

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 11301

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2011～2012

課題番号： 23659866

研究課題名（和文） メタボローム解析で拓く癌細胞の代謝生物学

研究課題名（英文） Metabolomic approach to metabolic biology of cancer cells

研究代表者

高橋 信博 (TAKAHASHI NOBUHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号： 60183852

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌を対象とし、CE-TOFMS を用いて、解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路、アミノ酸代謝経路に関わる代謝物の網羅的解析（メタボローム解析）を試みた。本研究によって、口腔扁平上皮癌のメタボローム解析手法が確立され、口腔扁平上皮癌は他の癌と同様に解糖系の亢進（ワールブルグ効果）が生じていること、さらに、エネルギー源として糖に加えグルタミン等のアミノ酸が利用していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Metabolome analyses of oral squamous cancer (OSC) were performed by CE-TOFMS, targeting metabolites of Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMPP), pentose-phosphate pathway, TCA cycle and metabolic pathways for amino acids. Method for metabolome analyses of OSC was established. The results suggest that the enhancement of EMPP (Warburg effect) occurred in OSC, as previously reported for other cancers, and that amino acids such as glutamine were utilized as an additional energy source for OSC.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：癌組織、メタボローム解析、糖代謝、アミノ酸代謝

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞が無数の命を獲得できるのは、(a) 種々の遺伝子変異によってミトコンドリア依存性のアポトーシスを回避すること、そして、(b) テロメラーゼ活性によって染色体テロメア部分を修復することによると考えられている。しかし、癌細胞が無数に増殖するためには、大量のエネルギー産生が不可欠である。

約 80 年前、癌細胞の嫌氣的解糖亢進（ワールブルグ効果）が発見されて以来、本現象は癌細胞の代謝的特徴として確認されてきた。しかし、解糖では 1 分子のグルコースから 2 分子の ATP が産生されるだけであり、ク

エン酸回路～電子伝達系の好氣的代謝の ATP 産生量（計 36 分子）と比べ極めて効率が悪い。現在に至るまで、ワールブルグ効果とエネルギー産生効率の矛盾を説明できていないのが実情である。

代謝的視点から見ると、癌細胞は、永遠に分裂を繰り返し生き続けるために多細胞生物の秩序を捨てた「原始化した細胞」とも考えられる。すなわち、嫌氣的解糖でエネルギーを賄い、進化の過程で共生したミトコンドリアによる好氣的代謝（クエン酸回路、電子伝達系）を捨て、もっぱら酸素の無かったかつての地球で行われていた嫌氣的代謝を行っていると言える。とくに扁平上皮癌は、上皮という末梢に生ずる癌であるため血流が

少なく低酸素環境に曝されやすく、これらの特徴を鮮明に表すものと思われる。

2000年以降、解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路の代謝物を網羅的に解析できるCE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計)の進歩によって、糖代謝を中心としたエネルギー代謝の一斉解析が可能となってきた。CE-TOFMSは糖代謝性細菌の代謝解析に好都合であり、大腸菌をはじめ様々な細菌で解析が進められている。申請者らもCE-TOFMSを用いてミュータンスレンサ球菌をはじめ口腔内の糖代謝菌の解析を行い、口腔細菌やプラーク全体の糖代謝の全容の解析に成功している。さらに、本装置を、大腸癌などの腺癌細胞の糖代謝解析に応用し、その特徴を明らかにできることが分かってきた。

## 2. 研究の目的

上皮という末梢に位置するために低酸素的であると考えられ、かつ、口腔領域に頻発する「扁平上皮癌」を対象とし、世界最先端のCE-TOFMSを用いて、解糖系をはじめペントースリン酸回路、クエン酸回路、さらにはアミノ酸代謝系に関わる代謝物を網羅的に解析(メタボローム解析)することによって、癌細胞のエネルギー代謝の全容を明らかにし、「ワールブルグ効果の矛盾」を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(本研究は東北大学大学院歯学研究科研究倫理委員会の承認を受けた)

### (1) 癌組織のメタボローム解析手法の確立と測定

「口腔扁平上皮癌組織」から、「癌組織部分」とその周辺の「正常組織部分」を切り出し、液体窒素で急速凍結し、メタノール抽出法にて細胞内代謝物を抽出し、CE-TOFMSにてメタボローム解析を行った。組織試料の調整、代謝物の抽出、および試料の保存に関して、それぞれの最適条件を検討した。

解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路、さらに、アミノ酸代謝系に関する各種代謝物を解析対象とした。

### (2) バイオインフォマティクスによる代謝動態の推定と新規代謝経路の検討

得られたメタボローム・データから、代謝物データベースに基づいて各種代謝物を同定・定量して「メタボローム・プロファイル」を作製し、癌組織と正常組織の代謝動態(各代謝系の機能状態)について比較した。

さらに、メタボローム・プロファイルから、癌組織特異的代謝物ならびに代謝経路について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 癌組織のメタボローム解析手法の確立と測定

「口腔扁平上皮癌組織」から、「癌組織部分」とその周辺の「正常組織部分」を切り出し、液体窒素で急速凍結し-80℃で保存することが確認された。凍結組織試料からの解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路、さらに、アミノ酸代謝系に関する代謝物の抽出は、凍結メタノール抽出法によって、効率的・安定的に行うことが可能であることが明らかになった。

一方、アンモニア等のガス化しやすい低分子については抽出効率等が安定せず、今後の検討課題となった。

### (2) バイオインフォマティクスによる代謝動態の推定と新規代謝経路の検討

口腔扁平上皮癌は、これまでに報告されている各種癌組織と同様に、解糖系の亢進を示唆するグルコースの減少と乳酸の増加、すなわち「ワールブルグ効果」が生じていることが確認された。

さらに、アミノ酸代謝系の解析から、癌組織内でグルタミンの減少が明らかになり、癌細胞におけるエネルギー源として糖に加えグルタミン等のアミノ酸が利用されていることが示唆された。

### (3) 研究成果の公表等

本研究の成果は、国際歯科研究学会(2012年6月、イグアス、ブラジル)および日本口腔外科学会(2012年10月、横浜)にて発表され、後者においては「優秀ポスター賞」を受賞した。

## 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14件)

1. Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H. Responses of infected dental pulp to  $\alpha$ TCP containing antimicrobials in rat molars. 査読有, Arch Histol Cytol 75, 2013, in press
2. Domon-Tawarayama H, Nakajo K, Washio J,

- Ashizawa T, Ichino T, Sugawara H, Fukumoto S, Takahashi N. Divalent cations enhance fluoride binding to *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* cells and subsequently inhibit bacterial acid production. 査読有, Caries Res 47, 2013, 141-149  
doi: 10.1159/000344014
3. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. 査読有, Caries Res 47, 2013, 89-102
  4. Ma S, Imazato S, Chen J-H, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T. Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. 査読有, Dent Mater J 31, 2012, 909-915
  5. Takahashi N, Washio J, Mayanagi G. Metabolomic approach to oral biofilm characterization - A future direction of biofilm research. 査読有, J Oral Biosci 54, 2012, 138-143
  6. Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N. Quantification and identification of bacteria in acrylic resin denture bases and dento-maxillary obturator-prostheses. 査読有, Am J Dent 25, 2012, 171-175
  7. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Shoji M, Sato E, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N. Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence filter - A pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment -. 査読有, Int J Dent 2012, 2012  
doi: 10.1155/2012/172935
  8. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Hashimoto K, Takeuchi Y, Shoji M, Sato E, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N. Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. 査読有, Int J Dent 2012, 2012  
doi: 10.1155/2012/609689
  9. Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N. Microbial composition and acidogenic potential of dental plaque microflora on first molars with orthodontic bands and brackets. 査読有, J Oral Biosci 55(2), 2012, 107-112
  10. Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N. Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods. 査読有, J Microbiol 50(1), 2012, 58-62  
doi: 10.1007/s12275-012-0459-4
  11. Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-denaturing activity of these bacteria. 査読有, Am J Dent 24(5), 2011, 295-299
  12. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. Evaluation of pH at the bacteria-dental cement interface. 査読有, J Dent Res 90(12), 2011, 1446-1450  
doi: 10.1177/0022034511423392
  13. Takahashi N, Washio J. Metabolomic effects of xylitol and fluoride on plaque biofilm in vivo. 査読有, J Dent Res 90(12), 2011, 1463-1468  
doi: 10.1177/0022034511423395
  14. Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RRB. Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. 査読有, Eur J Oral Sci 119(2), 2011, 175-181
- [学会発表] (計 34 件)
1. Ogawa T, Washio J, Echigo S, Takahashi N. Metabolome analysis of oral squamous cell carcinoma using CE-TOFMS. The 90th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, June 22, 2012, Iguasse Falls, Brazil
  2. Washio J, Ogawa T, Suzuki K, Tsukiboshi Y, Watanabe M, Takahashi N. Amino acid composition and amino-acid degrading activity of dental plaque. The 90th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, June 22, 2012, Iguasse Falls, Brazil
  3. 小川珠生, 鷺尾純平, 高橋 哲, 高橋信博. メタボローム解析から見た口腔扁平上皮癌の糖・アミノ酸代謝の特徴. 第57回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2012年10月19日~2012年10月21日, 横浜
  4. Takahashi N. Interface: A keyword in oral health science. 14th International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (invited speaker). May 13, 2012, Sendai
  5. 高橋信博. フッ化物とプラークのダイナミクス-フッ化物はプラークに蓄積し、プラーク酸産生を抑制する. 第61回日本口腔衛生学会・総会 シンポジウムI (招待

- 講演), 2012年05月26日, 横須賀
6. Takahashi N. Metabolic properties of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species (invited speaker), 2012年8月27日, 長崎
  7. 高橋信博. 口腔生態系という小宇宙(マイクロコスモス). みやぎ県民大学大学開放講座(招待講演). 2012年09月08日, 仙台
  8. Takahashi N. Metabolic modulation of caries-related biofilm: The process from symbiosis to dysbiosis. 第54回歯科基礎医学会学術大会 ロッテ基金(メイン) 特別シンポジウム(招待講演), 2012年09月15日, 郡山
  9. 高橋信博. 歯科トクホの機能評価マニュアル小委員会について. 第2回口腔保健用機能性食品研究会・総会(招待講演), 2012年09月22日, 横浜
  10. 福島 梓, 真柳 弦, 中條和子, 佐々木啓一, 高橋信博. *S. mutans*人工バイオフィルムによるチタンの生物学的腐食. 第5回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会(招待講演), 2013年2月1日, 長崎
  11. 鷺尾純平, 高橋信博. Dental plaque biofilm中のアミノ酸の代謝機構 – CE-TOFMSを用いたメタボロミクスの観点から –. 第54回歯科基礎医学会学術大会, 2012年09月16日, 郡山
  12. 鷺尾純平, 月星陽介, 渡邊基博, 鈴木啓佑, 高橋信博. 口腔プラークバイオフィルム中のアミノ酸組成およびその代謝に伴うアンモニア産生に関するメタボロミクスの考察. 第7回メタボロームシンポジウム, 2012年10月10日~2012年10月12日, 鶴岡
  13. 鷺尾純平, 真柳弦, 小川珠生, 高橋信博. メタボローム解析で見えてきた口腔バイオフィルムの機能 – 「何があるか」から「何をしているか」へ –. 第22回日本歯科医学会総会, 2012年11月10日, 大阪
  14. 鈴木啓佑, 月星陽介, 渡邊基博, 小川珠生, 鷺尾純平, 高橋信博. プラークと唾液のメタボローム解析 – 口腔内でのアミノ酸の利用に注目して. 第22回日本歯科医学会総会, 2012年11月10日, 大阪
  15. Takahashi N. Recent discoveries about the metabolism of microbial communities and caries-associated microorganisms. ORCA symposium (invited speaker), July 6-9, 2011, Kaunas, Lithuania
  16. 高橋信博. 口腔保健用機能性食品開発の将来像. 口腔保健用トクホ食品研究会(招待講演), 2011年8月21日, 横浜
  17. 高橋信博. 齲蝕・歯周炎と口腔バイオフィルム. 日本臨床腸内微生物学会教育講演(招待講演), 2011年9月3日, 東京
  18. Takahashi N. Metabolomic approach to oral biofilm characterization. Satellite Symposium on The 53rd Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology (invited speaker), September 30, 2011, Gifu
  19. 高橋信博. 口腔インターフェイスとバイオフィルム制御. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム(招待講演), 2011年11月21-22日, 京都
  20. 高橋信博. 歯科用特定保健用食品(歯科用トクホ)の今とこれから. 宮城県保険医協会学術研究会(招待講演), 2011年11月24日, 仙台
  21. 川嶋順子, 中條和子, 島内英俊, 高橋信博. プラークバイオフィルム構成細菌種におけるフッ化物感受性の違い – *Actinomyces*と*Streptococcus*の酸産生活性での比較. 文部科学省特別経費対象事業「歯学連携ネットワークによる口腔からQOL向上を目指す研究」第4回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会(招待講演), 2012年1月27日, 長崎
  22. 高橋信博, 真柳 弦, 中條和子, 鷺尾純平, 佐藤拓一, 竹内裕尚, 佐久間陽子, 松尾 洋, 末永華子, 鈴木 治, 佐々木啓一. バイオマテリアル – パラサイト・インターフェイスへの挑戦 – バイオマテリアルの生物学的劣化の理解へ. 九州大学応用力学研究所平成23年度共同利用研究集会「力学適応能、自己組織化能を有するバイオマテリアル – 生体インターフェイスの創製」(招待講演), 2012年3月2日, 福岡
  23. Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. Caries-preventive effects of fluoride and fluoride-containing dental materials. The 6th International Workshop on Nano-, Bio- and Amorphous Materials, August 8-9, 2011, Zao
  24. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. Evaluation of pH using an ISFET at the interface between bacteria and restorative materials. The 6th International Workshop on Nano-, Bio- and Amorphous Materials, August 8-9, 2011, Zao
  25. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. Evaluation of pH at the bacteria-restorative material interface. 第59回JADR学術大会, 2011年10月8日, 広島
  26. Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Shimauchi H, Takahashi N. Fluoride-tolerance of *Actinomyces* acid

- production and its enhancement by bicarbonate. 第59回JADR学術大会, 2011年10月8日, 広島
27. 川嶋順子, 中條和子, 鷺尾純平, 島内英俊, 高橋信博. 根面齲蝕関連菌 *Actinomyces* の酸産生活性とそれに及ぼす環境pH、重炭酸、フッ化物の影響. 日本歯科保存学会第134回学術大会, 2011年6月9-10日, 千葉
28. 鷺尾純平, 高橋信博. ヒトプラークとう蝕関連口腔細菌 *Streptococcus mutans* の糖代謝に対するキシリトールの影響の相違. 第84回日本生化学大会, 2011年9月24日, 京都
29. 中條和子, David Beighton, 高橋信博. 口腔 *bifidobacteria* の菌体内多糖代謝による酸産生 - 代表的な齲蝕関連細菌種との比較 -. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月1日, 岐阜
30. 佐藤拓一, 河村好章, 八巻恵子, 島内英俊, 高橋信博. 感染根管内細菌叢の pyrosequencing法によるメタゲノム解析. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月1日, 岐阜
31. 鷺尾純平, 高橋信博. ヒト・プラークの糖代謝に対するフッ化物およびキシリトールの影響～CE-TOFMSを用いたメタボロミクス・アプローチ～. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月1日, 岐阜
32. 安彦友希, 佐藤拓一, 坂下玲子, 高橋信博. 高齢者の歯肉縁下プラーク細菌叢: *Porphyromonas gingivalis* の定量解析と fimA 遺伝子型タイピング. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月2日, 岐阜
33. 真柳 弦, 五十嵐公英, 鷺尾純平, 中條和子, 土門-俵谷ひと美, 高橋信博. イオン感受性電界効果型トランジスタ微小pH電極による細菌-歯科修復材料・インターフェイスpH測定. 粉体粉末冶金協会 平成23年度秋季大会 (第108回講演大会), 2011年10月26-28日, 大阪
34. 鷺尾純平, 小川珠生, 真柳 弦, 高橋信博. CE-TOFMSを用いた口腔プラークバイオフィルム糖代謝メタボローム解析～フッ化物やキシリトールによる影響をin vivoで探る～. キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2011年11月9-11日, 鶴岡

[図書] (計1件)

1. 高橋信博. 医歯薬出版. 唾液の生化学・プラークの生化学・齲蝕の生化学, In: 早川太郎, 須田立雄, 木崎治俊 (編集): 口腔生化学 第5版, 2011, 189-252 ページ

[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

## 6. 研究組織

### 1) 研究代表者

高橋 信博 (TAKAHASHI NOBUHIRO)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 60183852

### (2) 研究分担者

越後 成志 (ECHIGO SEISHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 70005114

鷺尾 純平 (WASHIO JUMPEI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 20400260

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: