

[招待論文：総説・レビュー論文]

メタボローム(全代謝産物)測定法の 開発とがん検査への応用

Development of Metabolome Profiling Method and Application to Cancer Screening

曾我 朋義

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科教授

Tomoyoshi Soga

Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

Correspondence to: soga@sfc.keio.ac.jp

Abstract: ゲノム情報の最終産物であり、生体内に数千種類以上存在する代謝産物（メタボローム）の網羅的な解析は、生命科学の基礎研究のみならず、医薬、食糧、環境、エネルギーなど人類が直面している問題に有効な解決策をもたらすのではないかと期待されている。我々は、キャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）によるメタボローム解析技術を開発し、代謝産物の一斉分析を実現した。近年この方法論をさらに高感度化、高速化させ、様々な生命科学研究に応用している。ここでは、本法の技術開発およびがん検査への応用について概説したい。

Metabolites are final products of gene expression and thus the measurement of the level of all intracellular metabolites, metabolome, has expected to become a powerful tool not only for understanding fundamental research but also for providing solutions to problems facing humankind such as healthcare, food, global warming and power productions. We proposed a new metabolomic profiling method for the analysis of most of all charged metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). Recently we further developed high-sensitive and high-throughput CE-MS method. This article introduces the development of the technology and its application to rapid screening of patients with colorectal cancer.

Keywords: メタボロミクス、代謝産物、キャピラリー電気泳動、質量分析計、がん検査
metabolomics, metabolite, capillary electrophoresis, mass spectrometry, cancer screening

はじめに

2001年に設立された慶應義塾大学先端生命科学研究所では、細胞や生体内に存在する様々な分子の変化を網羅的に測定し、生命現象を司る生体分子の相互作用の全貌を解明することを目指すプロジェクトが始動した。このシステム生物学あるいはオミクス解析とも言われる新しい学問領域は、ゲノム解析、全遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析、全タンパク質 (プロテオーム) 解析データに加えて、全代謝産物 (メタボローム) データを取得し、ゲノムDNAの遺伝情報がどのように伝達されて生命現象に関与しているか包括的に理解しようとするものである。しかし、2001年当時、一部の代謝産物にターゲットを絞った分析法は存在していたが、メタボロームを網羅的に測定できる方法論は存在していなかった。筆者らは、世界に先駆けてキャピラリー電気泳動装置 (CE) と質量分析計 (MS) を組み合わせた CE-MS 法によるメタボローム測定技術を開発し、一度に数千種類の代謝産物の測定を実現した。近年、この分析法をさらに進化させた高感度化、ハイスループット化技術も開発した。本稿では、メタボローム測定技術の開発からがんのスクリーニング技術への応用について報告する。

1 メタボローム測定技術の開発

ゲノムや遺伝子発現解析の対象となる DNA や RNA は 4 種類の核酸塩基、プロテオーム解析の対象であるタンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成されている。これらに対して、メタボローム解析の対象は、物理化学的な性質が異なった数千種類の代謝産物であり、このことがメタボローム解析を極めて困難なものにしていた。最初にメタボローム解析に応用されたのはガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) であった。この方法は気化する物質しか測定できないため、半日以上かけて代謝産物を揮発性の物質に変換 (誘導体化) する必要があった。また、この誘導体化を行っても気化しない代謝産物も数多く存在し、それらは測定することができなかった。

そこで我々は、新規のメタボローム測定法の開発に取り組んだ。各代謝産物の構造をよく調べると、解糖系、クエン酸回路、アミノ酸代謝、核酸生合成などの中心代謝経路に存在する代謝産物のほとんどすべては、正か負に帯

電しているイオン性物質であることが判明した。そこで、イオン性物質に対して高い分離能を示すキャピラリー電気泳動 (CE) と高感度高選択検出器である質量分析装置 (MS) を組み合わせた CE-MS 法によるメタボローム測定技術を開発した¹⁾⁻³⁾ (図 1)。

CE-MS 法の測定の原理を以下に記す。細長い中空のチューブであるキャピラリーの一端に細胞や生体試料から抽出した代謝産物を導入後、キャピラリーの両端に数万ボルトの電圧を加えた。この印加電圧により、すべての陽イオン性代謝産物は陰極に、陰イオン性代謝産物は反対の陽極方向に移動する (図 2)。この代謝産物の移動速度は、各代謝産物の (電荷 / イオン半径) の値

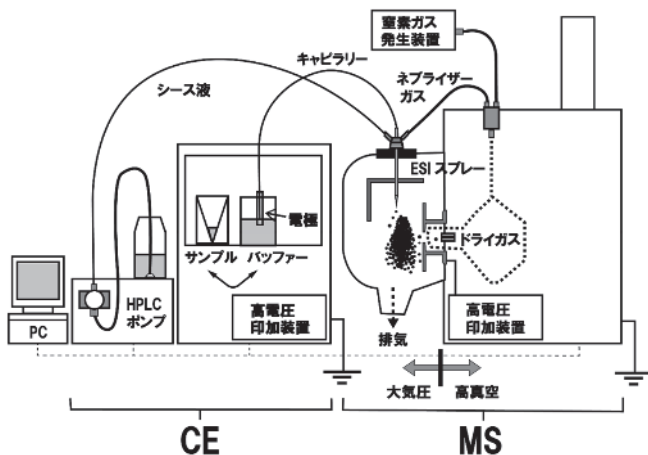


図 1 CE-MS システムの構成図

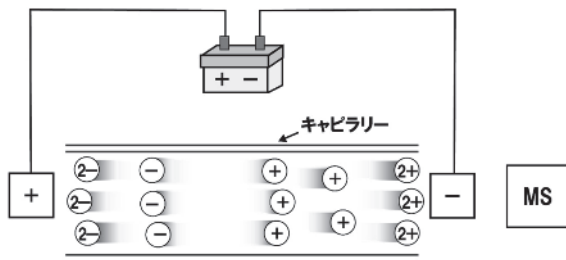


図 2 CE-MS での分離の原理

に基づいており、この値が大きな代謝産物 (つまり電荷が大きく、イオン半径が小さい代謝産物) は早く移動する (図2)。この原理に基づいて、各代謝産物は、キャピラリー内を移動する速度が異なるため、MSに到達する時間に差が生じ、MSで代謝産物が固有に持つ質量で順次測定される (図3)。このCE-MS法では、陽イオン用 (陰極にMSを接続) および陰イオン用 (陽極にMSを接続) の二種類の測定条件によって、数千種類のイオン性物質を一斉に測定することを実現した¹⁾⁻³⁾。我々は、本法を微生物、植物、哺乳動物、臨床検体など種々の生物に応用し、新規知見を見出してきた⁴⁾⁻¹⁰⁾。

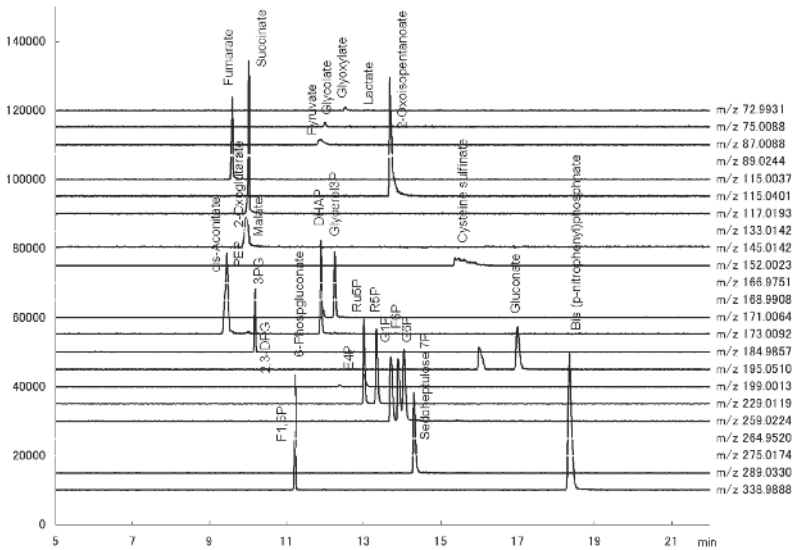


図3 CE-MSによる陰イオン代謝産物の一斉分析結果

2 高感度メタボローム測定技術の開発

近年、種々の細胞の個性の解析を目指すシングルセル分析の重要性が高まり、技術革新に伴ってDNAやRNAレベルではシングルセルでの解析が実現した。しかし、CE-MSによるメタボローム測定技術では、10万個の細胞が必要であった。そこで、シングルセルでのメタボローム解析を実現するためにCE-MS技術の高感度化に取り組んだ^{11), 12)}。図4に従来のCE-MS法での

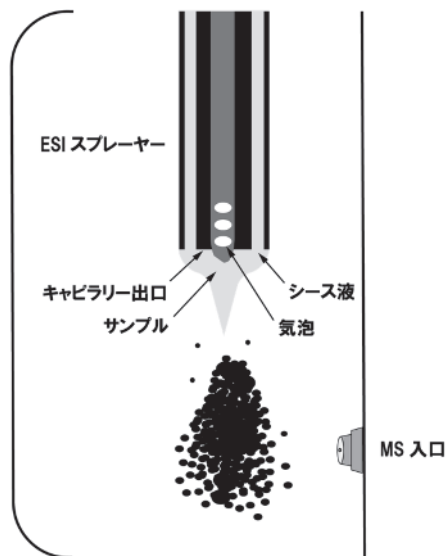


図4 CE-MS インターフェースの拡大図

CE と MS のインターフェースの拡大図を示した。CE ではキャピラリーに数万ボルトの電圧を印加するが、これによってキャピラリー内の泳動バッファが電気分解しキャピラリーの出口に水素や酸素の気泡が発生する(図4)。これらの気泡がMSに入ると検出不能になるため、シース液をキャピラリーの外側から流して気泡を吸収している。しかし、このシース液によって、サンプル成分が希釈されるため、MSでの検出感度が200倍以上低下するという問題があった。

そこで、感度を改善するため、シース液を使わないシースレス CE-MS 法(図5)を新たに開発した¹²⁾。キャピラリーの出口から手前の位置に、電極が入った泳動バッファリザーバを設置すると、電気分解による気泡は泳動バッファリザーバで発生した。この方法では気泡はMSには導入されず、その結果、安定した CE-MS 測定が可能になった。本法は、従来法に比べて各代謝産物の感度が数倍から100倍以上(平均で30倍)改善した。

このシースレス CE-MS 法を用いて、大腸がん細胞中のアミノ酸を測定したところ、グルタミンやグルタミン酸などのアミノ酸は100細胞のみならず

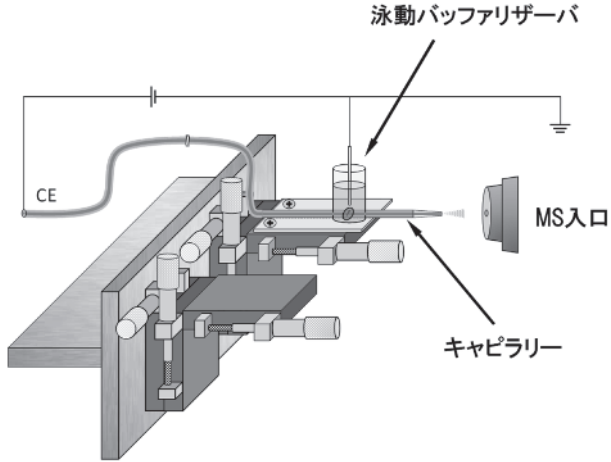


図5 シースレス CE-MS デバイス

10細胞でも検出できることが確認された(図6)。今後、超高感度測定が可能なMSをこのシースレス CE-MS デバイスに接続することにより、1細胞でのメタボローム解析に挑戦する予定である。

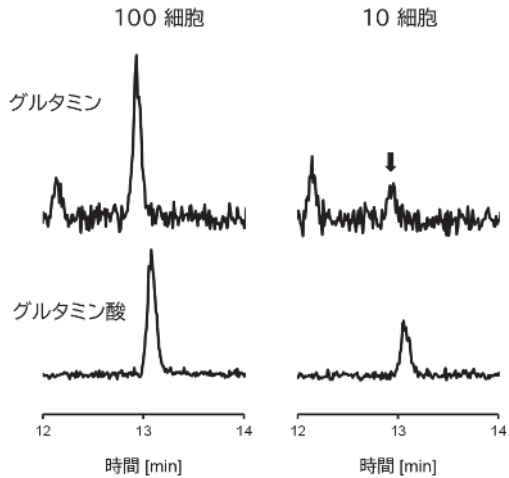


図6 シースレス CE-MS による大腸がん細胞のアミノ酸分析

3 ハイスループットメタボローム測定技術の開発

メタボローム解析技術の誕生により、病気の早期診断を可能にしたり、薬剤の有効性や毒性を示したりする新規の代謝産物（バイオマーカー）が発見されている。一般にバイオマーカーを実用化するためには、1検体を1分で測定できることが求められているが、CE-MS法を含めて代謝産物を測定できる技術では、1検体の測定に10分以上の時間が必要であった（図3）。そこで、1検体を1分で測定できる高速メタボローム測定法（多検体同時分析技術）の開発に取り組んだ¹³⁾。

図7に多検体同時分析 CE-MS法の測定原理を示した。この方法は、図7の一段目のように、泳動バッファ（BGE）をキャピラリーに入れた後、数十検体のサンプルを注入する（図7では4検体）。その後、電圧が印加されると実際の電圧（E）は図で示したように、サンプルゾーンでは高く、バッファゾーン（BGE）では低くなる（図7二段目）。したがって、各代謝産物は、サンプルゾーンでは速く移動し、BGEゾーンに入ると減速する。その結果、各検体の代謝産物はサンプルゾーンとBGEの境界に先端濃縮される（図7二段目）。その後、サンプルゾーンとBGEが混ざり合い、サンプルゾーンとBGEの電

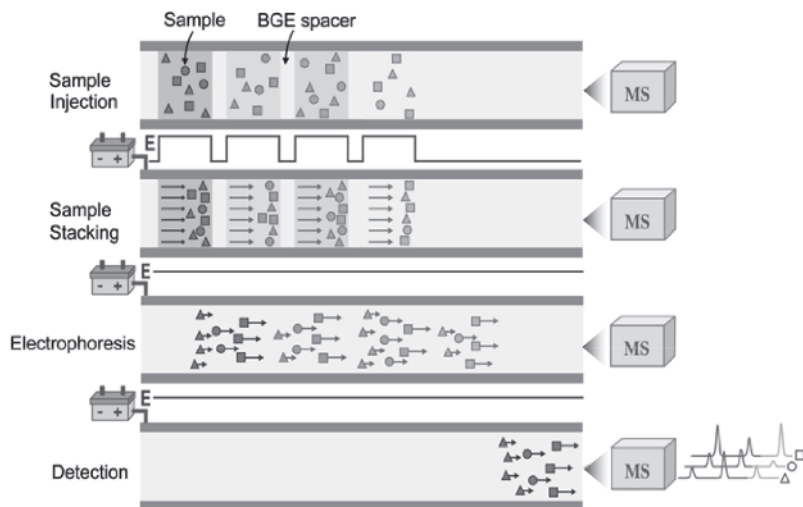


図7 多検体同時分析 CE-MS法の測定原理

位差が一定になると各検体中の代謝産物は、電気泳動を開始し(図7 三段目)、MSに導入されると1番目の検体の代謝産物から順次検出される(図7 四段目)。本法により40検体を一度に電気泳動されることが可能になり、40検体の代謝産物を40分以内で測定することに成功した¹³⁾。

4 多検体同時分析 CE-MS による唾液中のがんマーカー測定

メタボローム解析などの最先端の分析技術によって、ポリアミン合成経路の代謝産物が大腸がん、膵臓がん、乳がんなどのがん患者の唾液や尿で高値を示し、がん患者のスクリーニングに有用であることが判明した¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。しかし、ポリアミン類を高速に測定できる分析手法はほとんどなく、臨床検査会社などで実用化するためには膨大な数の検体を短時間に処理できる測定法が不可欠である。

そこで、多検体同時分析 CE-MS 法を唾液中のポリアミン類の測定に応用したところ、40検体の唾液中のポリアミン類を40分以内に測定することに成功した¹³⁾。図8に健常者(前半の20例)と大腸がん患者(後半の20例)から採取された唾液中の7種類のポリアミンを測定した結果を示した。前半部分の健常者からはポリアミン類のピークはほとんど検出されていないが、後半部分の大腸がん患者からは大きなピークが検出された。続いて全部で359例(健常者57例、大腸良性腫瘍26例、大腸がん276例)の唾液中のポリアミン類を測定し、N1-アセチルスペルミジン、N1-アセチルスペルミン、N1、N12-ジアセチルスペルミンの結果を示した(図9)。3種類のポリアミンとも大腸がん患者では、有意に高値を示し、N1-アセチルスペルミンを用いると83.4%の精度で大腸がん患者を健常者と大腸良性腫瘍から区別できることが判明した。本法のスクリーニング精度は、既存の大腸がんマーカーであるNSE(76.6%) CEA(68.2%) CA19-9(56.0%)、CA125(59.0%)、CA242(65.1%)などよりも優れた結果を示した。多検体同時分析 CE-MS 法による唾液中のポリアミン類の測定は、40検体を40分以内に測定できる迅速な分析手法であるばかりでなく、スクリーニングの精度も優れており、今後有望ながんのスクリーニング手法になると思われる。

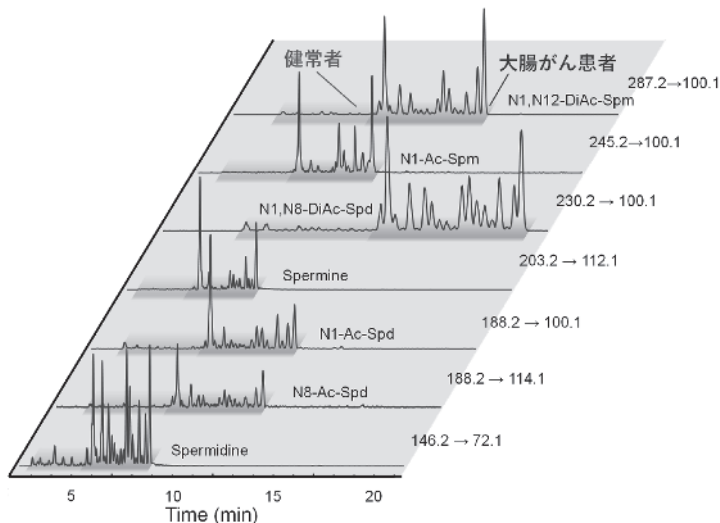


図8 健常者と大腸がん患者（各20例）の唾液中のポリアミン測定結果

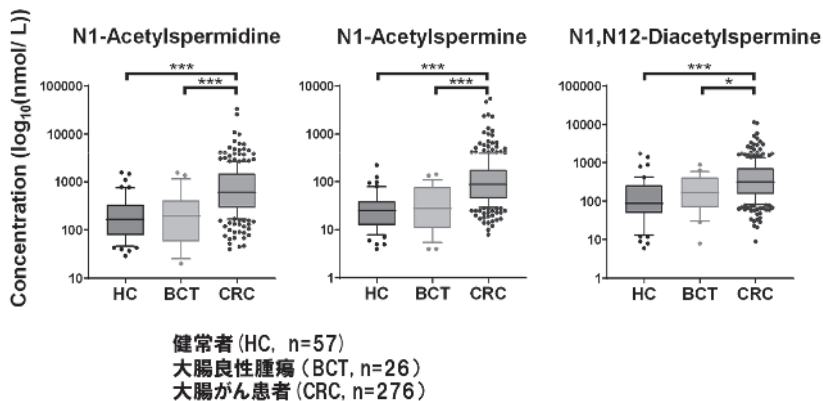


図9 健常、大腸良性腫瘍、大腸がん患者（計359例）の唾液中のポリアミン測定結果

おわりに

慶應義塾大学先端生命科学研究所が開発した CE-MS 法によるメタボローム解析技術は、一度に数千種類の代謝産物を測定できる画期的な方法論である。これまでに数百の国内外の大学、研究機関と様々な生物種に対しての共

同研究を進めており、多くの研究成果を生み出してきた。また、筆者らは、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 (HMT) を創業し、本技術を産業応用にも展開している。しかし、CE-MS 法は万能なメタボロームの測定手法ではなく、測定感度や処理能力には限界もある。本稿で示したように今後もさらに技術開発を続けることによって、1細胞や1分子測定に向けたさらなる高感度化や、大規模検体を処理できるハイスループット化の確立が求められている。

参考文献

- 1) Soga, T., et al. (2002) "Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry", *Analytical Chemistry*. 74(10), pp. 2233-2239.
- 2) Soga, T., et al. (2003) "Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry", *Journal of Proteome Research*. 2(5), pp. 488-494.
- 3) Soga, T., et al. (2009) "Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry", *Analytical Chemistry*. 81(15), pp. 6165-6174.
- 4) Ishii, N., et al. (2007) "Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E-coli* to perturbations", *Science*. 316(5824), pp. 593-597.
- 5) Soga, T., et al. (2006) "Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption", *Journal of Biological Chemistry*. 281(24), pp. 16768-16776.
- 6) Hirayama, A., et al. (2009) "Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry", *Cancer Research*. 69(11), pp. 4918-4925.
- 7) Soga, T., et al. (2011) "Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease", *Journal of Hepatology*. 55(4), pp. 896-905.
- 8) Satoh, K., et al. (2017) "Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(37), pp. E7697-E7706.
- 9) Yoneshiro, T., et al. (2019) "BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44", *Nature*. 572(7771), pp. 614-619.
- 10) Yachida, S., et al. (2019) "Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer", *Nature Medicine*. 25, pp. 968-976.
- 11) Hirayama, A., et al. (2012) "Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis", *Analyst*. 137, pp. 5026-5033.
- 12) Hirayama, A., et al. (2018) "Development of a sheathless CE-ESI-MS interface", *Electrophoresis*. 39, pp. 1382-1389.
- 13) Igarashi, K., et al. (2021) "High-throughput screening of salivary polyamine markers for discrimination of colorectal cancer by multisegment injection capillary electrophoresis

- tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*. 1652, 462355.
- 14) Hiramatsu, K., et al. (2005) “N1,N12-Diacetylspermine as a Sensitive and Specific Novel Marker for Early- and Late-Stage Colorectal and Breast Cancers”, *Clinical Cancer Research*. 11(8), pp.2986-2990.
 - 15) Sugimoto, M., et al. (2010) “Capillary electrophoresis mass spectrometry-based metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles”, *Metabolomics*. 6(1), pp.78-95.
 - 16) Asai, Y., et al. (2018) “Elevated polyamines in saliva of pancreatic cancer”, *Cancers*. 10(2), 43.

[受付日 2022. 2. 10]