

氏名	とみた りょうこ 富田 陵子		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	乙第 1730 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	<b>がん細胞に対するアミノ酸メタボロミクスの開発とその応用</b>		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	藤岡 稔大
	（副査） 福岡大学	教授	能田 均
	福岡大学	准教授	吉田 秀幸
	福岡大学	准教授	巴山 忠

## 内容の要旨

### 【緒言】

代謝物の総体を意味する「メタボローム」は、遺伝子情報の最終表現型であり、これら低分子代謝物を網羅的に解析することで生命現象を包括的に評価しようという技術が「メタボロミクス」である。生命体の僅かな代謝変動でさえも捉えられるというユニークな利点をもつことから、医療や生命科学、臨床研究、創薬、環境毒性学、食品科学など様々な研究で応用されている<sup>1-3)</sup>。その中でも近年、測定対象をアミノ酸などの同定および定量が容易な代謝物のみに限定したターゲットメタボロミクス研究に注目が集められており、実際に、健康状態や病気の可能性を評価する新しい検査法として様々な研究施設・医療機関にて採り入れられている<sup>4-6)</sup>。そこで本研究では、がん細胞へのアミノ酸の取り込みが正常細胞に比べて増加していること<sup>7)</sup>に着目し、培養細胞レベルでのアミノ酸濃度変動に基づいて細胞状態の変化を判定する手法「アミノ酸メタボロミクス」を開発した。さらに、抗がん剤を用いる化学療法は現在のがん治療の主力であるが、患者ごとに薬剤応答性が異なることが根治を妨げる一因として問題となっている。そこで、効果的ながん治療を達成すべく抗がん剤感受性試験が実施されている。特に細胞内酵素活性を利用する方法は、低コストかつ操作の簡便性から頻繁に用いられる。しかし、臨床効果との相関性などにおいて改善すべき問題も残っており、より高精度な抗がん剤効果判定法の開発が望まれている。細胞のアミノ酸代謝変動に基づいた細胞状態の評価（アミノ酸メタボロミクス）を新たな抗がん剤効果判定法として応用すべく、検討を行った。

## 【1】アミノ酸メタボロミクスの開発

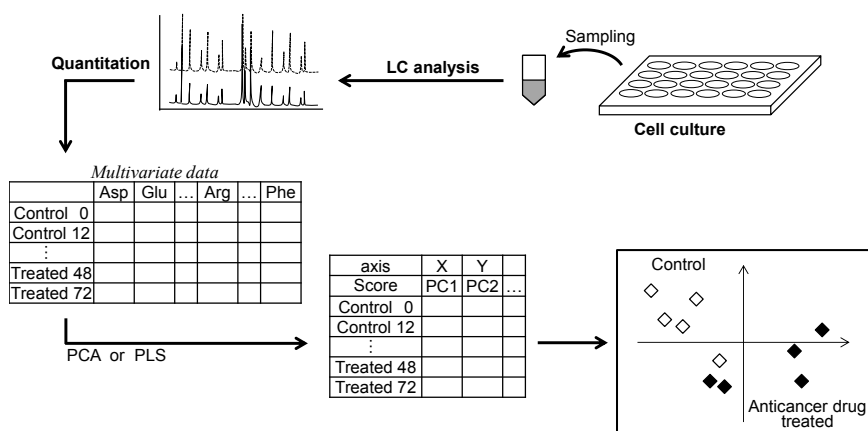


Fig. 1 Concept of amino acid metabolomics for evaluating of anticancer drugs on cancer cells by multivariate analyses.

アミノ酸メタボロミクスによる抗がん剤効果判定の概略を Fig. 1 に示す。アミノ酸メタボロミクスでは、がん細胞の培養培地中アミノ酸の濃度を LC 分析により測定し、得られた経時的変動データについて多変量解析を施す。これにより、アミノ酸濃度情報（定量結果）をスコアプロットと呼ばれる 2 次元グラフ上の 1 点に集約し、細胞状態の視覚的評価を容易に行うことができる。まずは、アミノ酸メタボロミクスの基盤となるアミノ酸分析法について検討した。その結果、高精度なアミノ酸濃度データを得られるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法<sup>8)</sup> や、簡便かつ迅速な分析が可能な非誘導体化 LC-MS/MS 法はいずれもアミノ酸メタボロミクスの基盤として有用であることが確認された。そこで、実試料（細胞培養培地）分析へと応用したところ、検体はスコアプロット上の 1 点として表され、検体間のアミノ酸濃度情報の差異は座標位置の違いとして反映された。さらに、ローディングプロットにおいて、検体の特徴を評価するのに寄与したアミノ酸を同定可能であることも確認することができた。以上より、細胞の状態を評価するためにアミノ酸濃度変動を測定することは、有用なアプローチであることが示された。

## 【2】大腸がん細胞に投与した 3 種抗がん剤の効果判定への応用

本章では、作用機序の異なる 3 種抗がん剤 (5-フルオロウラシル、5-FU; イリノテカン、CPT-11; シスプラチン、CDDP) を投与したヒト直腸結腸腺がん由来細胞株 colo201 の培養培地に対してアミノ酸メタボロミクスを行い、抗がん剤が colo201 の増殖に及ぼす影響を評価した。培養培地中アミノ酸 (21 種) 濃度は、AccQ・Tag を用いるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法<sup>8)</sup> により測定した。得られた経時的濃度データについて主成分分析 (PCA) および部分最小二乗法 (PLS) による多変量解析を行った。さらに、得られたスコアプロット上における検体をクラスター分析 (CA) や判別分析 (DA) により分類した。

その結果、PCA-DA で得られたスコアプロットにおいて、抗がん剤を投与した検体は control 検体と比べて座標位置が離れていた (Fig. 2)。つまり、スコアプロット上の座標位置によって抗がん剤投与の有無を判定することが可能であった。

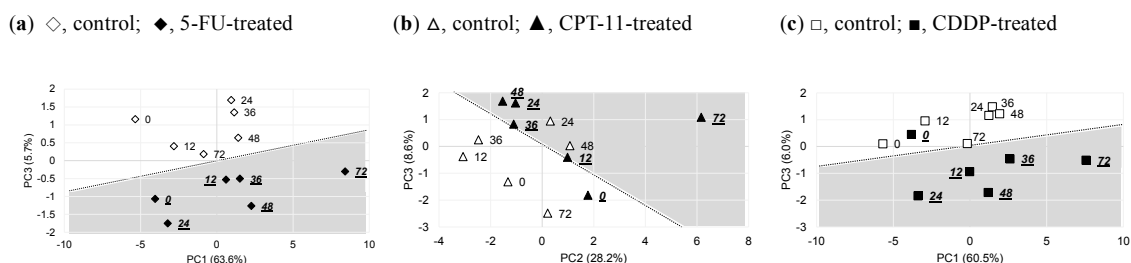


Fig. 2 PCA-DA score plots obtained from analyses of colo201 cell culture medium treated with 5-FU (a), CPT-11 (b), and CDDP (c). Colo201 cells were incubated at 0, 12, 24, 36, 48, and 72 hr. The numbers indicate the incubation time (hr).

### 【3】 がん微小環境における大腸がん細胞に対する抗がん剤効果判定への応用

ヒト固形がんには、細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素・栄養飢餓環境 (がん微小環境) が存在する。そのような過酷な環境においても代謝特性を変化させることでがん微小環境に適応したがん細胞は、放射線や多くの抗がん剤に対する感受性が低い<sup>9,10)</sup>。これは治療成績不良の主因であるばかりでなく、浸潤・転移・再発の温床となっており、難治性がんの悪性化にも影響を及ぼすことが懸念されている。しかしながら、低酸素や栄養飢餓状態による薬剤耐性の発生机序などは未だ十分に理解されておらず、新たな知見が求められている。そこで、通常酸素・グルコース豊富状態または低酸素・グルコース飢餓状態で 5-FU を投与したヒト大腸がん由来細胞株 DLD-1 に対してアミノ酸メタボロミクスを行い、培養環境が抗がん剤感受性に及ぼす影響を評価した。培養培地中アミノ酸 (20 種) 濃度は、非誘導体化 LC-MS/MS 法により測定した。得られた経時的濃度データについて PCA-CA および PCA-DA による解析を行い、スコアプロット上で検体を分類した。その結果、通常酸素・グルコース豊富状態で 5-FU を投与した場合、PCA-DA により control 検体と 5-FU 投与検体の座標位置が、培養時間の経過に伴って大きく離れるスコアプロットが得られた。つまり、5-FU により増殖が抑制されている状態を反映したスコアプロットであった (Fig. 3a)。一方、低酸素・グルコース飢餓状態で 5-FU を投与した場合、PCA-DA で得られたスコアプロット上の検体は、培養時間が近いもの同士で近接し、5-FU 投与の有無に依存した座標位置ではなかった。つまり、5-FU の抗がん効果が抑制されている状態を反映したスコアプロットであった (Fig. 3b)。これらの結果は、培養環境が変化したことによって DLD-1 の 5-FU に対する感受性が変化したことを示している。つまり、アミノ酸メタボロミクスは特殊な培養環境においても抗がん剤効果の有無を判定することが可能であった。

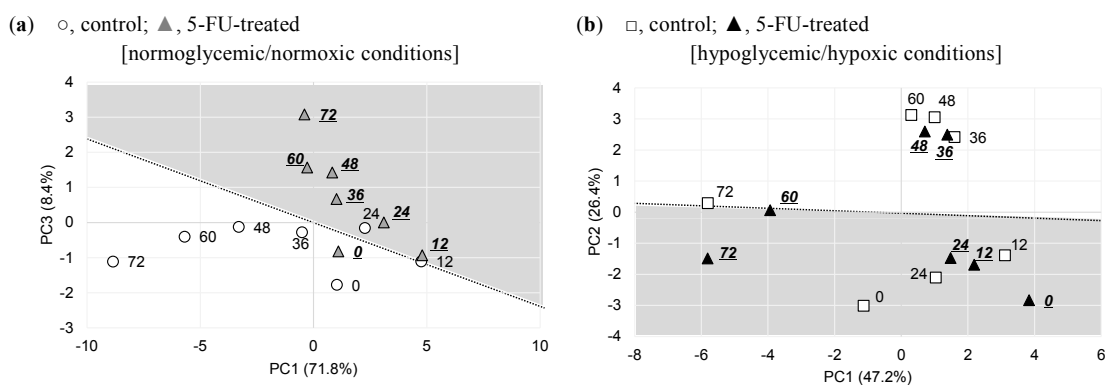


Fig. 3 PCA-DA score plots obtained from analyses of DLD-1 cell culture medium treated with and without 20  $\mu\text{g/mL}$  5-FU under normoglycemic/normoxic (a) and hypoglycemic/hypoxic (b) conditions. DLD-1 cells were incubated at 0, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 hr. The numbers indicate the incubation time (hr).

#### 【4】膵臓がん細胞外および細胞内アミノ酸メタボロミクスの比較

これまでの検討では、培養培地中アミノ酸濃度の分析結果を基に解析を行った。がん細胞状態を評価するのであれば、細胞そのものに含まれるアミノ酸データを用いるべきとも考えられるが、その分析を行うための操作は培養培地の分析と比較して、一般に煩雑である。それゆえ、培養培地中アミノ酸濃度の解析結果が、細胞内アミノ酸濃度の解析結果と同質のものであると証明できれば、よりシンプルな評価法として提供することができる。そこで、ヒト膵臓がん由来細胞株 PANC-1 を用い、「培養培地中」つまり「細胞外」、および「細胞内」アミノ酸について、それぞれアミノ酸メタボロミクスを行い、培養培地の解析結果が細胞内の状態変動をどの程度反映できているのか評価した。グルコース豊富状態またはグルコース飢餓状態でゲムシタビン塩酸塩 (GEM) またはピルビニウムパモ酸塩 (PP) を投与した PANC-1 の細胞外および細胞内アミノ酸 (20 種) 濃度は、非誘導体化 LC-MS/MS 法により別々に測定した。得られたそれぞれの経時的濃度データについて PCA-CA および PCA-DA による解析を行い、スコアプロット上で検体を分類した。「細胞内」アミノ酸について解析した結果、GEM はグルコース豊富状態で投与した場合のみ (Figs. 4a, b)、PP はグルコース飢餓状態で投与した場合のみ (Figs. 4c, d) 抗がん効果を示すことが PCA-CA で得られたスコアプロット上で示された。一方、「細胞外」アミノ酸について解析した場合も「細胞内」と同様に、GEM や PP の効果判別が可能なスコアプロットが得られた。つまり、細胞外アミノ酸濃度の変化を測定することで、抗がん剤投与により生じる PANC-1 の増殖抑制という細胞の状態変化を評価することが可能であった。

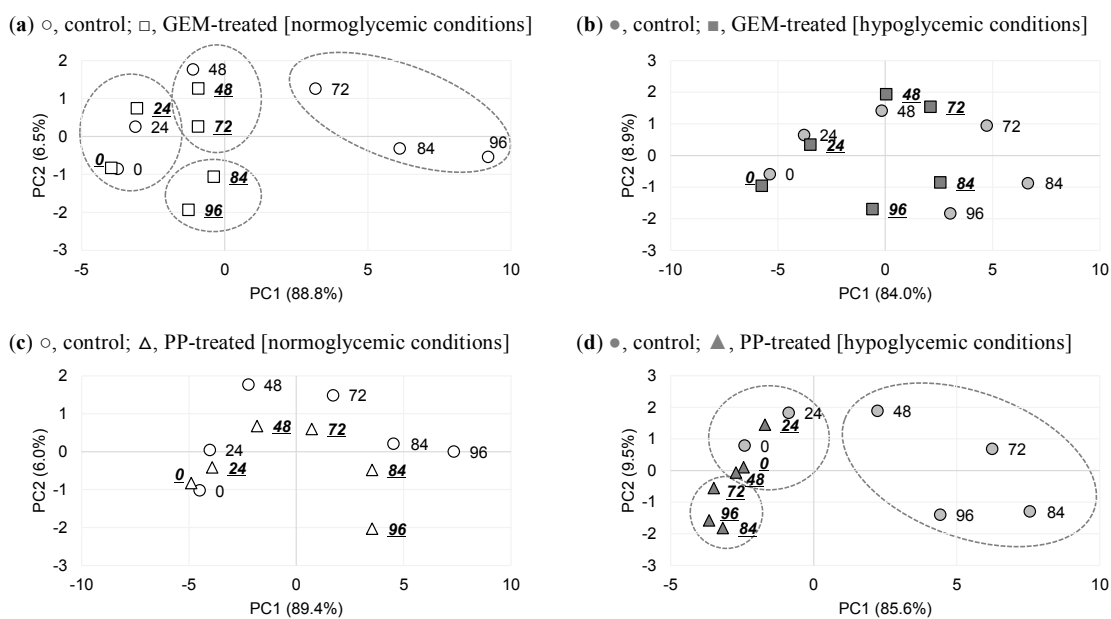


Fig. 4 PCA-CA score plots obtained from analyses of intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with GEM (a and b) and PP (c and d) under either normoglycemic or hypoglycemic conditions. PANC-1 cells were incubated at 0, 24, 48, 72, 84, and 96 hr. The numbers indicate the incubation time (hr).

## 【総括】

本研究により、抗がん剤の有効性を培養細胞レベルで評価する手法としてアミノ酸メタボロミクスは有用であることが明らかになった。培養培地中アミノ酸の分析法として、簡便かつ迅速な LC-MS/MS 法も有用であったが、従来の HPLC 装置を用いるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法でも十分実施可能であった。それゆえ、アミノ酸メタボロミクスは現在の抗がん剤感受性試験に対する補助的な判定法として、小規模研究施設や医療機関などでも比較的容易に導入できる技術であると期待している。さらに近年は、低酸素や栄養飢餓状態に代表される「がん微小環境」に曝されたがん細胞の「耐性克服」を治療標的とするような薬剤の開発研究<sup>11-14)</sup>が精力的に進められている。本法は、このような新薬開発分野においても候補物質のスクリーニングや薬効評価、さらには作用機序解明の場面で貢献できる技術であると考えられる。

【参考文献】 1) *PLoS One*, **2016**, *11*, e0150524. 2) *Food Chem.*, **2015**, *181*, 318. 3) *Metabolomics*, **2012**, *9*, 444. 4) *Amino Acids*, **2016**, *48*, 1339. 5) *Diagn. Pathol.*, **2013**, *8*, 203. 6) *Ningen Dock*, **2012**, *26*, 911. 7) *Semin. Cancer Biol.*, **2005**, *15*, 254. 8) *J. Chromatogr. A*, **1997**, *763*, 11. 9) *Cancer Sci.*, **2011**, *102*, 975. 10) *Cancer Res.*, **2009**, 1751. 13) *Cancer Sci.*, **2004**, *95*, 547. 14) *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 5248.

## 審査の結果の要旨

本研究では、培養細胞レベルでのアミノ酸代謝の変動に基づいて細胞の代謝状態の変化を判定する方法を開発し、種々の条件で培養したがん細胞の解析へと応用した。

第一章では、がん細胞の培養培地中アミノ酸濃度変動を測定し、得られたデータの統計的解析により細胞の代謝状態を視覚化する手法として「アミノ酸メタボロミクス」の開発を試みた。その結果、培養細胞の培養培地中アミノ酸の濃度を経時的に測定し、これについて多変量解析を施すことで、各検体のアミノ酸濃度情報が2次元グラフ上の1点として集約され、培養時間などにより生じる試料状態間におけるアミノ酸濃度の差異を視覚的に評価することができた。さらに、その評価を行うのに寄与したアミノ酸を同定することも可能であった。

第二章では、アミノ酸メタボロミクスを抗がん剤効果判定法として応用すべく、3種の抗がん剤（5-FU, CPT-11, CDDP）で処理した colo201（ヒト直腸結腸腺がん由来細胞株）に対する解析を行った。プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光分析法により21種アミノ酸およびNH<sub>3</sub>濃度を測定し、アミノ酸メタボロミクスにより解析したところ、抗がん剤投与群と非投与（control）群の差を明確に判別することが可能であった。さらに、抗がん剤効果の判別マーカー候補として3種のアミノ酸（Ser, Asp および Met）を同定することができた。

第三章では、本法が培養環境に依存することなく抗がん剤効果を判定できるかどうかについて検討した。腫瘍微小環境を模倣した状態として、低酸素かつグルコース欠乏状態に曝された DLD-1（ヒト大腸がん由来細胞株）に対する5-FUの効果発現や細胞状態に及ぼす影響を20種アミノ酸濃度の変動に基づいて評価した。その結果、「通常酸素・グルコース豊富状態でDLD-1を培養」した場合と比較して、「低酸素・グルコース欠乏状態で培養」した場合、5-FU投与群と非投与群との間に差は認められないことが分かった。

また、「通常酸素・グルコース豊富状態」および「低酸素・グルコース欠乏状態」で培養された control 群間について比較したところ、低酸素・グルコース欠乏状態に曝された DLD-1 は、「通常酸素・グルコース豊富状態」で培養された DLD-1 とは異なる代謝状態である可能性が示唆された。つまり、特殊な培養環境が DLD-1 の増殖や抗がん剤（5-FU）効果発現に影響を及ぼしていることを本実験で証明できた。

第四章では、PANC-1（ヒト膵臓がん由来細胞株）に対して GEM（ゲムシタピン塩酸塩）または PP（ピルビニウムパモ酸塩）を投与し、その細胞外および細胞内におけるアミノ酸メタボロミクス解析を行った。その結果、PANC-1 に対する抗がん剤効果の判別は、細胞内および細胞外アミノ酸濃度のどちらを用いた場合においても可能であるということが分かった。つまり、本実験において、細胞内の状態変化を細胞外からも判別可能であるということを示すことができた。また、さらなる統計解析の結果、GEM および PP の効果の特異的に評価できるようなアミノ酸を同定できたことから、薬剤応答の新たなバイオマーカーを提供できる可能性も示唆された。

以上の結果から、今回提案するアミノ酸メタボロミクスは、培養細胞レベルで抗がん剤の効果を評価できる手法として十分に有用であることが示唆された。本法は、「アミノ酸の定量結果のみを用いること」ならびに「その測定には特殊な装置を必要としないこと（HPLC装置のみ）」を特徴としている。そのため、例えば、従来の抗がん剤感受性試験の補助的な評価を目的として、小規模研究施設や医療機関などでも容易に導入できる技術であると期待している。さらに、近年は低酸素や栄養欠乏状態に代表されるような「腫瘍微小環境」に曝されたがん細胞の耐性を克服するような薬剤の開発研究が新規抗がん剤ターゲットして精力的に進められている。本法は、このような新薬開発分野においても候補物質のスクリーニングや薬効評価、作用機序解明の場面で大いに貢献できるものと期待できる。

上記の内容に関して、申請者は、本研究に関する英語論文3報をすでに受理されており、さらには公聴会でのプレゼンテーションおよび質疑に対する応答も適切であると判断した。学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。