの精密検査が必要な人を発見できる負担の少ない最も有効な検査法ではあるものの、この検査で陰性であったとしても、大腸がんの発症を否定することはできない。また、血液検査において腫瘍マーカーが異常値を示すことで、大腸がんが発見できる可能性があるものの、進行大腸がんであってもこの血液検査で陽性を示すのは約半数程度であること、さらに、大腸がん検査で使用される腫瘍マーカーは大腸がん特異的なものではなく、胃がんや膵がん、肺がんを発症していても変動する。すなわち、大腸がんを早期に、かつ、より精確に発見できる血液マーカーは発見されていないのが現状であり、そのため、大腸がんの確定診断

のためには、患者にかなりの負担を強いる大腸内視鏡検査が必須となっている。内視鏡検査は比較的早期に消化管がんの診断が可能であるが、侵襲的な検査であり、スクリーニング法として全国民に行うことは困難である。また、大腸がん患者において、初診時にすでに進行がんである割合は、約40-60%と高い事実から、より簡便な、より早期（超早期）診断法が求められている。そこで本提案課題は、質量分析計を用いて血中低分子代謝産物の変動を捉え、がんの早期発見、治療効果予測、予後診断に役立つ画期的ながん診断法の開発の礎となると考える。

2. 研究の目的

生体内にはDNAやタンパク質のほかに、糖、有機酸、アミノ酸など多くの低分子が存在し、その種類は数千種存在する。これらの低分子物質は、酵素などの代謝活動によって作り出された代謝産物である。現在では、細胞の働きを包括的に理解しようとするとき、これまでも盛んに研究が行われてきているゲノムの網羅的解析（ゲノミクス）やタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）に加えて、代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）が重要であると言われている。我々は、アミノ酸や有機酸、糖、脂肪酸など低分子代謝産物を網羅的に測定が可能な、高感度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を有しており、血清や尿、組織などの生体試料から、混合物の状態で確実な代謝産物が測定可能である。そこで、このメタボローム解析システム（質量分析計とその解析ソフトを含めた統合システム）を使い、モデルがん細胞、ならびに、臨床検体を用いて大腸がんのメタボローム解析を行う。これ

らより、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、さらには、将来の臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

本提案課題では、大腸がんの早期診断、ならびに、治療効果予測が可能な診断法の確立を目的とし、大腸がん患者から提供していただいた臨床検体と、担がんマウスから採取した検体とを用いてメタボローム解析を実施する。具体的には以下に示す実験を実施した。

(1) 平成 22 年度

- ① 大腸がん患者血清・尿を用いたメタボローム解析
- ① -1:メタボリックフィンガープリンティング

我々はこれまでに、マウス、あるいはヒトの血清や尿、組織を用いたメタボローム解析を実施してきており、データ分析も含めその解析システムを確立している。そこで、そのシステムを採用して、以下に示す実験を実施した。

具体的には、早期大腸がん患者と進行大腸がん患者から血清を提供していただき、クロロホルム/メタノール/水を用いた液液分配により、血清からアミノ酸や有機酸など低分子代謝産物の抽出を行った。また、健常人の血清と尿からも同様に低分子代謝産物を抽出した。抽出液をガスクロマトグラフィー質量分析計に供し測定を実施し、得られた測定データを用いて多変量解析のひとつである主成分分析により統計処理を行うことで、早期大腸がん患者、進行大腸がん患者、健常人の血清中の低分子代謝産物の存在パターン

がそれぞれ異なるのか否かを統計学的に明らかにした。

① -2:メタボライトプロファイリング

①-1 で得られた測定結果を用いて、実際に変動している低分子代謝産物を我々が保有しているデータベースなどを用いることで同定し、大腸がん患者と健常人との間で変動するものや、早期大腸がんと進行大腸がんとの間で変動するもの、を明らかにしていき、早期診断や治療効果予測に採用できるバイオマーカー候補を決定した。

(2) 平成 23 年度

- ② 担がんマウスモデルを用いたメタボローム解析
- ② -1:大腸がん細胞株を用いたメタボローム解析

研究代表者の所属する消化器内科研究室では既に、数種のヒト由来大腸がん細胞株を保有している。次に、ヌードマウスに数種のヒト大腸がん由来細胞株を移植することで担がんマウスを作製し、担がんマウスにおけるメタボローム解析の適応性について確認を行った。

具体的には、ヌードマウス体内にヒト大腸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、ヒト大腸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。得られた血清から低分子代謝産物を抽出し、続けて、メタボローム解析を実施し、がん移植により変動する血清中代謝産物を同定した。

上記の研究成果をまとめることで、質量分析計を用いた超早期診断法の開発への足が

かりとするデータを取得した。また、得られた結果を神戸大学医学部附属病院由来の臨床検体の結果と照合していくことで、より実用化へ向けた研究へと進展させていった。

4. 研究成果

大腸がん患者 (n=12)、健常人 (n=12) の血清のメタボローム解析を実施し、また、大腸がんの比較対象として食道がん患者 (n=12) と胃がん患者 (n=11) の解析も同様に行った。その結果、各がん種と健常人においてそれぞれ血清代謝物存在パターンが異なるということを多変量解析のひとつである主成分分析 (PCA) により確認できた。さらに、代謝物ターゲット解析において、各がん種間で特異的に変動する代謝物として、食道がんではマロン酸を、胃がんではピルビン酸と 3-ヒドロキシプロピオン酸とを、大腸がんではアラニンとグルクロン酸ラクトン、グルタミンをそれぞれ見出した。これらの結果は、大腸がんの発症により体内のメタボローム、特に、血清メタボロームが大きく変動し、かつ、その変動は疾患に特異的なものである可能性を示している。今後、他施設研究も含めた血清メタボローム解析の大規模試験が必要となってくるが、これらの結果は、メタボローム解析が疾患特異的な診断手法として臨床に応用できる可能性を示唆している。

次に、大腸がんを含めた様々なヒトがん細胞株をヌードマウスに移植し、そのがん細胞株が定着後にヌードマウスの解剖を行い、マウスより血清を採取して、血清中代謝産物の解析を、質量分析計を用いて実施した。また、同様に、がん細胞を移植していないヌードマウスからも血清を採取した。その結果、アミ

ノ酸を中心に様々な代謝産物ががん細胞の存在により変動することが明らかとなった。また、各種細胞株自体からも代謝産物を抽出し、同様に、代謝産物の解析を行った結果、由来組織が異なることで、細胞内代謝産物プロファイルが異なることを明らかにできた。

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 Atsuki Ikeda, Shin Nishiumi, Masakazu Shinohara, Tomoo Yoshie, Naoya Hatano, Takuya Okuno, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Tadaomi Takenawa, Takeshi Azuma, Masaru Yoshida. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomedical Chromatography*, 2012 May;26(5):548-58. (査読有)

[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

奥野 達哉 (OKUNO TATSUYA)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50464269

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者