

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590915

研究課題名(和文) 質量分析計を用いた食道がん早期診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis method for esophageal cancer by mass spectrometry

研究代表者

豊永 高史 (Toyonaga, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40464268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道がん患者に対してメタボローム解析を実施し、食道がんの早期発見に有用なバイオマーカーを見つけることを目的とした。その結果、食道がんの発症により有意に変動する代謝物として、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた分析により17種類の代謝物を、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂質解析により47種類の脂質代謝物を、液体クロマトグラフ質量分析計を用いたカチオン・アニオン解析により13種類の代謝物を見出した。これらの変動した代謝物が、食道がんに対するバイオマーカー候補になりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed metabolome analysis of esophageal cancer patients, and the aim of this study was to discover the biomarkers that are useful for early detection of esophageal cancer. As a result, we found the 17 metabolites that were significantly changed by the pathogenesis of esophageal cancer by metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. By lipid metabolome analysis using liquid chromatography/mass spectrometry, we discovered the 47 lipid metabolites with the significant alterations, and by cation/anion metabolome analysis using liquid chromatography/mass spectrometry, we found the 13 metabolites with the significant alterations. These significantly-changed metabolites may be candidates for esophageal cancer biomarkers.

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：食道がん 質量分析計 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

わが国での1年間の食道がん発症はおよそ9,000人と言われている。これは罹患率の高い胃がんの約6分の1、大腸がんの約6分の1ではあるが、食道がんは人口の高齢化に伴い年々増加することが予想されている。食道がんには早い段階からリンパ節や他の臓器への転移がみられ、発見が遅れると各種治療を行っても完治は困難である。しかし、既存のSCCなどに代表される血液検査における腫瘍マーカーは早期食道がんの発見に全く無力である。近年、早期発見のために内視鏡検査の啓蒙も行われているが、内視鏡検査の手間と苦痛が健診率向上の妨げとなり、依然として進行がんとなってから見つかる場合が多い。より簡便、かつ、確実な早期発見方法の開発が望まれている。

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や代謝物の変化は、遺伝子の発現量よりもダイナミックであり、表現形に最も近いものであると考えられる。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、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。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、より生体での表現型に近い細胞内低分子の量的、質的な変動の総体解析(メタボローム解析)が重要になることは明らかであり、Nature誌による2020 visions (Nature 463, 7 January 2010)においても強調されている。

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、疾患に特徴的な低分子量代謝産物パターンが形成される。しかし、このような低分子量代謝物を網羅的、包括的に解析した研究(メタボローム解析研究)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、臨床医学分野では未だ十分な成果を上げていない。しかし、近年、機器や解析技術の飛躍的な向上がみられ、高速、かつ、精確な代謝物の測定、定量が可能となり、工学、薬学、法医学分野などでは既にその高い解析能力が実用化され、その成果も上がりつつあるのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者の所属研究機関では、メタボローム解析の臨床応用を目指して、臨床に直結し幅広い専門家を揃えた質量分析総合センターを設立、運用している。また、研究代表者は早期食道がん内視鏡治療の世界的エキスパートであり、附属病院には早期食道がん患者が多数受診する。そこで、研究代表者は、国民的要求の高いがん早期診断に対し当研究機関の利点を最大限活用し、食道がんを対象としたメタボローム解析を行うことを着想した。すなわち、メタボロミクスの技術を臨床医学に活用し、食道がんに特異的な代謝物変動パターンを同定する試みであり、食道がん予後改善を最終的な目標とし、質量分析装置を用いた新たな食道がん早期診断法、および、スクリーニング法の開発と臨床応用の可能性について検証することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボローム解析

食道がん患者から得られた50 μ lの血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを1:1:2.5の容量比で混合した溶媒を250 μ l加え、さらに、内部標準物質として2-イソプロピルリンゴ酸0.5 mg/mlを10 μ l加え、十分に混濁した。これを、37、1,200 rpmで30分間振盪した後、16,000 x gで3分間遠心分離し、上清225 μ lを採取した。ここに200 μ lの蒸留水を加えてよく混濁した後、再度、16,000 x gで3分間遠心分離し、上清250 μ lを採取した。抽出した上清は、20分間濃縮遠心乾燥した後、一晚、凍結乾燥した。その後、ピリジンで20 mg/mlに溶解したメトキシアミン溶液を60 μ l加え、超音波破碎を20分間行い、溶解した上で、30、1,200 rpmで90分間振盪し、オキシム化を行った。さらに、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(MSTFA)を40 μ l加え、37、1,200 rpmで30分間振盪することによって、トリメチルシリル誘導体化を行った。最後に、16,000 x gで3分間遠心分離し、得られた上清をガスクロマトグラフ質量分析計に供した。ガスクロマトグラフ質量分析計は、島津製作所製のGCMS-QP2010Ultraを用いた。試料注入量は1.0 μ lとし、注入口温度は230、スプリット比は25:1とした。キャピラリーカラムには、CP-SIL 8 CB low bleed/MS(30 m長 x 内径0.25 mm、膜厚0.25 μ m)を用い、80から330まで1分あたり15の昇温条件とした。イオン化法には、70 eVの電子イオン化法を採用し、イオン源温度は200とした。Advanced Scanning Speed

Protocol (ASSP) を用いて、 m/z 85 から m/z 500 の範囲を 20 points/sec の速度でスキャン測定した。得られたデータは netCDF 形式に変換して出力し、公開ソフトウェアである MetAlign と Aloutput に In-house の代謝物データベースを統合した解析システムを用いて処理した。

(2) 液体クロマトグラフ質量分析計によるメタボローム解析

液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂質分析

食道がん患者から得られた 10 μ l の血清に対し、抽出溶媒としてメタノールを 80 μ l 添加して十分に混濁した。さらに、内部標準物質として PC 12:0/12:0 を 10 μ l 添加して十分に混濁した。氷上で 10 分間静置して、続けて、16,000 x g、4°C で 3 分間遠心分離し、上清 60 μ l を採取した。得られた抽出液は、液体クロマトグラフ質量分析計による脂質分析に供した。なお、脂質解析については、130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラフィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた液体クロマトグラフ質量分析計によるマルチターゲット脂質プロファイリング法により実施した。観測対象としては、グリセロリン脂質や遊離脂肪酸、糖脂質などとした。

液体クロマトグラフ質量分析計を用いたカチオン&アニオン分析

A. 液体クロマトグラフ質量分析計を用いたカチオン分析

食道がん患者から得られた 50 μ l の血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを 1:1:2.5 の容量比で混合した溶媒を 900 μ l (内部標準物質として 2-Bromohypoxanthine を含む) 加え、十分に混濁した。これを、37、1,200 rpm で 30 分間振盪した後、15,000 x g、4 で 5 分間遠心分離し、上清 630 μ l を採取した。ここに 280 μ l の蒸留水を加えてよく混濁した後、再度 16,000 x g で 3 分間遠心分離し、上清 600 μ l を採取した。抽出した上清は、20 分間濃縮遠心乾燥した後、一晚、凍結乾燥した。続けて、凍結乾燥物を水で再溶解して、液体クロマトグラフ質量分析計によるカチオン分析に供した。なお、カチオン解析についても、130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラフィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた液体クロマトグラフ質量分析計によるマルチターゲットプロファイリング法により実施した。

B. 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた

アニオン分析

食道がん患者から得られた 50 μ l の血清に対し、クロロホルム・水・メタノールを 1:1:2.5 の容量比で混合した溶媒を 900 μ l (内部標準物質として (10-Camphorsulfonic acid と PIPES を含む) 加え、十分に混濁した。これを、37、1,200 rpm で 30 分間振盪した後、16,000 x g、4 で 5 分間遠心分離し、上清 630 μ l を採取した。ここに 280 μ l の蒸留水を加えてよく混濁した後、再度 15,000 x g で 3 分間遠心分離し、上清 600 μ l を採取した。抽出した上清は、20 分間濃縮遠心乾燥した後、一晚、凍結乾燥した。続けて、凍結乾燥物を水 50 μ l で再溶解して、液体クロマトグラフ質量分析計によるアニオン分析に供した。なお、アニオン解析についても、130 MPa の高圧耐性をもち高速高分離が可能な超高速液体クロマトグラフィー)とあらかじめターゲットを絞り込んだ高感度観測手法である MRM (マルチプルリアクションモニタリング) 測定を組み合わせた液体クロマトグラフ質量分析計によるマルチターゲットプロファイリング法により実施し、さらに、測定の際にはイオンペア試薬を使用した。

4. 研究成果

本研究では、健康診断で採取される多数の血液検体中のがん特異的代謝物 (メタボローム) の変動パターンを高感度に検出し、プロファイリングすることができれば、画期的な超早期診断システムの開発につながると考え、食道がんを対象に特徴的に変動する代謝物を網羅的に分析し、その変動パターン解析を行うことで、食道がんに対する新たな診断法の確立を目的とした。

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清代謝物解析では、グルタミン、グリシルグリシン、シトルリンなど 17 種類の代謝物が、健常人と比較して有意に変動することが明らかとなった。液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂質解析では、47 種類のホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、あるいは、アシルカルニチン類が有意に変動した。液体クロマトグラフ質量分析計を用いたカチオン・アニオン解析では、13 種類の代謝物が有意な変動を示すことを明らかにできた。さらに、有意に変動した代謝物に基づき、ステップワイズ法により説明変数を選択し、多重ロジスティック回帰分析による食道がん予測式を構築できた。この予測式は、オルニチン、タウリン、そして、PC_20-3_20-4 の 3 種類の代謝物で構成されており、オルニチンとタウリンは、健常者と比較して、食道がん患者で高値を示しており、一方、PC_20-3_20-4 は、食道がん患者で低値を示した。この構築でき

た予測式を ROC 解析 (Receiver Operating Characteristic analysis) にて評価した結果、AUC (The area under curve) や感度、特異度が高い値を示した。これらの結果は、食道がん発見に代謝物分析が有用である可能性を示している。今後は、他のがん種との比較などを進めるとともに、他施設検体の分析を含む大規模試験を実施することで、さらに信頼性のある代謝物バイオマーカー候補の検証を進め、代謝物解析に基づいた食道がんの新規診断法の実用化に努める必要があると考える。

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊永 高史 (TOYONAGA Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 4 0 4 6 4 2 6 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :