

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701005

研究課題名(和文) 局所的超高感度代謝物分析システムを用いた大腸がん組織の網羅的代謝物解析

研究課題名(英文) Comprehensive metabolome analysis with high resolution and sensitive system

研究代表者

入野 康宏 (Irino, Yasuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：10415565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：メタボロミクスを末梢血に応用し、疾患を早期発見しようとする試みがなされており、本研究は局所的超高感度代謝物分析システムの開発を行い、代謝物の網羅的解析を実施することを目的とした。

がん抑制遺伝子であるAPC(Adenomatous polyposis coli)に着目して研究を実施した。APC変異株と野生株の大腸がん細胞を用いて、発現量に違いのある代謝物とタンパク質を網羅的に調べた。以上の結果から大腸がんの局所的超高感度代謝物システムで測定すべき代謝物を決定することができ、その代謝物(代謝経路)はAPCによる制御を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics is a powerful approach to discover new biomarkers of various diseases. In this study, we tried to develop the high sensitive and resolution metabolome analysis system.

We first focused on a tumor suppressor gene, Adenomatous polyposis coli (APC). We conducted the comprehensive quantification of water-soluble metabolites and proteins in colon cancer cells (both APC mutation cell and APC wild-type cell) using a mass spectrometry. We determined target metabolites for our system. We also found the levels of some metabolic enzymes were regulated by APC activity. These results suggest that APC mutation causes metabolite pathways in colon cancers.

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：代謝 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

生体内には核酸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数千種存在する。これらの低分子化合物は、細胞の代謝活動によって作り出される代謝物である。現在では、細胞機能を包括的に理解しようとするために、広く使用され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、代謝物の網羅的解析(メタボロミクス)が強力な分析手法として利用されている。近年、メタボロミクスを末梢血に応用し、疾患を早期発見しようとする試みがなされており、代謝物の存在パターンを調べることで、疾患を診断することが可能である。

がんは日本人の死亡原因の第1位となっており、国民の3人に1人はがんが原因で尊い生命を失っている。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。「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る。末梢血中の代謝物の存在パターンからがんを早期診断するための研究が精力的に実施されている。

末梢血は低侵襲的に採取でき、疾患を診断するために適しているが、食事や飲み薬の影響が強く、病態を正確に反映しているとは限らず、末梢血でのがん診断の有用性を検討する必要がある。がん組織と非がん組織を直接的に分析することが望まれる。

本研究課題の遂行により、代謝物そのものが、がんの治療の標的になりうることも十分に期待できるので、本研究課題の発展性は高い。さらに、組織での局所的な代謝物解析が、今後のがん治療薬の探索をするうえで強力な解析手法になりうることを考えると、本研究課題の重要性も非常に高いと考える。

2. 研究の目的

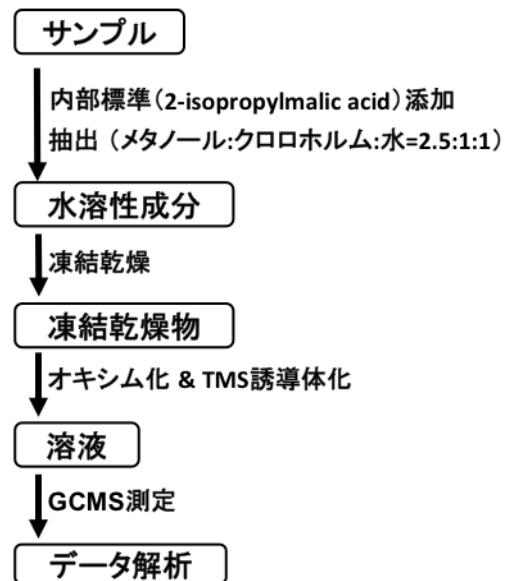
本研究課題は、局所的超高感度代謝物分析システムの開発を行い、直接的に組織切片の代謝物の網羅的解析を実施することを目的とした。がんの早期診断のために、末梢血検体を用いたバイオマーカー探索が精力的に行われている。しかし、末梢血は食事や投薬の影響を受けるので、必ずしも病態を反映するとはいえず、組織での分析が不可欠である。そこで、本研究課題では質量分析計を用いて組織の代謝物存在パターンを調べることを目的とし、組織切片中の代謝物を直接分析できる局所的超高感度代謝物分析システムを開発する。がんで代謝物存在パターンに違いが見られるかを検討し、がんの発症の原因分子や分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 局所的超高感度代謝物分析システムの測定すべき代謝物の検討

GC-MS(ガスクロマトグラフ-質量分析計)を用いた網羅的に水溶性代謝物を測定する実験系がすでに整っているため、はじめに末梢血・細胞などの生体試料に含まれる水溶性代謝物を分析することで、局所的超高感度代謝物分析システムで分析すべき代謝物候補を決定することとした。細胞・血液からクロロホルム-メタノール水溶液を用いて水溶性代謝物を抽出した。抽出された水溶性代謝物を誘導体化反応させて、GC-MSを用いた網羅的に水溶性代謝物を測定した(図1)。

図1:GC-MSを用いた代謝物分析



(2) APC 変異による代謝物変動原因の検討

上記(1)の項目の実験で確認された代謝物変動の原因を調べるために、APC 変異による代謝酵素の発現量に変化が見られるかどうかを検討した。

(3) 抗がん作用が期待される薬剤に対するがん細胞の代謝プロファイルの変化の検討

多くのがんで、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)の変異とMAP kinaseのpathwayの活性化が報告されている。測定すべき代謝物の意味づけを深めるために、PI3KとMAP kinaseの阻害剤を添加したときのがん細胞の代謝プロファイルに変化があるかを調べた。

がん細胞にPI3K阻害剤であるBEZ235と

MAP kinase の阻害剤である U0126 を添加し、24 時間培養した後に、細胞から代謝物を抽出し、網羅的に解析した。得られた代謝物データを多変量解析し、PI3K と MAP kinase の阻害剤が代謝プロファイルに与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 局所的超高感度代謝物分析システムの測定すべき代謝物の検討

大腸がんの原因遺伝子でありがん抑制遺伝子である Adenomatous Polyposis Coli (APC) を発現させた大腸がん細胞である SW480 (以下 SW480(APC)) と APC 変異体を発現している SW480 中の代謝物を測定した。同定された代謝物の内訳は、アミノ酸、有機酸や糖類であった。

その結果、測定すべき代謝物を決定することができた。

(2) APC 変異による代謝物変動原因の検討

上記(1)の項目の実験で確認された代謝物変動の原因を調べるために APC 変異による代謝酵素の発現量に変化が見られるかを調べた。

その結果、APC の変異株においていくつかの代謝酵素の発現量が変化していた。

(3) 抗がん作用が期待される薬剤に対するがん細胞の代謝プロファイルの変化の検討

多くのがんで変異が認められる PI3K と MAP kinase を阻害したときの代謝プロファイルの変化を調べた。

その結果、MAP kinase の阻害剤は、代謝プロファイルに影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし、PI3K の阻害剤は、代謝プロファイルを変化させることが分かった(図2)。さらに、PI3K の阻害剤が代謝プロファイルに影響を与えた細胞は、すべて PI3K が過剰に活性化している細胞であることが分かった。PI3K の阻害剤の感受性が高く、増殖が強く抑制されたがん細胞では、代謝プロファイルの変化に対する PI3K 阻害剤の効果が最も高いことが明らかとなった。

がん遺伝子の変異によって、各がん細胞は異なる代謝プロファイルを示していることと、各種の薬剤に対する反応性(代謝プロファイルの変動)が異なっていた。

これらの結果は、がん遺伝子が代謝を制御していることと、それら遺伝子の働きの違いにより、各がん細胞の代謝パターンが異なっていることを示唆している。薬剤の効果を評価する上で代謝を調べることは、有用である可能性が示唆された。

(4) まとめと考察

本研究課題の遂行により、大腸がんの局所的高感度代謝物システムで測定すべき代謝物を決定することができ、その代謝物(代謝経路)は APC による制御を受けていることが示唆された。

また、PI3K の阻害剤を添加し、がん細胞の増殖を抑制させると代謝プロファイルの変動が見られた。このことは、がん特有の代謝プロファイルを調べることが、がんの性質を調べるための有効な手段であることを示唆している。

がんは正常細胞と異なる代謝を用いていることが、近年の研究により明らかにされており、がん細胞の特有の代謝制御機構を明らかにすることは、がん診断のみならず新規がん治療法の開発につながる。したがって、本研究課題を発展させることは、がん克服のための第一歩となりえる可能性を秘めている。

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)

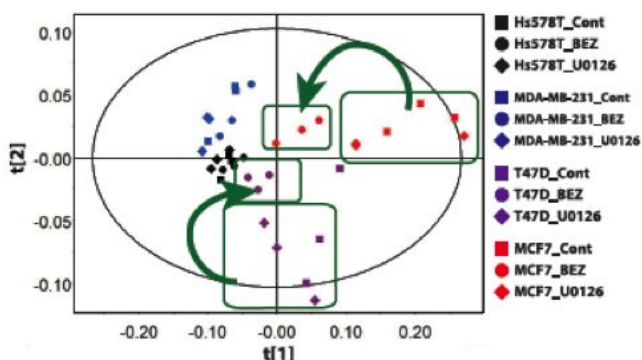
[雑誌論文](計 2件)

すべて査読あり

Tokuda E, Itoh T, Hasegawa J, Ijuin T, Takeuchi Y, Irino Y, Fukumoto M, Takenawa T.

Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and invasive cell migration in human breast cancer.

図2: 各種阻害剤による代謝プロファイルの変化



Cancer Research, 2014. in press.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2441

Yoshida M, Hatano N, Nishiumi S, Irino Y, Izumi Y, Takenawa T, Azuma T.
Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Gastroenterology, 47, 9-20.2012.
doi:10.1007/s00535-011-0493-8

〔学会発表〕(計 3件)

Irino Y, Koshiyama A, Ichibangase T, Imai K, Yoshida M.
The Profiling of the Effects of Adenomatous Polyposis Coli (APC) Mutation on the Cellular Proteome in Colorectal Cancer Cells.
HUP0 12th Annual World Congress, September 17, 2013. Pacifico Yokohama, Japan.
Poster presentation.

入野 康宏, 平田 悠、竹内 由紀子、波多野 直哉、山田 小弓、竹縄 忠臣
PI3 阻害剤が代謝に与える影響のプロファイリング
第 65 回日本細胞生物学会、2013 年 6 月 21 日、名古屋
フラッシュトーク発表、ポスター発表

入野 康宏, 平田 悠、竹内 由紀子、波多野 直哉、竹縄 忠臣
Characterization of breast cancer cells with metabolic profiling.
第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡
ポスター発表

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入野 康宏 (Irino Yasuhiro)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号：10415565

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし