慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	rasH2マウスの発がん過程メタボローム解析
Sub Title	
Author	飛田, 匠太(Hida, Shota)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014
Jtitle	生命と情報 No.21 (2014.) ,p.174- 182
JaLC DOI	
Abstract	がんは正常細胞が遺伝子変異を起こすことにより発症し, 無秩序な増殖を続けながら浸潤や転移を繰り返す疾患である。進行すると多臓器不全や感染症により死に至るため, 早期発見が重要である。そのため, 近年, 血液や唾液を測定することでがんの早期発見を目指した研究が進んでいる。より早期に診断を行うためにはがんの進行に伴う血中代謝物の時系列変化を明らかにすることが重要であるため, 本研究では, がんのモデルマウスを用いてヒトでは行うことが難しい発がん過程の血中代謝物の時系列変化の解明と新規がんバイオマーカー探索を目的として行った。 本研究で用いたrasH2マウスは, ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであり, MNU投与後13週間以内に90%以上ががんを発症するがんのモデルマウスである。健康な状態から末期がん状態までを26週間で観察することが出来るため, 発がん過程の観察や新規バイオマーカー探索に適している。rasH2マウス(n=60)とnonTgマウス(n=20)を用いて26週間短期発がん性評価試験を行い経時的に血漿を採取した。7週齢から33週齢の26週間のうち7, 9, 13, 15, 17, 19, 25, 33週齢の血漿(n=431)から代謝物を抽出し, CE-TOFMSにより測定を行った。 血漿中代謝物を測定した結果, nonTgマウスとrasH2マウスの血漿中代謝物プロファイルが異なることが分かった。nonTgマウスと比較してrasH2マウスの血漿中代謝物は, がん細胞と正常細胞を比較した先行研究と同様に有意なpyruvateの減少とlactateの増加がみられたことから, rasH2マウスは発がん物質への感受性が上がるだけではなく, がん細胞に近い代謝状態であることが推測された。また, rasH2マウスでは発がん状態に伴い血漿中代謝プロファイルが変化していた。特にcholineやアミノ酸6種は, 溶媒投与rasH2マウス群と比較して早期死亡群で有意に減少し, それらを用いてROC曲線を算出した結果, AUC値が0.9以上であったことから, これら7物質を計測することで発がん状況を診断出来る可能性が示唆された。
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 2014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=KO92001004-00000021-0174

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.

2014年度　卒業論文ダイジェスト

rasH2マウスの発がん過程メタボローム解析

環境情報学部4年

飛田 匠太

要旨

がんは正常細胞が遺伝子変異を起こすことにより発症し，無秩序な増殖を続けながら浸潤や転移を繰り返す疾患である．進行すると多臓器不全や感染症により死に至るため，早期発見が重要である．そのため，近年，血液や唾液を測定することでがんの早期発見を目指した研究が進んでいる．より早期に診断を行うためにはがんの進行に伴う血中代謝物の時系列変化を明らかにすることが重要であるため，本研究では，がんのモデルマウスを用いてヒトでは行うことが難しい発がん過程の血中代謝物の時系列変化の解明と新規がんバイオマーカー探索を目的として行った．

本研究で用いたrasH2マウスは，ヒトプロト型*c-Ha-ras*遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであり，MNU投与後13週間以内に90％以上ががんを発症するがんのモデルマウスである．健康な状態から末期がん状態までを26週間で観察することが出来るため，発がん過程の観察や新規バイオマーカー探索に適している．rasH2マウス (n=60)とnon Tgマウス (n=20)を用いて26週間短期発がん性評価試験を行い経時的に血漿を採取した．7週齢から33週齢の26週間のうち7，9，13，15，17，19，25，33週齢の血漿 (n=431)から代謝物を抽出し，CE-TOFMSにより測定を行った．

血漿中代謝物を測定した結果，non TgマウスとrasH2マウスの血漿中代謝物プロファイルが異なることが分かった．non Tgマウスと比較してrasH2マウスの血漿中代謝物は，がん細胞と正常細胞を比較した先行研究と同様に有意なpyruvateの減少とlactateの増加がみられたことから，rasH2マウスは発がん物質への感受性が上がるだけではなく，がん細胞に近い代謝状態であることが推測された．また，rasH2マウスでは発がん状態に伴い血漿中代謝プロファイルが変化していた．特にcholineやアミノ酸6種は，溶媒投与rasH2マウス群と比較して早期死亡群で有意に減少し，それらを用いてROC曲線を算出した結果，AUC値が0.9以上であったことから，これら7物質を計測することで発がん状況を診断出来る可能性が示唆された．

Keywords : rasH2 マウス，がん，CE-TOF/MS，メタボローム

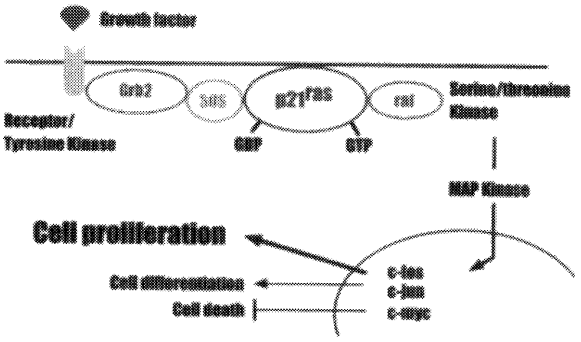
1 序論

がんとはがん細胞が正常な生体秩序を外れて無秩序に増殖することにより，正常な生体機能を妨げる疾患のことである．がん細胞は正常細胞が遺伝子変異を起こすことにより発生する．周辺正常組織への浸潤，血管やリンパ流を通じて転移をすることにより進行し，多臓器不全や悪液質による感染症を引き起こすことによりヒトを死に至らしめる．現在，世界の死因の第3位を占めるのががんであり，日本においては死因の第1位で死亡者数のおよそ1/3ががんによるものである(厚生労働省,2013; Thun *et al.*,2010)．国際がん研究機関(International agency for research on cancer ; IARC)が発表したWORLD CANCER REPORT 2008によると，2008年にがんと診断された人は1270人，死亡者は760人，患者の総数は2500人と推計されており，2030年にはがんと診断される人は2200万人，がん患者の総数は7500万人にまで倍増する(Bray *et al.*, 2012; Popat *et al.*, 2013)．今後も患者数の増加が予測されるがんに対して，早期発見・早期治療の実現が重要であり，胃がんや大腸がん，乳がん，肺がんといった多くのがんで早期発見・早期治療による予後改善や死亡率の低下が報告されている(Patru *et al.*, 2013; Rebecca *et al.*, 2012)．

今日，がんの早期診断を目的として画像診断や内視鏡検査が行われているが，これらの手法は身体的・精神的負担が大きいため，より身体的・精神的負担を軽減した新たながん早期診断法が求められている．その手法の一つにバイオマーカー診断がある．バイオマーカーとは生体の体液中に含まれる物質であり，生体内の生物学的変化を定量的に把握する指標となる物質のことである．近年，がんの早期診断指標となり得る代謝物がいくつか報告されており，実用化も進んでいる．2011年に味の素(株)が開発した血清中アミノ酸の濃度バランスから肺がん，胃がん，大腸がん，乳がん，前立腺がんのリスクを診断するアミノインデックスの臨床応用が開始された(Miyagi *et al.*, 2011)．また，大腸がん患者を対象とした血清メタボローム解析からバイオマーカー候補として2-hydroxybutyrate, aspartic acid, kynurenine, cystamineが見つかっている(Nishiumi *et al.*, 2012)．一方で，がんの進行により代謝物がどのように変化するのかは未だ明らかになっておらず，より早期に変動する代謝物を明らかにすることで，新たなバイオマーカー候補の発見やがんの進行のメカニズム解明に寄与すると期待できる．そこで，本研究では，ヒトでは研究が困難である発がん過程における代謝物の時系列変化の解明とバイオマーカー探索を目的とし，背景遺伝子の高い均質性や発がん形質の再現性，安定した発がん感受性といった特徴をもつrasH2(CB6F1-Tg rasH2)マウス(n=60)とnon Tg(CB6F1-non transgenic)マウス(n=20)の血漿の測定・解析を行った結果について報告する．

2 対象と方法

2.1 CB6F1-Tg rasH2マウス



rasH2マウスは，1989年に実験動物中央研究所(central institute for experimental animals ; CIEA)により開発されたトランスジェニックマウスであり，ヒト悪性黒色腫・ヒト膀胱がんから得られたヒトプロト型がん遺伝子*c-Ha-ras*が導入されている(Yamamoto *et al.*, 1996)．がん遺伝子を導入したことで発がん感受性が高まり，従来，75週間を要した長期発がん性評価試験から試験期間を短縮した26週間短期発がん性評価試験を行うことができる．*ras*遺伝子は，ラットの肉腫(rat sarcoma）から発見されたためrasと名付けられた．Rasタンパクは分子量約21 kDa のGタンパクで多くの生物種に保存されており，ホメオスタシスや細胞増殖，分化，アポトーシスを制御し，GTP(guanosine triphosphate)結合型の活性型とGDP(guanosine diphosphate)結合型の不活型によりシグナル伝達が調節されている(Castellano and Downward, 2011)(図1)．GDP結合型からグアニンヌクレオチド交換因子(guanine-nucleotide exchange factors ; GEF)によりGDPとGTPの交換反応が行われ，活性型になり下流へシグナル伝達を行う．その後，GTPase活性タンパク質(GTPase-activating protein ; GAP)の作用で不活性型のGDP結合型に戻る(Malumbres and Barbacid, 2012)．Rasタンパクのコドン12，13に変異が起きた結果，過剰な活性により下流のRas/Raf/MEK(mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular-signal-regulated kinase)経路等を通じてがん化を促進させる

2.2 MNU

水溶性アルキル化剤であるMNUは，生体内においてDNA(deoxyribonucleic acid)に点変異を引き起こす．短期発がん性評価試験の標準陽性対照物質であるため本研究の被験物質として使用した．MNUをrasH2マウスに投与した場合，18週

以内に多数のがんを発症することが確認されており，腫瘍発生部位と腫瘍発症マウスの割合は，投与後13週で前胃(90%)，胸腺(76.7%)，皮膚(40%)であった(Adachi *et al.*, 2002; Takaoka *et al.*, 2003)．MNUを被験物質として用いる利点として，マウスに投与した際に高頻度に腫瘍が発症すること，MNU自体の毒性により死亡することが少ないこと，数日で体外に排出されることがあげられ，動物試験において広く使用されている(Jaafar *et al.*, 2009)．

2.3 動物試験

オスのrasH2マウス(n=60)と*c-Ha-ras*遺伝子を導入していないオスのnon Tgマウス(n=20)を用い，rasH2マウスとnon Tgマウスをそれぞれ2群に分け，被験物質であるMNU 37.5 mg/kg，溶媒対照物質としてクエン酸緩衝液(pH 4.5) 37.5 mg/kg を生後7週齢目に各群に単回腹腔内投与した(表1)．

表1. rasH2マウスとnon Tg* マウスの内訳

マウス群	N
溶媒投与rasH2マウス	10
MNU** 投与rasH2マウス	50
溶媒投与non Tgマウス	10
MNU投与non Tgマウス	10

*non Tg (non transgenic), * *MNU (N-methyl-N-nitrosourea)

試験を開始した7週齢から33週齢もしくは死亡するまで2週毎にプレーン毛細管を用いてイソフルラン軽麻酔下で眼底静脈叢から150 μL採血した．

本研究では，26週間短期発がん性評価試験を行い，7週齢から33週齢のうち7，9，13，15，17，19，25，週齢の血漿サンプルを解析に用いた．MNU投与rasH2マウスの生存時間解析の結果，28匹が試験期間中に死亡し，22匹が試験期間生存した(図2)．17週齢から死亡する個体が現れ，試験期間中に死亡したマウスは28匹，試験期間生存したマウスは22匹であった．動物試験は，共同研究者であるCIEAで行われた．

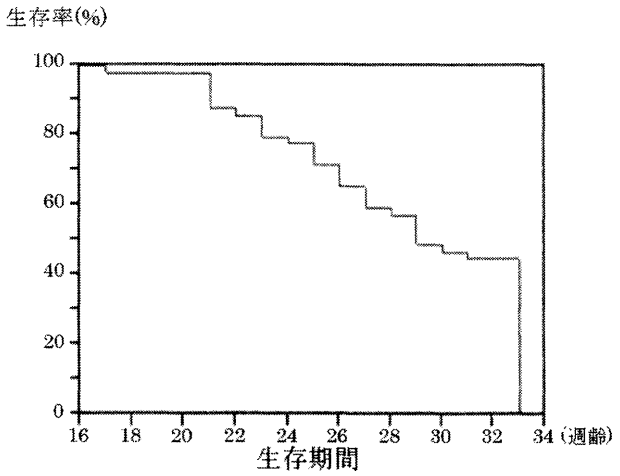


図2.MNU投与rasH2マウスの生存時間曲線

縦軸が生存率，横軸が生存期間を表す．

本研究では，試験期間中に死亡したマウスを早期死亡群(n=28)，試験期間を生存したマウスを試験期間生存群(n=22)と定義した．対象としたサンプルの詳細については表2にまとめた．すべてのマウスは試験終了時もしくは死亡時に剖検を実施し，腫瘍が確認されたマウス数とその腫瘍発症部位を表3に示した．

表2. 対象サンプル

マウス群	N	7週齢	9週齢	13週齢	15週齢	17週齢	19週齢	25週齢	33週齢
MNU投与rasH2マウス	50	•	•	•	•	•	•	•	•
溶媒投与rasH2マウス	10	•	•	•	•	•	•	•	•
MNU投与non Tgマウス	10	•					•		
溶媒投与non Tgマウス	10	•	•	•	•	•	•		

測定を行ったサンプルを•で示した.

表3. 腫瘍が確認されたマウス数

マウス群	前胃	皮膚	脾臓	肺	胸腺	肝臓
MNU投与rasH2マウス	50/50	37/50	29/50	26/50	19/50	8/50
溶媒投与rasH2マウス	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10
MNU投与non Tgマウス	4/10	0/10	0/10	7/10	0/10	0/10
溶媒投与non Tgマウス	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	1/10

腫瘍が確認されたマウス数 / マウス群の総数

2.4 分析方法

2.4.1 前処理

CIEAで採取されたマウスの血漿は冷凍保存したのち，慶應義塾大学先端生命科学研究所に送付し，測定まで-80°Cで冷凍保存した．血漿中代謝物を定量するために内部標準物質(internal standard ; IS)を抽出溶媒に添加し，前処理を行った．

まず，20 μMのIS1(methionine sulfone, MES(2-morpholinoethane sulfonic acid), CSA(10-camphorsulfonic acid))を含むMeOH溶液を作成し，2 mLエッペンドルフチューブに20 μM のIS1を含むMeOH 380 μL, 血漿 20 μL を加えた(血漿を20 μL採取が出来なかったサンプルでは 15 μL, 10 μL, 5 μLを加えた). 次に，エッペンドルフチューブを撹拌し， クロロホルム($CHCl_3$) 400 μLとMilli-Q 水120 μLを加え完全に白濁するまで再撹拌したのち，1000 g, 5 min, 4°Cの条件で遠心分離を行った．遠心分離後，チューブの上清を限外濾過チューブに250 μL移し，9100 g, 3.5 h, 4°Cの条件で遠心分離を行った．限外濾過チューブで濾過されたろ液を40°C, 1.5 hの条件で遠心減圧乾燥機にかけ，乾燥後200 μMのIS2(3-aminopyrrolidine, trimesate)を含むMilli-Q水40 μLを加えて溶解して測定サンプル用にAnion, Cationともにバイアルに8 μLずつ分注した．

2.4.2 CE-TOFMSによる測定とMasterHandsによる解析

前処理を行ったサンプルをキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometer ; CE-TOFMS)により測定した．測定は，慶應義塾大学先端生命科学研究所中西裕美子研究員の指導の下行った．CE-TOFMS によって測定したデータは，杉本昌弘氏が開発した解析ソフトウェアMasterHandsを用いて解析した(Sugimoto *et al.*, 2010). MasterHandsによりCE-TOFMSで計測したデータを積分し，計測ごとにずれる移動時間の補正，ピークのタグ付け(isotopeやringingピークの検出)，濃度計算，アノテーション(ピークの物質特定)を行い，サンプルのピークの面積を計算し，各ピークのm/z・その物質のMTを標準物質のものと比較し代謝物のアノテーションをつけた．サンプルにはあらかじめ濃度を調整したIS を加えてあるため，ISのピーク面積ですべてのピーク面積の補正を行った．Cation測定のISとしてmethionine sulfone : m/z = 182.0482, 3-aminopyrrolidine : m/z = 87.0921を用い，Anion測定のISとしてMES : m/z = 194.04973, CSA : m/z = 231.0703を用いた．アノテーションのついた物質の面積とあらかじめ濃度の分かっている標準物質中のピーク面積比から濃度を計算し，解析に用いた．

3 結果と考察

3.1 ras遺伝子導入が与える血漿中代謝物プロファイルへの影響

まず，ras遺伝子の導入により血漿中代謝物プロファイルにどのような変化が現れるかを明らかにするために，19週齢の溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non Tgマウスの血漿中代謝物のデータを用いてPCAを行った．その結果，溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non TgマウスでPC1成分の方向にPCAのスコアプロットが2分された(図3).

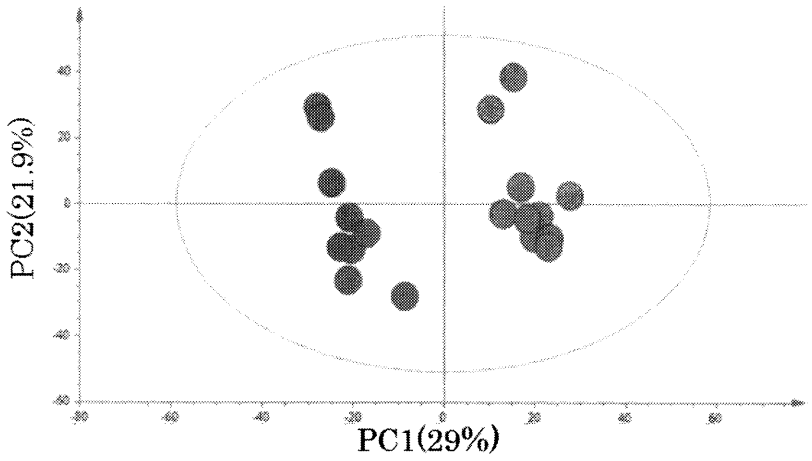


図3. 溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non TgマウスのPCA
横軸が第1主成分，縦軸が第2主成分を示す．緑が溶媒投与rasH2マウス，黄色が溶媒投与non Tgマウスを表す.

溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non Tgマウスの血漿中代謝物の違いを明らかにするため，Mann-Whitney U testを行った結果，32代謝物で有意差がみられた．その中から，解糖系関連代謝物であるpyruvete(P -value=0.00082)とlactate(P -value=0.0011)の代謝物濃度を示した(図4)．溶媒投与non Tgマウスと比較して，溶媒投与rasH2マウスではlactateの濃度が有意に高く，pyruvateは濃度が有意に低かった.

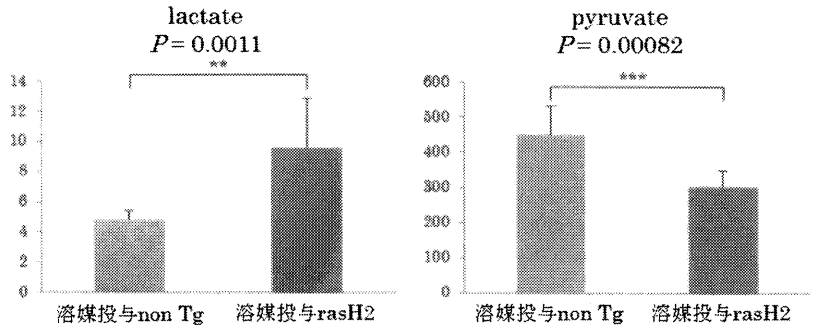


図4.溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non Tgマウスのlactateとpyruvate濃度
黄色が溶媒投与non Tgマウス，緑がrasH2マウスの血漿中濃度の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す． P -valueはMann-Whitney U testで算出し，$^{***}P$ <0.001，$^{**}P$ <0.01を示す.

3.2 MNU投与rasH2マウスの発がん状態と血漿中代謝物プロファイルの変化

発がん過程により血漿中代謝物プロファイルがどのように変化するかを明らかにするために，MNU投与rasH2マウスの時系列解析を行った．先行研究から，19週齢時には，発がんが起きていると考えられるため19週齢のMNU投与rasH2マウスと溶媒投与rasH2マウスでPCAを行った(図5)．溶媒投与rasH2マウス，MNU投与rasH2マウスの試験期間生存群，MNU投与rasH2マウスの早期死亡群の順にPCAのスコアプロットはPC1成分の方向に分離していた．腫瘍を発症していないと考えられる溶媒投与rasH2マウスから発がんが進行していると考えられる早期死亡マウスへとPCAのスコアプロット

が分離していたことから，発がん状況が進行するにしたがって血漿中代謝物プロファイルが変動していることが示唆された．

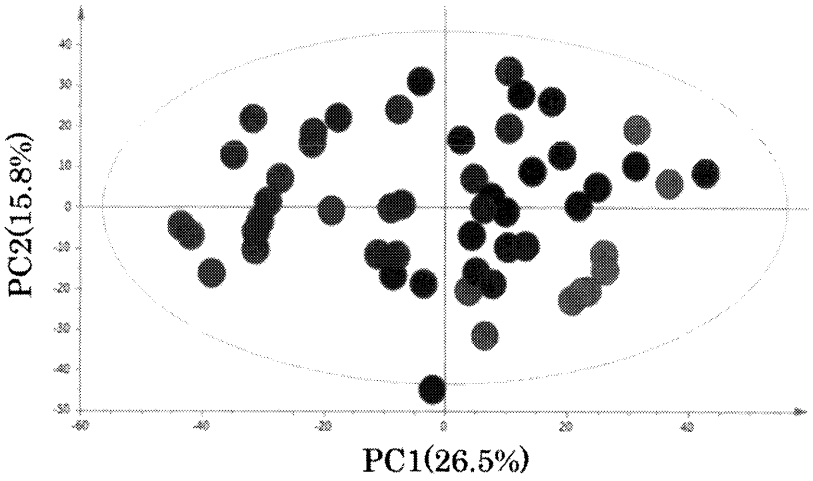


図5.MNU投与rasH2マウスと溶媒投与rasH2マウスのPCA

横軸が第1主成分，縦軸が第2主成分を示す．緑が溶媒投与rasH2マウス，青が試験期間生存群，赤が早期死亡群を表す．

次に，Steel-dwass testを行い試験期間生存群，早期死亡群，溶媒投与rasH2マウス群，溶媒投与nonTgマウス群のいずれかの2群間で有意差がみられた代謝物を用いて時系列グラフを記述し，19週齢から試験期間生存群と早期死亡群で差がみられる代謝物を探索した結果，7代謝物が見つかった．これらの代謝物は，Steel-dwass testでは試験期間生存群と早期死亡群では有意差がみられなかったが，Mann-Whitney U testでは6代謝物で試験期間生存群と早期死亡群において有意な差がみられた(図6)．

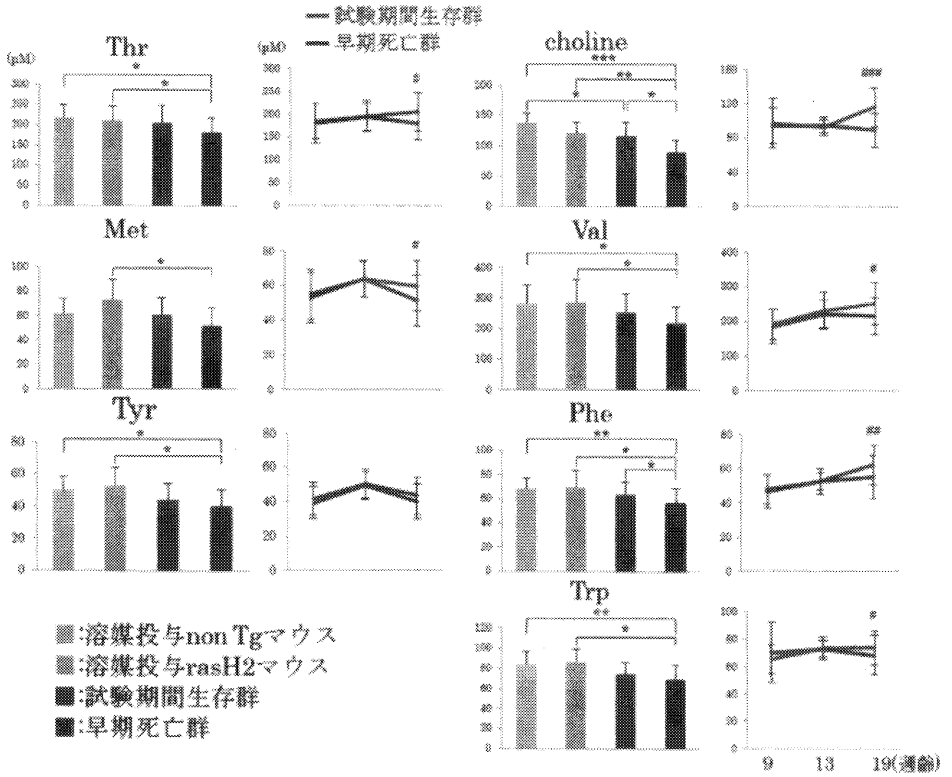


図6. 代謝物の19週齢時の血漿中濃度と9週齢から19週齢の時系列変化

棒グラフは，マウス群ごとの代謝物の平均濃度，エラーバーは標準偏差を表す．折れ線グラフは，試験期間生存群と早期死亡群の9週齢から19週齢の時系列変化，エラーバーは標準偏差を表す．アスタリスクは試験期間生存群，早期死亡

群，溶媒投与rasH2群，溶媒投与nonTgマウス群についてsteel-dwass testを行い，*P <0.05，**P <0.01，***P <0.001を示す．シャープは，19週齢の試験期間生存群と早期死亡群についてMann-Whitney U testを行い，#P <0.05，##P <0.01，###P <0.001を示す．

次に，これらの代謝物のマーカーとしての有用性を検証するためにロジスティック回帰分析を行い受診者操作曲線(receiver operating characteristic curve ; ROC曲線)を算出した(図7)．

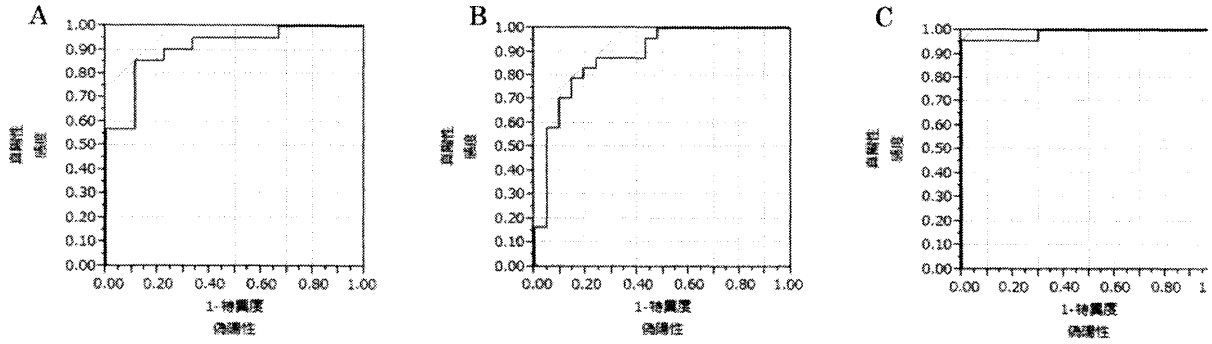


図7. 7代謝物を用いたROC曲線

縦軸が感度であり，横軸は1-特異度を表す．Aは早期死亡群と試験期間生存群，Bは早期死亡群と溶媒投与non Tg群，Cは試験期間生存群と溶媒投与rasH2マウスROC曲線を示す．AUC(area under the curve)値はそれぞれ0.91005，0.88291，0.98750であった．

ROC曲線のAUC値は，一般的に0.7以上が有用な検査とされ，今回の解析の結果は，いずれの組み合わせでもおよそ0.9以上(0.91005，0.88291，0.98750)であり，これらの7代謝物はバイオマーカー候補として有用であると推察された．

4. 議論

4.1 溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non Tgマウスのプロファイリング

19週齢の溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non TgマウスでPCAを行った結果，スコアプロットが2分する傾向がみられた．溶媒投与rasH2マウスでは33週齢の剖検時に腫瘍が確認されているが，腫瘍の直径が1mmと初期の病変であることから，19週齢時のスコアプロットの分離は腫瘍の形成による影響ではなく，*ras*遺伝子を導入したことにより細胞内代謝が変化した結果と考えられる． lactateは，がん細胞特有の代謝であるワールブルグ効果によって増加する代謝物である(Warburg *et al.*,1927)．ワールブルグ効果とは，正常細胞と比較してがん細胞が好気的条件下においても酸化的リン酸化反応よりも解糖系を亢進させてエネルギー産生をする代謝であり，実際に胃がんと大腸がん組織では正常細胞と比較して有意なlactateの増加とpyruvateの減少が報告されている(Hirayama *et al.*, 2009)．がん細胞におけるこの変動は，解糖系の亢進により乳酸脱水素酵素-A (lactate dehydrogenase A ; LDH-A)や乳酸脱水酸化酵素5 (lactate dehydrogenase 5 ; LDH 5) の発現が増加し，pyruvateからlactateへの代謝が増加するためであると考えられている (Kim *et al.*, 2014; Fantin *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2014)．ヒトのがん発症において重要な役割をもつがん抑制遺伝子のp53遺伝子を欠損させた*p53*ノックアウトマウスでも解糖系の亢進により血清中のlactate濃度が上昇するという報告がある(Zhang *et al.*, 2013)．また，がん抑制遺伝子PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10)を導入したトランスジェニックマウスでは発がんが起こりにくく，その理由として解糖系代謝を抑制しているためであるという報告もある(Garcia-Cao *et al.*,2013)．さらに*ras*遺伝子は，Raf/MEK/ERK経路を介して低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor-1α ; HIF-1α)を誘導し，HIF-1αは，ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ3遺伝子(pyruvate dehydrogenase kinase-3 ; PDK3)を介して解糖系を亢進させる (Lim, J.H. *et al.*,2004; Lu, C.W. *et al.*,2008)．以上のことから，rasH2マウスでは解糖系が亢進している可能性が示唆され，rasH2マウスの血漿中のlactateの増加とpyruvateの減少は細胞内代謝における解糖系の亢進の影響が血漿中に現れた結果と考えられる．また，解糖系の亢進がrasH2マウスにおいて発がん性が高くなる要因の一つではないかと考えられる．

4.2 MNU投与rasH2マウス

7代謝物のうち，Thr，Met，Val，Tyr，Phe，Trpは，血清中アミノ酸濃度を利用したがんのスクリーニング手法であるアミノインデックスにおいて胃がん患者で有意に減少する代謝物であり(Miyagi *et al.*, 2011)，本研究でも溶媒投与rasH2マウスと比較して早期死亡群で有意な減少がみられた．rasH2マウスでは，MNU投与後13週齢以内に90%以上のマウスが胃

がんを発症することから，これらアミノ酸の変化は胃がんの発がんに関連した血漿代謝物の変化であると推察される．また，cholineも19週齢で溶媒投与rasH2マウスと比較して早期死亡群で有意な減少がみられた．cholineは，必須栄養素のひとつでありacetylcholineの合成，膜合成，リン脂質によるシグナル伝達，メチル基の供給源として必要な物質として知られている(Awwad *et al.*,2012)．cholineは，様々ながん細胞内に高濃度に集積しているため，その性質を利用し放射線同位元素で標識したcholineをポジトロン断層撮影法(positron emission tomography ; PET)により検出するPET診断で使用されている(Glunde *et al.*, 2011; Pegard *et al.*, 2014)．また，cholineは健常者と比較して食道がん患者の血漿中で有意に減少するとの報告もある(Ayshamgul *et al.*,2010)．マウスの胃は，構造的にはヒトの食道に近いことからも，本研究でみられたcholineの減少は，がん細胞による取り込みにより血漿中で有意に減少したと考えられ，特に胃がんに関連した影響ではないかと推察される．

4.3 結論

溶媒投与rasH2マウスと溶媒投与non Tgマウスの血漿中代謝物を比較した結果，溶媒投与rasH2マウスでは有意なlactateの増加とpyruvateの減少といったがん細胞特有の代謝傾向がみられた．*p53*ノックアウトマウスや*PTEN*マウスを用いた研究から解糖系の代謝が発がん性に大きく関わることが明らかになっており，溶媒投与rasH2マウスでみられた解糖系の亢進は，発がん性を高める要因の1つとなっている可能性が本研究の結果からも示唆された．また，試験期間生存群，早期死亡群，溶媒投与rasH2マウスを用いてPCAを行った結果から，発がんが進行するにしたがって血漿中代謝物が変動する傾向がみられた．rasH2マウスの血漿中代謝物のプロファイルでは，ヒトを対象とした先行研究と同様の結果が得られたため，バイオマーカー探索対象としてrasH2マウスが有用な実験モデルであると考えられた．ROC曲線のAUC値から，血漿中のCholineと6種のアミノ酸を測定することでrasH2マウスの発がん状況を診断できる可能性が示唆された．

5 謝辞

本研究に取り組むにあたり動物実験を行って頂いたCIEAの皆様，アドバイザーとして指導をして頂いた中西裕美子研究員には測定から解析，学会発表に至るまで親身に指導して頂き大変お世話になりました．また，研究方針や解析についてアドバイスをして頂いた福田真嗣特任准教授にも深く感謝しております．常在菌グループ，メタボロームグループの皆様にもこの場を借りて感謝を申し上げます．そしてこのような研究に取り組める環境を提供してくださった冨田勝環境情報学部教授にこの場を借りて深く感謝を申し上げます．

6 参考文献

厚生労働省，平成24年人口動態統計月報年計．

Adachi, T. *et al.* (2002)Twenty-six week carcinogenicity study of ampicillin in CB6F1-TgrasH2 mice., *J Toxicol Sci.*,**27**,147-63.

Awwad, H.M. *et al.* (2012)The role of choline in prostate cancer., *Clin Biochem.*,**45**,1548-53.

Ayshamgul, H. *et al.* (2010)1H-MRS metabonomic analysis of plasma samples of esophageal cancer patients based on different pattern recognition., *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*,**32**,681-4.

Balendiran, G.K. *et al.* (2004)The role of glutathione in cancer.,*Cell Biochem Funct.*,**22**, 343-52.

Bray, F. *et al.* (2012)Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008—2030):a population-based study., *Lancet Oncol.*, **13**,790-801.

Castellano, E. and Downward, J. (2011)RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway., *Genes Cancer.*,**2**,261-74.

Cavuoto, P. and Fenech, MF. (2012)A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension.,*Cancer Treat Rev.*, **38**,726-36.

Fantin, VR. *et al.* (2006)Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance.,*Cancer Cell.*,**9**,425-34.

Garcia-Cao, I. *et al.* (2012)Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state., *Cell.*,**30**,49-62.

Glunde, K. *et al.* (2001)Choline metabolism in malignant transformation., *Nat Rev Cancer.*,**11**,835-48.

Graziosi, L. *et al.* (2013)Epigenetic modulation by methionine deficiency attenuates the potential for gastric cancer cell dissemination.,*J Gastrointest Surg.*,**17**,39-49.

Hirayama, A. *et al.* (2009)Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.,*Cancer Res.*,**69**,4918-25.

Ishimoto, T. *et.al.* (2011)CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth.,*Cancer Cell.*,**19**,387-400.

Jaafar, H. *et al.* (2009)The association between phenotype and size of breast tumors induced by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) injection in rats.,*Med Sci Monit.*,**15**,129-34.

James, M.D. *et al.* (2004)The Utility of Genetically Modified Mouse Assays for Identifying Human Carcinogens:A Basic Understanding and Path Forward.,*Toxicol Sci.*,**77**,188-94.

Jemal, A. *et al.* (2008)Cancer statistics, 2008.,*CA Cancer J Clin.*,**58**,71-96.

Kim, H.S. *et al.* (2014)High lactate dehydrogenase 5 expression correlates with high tumoral and stromal vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer.,*Pathobiology.*,**81**,78-85.

Lim, J.H. *et al.* (2004)Ras-dependent induction of HIF-1alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion.,*Oncogene.*,**23**,9427-31.

Lin, G. *et al.* (2014)Reduced Warburg effect in cancer cells undergoing autophagy: steady- state 1H-MRS and real-time hyperpolarized 13C-MRS studies.,*PLoS One.*,**25**, e92645.

Lu, C.W. *et al.* (2008)Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance., *J Biol Chem.*,**283**,28106-14.
Malumbres, M. and Barbacid, M. (2012)RAS oncogenes: the first 30 years.,*Nat Rev Cancer.*,**3**, 459-65.
Miyagi, Y. *et al.* (2011)Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection.,*PLoS One.*, **6**,e24143.
Nishiumi, S. *et al.* (2012)A Novel Serum Metabolomics-Based Diagnostic Approach for Colorectal Cancer.,*PLoS One.*,**7**,e40459.
Patru, C.L. *et al.* (2013)Current issues in gastric cancer epidemiology., *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.*,**117**,199-204.
Pegard, C. *et al.* (2014)Study of inter- and intra-observer reproducibility in the interpretation of [(18)F]choline PET/CT examinations in patients suffering from biochemically recurrent prostate cancer following curative treatment.,*EJNMMIRes.*,**30**,4-25.
Popat, K. *et al.*(2013)The global burden of cancer.,*Best Pract Res Clin Anaesthesiol.*, **27**,399-408.
Saeed, A.I. *et al.* (2003)TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.,*Biotechniques.*,**34**,374-8.
Takaoka, M. *et al.* (2003)Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F1-rasH2 transgenic mice.*Toxicol Pathol.*, **31**,191-9.
Thun, M.J. *et al.* (2010)The global burden of cancer: priorities for prevention.,*Carcinogenesis.*,**31**,100-10.
Warburg, O. *et al.* (1927)THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.,*J Gen Physiol.*,**8**,519-30.
Yamamoto, S. *et al.* (1996)Rapid induction of more malignant tumors by various genotoxic carcinogens in transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene than in control non-transgenic mice.,*Carcinogenesis.*,**17**,2455-61.
Zhang, C. *et al.* (2013)Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect.,*Nat Commun.*,**4**,29-35.