

Title	胃癌患者の血液中代謝物質のメタボローム解析
Sub Title	
Author	真鍋, 瑞那(Manabe, Mizuna) 富田, 勝(Hori, Shigeki)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2010-02
Jtitle	研究会優秀論文
JaLC DOI	
Abstract	癌の診断に有用な血中腫瘍マーカーは,癌の選別や予後の予測,経過評価,特に再発診断,化学療法など,治療効果の評価への可能性に期待が寄せられている.しかし胃癌をはじめとする多くの癌は組織型が混在しているために,癌種ごとに特異的で感度の高い腫瘍マーカーは殆ど同定されていない.現在タンパク質レベルでの測定可能な胃癌血中マーカーとしてCEA, CA19-9などがあるが,感度・特異度が低く,早期診断に用いるには不十分である.そこで本研究では胃癌の早期診断マーカーの発見に向けて,感度が高く胃癌に特異的な腫瘍マーカーを探索することを目的として,血中代謝物質の解析を行った.キャピラリー電気泳動-飛行時間型-質量分析計(CE-TOFMS)を用いて,健常者群(n=11)と術前(n=17)・術後(n=12)の胃癌患者群血清中のイオン性代謝物質を比較解析し,その変動を調べた-その結果代謝物質由来のピークを286検出することができ,健常者群と術前胃癌患者群間において25個,術前胃癌患者群と術後胃癌患者群間で24個の物質に有意な差(P<0.05;Student t-test)が認められた.これらの物質のうち,特に有意性の高いものとしてX3(P=5.81×10 ⁻⁴)とX1(P=8.58×10 ⁻⁹)があった.この2物質は健常者群と術前胃癌患者群それぞれの血中で逆の変動を示していた,これを術後胃癌患者群の血中代謝プロファイルとも比較した結果,この2物質の血中でのレベルは健常者群のそれとほぼ同等となっていたことが分かった.以上のことからX3とX1を媒介する酵素PNPと胃癌の発症との関連が示唆された。
Notes	先端生命科学プロジェクト2009年度春学期
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0630

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.

研究会優秀論文

胃

癌患者の血液中代謝物質の メタボローム解析

2009年度 春学期

SPRING

真鍋 瑞那 環境情報学部 2年

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

研究会優秀論文推薦のことば

真鍋君は、鶴岡市立荘内病院との共同研究で、初期胃がん患者の血液をメタボローム解析したところ、様々な代謝物質が胃がん患者特有に血中に増加していることを見出しました。このことは血中の代謝物質の量が、胃がんの「診断マーカー」として実用化できる可能性があります。初期の胃がんは自覚症状がないことから、血液で簡便に早期発見できることは極めて重要ですので、本研究の更なる発展に期待します。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

胃癌患者の血液中代謝物質のメタボローム解析

真鍋瑞那

要旨

癌の診断に有用な血中腫瘍マーカーは、癌の選別や予後の予測、経過評価、特に再発診断、化学療法など、治療効果の評価への可能性に期待が寄せられている。しかし胃癌をはじめとする多くの癌は組織型が混在しているために、癌種ごとに特異的で感度の高い腫瘍マーカーは殆ど同定されていない。現在タンパク質レベルでの測定可能な胃癌血中マーカーとして CEA, CA19-9 などがあるが、感度・特異度が低く、早期診断に用いるには不十分である。そこで本研究では胃癌の早期診断マーカーの発見に向けて、感度が高く胃癌に特異的な腫瘍マーカーを探索することを目的として、血中代謝物質の解析を行った。キャピラリー電気泳動・飛行時間型・質量分析計(CE-TOFMS)を用いて、健常者群($n = 11$)と術前($n = 17$)・術後($n = 12$)の胃癌患者群血清中のイオン性代謝物質を比較解析し、その変動を調べた。その結果代謝物質由来のピークを 286 検出することができ、健常者群と術前胃癌患者群間において 25 個、術前胃癌患者群と術後胃癌患者群間で 24 個の物質に有意な差($P < 0.05$; Student t-test)が認められた。これらの物質のうち、特に有意性の高いものとして X3($P = 5.81 \times 10^{-4}$)と X1($P = 8.58 \times 10^{-9}$)があった。この 2 物質は健常者群と術前胃癌患者群それぞれの血中で逆の変動を示していた。これを術後胃癌患者群の血中代謝プロファイルとも比較した結果、この 2 物質の血中でのレベルは健常者群のそれとほぼ同等となっていたことが分かった。以上のことから X3 と X1 を媒介する酵素 PNP と胃癌の発症との関連が示唆された。

Keywords : 胃癌, 腫瘍マーカー, PNP, X3

1.序論

1.1.研究背景と目的

近年、年間 30 万人近くの人が癌で死亡している。この数は全死亡者数の 3 分の 1 に相当し、3 人に 1 人は癌が原因で死亡していることを示している。中でも胃癌は日本で最も罹患率が高く、癌死亡率は男性で肺癌に次いで 2 位、女性では 1 位となっている。胃癌の術後 5 年後生存率はステージ I で 91.8%，ステージ II で 72.8%，ステージ III で 46.2%，ステージ IV で 3.0%であり、早期胃癌で治療を行った場合と進行癌に入ってから治療を行った場合ではその後の生存率に大きな開きがあることが分かる。この統計より胃癌は早期発見・治療が非常に重要であるといえる。しかし胃癌は初期段階でほとんど自覚症状が認められないことや、胃癌特有の症状がないことから早期発見が非常に困難であるのが現状である。そこで本研究では、胃癌の早期発見に利用可能な腫瘍マーカーを探索することを目的とする。腫瘍マーカーは多くが癌細胞でつくられ、一部が血液や尿中に出てくるため一般的に血液、尿および癌組織を対象にして行われる。特に血液や尿を採取するだけで調べることが可能であるため、腫瘍マーカーの検査は日常的に行うことができるという面で優れている。現在胃癌の診断に利用されている腫瘍マーカーには CEA（癌胎児性抗原）と CA19-9（組織ポリペプチド抗原）がある。しかしどちらも臓器特異性が低いことから早期癌をスクリーニングすることは現時点では困難である。以上のことから、臓器特異性が高く胃癌に特有な血中腫瘍マーカーを探索することを目的として解析を行った。

1.2.胃癌の病理

胃壁は胃の内側から粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下層、漿膜層となっている。胃癌は粘膜に発生し、時間が経過するに従い粘膜下層、筋層、漿膜下層、漿膜層へと進行する。粘膜下層までのものを早期胃癌、筋層より深くなったものを進行胃癌と呼ぶ。早期胃癌は大きく 3 つの型に分類されている。I 型は隆起型、II 型は表面型、III 型は陥凹型である。II 型はさらに、II a 型、II b 型、II c 型に分けられる。早期癌では癌の型に関係なく転移は少なく、癌細胞は胃にとどまっているか、あるいは癌の近くのリンパ節までしか転移していないことが多い。しかし癌が進行するに従い、リンパ行性転移や血行性転移、腹膜転移などにより全身に癌の転移が発生し完治が困難となる。

2.対象と手法

2.1.研究対象

健常者群(n=11)と術前(n=17)・術後 1 週間(n=12)胃癌患者群の血清データを荘内病院から収集した。術前・術後胃癌患者のうち、11 人は同一患者であった。CE-TOFMS によるイオン性代謝物質の測定実験は、慶応義塾大学先端生命科学研究所の研究員である平山明由氏が担当した。その際サンプル調整は以下の方法で行われた。健常者群と胃癌患者群の臨床情報は以下の表にまとめた (表 1)。

表 1 胃癌患者と健常者の臨床情報

	術前胃癌患者 (n=17)	術後胃癌患者 (n=12)	健常者 (n=11)
年齢	67.13±11.00	64.91±9.34	36.18±9.37
性別 (%)			
男性	41	58	18
女性	47	42	82
不明	12		
ステージ(%)			
I A	82	92	
II	6	8	
不明	12		

2.2.サンプルの前処理 (陽イオン代謝物質)

Methionine sulfone を 10 μ L 含んだ MeOH450 μ L に血清 50 μ L を加え、攪拌した。その後さらに CHCl₃500 μ L と Milli-Q 水を 200 μ L 加え攪拌した。次に 4℃で 5 分間、5,000rpm で遠心分離し、水層を濾過した。再び 4℃で 2 時間、10,000rpm で遠心分離して乾燥させ、最後に 100 μ M の 3-Aminopyrrolidine を含んだ Milli-Q 水を 12.5 μ L 加えて CE-TOFMS で測定した。

2.3.解析手法

健常者(n=11)と術前(n=17)・術後(n=12)胃癌患者の計 40 個のデータを対象に解析を行った。なお比較方法として最初に、健常者と術前胃癌患者の 2 群間で顕著な差がみられている物質を探索した。その後、術前・術後胃癌患者の 2 群間で同様の方法で比較解析を行った。

メタボローム解析は Master Hands を用いて行った。このソフトウェアでは、試料中のイオン性代謝物質のピークの大きさを異なるサンプル間で比較することが可能である。しかし検出されたピークの中には CE-TOFMS では分離が不十分なために定量値に信頼性のない中性物質や、塩やスパイクなどの不要なピークも含まれているため、以下の閾値をもうけてこれらのノイズを除去した。

(1)Intensity (ピークの強度) が 1000 以下のピークを削除した。

(2)Rel Area (内部標準で補正したピーク面積) が 0.005 以下のピークを削除した。

(3)Rel MT (補正後の移動時間) が 7.3~7.5, 21.7~22.4(min.)のピークを削除した。

なおイオン性代謝物質名の推定は、質量電荷比(m/z)と測定ごとの揺らぎを補正した移動時間(mt)が標準物質と一致したものについてのみ行った。

3. 結果

3.1.術前胃癌患者と健常者の比較解析結果

本研究では腫瘍マーカーを探索することを目的としたため、術前・術後胃癌患者と健常者それぞれ 6 割以上の人数においてみられる代謝物質を対象に解析を行った。その結果物質由来のピークが 286 個検出され、そのうち術前胃癌患者と健常者の 2 群間で特に有意な差がみられた代謝物質のピークは計 25 個であった。このうち質量電荷比(m/z)と移動時間(mt)が標準物質と一致した代謝物質を以下の表にまとめた (表 2)。

表 2 術前胃癌患者と健常者で有意な差がみられた陽イオン代謝物質

m/z	mt(min.)	代謝物質名	P 値
137.04	13.68	X1	8.58×10^{-9}
284.10	14.99	X2	1.92×10^{-4}
269.08	20.38	X3	5.81×10^{-4}
175.10	12.17	X4	1.27×10^{-3}
133.06	11.04	X5	1.43×10^{-3}
90.05	9.91	X6	1.84×10^{-1}

3.2.術前胃癌患者と術後胃癌患者の比較解析結果

術前胃癌患者と術後胃癌患者の 2 群間で比較解析した結果、物質由来のピークは 286 個あり、特に有意な差がみられた代謝物質のピークは計 24 個であった。このうち質量電荷比 (m/z) と移動時間(mt)が標準物質と一致した物質を以下の表にまとめた (表 3)。

表 3 術前胃癌患者と術後胃癌患者で有意な差がみられた陽イオン代謝物質

m/z	mt(min.)	代謝物質名	P 値
130.08	12.98	X7	3.49×10^{-3}
118.06	10.88	X8	2.19×10^{-2}
90.05	9.91	X6	3.25×10^{-2}

4.議論

4.1. X1 と X3

術前胃癌患者と健常者で有意な差がみられた代謝物質のうち X1 と X3 は pathway 上で酵素 purine-nucleoside phosphorylase(PNP)(E.C. 2.4.2.1)を介して隣接した箇所に位置する。これよりこの 2 物質の周辺代謝物質の変動を追った (図 1)。X3 と X1 及びこの 2 物質を媒介する酵素 PNP については以下のような報告がされている。胃癌患者の腫瘍性粘膜組織では X3 の割合が通常の粘膜組織と比較して増加する(Nakano *et al.*, 1985)。また胃癌と特定されていないが、一般に癌患者において X1 および xanthine の血中での割合が健常者と比較して増加するという報告がある(Lorenzi *et al.*, 1987)。さらに血中での PNP 活性は健常者よりも癌患者で高いという結果が出ている(Roberts *et al.*, 2004)。X3 については、健常者よりも胃癌患者で血中濃度が高かったことから先行研究の内容と一致するが、X1 は術前・術後に関わらず胃癌患者での血中濃度が有意に低く、先行研究とは逆の結果となった。しかし血中の代謝物質は様々な臓器の影響を受けるので、特定の代謝経路における代謝物質の変動が胃癌の影響によるものであると断定することは難しいと思われる。

既に上で述べたが、図 1 で示したグラフより X3 と X2 は術前胃癌患者において血中濃度が健常者と比較して非常に高いことが分かる。またこれらの物質は術後の血中濃度が健常者のそれとほぼ近い値になっていることが分かる。一方 X1 は術前胃癌患者において健常者と比較したとき血中濃度が有意に低い。しかし外科治療後は、X3 や X2 と同様に健常者の血中濃度に近い値になっていることが分かる。

以上のことから PNP は胃癌患者において、X1 から X3 の方向に活性化していると考えられる。ただしこれは胃癌患者の血液中に含まれている代謝物質を解析した結果であるため、胃癌の腫瘍性粘膜組織では逆反応が起きている可能性がある。一般に腫瘍マーカーは多くが癌細胞でつくられ、その一部が血中に出てくる。胃癌患者の血中で X1 が減少しているのは、癌細胞が増殖する際に多量の X1 を必要とするためであるという予測ができる。逆に

X3 や X2 は癌細胞で消費されないために血中に多く出ているという考察ができる。

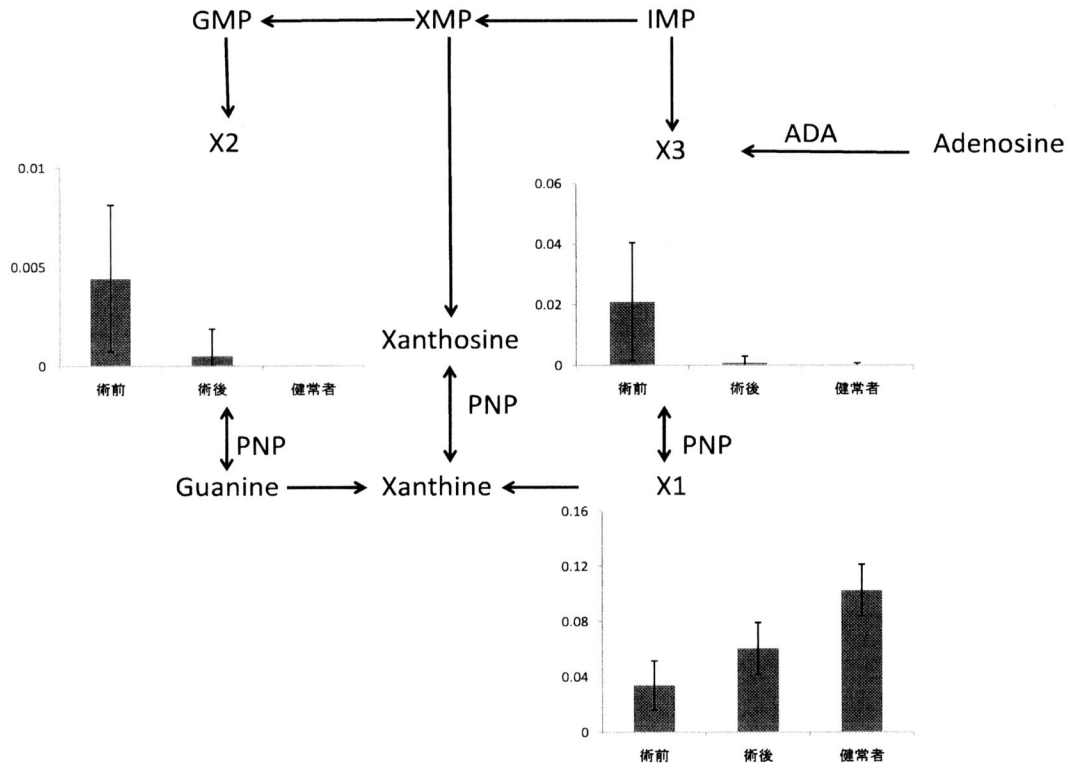


図 1 術前・術後胃癌患者と健常者の血清中に含まれる代謝物質の変動
縦軸は平均 Rel Area 値

4.2. 胃癌患者における Arginine の血中濃度の増加

術前胃癌患者と健常者で有意な差がみられた陽イオン代謝物質とその物質の周辺代謝物質の変動を追った (図 2). これより arginine から ornithine への経路や ornithine から citruline への経路, X8 と arginine 間の経路で, 術前胃癌患者と健常者に含まれるそれぞれの代謝物質濃度が逆転していることが分かる. arginine は乳癌や結腸癌を含む多くの癌患者で血中濃度が低くなっているという報告がある (Visser *et al.*, 2005). しかしこれとは逆に, arginine を含む多くのアミノ酸は胃癌及び結腸癌の患者の腫瘍組織で増加しているという結果も報告されている (Hirayama *et al.*, 2009). arginine は酵素 arginase (ARG) (E.C. 3.5.3.1) によって urea と ornithine をつくり, また酵素 nitric oxide synthase (NOS) (E.C. 1.14.13.39) によって nitric oxide (NO) と citruline をつくることで知られている. ARG は結腸癌や乳癌, 肺癌, 前立腺癌の患者で活性化がみられるため, 特に乳癌や結腸癌では病気の進行の指標として用いられる可能性も報告されている. ARG が活性化する原因としては,

腫瘍が成長するのに不可欠な polyamine の高い需要を維持するためと考えられている (Viola and Bronte, 2007). しかし今回の解析結果では arginine の血中濃度は健常者と比較して術前胃癌患者で増加がみられた. これより ARG あるいは NOS が胃癌患者で不活性化している可能性が考えられる. また, 酵素 glycine amidinotransferase (AGAT) (E.C. 2.1.4.1) を介して arginine と隣接した位置にある X8 は健常者よりも術前胃癌患者で減少していることが分かる. これより胃癌患者では AGAT が X8 から arginine の方向に活性化しており, その結果 arginine の血中濃度が高くなった可能性もある.

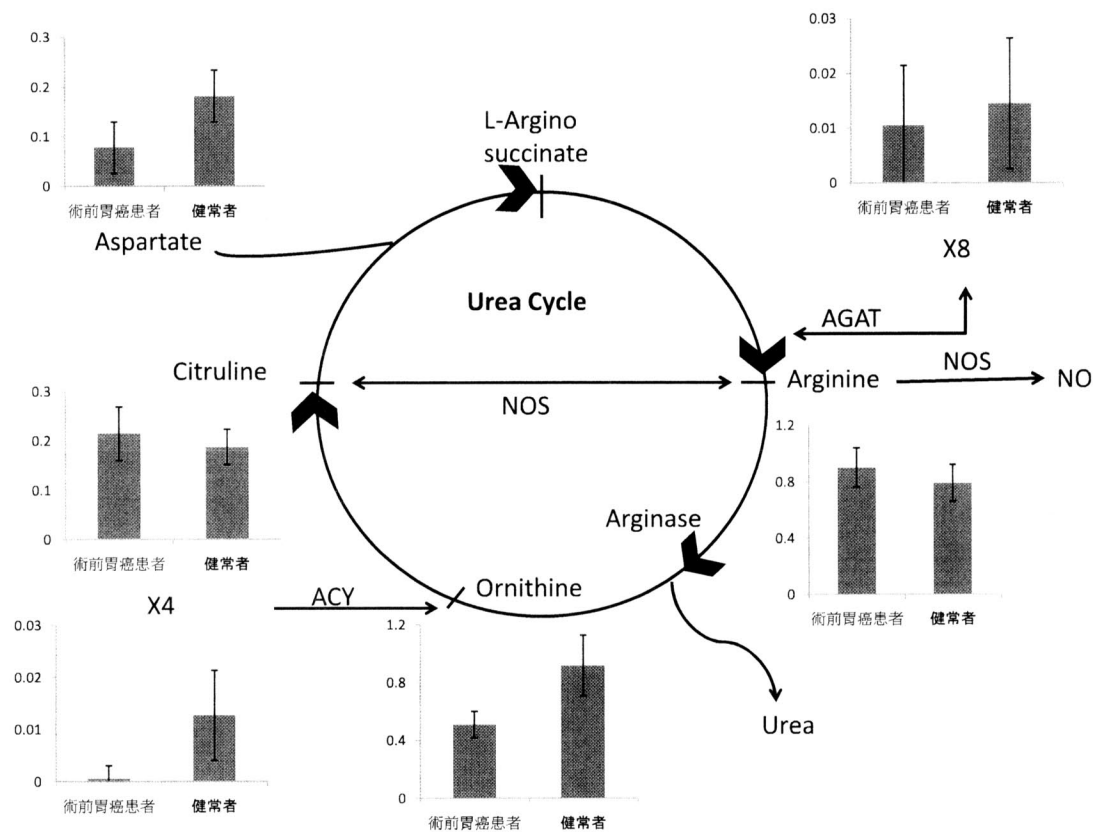


図 2 術前胃癌患者と健常者の血清中に含まれる代謝物質の変動
縦軸は平均 Rel Area 値

5.結論と今後の展望

今回の解析結果では術前・術後胃癌患者と健常者の血清中に含まれる X3 と X1 の代謝物質の変動から、酵素 PNP と胃癌の発癌の関連が示唆された。また、多くの癌では arginine の血中濃度が低いという先行研究とは逆の結果ではあったが、胃癌患者では arginine の血中濃度が高いという結果が出た。よって arginine 及びこの周辺代謝物質を測定することで、胃癌に特異的な腫瘍マーカーが発見される可能性がある。胃癌患者の血中に含まれる X1 及び arginine の減少は先行研究と逆を示す結果となった。これについては様々な要因が考えられる。まず胃癌患者と健常者の臨床情報についてだが、この 2 群間ではサンプルの平均年齢に 30 歳前後の差がみられる。血中に含まれる代謝物質の濃度は年齢によって異なるため、代謝物質の逆の変動はこの年齢差によるものである可能性がある。またサンプル数が限られていたため、今回扱ったサンプルに限り偶然代謝物質の変動が逆になったという予測もできる。

今回は術前・術後胃癌患者と健常者の陽イオン代謝物質についてのみ解析を行ったので今後は陰イオン代謝物質及びヌクレオチド代謝物質についても解析を行っていきたい。これによって今回測定できていないと思われた、他の関連代謝物質が測定されている可能性が期待される。また X1 や arginine が先行研究と逆の結果を示した原因については、陰イオン代謝物質やヌクレオチド代謝物質の測定結果と合わせて、より広い範囲で代謝プロファイルを調べることで、その原因を調べていきたいと考えている。しかし胃癌患者の血中で arginine が増加しているという内容の論文(Hirayama *et al.*, 2009)も報告されているので、この論文と本研究で扱った代謝データとの比較を今後行う。

謝辞

本研究を進めるにあたり、アドバイザーである杉本昌弘氏には多くの的確な助言やご指導をしていただきました。またメタボロームの測定実験を行って頂いた慶應義塾大学先端生命科学研究所研究員の平山明由氏、メタボロームグループのメンバーの方々には大変お世話になりました。この場を借りてお礼を申し上げます。最後に、このような素晴らしい研究環境と研究を行う機会を与えて下さった富田勝教授に深く感謝致します。

参考文献

- [1]Visser, Y., Dejong, C., Luiking, Y., Fearon, K., Meyenfeldt, M., and Deutz, N. (2005) Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency?, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**: 1142-6.
- [2]Viola, A. and Bronte, V. (2007) Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses, *Seminars in Systems Biology*, **17**: 309-316.

- [3]Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, and H., Soga, T.. (2009) Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Cancer Research*, **69**: 4918-25.
- [4]Roberts, E., Newton, R. and Axford, A. (2004) Plasma purine nucleoside phosphorylase in cancer patients, *Clinica Chmica Acta*, **344**: 109-114.
- [5]Nakano, K., Shindo, K., Yasaka, T. and Yamamoto, H. (1985) Reversed-phase liquid chromatographic investigation of nucleoside and bases in mucosa and modified nucleosides in urines from patients with gastrointestinal cancer, *J Chromatogr*, **332**: 127-37.
- [6]Lorenzi, M., Vannoni, D., Leoncini, R., Caldarone, R. and Marinello, E. (1987) The determination of urinary oxypurines as marker of gastrointestinal tumors, *Tumori*, **73**: 289-94.
- [7]Maehara, Y., Sakaguchi, Y., Kusumoto, T., Kusumoto, H. and Sugimachi, K. (1989) Species differences in substrate specificity of pyrimidine nucleoside phosphorylase, *Journal of Surgical Oncology*, **42**: 184-6.

胃癌患者の血液中代謝物質のメタボローム解析

2010年2月15日 初版発行

著者 真鍋瑞那

監修 富田勝

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

SFC-SWP 2009-S-002

■ 本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。