

Title	Metabolomic analysis reveals biomarkers in blood plasma from ras H2 mice
Sub Title	
Author	島村, 安俊(Shimamura, Yasutoshi)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.99- 106
JaLC DOI	
Abstract	<p>がんとは正常な生体機能を異常な内分泌で妨げ、多数の臓器を機能不全に至らしめる疾病である。正常細胞が変化したがん細胞では遺伝子変異による無秩序な細胞増殖が起こり、転移や浸潤によって周囲の組織に定着する性質を持っている。進行度と共に生存率が大きく下がるがんでは早期発見が非常に重要であり、早期発見にむけた手法の1つにバイオマーカーを用いた探索法がある。体液中の代謝物濃度の相関からがんの選別や病勢、再発診断などを行うバイオマーカーであるが、微小環境に大きく左右されるがんではヒト体液中の代謝物を用いたバイオマーカー探索や発がんメカニズムの解明は困難であった。</p> <p>近年、がん研究の場では高い発がん感受性を持つモデル生物が用いられるようになり、中でもがん遺伝子を人工的に操作したモデル生物を使用した発がん性評価試験が主流になっている。内因性プロモーター/エンハンサーを持つヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入しているrasH2マウスは通常2年かかる発がん性評価試験を26週間で行うことが可能であり、またヒトの発がん物質に適正に反応することから短期間でバイオマーカーの探索や発がんメカニズムの考察が可能となっている。本研究では90匹に及ぶrasH2マウス及びnonTgマウスを対象とした26週間短期発がん性評価試験から得られた血漿を対象に時系列解析を進めた。本研究の目的はバイオマーカー探索、及び腫瘍の進行と代謝物の時系列変化の関係性について解析を進めた。バイオマーカー探索ではGlutathioneとLaurateが候補として挙がり、腫瘍の進行と代謝物の関係性ではARG活性やがん悪質駅によるCori Cycle活性の亢進が推察された。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0099

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Metabolomic analysis reveals biomarkers in blood plasma from *ras* H2 mice

島村 安俊

要旨

がんとは正常な生体機能を異常な内分泌で妨げ、多数の臓器を機能不全に至らしめる疾病である。正常細胞が変化したがん細胞では遺伝子変異による無秩序な細胞増殖が起こり、転移や浸潤によって周囲の組織に定着する性質を持っている。進行度と共に生存率が大きく下がるがんでは早期発見が非常に重要であり、早期発見にむけた手法の 1 つにバイオマーカーを用いた探索法がある。体液中の代謝物濃度の相関からがんの選別や病勢、再発診断などを行うバイオマーカーであるが、微小環境に大きく左右されるがんではヒト体液中の代謝物を用いたバイオマーカー探索や発がんメカニズムの解明は困難であった。

近年、がん研究の場では高い発がん感受性を持つモデル生物が用いられるようになり、中でもがん遺伝子を人工的に操作したモデル生物を使用した発がん性評価試験が主流になっている。内因性プロモーター/エンハンサーを持つヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入している *ras*H2 マウスは通常 2 年かかる発がん性評価試験を 26 週間で行うことが可能であり、またヒトの発がん物質に適正に反応することから短期間でバイオマーカーの探索や発がんメカニズムの考察が可能となっている。

本研究では 90 匹に及ぶ *ras*H2 マウス及び nonTg マウスを対象とした 26 週間短期発がん性評価試験から得られた血漿を対象に時系列解析を進めた。本研究の目的はバイオマーカー探索、及び腫瘍の進行と代謝物の時系列変化の関係性について解析を進めた。バイオマーカー探索では Glutathione と Laurate が候補として挙がり、腫瘍の進行と代謝物の関係性では ARG 活性やがん悪質駅による Cori Cycle 活性の亢進が推察された。

Keywords : 1. メタボロミクス / 2. *ras*H2 マウス / 3. がん / 4. 時系列解析 / 5. CE-TOFMS

1. 序論

1.1 がん

がんとは正常な生体機能を異常な内分泌で妨げ、多数の臓器を機能不全に至らしめる疾病である。腫瘍の中でも一般的には悪性腫瘍を指し、また悪性新生物と称されることもある。World Cancer Report 2008によると2008年のがん罹患患者数は約1270万人にのぼり、がんによる死亡者数は約760万人であった (Ferlay *et al.*, 2010) (表1)。

表1 各大陸の罹患患者数と死亡者数 (2008)

Continent	Populations (1000's)	Cancer cases		Cancer deaths	
		Total	%	Total	%
World	6,750,062	12,662,554	100 %	7,564,802	100 %
Africa	987,092	715,571	6 %	541,779	7 %
Asia	4,075,309	6,092,359	48 %	4,072,332	54 %
Europe	731,568	3,208,882	25 %	1,715,240	23 %
Latin America and Caribbean	576,102	906,008	7 %	542,051	7 %
Northern America	345,053	1,603,870	13 %	638,328	8 %

がん罹患患者数、死亡者数共に最も多い腫瘍は肺がんであり、罹患患者では全腫瘍の13%、またがんによる死亡者の18%は肺がんが死因であることが明らかになった。罹患患者数では肺がんが続いて、乳がん、結直腸がんが多く、死亡者数では肺がん、胃がん、肝臓がんが多いことが分かっている。2010年のがんによる死亡者数は約880万人にのぼり、2008年と比べて約120万人の増加していることが分かった。がんは年々増加傾向にあり、2030年には死亡者数が1140万人、罹患患者数が2220万人にまで増加すると予測されている。進行度と広がりによって生存率が低下するがんは初期のStage Iでは生存率が約90%近いのに対して、末期がんであるStage IVだと生存率は約10%まで低下する。またがんは転移や浸潤によって周囲の組織に定着する性質をもっており、複数の組織でがんが同時に進行しているケースも少なくない。そうしたことから早期発見は重要視されており、手法としてCTやPET、MRI、バイオマーカー診断などが挙げられる。

1.2 本研究の目的

本研究は*ras*H2マウス、およびnonTgマウスの血漿中代謝物を用いた時系列解析によるバイオマーカー探索を目的とした。対象動物である*ras*H2マウスはヒトプロト型c-Ha-*ras*遺伝子を導入したマウスであり、近年よく使用されるがん遺伝子を人工的に操作したモデル生物の一つである。90匹に及ぶ*ras*H2マウス、nonTgマウスには26週短期発がん性評価試験を行い、試験期間中2週毎の計14回採血していることから、大規模な代謝物データを得ることが可能となった。試験した90匹のマウスは腫瘍発症個体や腫瘍未発症個体など様々であり、また発症した腫瘍もマウスによって多様であった。本研究では肺がん特異的なバイオマーカー探索と腫瘍の進行と代謝物の時系列変化の関係性について解析を進めた。

2. *ras* H2 mouse

2.1 *ras* gene

がん遺伝子には、シグナル伝達を起こすがん原遺伝子と称される遺伝子が存在している。通常はシグナル伝達によって細胞分裂を行っているが、活性化したがん原遺伝子は異常な細胞増殖などを引き起こす。がん原遺伝子である*ras*遺伝子はラット肉腫ウイルス(Ras sarcoma)のがん遺伝子として単離されたことから、Ras sarcomaに基づき*ras*と命名された。はじめにHarveyおよびKirsten株のがん遺伝子としてv-Ha-*ras*、v-Ki-*ras*が同定され、正常細胞のゲノムの中にも*ras*遺伝子が存在することが明らかとなった (Chang *et al.*, 1982)。ヒト腫瘍組織において*ras*遺伝子の変異は多く確認されており、ヒト

のがんの約 30%に *ras* 遺伝子の変異があると報告されている (Bos, 1989).

2. 2 *rasH2* mouse

ras 遺伝子を人工的に導入したモデル生物は 1980 年代より数多く報告されるようになり、近年では動物実験の現場に多く使用されている。*ras* 遺伝子導入モデル生物の開発は、正常型および活性型の *c-Ha-ras* 遺伝子を全身に発現する Tg マウスの開発に向けた試験から始まった。前述の通り Gly が Val に変化するコドン 12, もしくは Gln が Leu に変化するコドン 61 に変異を持つ *c-Ha-ras* 遺伝子において、それ自身のプロモーター領域を含んだゲノム DNA を導入したマウスは胎性致死となり、目的とする次世代への遺伝子伝達が可能なマウスの開発はできなかった。次の試験で Exon に変異の無い 6.8kb の野生型 *c-Ha-ras* 遺伝子をマウスに導入すると生存可能な Tg マウスが生まれ、8 匹中 5 匹は生後 1 週間以内に死亡したが、3 匹のマウスは生存していた。生存した 3 匹のマウスである *rasH2*, *rasH7*, *rasH8* はその後も成長し、次世代に導入遺伝子を伝達可能なモデルマウスであることが分かった (Katsuki *et al.*, 1989)。 *rasH2* では 18 ヶ月以内に約半数のマウスに自然発症腫瘍が生じており、また発がん性物質の投与によって短期間に発がんすることから発がん感受性の高さが確認された。50mg/kg の N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 投与によって前胃乳頭腫が 12 週間以内に 100% の頻度で発生し、皮膚乳頭腫は 16% に発生した。MNU 投与によって発生した前胃腫瘍では *c-Ha-ras* 遺伝子のコドン 12 あるいは 61 における変異が認められたが、内因性の *ras* 遺伝子に変異は見られなかった (Ando *et al.*, 1992)。

CB6F1-Tg-*rasH2* マウスとは実験動物中央研究所 (Central Institute for Experimental Animals : CIEA) によって開発された内因性プロモーター/エンハンサーを持つヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子の 3 コピーがタンデムに導入されたマウスである (Machida *et al.*, 2008)。導入遺伝子はヒト悪性黒色腫およびヒト膀胱がんから得られた 2 つの *c-Ha-ras* 遺伝子のそれぞれにおける点変異箇所を切り離して再結合されたプロト型であり、遺伝子の 3 コピーは 15 番染色体に挿入されているため安定的な状態を保っている。

動物実験の対象として *rasH2* マウスは 26 週短期発がん性評価試験が認められており、通常 2 年かかる試験期間と比べて非常に短くなっている。これは *rasH2* マウスにおける最大の特徴であるとも考えられ、高い発がん感受性の性質から可能となっている。また *rasH2* マウスは発がん性評価の再現性と安定性の高さが日本や米欧の 50 施設以上で証明されている。

3. 対象と手法

3. 1 対象生物

本研究の対象生物は CIEA によって開発された *rasH2* マウス、および *rasH2* マウスと同腹の nonTg マウスである。両マウスにおいて被験物質である MNU を 37.5 mg/kg 腹腔内単回投与したマウス群と、溶媒対照としてクエン酸緩衝液 (pH4.5) を 37.5 mg/kg 腹腔内単回投与したマウス群を用意した。それぞれの群におけるマウス数は溶媒を投与したコントロール *rasH2* マウス (n=10), MNU 投与 *rasH2* マウス (n=50), 溶媒投与 nonTg マウス (n=10), MNU 投与 nonTg マウス (n=20) である。これら 90 匹のマウスを用いた 26 週間短期発がん性評価試験を実施し、試験期間中 2 週毎に血漿を採取した。試験中に瀕死状態のマウスを発見した場合は全採血による安楽死処分を施し、試験期間である 26 週間生存していたマウスも試験終了後に全採血による安楽死処分を施した。試験中に瀕死状態となったマウス及び安楽死処分を施したマウスは安楽死処分直後に剖検し、全身の諸臓器で腫瘍の有無を確認した。

様々な動物実験で使用されている発がん性物質である MNU は生体内投与で DNA に点変異を起こし、O⁶-methylguanine を発生させる。O⁶-methylguanine の発生は C-to-T 変異や G-to-A 変異を誘い、修復酵素 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase タンパク質の活性低下により腫瘍の活性化を誘導する (Budán *et al.*, 2009)。MNU は半減期が 15 分であることや数日で体外へ排出されることから、動物実験において生物への直接的な影響はないと考えられている (Morton *et al.*, 2008)。

3. 2 データ解析

CE-TOFMS によって測定された血漿データは IAB の杉本昌弘氏によって開発された MasterHands を用いて解析を行った (Sugimoto *et al.*, 2010a). このソフトウェアでは各ピークに対して質量電荷比 (m/z) と代謝物の泳動時間 (MT), 積分値が算出され, m/z と MT から指標成分による Annotation を行い, 積分値からサンプル中の Conc や補正值である Rel Area が得られる. 各ピークの定量は IS によって CE の注入量と MS の感度を補正しており, IS を Cation では Methionine sulfone と 3-Aminopyrrolidine とし, Anion では MES と CSA として全てのピーク面積の補正を行った.

3. 3 統計解析

統計解析としては Mann-Whitney's u-test やロジスティック回帰分析などを行った. 2 群間において特異的であると推察される代謝物を特定するために, 正規分布に従わないデータに対して固体の統計的な有意差を計算する Mann-Whitney's u-test を行った. さらにがんマウスと健常マウスの比較解析から単一腫瘍診断モデル作成を目的としてロジスティック回帰分析を行った (Sugimoto *et al.*, 2010b).

4. 結果と考察

4. 1 肺がんバイオマーカー探索

26 週短期発がん性評価試験の剖検結果, 肺がんのみ確認された MNU 投与 nonTg マウス ($n=6$), 腫瘍未発症 MNU 投与 nonTg マウス ($n=6$) が見つかった. これら 2 つのマウス群における 7 週齢から 31 週齢までの代謝物データを用いて肺がん特異的なバイオマーカー探索を進めた. 23 週齢目, 27 週齢目, 31 週齢目を用いた. Mann-Whitney's u-test の結果, 27 週齢目で Glutathione と Laurate において有意差が見られた (図 1).

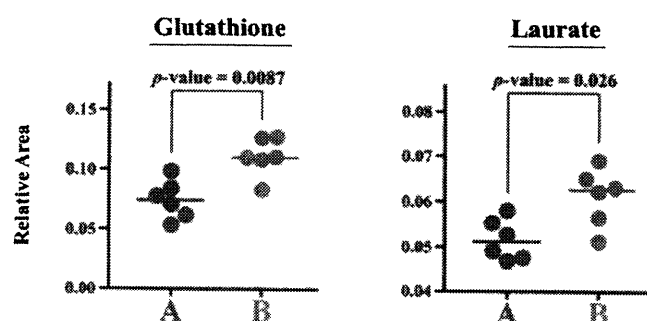


図 1 Glutathione と Laurate のプロット図

縦軸は代謝物の Rel Area を示しており, プロットの数はいずれのマウス個体を示している. また A は肺がんのみ確認された MNU 投与 nonTg マウス群を示しており, B は腫瘍未発症 MNU 投与 nonTg マウス群を示している.

Glutathione とは陽イオン性の抗酸化物質であり, グルタチオン抱合を行うことで毒物や薬物を細胞外へ排出させ, 細胞の解毒を行う生理機能を有している. 本研究においても p -value = 0.0087 と有意差の見られた Glutathione は肺がんのみ確認された MNU 投与 nonTg マウス群で濃度が低下しており, 抗酸化作用が弱まることで発がんやがんの進行に関わったのではないかと推察された. また Glutathione は肺にとって不可欠な保護抗酸化物質であるとの報告もあり, 肺における Glutathione の欠乏は多臓器と比べてがんの成長を促す可能性が高いと考えられた (Rahman, 1999). p -value = 0.026 であった Laurate も抗酸化作用を有する陰イオン性代謝物である. 体内では Monolaurin という物質に変換され, ウイルスの脂質外膜に作用することで動物の免疫系を様々なウイルスやバクテリアから保護し, 感染や増殖を抑える抗菌, 抗ウイルス作用を持つ. Laurate においても腫瘍未発症 MNU 投与 nonTg マウス群と比べて, 肺がんのみ確認された MNU 投与 nonTg マウス群で濃度が低下していることから, 抗酸化作用を持つ代謝物の欠如が肺がんに関わっていると推察できた. Laurate は肺がん患者の血清, 及び肺がん組織の両方で有意差が確認されたという報告もあり, 腫瘍組織でも有意差の見られる代謝物である (Hori *et al.*, 2011). 次に Glutathione と Laurate を用いてロジスティック回帰分析を行った結果を以下に示す (表 2).

表2 ロジスティック回帰分析結果

	R_U^2	p -value
AUC _{Training}	1.00	< 0.001
AUC _{Cross Validation}	0.94 ± 0.08	< 0.001

ロジスティック回帰分析から得られた AUC_{Training} = 1.00 という結果は、解析で用いた肺がんのみ確認された MNU 投与 nonTg マウス (n=6) と腫瘍未発症 MNU 投与 nonTg マウス (n=6) のサンプル数が少ないためだと考えられた。交差検定では AUC_{Cross Validation} = 0.94 ± 0.08 という結果であり、高確率で肺がん発症の有無を判別できるモデルであることが示された。しかし Glutathione, Laurate 共に全週齢で有意差の見られる代謝物ではなく、それ以外の代謝物においても連続して有意差の見られるものが無かった。このことから肺がんによって単調増加や単調減少する代謝物は無く、また階層的クラスタリングの結果から代謝物は多様な変動をしていることが推察された。4'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene を投与したマウスにおいて Glutathione は腫瘍発症後の約 6 週間は濃度が下がり、その後 Glutathione は濃度が上昇する、そして末期がんで再び下がるといった挙動を示すことが知られている。代謝物はがんの発症など様々な要因によって濃度の変化や代謝物挙動の乱れが引き起こされるため、時系列解析によるバイオマーカー探索ではがん発症時期を揃えた解析が有用ではないかと考えられる。がん発症時期が確認された状態で時系列解析を行うことが可能となれば、発症前後で大きく変化する代謝物の探索や、特異的な代謝物挙動の発見などが期待される。

4. 2 腫瘍の進行と代謝物の時系列変化

26 週短期発がん性評価試験中、MNU 投与 *rasH2* マウスは過半数の 56 % (28/50) が試験終了前に死亡した。早期死亡マウス群は全ての個体で複数の腫瘍が確認されているが、健常状態から死亡直前の末期がん状態までの生命現象を代謝物で追うことが可能である。本解析では 21 週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群 (n=4) と 29 週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群 (n=4) を対象とし、代謝物の変化を追った。

本解析では 7 週齢で正規化した代謝物の時系列変化グラフを KEGG パスウェイ上に載せることで、パスウェイ上での代謝物変動に着目した (Kono *et al.*, 2009) (図 2)。

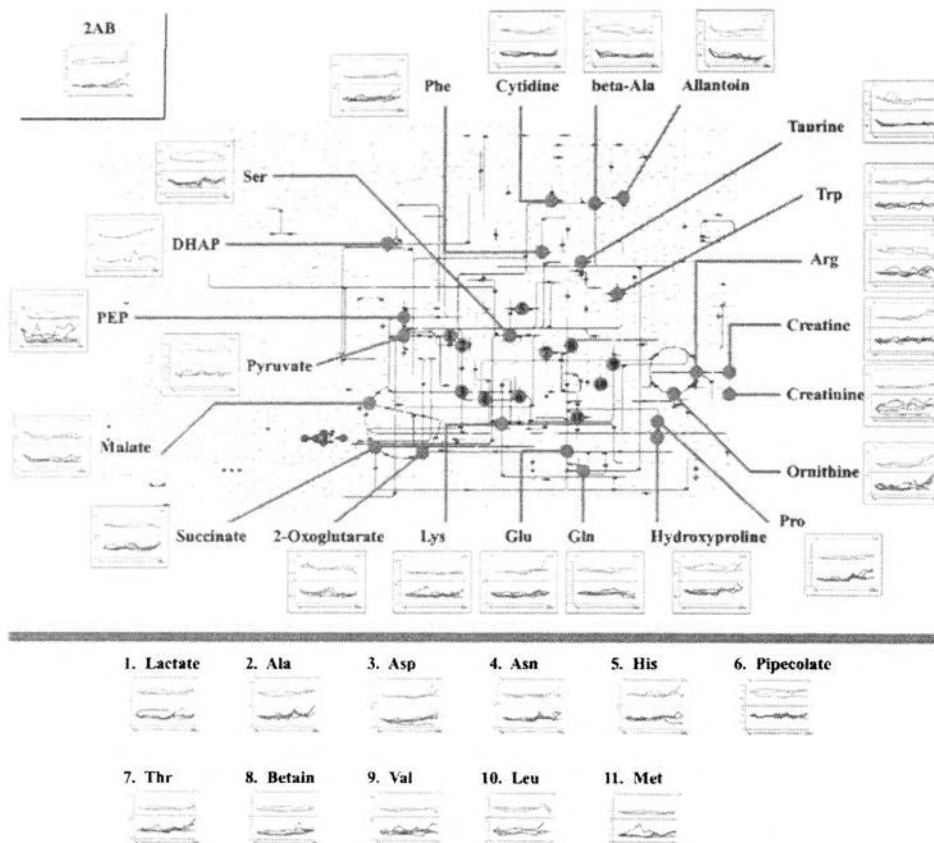


図3 KEGG パスウェイ上に図示した7週齢正規化グラフ

7週齢で正規化した代謝物濃度の時系列変化グラフを代謝マップ上に図示した。グラフの上部で21週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群を赤色で示しており、下部では29週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群を青色で示している。

正規化による時系列変化グラフから Ala, Asn, Asp, Lactate, Ornithine, Phe, 2AB が21週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群と29週齢死亡 MNU 投与 *rasH2* マウス群の両群で末期がんにおける濃度上昇が確認され、Arg は両群で濃度減少が確認された。濃度上昇が確認された Asn はがん細胞の増殖にかかわる代謝物であり、Asn が上昇していることから両群のマウス内のがん細胞も増殖したのではないかと考えられる。また解析から Lactate は末期がんで増加が認められており、がん悪液質による Cori Cycle 活性の亢進が関係していると推察された。進行がんや末期がんで生じるがん悪液質とはがん細胞から分泌される物質による代謝異常状態や免疫異常状態を指し、がん死因の約 20% を占めるとされている (Tisdale, 1997)。また進行した胃がんの 80% 以上で生じることが分かっており、この解析で用いた全マウスで胃がんが発症していることからがん悪液質が生じている可能性が考えられる。大量の Glucose を消費するがん細胞では解糖系で代謝することで Pyruvate を生成し、酵素 LDH を介して Lactate を生成する。Lactate では末期がんでの増加が見られたのに対して、Pyruvate では特異的な時系列変化が見られなかった。末期がんで濃度が上昇した Ornithine は、濃度が減少した Arg と酵素 ARG を介して隣接している代謝物である。ARG は多くのがんで活性化するため、腫瘍進行の指標として用いられている酵素である (Hirayama *et al.*, 2009)。解析で使用したマウス両群において Arg 濃度が徐々に減少しているのに対して、Ornithine の濃度が上昇していることから ARG 活性が起こっていると推察できる (図3)。



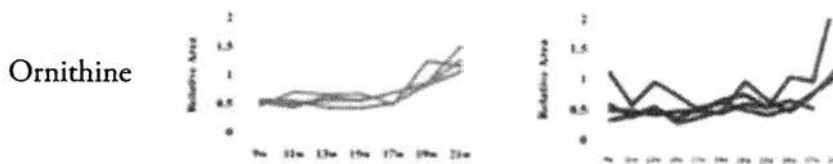


図4 Arg と Ornithine の濃度変化

縦軸は Rel Area を示しており、横軸は週齢を示している。また赤線グラフは21 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス (n=4) 示しており、青線グラフは29 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス (n=4) を示している。

21 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群は全ての個体で Arg の減少と Ornithine の上昇が確認できるのに対して、29 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群では異なる個体が存在した。しかしながら、興味深いことに21 週齢死亡群でも29 週齢死亡群でも Arg が減少を始めるポイントが近似しており (Died in 21w : 17w, Died in 29w : 21w), また Ornithine が上昇を始めるポイントも近似していた (Died in 21w : 17w, Died in 29w : 23w)。29 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群で Arg の減少が見られた21 週齢目は Asn や Thr といったアミノ酸7つで特徴的な変化を起こしていた (図4)。

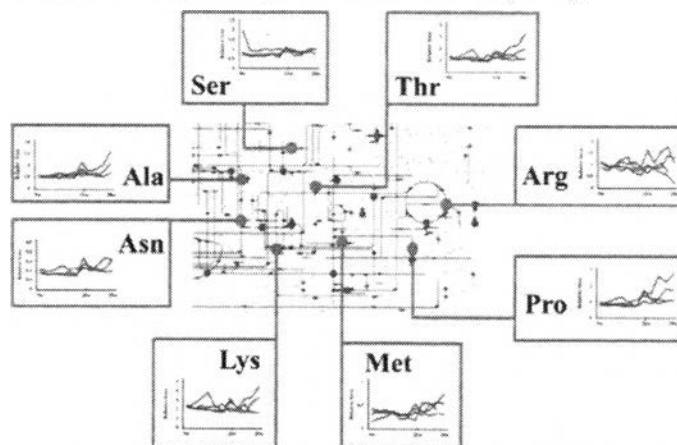


図4 21 週齢目で特徴的な変化を起こした7代謝物と Arg

29 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス (n=4) の時系列線グラフである。縦軸は Rel Area, 横軸は週齢を示している。

これら7代謝物では21 週齢目で濃度が上昇するという挙動が確認された。中でも Pro や Thr, 酵素 Aspartate 4-decarboxylase を介して隣接している Ala や Asn では23 週齢目で一度濃度が下がった後、いくつかのマウスでは再び濃度が上昇していた。必須アミノ酸が末期がんで濃度上昇の原因としては、Autophagy によるタンパク質分解による生産が考えられる。しかし、この解析では十分なデータが足りなかったため、踏み込んだ考察はできなかった。また21 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群で Arg の減少が見られた17 週齢目では特徴的な変化を起こした代謝物は見つからなかった。しかしながら29 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群では12 回採血しているのに対して、21 週齢死亡 MNU 投与 rasH2 マウス群は早期死亡のため8 回のみ採血だったことが起因している可能性があると考えられた。

謝辞

本研究は実験動物中央研究所の浦野浩司氏, 堤秀樹氏, 伊藤守氏, 野村達治氏との共同研究である。90匹にも及ぶマウスの短期発がん性評価試験を行っていただいたことに感謝申し上げます。CE-TOFMS で測定をしてくださった大沼啓美氏, 金子未来氏, 平山明由氏に感謝の意を表したい。最後にこのような素晴らしい研究環境と機会を提供してくださった富田勝教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Ando, K., Saitoh, A., Hino, O., Takahashi, R., Kimura, M. and Katsuki, M. (1992) Chemically induced forestomach papillomas in transgenic mice carry mutant human c-Ha-ras transgenes. *Cancer Research*, **52**, 978-982.
- Bos, J. (1989) ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer research*, **49**, 4682.

- Budán, F., Varjas, T., Nowrasteh, G., Prantner, I., Varga, Z., Ember, A., Cseh, J., Gombos, K., Pázsit, E. and Gobel, G. *et al.* (2009) Early Modification of c-myc, Ha-ras and p53 Expressions by Chemical Carcinogens (DMBA, MNU). *In Vivo*, **23**, 591-598.
- Chang, E., Gonda, M., Ellis, R., Scolnick, E. and Lowy, D. (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 4848-4852.
- Ferlay, J., Shin, R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, **127**, 2893-917.
- Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., *et al.* (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*, **69**, 4918-4925.
- Katsuki, M., Kimura, M., Yokoyama, M., Sato, M., Kimura, S., Hata, J., Sekiya, T., Izawa, M. and Nishimura, S. (1986) Teratocarcinoma derived from mouse zygotes after the introduction of activated human c-Ha-ras DNA., *Princess Takamatsu Symposium*, **17**, 269-276.
- Hori, S., Nishiumi, S., Kobayashi, K., Shinohara, M., Hatakeyama, Y., Kotani, Y., Hatano, N., Maniwa, Y., Nishio, W. and Bamba, T., *et al.*, (2011) A metabolomic approach to detect early stages of lung cancers. *Lung Cancer*, **74**, 284-92.
- Kono, N., Arakawa, K., Ogawa, R., Kido, N., Oshita, K., Ikegami, K., Tamaki, S. and Tomita, M. (2009) Pathway projector : web-based zoomable pathway browser using KEGG atlas and Google Maps API. *PLoS One*, **4**, e7710.
- Machida, K., Urano, K., Yoshimura, M., Tsutsumi, H., Nomura, T., and Usui, T., (2008) Carcinogenic comparative study on rasH2 mice produced by two breeding facilities. *The Journal of Toxicological Sciences*, **33**, 493-501.
- Morton, D., Bailey ,K., Stout, C., Weaver, R., White, K., Lorenzen, M. and Ball, D. (2008) N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU); A positive control chemical for p53+/- mouse carcinogenicity studies. *Toxicologic Pathology*, **36**, 926-931.
- Rahman, I. (1999) Inflammation and the regulation of glutathione level in lung epithelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, **1**, 425-447.
- Sugimoto, M., Hirayama, A., Robert, M., Abe, S., Soga, T. and Tomita, M. (2010a) Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction, and isotopic pattern information in CE-TOF-MS data. *Electrophoresis*, **31**, 2311-2318.
- Sugimoto, M., Wong, D., Hirayama, A., Soga, T. and Tomita, M. (2010b) Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*, **6**, 78-95.
- Tisdale, M. (1997) Biology of cachexia. *Journal of the National Cancer Institute*, **89**, 1763-73.