

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560237

研究課題名(和文)超臨界流体質量分析システムを用いたがん診断システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of cancer diagnosis system by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry

研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA, MASARU)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00419475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超臨界流体クロマトグラフィーに質量分析計を接続した新しい分析システム(SFC-MS)を構築し、血漿・血清中の代謝物を分析できるようなシステムを構築することを目的とした。SFC-MSは、本来、脂質などの疎水性分子の分析に有用であるが、血清・血漿中には疎水性分子のみならず、様々な種類の親水性分子が存在することから、親水性分子も分析可能な条件も決定し、ヒト血清中代謝物を分析できる条件を見出した。さらに、生体試料である血清の分析、ならびに、その評価も可能であることを確認できた。これらの結果は、SFC-MS分析は、将来的に、疾患診断システムとして応用可能である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish the new system based on supercritical fluid chromatography mass spectrometry (SFC-MS), and also to construct the system to analyze serum/plasma metabolites by SFC-MS. SFC-MS is useful to analyze hydrophobic molecules such as lipids, but serum and plasma have an abundance of hydrophilic molecules as well as hydrophobic molecules. Therefore, in SFC-MS analysis, we determined the analyzability condition for hydrophilic molecules in addition to hydrophobic molecules, and found the condition to analyze the human serum metabolites by SFC-MS. In addition, we confirmed that SFC-MS is possible to analyze the serum as biological samples and moreover to evaluate the difference between samples. These results indicate that SFC-MS analysis may be applicable to the disease diagnosis system.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：がん 診断 超臨界 質量分析 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

日本社会の高年齢化に伴い、死因としてのがんは増加の一途を辿っており、昨今では日本人死因の3分の1を占めている。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。がんでは、健常人では見られないタンパク質の発現やその活性の変化により代謝経路に異常が認められている。その結果、細胞内で誘発された様々な代謝物の変動を血液中での確に、かつ、感度よく検出することができれば、様々な疾患診断が可能となる。

研究代表者は、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC-MS)を用いて、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、さまざまながん特異的に早期から変動する代謝物を同定してきた。これまでにヒト膵がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん患者血清中の代謝物の網羅的解析により、診断に有効なバイオマーカーを同定し、これらの代謝物の変動パターンを用いた「がんプロファイリング診断システム」の開発を進めている。しかしながら、GC-MSなど、これまでの分析システムでは、さまざまな疾患に深く関与すると想定されている脂質、特に、酸化脂質などは、網羅的に解析することができなかった。

そこで、研究代表者は、得られたデータを統合でき、より簡便、かつ、低侵襲的で信頼性のあるがんの超早期診断法を開発するため、超臨界流体クロマトグラフィーにタンデム四重極型質量分析計を接続した新しい分析システム(SFC-MS)を構築し、様々ながん患者血清中の酸化脂質などの脂質を含む代謝物を網羅的に解析することができるようにする必要があったと考えた。

2. 研究の目的

超臨界流体とは、臨界温度、臨界圧力を超えた状態の物質のことをいい、低粘性・高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好ましい性質を有している。超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)は高速、かつ、高分離の分析が可能であり、極性有機溶媒(モディファイヤー)の添加や温度、背圧を変化させることにより、ガスクロマトグラフィー(GC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にない幅広い分離モードを選択することが可能であると考えられている。超臨界流体を移動相に用いたSFC-MSでは、メタボロミクスに広く使用されているGC-MSやLC-MS、キャピラリー電気泳動(CE-MS)などでは分離が困難であった代謝物の解析が可能であり、これまで解析の対象とならな

かった代謝物に関する情報を得ることができることが明らかになってきている。また、当該手法は、スクリーニングなど幅広い代謝物を対象とした解析や多検体の解析に有用であると考えられる。さらに、選択性のある質量分析を用いていることから、個々の成分の詳細なプロファイリングも可能であるため、SFC-MSはメタボロミクスの新たな分析手法として期待されており、SFC-MSの使用は、斬新なアイデア、ならびに、チャレンジ性を有していると考えた。そこで、本研究では、超臨界流体クロマトグラフィーに質量分析計を接続した新しい分析システムSFC-MSを構築するとともに、SFC-MSを用いて、血漿・血清中の代謝物を分析できる体制を整え、検体評価に適用できるようにすることを目的とした。

3. 研究の方法

SFC-MSによる血漿・血清中の代謝物の分析に先立ち、SFC-MS分析のためのMultiple Reaction Monitoring(MRM)法による代謝物データベースの作成を、各代謝物の標品を用いて行った。なお、質量分析計は、タンデム四重極型を使用した。

続いて、SFC-MSで分析する血漿・血清中代謝物のうち、がん患者と健常者との間で違いのある、すなわち、バイオマーカー候補代謝物を見出すため、がん患者血清と健常者血清をLC-MS分析に供した。なお、血清中代謝物抽出方法の概要は、以下に示すとおりである。

血清からの脂質代謝物の抽出には、メタノールを使用し、内部標準物質として、PC_{12-0_12-0}を添加した。

血清からのカチオン系分子代謝物の抽出には、メタノール、クロロホルム、水の混合溶媒を使用し、内部標準物質として、2-Bromohypoxanthineを添加した。

血清からのアニオン系分子代謝物の抽出には、メタノール、クロロホルム、水の混合溶媒を使用し、内部標準物質として、10-Camphorsulfonic acidを添加した。なお、アニオン系分子分析の際には、イオンペア試薬であるトリブチルアミンを移動相に添加した。

次に、SFCにおける条件検討を行った。なお、LC-MS分析によって明らかになったバイオマーカー候補を、より安定的に、かつ、定量的に分析できるようにすることを念頭において条件検討を進めるとともに、バイオマーカー候補以外についても幅広く代謝物を分析することが可能か否かに関しても検討し

た。これにより、SFC-MS でしか測定できないような代謝物も同様に評価できるような検討を実施した。なお、条件検討内容については、超臨界流体クロマトグラフィーにおけるモディファイヤーの添加や温度、背圧などを検討するとともに、カラムの選別も実施した。

4. 研究成果

MRM 法による代謝物データベースの作成を、タンデム四重極型質量分析計を用いて実施し、約 300 種類の脂質、約 100 種類のカチオン系分子、約 150 種類のアニオン系分子を分析できる体制を整えることができた。

続いて、LC-MS を用いて、大腸がん患者血清、ならびに、その対照となる健常者血清の血清中代謝物分析を行い、比較解析を行うことで、大腸がんに対するバイオマーカー候補探索を行った。各代謝物のピーク面積値の内部標準物質のピーク面積に対する相対値を算出し、大腸がん患者血清と健常者血清との間で有意差検定を行った結果、約 30 種類の有意な違いを示した代謝物を見出すことができた。がん診断のための SFC-MS システム開発において、この約 30 種類の代謝物に関しては、安定的に、かつ、定量的に SFC-MS を用いて分析できる必要があり、続けて、SFC-MS の分析条件の検討を行った。なお、アニオン系分子の LC-MS による分析は、イオンペア試薬を用いた分析系に行っている。SFC-MS 分析では、イオンペア試薬を用いることが、機器的な問題で不可能であることから、SFC-MS の分析条件の検討では、脂質、ならびに、親水性分子のうちカチオン系分子に関して実施した。

本来、SFC-MS は、脂質などの疎水性分子の分析に有用である。しかし、血清・血漿中には疎水性分子のみならず、様々な種類の親水性分子（カチオン系分子、ならびに、アニオン系分子）例えば、アミノ酸や有機酸などが存在する。そこで、このような親水性分子を保持・分離可能なカラムを使用する必要があると考え、分析カラムの検討を行った。その結果、極性基内包型の逆相 ODS カラムが有効であることが確認できたが、このカラムを用いた場合でも、いくつかの代謝物については、ピーク形状が悪いものも存在した。

続いて、SFC におけるモディファイヤーについて検討した。その結果、極性溶媒であるメタノールをモディファイヤーとして利用することで、メタノールの添加量に依存して、親水性分子に対するピーク検出の安定性が大きく変動することを明らかにできた。さらに、モディファイヤーとしてのメタノールの添加割合をいくつか設定して、代謝物の分析

安定性を比較検証し、最適な添加割合を決定した。

次に、上記の検証により決定した条件を用いて、ヒト血清分析を実施した。バイオマーカー候補の代謝物に関しては、やはり、すべての代謝物を安定的に測定することはできず、ピーク形状が悪い代謝物がいくつか存在した。また、LC-MS では分析が難しいものも含めたバイオマーカー候補以外の代謝物に関しても、安定的に測定できないものがいくつか存在した。すなわち、現状の条件では、SFC-MS による、より幅広い網羅的な代謝物の解析を達成するためには、まだ、条件を改善する必要があることが明らかにでき、これは、今後の検証課題であると思われる。しかしながら、多くの代謝物については、RSD% も低く、安定的に分析ができており、さらに、検体間の違いを評価することも可能であることも確認できていることから、現状の条件でも、本研究目的を達成できていると考えられる。

本研究を実施することにより、SFC-MS を用いた代謝物解析システムも、新たながん診断システムとして適用可能である可能性を示すことができた。しかしながら、がん診断システムとして活用する場合には、絶対定量の必要性や多検体処理への対応、ユーザー操作性向上（機器操作のシンプル化）、データ解析の簡易化などについて解決が必要である。まず、絶対定量に関しては、いくつかの検証試験を経てバイオマーカー候補が決定した後、その代謝物に対する安定同位体を準備し、安定同位体データに基づき、血中濃度の算出を行う必要がある。なお、この際には、その分析系に最適なカラムを、再度、選別する必要があるかもしれない。また、多検体処理、ユーザー操作性向上（機器操作のシンプル化）、データ解析簡易化については、ハード面での大幅な改善が必要であり、検体処理の自動化（ロボット化）やデータ解析システム能の向上など解決すべき点が数多くある。しかし、この点が処理できなければ、研究成果が実用化のために活用されにくく、今後、産学連携で進めていくべき課題である。いずれにせよ、これらの問題点が解決できるのか否かが、将来的な SFC-MS を用いた代謝物解析の臨床現場への実用化へ向けた鍵となると考えられる。

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 3 件)

Suzuki M., Nishiumi S., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.
Metabolome analysis for discovering

biomarkers of gastroenterological cancer.
Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 966, 59-69 (2014).
doi: 10.1016/j.jchromb.2014.02.042.

Matsubara A., Izumi Y., Nishiumi S., Suzuki M., Azuma T., Fukusaki E., Bamba T., Yoshida M.
Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots.
Journal of Chromatography B, 969, 199-204(2014).
doi: 10.1016/j.jchromb.2014.08.013.

Nishiumi S., Suzuki M., Kobayashi T., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.
Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer.
Metabolites, 4, 547-571 (2014).
doi: 10.3390/metabo4030547.

〔学会発表〕(計2件)

吉田優

血清メタボロミクスを用いた消化器癌バイオマーカー探索、日本プロテオーム学会、2014/7/16-17、つくば国際会議場(茨城県)

吉田優

血清メタボロミクスを用いた癌バイオマーカー探索、第73回日本癌学会学術総会、2014/9/24-25、パシフィコ横浜(神奈川県)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
神戸大学医学研究科内科学講座消化器内科学分野ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html>

神戸大学医学研究科内科系講座病因病態解析学分野
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/metabo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA, Masaru)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00419475

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：