

平成 29 年度 博士学位論文

論題：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

指 導 教 授 藤岡 稔大

福岡大学大学院 薬学 研究科

薬学 専攻

氏 名 富田 陵子

目次

緒論	1
【第一章】アミノ酸メタボロミクスの開発	3
1-1. プレカラム誘導体化 HPLC-蛍光検出法	5
1-1-1 基準操作	5
1-1-2 クロマトグラム	6
1-1-3 バリデーション	7
1-2. 非誘導体化 LC-MS/MS 法	8
1-2-1 基準操作	8
1-2-2 クロマトグラム	10
1-2-3 バリデーション	10
1-3. データの統計解析	14
1-3-1 基準操作	14
1-3-2 colo201 に対するアミノ酸メタボロミクス	15
1-4. まとめ	19
【第二章】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	20
2-1. 各抗がん剤の colo201 に対する効果	22
2-1-1 細胞増殖測定用試薬 WST-1 による IC ₅₀ の測定	22
2-2. colo201 に対するアミノ酸メタボロミクス	23
2-2-1 基準操作	23
2-2-2 定量値	24
2-2-3 5-FU を投与した colo201 の解析結果	32
2-2-4 CPT-11 を投与した colo201 の解析結果	34
2-2-5 CDDP を投与した colo201 の解析結果	36
2-2-6 効果判定マーカー候補物質の同定	38
2-3. まとめ	41

【第三章】 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	42
3-1. 抗がん剤 5-FU の DLD-1 に対する効果	43
3-2. DLD-1 に対するアミノ酸メタボロミクス	44
3-2-1 基準操作	44
3-2-2 定量値	45
3-2-3 5-FU を投与した DLD-1 の解析結果	50
3-2-4 培養条件の異なる DLD-1 の解析結果	53
3-3. まとめ	56
【第四章】 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	57
4-1. 各抗がん剤の PANC-1 に対する効果	59
4-2. PANC-1 に対するアミノ酸メタボロミクス	61
4-2-1 基準操作	61
4-2-2 定量値	63
4-2-3 GEM を投与した PANC-1 の PCA	76
4-2-4 PP を投与した PANC-1 の PCA	78
4-2-5 抗がん剤の有効性を評価するアミノ酸候補の探索	80
4-3. まとめ	83
総括	84
実験の部	86
参考文献	90
謝辞	94

【略語表】

本論文では、以下の略号を使用した。

5-FU	5-Fluorouracil
Ala	L-Alanine
AMQ	6-Aminoquinoline
AQC	6-Aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl carbamate
Arg	L-Arginine
ASCT2	Alanine-serine-cysteine transporter 2
Asn	L-Asparagine
Asp	L-Aspartic acid
CA	Cluster analysis
CDDP	Cisplatin
CE	Capillary electrophoresis
CPT-11	Irinotecan hydrochloride
(Cys) ₂	L-Cystine
DA	Discriminant analysis
DNS-Cl	Dansyl chloride
ESI	Electrospray ionization
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL	Fluorescence detection
GC	Gas chromatography
GEM	Gemcitabine hydrochloride
Gln	L-Glutamine
Glu	L-Glutamic acid
Gly	Glycine
His	L-Histidine
HPLC	High performance liquid chromatography
HyPro	L-Hydroxyproline
Ile	L-Isoleucine
IS	Internal standard
LAT	L-Type amino acid transporter
LC	Liquid chromatography
Leu	L-Leucine

Lys	L-Lysine
Met	L-Methionine
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NBD-F	4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
NH ₃	Ammonia
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear magnetic resonance
OPA	<i>o</i> -Phthalaldehyde
OPLS-DA	Orthogonal partial least squares discriminant analysis
Orn	L-Ornithine
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal component analysis
Phe	L-Phenylalanine
PLS	Partial least squares
PP	Pyrvinium pamoate
Pro	L-Proline
RSD	Relative standard deviation
Ser	L-Serine
THF	Tetrahydrofuran
Thr	L-Threonine
Trp	L-Tryptophan
TS	Thymidylate synthase
Tyr	L-Tyrosine
Val	L-Valine

緒論

生命の設計図とされる遺伝子情報（ゲノム）をもとに、転写・翻訳という過程を経て作られたタンパク質は細胞の構成要素の一部になるとともに、酵素として細胞内での代謝を促進する。その結果生じる代謝産物の総体を意味するのが「メタボローム」であり、遺伝子情報の最終表現型である。低分子代謝産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¹⁻³⁾」である。メタボロミクスは、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、分野を問わず、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へと応用されている⁴⁻⁷⁾。メタボロミクス研究の黎明期は、バイオマーカー候補物質として単一分子を発見することに焦点を当てた報告が多かったが、近年では疾患リスク予測や診断⁸⁻¹¹⁾、あるいは疾病原因となる代謝異常のメカニズム解明のための解析ツールとして応用されている。しかしながら、メタボロミクスにて対象となる代謝物の数は膨大である。それゆえ、既知・未知にかかわらず全成分網羅的に分析し、さらに得られたデータを包括的に解析するノンターゲットメタボロミクスを行うには、相当な熟練と膨大な時間を要することは想像に難しくなく、実際の医療への応用を鑑みると、未だ研究の余地があることは否めない。そこで最近では、主要な代謝経路における構成成分のうち、同定および定量が比較的容易な代謝物に限定した分析を行い、解析するターゲットメタボロミクス研究が盛んである。ターゲットメタボロミクスの中でも、アミノインデックス®^{12,13)}やキラルアミノ酸メタボロミクス¹⁴⁻¹⁶⁾のように鍵となる代謝物としてアミノ酸にフォーカスした「アミノ酸メタボロミクス」は、様々な生理学的状態のモニタリングや診断など、あらゆる分野でその有用性や利便性を発揮することから、注目を集めている。血液中のアミノ酸バランスは常にほぼ一定になるようにコントロールされており、アミノ酸は身体の中で様々な新陳代謝のネットワークを作っているハブ化合物である。多くの生体試料中にも比較的豊富に存在していることから、ターゲットメタボロミクスの測定対象として優れた特性をもつと考えられている。これまでに、がん¹⁷⁾、肝不全^{18,19)}、腎不全²⁰⁾、糖尿病²¹⁾、フェニルケトン尿症²²⁾などのアミノ酸代謝異常症など数多くの疾病において、アミノ酸代謝の不均衡が病因として寄与することが報告されてきた。例えば、alanine-serine-cysteine transporter 2 (ASCT2) や L-type amino acid transporter 1 (LAT1) などの中性アミノ酸トランスポーターは、様々な初期がんにおいて協調的に増加しており、がん細胞へのアミノ酸の取り込み亢進に寄与するなど、がん代謝に深く関与している²³⁾。Zhang らは、このように疾病により生体内アミノ酸組成のバランスが崩れることに着目し、血清アミノ酸プロファイルを肝線維症の診断に利用できる可能性があることを明らかにした^{18,19)}。既に、血中アミノ酸を測定することで、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「アミノインデックス®」が全国の医療機関で導入され、2011年の実用化から5年以上が経過している²⁴⁻²⁶⁾。

そこで本研究では、培養細胞レベルでのアミノ酸代謝変動に基づいて細胞の代謝状態の変化を判定する新たな手法としてアミノ酸メタボロミクスの基盤技術を構築し、様々な条件で培養したがん細胞に対する解析へと応用した。第一章では、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。さらに、本法の有用性を確認するため、培養がん細胞に対して本法を適用した。第二章では、がん細胞に種々の抗がん剤を投与し、本法の抗がん剤効果判定としての有用性を評価した。第三章では、腫瘍微小環境を模倣した低酸素・グルコース欠乏状態で培養したがん細胞に抗がん剤を投与し、培養環境が抗がん剤効果発現に及ぼす影響を判定できるか検討した。第四章では、グルコース欠乏状態で培養したがん細胞に抗がん剤を投与し、細胞外および細胞内アミノ酸それぞれについて解析を行い、培地から得られる情報が、細胞内アミノ酸濃度の変動をどの程度反映できているか精査した。

第一章 アミノ酸メタボロミクスの開発

本章では、生体内における様々な代謝経路でハブ化合物として重要な役割を果たす「アミノ酸」に焦点を当て、培養細胞レベルでのアミノ酸濃度変動からがん細胞の状態を評価する手法として「アミノ酸メタボロミクス」を構築し、*in vitro*における抗がん剤効果判定への応用を試みた。

メタボロミクス研究では、測定対象物の物理的・化学的性質の多様性を考慮しながら、主に LC-MS²⁷⁾ や GC-MS²⁸⁾、CE-MS¹⁻³⁾、NMR²⁹⁻³¹⁾ などの大型機器が目的に応じて使い分けられていた。今回、網羅的なアミノ酸分析を上手く実行するためには、正確かつ選択的で感度良く、そして頑健なアミノ酸の検出および測定法が必要である。様々なアミノ酸濃度を一斉に測定する方法として、これまで数多く報告されてきた³²⁻⁴⁴⁾。その中でも HPLC 装置は比較的小型であるため、医療機関や研究所でも一般的に利用可能である。HPLC を利用したアミノ酸分析法として、陽イオン交換クロマトグラフィーで分離した後、ninhydrin で誘導体化して検出するポストカラム誘導体化法がある。また、様々な試薬で蛍光誘導体化後に逆相分配クロマトグラフィーで分離・検出するプレカラム誘導体化法などは、生体試料中のアミノ酸をフェムトモルレベルで検出することができ、高感度かつ高選択的で強力なツールとして認識されている。蛍光試薬として *o*-phthalaldehyde (OPA)³⁶⁾、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)³⁷⁻³⁹⁾、fluorescein isothiocyanate (FITC)^{40,41)}、dansyl chloride (DNS-Cl)^{42,43)}、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)⁴⁴⁾などは、商業的に入手し易く、汎用されている。このように様々な分析法が開発されてきたが、それぞれに一長一短があるため、測定試料や目的成分の特性、必要な感度などを考慮しながら選択しなければならない。また、メタボロミクス研究では、多検体中のアミノ酸を網羅的に分析することが求められることから、高感度な検出システムとともに誘導体の化学的・物理的安定性も必要である。そこで今回、プレカラム蛍光誘導体化試薬として AQC を用いる AccQ・Tag 法³⁷⁻³⁹⁾を選択した。AQC は一級アミンおよび二級アミンと反応し、極めて安定な蛍光性尿素誘導体を生成し、過剰な AQC は直ちに 6-アミノキノリン (AMQ)、*N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および二酸化炭素に加水分解される (Fig.1)。励起波長 250 nm、蛍光波長 395 nm で蛍光検出する場合、アミノ酸を標識した尿素誘導体は検出されるが、AMQ は蛍光強度が弱いため、クロマトグラム上でアミノ酸ピークを妨害しない。さらに、検出限界が数十フェムトモルレベルと高感度で再現性も良好、かつ、長期間安定な誘導体を生成する(少なくとも室温で1週間は安定である)ことから、本研究の基盤となるアミノ酸分析へ適用することで十分満足できる定量値が得られると考えられる。また、プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法に代わる手法として、誘導体化を伴わない新しい LC-MS/MS 法についても検討した。前述した通り、プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法は、高感度かつ高選択的な分析が可能である。しかし一方で、測定対象を誘導体化するという一手間

がかかることから、分析操作の煩雑化・長時間化が問題となる。測定対象の時間依存的な変化を回避するためには、シンプルかつ迅速な分析法が求められる場合もある。そこで、遊離アミノ酸を誘導体化することなく LC-MS/MS で迅速に分析するのに特化した専用カラム *Intrada Amino Acid column*⁴⁵⁾ によるアミノ酸分析法について検討した。このカラムは、構造異性体である Leu および Ile を上手く分離でき、 β -または γ -アミノ酸異性体やジペプチドなどの分析にも適用可能である。本法は、装置自体が大型で高額であるため、設置できる研究機関が制限されるが、手動での誘導体化操作が不要であることを含めると、分析のスループット性は劇的に向上すると考えられる。

これらアミノ酸分析法を利用して、培養がん細胞株の培養培地に含まれるアミノ酸の経時的濃度を測定し、得られたデータについて統計的解析を施した。これによりアミノ酸情報を二次元グラフ上の 1 点に集約し、培養細胞の時間的な状態変動や薬剤投与による状態変動を視覚的に理解しやすい形で評価するための「アミノ酸メタボロミクス」の基盤を構築し、その有用性を評価した。

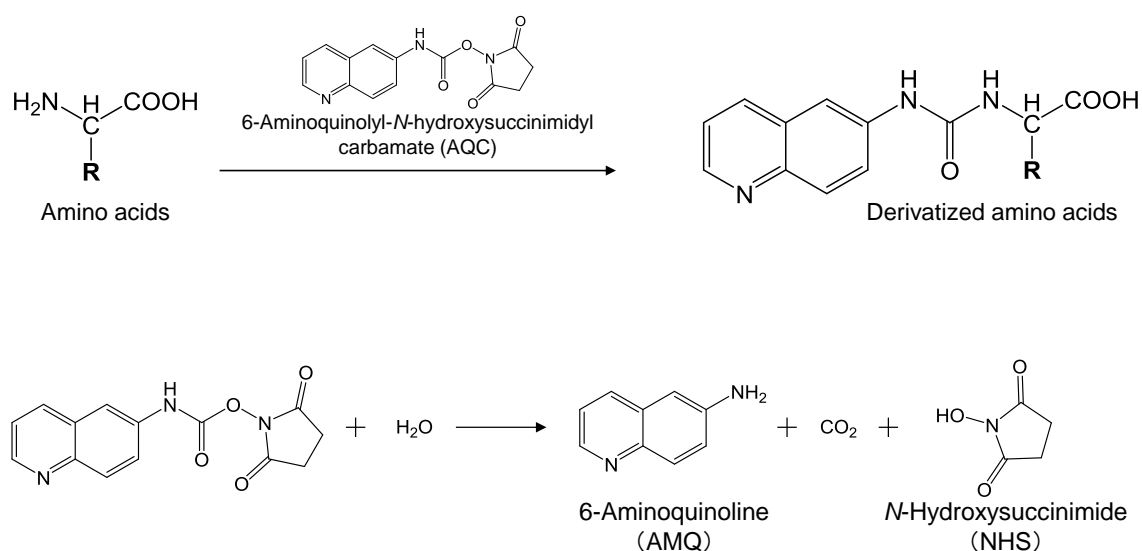


Fig.1 Derivatization of amino acids with AQC and hydrolysis of the excess reagent.

1-1. プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法

1-1-1 基準操作

(1) アミノ酸標準液

17 種アミノ酸および NH₃ の 2.5 mM [(Cys)₂ のみ 1.25 mM] 標準溶液 (Amino Acid Standard H, 0.1 M 塩酸溶液) 900 μL と、5 種のアミノ酸 (Asn、Gln、HyPro、Orn および Trp) の 25 mM 標準溶液 (0.1 M 塩酸溶液) 90 μL を混合し、アミノ酸標準液とする。

(2) 培地試料の前処理³⁷⁾

培養培地 100 μL に 0.4 mM α-aminobutyric acid 100 μL (内標準物質) およびアセトニトリル 200 μL を加え、4°C、16,000 × g にて 5 分間遠心分離する。その上清 10 μL を試料とする。

(3) 誘導体化操作³⁷⁾

AccQ・TagTM 法 (アミノ酸分析メソッド, Waters) に従った。試料 10 μL に AccQ・Fluor Borate buffer 70 μL を加えて攪拌後、AccQ・Fluor 試薬 (AQC) 20 μL を加えて、55°C で 10 分間加熱する。反応後、5 μL を HPLC に注入する。

(4) HPLC 条件³⁷⁾

カラムには AccQ・Tag アミノ酸分析カラム (150 × 3.9 mm i.d., 4 μm, Waters) を用い、カラムオーブンを 39°C に設定した。移動相は AccQ・Tag 溶離液 A および B、アセトニトリル、水による直線グラジエント溶離を行い、流速は 1.0~1.3 mL/min で送液した。Table 1-1 にグラジエントプログラムを示す。蛍光検出は、励起波長 250 nm、蛍光波長 395 nm で行った。

Table 1-1 Gradient elution program for the fluorescence derivatization-HPLC analysis. Curve 6 means linear gradient elution and 11 means stepwise elution. A, AccQ • Tag Eluent A; B, AccQ • Tag Eluent B; C, acetonitrile; D, water.

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Curve
Initial	90.0	10.0	0.0	0.0	*
0.50	89.0	10.0	1.0	0.0	11
17.0	88.0	10.0	2.0	0.0	6
24.0	86.0	9.0	5.0	0.0	6
32.0	63.0	25.0	12.0	0.0	6
33.5	0.0	87.5	12.5	0.0	6
33.8	22.0	65.5	12.5	0.0	6
37.0	22.0	65.0	13.0	0.0	6
48.0	22.0	63.0	15.0	0.0	6
48.1	0.0	0.0	60.0	40.0	6
51.0	90.0	10.0	0.0	0.0	11

1-1-2 クロマトグラム

(1) アミノ酸標準液

アミノ酸標準液を 1-1-1 基準操作の条件に従い分析したときのクロマトグラムを Fig.1-1 に示す。Trp 自身の蛍光性による影響で、Trp のピークは蛍光検出されなかったが、内標準物質として添加した α -aminobutyric acid を含めた 21 種アミノ酸および NH_3 に由来する 23 本のピークが 45 分以内に良好に分離検出された。

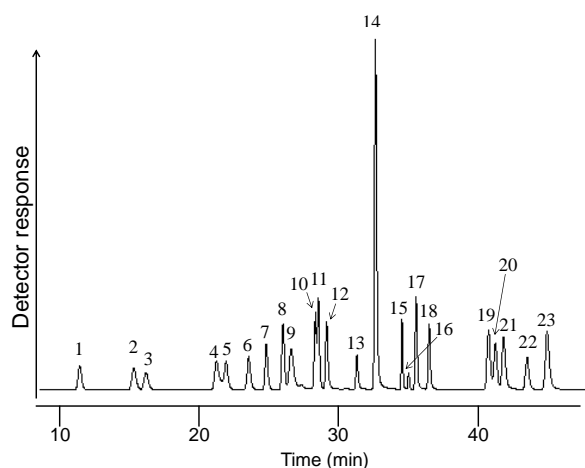


Fig.1-1 Typical chromatogram obtained from analysis of 21 standard amino acids, IS, and NH_3 . Peaks: 1, Asp; 2, Glu; 3, HyPro; 4, Ser; 5, Asn; 6, Gly; 7, Gln; 8, His; 9, NH_3 ; 10, Thr; 11, Arg; 12, Ala; 13, Pro; 14, IS; 15, Tyr; 16, $(\text{Cys})_2$; 17, Val; 18, Met; 19, Ile; 20, Orn; 21, Leu; 22, Lys; 23, Phe. Amounts: 12.5 pmol each per 5 μL injection; $(\text{Cys})_2$, 6.25 pmol per 5 μL injection.

(2) colo201 培養培地試料

colo201 細胞を 12 時間培養したときの培養培地について 1-1-1 基準操作の条件に従い分析したときのクロマトグラムを Fig.1-2 に示す。内標準物質として添加した α -aminobutyric acid、21 種アミノ酸および NH_3 に由来する 23 本のピークは、培地由来成分による妨害を受けることなく、それぞれ単一のピークとして検出された。

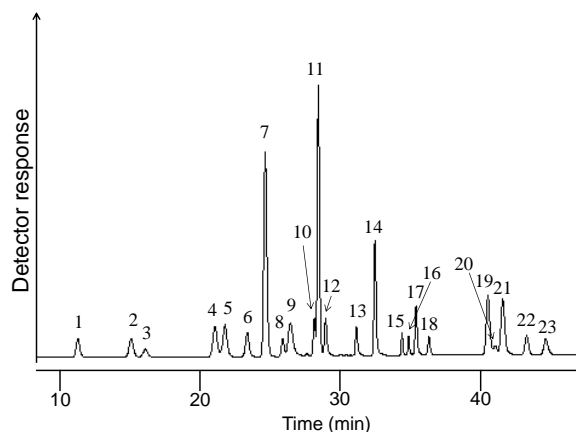


Fig.1-2 Chromatogram obtained from analysis of colo201 cell culture medium incubated for 12 hour. Peaks (amounts per 5 μL injection): 1, Asp (25.9 pmol); 2, Glu (34.1 pmol); 3, HyPro (15.8 pmol); 4, Ser (31.9 pmol); 5, Asn (42.8 pmol); 6, Gly (28.5 pmol); 7, Gln (143.0 pmol); 8, His (59.5 pmol); 9, NH_3 (14.3 pmol); 10, Thr (16.8 pmol); 11, Arg (105.4 pmol); 12, Ala (23.4 pmol); 13, Pro (26.7 pmol); 14, IS (50 pmol); 15, Tyr (11.4 pmol); 16, $(\text{Cys})_2$ (18.4 pmol); 17, Val (19.5 pmol); 18, Met (9.0 pmol); 19, Ile (35.7 pmol); 20, Orn (10.3 pmol); 21, Leu (37.2 pmol); 22, Lys (21.9 pmol); 23, Phe (9.9 pmol).

1-1-3 バリデーション

(1) 直線性

9.1–90.9 μM に希釈したアミノ酸標準液を用いて分析を行い、各アミノ酸のピーク高さを用いて内標準法による検量線を作成した。その結果、 $r^2 \geq 0.9903$ と良好な直線性を示した。

(2) 再現性

24 well plate における 1 well 中の培地に含まれるアミノ酸について、5 回繰り返し測定を行い、定量値の相対標準偏差 (RSD%) を算出した。繰り返し精度を確認したところ、いずれのアミノ酸においても RSD 7.6% 以下と良好な値であった。これにより、同じ条件で培養した培養培地試料として複数 well を用いてばらつきを確認する場合、1 well あたりの 1 回の LC 分析 (測定) で得られた定量値でも、well 中のアミノ酸濃度を十分反映している定量値として扱えることが示唆された。

1-2. 非誘導体化 LC-MS/MS 法

1-2-1 基準操作

(1) アミノ酸標準液

17 種アミノ酸と NH₃ の 2.5 mM 標準溶液 (Amino Acid Standard H, 0.1 M 塩酸溶液) 900 μL と、3 種のアミノ酸 (Asn、Gln および Trp) の 25 mM 標準溶液 (0.1 M 塩酸溶液) 90 μL を混合し、アミノ酸標準液とする。

(2) 培地試料の前処理

培養培地 30 μL に 1 mM の 5 種安定同位体標識アミノ酸 (Glu-*d*₅、His-*d*₃、Lys-*d*₈、Val-*d*₈ および Phe-*d*₅) 混液 (内標準物質) 10 μL および冷メタノール 110 μL を加える。攪拌した後、4°C、16,000 × *g* にて 5 分間遠心分離する。その上清を移動相 A で適宜希釈したものを試料とし、1 μL を LC に注入する。

(3) LC-MSMS 条件

カラムには Intrada Amino Acid (100 × 3.0 mm i.d., 3 μm, Imtakt) を用い、カラムオーブンを 40°C に設定した。移動相はアセトニトリル-テトラヒドロフラン (THF) -25 mM ギ酸アンモニウム-ギ酸の混液 A およびアセトニトリル-100 mM ギ酸アンモニウムの混液 B による直線グラジエント溶離を行い、流速は 0.7 mL/min で送液した。Table 1-2 にグラジエントプログラムを示す。MS/MS 検出には、API 4000 QTRAP (AB sciex) を使用し、イオン源は ESI、イオン化モードはポジティブとし、MRM モード (Table 1-3) で測定した。

Table 1-2 Gradient elution program for the LC-MS/MS analysis. A, THF-25 mM ammonium formate-acetonitrile-formic acid = 75:16: 9:0.3, v/v/v/v; B, acetonitrile-100 mM ammonium formate = 1:4, v/v.

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	100	0
2.00	100	0
3.90	83	17
4.00	0	100
8.00	0	100
8.01	100	0
11.00	100	0

Table 1-3 Retention time, MRM parameters, and IS for the quantification of amino acids. Q1, precursor ion; Q3, product ion; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential; IS, internal standard used for quantification.

	Retention time (min)	MRM parameters				IS
		Q1	Q3	CE (V)	CXP (V)	
Trp	2.9	205.1	188.1	15	14	Phe- <i>d</i> ₅
Phe	3.2	166.1	120.0	17	8	Phe- <i>d</i> ₅
Tyr	3.6	182.1	136.1	19	10	Phe- <i>d</i> ₅
Leu	4.0	132.1	86.2	15	6	Val- <i>d</i> ₈
Met	4.2	150.0	104.1	15	6	Val- <i>d</i> ₈
Ile	4.3	132.3	86.0	15	6	Val- <i>d</i> ₈
Val	4.8	118.1	72.3	17	4	Val- <i>d</i> ₈
Glu	5.1	148.0	84.2	23	6	Glu- <i>d</i> ₅
Pro	5.2	116.0	70.1	23	4	Val- <i>d</i> ₈
Asp	5.2	134.0	74.1	21	12	Glu- <i>d</i> ₅
Thr	5.2	120.0	74.2	15	4	Val- <i>d</i> ₈
Ala	5.2	90.1	44.1	19	6	Val- <i>d</i> ₈
Ser	5.3	106.0	60.0	17	10	Val- <i>d</i> ₈
Gln	5.3	147.1	129.9	13	8	Val- <i>d</i> ₈
Gly	5.3	76.0	48.1	9	8	Val- <i>d</i> ₈
Asn	5.3	133.0	74.1	21	12	Val- <i>d</i> ₈
(Cys) ₂	5.4	241.0	152.0	19	10	Val- <i>d</i> ₈
His	6.9	156.1	110.0	19	6	His- <i>d</i> ₃
Lys	7.8	147.1	84.1	23	4	Lys- <i>d</i> ₈
Arg	8.9	175.1	70.0	33	12	Lys- <i>d</i> ₈
Phe- <i>d</i> ₅	3.2	171.1	125.0	17	8	–
Val- <i>d</i> ₈	4.8	126.1	80.3	17	4	–
Glu- <i>d</i> ₅	5.1	153.0	89.2	23	6	–
His- <i>d</i> ₃	6.8	159.1	113.0	19	6	–
Lys- <i>d</i> ₈	7.8	155.1	92.1	23	4	–

1-2-2 クロマトグラム

(1) アミノ酸標準液

アミノ酸標準液を 1-2-1 基準操作の条件に従い分析したときのクロマトグラムを Fig.1-3 に示す。内標準物質として添加した 5 種の安定同位体標識アミノ酸を含めた 20 種アミノ酸に由来する 25 本のピークが 10 分以内に良好に分離検出された。

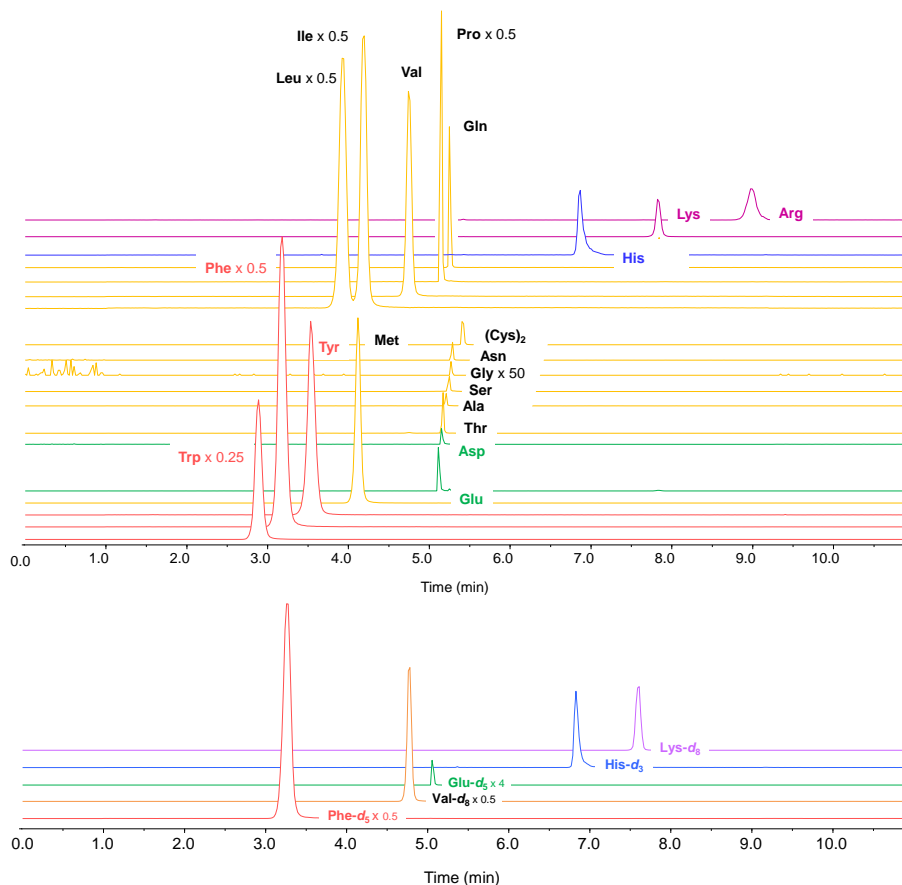


Fig.1-3 Typical MRM chromatograms of 20 standard amino acids (amounts: 90.9 pmol each per 1 μ L injection) and 5 stable isotope-labeled amino acids (Glu- d_5 , His- d_3 , Lys- d_6 , Val- d_6 , and Phe- d_5 ; amounts: 66.7 pmol each per 1 μ L injection). The numbers next to the amino acid labels indicate the expansion of the peak intensity.

1-2-3 バリデーション

(1) 直線性

3.6–1818.2 μ M に希釈したアミノ酸標準液を用いて分析を行い、各アミノ酸のピーク面積を用いて内標準法による検量線を作成した。各アミノ酸に対応する内標準物質（安定同位体標識アミノ酸）を Table 1-3 に示した。その結果、Trp、Asp、Ala、Gly および

His を除く 15 種アミノ酸で $r^2 \geq 0.9953$ と良好な直線性を示した。Trp、Asp および Gly は、それぞれ 3.6–909 μM 、28.4–1818 μM および 227–1818 μM の濃度範囲における r^2 が、0.9966、0.9995 および 0.9990 と良好な値であった。さらに、Ala および His の濃度範囲 14.2–1818 μM における r^2 も 0.9994 および 0.9989 と良好な値であった (Table 1-4)。

(2) 検出限界

各アミノ酸の $S/N = 3$ における検出限界を算出した結果、注入量 1 μL あたり Gly の 38.0 pmol (190.1 μM) を除いて 0.02–3.6 pmol (0.1–18.1 μM) の範囲であった (Table 1-4)。これにより、本法は培地試料中のアミノ酸を定量するのに十分な感度を有していることが確認できた。

(3) 再現性

227 μM となるように希釈調製したアミノ酸標準液および培地添加試料を用いて 3 回繰り返し分析を行った。アミノ酸標準液を分析した場合、各アミノ酸のピーク面積より求めた相対標準偏差 (RSD) の値は日内で 3.6% 以下、日間でも 17.1% といずれも良好な再現性を示した。さらに、培地添加試料を分析した場合も、各アミノ酸のピーク面積より求めた RSD の値は日内で 9.6% 以下、日間で 21.7% 以下と概ね良好な結果であった (Table 1-4)。

(4) 回収率

455 μM となるように希釈調製したアミノ酸標準液および培地添加試料を分析し、Eq.1-1 を用いて回収率を算出したところ、87.7–133.1% の範囲内で、極端に高いまたは低い値がなかったことから概ね良好な結果であった (Table 1-4)。

$$\text{Eq.1-1 } \frac{a-b}{c} \times 100$$

a, response of amino acid in medium spiked with standard solution

b, response of amino acid in non-spiked medium

c, response of amino acid in medium that was spiked standard amino acid solution after extraction

(5) 正確性

455 μM となるように希釈調製したアミノ酸標準液および培地添加試料を分析し、Eq.1-2 を用いて正確性を算出した結果、89.8–117.6%の範囲内で、極端に高いまたは低い値がなかったことから概ね良好な結果であったであった (Table 1-4)。

$$\text{Eq.1-2 } \frac{d-e}{f} \times 100$$

d, concentration of amino acid in medium spiked with standard solution

e, concentration of amino acid in non-spiked medium

f, added concentration of standard amino acid solution

Table 1-4 Calibration range, linearity, LOD, recovery, intra- and inter-day precision, and accuracy of standard amino acid solution.

	Calibration range (μM)	Linearity (r^2) ^a	LOD ^b (μM)	Recovery ^c (%)	Precision (% , $n = 3$) ^d				Accuracy ^e (%)
					standard solution		spiked solution		
					intra-day	inter-day	intra-day	inter-day	
Trp	3.6 – 909	0.9966	0.1	100.5	3.6	3.3	7.0	14.5	113.0
Phe	3.6 – 1818	0.9989	0.3	94.9	2.7	6.5	8.7	13.7	91.6
Tyr	3.6 – 1818	0.9999	1.4	99.5	2.3	2.4	8.3	17.7	99.4
Leu	3.6 – 1818	0.9959	0.9	107.3	2.1	5.3	4.0	13.3	91.1
Met	3.6 – 1818	0.9999	0.6	98.3	1.7	2.9	7.5	11.7	99.8
Ile	3.6 – 1818	0.9953	1.2	108.5	1.5	6.7	5.3	13.7	89.8
Val	3.6 – 1818	0.9992	2.1	102.1	3.3	5.3	4.7	13.3	95.3
Glu	3.6 – 1818	0.9998	1.9	93.8	2.5	7.5	8.3	8.1	100.4
Pro	3.6 – 1818	0.9992	1.6	99.0	3.5	6.3	5.6	21.7	92.2
Asp	28.4 – 1818	0.9995	18.1	92.8	1.9	7.5	6.5	6.9	97.3
Thr	3.6 – 1818	0.9999	3.4	100.3	2.9	6.7	4.8	13.4	101.0
Ala	14.2 – 1818	0.9994	12.4	99.4	2.4	17.1	4.7	17.7	102.2
Ser	3.6 – 1818	0.9995	3.8	98.7	2.4	9.1	3.7	19.3	100.7
Gln	3.6 – 1818	0.9996	1.2	133.1	2.6	12.0	9.6	9.5	117.6
Gly	227 – 1818	0.9990	190.1	95.6	2.6	4.3	4.3	5.3	95.0
Asn	3.6 – 1818	0.9999	1.0	87.7	0.8	9.0	1.3	8.7	102.9
(Cys) ₂	3.6 – 1818	0.9999	1.6	92.2	2.8	10.6	2.8	8.4	95.1
His	14.2 – 1818	0.9989	7.7	101.5	2.9	12.4	4.4	13.6	100.8
Lys	3.6 – 1818	0.9999	2.2	91.1	2.3	7.8	3.3	7.8	102.6
Arg	3.6 – 1818	0.9998	3.9	99.5	2.8	3.0	8.1	4.8	111.2

a, Correlation coefficient of the amino acid calibration curve in each range

b, Defined as a signal-to-noise ratio of 3

c, Percent ratio of peak-area for 455 μM amino acid spiked into the medium before and after deproteinization

d, Relative standard derivation of the peak-area of 227 μM amino acid in standard solution and spiked standard solution into the medium

e, Percent ratio of peak-area for 455 μM amino acid spiked into the medium and standard solution.

1-3. データの統計解析

1-3-1 基準操作

(1) アミノ酸の定量値

培地試料 ($n=5$ または $n=3$ 検体) についてプレカラム蛍光誘導体化-HPLC/蛍光検出法または LC-MS/MS 法を用いてアミノ酸分析を行い、内標準法により培地中アミノ酸の濃度を算出した。このとき、グラブス・スミルノフ棄却検定^{46,47)}を行うために、 $n=5$ または $n=3$ 検体の中で「外れ値だと予測される検体の定量値」と「検体間の平均値(濃度)」の差の絶対値を標準偏差で除した値(標準変化量 z : Eq.1-3)を算出した。危険率 5%および $n=5$ としたときの棄却限界値 1.672、または危険率 5%および $n=3$ としたときの棄却限界値 1.153 よりも大きい場合には外れ値として棄却した。

$$\text{Eq.1-3} \quad z = \frac{|X^* - \mu|}{\sigma}$$

X^* , outlier value; μ , average of measured values; σ , standard deviation of measured values.

(2) 濃度データの規格化

がん細胞培養培地中アミノ酸および NH_3 の各濃度には大きな差があるため、データの規格化を行った。各アミノ酸について検体間の濃度の平均が 0、分散が 1 となるように、各検体中の濃度と濃度平均値の差を標準偏差で除して規格化した値 (Eq.1-4) を統計解析ソフトウェア (SIMCA-P+12.0, Umetrics) に入力し、多変量解析を行った。これにより濃度に大きな差があるアミノ酸同士、あるいはアミノ酸組成が大きく異なる検体間においても同じ次元で比較することが可能になる。

$$\text{Eq.1-4} \quad \text{normalized value} = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

X , measured concentration; μ , average of concentrations measured from 0 hr to 72 hr; σ , standard deviation of measured from 0 hr to 72 hr.

(3) 多変量解析^{48,49)}

検体のアミノ酸情報を可視化する手法として、多変量解析の一種である主成分分析 (Principal component analysis : PCA) を利用した。PCA とは多変量データを説明するため、複数ある説明変数をデータの分布 (分散) が大きくなるような少数の潜在変数 (主成分) に圧縮する手法である。合成された主成分のうち、データの分散が最大となる主

成分を第一主成分 (PC1)、PC1 に垂直かつデータの重心を通る主成分を第二主成分 (PC2) とする。PC1 および PC2 に垂直かつデータの重心を通る主成分を第三主成分というように、理論的には説明変数と同じ数の主成分が合成されていく。統計学的に有意なものとして得られた主成分の中から選び出した 2 つを座標軸とすることで、検体が有する情報をスコアプロットとよばれる 2 次元グラフ上の 1 点に集約できる。各検体の違いは座標位置の違いとして反映され、その座標位置の傾向から変数間の関係や検体の特徴を視覚的に理解することが容易にできる。さらにローディングプロットでは、検体のスコアプロットにおける検体の座標位置に各変数がどの程度影響しているかを表しており、特に大きく寄与した変数は主成分係数としての値が大きくなることから、ローディングプロットを中心から離れて表示される。ここで寄与率とは、各主成分の分散を全主成分の分散の和で除した百分率の値であり、各主成分がデータ全体の傾向をどの程度説明できているかという指標である。ただし、1 つの主成分の寄与率が 90% 以上であるとき、その主成分だけで全体の傾向を説明してしまうために検体がスコアプロット上で密集し、個々の差異を捉えるのが困難となる。明確な判断基準は存在しないが、一般的に累積寄与率が 60% 以上のときに分析法の妥当性が認められると考えられる。

1-3-2 colo201 に対するアミノ酸メタボロミクス

(1) がん細胞培養条件

ヒト結腸直腸腺がん由来細胞株 colo201 をモデル細胞として使用した。colo201 を 5×10^4 cells/mL、1 mL/well の密度で 24 well plate に播種し、10% ウシ胎児血清 (FCS)、1 mM 非必須アミノ酸溶液、1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む基礎培地 (RPMI 1640) を用い、CO₂ インキュベーター内 37°C にて培養した。播種した時点を培養 0 時間とし、その後 12、24、36、48 および 72 時間ごとに回収した colo201 培養培地をプレカラム誘導体化 LC-FL 分析に用いた。得られたアミノ酸濃度データを規格化したものを変数として SIMCA-P+12.0 へ入力した。

(2) 21 種アミノ酸および NH₃ の定量値

培養培地中に含まれるアミノ酸のうち Trp を除く 21 種のアミノ酸および NH₃ について、1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準じて算出した濃度を多変量解析における変数として用いた。Table 1-5 には colo201 培養培地中アミノ酸の経時的な定量値を示す。

Table 1-5 Concentration (μM) of 21 amino acids and NH_3 obtained from analysis of colo201 cell culture medium ($n = 5$).

	0 hr		12 hr		24 hr		36 hr		48 hr		72 hr	
	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD
Asp	232.7	\pm 2.3	231.1	\pm 1.4	203.3	\pm 4.1	229.2	\pm 2.1	229.0	\pm 4.8	226.0	\pm 3.0
Glu	249.7	\pm 2.3	253.9	\pm 0.7	232.8	\pm 4.6	275.3	\pm 2.1	289.4	\pm 4.1	328.1	\pm 2.4
HyPro	134.2	\pm 5.4	131.3	\pm 1.1	118.2	\pm 1.5	133.9	\pm 0.8	133.4	\pm 2.1	139.0	\pm 1.9
Ser	290.9	\pm 1.1	279.0	\pm 2.5	239.7	\pm 1.5	255.4	\pm 1.0	231.8	\pm 3.5	177.2	\pm 1.5
Asn	657.0	\pm 13.2	628.1	\pm 3.6	542.1	\pm 1.8	610.8	\pm 5.0	601.8	\pm 8.1	595.6	\pm 9.0
Gly	227.5	\pm 3.5	225.5	\pm 1.6	203.9	\pm 2.7	236.5	\pm 1.1	241.8	\pm 2.9	272.2	\pm 2.2
Gln	1421.8	\pm 10.1	1284.6	\pm 2.0	1035.0	\pm 9.6	1021.1	\pm 2.2	849.0	\pm 11.7	498.2	\pm 4.8
His	82.3	\pm 1.7	79.9	\pm 0.5	69.7	\pm 0.9	77.0	\pm 0.4	73.5	\pm 2.5	70.1	\pm 0.6
NH_3	364.2	\pm 6.6	449.0	\pm 7.7	481.9	\pm 10.9	642.6	\pm 18.1	727.3	\pm 16.2	1050.9	\pm 14.1
Thr	147.4	\pm 2.3	147.3	\pm 1.2	127.9	\pm 3.6	142.0	\pm 4.0	136.4	\pm 2.3	126.5	\pm 1.0
Arg	881.3	\pm 14.5	851.5	\pm 6.7	737.7	\pm 8.4	809.0	\pm 6.6	778.2	\pm 20.6	735.5	\pm 5.6
Ala	165.0	\pm 5.8	213.3	\pm 1.3	238.4	\pm 6.3	345.4	\pm 7.5	427.5	\pm 4.0	630.0	\pm 4.9
Pro	239.0	\pm 3.1	239.1	\pm 2.3	216.7	\pm 1.7	244.6	\pm 2.4	246.6	\pm 0.5	267.5	\pm 0.9
Tyr	91.8	\pm 2.9	88.5	\pm 0.7	77.6	\pm 1.2	85.0	\pm 0.2	80.4	\pm 1.2	72.6	\pm 0.7
(Cys) ₂	163.8	\pm 2.3	151.7	\pm 1.5	134.7	\pm 1.1	148.3	\pm 1.0	144.8	\pm 4.2	140.7	\pm 2.3
Val	171.2	\pm 7.9	163.9	\pm 8.4	140.5	\pm 5.6	163.3	\pm 13.4	136.3	\pm 13.2	108.5	\pm 3.5
Met	78.6	\pm 1.7	75.0	\pm 0.5	65.0	\pm 0.9	69.7	\pm 0.6	65.1	\pm 0.8	56.9	\pm 0.7
Ile	283.7	\pm 1.3	276.7	\pm 2.8	239.1	\pm 3.3	256.7	\pm 2.6	240.8	\pm 4.7	212.8	\pm 2.1
Orn	57.1	\pm 1.1	76.3	\pm 0.9	83.9	\pm 0.8	112.5	\pm 1.2	128.9	\pm 3.7	168.8	\pm 1.3
Leu	294.6	\pm 2.4	286.2	\pm 3.5	245.6	\pm 3.3	259.0	\pm 2.3	239.5	\pm 6.4	209.2	\pm 1.3
Lys	177.2	\pm 3.5	178.8	\pm 0.7	154.7	\pm 1.5	164.0	\pm 1.0	153.8	\pm 5.2	130.6	\pm 1.8
Phe	77.9	\pm 2.4	75.5	\pm 0.5	65.8	\pm 0.7	71.3	\pm 0.4	66.6	\pm 2.2	57.4	\pm 0.4

(3) colo201 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した (Fig.1-4)。培養 0 時間から 72 時間までの 6 検体は、スコアプロット上の 1 点として表され、培養時間の経過に伴って PC1 軸を右から左方向へと推移した。このスコアプロットにおける PC1 の寄与率は 73.0%、PC2 の寄与率は 25.4%、これらの累積寄与率は 94.6%と全体の傾向を十分に集約できていた。また、PC1 または PC2 軸のみが極端に大きな寄与率 (> 90%) を示すこともなかったことから、本解析法は検体個々の違いを評価するのに十分な特性を持つことが示された。

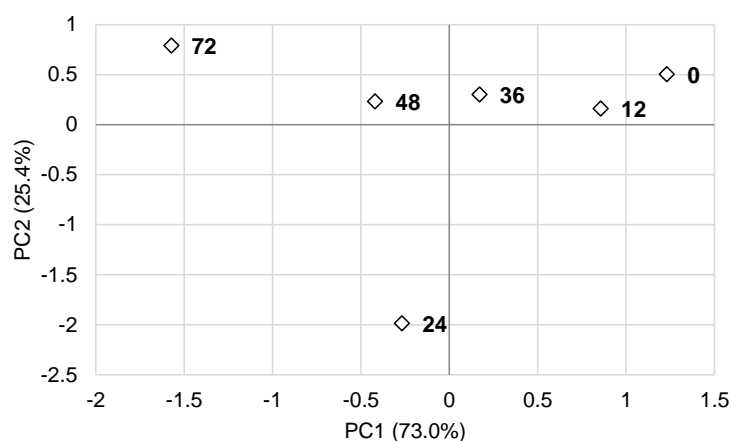


Fig.1-4 PCA score plot of PC1 and PC2 obtained from analysis of colo201 cell culture medium.

また、PCA により得られた PC1 係数および PC2 係数を用いたローディングプロットを Fig.1-5 に示す。ほとんどのアミノ酸がローディングプロット上を大きく広がり、原点から離れた座標位置であった。つまり、Fig.1-4 で示されるスコアプロットにおける検体の広がり、少数個のアミノ酸濃度変動が寄与していたわけではなく、アミノ酸全体の濃度変動 (トータルバランスの変化) によって座標位置が決定されることを示唆している。経時的な濃度データと比較したところ、培養時間の経過に伴い大きい濃度変化を示すアミノ酸ほど原点 (中心) から離れて位置する傾向があった。

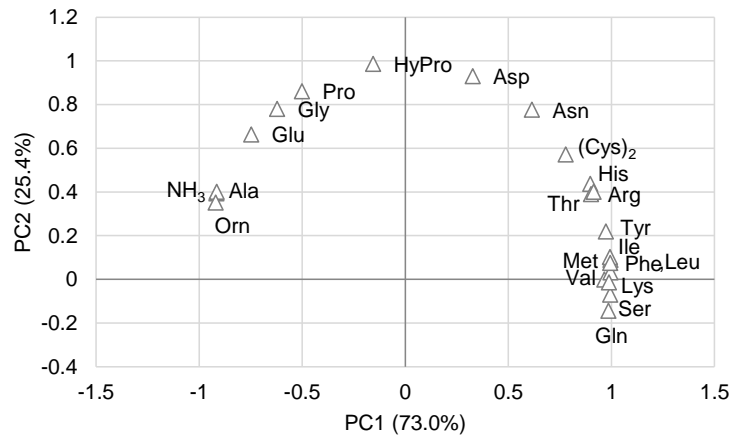


Fig.1-5 PCA loading plot of PC1 and PC2 coefficient obtained from analysis of colo201 cell culture medium.

1-4. まとめ

本章では、がん細胞の培養培地中に含まれる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「アミノ酸メタボロミクス」の基盤技術を整備した。

まずは、アミノ酸メタボロミクスの基盤となる培養培地中アミノ酸の測定法としてプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法または非誘導体化 LC-MS/MS 法について検討した。従来の分析条件³⁷⁾に準拠し、誘導体化-HPLC/蛍光検出法のバリデーションデータの取得を行ったところ、良好な直線性が確認された。また、AQC 誘導体の安定性が高いことも知られており、定量値のばらつきが小さく (RSD < 7.6%)、高精度なアミノ酸濃度変動データを得られることも確認された。続いて、臨床現場や医療、新薬開発の分野など様々な場面へアミノ酸メタボロミクスを適用する場合、多検体データ解析が求められるようになる。そこで、より簡便かつ効率的な分析法として非誘導体化 LC-MS/MS 法について検討した。既報⁴⁵⁾に準拠しつつ、分析条件の最適化後、バリデーションデータの取得を行ったところ、直線性、再現性、回収率、正確性のいずれも良好な値が得られた。検出限界値も、培地中アミノ酸濃度を測定するには問題ない値であった。さらに、プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法に比べて、誘導体化操作が不要であることも含めて1検体あたりの分析時間が短縮され、分析のスループット性が大きく改善された。以上、今回検討した2種類の分析法のいずれも、アミノ酸メタボロミクスの基盤となる培地中アミノ酸濃度測定に有用であることが示された。

最後に、アミノ酸メタボロミクス法の細胞状態の評価法としての有用性について検討すべく、合計72時間培養したcolo201培養培地中アミノ酸およびNH₃についてプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法を行い、経時的な濃度データを得た。これについてPCAを実施し、得られたPC1スコアおよびPC2スコアを用いたスコアプロットを作成した。その結果、各検体は2次元グラフ上の1点として集約して表され、検体のアミノ酸情報の差異を座標位置の違いとして視覚的に評価することが可能であった。さらに、ローディングプロットからスコアプロットにおける検体のアミノ酸情報の差異、特に培養時間の違いを評価するのに大きく寄与したアミノ酸の同定を試みた。今回の検討では、ほとんどのアミノ酸が同じくらい寄与していたが、ローディングプロットが検体の特徴を評価するのに寄与したアミノ酸を抽出できることが確認された。

以上の結果から、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を評価することは可能であり、細胞状態を評価する手法として有用であることが示された。そこで第二章では、複数の抗がん剤で処理したcolo201に対する解析を行い、抗がん剤効果判定法としての応用を試みた。

第二章 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

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。しかし、これら医薬品の治療域は、他の一般的な医薬品に比べ格段に狭いため、副作用を伴うことなく化学療法でがん細胞を選択的に根絶させるのは、極めて困難な現状である。また、個体間での薬剤応答性が異なることも治療を難しくしている一因である。効果的ながん治療を達成するために、多くの医療機関では抗がん剤感受性試験が実施されている。この試験は、外科的手術や内視鏡検査で採取された腫瘍組織を用いて *in vitro* で、がん細胞の生存率を評価する手法で、各個体に対する抗がん剤の治療効果を事前に予測することが出来る。ただし、この手法はがん細胞の生死状態のみで薬剤の効果を判定するため、がん細胞死（アポトーシス、ネクローシスなど）について、その過程を追跡することは難しい。さらに、真陰性率は高いけれども真陽性率が低い点も改善すべき問題として考えられている⁵⁰⁾。そのため、薬剤感受性の予測のみならず、個体ごとの薬剤投与量の最適化をも可能にする、より正確な予測法の開発が過去数十年にわたるがん治療研究の最終目標である。そこで本章では、がん細胞の培養培地についてアミノ酸メタボロミクスを行うことにより、種々の抗がん剤が細胞増殖に及ぼす影響を評価することを目的とした。アミノ酸メタボロミクスによる抗がん剤効果判定の原理を Fig.2-1 に示す。

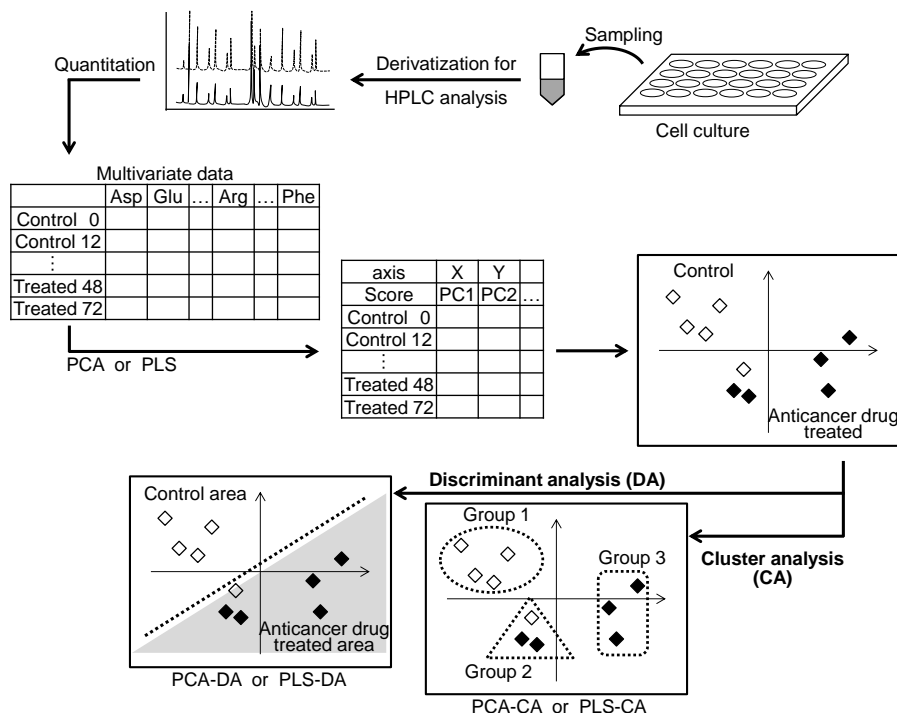


Fig.2-1 Schematic diagram depicting the procedure involved in the amino acid metabolomics study evaluating the effects of anticancer drugs used in cell culture medium by using multivariate analyses (PCA and PLS) and data classification (cluster and discriminant analyses).

作用機序の異なる 3 種の抗がん剤をそれぞれ投与したヒト直腸結腸腺がん細胞株 colo201 を培養し、培養培地中アミノ酸の経時的な濃度変化をプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光法により測定した。得られたアミノ酸濃度データについて多変量解析を施し、スコアプロット上で抗がん剤の効果の有無を判定できるか検討した。また、ローディングプロットを用いて、各抗がん剤の効果を評価するための有用な潜在的バイオマーカー候補となり得るアミノ酸を探索した。検討に用いた 5-fluorouracil (5-FU, Fig.2-2(A)) はチミジル酸合成酵素阻害剤、irinotecan (CPT-11, Fig.2-2(B)) はトポイソメラーゼ I 阻害剤、そして cisplatin (CDDP, Fig.2-2(C)) は DNA 架橋剤である。5-FU は、多くの固形がんに対して適応があり、単剤または他薬剤との併用で使用されている。特に、外科的手術が困難な進行がん・再発胃がんなどに対する初回治療として 50 年以上の長期にわたって化学療法の主役を担い続けてきた抗がん剤である。一方、CPT-11 はヌマミズキ科キジユ (*Camptotheca acuminata*) に含まれるカンプトテシンをリード化合物として開発されたプロドラッグ型の抗がん剤で、生体内カルボキシエステラーゼにより活性代謝物 SN-38 に変換される。肺癌、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、乳がん、悪性リンパ腫などの化学療法に広く用いられている。そして CDDP は、初めて開発された白金製剤であり、がん細胞の 2 本の DNA 鎖と結合することで、DNA の複製を妨げ、がん細胞を死滅させる。激しい副作用が現れることが有名であるものの、肺癌、膀胱がん、前立腺がん、卵巣がん、食道がん、胃がん、子宮頸がん、悪性リンパ腫など様々ながんに対して、多くの場合は多剤併用で使われている。このような作用機序の異なる抗がん剤を用いて比較することにより、アミノ酸トータルバランスの変化に基づいて抗がん剤効果を判定できるかどうかを検討するだけでなく、抗がん剤の作用機序を区別できるような判定法となり得るかどうかについても検討することができる。

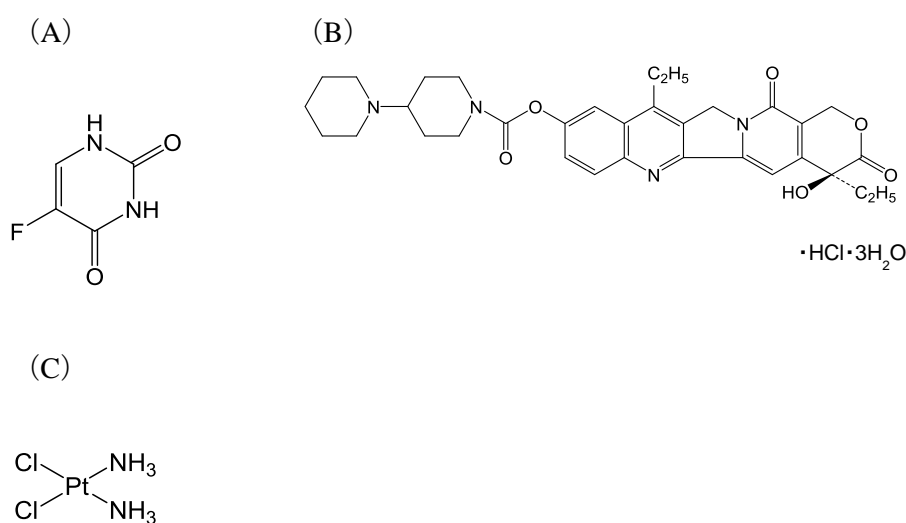


Fig.2-2 The structure of 5-FU (A), CPT-11 (B), and CDDP (C).

2-1. 各抗がん剤の colo201 に対する効果

2-1-1 細胞増殖測定用試薬 WST-1 による IC₅₀ の測定

WST-1 試薬はテトラゾリウム塩であり、細胞内の脱水素酵素によってホルマザンに変換される (Fig.2-3)。この酵素活性は培養中において代謝活性を有する細胞数と直接相関を示すため、生細胞数の定量などが可能である。今回は抗がん剤で処理したがん細胞の培養培地中に生成したホルマザンの吸光度を経時的に測定することで用量反応曲線を作成し、各抗がん剤の colo201 細胞に対する 50%抑制濃度 (IC₅₀) を求めた。

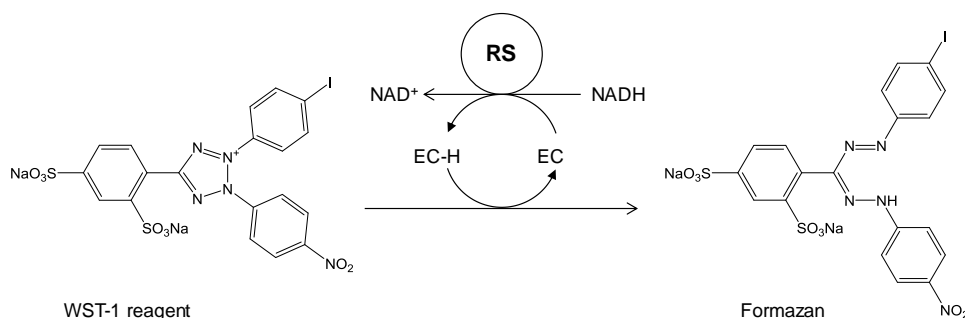


Fig.2-3 Principle of cell proliferation assay using WST-1 reagent. EC and RS represent electron coupling reagent and succinate-reductase system, respectively.

(1) 培養条件

10% FCS、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む RPMI 1640 を用いて、colo201 を 96 well plate に 1.25×10^5 cells/mL、100 μ L/well の密度で播種し、CO₂ インキュベーター内 37°Cにて培養した。播種後、3 種の抗がん剤 5-FU (0.1–50 μ g/mL)、CPT-11 (0.1–50 μ g/mL) および CDDP (0.1–50 μ g/mL) をそれぞれ別々に添加した時点を培養 0 時間とし、72 時間後にマイクロプレートリーダーを用いてホルマザンの吸光度 (測定波長 450 nm、リファレンス波長 655 nm) を測定し、WST-1 assay を行った。抗がん剤の代わりにジメチルスルホキシド (DMSO) を添加したものを対照とし、これらの結果を用いて、各抗がん剤の用量反応曲線を作成した。

(2) 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) 値

各抗がん剤とともに 72 時間培養した colo201 細胞内に生成したホルマザンの吸光度を、抗がん剤を添加しない場合の培地中ホルマザンの吸光度で除し、生存率 (%) とした。その生存率を縦軸に、横軸を各抗がん剤濃度とする用量反応曲線を作成したところ、各抗がん剤の colo201 に対する IC₅₀ は、5-FU で 13 μ g/mL、CPT-11 で 19 μ g/mL、CDDP で 15 μ g/mL (いずれも培地中での濃度) であった。そこで、アミノ酸メタボロミクスの実験では、これらの IC₅₀ を踏まえて、培地中での最終濃度が 5-FU は 10 μ g/mL、CPT-11

および CDDP は 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、各抗がん剤を colo201 培養培地に添加した。今回の検討では、あらかじめ抗がん剤による細胞増殖抑制効果が確認されている colo201 をモデル細胞とすることで、アミノ酸メタボロミクスが抗がん剤処理の有無を判定する手法として有用であるか検証する。設定した CDDP の投与濃度は、あらかじめ算出した IC_{50} よりも高い 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いたが、生存率が約 20% と非常に強い細胞増殖抑制効果を示す濃度であり、CDDP の効果が確認されている colo201 (モデル細胞) として用いることに問題はないと考えられる。

2-2. colo201 に対するアミノ酸メタボロミクス

2-2-1 基準操作

(1) 各抗がん剤を投与した colo201 の培養条件

10% FCS、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む RPMI 1640 を用いて、colo201 を 24 well plate に 5×10^4 cells/mL、1 mL/well の密度で播種した。培地中での最終濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう 5-FU 溶液を、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう CPT-11 溶液および CDDP 溶液をそれぞれ 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ で各 well に添加し、その後 CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養を行った。培地に抗がん剤を添加した時点を培養 0 時間とし、12、24、36、48 および 72 時間後に回収した浮遊細胞を含む培地をプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法にて分析した。第一章 1-3-1 「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準拠し、得られたデータについて多変量解析を行った。

(2) 多変量解析^{48,49)}

第一章の多変量解析の項に準拠し、検体のアミノ酸情報を可視化する手法として、PCA を利用した。得られた主成分の中から選び出した 2 つを座標軸とし、検体情報をスコアプロット上の 1 点に集約した。また、教師付き次元削減法として知られる、部分最小二乗分析 (Partial Least Squares ; PLS) による解析も実施した。PLS は、PCA と同様に複数の説明変数から新しい潜在変数を合成する手法であるが、変数の中に検体の「クラス情報を表す目的変数」が含まれており、この目的変数と説明変数の共分散が最大となるような潜在変数をつくりだす。PCA は検体の分布が出来るだけ大きくなるような指標でデータを表すことから、検体個々の差異を把握しやすい。これに対して PLS では、検体のクラス分けを重視した指標でデータを表すため、クラス未知の検体を分類できるような回帰モデルが得られる。各抗がん剤とともに 72 時間培養した colo201 培養培地中アミノ酸 21 種および NH_3 の経時的濃度データについて、PCA および PLS を実施した。

さらに、得られる各スコアプロットにおいて、検体を抗がん剤投与群および非投与群にグループ分けするための統計的手法として、判別分析 (discriminant analysis ; DA) およびクラスター分析 (cluster analysis ; CA) を用いた。クラスター分析とは、検体の中で互いに類似したものを集めてクラスターと呼ばれるグループにまとめる手法である。階層的な手法と非階層的な手法の2種類があり、今回はユーグリット平方距離を利用したウォード法による階層的クラスター分析を行い、得られたデンドログラム (樹形図) に従って検体をいくつかのグループに分類し、それぞれを枠で囲んだ。一方、判別分析とは予め2つのグループにクラス分けされた検体を用いて判別の境界線を求めておき、新たな検体がどちらのグループに属するかを判定する手法である。判別の基準となる境界線として、判別関数と呼ばれる直線とマハラノビス距離と呼ばれる曲線などいくつかの種類がある。今回は、PCA および PLS により合成された主成分のうちスコアプロット作成に使用した2つの主成分スコア値を総計解析ソフトウェア SPSS 15.0 Base system (SPSS Japan) に入力し、線形判別分析を行った。得られた判別関数および判別得点から検体のグループ分けを行い、Eq. 2-1 で定義した判別率の結果を用いて評価した。

$$\text{Eq.2-1 判別率(\%)} = \frac{\text{正しく判別された検体数}}{\text{全検体数}} \times 100$$

2-2-2 定量値

(1) 21種アミノ酸の定量値

培養培地中に含まれるアミノ酸のうち NH₃ および Trp を除く 21 種のアミノ酸について、第一章 1-3-1 「アミノ酸の定量値」 および 「濃度データの規格化」 に準じて算出した濃度を多変量解析における変数として用いた。Tables 2-1 および 2-2 には 5-FU を投与した場合の、Tables 2-3 および 2-4 には CPT-11 を投与した場合の、そして Tables 2-5 および 2-6 には CDDP を投与した場合の経時的な定量値を示す。

Table 2-1 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	214.9 \pm 5.0	229.5 \pm 3.5	221.7 \pm 2.1	233.2 \pm 3.5	241.0 \pm 4.7	266.3 \pm 3.5
Glu	265.3 \pm 1.9	290.7 \pm 2.2	273.1 \pm 1.9	292.5 \pm 3.2	302.4 \pm 3.6	335.9 \pm 2.8
HyPro	121.9 \pm 1.0	133.3 \pm 1.8	125.6 \pm 0.9	134.1 \pm 1.7	136.6 \pm 2.0	149.3 \pm 1.7
Ser	237.9 \pm 3.0	247.5 \pm 3.4	228.9 \pm 0.9	250.2 \pm 1.4	246.5 \pm 5.7	263.6 \pm 1.8
Asn	341.8 \pm 1.6	365.0 \pm 1.8	335.7 \pm 2.3	356.1 \pm 1.1	354.5 \pm 3.4	372.7 \pm 2.3
Gly	226.5 \pm 0.4	246.1 \pm 0.8	230.5 \pm 0.8	248.4 \pm 0.7	252.6 \pm 3.3	276.2 \pm 2.2
Gln	1226.7 \pm 4.8	1236.7 \pm 5.1	1119.4 \pm 3.3	1126.1 \pm 3.8	1091.6 \pm 3.5	1063.9 \pm 5.6
His	394.7 \pm 2.3	486.1 \pm 2.0	497.6 \pm 1.4	591.6 \pm 3.7	637.5 \pm 2.7	751.0 \pm 4.4
Thr	134.4 \pm 0.9	143.5 \pm 0.5	133.9 \pm 0.5	142.9 \pm 0.7	143.4 \pm 1.0	154.9 \pm 1.1
Arg	836.8 \pm 5.2	863.4 \pm 4.4	792.5 \pm 2.2	818.4 \pm 4.0	796.1 \pm 4.5	813.8 \pm 2.9
Ala	153.6 \pm 0.9	181.7 \pm 0.7	179.0 \pm 0.6	207.8 \pm 1.1	220.2 \pm 1.2	262.8 \pm 1.3
Pro	207.6 \pm 1.0	224.9 \pm 1.0	213.7 \pm 1.1	228.1 \pm 0.6	231.9 \pm 1.6	252.5 \pm 1.0
Tyr	86.3 \pm 0.7	92.1 \pm 0.4	87.3 \pm 0.4	93.7 \pm 0.1	94.0 \pm 0.4	102.1 \pm 0.6
(Cys) ₂	147.7 \pm 0.7	153.4 \pm 0.8	144.4 \pm 0.3	153.0 \pm 1.1	154.6 \pm 0.8	165.1 \pm 0.9
Val	152.8 \pm 1.1	162.7 \pm 0.5	154.1 \pm 0.5	164.2 \pm 0.7	165.2 \pm 1.1	178.8 \pm 1.1
Met	69.3 \pm 0.5	74.2 \pm 0.5	70.7 \pm 0.4	76.3 \pm 0.8	77.6 \pm 0.6	83.7 \pm 1.1
Ile	284.3 \pm 1.4	301.1 \pm 1.1	286.3 \pm 0.3	305.5 \pm 2.3	305.0 \pm 2.1	330.2 \pm 1.7
Orn	54.5 \pm 0.4	85.0 \pm 0.3	94.9 \pm 0.4	127.2 \pm 1.0	145.4 \pm 0.9	202.4 \pm 1.4
Leu	298.7 \pm 1.0	316.3 \pm 0.8	300.4 \pm 0.7	320.7 \pm 2.3	321.5 \pm 2.8	347.6 \pm 1.1
Lys	171.5 \pm 0.6	182.3 \pm 0.9	173.4 \pm 1.3	185.6 \pm 1.7	185.2 \pm 0.8	200.8 \pm 0.9
Phe	78.2 \pm 0.2	83.3 \pm 0.4	79.2 \pm 0.2	84.6 \pm 0.5	84.8 \pm 0.7	92.3 \pm 0.4

Table 2-2 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium without 5-FU treatment.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	189.4 \pm 1.2	207.8 \pm 1.1	212.4 \pm 2.5	224.3 \pm 0.8	227.4 \pm 1.5	227.1 \pm 0.4
Glu	253.2 \pm 2.2	272.6 \pm 0.9	283.5 \pm 3.0	301.9 \pm 2.0	312.7 \pm 1.8	352.1 \pm 2.9
HyPro	118.3 \pm 0.6	126.3 \pm 0.4	132.6 \pm 1.2	134.5 \pm 0.4	137.3 \pm 0.3	138.0 \pm 0.4
Ser	264.3 \pm 0.9	254.3 \pm 2.5	277.6 \pm 1.2	273.3 \pm 2.9	259.9 \pm 2.2	243.2 \pm 1.7
Asn	336.8 \pm 1.3	341.9 \pm 1.7	358.9 \pm 2.2	354.4 \pm 2.2	349.6 \pm 3.8	336.4 \pm 1.2
Gly	222.5 \pm 0.7	228.2 \pm 0.5	246.4 \pm 1.4	249.5 \pm 0.8	253.1 \pm 1.0	268.7 \pm 0.6
Gln	1221.9 \pm 6.8	1143.0 \pm 1.8	1148.1 \pm 4.2	1035.0 \pm 1.8	943.3 \pm 3.7	643.2 \pm 2.3
His	359.0 \pm 5.4	475.8 \pm 2.6	560.8 \pm 1.2	684.8 \pm 0.6	770.8 \pm 0.5	1017.8 \pm 1.8
Thr	132.4 \pm 0.2	134.0 \pm 0.8	142.2 \pm 0.7	138.9 \pm 0.9	140.2 \pm 1.0	130.6 \pm 0.6
Arg	856.0 \pm 1.9	840.8 \pm 3.5	851.0 \pm 1.7	812.2 \pm 5.0	805.4 \pm 6.2	735.5 \pm 4.3
Ala	152.1 \pm 0.4	187.5 \pm 1.0	220.0 \pm 1.0	265.8 \pm 1.4	313.6 \pm 2.0	456.1 \pm 3.2
Pro	202.5 \pm 0.9	213.4 \pm 1.3	225.1 \pm 0.6	226.9 \pm 0.4	233.0 \pm 1.2	238.2 \pm 0.7
Tyr	87.3 \pm 0.2	91.0 \pm 0.3	93.5 \pm 0.6	92.4 \pm 0.2	92.7 \pm 0.6	85.7 \pm 0.8
(Cys) ₂	144.5 \pm 1.0	147.4 \pm 0.6	151.3 \pm 1.1	150.7 \pm 0.9	151.9 \pm 1.1	145.2 \pm 1.2
Val	151.1 \pm 0.4	156.0 \pm 0.8	162.4 \pm 1.2	159.8 \pm 0.7	159.4 \pm 1.2	145.3 \pm 1.3
Met	68.7 \pm 0.4	71.9 \pm 0.8	75.0 \pm 0.4	77.2 \pm 0.7	74.6 \pm 0.9	69.7 \pm 1.1
Ile	276.2 \pm 1.9	285.3 \pm 1.1	308.0 \pm 1.7	302.5 \pm 0.7	300.2 \pm 1.6	279.5 \pm 1.3
Orn	54.2 \pm 0.5	82.0 \pm 0.2	103.5 \pm 0.5	129.9 \pm 0.8	150.8 \pm 1.1	190.0 \pm 1.5
Leu	287.9 \pm 2.9	297.1 \pm 0.8	319.0 \pm 1.7	313.5 \pm 0.9	312.0 \pm 2.0	286.1 \pm 1.9
Lys	169.8 \pm 0.5	174.8 \pm 0.2	185.7 \pm 1.4	182.5 \pm 0.6	181.7 \pm 0.6	166.3 \pm 1.0
Phe	76.2 \pm 0.3	79.0 \pm 0.4	84.8 \pm 0.5	84.0 \pm 0.3	83.8 \pm 0.4	77.3 \pm 0.5

Table 2-3 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium treated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CPT-11.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	238.2 \pm 4.3	249.4 \pm 5.5	278.0 \pm 14.1	250.1 \pm 2.2	252.7 \pm 3.8	265.7 \pm 3.6
Glu	329.7 \pm 3.1	332.9 \pm 4.7	349.0 \pm 8.1	344.2 \pm 1.4	348.9 \pm 2.6	386.6 \pm 1.9
HyPro	162.4 \pm 1.4	169.0 \pm 1.3	170.2 \pm 2.2	168.5 \pm 0.7	169.6 \pm 1.4	179.7 \pm 1.3
Ser	402.7 \pm 1.1	402.2 \pm 3.7	391.0 \pm 1.8	390.4 \pm 2.5	387.2 \pm 1.8	412.3 \pm 2.4
Asn	456.5 \pm 1.6	453.2 \pm 4.0	447.1 \pm 1.7	441.7 \pm 2.6	436.6 \pm 2.6	458.4 \pm 5.0
Gly	303.2 \pm 0.8	299.3 \pm 2.5	291.5 \pm 1.7	299.7 \pm 1.4	303.4 \pm 1.5	343.5 \pm 2.7
Gln	1330.0 \pm 2.3	1193.9 \pm 10.8	1066.3 \pm 3.7	973.7 \pm 6.4	928.7 \pm 4.5	774.5 \pm 6.8
His	817.4 \pm 7.1	900.5 \pm 1.4	921.7 \pm 9.6	1070.6 \pm 9.8	1181.2 \pm 9.3	1334.9 \pm 5.8
Thr	182.6 \pm 0.7	178.9 \pm 1.2	169.7 \pm 0.5	171.5 \pm 1.1	170.6 \pm 0.7	185.2 \pm 1.5
Arg	1128.9 \pm 3.3	1096.7 \pm 9.0	1024.6 \pm 3.5	1012.4 \pm 3.0	977.7 \pm 1.1	994.8 \pm 6.2
Ala	204.7 \pm 0.9	246.6 \pm 1.5	274.1 \pm 1.2	345.3 \pm 1.5	389.4 \pm 1.2	530.4 \pm 4.6
Pro	289.3 \pm 0.6	290.3 \pm 1.6	283.8 \pm 0.8	289.2 \pm 0.3	286.1 \pm 1.4	315.2 \pm 1.8
Tyr	119.2 \pm 0.3	118.1 \pm 0.8	115.2 \pm 0.6	114.9 \pm 0.1	113.7 \pm 0.5	120.9 \pm 0.8
(Cys) ₂	194.2 \pm 0.7	184.6 \pm 1.0	174.3 \pm 1.0	177.4 \pm 1.1	176.2 \pm 1.0	185.0 \pm 1.2
Val	208.0 \pm 0.3	202.9 \pm 1.5	195.9 \pm 0.7	194.5 \pm 0.9	191.1 \pm 0.8	202.4 \pm 1.2
Met	99.6 \pm 0.6	98.4 \pm 1.2	97.3 \pm 0.7	94.2 \pm 1.5	93.2 \pm 0.8	97.8 \pm 1.1
Ile	386.0 \pm 1.3	379.9 \pm 3.2	371.2 \pm 2.7	362.7 \pm 1.0	354.5 \pm 2.5	371.6 \pm 3.4
Orn	93.5 \pm 0.6	121.1 \pm 1.2	140.2 \pm 1.2	172.3 \pm 0.7	189.8 \pm 1.2	250.9 \pm 3.6
Leu	402.7 \pm 1.5	391.8 \pm 4.0	385.4 \pm 2.8	374.0 \pm 2.8	366.0 \pm 4.8	383.3 \pm 2.7
Lys	238.0 \pm 1.9	235.9 \pm 2.2	228.5 \pm 1.0	233.4 \pm 1.0	232.9 \pm 2.3	246.5 \pm 1.6
Phe	104.6 \pm 0.4	103.5 \pm 1.2	102.6 \pm 0.8	102.1 \pm 0.6	101.5 \pm 0.9	110.9 \pm 1.4

Table 2-4 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium without CPT-11 treatment.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	232.5 \pm 2.8	229.0 \pm 3.3	279.0 \pm 21.3	249.9 \pm 4.9	266.7 \pm 5.5	265.9 \pm 2.1
Glu	317.3 \pm 3.4	316.9 \pm 3.1	354.2 \pm 12.0	347.2 \pm 2.6	375.7 \pm 3.8	411.5 \pm 3.5
HyPro	161.5 \pm 3.1	159.3 \pm 1.2	172.9 \pm 2.9	168.7 \pm 1.3	179.3 \pm 1.0	186.0 \pm 2.1
Ser	391.4 \pm 1.6	384.8 \pm 1.5	397.4 \pm 2.9	376.9 \pm 4.2	384.7 \pm 2.5	356.6 \pm 3.4
Asn	441.4 \pm 1.5	433.6 \pm 2.0	452.2 \pm 2.5	440.7 \pm 2.9	449.7 \pm 4.7	454.1 \pm 3.2
Gly	290.4 \pm 2.2	292.5 \pm 0.9	298.9 \pm 2.7	296.2 \pm 0.4	319.0 \pm 1.8	364.2 \pm 2.3
Gln	1276.9 \pm 3.1	1156.4 \pm 3.0	1090.7 \pm 1.8	944.2 \pm 1.9	920.9 \pm 5.1	626.3 \pm 5.1
His	771.4 \pm 6.2	840.3 \pm 24.0	941.3 \pm 16.1	1042.2 \pm 5.3	1201.9 \pm 22.3	1480.8 \pm 20.5
Thr	175.2 \pm 0.7	174.6 \pm 0.5	127.4 \pm 1.4	166.3 \pm 0.4	172.2 \pm 1.1	168.9 \pm 0.9
Arg	1090.4 \pm 2.9	1056.1 \pm 1.7	173.8 \pm 0.7	997.5 \pm 1.9	1017.2 \pm 7.3	988.9 \pm 4.2
Ala	197.2 \pm 0.6	239.4 \pm 0.6	1049.5 \pm 2.8	338.9 \pm 0.9	413.3 \pm 2.2	626.2 \pm 2.7
Pro	284.0 \pm 2.2	281.5 \pm 1.5	278.5 \pm 1.1	290.8 \pm 0.7	305.2 \pm 1.4	328.4 \pm 1.9
Tyr	117.2 \pm 1.8	113.7 \pm 0.6	288.4 \pm 0.5	113.5 \pm 0.3	115.9 \pm 0.1	111.7 \pm 0.5
(Cys) ₂	188.5 \pm 0.9	179.8 \pm 1.4	116.1 \pm 0.2	177.6 \pm 1.3	182.0 \pm 1.4	183.1 \pm 2.4
Val	203.1 \pm 0.6	197.2 \pm 0.2	178.8 \pm 0.5	190.8 \pm 1.2	192.7 \pm 0.5	179.3 \pm 1.1
Met	97.2 \pm 1.3	95.9 \pm 0.7	197.4 \pm 0.5	91.8 \pm 1.8	94.5 \pm 1.1	88.6 \pm 1.5
Ile	377.4 \pm 2.2	367.3 \pm 2.1	97.4 \pm 0.4	360.1 \pm 1.3	369.1 \pm 2.9	349.5 \pm 1.9
Orn	89.2 \pm 0.7	118.0 \pm 1.2	374.3 \pm 1.0	172.7 \pm 1.5	204.6 \pm 0.7	258.8 \pm 1.3
Leu	393.6 \pm 4.2	381.7 \pm 1.3	144.2 \pm 0.7	370.9 \pm 1.5	375.8 \pm 1.9	350.5 \pm 1.4
Lys	228.4 \pm 1.7	228.0 \pm 1.9	387.2 \pm 1.1	227.9 \pm 1.3	235.1 \pm 2.6	218.9 \pm 2.6
Phe	102.5 \pm 1.7	99.96 \pm 0.5	231.6 \pm 0.9	100.3 \pm 0.4	102.2 \pm 0.6	99.1 \pm 1.1

Table 2-5 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium treated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDDP.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	202.4 \pm 3.5	210.9 \pm 1.6	209.3 \pm 1.8	224.9 \pm 2.7	221.3 \pm 1.7	246.7 \pm 1.5
Glu	262.9 \pm 1.7	275.6 \pm 2.5	272.7 \pm 2.3	299.9 \pm 1.6	297.8 \pm 3.6	331.8 \pm 2.0
HyPro	124.0 \pm 0.8	128.9 \pm 0.6	125.3 \pm 1.2	137.0 \pm 1.3	131.3 \pm 1.0	145.7 \pm 0.5
Ser	271.1 \pm 3.9	282.4 \pm 1.5	265.2 \pm 1.5	276.8 \pm 1.6	279.0 \pm 2.7	302.9 \pm 0.8
Asn	345.9 \pm 1.0	360.2 \pm 1.4	336.6 \pm 1.4	359.6 \pm 1.7	350.6 \pm 1.9	366.3 \pm 0.9
Gly	227.0 \pm 1.3	243.8 \pm 1.3	231.6 \pm 0.4	248.0 \pm 0.5	249.7 \pm 0.8	270.2 \pm 0.6
Gln	1242.5 \pm 3.1	1202.0 \pm 1.4	1097.2 \pm 3.1	1073.4 \pm 3.0	1017.1 \pm 3.4	938.4 \pm 2.8
His	371.4 \pm 4.1	534.1 \pm 1.9	563.1 \pm 3.0	701.4 \pm 0.4	752.4 \pm 4.5	919.2 \pm 2.0
Thr	133.8 \pm 0.7	141.1 \pm 0.8	132.7 \pm 0.6	142.4 \pm 0.7	141.8 \pm 0.8	151.0 \pm 1.0
Arg	864.7 \pm 5.5	854.4 \pm 3.0	796.5 \pm 3.0	827.6 \pm 4.8	790.5 \pm 4.1	807.0 \pm 2.1
Ala	154.3 \pm 1.0	194.2 \pm 1.1	201.5 \pm 1.2	251.4 \pm 1.2	268.2 \pm 1.3	349.8 \pm 1.6
Pro	207.0 \pm 0.7	220.4 \pm 0.4	210.6 \pm 0.9	227.1 \pm 1.1	225.3 \pm 0.7	246.1 \pm 0.9
Tyr	89.3 \pm 0.4	92.3 \pm 0.4	87.6 \pm 0.8	94.2 \pm 0.5	91.8 \pm 0.4	99.1 \pm 0.5
(Cys) ₂	147.2 \pm 0.8	147.7 \pm 0.8	141.4 \pm 1.0	151.5 \pm 0.9	148.2 \pm 1.0	157.2 \pm 0.8
Val	155.0 \pm 1.1	161.5 \pm 1.0	153.0 \pm 1.3	165.1 \pm 0.6	160.9 \pm 0.8	173.3 \pm 0.4
Met	70.0 \pm 0.5	65.9 \pm 0.4	63.1 \pm 1.0	68.0 \pm 0.2	64.0 \pm 0.4	69.6 \pm 0.3
Ile	283.0 \pm 1.2	304.0 \pm 2.1	287.6 \pm 1.0	312.6 \pm 2.4	300.9 \pm 0.8	321.8 \pm 1.6
Orn	55.2 \pm 0.3	86.2 \pm 0.5	98.3 \pm 0.4	135.3 \pm 1.1	149.0 \pm 1.1	206.3 \pm 1.0
Leu	296.1 \pm 0.8	316.7 \pm 2.0	300.2 \pm 1.9	326.2 \pm 0.8	314.1 \pm 1.0	332.9 \pm 2.0
Lys	174.6 \pm 0.5	183.9 \pm 1.0	174.4 \pm 1.1	189.6 \pm 1.3	183.8 \pm 0.7	196.2 \pm 0.8
Phe	78.6 \pm 0.6	83.8 \pm 0.4	79.4 \pm 0.6	85.9 \pm 0.7	83.7 \pm 0.3	89.3 \pm 0.5

Table 2-6 Concentration (μM) of 21 amino acids obtained from colo201 cell culture medium without CDDP treatment.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr
	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.	mean \pm S.D.
Asp	189.4 \pm 1.2	207.8 \pm 1.1	212.4 \pm 2.5	224.3 \pm 0.8	227.4 \pm 1.5	227.1 \pm 0.4
Glu	253.2 \pm 2.2	272.6 \pm 0.9	283.5 \pm 3.0	301.9 \pm 2.0	312.7 \pm 1.8	352.1 \pm 2.9
HyPro	118.3 \pm 0.6	126.3 \pm 0.4	132.6 \pm 1.2	134.5 \pm 0.4	137.3 \pm 0.3	138.0 \pm 0.4
Ser	264.3 \pm 0.9	254.3 \pm 2.5	277.6 \pm 1.2	273.3 \pm 2.9	259.9 \pm 2.2	243.2 \pm 1.7
Asn	336.8 \pm 1.3	341.9 \pm 1.7	358.9 \pm 2.2	354.4 \pm 2.2	349.6 \pm 3.8	336.4 \pm 1.2
Gly	222.5 \pm 0.7	228.2 \pm 0.5	246.4 \pm 1.4	249.5 \pm 0.8	253.1 \pm 1.0	268.7 \pm 0.6
Gln	1221.9 \pm 6.8	1143.0 \pm 1.8	1148.1 \pm 4.2	1035.0 \pm 1.8	943.3 \pm 3.7	643.2 \pm 2.3
His	359.0 \pm 5.4	475.8 \pm 2.6	560.8 \pm 1.2	684.8 \pm 0.6	770.8 \pm 0.5	1017.8 \pm 1.8
Thr	132.4 \pm 0.2	134.0 \pm 0.8	142.2 \pm 0.7	138.9 \pm 0.9	140.2 \pm 1.0	130.6 \pm 0.6
Arg	856.0 \pm 1.9	840.8 \pm 3.5	851.0 \pm 1.7	812.2 \pm 5.0	805.4 \pm 6.2	735.5 \pm 4.3
Ala	152.1 \pm 0.4	187.5 \pm 1.0	220.0 \pm 1.0	265.8 \pm 1.4	313.6 \pm 2.0	456.1 \pm 3.2
Pro	202.5 \pm 0.9	213.4 \pm 1.3	225.1 \pm 0.6	226.9 \pm 0.4	233.0 \pm 1.2	238.2 \pm 0.7
Tyr	87.3 \pm 0.2	91.0 \pm 0.3	93.5 \pm 0.6	92.4 \pm 0.2	92.7 \pm 0.6	85.7 \pm 0.8
(Cys) ₂	144.5 \pm 1.0	147.4 \pm 0.6	151.3 \pm 1.1	150.7 \pm 0.9	151.9 \pm 1.1	145.2 \pm 1.2
Val	151.1 \pm 0.4	156.0 \pm 0.8	162.4 \pm 1.2	159.8 \pm 0.7	159.4 \pm 1.2	145.3 \pm 1.3
Met	68.7 \pm 0.4	71.9 \pm 0.8	75.0 \pm 0.4	77.2 \pm 0.7	74.6 \pm 0.9	69.7 \pm 1.1
Ile	276.2 \pm 1.9	285.3 \pm 1.1	308.0 \pm 1.7	302.5 \pm 0.7	300.2 \pm 1.6	279.5 \pm 1.3
Orn	54.2 \pm 0.5	82.0 \pm 0.2	103.5 \pm 0.5	129.9 \pm 0.8	150.8 \pm 1.1	190.0 \pm 1.5
Leu	287.9 \pm 2.9	297.1 \pm 0.8	319.0 \pm 1.7	313.5 \pm 0.9	312.0 \pm 2.0	286.1 \pm 1.9
Lys	169.8 \pm 0.5	174.8 \pm 0.2	185.7 \pm 1.4	182.5 \pm 0.6	181.7 \pm 0.6	166.3 \pm 1.0
Phe	76.2 \pm 0.3	79.0 \pm 0.4	84.8 \pm 0.5	84.0 \pm 0.3	83.8 \pm 0.4	77.3 \pm 0.5

(2) アミノ酸濃度変化の比較

5-FU 群、CPT-11 群、CDDP 群および control 群の各アミノ酸について、培養開始時点の濃度と比較した培養時間ごとの濃度変化を Fig.2-4 にまとめた。

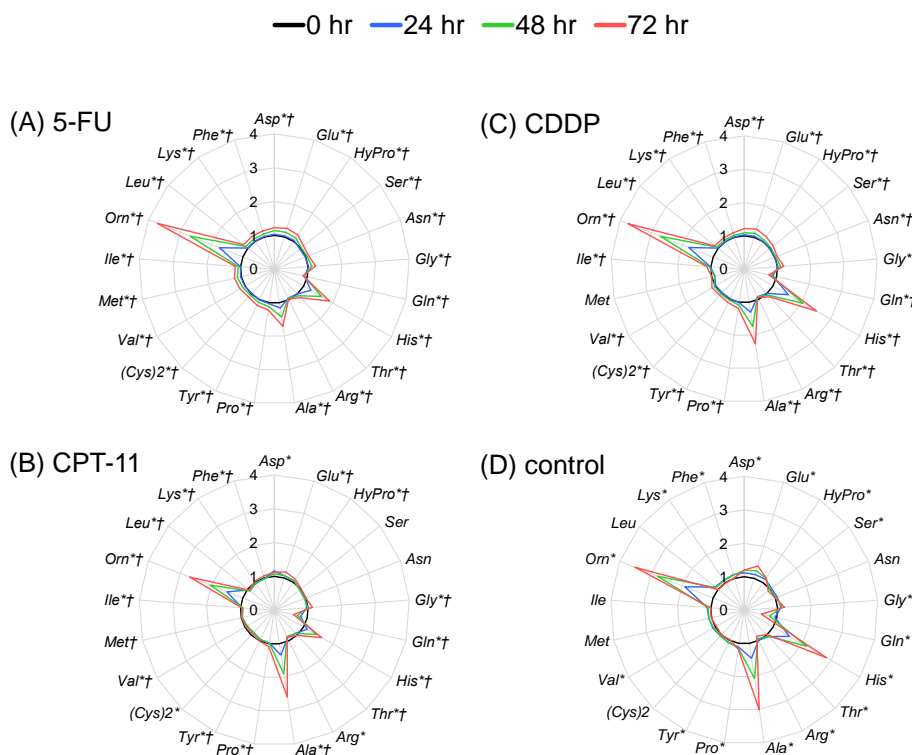


Fig.2-4 Change of each amino acid concentration compared to the initial concentration in colo201 cell culture medium treated with (A) 5-FU, (B) CPT-11, and (C) CDDP, and (D) control. * denotes amino acids whose concentration at 72 hr significantly increased or decreased compared to the initial concentration ($p < 0.05$). † denotes amino acids whose concentration significantly increased or decreased in comparison to the concentration measured under the control conditions ($p < 0.05$).

すべての条件において、培養液中の His、Ala および Orn 濃度に著しい変化が観測された。さらに、アミノ酸濃度が時間経過に伴って変化する割合は、薬剤投与群と control 群では異なっていた。例えば、control 72 時間検体における Ala 濃度は、0 時間における濃度に比べて 3 倍に増加した。一方、5-FU 群、CPT-11 群、CDDP 群それぞれの 72 時間検体における Ala 濃度は、1.7 倍、2.6 倍、2.3 倍にそれぞれ増加した。測定した 21 種アミノ酸濃度のうち、control 群 72 時間では 16 種 (Asn、(Cys)₂、Met、Ile、Leu を除く) が、5-FU 群 72 時間では全アミノ酸が、CPT-11 群 72 時間では 18 種 (Asn、Ser、Met を除く) が、そして CDDP 群 72 時間では 20 種 (Met を除く) が、0 時間検体における濃度と比べて有意に変化した (* $p < 0.05$)。また、薬剤投与群 72 時間検体と control 群 72 時間検体の濃度変動を比較すると、有意差が認められるアミノ酸も多くあった。5-FU 投与群では 21 種すべてが、CPT-11 投与群では 17 種 (Asp、Asn、Arg、(Cys)₂ を除く) が、

CDDP 投与群では 19 種 (Gly、Met を除く) が、control 群 72 時間検体における濃度に比べて有意な変化を示した ($\dagger p < 0.05$)。ただし、CDDP 投与群 72 時間検体の Met 濃度は、control 12 時間および 48 時間検体と比較した場合には有意な減少を示したものの、72 時間では control 検体との有意差は認められなかった。

各アミノ酸について、時間経過に伴う変化や薬剤投与による変化を確認したが、ほとんどのアミノ酸は変化が小さいため、21 種それぞれの濃度変化を比較するだけでは、検体間の違いを評価することは非常に困難であると考えられる。

2-2-3 5-FU を投与した colo201 の解析結果

(1) 5-FU を投与した colo201 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した。PC1 の寄与率は 63.6%、PC2 の寄与率は 28.5%、これらの累積寄与率は 92.1%と全体の傾向を十分に集約できていた。PC1 および PC2 スコアを利用してクラスター分析を行ったところ、培養時間が近いものが同一グループに分類される傾向がみられ、スコアプロット上で 5-FU 群と control 群を判別することは困難であった。判別分析による両群の判別も試みたが、こちらも 5-FU 群と control 群を明確に判別することはできなかった (判別率は 66.7%)。次に、5-FU 群と control 群を明確に区別するために PC1 と PC3 スコアを利用したところ、PC1 の寄与率は 63.6%、PC3 の寄与率は 5.7%、これらの累積寄与率は 69.3%のスコアプロットが得られた (Fig.2-5)。このスコアプロットについてクラスター分析を行ったが、5-FU 処理の有無を判別することは困難であった (Fig.2-5(A))。しかし、判別分析を行ったところ両群は境界線により判別率 100%で区別された (Fig.2-5(B))。ただし、5-FU 群および control 群の 0 時間検体は、ほぼ同じアミノ酸濃度組成であるにもかかわらず、別のグループとして判別されていた。この原因は不明だが、サンプルを準備する過程でのタイムラグにより生じる差を表している可能性も考えられる。

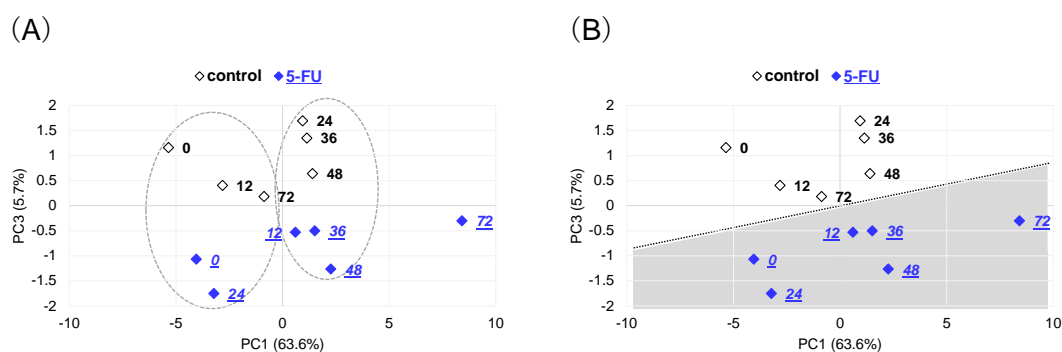


Fig.2-5 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without 5-FU for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr).

(2) 5-FU を投与した colo201 の PLS

PLS により得られた PC1 と PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した (Fig.2-6)。PC1 の寄与率は 52.2%、PC2 の寄与率は 29.1%、そして累積寄与率は 81.3%と全体の傾向を十分に説明できていた。このスコアプロットについて、クラスター分析による 5-FU 群と control 群の判別を試みたが、一目で両群を判別できる結果は得られなかった (Fig.2-6(A))。次に判別分析を行った場合、境界線により判別率 100%で両群を明確に区別することが可能であった (Fig.2-6 (B))。

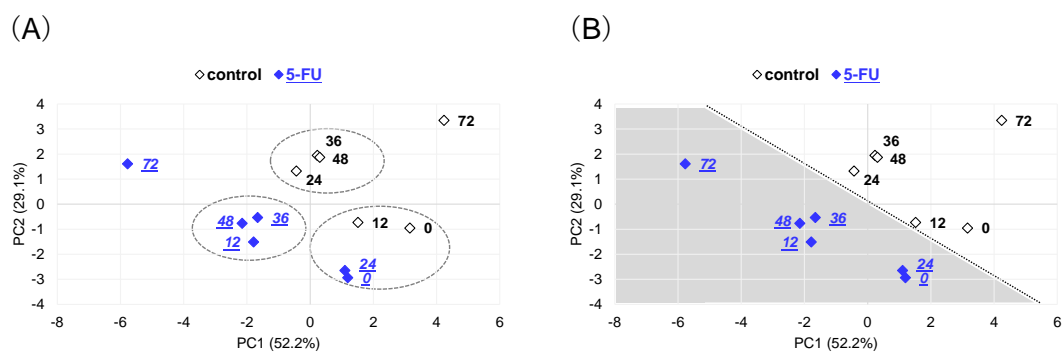


Fig.2-6 (A) PLS-CA and (B) PLS-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without 5-FU for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr)

2-2-4 CPT-11 を投与した colo201 の解析結果

(1) CPT-11 を投与した colo201 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した。PC1 の寄与率は 56.1%、PC2 の寄与率は 28.2%、これらの累積寄与率は 84.3%と全体の傾向を十分に集約できていた。各検体についてクラスター分析を行ったところ、培養時間の近いもの同士でグループを形成しており、CPT-11 群と control 群に分類することは困難であった。そこで、判別分析による両群の判別を試みたが、境界線による判別では両群ともに誤判別された検体が多かったため、判別率が 58.3%と低く、区別することはできなかった。そこで、CPT-11 群と control 群を一目で区別できるように、PC1 と PC3 スコアを利用したスコアプロットを作成した(PC1 の寄与率 56.1%、PC3 の寄与率 8.6%、累積寄与率 64.7%)。しかし、このスコアプロットにおいてもクラスター分析または判別分析による両群の判別は困難であった。そこでさらに、PC2 と PC3 スコアを利用したスコアプロットを作成した (Fig.2-7)。ただし、PC2 の寄与率は 28.2%、PC3 の寄与率は 8.6%、累積寄与率は 36.8%と全体の傾向を十分に説明できる値ではなかった。このスコアプロットに対してクラスター分析を行ったところ、特徴的な検体の分類傾向は示さなかった (Fig.2-7(A))。判別分析での区別を試みた結果、control 群の 24 および 48 時間検体と CPT-11 群 0 時間が誤判別されたため、判別率が 75.0%とやや低いが、2 群を判別することができた (Fig.2-7(B))。CPT-11 群および control 群の 0 時間は、ほぼ同一のアミノ酸濃度組成を示すため、CPT-11 群が誤判別されていても、問題はないと考えられる。

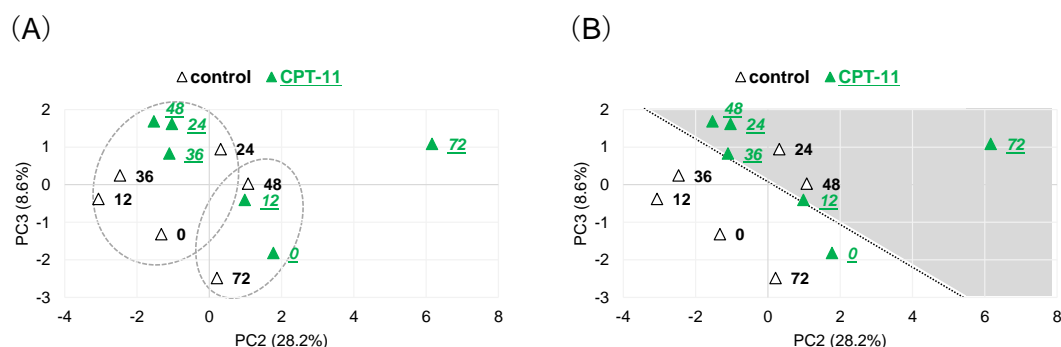


Fig.2-7 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without CPT-11 for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr).

(2) CPT-11 を投与した colo201 の PLS

PLS により得られた PC1 と PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した。PC1 の寄与率は 45.8%、PC2 の寄与率は 33.1%、累積寄与率は 78.9%と全体の傾向を十分に説明できていた。このスコアプロットについてクラスター分析を行ったところ、CPT-11 処理 72 時間検体を除き、大きく 2 つのグループに分けられた。しかし、培養時間の近い検体と同じグループに分類され、一目で CPT-11 群と control 群を区別することは困難であった。判別分析を行った場合も、原点付近に位置する 24 時間および 48 時間の検体などが誤判別され、判別率は 58.3%であった。つまり、判別分析においても両群を明確に区別できる境界線は得られなかった。そこで、CPT-11 群と control 群を区別するために PC1 と PC3 を軸としたところ、PC1 の寄与率は 45.8%、PC3 の寄与率は 13.7%、累積寄与率は 59.5%のスコアプロットが得られた (Fig.2-8)。これについてクラスター分析を行った結果、control 群 72 時間検体を除き、2 つのグループに分けることが出来た (Fig.2-8(A))。しかし、検体の分類に特徴的な傾向はなく、CPT-11 処理の有無を評価することはできなかった。一方、判別分析を行ったところ、Fig.2-8(B) に示すように原点付近にプロットされる検体の明確な区別が困難であり、境界線によって両群を明確に判別することは困難であった (判別率 75.0%)。

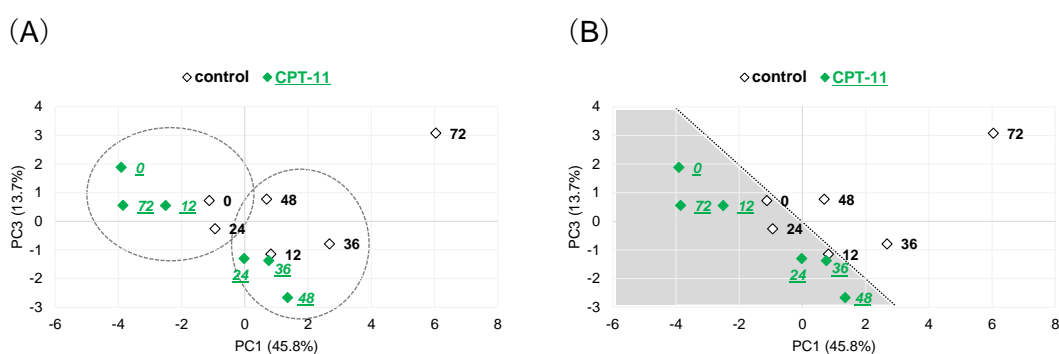


Fig.2-8 (A) PLS-CA and (B) PLS-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without CPT-11 for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr).

2-2-5 CDDP を投与した colo201 の解析結果

(1) CDDP を投与した colo201 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した。PC1 の寄与率は 60.5%、PC2 の寄与率は 30.7%、これらの累積寄与率は 91.2%と全体の傾向を十分に集約できていた。PC1 および PC2 スコアを利用してクラスター分析を行ったところ、両群の 72 時間検体を除いて大きく 2 つのグループに分類された。しかし、培養時間の差に依存した傾向を示し、CDDP 群と control 群を区別することは困難であった。そこで、判別分析による区別も試みたが、両群を明確に分類できる境界線は得られなかった。CDDP 群と control 群を区別するため、PC1 と PC3 スコアを利用したところ、PC1 の寄与率は 60.5%、PC3 の寄与率は 6.0%で、累積寄与率 66.5% のスコアプロットが得られた (Fig.2-9)。これについてクラスター分析を行ったところ、検体のグループ分けに CDDP 処理の影響は認められなかったため (Fig.2-9(A))、判別分析による分類を試みた。その結果、境界線により判別率 91.7%で両群が判別された (Fig.2-9(B))。このとき、CDDP 群 0 時間検体は control 群として誤判別されていたが、0 時間検体同士はほとんど同じアミノ酸組成を示すことから、同一グループとしてまとめられても特に問題はないと考えられる。

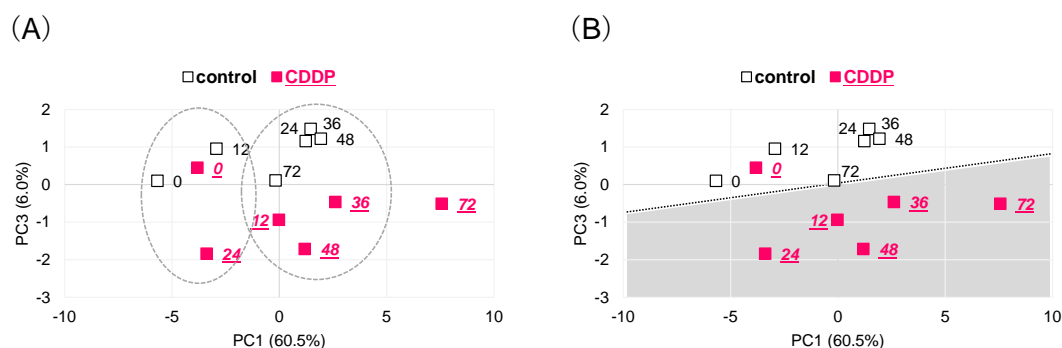


Fig.2-9 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without CDDP for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr).

(2) CDDP を投与した colo201 の PLS

PLS によって得られた PC1 と PC2 スコアからスコアプロットを作成したところ、PC1 の寄与率は 44.5%、PC2 の寄与率は 34.4%、累積寄与率は 78.9% と全体の傾向を十分に反映できているスコアプロットであった。これについてクラスター分析を行ったところ、大きく 3 つのグループに分類されたものの、一目で CDDP 群と control 群を判別することは困難であった。次に、判別分析を行った場合、境界線により判別率 83.3% で CDDP 群と control 群を判別できた。ただし、control 群 0 時間および 24 時間検体が誤判別されていたことから、より高い判別率となるスコアプロットを目指し、PC1 と PC3 スコアを利用した。その結果、PC1 の寄与率 44.5%、PC3 の寄与率 18.2%、累積寄与率 62.7% のスコアプロットが得られた (Fig.2-10)。これについてクラスター分析を行ったところ、control 群 72 時間検体を除き、2 つのグループに分類された (Fig.2-10(A))。この分類は CDDP 処理の有無に依存していた。次に、判別分析を行った結果、境界線により判別率 91.7% で両群は明確に区別された (Fig.2-10(B))。このとき、CDDP 群 0 時間検体は control 群として誤判別されていたが、特に問題はないと考えられる。

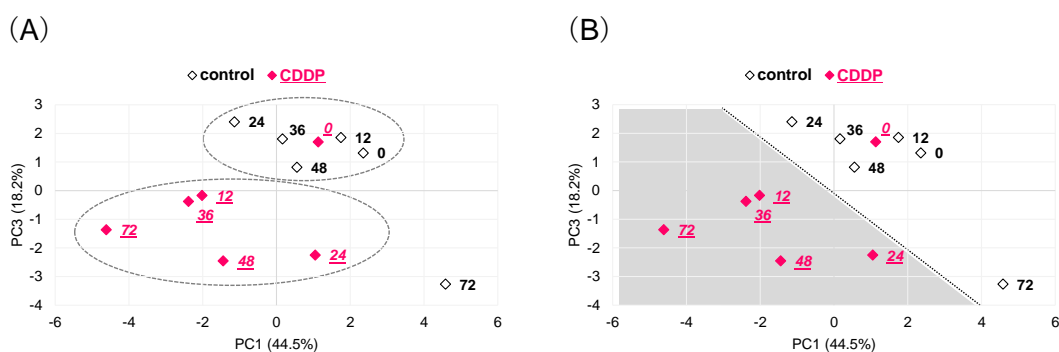


Fig.2-10 (A) PLS-CA and (B) PLS-DA score plots obtained from the analysis of colo201 cell culture medium treated with or without CDDP for 72 hr. Numerals indicate the incubation time (hr).

2-2-6 効果判定マーカー候補物質の同定

(1) 5-FU 効果判定マーカー候補物質の同定

Figs.2-5 および 2-6 で示された PCA および PLS スコアプロット上で、5-FU 群と control 群を判別することが可能であった。そこで、判別に寄与したアミノ酸について、各ローディングプロットから推定した (Fig.2-11)。PCA ローディングプロットにおいて、両群は境界線により 2 つの領域に分かれていたことから、PC3 係数 (絶対値) の大きなアミノ酸が判別に大きな影響を及ぼすと考えられる。つまり、PC3 係数の中で最大値を示す Ser および最小値を示す Asp の濃度変動が、判別に寄与したと推測された (Fig.2-11(A))。一方、PLS ローディングプロットでも、両群は右下がりの境界線によって区別されていたことから、PC1 係数および PC2 係数の両方で原点から離れた位置にある Ser および Asp の濃度変動が、判別に寄与したものであると推測された (Fig.2-11(B))。

マーカー候補物質として挙げられた Ser および Asp の濃度変動グラフを作成し、5-FU 群と control 群を比較したが、両群に大きな差は認められなかった (Fig.2-11(C))。また、培養時間の経過に伴って濃度が大きく変化することもなかった。

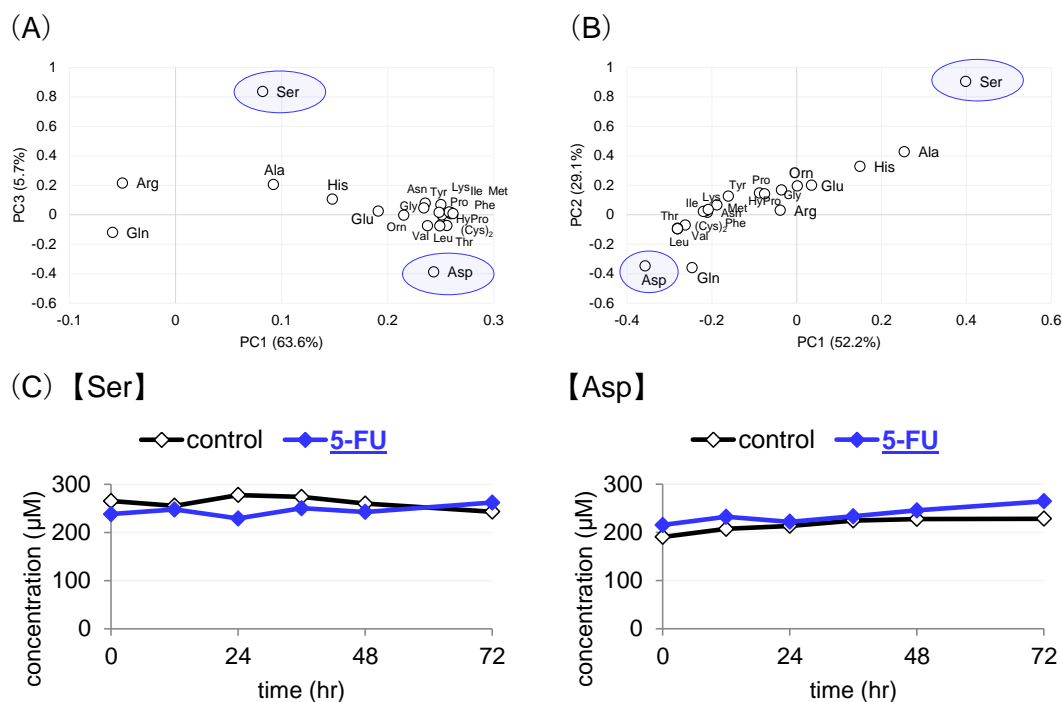


Fig.2-11 (A) PCA and (B) PLS loading plots given by the analysis presented in Figs.2-5 and 2-6, respectively. Plots show differences between control and 5-FU-treated groups. (C) Concentrations of Ser and Asp in colo201 cell culture medium treated with or without 5-FU.

(2) CPT-11 効果判定マーカー候補物質の同定

PCA および PLS スコアプロット上で CPT-11 群と control 群を明確に判別することは困難であったが、どちらのスコアプロットにおいても、両群は右下がりの境界線で区別される可能性が示唆された (Figs.2-7 および 2-8)。このとき寄与したアミノ酸について、各ローディングプロットから推定した (Fig.2-12)。PCA ローディングプロットでは、PC2 係数および PC3 係数の両方の値において比較的大きな値である Lys の濃度変動が判別に寄与するものと推測された (Fig.2-12(A))。一方、PLS ローディングプロットでも、PC1 係数および PC3 係数の両方で原点から離れた位置にある Lys の濃度変動が判別に寄与するものと推測された (Fig.2-12(B))。

マーカー候補物質として挙げられた Lys の濃度変動グラフを作成し (Fig.2-12(C))、CPT-11 群および control 群を比較したが、両群ともに培養時間の経過に伴って濃度が大きく変化することはなく、群間にほとんど差がないことも示された。

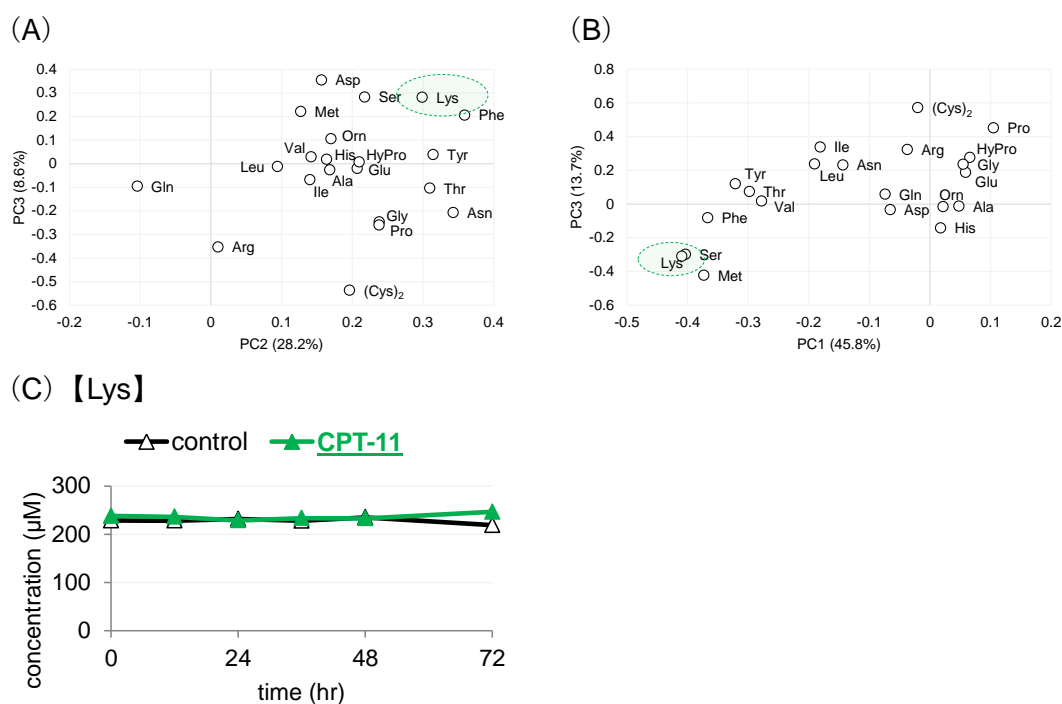


Fig.2-12 (A) PCA and (B) PLS loading plots given by the analysis presented in Figs.2-7 and 2-8, respectively. Plots show differences between control and CPT-11-treated groups. (C) Concentration of Lys in colo201 cell culture medium treated with or without CPT-11.

(3) CDDP 効果判定マーカー候補物質の同定

PCA および PLS スコアプロット上で CDDP 群と control 群を判別することが可能であった (Figs.2-9 および 2-10)。このとき寄与したアミノ酸について、各ローディングプロットから推定した (Fig.2-13)。PCA ローディングプロットでは、両群は境界線により 2 つの領域に分かれていたことから、PC3 係数 (絶対値) の大きなアミノ酸が判別に影響を及ぼしたと考えられる。つまり、PC3 係数の中で最高値を示す Met の濃度変動が判別に寄与するものと推測された (Fig.2-13(A))。一方、PLS ローディングプロットでも、両群が境界線により区別されていたことから、他のアミノ酸に比べて原点から最も離れた位置にある Met の濃度変動が大きく寄与するものと推測された (Fig.2-13(B))。

マーカー候補物質として挙げられた Met の濃度変動グラフを作成し (Fig.2-13(C))、CDDP 群および control 群を比較したが、両群間での濃度差および培養時間の経過に伴う変動がわずかに観測されただけであった。

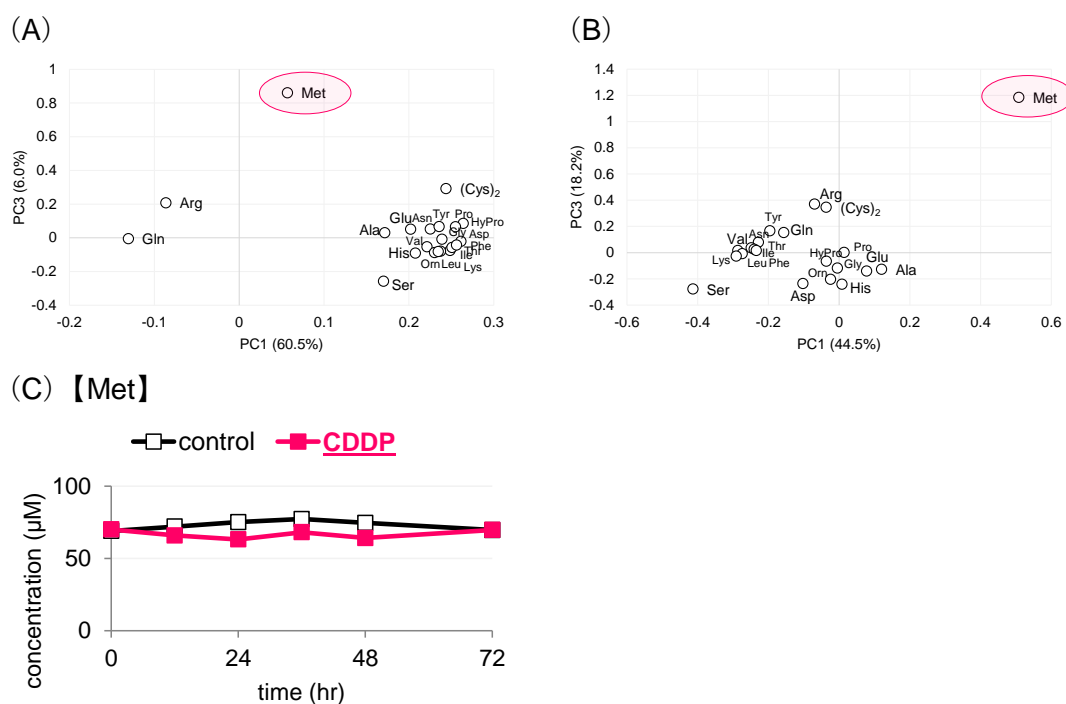


Fig.2-13 (A) PCA and (B) PLS loading plots given by the analysis presented in Figs.2-9 and 2-10, respectively. Plots show differences between control and CDDP-treated groups. (C) Concentration of Met in colo201 cell culture medium treated with or without CDDP.

2-3. まとめ

本章では、3種の抗がん剤を投与した colo201 を用いて培養培地中アミノ酸濃度を経時的に測定した。21種アミノ酸および NH₃ 濃度の網羅的な測定は、AccQ・Tag を用いるプレカラム誘導体化 LC-FL 法により実施した。相対的なアミノ酸組成（プロファイル）の差異を 2次元グラフ上の座標位置の違いとして表すための統計的手法として、PCA および PLS を用いることで抗がん剤の治療効果の視覚化を試みた。PCA および PLS で得られたスコアプロットにおける検体の培養時間の違いや抗がん剤投与の有無を判別するための統計的手法として CA や DA を用いた。CA では、3種の抗がん剤それぞれを投与した群と control 群間の違いを判別することは難しかったが、DA で作成できる判別直線（境界線）により両群の違いを視覚化することができた。さらに、抗がん剤効果の判別に利用できるようなマーカー候補として 3種のアミノ酸（Ser、Asp および Met）がローディングプロットから同定されたが、用いた抗がん剤の種類によって異なっていた。5-FU や CDDP を投与した場合に同定されたアミノ酸は、以前の報告⁵¹⁻⁵³⁾を支持していることから非常に興味深い結果であることが示唆された。しかしながら、抗がん剤の種類と同定されたアミノ酸の関係性を詳細に解明するためには、様々な作用機序を有する抗がん剤を用いて更なる検討を行うことが必要である。

第三章 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

1956年に Warburg が報告⁵⁴⁾した「ワーバーグ効果」は、周囲の酸素状態に関係なくがん細胞がエネルギー産生効率の低い嫌氣的解糖系により ATP 産生を行っている代謝状態を表しており、がん細胞のグルコース要求性が高い理由とされている。しかし、がん組織内部の細胞は異常な増殖スピードに対する血管新生が追い付かず、血流不足に陥っている。それゆえ、低酸素・栄養飢餓状態での細胞増殖を強いられている。実際に酸素電極を用いた計測で、がん組織の酸素濃度は正常組織に比べて低いことが示された^{55,56)}。このような過酷な環境下で生存し続けるために、がん細胞は正常細胞とは異なる代謝特性を示すことが、近年の研究で明らかにされている。低酸素状態は悪性腫瘍、特に固形がんにおいて一般的に認められる特徴であり、浸潤性や悪性化を促進する要因^{57,58)}としても考えられている。がんの特異的な代謝特性は、がん細胞が過酷な環境でも生き抜くための術である一方で、抗がん剤の作用発現に影響を及ぼす原因でもあり得る。例えば、Hirayama らは CE-MS を利用したメタボロミクスにより、低酸素環境と正常酸素環境では、がん細胞の代謝が異なることを示し、最終的には抗がん剤への応答性において、差異を生じさせる可能性があることを報告している⁵⁹⁾。さらに Onozuka らも、腫瘍微小環境を模倣した低酸素・グルコース飢餓状態で培養されたヒト膵臓がん由来細胞株 PANC-1 などにおいて、抗がん剤効果の低下を確認した⁶⁰⁾。つまり、抗がん剤の効果は腫瘍微小環境に強く影響を受ける⁶¹⁻⁶⁴⁾。しかしながら、低酸素やグルコース欠乏状態による薬剤耐性の発生機序は未だ十分に理解されておらず、メタボロミクス解析により新たな知見を提供することも可能であると期待される。

第二章で、3種の抗がん剤で処理された colo201 細胞に対して行ったアミノ酸メタボロミクスにより、スコアプロット上で抗がん剤の効果判定が可能であることが示唆された。そこで本法の抗がん剤効果判定法としての有用性をさらに検証すべく、本章では腫瘍微小環境を模倣した低酸素・グルコース欠乏状態に曝されながら抗がん剤を投与したヒト大腸がん由来細胞株 DLD-1 に対して本法を適用し、培養環境に依存することなく、がん細胞の抗がん剤感受性に及ぼす影響を評価できるか検討した。

大腸がんに対する適応が認められている抗がん剤 5-FU とともに培養した DLD-1 細胞について、培養培地中のアミノ酸濃度変化を LC-MS/MS 分析により測定した。得られた経時的濃度変化データについて PCA によりスコアプロット上で検体の分類傾向を評価し、抗がん剤の効果判定するために CA および DA による解析も実施した。また、ローディングプロットを用いて、5-FU 投与の有効性やがん細胞の応答を評価するために有用な潜在的なバイオマーカー候補となり得るアミノ酸の同定を行った。

3-1. 抗がん剤 5-FU の DLD-1 に対する効果

(1) 培養条件

10% ウシ胎児血清 (FBS)、1% カナマイシン硫酸塩、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 5-FU (0.1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含むグルコース含有 RPMI 1640 を用いて、DLD-1 を 96 well plate に 7.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/well の密度で播種し、通常酸素酸素 (21% O_2) 状態で CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養した。播種した時点を培養 0 時間とし、72 時間後に MTT assay を行い、用量反応曲線を作成した。

(2) 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) 値

5-FU は DLD-1 に対して濃度依存的に増殖抑制効果を示し、用量反応曲線から培養 72 時間後の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算出したところ、21.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これを踏まえて、アミノ酸メタボロミクスの実験では増殖抑制率が 50% 程度で、溶液の調製が簡便となるように、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を投与濃度とした。

(3) 5-FU (IC_{50}) を投与した DLD-1 の培養条件

10% FBS、1% カナマイシン硫酸塩、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 5-FU (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含むグルコース不含 RPMI 1640 を用いて、DLD-1 を 96 well plate に 7.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/well の密度で播種し、低酸素 (5% O_2) 状態で CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養した。対照として、10% FBS、1% カナマイシン硫酸塩、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 5-FU (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含むグルコース含有 RPMI 1640 を用いて DLD-1 を 96 well plate に播種し、通常酸素酸素 (21% O_2) 状態で CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養した。72 時間後に MTT assay を行い、細胞生存率を算出した。

(4) 細胞生存率

通常酸素・グルコース豊富状態または低酸素・グルコース欠乏状態で 5-FU 投与したときの control (5-FU 非投与) に対する相対的な生存率を Fig.3-1 に示す。通常酸素・グルコース豊富状態では、約 55% の増殖抑制効果がみられた。しかし、低酸素・グルコース欠乏状態では、約 5% の増殖抑制しか示さなかった。つまり、低酸素・グルコース欠乏状態による 5-FU の作用低下が見られた。

このような 5-FU に対する耐性を発現した要因を探るべく、トリパンブルー染色法によって染色されなかった生細胞数の直接計測を行った。通常酸素・グルコース豊富状態では、初期密度 (播種した密度) の 7.5×10^4 cells/mL から 48 時間後には 23×10^4 cells/mL

へ増加していた。これに対して低酸素・グルコース欠乏状態では、48 時間後でも大きな変化が見られなかった (8.0×10^4 cells/mL)。さらに、どちらの培養環境においてもトリパンブルーで染色された死細胞はほとんど観測されなかったことから、低酸素・グルコース欠乏状態では DLD-1 の増殖そのものが強く抑制されていることが推測された。5-FU の細胞障害活性の作用機序として、フッ素化されたヌクレオシドが誤って RNA や DNA に取り込まれ、最終的にチミジル酸合成酵素などのヌクレオチド合成酵素を阻害⁶⁵⁾ することが知られている。つまり、代謝速度が速い細胞に対して特に強い効果を発揮するため、微小環境を模倣した状態で培養された DLD-1 は、細胞増殖 (代謝) が抑制されたことにより薬剤耐性を生じたのではないかと考えられる。このように培養環境の違いによって 5-FU に対する感受性に変化が生じている DLD-1 について、アミノ酸メタボロミクスによる評価を試みた。

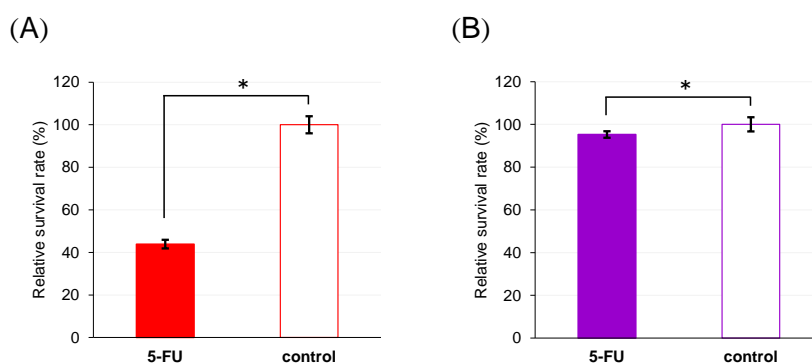


Fig.3-1 Relative survival rate of the DLD-1 cells treated with or without 5-FU under (A) normoglycemic/normoxic and (B) hypoglycemic/hypoxic conditions. Relative survival rate is shown as a percentage of the control under each condition. Data represent the mean \pm SD ($n = 10$, $*p < 0.05$).

3-2. DLD-1 に対するアミノ酸メタボロミクス

3-2-1 基準操作

(1) 5-FU を投与した DLD-1 の培養条件

10% FBS、1%カナマイシン硫酸塩、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 5-FU (20 μ g/mL) を含むグルコース不含 RPMI 1640 を用いて、DLD-1 を 96 well plate に 7.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/well の密度で播種し、低酸素 (5% O_2) 状態で CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養した。対照として、10% FBS、1%カナマイシン硫酸塩、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液および 5-FU (20 μ g/mL) を含むグルコース含有 RPMI 1640 を用いて DLD-1 を 96 well plate に播種し、通常酸素酸素 (21% O_2) 状態で CO_2 インキュベーター内 37°C にて培養した。播種した時点を培養 0 時間とし、その後、12、24、36、48、60 および 72 時間後

に回収した培地を培地試料として LC-MS/MS 分析を行った。第一章 1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準拠し、得られたデータについて多変量解析を行った。

(2) 多変量解析

第一章の多変量解析の項に準拠し、検体のアミノ酸情報を可視化する手法として、PCA を利用した。さらに、得られるスコアプロットにおける検体の分類に DA および CA を用いた。PCA により得られた合成指標のうちスコアプロット作成に使用した2つのスコア値を SPSS 15.0 Base system に入力し、線形判別分析を行った。得られた判別関数から検体のグループ分けを行い、Eq.3-1 で定義した判別率の結果を用いて評価した。

$$\text{Eq.3-1 判別率(\%)} = \frac{\text{正しく判別された検体数}}{\text{全検体数}} \times 100$$

3-2-2 定量値

培養培地中に含まれるアミノ酸のうち 20 種について、第一章 1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準じて算出した濃度を多変量解析における変数として用いた。Table 3-1 および 3-2 には通常酸素・グルコース豊富状態で培養した場合の、Table 3-3 および 3-4 には低酸素・グルコース欠乏状態で培養した場合の経時的な定量値を示す。

Table 3-1 Concentration (μM) of 20 amino acids obtained from analysis of DLD-1 cell culture medium treated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU under normoglycemic/normoxic conditions ($n = 3$).

	0 hr		12 hr		24 hr		36 hr		48 hr		60 hr		72 hr	
	mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD	
Trp	16.0 \pm 2.2		27.3 \pm 3.0		28.0 \pm 1.7		24.7 \pm 1.2		24.2 \pm 0.3		22.6 \pm 0.3		13.1 \pm 3.9	
Phe	92.5 \pm 4.0		102.0 \pm 5.2		100.0 \pm 5.2		97.6 \pm 2.2		98.6 \pm 1.9		93.5 \pm 3.6		97.4 \pm 6.1	
Tyr	112.9 \pm 8.6		167.7 \pm 12.6		152.8 \pm 9.5		166.6 \pm 9.6		168.5 \pm 0.1		163.1 \pm 5.5		108.7 \pm 24.7	
Leu	349.1 \pm 19.2		364.6 \pm 11.1		345.7 \pm 15.0		341.4 \pm 19.0		340.9 \pm 2.7		329.0 \pm 9.5		353.5 \pm 11.9	
Met	78.4 \pm 7.1		94.3 \pm 3.9		86.7 \pm 8.1		89.8 \pm 5.1		91.4 \pm 0.8		83.1 \pm 3.3		73.1 \pm 6.9	
Ile	319.9 \pm 20.9		327.7 \pm 17.1		316.9 \pm 16.6		295.0 \pm 17.5		299.1 \pm 6.7		283.7 \pm 14.1		307.5 \pm 12.3	
Val	179.7 \pm 11.7		205.0 \pm 7.0		199.2 \pm 4.3		195.9 \pm 8.3		200.4 \pm 1.5		186.7 \pm 0.8		176.2 \pm 10.8	
Glu	315.9 \pm 11.8		364.7 \pm 19.2		369.7 \pm 20.7		343.2 \pm 11.0		377.9 \pm 15.0		374.8 \pm 17.4		428.7 \pm 20.8	
Pro	323.8 \pm 7.2		416.0 \pm 18.4		396.6 \pm 11.8		336.5 \pm 26.0		338.4 \pm 9.2		313.1 \pm 10.7		320.1 \pm 28.1	
Asp	220.5 \pm 19.0		233.1 \pm 16.1		236.9 \pm 34.9		178.0 \pm 8.5		184.0 \pm 32.1		166.5 \pm 9.4		212.9 \pm 34.8	
Thr	150.6 \pm 10.7		223.4 \pm 10.6		201.9 \pm 10.1		189.2 \pm 12.3		178.2 \pm 4.0		164.7 \pm 7.4		137.0 \pm 15.3	
Ala	257.4 \pm 19.4		344.2 \pm 16.4		358.4 \pm 30.6		383.5 \pm 26.1		408.5 \pm 4.9		399.5 \pm 9.2		320.4 \pm 44.7	
Ser	374.8 \pm 27.9		484.3 \pm 22.7		456.2 \pm 36.0		410.8 \pm 25.9		422.9 \pm 7.7		409.0 \pm 29.1		328.1 \pm 29.3	
Gln	4251.0 \pm 325.7		6591.3 \pm 438.2		4980.7 \pm 381.4		4735.7 \pm 280.3		4309.2 \pm 170.6		3972.7 \pm 146.6		2300.6 \pm 603.0	
Gly	179.8 \pm 126.5		190.3 \pm 64.4		118.1 \pm 67.1		407.6 \pm 134.4		330.7 \pm 133.6		357.7 \pm 202.1		280.6 \pm 354.3	
Asn	935.6 \pm 85.3		1188.1 \pm 80.0		1134.6 \pm 68.6		1069.3 \pm 72.1		1025.6 \pm 91.5		934.8 \pm 59.9		658.4 \pm 281.8	
(Cys) ₂	173.7 \pm 9.5		327.0 \pm 36.4		200.7 \pm 12.7		160.9 \pm 10.2		149.1 \pm 10.0		135.3 \pm 5.5		120.2 \pm 12.6	
His	115.3 \pm 11.3		127.8 \pm 9.8		106.7 \pm 6.8		88.5 \pm 1.8		95.1 \pm 6.9		90.6 \pm 3.6		101.2 \pm 14.7	
Lys	220.0 \pm 4.1		237.9 \pm 24.9		230.6 \pm 25.8		197.8 \pm 7.9		201.2 \pm 11.2		198.2 \pm 3.6		229.6 \pm 6.1	
Arg	667.3 \pm 33.4		833.5 \pm 72.8		743.3 \pm 111.0		736.9 \pm 45.4		583.5 \pm 11.8		558.3 \pm 19.8		832.4 \pm 46.2	

Table 3-2 Concentration (μM) of 20 amino acids obtained from analysis of DLD-1 cell culture medium under normoglycemic/normoxic conditions without 5-FU treatment ($n = 3$).

	0 hr		12 hr		24 hr		36 hr		48 hr		60 hr		72 hr	
	mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD	
Trp	11.0 \pm 2.8		29.4 \pm 1.1		24.3 \pm 1.7		19.7 \pm 1.8		14.1 \pm 1.7		8.5 \pm 1.4		N.D. \pm 0.7	
Phe	95.7 \pm 2.0		105.9 \pm 1.6		97.1 \pm 2.0		81.9 \pm 2.0		68.8 \pm 2.3		55.5 \pm 3.4		34.0 \pm 1.8	
Tyr	88.5 \pm 12.4		168.1 \pm 8.7		145.0 \pm 8.8		130.6 \pm 4.3		132.0 \pm 6.7		115.8 \pm 4.8		59.8 \pm 2.6	
Leu	340.3 \pm 17.6		352.1 \pm 18.9		330.0 \pm 15.0		294.1 \pm 5.3		276.6 \pm 14.4		239.4 \pm 12.2		193.1 \pm 8.9	
Met	69.1 \pm 7.3		94.9 \pm 5.2		83.5 \pm 5.7		68.0 \pm 0.7		58.8 \pm 3.0		42.4 \pm 4.4		12.6 \pm 3.1	
Ile	305.0 \pm 10.4		333.0 \pm 13.4		315.4 \pm 11.4		287.5 \pm 6.6		251.6 \pm 10.6		237.0 \pm 6.2		212.8 \pm 11.0	
Val	186.0 \pm 7.1		205.4 \pm 3.4		193.5 \pm 11.1		161.3 \pm 2.3		143.2 \pm 10.0		105.2 \pm 9.0		60.4 \pm 3.4	
Glu	298.3 \pm 4.4		351.4 \pm 7.4		362.8 \pm 5.5		362.0 \pm 19.9		351.2 \pm 24.5		357.3 \pm 6.8		355.0 \pm 23.5	
Pro	320.3 \pm 16.2		406.6 \pm 22.9		400.7 \pm 12.1		371.4 \pm 11.1		309.9 \pm 12.7		313.4 \pm 9.9		333.0 \pm 19.5	
Asp	264.0 \pm 19.8		245.1 \pm 19.4		229.8 \pm 3.8		189.7 \pm 4.6		128.1 \pm 19.5		76.6 \pm 19.1		40.7 \pm 15.9	
Thr	166.7 \pm 2.7		218.9 \pm 15.2		192.4 \pm 13.0		168.7 \pm 5.1		138.0 \pm 5.2		114.3 \pm 5.0		74.7 \pm 2.5	
Ala	287.4 \pm 4.0		338.0 \pm 20.6		352.3 \pm 12.3		363.6 \pm 9.2		412.1 \pm 28.6		477.0 \pm 12.9		483.8 \pm 12.1	
Ser	361.5 \pm 23.5		483.7 \pm 6.9		433.2 \pm 2.9		356.5 \pm 14.0		277.7 \pm 15.5		183.1 \pm 18.4		87.7 \pm 9.6	
Gln	4627.5 \pm 165.2		6389.0 \pm 256.6		4934.7 \pm 111.5		4074.7 \pm 19.5		3655.5 \pm 228.0		3207.1 \pm 76.9		1647.8 \pm 12.6	
Gly	145.5 \pm 162.1		189.3 \pm 76.1		224.4 \pm 64.9		318.9 \pm 141.9		295.3 \pm 247.7		440.7 \pm 185.0		506.8 \pm 155.0	
Asn	978.2 \pm 27.0		1165.0 \pm 110.1		1117.6 \pm 56.8		991.8 \pm 49.9		896.3 \pm 93.9		899.7 \pm 45.6		711.4 \pm 28.7	
(Cys) ₂	179.7 \pm 11.0		338.1 \pm 15.6		175.1 \pm 25.4		168.0 \pm 5.9		139.8 \pm 8.3		125.2 \pm 8.9		100.0 \pm 8.6	
His	120.9 \pm 7.8		125.3 \pm 1.3		107.8 \pm 5.9		98.6 \pm 7.7		69.3 \pm 1.3		66.6 \pm 3.7		68.7 \pm 3.4	
Lys	210.8 \pm 9.9		237.8 \pm 5.1		217.7 \pm 22.8		175.4 \pm 2.6		141.6 \pm 15.4		121.1 \pm 15.9		83.9 \pm 7.3	
Arg	682.2 \pm 38.2		794.8 \pm 26.6		707.0 \pm 84.6		587.8 \pm 36.9		473.3 \pm 44.8		441.6 \pm 7.3		504.5 \pm 60.2	

N.D. means not detected.

Table 3-3 Concentration (μM) of 20 amino acids obtained from analysis of DLD-1 cell culture medium treated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU under hypoglycemic/hypoxic conditions ($n = 3$).

	0 hr		12 hr		24 hr		36 hr		48 hr		60 hr		72 hr	
	mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD	
Trp	24.9 \pm	3.9	23.4 \pm	1.2	26.3 \pm	2.4	27.1 \pm	2.6	23.9 \pm	0.9	19.3 \pm	5.5	15.8 \pm	1.3
Phe	101.0 \pm	5.3	104.2 \pm	3.5	107.9 \pm	6.4	104.0 \pm	6.1	99.5 \pm	5.6	102.8 \pm	4.3	102.7 \pm	2.7
Tyr	159.6 \pm	12.0	151.5 \pm	8.8	164.9 \pm	4.5	177.0 \pm	4.7	166.5 \pm	2.9	133.4 \pm	21.1	120.6 \pm	1.5
Leu	343.5 \pm	20.7	358.3 \pm	29.8	361.8 \pm	16.6	368.9 \pm	11.4	352.5 \pm	13.7	358.7 \pm	23.5	391.6 \pm	6.9
Met	92.9 \pm	8.5	89.8 \pm	8.5	92.3 \pm	4.8	97.1 \pm	6.6	90.9 \pm	1.5	79.9 \pm	4.6	84.0 \pm	2.6
Ile	313.1 \pm	17.6	334.9 \pm	32.5	344.8 \pm	8.0	320.4 \pm	10.9	307.0 \pm	1.3	322.3 \pm	15.8	352.4 \pm	12.9
Val	194.5 \pm	12.3	209.6 \pm	19.8	214.3 \pm	5.4	220.0 \pm	8.1	204.5 \pm	9.1	201.7 \pm	8.9	208.6 \pm	10.3
Glu	325.1 \pm	27.1	346.4 \pm	16.1	410.3 \pm	13.5	412.5 \pm	23.8	449.9 \pm	7.5	503.6 \pm	36.9	517.2 \pm	16.8
Pro	381.4 \pm	35.9	400.9 \pm	28.5	413.2 \pm	16.9	340.8 \pm	14.1	323.1 \pm	18.8	322.0 \pm	11.3	322.6 \pm	15.3
Asp	230.6 \pm	16.1	226.6 \pm	14.7	250.8 \pm	15.3	212.1 \pm	10.6	198.4 \pm	3.2	246.6 \pm	15.3	266.0 \pm	72.6
Thr	222.1 \pm	15.0	203.1 \pm	17.3	208.2 \pm	2.9	193.1 \pm	4.4	181.9 \pm	11.7	159.2 \pm	23.4	146.7 \pm	1.9
Ala	326.3 \pm	16.3	321.2 \pm	29.3	327.9 \pm	11.9	337.0 \pm	6.4	328.7 \pm	9.8	294.8 \pm	36.3	262.7 \pm	8.9
Ser	470.4 \pm	36.0	471.9 \pm	42.6	462.9 \pm	18.1	445.2 \pm	4.4	413.9 \pm	23.0	359.0 \pm	7.8	354.5 \pm	11.5
Gln	6769.5 \pm	301.9	5086.5 \pm	440.1	4592.6 \pm	183.0	4173.1 \pm	141.3	3257.3 \pm	51.1	2024.8 \pm	421.9	1423.6 \pm	69.3
Gly	269.7 \pm	223.8	121.4 \pm	52.9	302.1 \pm	99.2	360.1 \pm	167.6	340.6 \pm	198.4	1106.3 \pm	161.9	839.4 \pm	435.6
Asn	1162.2 \pm	16.2	1149.4 \pm	166.4	1112.1 \pm	61.8	1043.4 \pm	35.2	981.5 \pm	111.8	834.7 \pm	75.9	792.4 \pm	77.5
(Cys) ₂	347.1 \pm	29.5	220.3 \pm	32.6	193.2 \pm	13.7	152.8 \pm	5.9	134.7 \pm	9.0	118.3 \pm	13.6	122.4 \pm	7.5
His	123.5 \pm	5.2	119.3 \pm	8.5	115.3 \pm	9.8	84.2 \pm	2.5	91.1 \pm	12.4	94.3 \pm	9.9	103.9 \pm	10.1
Lys	231.1 \pm	10.0	222.3 \pm	6.3	236.4 \pm	14.7	227.2 \pm	16.0	215.4 \pm	17.3	227.0 \pm	17.9	235.1 \pm	14.4
Arg	745.1 \pm	52.2	694.1 \pm	71.2	721.7 \pm	66.8	614.2 \pm	23.7	555.6 \pm	42.9	762.8 \pm	32.8	848.1 \pm	55.3

Table 3-4 Concentration (μM) of 20 amino acids obtained from analysis of DLD-1 cell culture medium under hypoglycemic/hypoxic conditions without 5-FU treatment ($n = 3$).

	0 hr		12 hr		24 hr		36 hr		48 hr		60 hr		72 hr	
	mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD		mean \pm SD	
Trp	16.8 \pm	7.7	23.0 \pm	2.2	25.1 \pm	1.8	28.5 \pm	1.4	25.3 \pm	1.2	25.9 \pm	3.6	16.8 \pm	1.4
Phe	97.3 \pm	10.1	99.9 \pm	2.0	108.2 \pm	5.6	104.0 \pm	3.4	103.0 \pm	2.9	103.4 \pm	6.4	108.1 \pm	4.8
Tyr	124.7 \pm	35.4	153.7 \pm	5.0	155.5 \pm	6.3	179.8 \pm	11.2	174.7 \pm	5.4	172.7 \pm	6.6	122.3 \pm	3.6
Leu	377.9 \pm	24.8	355.8 \pm	14.1	359.9 \pm	24.2	364.4 \pm	6.3	357.8 \pm	22.2	374.6 \pm	11.0	387.3 \pm	22.0
Met	87.8 \pm	13.8	88.1 \pm	4.7	86.9 \pm	8.4	92.8 \pm	3.8	93.8 \pm	7.2	92.9 \pm	3.9	82.6 \pm	3.8
Ile	350.4 \pm	25.5	323.2 \pm	13.1	333.6 \pm	27.1	307.8 \pm	5.0	311.5 \pm	18.1	321.7 \pm	11.8	331.6 \pm	5.6
Val	200.8 \pm	12.1	203.4 \pm	12.2	209.2 \pm	17.9	210.6 \pm	1.1	215.2 \pm	7.5	218.5 \pm	5.8	214.0 \pm	11.4
Glu	311.5 \pm	17.8	361.4 \pm	18.5	411.1 \pm	39.5	422.5 \pm	5.0	455.9 \pm	19.5	484.3 \pm	15.2	517.5 \pm	37.9
Pro	347.5 \pm	53.4	403.9 \pm	25.1	408.7 \pm	22.0	337.9 \pm	15.7	335.4 \pm	14.6	337.9 \pm	10.1	323.1 \pm	20.5
Asp	239.6 \pm	41.2	213.6 \pm	22.1	245.1 \pm	16.3	200.8 \pm	14.7	211.0 \pm	9.9	228.8 \pm	16.6	246.0 \pm	16.0
Thr	171.4 \pm	50.9	216.6 \pm	20.3	201.6 \pm	8.2	193.1 \pm	7.4	181.7 \pm	7.6	184.8 \pm	6.5	143.3 \pm	7.4
Ala	262.6 \pm	73.9	335.0 \pm	20.0	329.6 \pm	29.5	354.5 \pm	6.3	354.0 \pm	17.1	365.9 \pm	7.2	270.7 \pm	8.4
Ser	423.4 \pm	92.0	467.5 \pm	44.6	449.3 \pm	20.2	424.5 \pm	8.3	428.6 \pm	22.7	424.7 \pm	13.3	345.1 \pm	22.3
Gln	4696.4 \pm	1919.3	5230.5 \pm	337.2	4438.4 \pm	403.5	4051.9 \pm	73.7	3164.4 \pm	204.2	2898.0 \pm	40.4	1517.8 \pm	97.7
Gly	80.0 \pm	85.2	182.0 \pm	134.7	181.3 \pm	77.2	335.0 \pm	112.2	329.7 \pm	186.4	286.3 \pm	144.4	1377.3 \pm	661.0
Asn	913.5 \pm	385.0	1244.4 \pm	43.7	1088.3 \pm	118.6	1006.6 \pm	49.1	973.3 \pm	35.4	921.1 \pm	52.2	740.8 \pm	15.5
(Cys) ₂	223.5 \pm	106.4	273.6 \pm	53.3	196.3 \pm	9.2	152.5 \pm	4.2	131.1 \pm	6.6	125.9 \pm	0.7	111.8 \pm	6.3
His	114.8 \pm	2.9	113.8 \pm	5.0	124.4 \pm	11.2	96.4 \pm	10.4	95.3 \pm	4.6	96.6 \pm	2.8	101.2 \pm	5.6
Lys	222.9 \pm	20.4	216.7 \pm	24.3	249.6 \pm	16.0	225.3 \pm	24.6	215.0 \pm	19.9	217.5 \pm	10.9	237.8 \pm	37.8
Arg	742.9 \pm	146.0	648.7 \pm	33.3	699.8 \pm	55.8	613.2 \pm	28.0	554.3 \pm	76.2	491.7 \pm	13.2	679.2 \pm	85.4

3-2-3 5-FU を投与した DLD-1 の解析結果

(1) 通常酸素・グルコース豊富状態で 5-FU を投与した DLD-1 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した。PC1 の寄与率は 71.8%、PC2 の寄与率は 10.9%、これらの累積寄与率は 82.7%と全体の傾向を十分に集約できていた。しかし、PC1 および PC2 スコアを利用してクラスター分析を行ったところ、スコアプロット上で 5-FU 群と control 群が区別されるような傾向はみられず、両群を判別することは困難であった。判別分析による両群の判別も試みたが、5-FU 群と control 群を明確に判別することはできなかった。次に、5-FU 群と control 群を明確に区別するために PC1 と PC3 スコアを利用したところ、PC1 の寄与率は 71.8%、PC3 の寄与率は 8.4%、これらの累積寄与率は 80.2%のスコアプロットが得られた (Fig.3-2)。このスコアプロットについてクラスター分析を行ったが、5-FU 処理の有無による分類の傾向はみられなかった (Fig.3-2 (A))。しかし、判別分析を行ったところ、両群は境界線により判別率 78.6%で区別された (Fig.3-2 (B))。

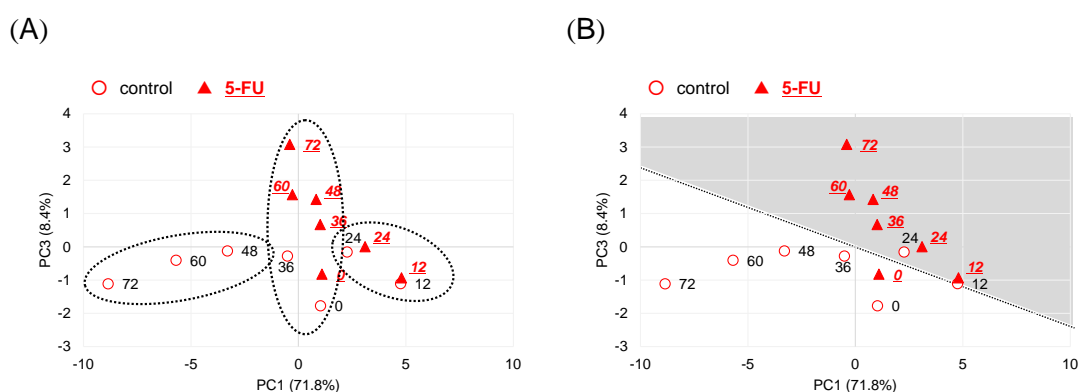


Fig.3-2 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of DLD-1 cell culture medium treated with and without 20 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU under normoglycemic/normoxic conditions for 72 hr. Triangles, 5-FU-treated group; open circles, control. The numerals indicate the incubation time (hr).

(2) 低酸素・グルコース欠乏状態で 5-FU を投与した DLD-1 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した (Fig.3-3)。PC1 の寄与率は 47.2%、PC2 の寄与率は 26.4%、これらの累積寄与率は 73.6%と全体の傾向を十分に集約できていた。PC1 および PC2 スコアを利用してクラスター分析を行ったところ、培養時間が近いものが同一グループに分類される傾向がみられ、スコアプロット上で 5-FU 群と control 群を判別することは困難であった (Fig.3-3 (A))。また、判別分析による両群の判別も試みたが、こちらも 5-FU 群と control 群を明確に判別することはできなかった (Fig.3-3 (B))。このときの判別率は 64.3%であった。

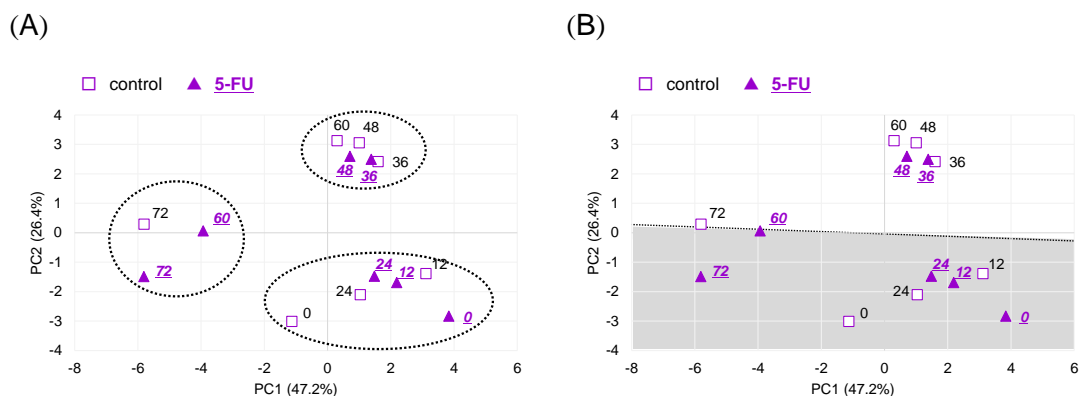


Fig.3-3 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of DLD-1 cell culture medium treated with and without 20 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU under hypoglycemic/hypoxic conditions for 72 hr. Triangles, 5-FU-treated group; open squares, control. The numerals indicate the incubation time (hr).

(3) 5-FU 効果判定マーカー候補物質の同定

Fig.3-2 で示された PCA スコアプロット上で、通常酸素・グルコース豊富状態で 5-FU 群と control 群を判別することが可能であった。このとき寄与したアミノ酸について、通常酸素・グルコース豊富状態の DLD-1 について解析して得られる PCA ローディングプロットから推定した (Fig.3-4 (A))。PCA ローディングプロットでは、ほとんどのアミノ酸が同じくらいの PC1 係数を示し、集団となっていたが、Ala、Glu および Gly は離れて位置していた。そこで、これら 3 種アミノ酸の濃度変動が 5-FU 効果判定に寄与していることが示唆された。また、Fig.3-4 (B) は、低酸素・グルコース欠乏状態の DLD-1 について解析して得られる PCA ローディングプロットを示す。スコアプロットで 5-FU 群と control 群を区別できる傾向がみられなかったことから、予想された通り 20 種アミノ酸がスコアプロット上を広く点在し、特異的な傾向を示すアミノ酸は同定されなかった。Table 3-1~3-4 には、通常酸素・グルコース豊富状態または低酸素・グルコース欠乏状態で培養された 5-FU 群および control 群の培養培地中 20 種アミノ酸の経時的な濃度を示す。

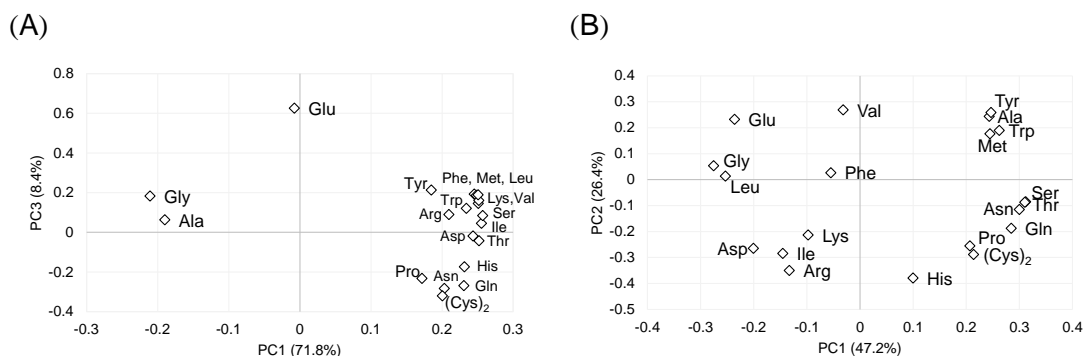


Fig.3-4 PCA loading plots obtained from the analyses presented in Figs. 3-2 and 3-3. DLD-1 cells were incubated with or without 5-FU under (A) normoglycemic/normoxic and (B) hypoglycemic/hypoxic conditions for 72 hr.

(4) 5-FU 効果判定法としての有用性

細胞生存率の実験で示された通り、低酸素・グルコース欠乏状態では DLD-1 の増殖が抑制されているため、5-FU 投与に由来する生存率の減少はほとんど観測されなかった (Fig.3-1 (b))。つまり、5-FU 投与による増殖抑制効果が現れていない DLD-1 についてアミノ酸メタボロミクスにより評価しても、5-FU 群と control 群を判別できないというのは当然の結果であり、本実験により DLD-1 の 5-FU への抵抗性をスコアプロット上に反映することができたと言える。つまり、スコアプロットにおいて、5-FU 群と control 群を判別できるかどうかを調べることで、5-FU の有効性を評価できる可能性が示唆された。

3-2-4 培養条件の異なる DLD-1 の解析結果

DLD-1 は低酸素・グルコース欠乏状態に曝された場合、細胞増殖が抑制され、5-FU の増殖抑制効果に対して耐性を生じると考えられた。そこで、培養環境の変化に由来する細胞状態の違いを評価するために、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の control 群間について解析した。

(1) 培養条件の異なる DLD-1 の PCA

PCA により得られた PC1 および PC2 スコアを用いてスコアプロットを作成した (Fig.3-5)。PC1 の寄与率は 66.1%、PC2 の寄与率は 17.4%、これらの累積寄与率は 83.5% と全体の傾向を十分に集約できていた。PC1 および PC2 スコアを利用してクラスター分析を行ったところ、培養時間が短い検体は同一グループに分類される傾向がみられたが、36 時間以降の検体は、培養環境の異なる検体を別々のグループとして分類することが可能であった (Fig.3-5 (A))。さらに、判別分析による両群の判別を試みたところ、こちらも両群を判別率 92.9% で明確に判別することができた (Fig.3-5 (B))。

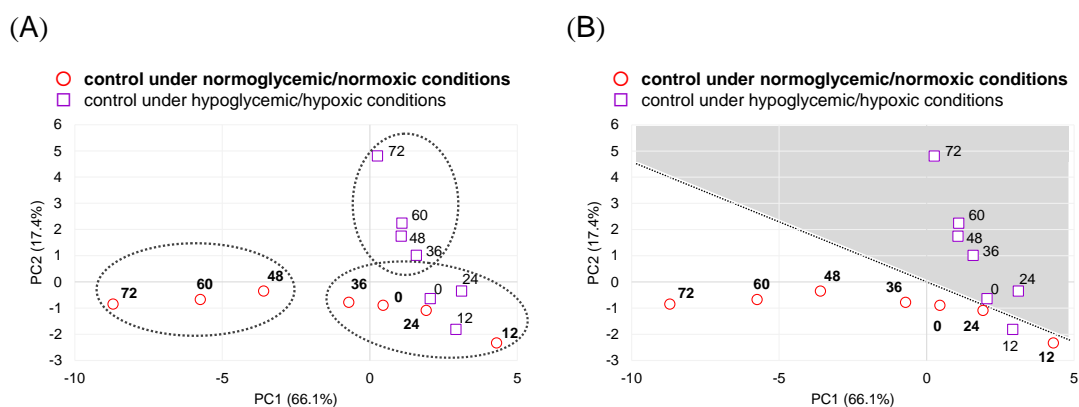


Fig.3-5 (A) PCA-CA and (B) PCA-DA score plots obtained from the analysis of DLD-1 cell culture medium without any 5-FU treatment under either normoglycemic/normoxic or hypoglycemic/hypoxic conditions. Open circles, control group under normoglycemic/normoxic conditions; open squares, control group under hypoglycemic/hypoxic conditions. The numerals indicate the incubation time (hr).

(2) 腫瘍微小環境判定マーカー候補物質の同定

Fig.3-5 で示された PCA スコアプロット上で、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 群を判別することが可能であった。このとき寄与したアミノ酸について、PCA ローディングプロットから推定した (Fig.3-6)。PCA ローディングプロットでは、ほとんどのアミノ酸が同じ PC1 係数の位置で集団として示されていたが、Ala、Glu および Gly が他のアミノ酸とは位置が大きく離れていた。つまり、これら 3 種アミノ酸の濃度変動が腫瘍微小環境であるかどうか判定するのに寄与したことが示唆された。

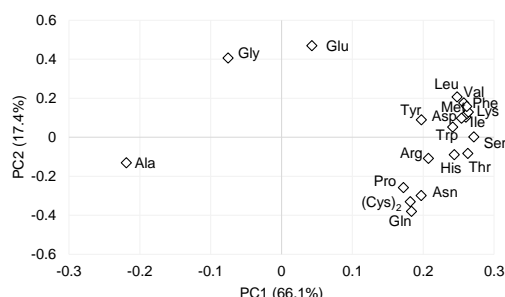


Fig.3-6 PCA loading plots obtained from the analysis presented in Fig. 3-5.

興味深いことに、5-FU 効果判定および腫瘍微小環境判定のためのマーカー候補物質として同じアミノ酸 3 種 (Ala、Glu および Gly) が同定された。これらのアミノ酸は解糖系やトリカルボン酸サイクル (TCA 回路) に関与することから、これら 3 種アミノ酸およびその他 TCA 回路に関係するいくつかのアミノ酸の経時的な濃度変化とともに代謝経路マップ上に示した (Fig.3-7)。低酸素・グルコース欠乏状態で培養された DLD-1 の培養培地中 Ala 濃度は、通常酸素・グルコース豊富状態で培養された場合に比べて低く、これは低酸素・グルコース欠乏状態による解糖系の抑制のためではないかと考えられた。さらに、過去の報告を踏まえると、低酸素・グルコース欠乏状態で培養された場合、TCA 回路も抑制されるために Gln から Glu への変換が生じ、結果的に Glu 濃度が増加したものと考えられる。

今回の結果より、5-FU 効果の判定や腫瘍微小環境の判定に同じアミノ酸がバイオマーカー候補物質として同定されたことから、それらは DLD-1 の増殖抑制において何らかの役割で関与していることが示唆される。ただし、経時的な濃度変化を確認したところ Gly に関しては 5-FU 投与の有無または培養環境の異なる群間で比較しても、有意な濃度変動が認められなかった。つまり、Gly を除く Ala と Glu が 5-FU 効果の判定や腫瘍微小環境判定を行うための有用なマーカー候補物質であると考えられる。これらは、低酸素環境またはグルコース飢餓状態に曝されたがん細胞・組織に関する研究報告と一致している⁶⁶⁻⁶⁸⁾。

- control under the normoglycemic/normoxic conditions
- 5-FU under the normoglycemic/normoxic conditions
- control under the hypoglycemic/hypoxic conditions
- 5-FU under the hypoglycemic/hypoxic conditions

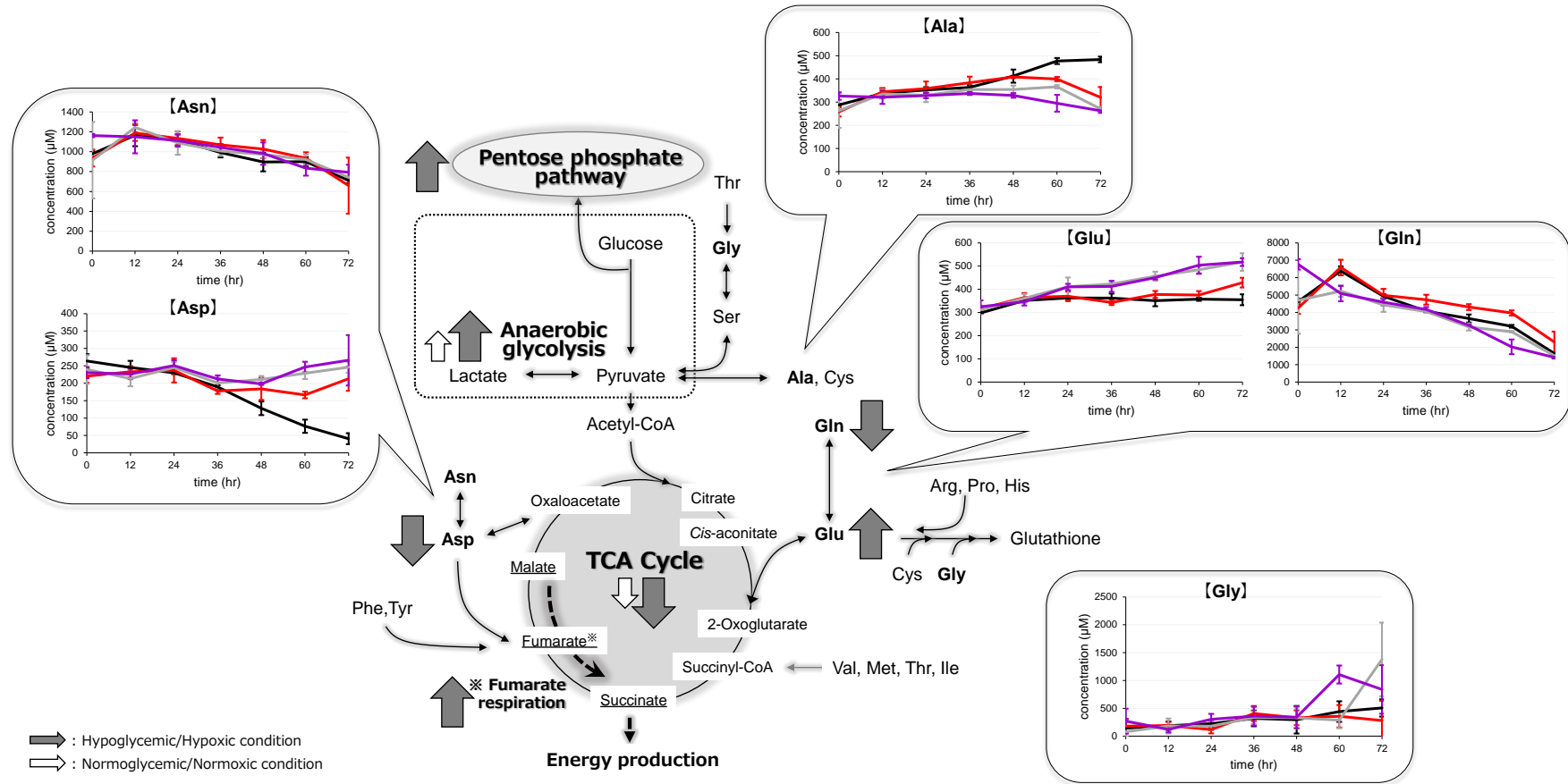


Fig.3-7 Concentrations of 6 amino acids (Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, and Gly) in DLD-1 cell culture medium treated with and without 5-FU under the normoglycemic/normoxic conditions and hypoglycemic/hypoxic conditions illustrated on a metabolic pathway map. The solid and dotted lines indicate the control group and 5-FU-treated group, respectively. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$).

3-3. まとめ

本章では、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 に 5-FU を投与し、特殊な培養環境が 5-FU の効果発現や細胞状態に及ぼす影響を培地中 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、PCA-DA で得られたスコアプロット上において 5-FU の効果判定が可能であった。しかし、低酸素・グルコース欠乏状態で培養した場合、スコアプロット上の検体は CA または DA のいずれを用いても 5-FU 群と control 群に区別することは出来なかった。これは、細胞生存率の実験結果で示されているとおり、DLD-1 に対する 5-FU の作用が低下している状態を反映したスコアプロットであると考えられる。つまり、アミノ酸メタボロミクスは低酸素・グルコース欠乏状態によって生じた 5-FU の増殖抑制効果の変化を評価することが可能であったと言える。さらに、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 群間についても比較した結果、PCA-DA で得られたスコアプロット上において培養環境の異なる DLD-1 を区別することが可能であった。つまり、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る DLD-1 とは異なる代謝状態である可能性が考えられた。実際に生細胞数を計測した結果、低酸素・グルコース欠乏状態では、生細胞数の増加が確認されず、増殖が強く抑制されていた。つまり、アミノ酸メタボロミクスにより特殊な培養環境が DLD-1 の増殖に及ぼす影響を評価できたと言える。最後に、抗がん剤治療効果のマーカ―や特殊環境特異的なマーカ―となり得るアミノ酸候補をローディングプロットから探索した。その結果、通常酸素・グルコース豊富状態で培養した DLD-1 に 5-FU を投与した場合と低酸素・グルコース欠乏状態で DLD-1 を培養した場合のどちらにおいても、DLD-1 の増殖が抑制されていることから、同じ 2 種のアミノ酸 (Ala と Glu) が判別のマーカ―候補として同定された。

以上より、アミノ酸メタボロミクスは培養環境に依存することなく抗がん剤の効果を判定できる手法であることが明らかになった。

第四章 膵臓がん細胞に対する細胞外および細胞内アミノ酸メタボロミクスの比較

これまでの検討により、アミノ酸メタボロミクスは培養環境に依存することなく抗がん剤や培養環境によって生じるがん細胞状態の違いを判定できる手法であることを確認した。本法は原則として、培養培地中におけるアミノ酸濃度の分析結果をもとに解析を行っているが、測定するアミノ酸のほとんどは、培地中や生体試料中で豊富に存在しているため、がん細胞状態の違いによって生じるアミノ酸レベルでの微小な変化を測定するのが困難な場合がある。また、一般にがん細胞または細胞内の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のが妥当であると考えられる。しかし、細胞内のアミノ酸を分析するための操作は、培養培地の分析と比較して極めて煩雑であり、迅速かつ簡便に多検体を分析することが難しい。もしも培地中のアミノ酸濃度変動を評価した結果が、細胞内代謝物変動を評価した結果と同質であるものと確認できれば、本研究で提唱するアミノ酸メタボロミクスを、よりシンプルな細胞状態の評価法として提供することができると考えられる。そこで本章では、培養培地および細胞抽出物の両方について別々にアミノ酸メタボロミクスで解析し、それらの違いを評価することにした (Fig.4-1)。

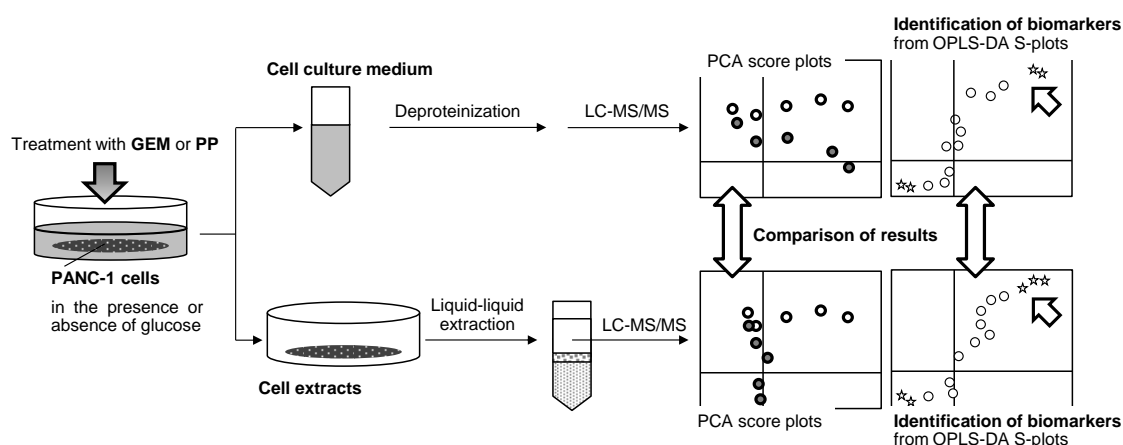


Fig.4-1 Schematic flow of amino acid metabolomics study of PANC-1 culture medium and cell extracts using multivariate analyses (PCA and OPLS-DA).

今回のモデルがん細胞株として、膵臓がん由来細胞株 PANC-1 を使用し、グルコース豊富状態または欠乏状態で gemcitabine (GEM, Fig.4-2(A)) または pyruvium pamoate (PP, Fig.4-2(B)) とともに PANC-1 を培養し、同一細胞の培養培地および細胞抽出物中アミノ酸の濃度を LC-MS/MS 分析により別々に測定した。今回用いた GEM は、ヌクレオシドトランスポーターで細胞内に流入後、キナーゼによりリン酸化され、二リン酸体はリボヌクレオチド還元酵素を強力に阻害する。また、三リン酸体が DNA への取り込みを競合的に阻害することで DNA 合成も阻害する^{69,70}。一般に膵臓がんの全身化学療法に用いられる代謝拮抗薬であり、標準治療薬として使用されてきた。しかし近年、酸素や栄

養の枯渇で特徴づけられる腫瘍微小環境に曝されたがん細胞は、**GEM** など従来の化学療法剤に対して抵抗性を示すとの報告がなされている^{59,60,71}。このがん細胞における薬剤抵抗性を克服する新規治療薬として、**PP** のような腫瘍微小環境中のがん細胞を治療ターゲットとする化合物が着目されている。例えば、通常の培養環境下では、**TCA** 回路で生成した電子は、主に好氣的呼吸鎖を経由して **ATP** 産生に関与している。その状態では、駆虫薬として臨床的に使用されている **PP** により呼吸鎖複合体 I が阻害されていても、コハク酸-キノン還元酵素活性が増強するため、細胞毒性を示すことはない⁷²。しかし、腫瘍微小環境のような低酸素・グルコース欠乏状態に曝されたがん細胞のミトコンドリアでは、好氣的から嫌氣的に切り替わった呼吸鎖がエネルギー産生を担っている。嫌氣的呼吸鎖が優位に働いているということは、主に **NADH**-フマル酸還元酵素がエネルギー産生に関与していることを意味する。**PP** はこの酵素を阻害する薬剤であることから、**PP** がグルコース欠乏状態に対して選択的に効果を発揮するようになる⁷³⁻⁷⁵。

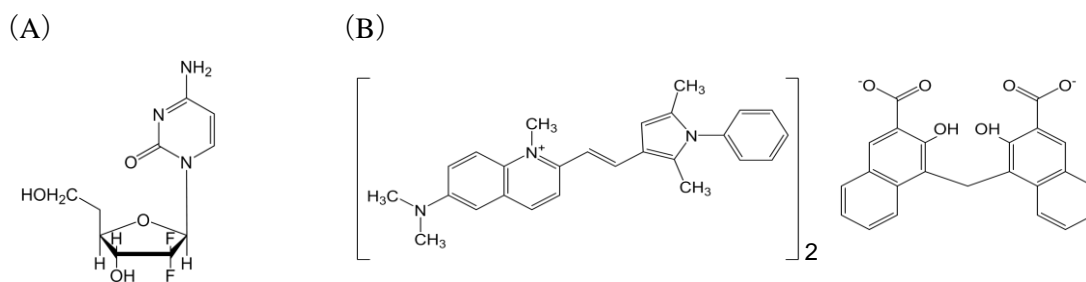


Fig.4-2 The structure of GEM (A) and PP (B).

LC-MS/MS 分析により得られた細胞内および細胞外（培養培地）それぞれの経時的アミノ酸濃度変動データについて多変量解析し、各抗がん剤の効果判定が可能であるか検討し、細胞内外における抗がん剤効果のバイオマーカー候補を探索した。さらに、培地中アミノ酸に対するメタボロミクス解析が、細胞内アミノ酸濃度の変動つまり抗がん剤を投与したがん細胞の代謝変動をどの程度反映できているか比較検証した。

4-1. 各抗がん剤の PANC-1 に対する効果

(1) 細胞増殖測定用試薬 WST-8 による IC₅₀ の測定

WST-8 試薬は、水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩を使用しており、細胞内の脱水素酵素により産生される NADH は 1-Methoxy PMS を介して WST-8 を橙色のホルマザンに還元する (Fig.4-3)。ホルマザンの色素量は生細胞数に比例するため、生細胞数の測定や増殖抑制効果の評価に利用される。MTT 法とは異なり、ホルマザンの溶解操作を必要とせず、また試薬の細胞に対する毒性が低いため、同じ細胞を他の試験に使用できることが大きなメリットである。今回は、グルコース豊富状態にて GEM で処理したがん細胞およびグルコース欠乏状態にて PP で処理したがん細胞の培養培地中で生成したホルマザンの吸光度を測定することで用量反応曲線を作成し、各抗がん剤の PANC-1 細胞に対する IC₅₀ を求めた

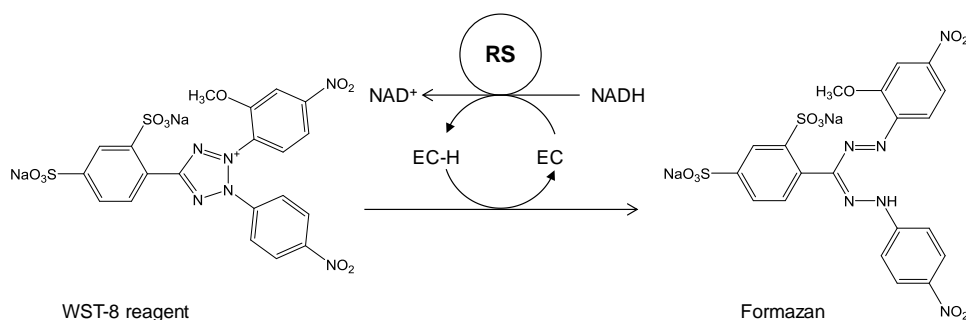


Fig.4-3 Principle of cell proliferation assay using WST-8 reagent. EC and RS represent electron coupling reagent and succinate-reductase system, respectively.

(2) 培養条件

10%透析済みFBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液、2 mM グルタミン溶液および 1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含むグルコース含有培地 (D-MEM) を用いて、PANC-1 を 96 well plate に 2.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/well の密度で播種し、CO₂ インキュベーター内 37°Cにて培養した。24 時間後に GEM (1.25–10 μM) を含むグルコース含有 D-MEM に交換し、この時点を培養 0 時間として、96 時間後に WST-8 assay を行い、GEM の用量反応曲線を作成した。また、PP (12.5–100 nM) を含むグルコース不含 D-MEM に交換した時点を培養 0 時間とし、96 時間後に WST-8 assay およびトリパンブルー染色を行い、それぞれの測定法による PP の用量反応曲線を作成した。

(3) 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) 値

グルコース豊富状態ではGEMはPANC-1に対して濃度依存的に増殖抑制効果を示し、GEMの用量反応曲線から培養96時間後のIC₅₀を算出したところ、1.3 μMであった。これを踏まえて、アミノ酸メタボロミクスの実験では増殖抑制率が50%程度で、溶液の調製が簡便となるように、1 μMをGEMの投与濃度とした。また、グルコース欠乏状態ではPPはPANC-1に対して濃度依存的に増殖抑制効果を示し、PPの用量反応曲線から培養96時間後のIC₅₀を算出したところ、0.06 μMであった。そこでアミノ酸メタボロミクスの実験では、増殖抑制率が50%程度で、溶液の調製が簡便となるように、0.05 μMをPPの投与濃度とした。ただし、グルコース欠乏状態に曝されたPANC-1はグルコース豊富状態で培養されたPANC-1と比べて代謝変動が起こっている可能性がある。WST-8 assayは細胞内酵素(NADH-還元酵素)活性に基づく比色法であることから⁷⁶⁾、細胞の代謝変動がWST-8 assayの結果に何らかの影響を及ぼすことが懸念される。そこで、同条件で培養されたPANC-1細胞についてトリパンブルー染色を行い、細胞計数盤による生細胞数の計測を行った。その結果、培養96時間後のIC₅₀は約0.02 μMであった。2つの測定法によるIC₅₀値は異なっていたが、0.05 μMのPPで処理されたPANC-1の増殖は強く(抑制率>50%)抑制されると考えられるため、溶液調製の簡便性も考慮して0.05 μMを投与濃度とした。

(4) GEMまたはPP(各IC₅₀)を投与したPANC-1の培養条件

10%透析済みFBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1 mM非必須アミノ酸溶液、2 mMグルタミン溶液および1 mMピルビン酸ナトリウム溶液を含む25 mMグルコース含有D-MEMを用いて、PANC-1を96 well plateに 2.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/wellの密度で播種し、CO₂インキュベーター内37°Cにて培養した。24時間後にGEM(1 μM)を含むグルコース含有D-MEMまたは不含D-MEM、PP(0.05 μM)を含む25 mMグルコース含有D-MEMまたは不含D-MEMに交換し、ここを培養0時間とした。96時間後にトリパンブルー染色による生細胞数の計測を行い、グルコース豊富またはグルコース欠乏状態のcontrol(薬剤非投与)に対する生存率を算出した。

(5) 細胞生存率

グルコース豊富またはグルコース欠乏状態でGEMまたはPPを投与したときのcontrolに対する相対的なPANC-1の生存率をFig.4-4に示す。グルコース豊富状態のGEM群の生存率は、controlの約10%まで著しく減少した。これに対して、グルコース欠乏状態のGEM群は約55%が生存し続けており、GEMの抗がん効果の低下がみられた。これまでに、栄養欠乏状態は細胞周期の遅延を引き起こし、しばしばG1期停止を

もたらすこと⁷⁷⁾、また、熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) が誘導され、抗アポトーシス経路が活性化されること^{78,79)} などが報告されている。それゆえ、これまでの報告例と細胞株や薬剤が異なるため明確なメカニズムは推定できないが、今回のグルコース欠乏状態における GEM の抗がん効果の低下は、決して予想外の結果ではない。一方、グルコース豊富状態の PP 群の生存率が約 75%であったのに対して、グルコース欠乏状態では、著しく減少した (生存率約 10%)。この結果は、PP がグルコース欠乏状態により強力な抗がん効果を発揮することを示しており、この PP 作用のグルコース欠乏選択性は過去の報告とも一致している⁷²⁻⁷⁵⁾。

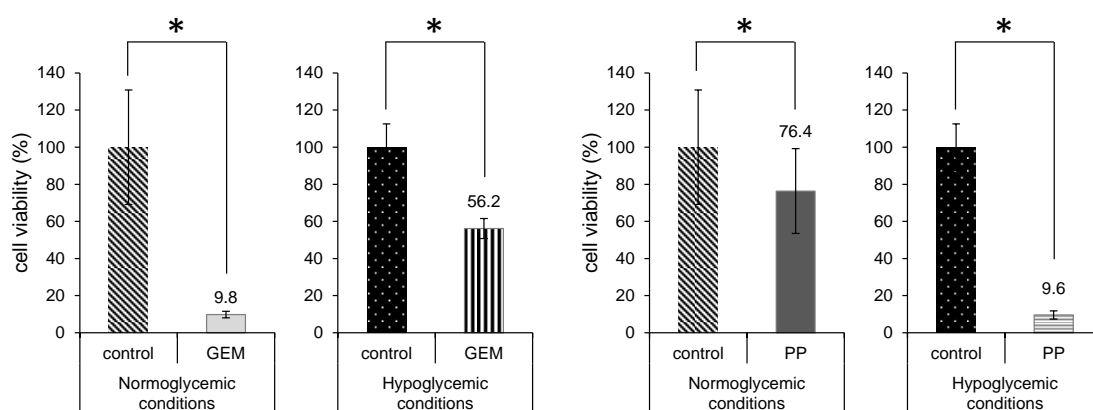


Fig.4-4 Relative cell viability of drug-treated PANC-1 cells under normoglycemic and hypoglycemic conditions. Cell viability is shown as a percentage of the control under each condition. Data represent the mean \pm SD ($n = 5, p < 0.05$).

4-2. PANC-1 に対するアミノ酸メタボロミクス

4-2-1 基準操作

(1) GEM または PP を投与した PANC-1 の培養条件

・ 培養培地分析

10%透析済みFBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液、2 mM グルタミン溶液および 1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む 25 mM グルコース含有 D-MEM を用いて、PANC-1 を 96 well plate に 2.5×10^4 cells/mL、0.1 mL/well の密度で播種し、CO₂ インキュベーター内 37°C にて培養した。24 時間後に GEM (1 μ M) を含むグルコース含有 D-MEM または不含 D-MEM、PP (0.05 μ M) を含む 25 mM グルコース含有 D-MEM または不含 D-MEM に交換した (培養 0 時間)。培養 0 時間および 24、48、72、84 および 96 時間後に回収した培地を細胞外アミノ酸試料として LC-MS/MS 分

析を行った。第一章 1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準拠し、得られたデータについて多変量解析を行った。

・ 細胞内代謝物分析

10%透析済みFBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液、2 mM グルタミン溶液および 1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む 25 mM グルコース含有 D-MEM を用いて、PANC-1 を 24 well plate に 2.5×10^4 cells/mL、1 mL/well の密度で播種し、CO₂ インキュベーター内 37°C にて培養した。24 時間後に GEM (1 μM) を含むグルコース含有 D-MEM または不含 D-MEM、PP (0.05 μM) を含む 25 mM グルコース含有 D-MEM または不含 D-MEM に交換した(培養 0 時間)。培養 0 時間および 24、48、72、84 および 96 時間ごとに回収した細胞抽出物を細胞内アミノ酸試料として LC-MS/MS 分析を行った。第一章 1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準拠し、得られたデータについて多変量解析を行った。

(2) 培養培地の前処理

第一章 1-1-1「培地試料の前処理」に準拠する。

(3) 細胞内代謝物の前処理

PANC-1 培養培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄する。冷メタノール 500 μL を加えて 5 分静置し、さらに 0.4 mM の 5 種安定同位体標識アミノ酸 (Glu-*d*₅、His-*d*₃、Lys-*d*₈、Val-*d*₈ および Phe-*d*₅) 水溶液 250 μL を加えて攪拌する。その全量を 2.0 mL チューブに移し、蒸留水 250 μL およびクロロホルム 500 μL をさらに加える。振とうにより液-液抽出した後、4°C、20,000 × *g* にて 10 分間遠心分離する。上層 (水層) を 1.5 mL チューブに移して減圧下濃縮乾固し、2%ギ酸で再溶解したものを試料とし、1 μL を LC に注入する。

(4) 多変量解析

第一章の多変量解析の項に準拠し、検体のアミノ酸情報を可視化する手法として、PCA を利用した。さらに、PCA により得られた主成分のうち、スコアプロット作成に使用した 2 つのスコア値を SPSS 15.0 Base system に入力し、CA を行った。また、効果判定のバイオマーカー候補となり得るアミノ酸を探索・同定するため、教師付き次元削減法として知られる PLS を改良した直交部分最小二乗-判別分析 (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis ; OPLS-DA) による解析も実施した。OPLS-DA は、PLS と

同様に変数として「クラス情報を表す目的変数」を含みながら潜在変数を合成するが、説明変数を「検体のグループを予測できる変数」と「グループ分けに無関係な変数」に統計的に分割したうえで潜在変数を合成する。これにより、検体のグループを予測する能力は保ったまま、より解釈しやすい回帰モデルが得られる。さらに、OPLS-DAにより得られるSプロットを用いて、検体のグループ分けに貢献しているアミノ酸を同定する。比較するグループ間で量的変動の見られるアミノ酸を同定することで、その違いが生ずるメカニズムを予測することが可能となる。

4-2-2 定量値

培養培地中および細胞内に含まれるアミノ酸のうち20種について、第一章1-3-1「アミノ酸の定量値」および「濃度データの規格化」に準じて算出した濃度を多変量解析における変数として用いた。Table 4-1にはグルコース豊富状態で、Table 4-2にはグルコース欠乏状態で培養した場合の細胞外アミノ酸の経時的な定量値を示す。また、Table 4-3にはグルコース豊富状態で、Table 4-4にはグルコース欠乏状態で培養した場合の細胞内アミノ酸の経時的な定量値を示す。

Table 4-1. Extracellular amino acid concentrations (μM) of PANC-1 cells treated with 1 μM GEM (A), 0.05 μM PP (B), and without drug-treatment (C) under normoglycemic conditions for 96 h ($n = 3$).

(A) GEM	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD
Trp	58.0	\pm 0.7	60.4	\pm 2.8	51.4	\pm 1.7	48.6	\pm 1.1	50.4	\pm 0.0	53.9	\pm 0.6
Phe	350.5	\pm 10.6	349.9	\pm 15.7	320.9	\pm 3.6	331.4	\pm 10.3	319.5	\pm 8.0	336.9	\pm 0.0
Tyr	273.6	\pm 13.4	301.5	\pm 16.4	278.1	\pm 6.1	267.6	\pm 8.4	269.9	\pm 11.0	281.0	\pm 0.2
Leu	704.2	\pm 32.9	652.7	\pm 35.1	639.9	\pm 9.8	663.9	\pm 7.5	408.7	\pm 18.8	416.4	\pm 1.4
Met	157.5	\pm 5.7	194.9	\pm 12.7	178.5	\pm 3.9	171.4	\pm 12.0	124.5	\pm 6.3	128.0	\pm 2.6
Ile	695.8	\pm 19.6	713.9	\pm 0.9	666.6	\pm 12.8	706.0	\pm 33.8	492.5	\pm 35.4	505.4	\pm 11.0
Val	681.6	\pm 18.3	689.8	\pm 31.8	646.6	\pm 20.8	677.8	\pm 19.0	615.5	\pm 13.3	656.3	\pm 5.7
Glu	154.9	\pm 37.2	301.9	\pm 39.0	305.4	\pm 45.4	459.6	\pm 59.0	484.7	\pm 20.9	570.8	\pm 0.3
Pro	595.8	\pm 97.5	426.0	\pm 29.5	497.6	\pm 68.1	458.1	\pm 79.8	357.7	\pm 14.3	372.6	\pm 39.0
Asp	92.6	\pm 23.7	80.7	\pm 10.6	83.8	\pm 3.5	87.8	\pm 17.7	86.8	\pm 11.7	61.8	\pm 9.6
Thr	800.0	\pm 46.3	794.9	\pm 77.8	785.3	\pm 26.7	808.5	\pm 24.5	752.7	\pm 20.4	787.0	\pm 18.6
Ala	145.5	\pm 27.7	163.2	\pm 25.7	239.0	\pm 1.6	329.7	\pm 40.3	360.3	\pm 0.6	422.9	\pm 0.1
Ser	421.7	\pm 8.9	369.9	\pm 49.1	338.9	\pm 24.3	307.5	\pm 9.8	291.6	\pm 2.4	274.9	\pm 8.6
Gln	5910.0	\pm 228.1	4633.0	\pm 300.7	3678.1	\pm 264.9	3183.9	\pm 145.4	2780.3	\pm 122.0	2680.5	\pm 137.8
Gly	613.3	\pm 147.9	556.1	\pm 37.3	647.2	\pm 98.3	706.9	\pm 1.0	669.0	\pm 67.5	666.9	\pm 41.8
Asn	90.0	\pm 4.4	86.7	\pm 10.5	81.6	\pm 4.3	74.3	\pm 2.7	75.1	\pm 0.1	76.5	\pm 3.7
(Cys) ₂	97.1	\pm 0.9	88.4	\pm 3.3	82.1	\pm 6.2	70.6	\pm 2.9	69.7	\pm 3.6	66.4	\pm 3.6
His	107.5	\pm 7.7	107.3	\pm 16.9	86.7	\pm 7.1	97.8	\pm 20.3	92.9	\pm 1.2	108.9	\pm 0.2
Lys	654.1	\pm 4.6	700.2	\pm 59.2	625.8	\pm 27.3	689.1	\pm 28.7	660.8	\pm 33.1	753.8	\pm 0.0
Arg	164.0	\pm 7.4	396.6	\pm 16.7	348.0	\pm 0.4	328.5	\pm 8.8	203.3	\pm 0.3	275.1	\pm 23.0

(B) PP	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	53.4	± 0.9	59.8	± 3.5	52.8	± 1.8	45.1	± 0.5	46.2	± 2.3	46.3	± 1.0
Phe	333.7	± 0.3	347.3	± 18.3	322.5	± 9.6	309.4	± 0.3	307.1	± 15.4	310.2	± 5.7
Tyr	259.8	± 0.3	294.7	± 11.5	266.3	± 0.2	246.9	± 1.9	260.6	± 13.3	264.8	± 3.6
Leu	646.2	± 10.2	651.5	± 29.8	634.8	± 12.2	606.7	± 0.2	386.8	± 24.8	368.6	± 5.5
Met	146.1	± 1.3	190.8	± 9.3	175.0	± 3.4	148.2	± 4.4	111.0	± 7.5	106.3	± 0.6
Ile	632.0	± 10.2	685.3	± 27.6	662.3	± 22.6	653.7	± 0.1	473.2	± 22.5	478.8	± 8.8
Val	640.6	± 4.7	683.0	± 30.6	653.2	± 32.7	624.0	± 4.8	602.1	± 30.6	606.2	± 6.0
Glu	125.5	± 47.8	254.5	± 24.0	241.5	± 16.8	359.7	± 17.6	388.0	± 18.9	436.4	± 27.7
Pro	534.8	± 45.2	404.8	± 46.3	485.8	± 3.8	372.3	± 16.4	368.5	± 0.3	379.1	± 22.6
Asp	89.7	± 10.6	87.5	± 8.5	85.4	± 20.3	58.7	± 2.2	84.1	± 8.8	77.0	± 15.9
Thr	845.6	± 57.8	819.2	± 47.1	828.0	± 42.3	865.1	± 77.6	837.4	± 1.9	791.3	± 72.0
Ala	147.9	± 30.9	162.0	± 9.8	215.2	± 21.6	332.2	± 0.5	395.7	± 22.2	453.0	± 36.7
Ser	457.3	± 36.4	392.4	± 33.3	344.8	± 21.0	242.8	± 4.1	204.3	± 11.6	143.5	± 5.8
Gln	5890.8	± 53.4	4806.3	± 538.2	3988.5	± 150.2	3264.8	± 37.2	2922.1	± 338.5	2633.7	± 37.9
Gly	775.1	± 75.4	493.4	± 25.9	678.8	± 139.6	556.3	± 91.6	612.5	± 1.2	632.8	± 93.5
Asn	97.8	± 9.9	86.5	± 7.6	78.5	± 2.2	75.0	± 1.9	75.5	± 0.1	81.3	± 6.7
(Cys) ₂	108.0	± 0.0	85.9	± 5.1	76.3	± 5.5	58.1	± 0.9	54.9	± 1.6	48.4	± 2.9
His	102.9	± 11.5	105.2	± 5.5	100.8	± 21.3	85.0	± 24.3	83.6	± 11.7	93.9	± 12.9
Lys	632.5	± 19.9	683.9	± 44.6	635.4	± 25.4	599.2	± 18.5	628.9	± 38.4	630.3	± 30.6
Arg	153.5	± 0.0	342.5	± 10.8	324.7	± 21.8	261.6	± 8.7	159.6	± 0.2	196.4	± 0.2

(C)	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
control	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	46.5	± 2.0	60.4	± 2.8	54.2	± 0.4	46.3	± 4.5	47.4	± 0.1	42.9	± 0.7
Phe	330.3	± 13.1	345.8	± 15.2	322.0	± 1.1	322.0	± 23.6	312.4	± 8.1	303.6	± 8.5
Tyr	238.0	± 6.0	288.9	± 10.9	270.0	± 2.8	254.9	± 19.3	265.0	± 7.1	261.6	± 1.8
Leu	709.6	± 27.0	627.8	± 0.9	600.2	± 18.0	603.9	± 24.5	358.8	± 10.8	335.7	± 4.8
Met	169.5	± 7.0	177.6	± 0.3	160.0	± 5.9	151.1	± 3.4	100.8	± 4.2	95.8	± 2.7
Ile	742.3	± 23.1	660.8	± 32.0	619.6	± 17.1	658.1	± 10.9	461.4	± 10.2	444.0	± 7.4
Val	650.3	± 15.7	675.6	± 48.5	632.9	± 12.2	626.2	± 38.7	568.9	± 11.8	565.1	± 8.6
Glu	141.4	± 29.0	255.3	± 27.7	251.7	± 1.0	345.9	± 82.3	383.4	± 22.2	360.1	± 1.8
Pro	374.8	± 28.1	493.0	± 72.6	457.7	± 13.5	452.7	± 46.3	379.5	± 43.5	443.3	± 0.6
Asp	87.0	± 7.6	76.5	± 5.3	86.3	± 12.0	80.6	± 9.6	79.8	± 9.7	69.5	± 12.0
Thr	795.2	± 80.8	796.5	± 51.4	854.1	± 23.2	957.2	± 140.7	859.4	± 42.8	724.4	± 18.8
Ala	131.7	± 30.0	157.1	± 27.1	210.7	± 15.1	312.0	± 21.1	312.9	± 7.2	317.7	± 7.2
Ser	384.8	± 28.0	355.2	± 1.9	337.1	± 14.0	209.1	± 13.6	119.5	± 13.5	51.1	± 3.1
Gln	4641.5	± 86.9	4494.3	± 1.1	3808.9	± 271.7	3119.2	± 195.5	2912.6	± 163.1	2415.5	± 129.3
Gly	740.1	± 41.7	612.7	± 52.5	677.6	± 29.1	623.7	± 45.0	738.2	± 109.9	667.3	± 3.2
Asn	86.3	± 9.9	78.6	± 4.7	78.4	± 5.0	68.7	± 3.5	60.9	± 4.9	57.0	± 0.0
(Cys) ₂	101.1	± 5.0	84.5	± 0.1	85.6	± 5.5	60.7	± 4.1	50.5	± 0.2	46.5	± 0.7
His	112.7	± 19.8	106.8	± 7.7	80.1	± 8.9	91.1	± 17.4	100.0	± 12.4	80.4	± 6.0
Lys	672.6	± 18.5	642.6	± 27.3	592.2	± 0.6	606.5	± 76.2	648.2	± 19.6	625.8	± 19.7
Arg	441.8	± 16.0	349.3	± 4.5	312.8	± 8.2	249.3	± 26.2	167.0	± 8.5	159.7	± 6.8

Table 4-2. Extracellular amino acid concentrations (μM) of PANC-1 cells treated with 1 μM GEM (A), 0.05 μM PP (B), and without drug-treatment (C) under hypoglycemic conditions for 96 h ($n = 3$).

(A) GEM	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD
Trp	55.9	\pm 4.2	55.5	\pm 0.5	53.8	\pm 0.6	47.5	\pm 0.5	51.0	\pm 2.0	51.2	\pm 0.9
Phe	342.8	\pm 12.6	341.7	\pm 3.8	334.3	\pm 2.8	331.4	\pm 3.1	323.8	\pm 8.1	344.6	\pm 5.2
Tyr	278.2	\pm 18.0	279.5	\pm 4.6	274.5	\pm 5.0	270.2	\pm 3.7	274.2	\pm 2.1	282.7	\pm 3.3
Leu	683.9	\pm 44.1	652.3	\pm 0.1	643.5	\pm 7.0	658.0	\pm 9.5	394.2	\pm 17.5	425.1	\pm 6.3
Met	141.4	\pm 14.5	185.6	\pm 5.6	176.9	\pm 3.3	173.5	\pm 5.4	127.1	\pm 7.2	132.1	\pm 0.6
Ile	670.7	\pm 57.3	679.1	\pm 26.1	672.4	\pm 4.2	720.2	\pm 26.9	473.2	\pm 19.5	518.6	\pm 2.2
Val	672.9	\pm 23.8	666.6	\pm 6.9	664.9	\pm 9.4	679.5	\pm 0.3	623.8	\pm 7.6	652.6	\pm 10.4
Glu	166.3	\pm 2.3	233.7	\pm 20.6	300.9	\pm 26.1	432.0	\pm 25.3	464.8	\pm 14.6	512.9	\pm 1.0
Pro	475.8	\pm 64.4	428.2	\pm 34.3	446.1	\pm 18.9	424.1	\pm 28.0	300.2	\pm 44.4	308.2	\pm 27.2
Asp	74.0	\pm 11.3	79.7	\pm 9.4	79.1	\pm 3.6	71.7	\pm 11.1	73.2	\pm 17.8	65.0	\pm 16.1
Thr	793.0	\pm 55.8	699.0	\pm 66.8	742.0	\pm 30.0	871.0	\pm 78.7	812.7	\pm 112.8	906.8	\pm 79.5
Ala	146.3	\pm 15.0	131.9	\pm 10.9	199.4	\pm 36.7	323.8	\pm 17.6	392.1	\pm 0.7	397.5	\pm 33.7
Ser	445.1	\pm 26.8	367.6	\pm 18.6	309.4	\pm 12.6	292.8	\pm 7.8	258.6	\pm 0.5	268.7	\pm 3.8
Gln	6117.8	\pm 341.2	4637.9	\pm 277.9	3926.6	\pm 3.9	3095.8	\pm 168.8	2914.7	\pm 245.4	2459.5	\pm 7.6
Gly	514.8	\pm 36.2	563.8	\pm 90.6	590.2	\pm 0.2	713.5	\pm 23.6	724.8	\pm 46.4	754.7	\pm 92.3
Asn	87.8	\pm 7.3	77.1	\pm 3.6	86.5	\pm 6.0	89.4	\pm 2.2	96.5	\pm 4.6	96.1	\pm 3.9
(Cys) ₂	92.7	\pm 3.7	87.9	\pm 0.1	75.8	\pm 1.5	70.3	\pm 3.7	64.2	\pm 0.0	67.0	\pm 3.8
His	95.5	\pm 10.5	105.7	\pm 4.6	86.7	\pm 10.0	104.1	\pm 14.6	108.6	\pm 8.7	108.1	\pm 9.1
Lys	695.3	\pm 25.6	670.6	\pm 20.1	674.9	\pm 0.1	688.6	\pm 13.6	715.3	\pm 18.6	737.3	\pm 7.9
Arg	319.3	\pm 133.2	372.7	\pm 5.8	344.4	\pm 9.2	355.2	\pm 2.1	266.2	\pm 1.7	282.5	\pm 11.4

(B) PP	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	54.2	± 2.4	63.7	± 8.1	56.4	± 1.7	48.8	± 0.2	53.3	± 2.9	55.9	± 0.2
Phe	341.7	± 9.0	380.5	± 41.6	345.5	± 9.9	329.5	± 2.4	345.9	± 3.5	354.5	± 0.1
Tyr	277.9	± 7.7	299.1	± 1.7	289.9	± 5.3	263.7	± 3.8	279.3	± 10.3	292.5	± 0.7
Leu	728.8	± 47.9	749.1	± 77.1	714.9	± 10.7	661.0	± 6.6	501.9	± 76.7	435.3	± 3.9
Met	152.1	± 9.7	215.6	± 23.6	203.7	± 1.4	176.5	± 9.7	151.5	± 12.9	139.4	± 0.3
Ile	711.8	± 53.3	767.2	± 93.7	737.4	± 10.5	709.1	± 31.4	596.2	± 78.7	530.0	± 0.0
Val	674.0	± 49.6	765.8	± 87.8	698.5	± 12.0	681.8	± 13.1	692.6	± 19.2	686.7	± 8.6
Glu	171.2	± 7.7	314.8	± 52.3	295.0	± 8.8	368.9	± 52.2	361.6	± 39.6	388.9	± 33.7
Pro	565.2	± 37.5	508.4	± 52.3	476.6	± 33.3	369.5	± 40.4	284.5	± 40.7	252.6	± 7.5
Asp	82.1	± 17.6	98.6	± 14.5	90.7	± 10.4	75.5	± 20.4	72.7	± 3.8	78.3	± 8.4
Thr	782.9	± 81.6	811.0	± 140.7	715.4	± 92.7	767.2	± 43.2	760.4	± 43.8	739.2	± 1.4
Ala	151.0	± 27.9	158.3	± 21.9	144.4	± 0.8	192.3	± 7.7	218.8	± 10.0	258.9	± 6.4
Ser	484.9	± 57.1	412.4	± 37.4	383.4	± 49.4	352.5	± 23.7	354.3	± 16.2	373.9	± 15.4
Gln	6111.6	± 409.8	4635.2	± 23.5	4326.5	± 200.1	3321.2	± 180.1	3237.7	± 420.5	2839.3	± 93.6
Gly	594.9	± 51.0	688.0	± 70.1	665.7	± 95.4	639.1	± 93.3	700.4	± 37.1	790.4	± 80.8
Asn	89.3	± 3.8	83.7	± 9.9	84.8	± 12.1	78.1	± 2.5	90.7	± 4.4	90.1	± 0.7
(Cys) ₂	102.2	± 7.0	92.4	± 7.6	94.1	± 0.1	69.5	± 1.4	72.3	± 0.0	64.2	± 1.8
His	105.6	± 4.9	131.4	± 28.0	116.2	± 7.3	116.3	± 8.0	121.1	± 5.5	118.2	± 7.2
Lys	671.9	± 33.9	736.6	± 92.8	722.9	± 21.8	667.1	± 31.6	696.6	± 25.3	730.6	± 24.3
Arg	176.2	± 13.4	386.1	± 0.3	406.8	± 17.2	352.1	± 6.8	278.4	± 1.5	288.8	± 9.4

(C)	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
control	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	50.3	± 2.1	56.2	± 1.1	55.3	± 2.3	49.1	± 0.1	49.6	± 0.6	51.9	± 1.5
Phe	323.6	± 4.7	343.2	± 3.5	337.8	± 0.2	328.8	± 3.4	323.5	± 1.3	339.1	± 9.6
Tyr	261.1	± 4.3	293.9	± 7.0	282.8	± 0.0	263.9	± 4.4	270.7	± 0.2	278.4	± 4.8
Leu	667.7	± 3.5	639.8	± 35.9	667.5	± 30.0	618.2	± 28.3	392.9	± 9.1	395.3	± 11.4
Met	143.1	± 4.9	190.3	± 11.0	193.8	± 3.6	167.5	± 6.9	130.4	± 0.1	128.3	± 5.1
Ile	653.9	± 10.2	708.1	± 1.3	713.8	± 0.3	659.5	± 15.8	483.6	± 7.4	487.3	± 24.5
Val	630.7	± 9.6	665.3	± 20.2	688.9	± 30.7	660.3	± 9.6	627.4	± 7.7	641.0	± 23.2
Glu	142.3	± 1.0	198.6	± 1.1	289.2	± 9.5	386.6	± 51.9	458.5	± 45.5	512.2	± 0.3
Pro	485.6	± 61.7	421.0	± 27.3	463.4	± 58.2	383.0	± 22.9	293.9	± 22.7	309.4	± 24.0
Asp	71.4	± 3.7	68.7	± 11.8	89.5	± 2.0	84.4	± 6.2	74.3	± 11.0	87.0	± 6.0
Thr	800.6	± 29.5	786.7	± 85.5	930.5	± 108.2	800.6	± 19.7	777.5	± 0.3	862.3	± 49.7
Ala	161.7	± 1.0	129.1	± 1.0	198.1	± 24.1	238.3	± 15.4	289.0	± 19.2	341.0	± 16.6
Ser	419.3	± 32.7	370.0	± 15.0	336.8	± 18.7	276.0	± 18.8	241.4	± 1.3	208.6	± 31.9
Gln	5648.9	± 19.6	4663.9	± 334.8	4075.0	± 175.2	3177.2	± 98.6	2814.7	± 150.3	2383.1	± 64.8
Gly	598.3	± 73.7	523.8	± 40.5	576.0	± 6.7	695.8	± 24.5	768.7	± 36.7	779.3	± 2.2
Asn	86.8	± 4.9	78.8	± 6.0	88.9	± 6.3	86.3	± 1.9	98.6	± 4.6	107.4	± 1.8
(Cys) ₂	93.9	± 3.8	83.8	± 3.1	76.1	± 2.9	52.4	± 2.3	46.1	± 3.9	39.8	± 1.7
His	76.8	± 0.6	99.1	± 0.0	99.5	± 9.6	76.5	± 9.3	110.5	± 12.5	111.5	± 17.4
Lys	635.2	± 20.1	693.1	± 27.8	691.9	± 0.3	662.4	± 1.2	649.7	± 22.4	677.1	± 21.1
Arg	170.9	± 0.2	384.6	± 13.6	360.4	± 11.8	317.6	± 14.2	209.0	± 8.9	245.4	± 1.7

Table 4-3. Intracellular amino acid concentrations (pmol/well) of PANC-1 cells treated with 1 μM GEM (A), 0.05 μM PP (B), and without drug-treatment (C) under normoglycemic conditions for 96 h ($n = 3$). N.D. means not detected.

(A) GEM	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD
Trp	63.5	\pm 10.1	44.9	\pm 4.8	108.3	\pm 2.6	111.8	\pm 5.7	111.3	\pm 8.1	83.8	\pm 11.3
Phe	119.5	\pm 14.2	157.4	\pm 1.2	451.6	\pm 15.2	427.3	\pm 14.9	477.4	\pm 7.4	365.5	\pm 0.2
Tyr	185.9	\pm 43.3	231.7	\pm 4.5	496.7	\pm 25.5	480.8	\pm 21.3	503.3	\pm 13.5	371.1	\pm 17.1
Leu	145.3	\pm 11.9	235.9	\pm 6.4	783.3	\pm 5.7	651.2	\pm 10.7	780.8	\pm 37.1	763.1	\pm 47.1
Met	80.4	\pm 0.0	177.9	\pm 0.8	465.9	\pm 15.6	390.5	\pm 5.6	387.0	\pm 17.4	323.2	\pm 5.3
Ile	209.9	\pm 32.1	254.7	\pm 11.1	687.8	\pm 41.0	643.8	\pm 22.1	723.1	\pm 23.4	680.8	\pm 20.0
Val	104.3	\pm 3.5	229.8	\pm 11.0	589.3	\pm 18.9	625.5	\pm 17.3	707.5	\pm 26.3	549.2	\pm 10.2
Glu	2113.8	\pm 506.2	5069.6	\pm 772.7	9447.5	\pm 713.0	8556.4	\pm 18.4	7359.7	\pm 907.7	5168.7	\pm 316.8
Pro	331.1	\pm 13.9	621.1	\pm 56.4	1032.9	\pm 74.6	1598.1	\pm 28.0	1804.2	\pm 80.2	1438.8	\pm 66.6
Asp	265.6	\pm 31.4	856.7	\pm 95.1	858.5	\pm 39.1	939.5	\pm 92.4	709.5	\pm 66.4	450.9	\pm 17.6
Thr	435.2	\pm 25.9	629.7	\pm 39.3	1308.4	\pm 67.5	1327.7	\pm 28.3	1707.3	\pm 180.6	1441.9	\pm 16.0
Ala	849.8	\pm 390.7	560.0	\pm 47.0	673.6	\pm 291.9	709.8	\pm 78.7	1214.4	\pm 193.3	1625.1	\pm 281.0
Ser	172.6	\pm 11.7	599.6	\pm 68.9	1206.8	\pm 56.3	1249.2	\pm 109.8	1638.1	\pm 103.9	1350.5	\pm 94.4
Gln	9703.7	\pm 614.5	15163.6	\pm 602.0	25890.5	\pm 750.3	22106.6	\pm 1230.6	24061.2	\pm 1223.1	19791.8	\pm 379.5
Gly	308.7	\pm 100.3	1146.6	\pm 136.8	3010.1	\pm 229.9	2263.0	\pm 328.5	3144.7	\pm 331.5	1843.3	\pm 272.4
Asn	196.5	\pm 21.7	329.5	\pm 21.3	532.4	\pm 49.9	543.2	\pm 55.8	540.7	\pm 36.7	472.7	\pm 2.1
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	30.4	\pm 2.1	71.5	\pm 3.7	187.8	\pm 7.6	183.8	\pm 3.0	202.8	\pm 3.5	155.6	\pm 5.9
Lys	31.5	\pm 0.7	88.5	\pm 11.6	277.6	\pm 3.4	203.8	\pm 5.2	287.9	\pm 19.7	190.5	\pm 4.7
Arg	375.9	\pm 18.0	424.4	\pm 30.6	513.7	\pm 20.2	241.6	\pm 32.7	55.7	\pm 30.8	13.5	\pm 23.1

(B) PP	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	50.0	± 19.6	58.0	± 3.8	116.5	± 15.6	183.6	± 4.8	228.0	± 9.7	224.9	± 10.0
Phe	93.8	± 9.5	192.0	± 2.6	481.0	± 3.0	812.7	± 14.4	1044.2	± 8.0	1059.8	± 33.3
Tyr	133.9	± 35.9	268.3	± 25.3	570.8	± 49.8	880.7	± 45.6	1098.9	± 16.8	986.9	± 71.3
Leu	176.5	± 26.3	313.1	± 18.8	939.0	± 45.7	1259.5	± 27.7	1701.1	± 35.6	2194.2	± 86.0
Met	83.6	± 2.1	206.7	± 2.6	467.0	± 7.8	633.1	± 5.8	782.2	± 11.7	786.1	± 15.3
Ile	184.5	± 27.4	287.0	± 27.5	819.6	± 54.7	1211.4	± 66.6	1612.5	± 16.6	1910.9	± 1.6
Val	107.9	± 13.7	273.6	± 13.9	642.9	± 14.7	1088.7	± 9.2	1388.3	± 39.8	1400.6	± 16.6
Glu	2312.3	± 646.3	4605.8	± 9.6	10855.0	± 2362.7	15227.5	± 3303.2	19137.6	± 5728.8	10419.7	± 1150.6
Pro	314.7	± 17.7	497.1	± 50.1	1147.9	± 54.9	2798.2	± 374.4	4821.4	± 822.4	6009.5	± 42.2
Asp	283.9	± 40.2	411.4	± 13.6	618.2	± 5.5	713.5	± 47.8	752.5	± 72.3	379.1	± 26.7
Thr	440.1	± 58.7	692.0	± 9.1	1492.0	± 96.3	2691.0	± 298.1	4231.1	± 564.8	4310.1	± 199.3
Ala	268.8	± 137.4	927.2	± 35.6	905.3	± 194.0	1854.8	± 120.6	3477.1	± 429.1	4389.1	± 83.2
Ser	201.6	± 49.7	766.5	± 64.3	1423.0	± 83.0	1993.7	± 117.0	2930.9	± 79.3	2303.1	± 1.8
Gln	9943.4	± 741.4	16731.7	± 1169.9	26116.6	± 1496.0	35831.2	± 2070.7	46928.7	± 561.3	47710.6	± 1772.1
Gly	502.0	± 213.2	655.0	± 231.0	2576.0	± 17.0	6627.2	± 950.3	9295.9	± 38.1	12918.4	± 513.1
Asn	204.5	± 28.9	342.0	± 0.6	702.4	± 0.4	1149.4	± 124.7	1762.7	± 150.4	1526.5	± 55.5
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	31.8	± 4.7	95.6	± 6.2	196.7	± 4.6	368.3	± 7.2	456.6	± 19.1	458.7	± 8.6
Lys	31.6	± 1.2	103.4	± 4.4	302.9	± 4.5	441.3	± 26.7	599.8	± 18.7	656.1	± 21.4
Arg	420.3	± 47.7	440.1	± 0.4	565.7	± 1.8	474.5	± 2.4	125.2	± 15.0	136.2	± 29.3

(C)	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
control	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	80.3	± 4.7	66.1	± 7.5	95.4	± 9.9	231.0	± 5.3	264.9	± 19.1	311.4	± 26.1
Phe	171.3	± 0.8	167.8	± 6.3	395.8	± 7.9	952.3	± 16.4	1226.3	± 0.0	1622.8	± 36.8
Tyr	185.5	± 55.8	169.0	± 40.7	459.4	± 11.0	1091.4	± 36.2	1314.2	± 32.8	1543.4	± 44.1
Leu	372.9	± 160.7	255.4	± 7.0	680.8	± 40.8	1423.0	± 43.4	1913.6	± 153.6	3099.8	± 207.1
Met	81.5	± 2.7	191.4	± 1.8	376.2	± 2.0	822.3	± 4.7	1102.8	± 16.4	1479.6	± 25.5
Ile	274.8	± 100.8	215.2	± 10.1	611.8	± 68.1	1348.1	± 89.4	1773.4	± 142.5	2646.2	± 155.1
Val	106.5	± 5.4	229.2	± 2.5	592.6	± 0.6	1081.3	± 27.6	1466.6	± 52.7	1829.2	± 62.6
Glu	2673.5	± 721.4	4804.1	± 657.5	8582.0	± 41.9	19900.3	± 1779.3	22060.4	± 2156.1	27239.2	± 600.8
Pro	353.4	± 73.5	494.9	± 88.2	1266.8	± 169.4	3540.5	± 52.4	5915.8	± 484.7	9019.6	± 1727.5
Asp	314.9	± 57.1	621.4	± 58.3	1238.1	± 34.2	1068.8	± 75.4	997.0	± 74.1	991.2	± 24.5
Thr	462.7	± 39.0	626.0	± 65.4	1104.6	± 119.3	3198.4	± 143.1	5042.6	± 660.6	7457.0	± 597.8
Ala	711.3	± 920.4	896.6	± 512.7	746.5	± 233.6	1677.2	± 132.9	3317.2	± 329.2	5255.9	± 686.2
Ser	203.0	± 45.8	598.6	± 70.8	1107.9	± 49.3	1915.6	± 82.4	2305.0	± 22.6	2064.5	± 40.2
Gln	9958.4	± 1.6	15091.1	± 192.9	22249.7	± 657.9	38991.0	± 34.2	48910.6	± 707.3	55304.0	± 103.1
Gly	292.8	± 198.2	1132.1	± 406.7	1998.6	± 137.8	6892.8	± 1019.6	10892.6	± 391.2	13120.2	± 0.0
Asn	212.7	± 12.0	295.6	± 15.4	535.9	± 19.0	980.4	± 73.6	1499.0	± 3.7	1802.1	± 165.5
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	29.1	± 0.0	79.5	± 0.2	156.2	± 2.3	431.1	± 2.6	586.4	± 0.5	770.6	± 15.8
Lys	32.6	± 0.8	91.9	± 3.0	261.4	± 8.4	478.3	± 16.6	669.1	± 11.8	857.1	± 20.9
Arg	339.1	± 34.8	438.9	± 65.5	457.0	± 45.7	390.3	± 125.4	103.5	± 11.3	153.1	± 24.4

Table 4-4. Intracellular amino acid concentrations (pmol/well) of PANC-1 cells treated with 1 μM GEM (A), 0.05 μM PP (B), and without drug-treatment (C) under hypoglycemic conditions for 96 h ($n = 3$). N.D. means not detected.

(A) GEM	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD	mean	\pm SD
Trp	53.5	\pm 20.1	43.7	\pm 6.4	80.7	\pm 3.5	122.1	\pm 10.3	101.4	\pm 8.3	61.0	\pm 8.8
Phe	105.0	\pm 41.8	165.6	\pm 3.4	332.5	\pm 6.1	476.9	\pm 3.8	491.2	\pm 4.0	339.0	\pm 19.9
Tyr	138.6	\pm 55.8	220.7	\pm 32.7	365.8	\pm 38.1	525.9	\pm 12.2	517.9	\pm 14.9	327.1	\pm 32.7
Leu	151.4	\pm 112.3	334.8	\pm 38.4	577.7	\pm 29.8	793.5	\pm 39.0	793.8	\pm 0.4	724.5	\pm 1.9
Met	71.1	\pm 1.0	180.4	\pm 5.0	364.9	\pm 10.0	465.6	\pm 7.3	451.7	\pm 19.6	327.5	\pm 4.3
Ile	161.5	\pm 66.7	294.8	\pm 57.1	520.1	\pm 0.3	774.0	\pm 49.7	745.4	\pm 31.2	620.5	\pm 0.5
Val	83.3	\pm 0.6	216.3	\pm 0.4	455.4	\pm 5.4	688.3	\pm 9.5	716.3	\pm 0.6	467.0	\pm 14.4
Glu	2256.5	\pm 29.7	3531.4	\pm 2.8	11110.9	\pm 2468.8	9176.9	\pm 2319.4	5959.2	\pm 63.2	3904.0	\pm 770.5
Pro	221.5	\pm 53.4	456.5	\pm 35.5	858.1	\pm 89.7	1194.8	\pm 0.7	1599.5	\pm 57.4	888.0	\pm 68.3
Asp	217.4	\pm 5.6	1106.9	\pm 208.7	1965.7	\pm 63.5	1836.7	\pm 85.2	1396.9	\pm 120.7	889.7	\pm 77.8
Thr	372.9	\pm 15.1	685.5	\pm 24.1	1040.8	\pm 41.0	1247.5	\pm 21.1	1699.4	\pm 75.1	1151.0	\pm 18.0
Ala	382.1	\pm 208.1	909.0	\pm 407.8	904.4	\pm 165.2	852.3	\pm 162.5	1082.1	\pm 128.9	862.4	\pm 269.8
Ser	132.8	\pm 0.8	503.0	\pm 35.6	895.1	\pm 21.0	1178.7	\pm 32.0	1359.7	\pm 57.1	962.1	\pm 102.4
Gln	9174.4	\pm 485.4	14290.0	\pm 88.0	19365.7	\pm 528.5	20383.3	\pm 765.7	19419.3	\pm 999.8	13054.2	\pm 634.8
Gly	354.7	\pm 145.1	1101.1	\pm 226.8	2076.6	\pm 201.2	2342.3	\pm 373.7	3031.7	\pm 303.9	2305.6	\pm 344.4
Asn	183.4	\pm 22.6	362.9	\pm 42.3	802.2	\pm 39.4	940.1	\pm 54.0	848.6	\pm 58.6	602.4	\pm 33.2
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	25.0	\pm 0.2	76.7	\pm 3.0	132.4	\pm 2.5	217.1	\pm 9.6	208.3	\pm 2.5	151.3	\pm 0.4
Lys	34.6	\pm 5.2	110.1	\pm 2.7	192.7	\pm 6.0	283.7	\pm 12.6	254.7	\pm 7.8	170.3	\pm 5.8
Arg	352.8	\pm 15.5	475.0	\pm 41.9	370.7	\pm 34.5	381.5	\pm 31.3	46.7	\pm 18.5	38.0	\pm 11.6

(B) PP	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	40.8	± 6.7	42.2	± 9.2	31.2	± 5.3	21.6	± 0.1	9.8	± 2.6	15.3	± 10.5
Phe	74.4	± 1.7	130.1	± 0.5	102.9	± 0.0	56.5	± 5.2	45.0	± 1.6	29.1	± 1.3
Tyr	162.6	± 26.9	189.6	± 17.5	138.0	± 4.6	88.1	± 0.3	62.8	± 5.7	85.9	± 32.3
Leu	147.0	± 33.6	248.8	± 12.1	186.9	± 17.1	91.7	± 12.9	64.3	± 9.8	39.9	± 37.1
Met	78.6	± 2.6	139.0	± 4.6	122.4	± 5.8	76.1	± 0.6	54.8	± 1.4	39.7	± 1.3
Ile	188.7	± 26.5	259.6	± 22.0	180.9	± 0.8	99.3	± 0.8	95.6	± 4.6	69.8	± 6.5
Val	92.8	± 6.2	186.7	± 14.3	157.3	± 9.3	106.2	± 2.9	118.7	± 25.0	66.9	± 12.2
Glu	2354.4	± 482.9	2233.9	± 50.1	1759.0	± 11.2	735.8	± 297.6	644.5	± 0.4	106.6	± 119.3
Pro	274.9	± 10.2	279.1	± 36.0	184.9	± 0.3	129.0	± 9.7	161.1	± 43.9	133.1	± 1.7
Asp	233.5	± 24.4	793.7	± 120.0	242.9	± 21.6	56.0	± 11.8	53.0	± 10.9	N.D.	
Thr	404.8	± 0.5	493.0	± 60.2	382.3	± 18.8	302.4	± 0.4	308.4	± 23.6	318.2	± 71.8
Ala	939.6	± 301.1	611.2	± 329.0	144.1	± 101.1	119.7	± 283.5	588.7	± 222.1	561.0	± 290.0
Ser	165.8	± 13.8	286.5	± 50.0	124.4	± 25.3	30.9	± 0.5	33.6	± 5.6	133.4	± 8.8
Gln	9229.5	± 871.5	10516.6	± 13.2	9686.8	± 428.9	7744.6	± 533.2	4850.4	± 258.7	3797.6	± 259.4
Gly	435.3	± 179.6	658.0	± 395.3	567.4	± 82.4	159.3	± 80.9	3049.7	± 0.0	708.3	± 578.8
Asn	228.8	± 2.7	253.2	± 18.9	258.3	± 27.3	200.9	± 24.1	108.7	± 9.4	111.1	± 13.9
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	29.2	± 3.0	61.1	± 1.5	37.4	± 0.1	15.5	± 1.3	11.7	± 4.8	15.0	± 3.4
Lys	37.7	± 2.6	113.6	± 1.5	98.6	± 4.9	93.5	± 4.4	93.1	± 2.4	57.9	± 3.9
Arg	354.6	± 5.8	505.4	± 33.9	202.4	± 19.5	126.4	± 9.5	10.2	± 19.6	N.D.	

(C)	0 hr		24 hr		48 hr		72 hr		84 hr		96 hr	
control	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD	mean	± SD
Trp	43.3	± 16.6	52.6	± 6.9	81.8	± 0.2	156.7	± 5.3	162.9	± 2.7	115.5	± 11.2
Phe	97.1	± 0.2	161.3	± 22.9	353.9	± 9.7	666.6	± 0.2	765.4	± 9.7	574.2	± 17.4
Tyr	146.3	± 17.3	245.2	± 88.0	418.9	± 33.4	721.5	± 0.8	753.4	± 40.4	570.9	± 21.1
Leu	181.8	± 56.1	283.4	± 40.3	656.1	± 16.6	1035.5	± 18.9	1253.8	± 173.7	1121.3	± 98.3
Met	98.4	± 0.7	171.0	± 2.1	397.4	± 5.3	588.8	± 16.1	617.8	± 20.8	509.6	± 13.3
Ile	218.9	± 11.1	283.0	± 7.6	599.2	± 26.5	995.0	± 4.7	1185.8	± 77.9	975.9	± 89.9
Val	147.1	± 12.8	221.3	± 7.3	509.0	± 16.2	908.0	± 23.8	1004.6	± 17.2	775.5	± 10.0
Glu	2477.7	± 916.5	3547.9	± 177.9	8198.3	± 3048.0	11882.6	± 3637.6	11138.9	± 4244.9	5048.8	± 726.5
Pro	342.7	± 0.8	427.6	± 12.2	761.7	± 1.7	1423.9	± 84.7	1862.6	± 5.2	1275.2	± 171.7
Asp	311.4	± 52.4	1057.2	± 39.4	1333.3	± 105.0	1001.5	± 79.5	769.5	± 153.0	427.4	± 30.6
Thr	467.4	± 84.4	611.3	± 71.4	1047.6	± 93.8	1664.9	± 81.2	2123.8	± 132.6	1587.4	± 158.5
Ala	404.6	± 370.1	517.9	± 1.1	447.3	± 112.5	905.5	± 152.3	1315.9	± 94.3	1148.5	± 212.5
Ser	214.9	± 12.6	483.9	± 2.1	920.0	± 110.4	1268.0	± 93.2	1492.7	± 159.9	1145.0	± 107.0
Gln	10610.3	± 871.1	14918.6	± 405.9	20095.5	± 905.9	23636.9	± 1285.5	23606.3	± 773.2	17968.9	± 260.9
Gly	310.3	± 64.0	1103.2	± 76.8	2232.1	± 149.2	3769.5	± 464.0	4930.6	± 736.0	3336.4	± 498.3
Asn	216.1	± 38.3	363.9	± 15.7	662.8	± 109.1	1110.7	± 112.2	1148.2	± 143.9	895.7	± 97.5
(Cys) ₂	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
His	34.6	± 1.2	76.5	± 1.1	165.5	± 3.4	311.7	± 0.0	332.8	± 19.4	260.6	± 0.1
Lys	57.3	± 2.1	102.0	± 3.3	234.5	± 2.7	361.6	± 2.4	418.5	± 3.8	305.2	± 2.0
Arg	420.4	± 20.7	484.0	± 9.5	438.3	± 18.9	401.9	± 12.8	129.9	± 1.7	152.5	± 55.0

4-2-3 GEM を投与した PANC-1 の PCA

グルコース豊富状態または欠乏状態で GEM とともに 96 時間培養した PANC-1 の細胞外または細胞内のアミノ酸について、アミノ酸メタボロミクスを用いて解析した。

(1) 培養培地分析

グルコース豊富状態で GEM を投与した PANC-1 の培養培地について分析して得られたスコアプロットを Fig.4-5(A) に示す。PC1 (52.3%) および PC2 (16.4%) の累積寄与率は 68.7% で、元のアミノ酸濃度情報を十分に維持していた。このスコアプロットにおいて、培養時間の短い検体は GEM 投与の有無にかかわらず、互いに近い座標位置であった。培養時間が長くなるに従い、特に 84 時間や 96 時間培養した検体では座標位置が離れ、クラスター分析により GEM 群と control 群に分類された。これは、PANC-1 に対する GEM の効果が、スコアプロットにおける座標位置の違いとして表されていることを示している。一方、グルコース欠乏状態で GEM を投与した PANC-1 の培養培地について分析して得られた PC1 (52.3%) および PC2 (19.0%) から成るスコアプロットでも、元データの分散の 71.3% を占めている (Fig.4-5(B))。座標位置は十分な寄与率で検体の傾向を反映していると考えられるが、培養時間が同程度の検体同士は、スコアプロット上で互いに近接し、GEM 投与の有無は区別されなかった。これは細胞生存率の実験結果 (Fig.4-4) で示されたようなグルコース欠乏状態による GEM の抗がん効果の低下を表している。

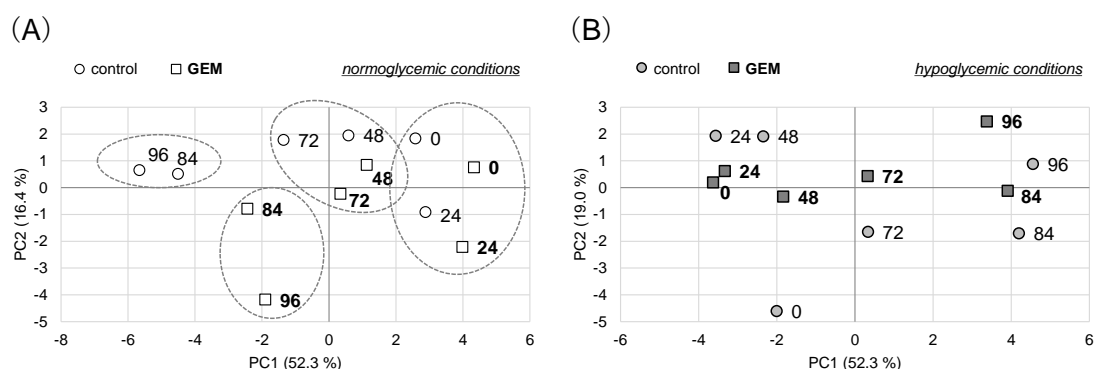


Fig.4-5 Score plots obtained from analyses of extracellular amino acids of PANC-1 cells treated with GEM under either (A) normoglycemic or (B) hypoglycemic conditions for 96 hr. Circles, control; squares, GEM-treated group. The numerals indicate the incubation time (hr).

(2) 細胞内代謝物分析

グルコース豊富状態で GEM を投与した PANC-1 細胞内アミノ酸について分析して得られたスコアプロットを Fig.4-6(A) に示す。PC1 (88.8%) および PC2 (6.5%) が元データ分散の 95.3% を占めており、培地を分析した場合と同様に GEM 群と control 群を区別することが可能であった。特に 72 時間以上培養された検体は、GEM 群と control 群の別々のクラスターとして分類され、座標位置が非常に遠く離れていることから、細胞外アミノ酸の分析結果より明確に判別されたと言える。一方、グルコース欠乏状態で GEM を投与した PANC-1 細胞内アミノ酸について分析して得られた PC1 (84.0%) および PC2 (8.9%) から成るスコアプロットでも、元データの分散の 92.9% を占めている (Fig.4-6(B))。十分な寄与率で検体の傾向を反映しているが、培養時間が同じ検体同士が近接し GEM 投与の有無を区別することは出来なかった。

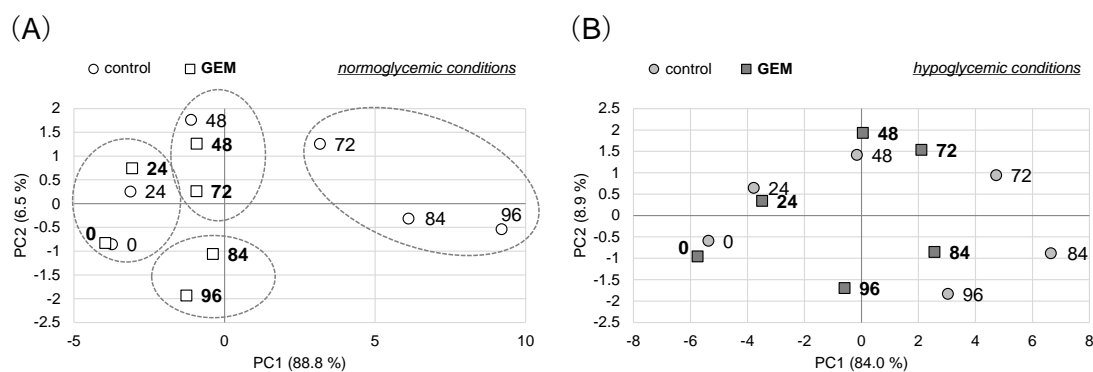


Fig.4-6 Score plots obtained from analyses of intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with GEM under either (A) normoglycemic or (B) hypoglycemic conditions for 96 hr. Circles, control; squares, GEM-treated group. The numerals indicate the incubation time (hr).

(3) GEM 効果判定マーカー候補物質の同定

グルコース豊富状態で培養した PANC-1 細胞の細胞内または細胞外アミノ酸濃度変動に基づいて評価するアミノ酸メタボロミクスは、GEM の有効性を *in vitro* で判別するツールとして有用であることが確認できた (Figs.4-5(A)および 4-6(A))。そこで、スコアプロットにおけるグループの分類に寄与したアミノ酸について、対応するローディングプロットから同定した。細胞外アミノ酸分析の結果から得られたローディングプロット (Fig.4-7(A)) では、ほとんどのアミノ酸が広く散在していた。これは、ほとんどのアミノ酸がスコアプロット上の座標位置の決定に等しく寄与したことを意味しており、GEM の効果を識別できるような特徴的なアミノ酸が観測されなかったということである。これに対して細胞内アミノ酸の分析から得られたスコアプロットにおいて、GEM 群と control 群は PC1 値で区別された (Fig.4-7(B))。つまり、対応するローディングプロットにおいて PC1 係数 (絶対値) の大きなアミノ酸が判別に大きな影響を及ぼすと考

えられ、PC1 係数が等しいほとんどのアミノ酸と、その対角に位置する Arg が判別に寄与したものであると推測された。

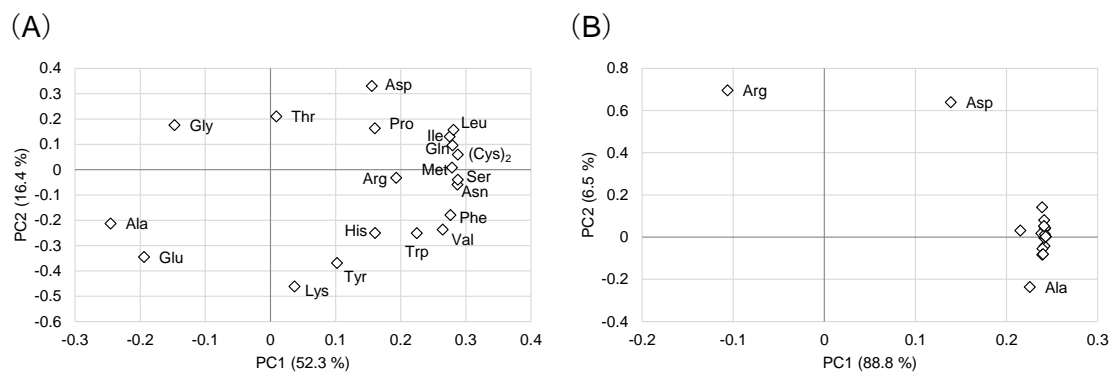


Fig.4-7 Loading plots obtained from analyses of (A) extracellular and (B) intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with GEM under normoglycemic conditions (hr).

4-2-4 PP を投与した PANC-1 の PCA

グルコース豊富状態または欠乏状態で PP とともに 96 時間培養した PANC-1 の細胞外または細胞内のアミノ酸について、アミノ酸メタボロミクスを用いて解析した。

(1) 培養培地分析

グルコース豊富状態とグルコース欠乏状態での PANC-1 培養培地の分析により得られたスコアプロットを比較した。それぞれのスコアプロットにおける PC1 および PC2 の主成分の累積寄与率は、グルコース豊富状態で 68.2%、グルコース欠乏状態で 74.4% と元のアミノ酸情報を十分に保持していた。それらのスコアプロットを比較した結果、グルコース豊富状態では、培養時間が同程度の検体同士は PP 投与の有無にかかわらず互いに近接していた (Fig.4-8(A))。しかし、グルコース欠乏状態で PP とともに 84 時間以上培養された検体は、control 群と区別された (Fig.4-8(B))。つまり、グルコース欠乏状態でのみ、PP 投与群は control 群から PC1 値により区別することが可能であったと言える。しかし、区別された検体の座標位置はそれほど遠く離れているわけではないことから、スコアプロット上で完全に判別されたとは言い難いかもしれない。

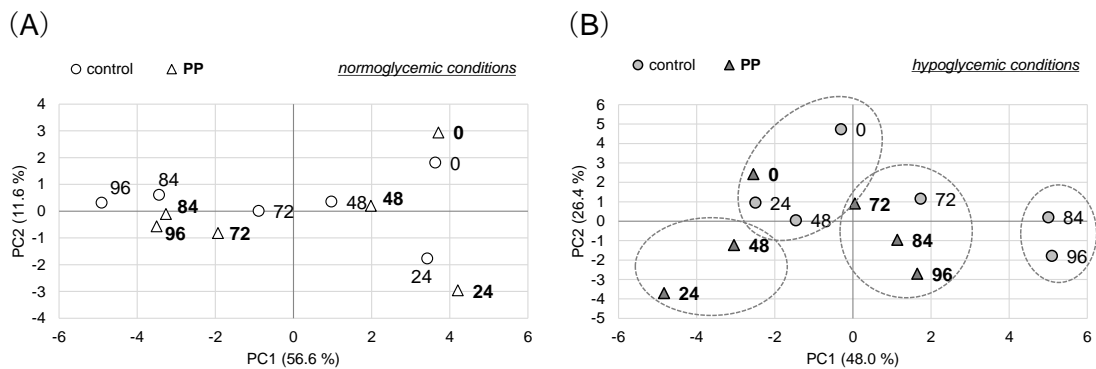


Fig.4-8 Score plots obtained from analyses of extracellular amino acids of PANC-1 cells treated with PP under either (A) normoglycemic or (B) hypoglycemic conditions for 96 hr. Circles, control; triangles, PP-treated group. The numerals indicate the incubation time (hr).

(2) 細胞内代謝物分析

グルコース豊富状態とグルコース欠乏状態で PP を投与した PANC-1 の細胞内アミノ酸に対する解析により得られたスコアプロットを比較した。Fig.4-9(A) に示されるように、グルコース豊富状態で PP とともに培養した PP 群は、96 時間検体を除き、control 群と区別することは出来なかった。細胞生存率の実験結果 Fig.4-4 でも示されたように、PP 群 96 時間検体が control 群と異なるグループとして判別されたのは、長時間培養のために培地中グルコース濃度が経時的に減少したことが原因の一つとして考えられた。また、グルコース欠乏状態で PP とともに培養した検体は、PC1 の値によって control 群から別のグループとして区別された (Fig.4-9(B))。これを前項の細胞外アミノ酸の分析結果から得られるスコアプロットの場合と比較すると、特に 48 時間以上培養した PP 群と control 群の間に PC1 値に依存した明確な区別が観測された。

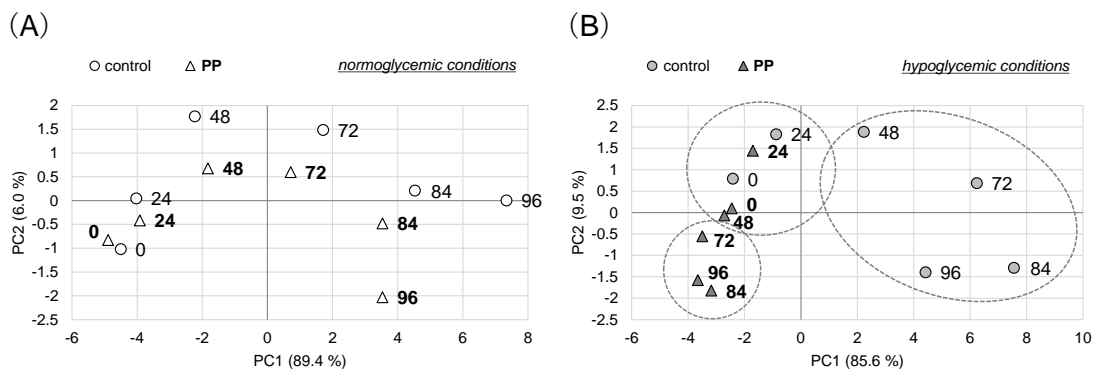


Fig.4-9 Score plots obtained from analyses of intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with PP under either (A) normoglycemic or (B) hypoglycemic conditions for 96 hr. Circles, control; triangles, PP-treated group. The numerals indicate the incubation time (hr).

(3) PP 効果判定マーカー候補物質の同定

アミノ酸メタボロミクスは、PP のグルコース欠乏状態に対する選択性を *in vitro* で確認できる手段であることを明らかにした (Figs.4-8(B)および 4-9(B))。そこで、各スコアプロットに対応するローディングプロットから検体のグループ判別に寄与する指標となり得るアミノ酸候補について検討した。グルコース欠乏状態の細胞外アミノ酸を分析した場合、PP 群はスコアプロット上で control 群と明確に区別されなかったため、ローディングプロットにおいてほぼ原点付近の Thr を除くほとんど全てのアミノ酸がプロット全体に分布する結果であった (Fig.4-10(A))。つまり、このローディングプロットから PP 作用発現との関連が示唆されるアミノ酸を同定することは出来なかった。これに対して、細胞内アミノ酸を分析して得られたスコアプロットにおいて、PC1 により PP 投与の有無を判別することが可能であった。しかしながら、対応するローディングプロットで PC1 係数の値が大きい (=プロットの中心から離れている) アミノ酸は、ほとんど全てであり、PP 投与の有無を判別するのに、ほとんどのアミノ酸が等しく寄与したことが示された (Fig.4-10(B))。つまり細胞外アミノ酸分析の場合と同様に、PP 投与の有無に関連するアミノ酸の同定が困難であることを意味する。

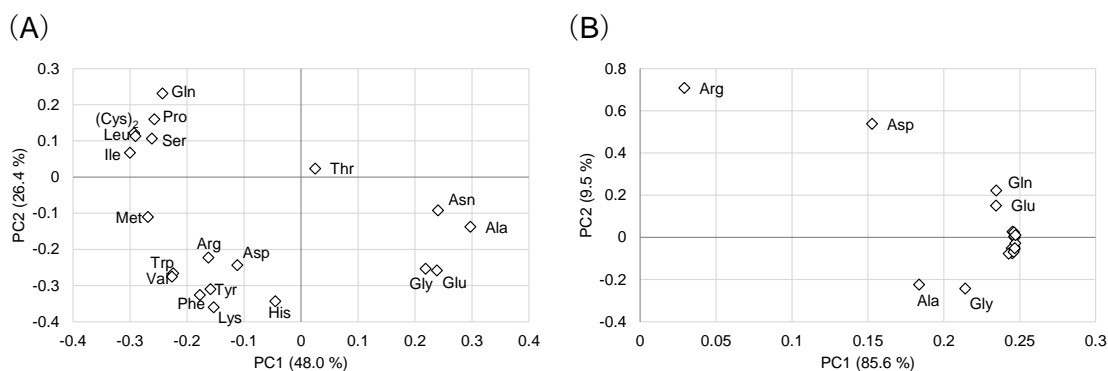


Fig.4-10 Loading plots obtained from analyses of (A) extracellular and (B) intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with PP under normoglycemic conditions (hr).

4-2-5 抗がん剤の有効性を評価するアミノ酸候補の探索

様々な条件で培養された場合でも、PANC-1 に対する抗がん効果の判別は、細胞内および細胞外アミノ酸濃度のどちらを用いた分析でも可能であるということが明らかになった。しかし、注目すべきは、細胞外または細胞内アミノ酸の分析から得られたスコアプロットのいずれにおいても、抗がん剤投与の判別に寄与する特徴的なアミノ酸 (変数) を同定することが出来なかったことである。GEM はもちろん PP を投与した PANC-1 は、control 群とは異なるアミノ酸プロファイルが観測されていることから、潜在的なマーカー候補物質は存在すると考えられる。それゆえ、これまでと異なる統計手法を

用いたデータの更なる解析が必要であると考えられた。第一章～第三章で使用した主成分分析 (PCA) の代わりに、アミノ酸濃度データに加えて検体のグループ情報を目的変数として使用する OPLS-DA を使用し、得られる S プロットから抗がん剤の効果の評価ができるようなアミノ酸候補の同定を試みた。S プロットの横軸は、各アミノ酸が判別に及ぼした影響の度合い (寄与度) を、縦軸は各アミノ酸のマーカー候補としての信頼度 (相関性) を表しており、信頼度の高いものが S プロットの上側または下側に表される。Fig.4-11(A) で示されるように、グルコース豊富状態で判別が達成された GEM 群 (84 時間および 96 時間検体) の細胞外アミノ酸データに対する OPLS-DA から得られた S プロットにおいて、多くのアミノ酸 (例えば Glu、Ile、Leu、Met、Asn および Pro) が GEM の有効性を判別するマーカー候補として抽出された。それらアミノ酸の GEM 群 96 時間検体の濃度は、control 群 96 時間検体の濃度と比較して異なっていた (Glu, 2.5 倍; Ile, 0.6 倍; Leu, 0.5 倍; Met, 0.6 倍; Asn, 0.7 倍; Pro, 1.2 倍)。さらに、同じグルコース豊富状態で 72 時間以上培養した場合の細胞内アミノ酸の解析で得られた S プロットからは、4 つのアミノ酸候補 (Glu、Trp、Tyr および Gln) が同定された (Fig.4-11(B))。GEM 群 96 時間検体における濃度は、control 群 96 時間検体と比較して異なっていたが、その差の程度は小さかった (Glu, 0.2 倍; Trp, 0.3 倍; Tyr, 0.2 倍; Gln, 0.4 倍)。

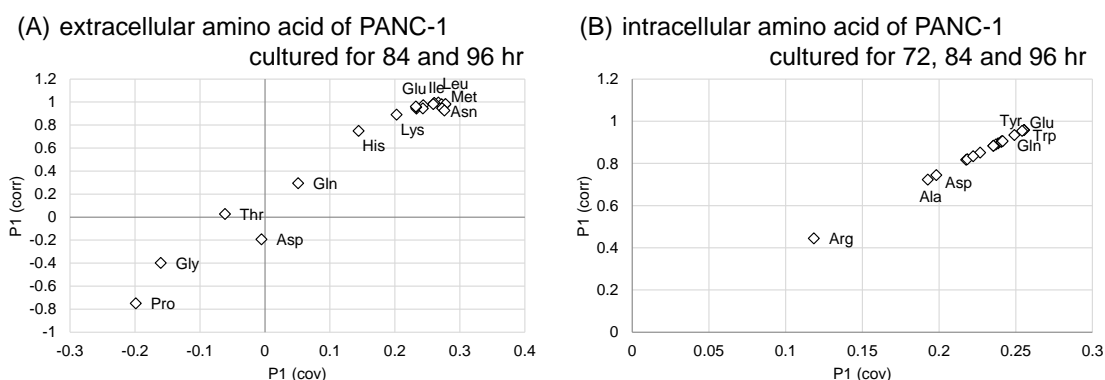


Fig.4-11 S-plots obtained from orthogonal partial least squares discriminant analyses of (A) extracellular and (B) intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with GEM under normoglycemic conditions.

一方、グルコース欠乏状態で 84 時間および 96 時間培養した PANC-1 の細胞外アミノ酸分析から得られる S プロットにおいて、PP 投与の有無を判別するのに寄与するアミノ酸として多くの変数が抽出され (例えば、96 時間後の control 群と比較して Ser, 1.8 倍; Val, 0.1 倍; (Cys)₂, 1.6 倍; His, 1.1 倍; Glu, 0.8 倍; Asn, 0.8 倍; Ala, 0.8 倍)、少数個のアミノ酸に絞り込むことは出来なかった (Fig.4-12(A))。しかし、同じグルコース欠乏状態で 48 時間以上培養した PANC-1 細胞内アミノ酸の分析により得られる S プロットからは、PP 投与の判別の指標となり得るアミノ酸候補として 3 つ (Gln、Met、Ser) が抽出された

(Fig.4-12(B))。ただし、PP 群 96 時間検体の濃度は control 群 96 時間検体と比較して Gln, 0.2 倍; Met, 0.1 倍; Ser, 0.1 倍と、いずれも大きな差は認められなかった。

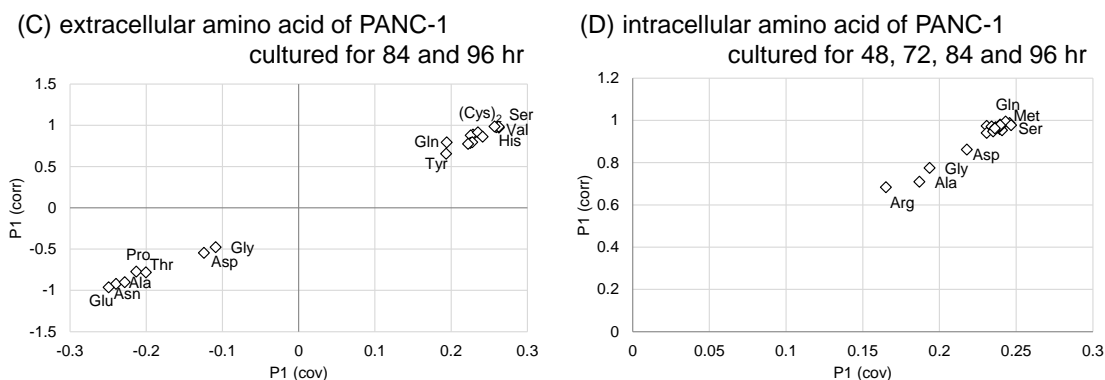


Fig.4-12 S-plots obtained from orthogonal partial least squares discriminant analyses of (A) extracellular and (B) intracellular amino acids of PANC-1 cells treated with PP under hypoglycemic conditions.

これまでの研究で、がん患者の血清アミノ酸濃度のうちいくつかは、健常者と比べて有意に変化することが報告されている。例えば、早期の膵臓がんスクリーニング指標「アミノインデックス」で用いられる Asn、Ile、Ala、His および Trp の 5 種アミノ酸の血中濃度は健常者と比べて低い⁸⁾。また、Nishiumi らはがん患者の血清中 Glu と Asn 濃度が増加し、Gly 濃度が減少していることを明らかにした⁹⁾。他にも、がん組織や細胞がグルコース欠乏状態に曝された場合、グルコースの代わりにアミノ酸や脂肪酸を利用することでエネルギー産生を維持するため、Gln が主な代替エネルギー源となる（グルタミンオリシス）⁸⁰⁻⁸³⁾。Gln 以外にも、様々なアミノ酸を補充する目的でオートファジーが誘導される^{84,85)} ため、がん組織のアミノ酸濃度は正常組織と比較して増加していることも報告されている^{59,86,87)}。今回同定したアミノ酸は、このような過去の報告と共通するものもあるが、新たなマーカー候補として同定されたものもあった。いくつかは、腫瘍微小環境でのグルコース枯渇に対する応答反応に関わるエネルギー代謝に関連するものであったことから、PANC-1 の代謝特性をより良く理解するための有用な情報となり得ると期待される。

4-3. まとめ

今回、培地中グルコースの存在が PANC-1 に対する抗がん剤の効果や抵抗性にどれほどの影響を与えるかについて、細胞外および細胞内アミノ酸メタボロミクスを用いて評価した。その結果、PANC-1 はグルコース欠乏状態に曝されることで GEM の抗がん効果に対して抵抗性を示すこと、および PP の抗がん効果はグルコース欠乏状態に選択的であることがスコアプロット上で示された。さらに、PANC-1 に対する抗がん効果の判別は、細胞内および細胞外アミノ酸濃度のどちらを用いた分析でも可能であるということが明らかになった。ただし、細胞内および細胞外のアミノ酸メタボロミクスの結果を比較した場合、スコアプロット、ローディングプロットおよび S プロットのいずれにおいても少し異なる結果が示されており、細胞内および細胞外アミノ酸濃度変動の同質性を結論づけるためには更なる検討が必要であると考えられる。細胞状態の変化における代謝機構の詳細解明ではなく、抗がん剤効果判定を目的とする場合であれば、測定操作が簡便な「培養培地」を測定試料とする細胞外アミノ酸メタボロミクスの方が有用であるということを実証することができた。さらに、検討の結果から、抗がん剤の効果を評価できるようなアミノ酸候補を抽出し、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。今後、測定対象としてアミノ酸だけではなく TCA 回路中間体も含めた更なる検討を行うことで、グルコース欠乏に曝されたがん組織・細胞の代謝変動をより詳細に解明することが可能となるに違いない。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として精力的に進められている。例えば、(+)-grandifloracin⁸⁸⁾、kigamicin D⁸⁹⁾、arctigenin⁹⁰⁾、tirapazamine⁹¹⁾などが既に栄養欠乏状態や低酸素状態のがん細胞に対して特異的に作用を発揮することが明らかにされている。本法は、このようなタイプの新薬開発分野に対し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大いに役立つと期待される。

総括

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手法を構築した。さらに、種々の条件で培養したがん細胞における抗がん剤効果判定法としての応用を試みた。

まず第一章では、がん細胞の培養培地に含まれるアミノ酸の濃度変動を測定し、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「アミノ酸メタボロミクス」の基盤技術を整備した。さらに、培養がん細胞の解析へと適用した結果、がん細胞培養培地中アミノ酸の経時的な濃度変動について多変量解析を施すことで、各検体のアミノ酸情報を2次元グラフ（スコアプロット）上の1点として集約し、培養時間などにより生じる検体のアミノ酸濃度の差異を座標位置の違いとして視覚的に評価することが可能となった。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抽出できることが確認された。

そこで第二章では、3種の抗がん剤（5-FU、CPT-11 および CDDP）で処理した colo201 に対する「アミノ酸メタボロミクス」解析を行い、抗がん剤効果判定法としての応用を試みた。蛍光試薬として AQC を用いるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法により 21 種アミノ酸および NH₃ 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、すべての抗がん剤において、PCA-DA により抗がん剤投与群と control 群間の違いを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いくつかのアミノ酸がローディングプロットから同定された。5-FU を投与した場合は Ser および Asp が、CPT-11 を投与した場合は Lys が、CDDP を投与した場合は Met が判別マーカー候補として挙げられ、用いた抗がん剤の種類によって異なる結果であった。

第三章では、「アミノ酸メタボロミクス」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証した。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 に 5-FU を投与し、特殊な培養環境が 5-FU の効果発現や細胞状態に及ぼす影響を培地中 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培養した場合、PCA-DA で得られたスコアプロット上において 5-FU の効果判定が可能であった。これに対して低酸素・グルコース欠乏状態で培養した場合、5-FU 群と control 群に区別することは出来ず、5-FU の DLD-1 に対する増殖抑制効果の低下を評価できた。また、通常酸素・グルコース豊富および低酸素・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結果から、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る 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、本法により特殊な培養環境が DLD-1 の増殖や抗がん剤効果発現に及ぼす影響を評価できたことから、培養環境に依存することなく細胞状態の違いを判定できる手法であることが明らかになった。

最後に第四章では、細胞外および細胞内アミノ酸の両方について別々にアミノ酸メタボロミクス解析を行い、それらの違いを評価した。その結果、PANC-1に対する抗がん効果の判別は、細胞内および細胞外アミノ酸濃度のどちらを用いた分析でも可能であることが明らかになった。今回の結果において、グルコース欠乏状態によりGEMの抗がん効果に対して抵抗性を示すこと、およびPPの抗がん効果のグルコース欠乏選択性がスコアプロット上で示されたが、特に、細胞内のアミノ酸濃度変動を評価する方が細胞の状態をより明確に判別することが可能であり、優れたアプローチであると考えられる。さらに、検討の結果から、抗がん剤の効果を評価できるようなアミノ酸候補を抽出し、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有効性を評価できる手法として有用であることを十分に提示できた。アミノ酸濃度の測定法として、第三章や第四章ではスループット性の改善のために簡便かつ迅速なLC-MS/MS法での評価を実施したが、第二章で示した通り従来のHPLC装置でも十分実施可能である。それ故、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と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対し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大いに貢献できるものと期待される。

実験の部

【第一章および第二章に関する実験】

共通の項目

(1) 水（精製水）

水道水を MILLIPORE Elix UV 純水製造システムにより前処理した後、Milli-Q Gradient 超純水製造装置により精製し使用。

(2) ガラス器具

NACALAI TESQUE 製 Scat 20X-PF にて洗浄後、市販の硝酸 ($d = 1.38$) を水で 2 倍希釈した液に少なくとも一晩浸し、浄水および精製水で洗浄し、乾燥して使用。

(3) 試薬

特記しない限り、市販の特級品をそのまま使用。試薬溶液は特記しない限り常法に従って調製した後、使用。

(4) AccQ・Tag™ 法

WATERS 社製アミノ酸分析メソッドを使用。

(5) AccQ・Tag 溶離液 A および溶離液 B

AccQ・Tag 濃縮液 A または濃縮液 B 100 mL と水 1000 mL をそれぞれ混合し調製。

＜AccQ・Tag 濃縮液 A または濃縮液 B の調製法＞

酢酸ナトリウム（三水和物）74 g を 500 mL の水に溶かし、トリエチルアミン 4.856 mL を加える (①)。リン酸 50 mL と水 35 mL を混合し、50%リン酸を調製する (②)。

①液に②液を加えていき、pH 5.70 に調整したものを濃縮液 A、pH 6.80 に調整したものを濃縮液 B とする。

(6) 機器

・アミノ酸分析（LC-FL 装置）

- 液体クロマトグラフ：Alliance™system 2695 装置および 2475 蛍光検出器、

WATERS 製

- 解析ソフト：Empower 2、WATERS 製

- ・反応恒温槽：PIERCE Reacti-Therm™ を目的温度に設定し使用。

- ・遠心分離機：KUBOTA 1720、KUBOTA 製
- ・細胞培養
 - クリーンベンチ：BIO CLEAN BENCH MCV-B131F、SANYO 製
 - 遠心分離機：KUBOTA 2800、KUBOTA 製
 - CO₂ インキュベーター：CO₂ INCUBATOR MCO-17AIC（SANYO 製）を
37°C、CO₂ 濃度 5% に設定し使用

(7) 実験試薬の調製

- ・ アミノ酸標準液

PIERCE 製 Amino Acid Standard H（2.5 mM, 0.1 M HCl）を使用。

- ・ 0.1 mM Asn、Gln、HyPro、Orn、Trp 混合溶液

KANTO CHEMICAL 製 *L*-Asparagine Monohydrate、*L*-Glutamine、WAKO 製 *L*-Hydroxyproline、協和発酵工業製 *L*-Ornithine HCl および KISHIDA CHEMICAL 製 *L*-Tryptophan をそれぞれ 0.1 M HCl で溶かし、250 mM に調製（ただし Trp のみ 100 mM）。それらを 0.1 M HCl で希釈し、それぞれが 25 mM となる混合液を調製。

- ・ 0.4 mM *L*-2-Aminobutyric acid

SIGMA 製 *L*-2-Aminobutyric acid を 0.1 M HCl に溶かし、調製。

- ・ 各抗がん剤溶液

SIGMA 製 5-Fluorouracil、*cis*-Diammineplatinum(II) dichloride および Irinotecan hydrochloride をそれぞれ DMSO で溶かし、調製。それぞれ使用直前に OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY 製大塚生食注にて希釈。その日のうちに使用。

【第三章および第四章に関する実験】

共通の項目

(1) 水（蒸留水）

水道水を YAMATO SCIENTIFIC オートスチル WG250W 純水製造装置により精製し使用。

(2) 試薬

特記しない限り、市販の特級品をそのまま使用。試薬溶液は特記しない限り常法に従って調製した後、使用。

(3) LC-MS/MS 分析用の移動相 A および B

THF、25 mM ギ酸アンモニウム、アセトニトリルおよびギ酸を 75 : 16 : 9 : 0.3 の割合で混合し、超音波で 15 分間脱気したものを移動相 A とした。また、100 mM ギ酸アンモニウムおよびアセトニトリルを 80 : 20 の割合で混合し、超音波で 15 分間脱気したものを移動相 B とした。

(4) 機器

・アミノ酸分析（LC/MSMS 分析）

- システムコントローラー：CMB-20A、SHIMADZU 製
- 低圧グラジエントユニット付ポンプ：LC-20AD、SHIMADZU 製
- デガッサ：DGU-20A₃、SHIMADZU 製
- オートサンプラー：SIL-20ACTH、SHIMADZU 製
- カラムオーブン：CTO-20A、SHIMADZU 製
- 質量分析計：API 4000 Qtrap、AB SCIEX 製
- 解析ソフト：Analyst software ver. 1.4.2、AB SCIEX 製

・遠心分離機：KUBOTA 3700、KUBOTA 製

・細胞培養

- バイオハザードキャビネット：クラス II 型 BHC-1306IIA/B3、
AIRTECH JAPAN 製
- 遠心分離機：KUBOTA 6200、KUBOTA 製
- CO₂ インキュベーター：ダイレクトヒート型 CO₂/マルチガス
インキュベーター（ASTECC 製）を 37°C、CO₂ 濃度 5% に設定し使用。
- 吸光マイクロプレートリーダー：SUNRISE RAINBOW RC-R、TECAN 製

(5) 実験試薬の調製

・ アミノ酸標準液

WAKO 製アミノ酸混合標準液 H 型 (2.5 mM, 0.1M HCl) を使用。

・ Asn、Gln、Trp 混合溶液

KANTO CHEMICAL 製 *L*-Asparagine Monohydrate、*L*-Glutamine および *L*-Tryptophan をそれぞれ 0.1 M HCl で溶かし、250 mM に調製 (ただし Trp のみ 100 mM)。それらを 0.1 M HCl で希釈し、それぞれが 25 mM となる混合液を調製。

・ 5 種安定同位体標識アミノ酸混合溶液 (Glu-*d*₅, His-*d*₃, Lys-*d*₈, Val-*d*₈, Phe-*d*₅)

CDN ISOTOPES 製の各安定同位体 (Glu-*d*₅, His-*d*₃, Lys-*d*₈, Val-*d*₈, Phe-*d*₅) を 0.1 M HCl に溶かし、メタノールで希釈調製。調製後の溶液は-20°C にて保存。

・ 各抗がん剤溶液

SIGMA 製 5-Fluorouracil、Pyrrvinium pamoate salt hydrate をそれぞれ DMSO で溶かし、調製。KANTO CHEMICAL 製 Gemcitabine Hydrochloride はリン酸緩衝生理食塩水で溶かし、調製。それぞれ使用直前に培養培地にて希釈。その日のうちに使用。

参考文献

- 1) E. Fukusaki, A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.*, **2005**, *100*, 347.
- 2) S. P. Putri, Y. Nakayama, F. Matsuda, T. Uchikata, S. Kobayashi, A. Matsubara, E. Fukusaki, *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, *115*, 579.
- 3) S. P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki, *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, *116*, 9.
- 4) K. Kami, T. Fujimori, H. Sato, M. Sato, H. Yamamoto, Y. Ohashi, N. Sugiyama, Y. Ishihama, H. Onozuka, A. Ochiai, H. Esumi, T. Soga, M. Tomita, *Metabolomics*, **2012**, *9*, 444.
- 5) S. Muroya, M. Oe, I. Nakajima, K. Ojima, K. Chikuni, *Meat Sci.*, **2014**, *98*, 726.
- 6) K. Inoue, C. Tanada, T. Sakamoto, H. Tsutsui, T. Akiba, J. Z. Min, K. Todoroki, Y. Yamano, T. Toyo'oka, *Food Chem.*, **2015**, *181*, 318.
- 7) K. Takahashi, H. Kohno, *PLoS One*, **2016**, *11*, e0150524.
- 8) S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Nakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida, *Metabolomics*, **2010**, *6*, 518.
- 9) N. Fukutake, M. Ueno, N. Hiraoka, K. Shimada, K. Shiraishi, N. Saruki, T. Ito, M. Yamakado, N. Ono, A. Imaizumi, S. Kikuchi, H. Yamamoto, K. Katayama, *PLoS One*, **2015**, *10*, e0132223.
- 10) H. J. Kim, S. H. Jang, J. S. Ryu, J. E. Lee, Y. C. Kim, M. K. Lee, T. W. Jang, S. Y. Lee, H. Nakamura, N. Nishikata, M. Mori, Y. Noguchi, H. Miyano, K. Y. Lee, *Lung Cancer*, **2015**, *90*, 522.
- 11) J. Xu, Y. Chen, R. Zhang, J. He, Y. Song, J. Wang, H. Wang, L. Wang, Q. Zhan, Z. Abliza, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 35010.
- 12) A. Zhang, H. Sun, X. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *404*, 1239.
- 13) F. Cheng, Z. Wang, Y. Huang, Y. Duan, X. Wang, *Clin. Chim. Acta*, **2015**, *447*, 23.
- 14) T. Mochizuki, T. Takayama, K. Todoroki, K. Inoue, J. Z. Min, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta*, **2015**, *22*, 73.
- 15) K. Kalíková, T. Šlechtová, E. Tesařová, *Separations*, **2016**, *3*, 30.
- 16) T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 26137.
- 17) Y. Ihata, E. Miyagi, R. Numazaki, T. Muramatsu, A. Imaizumi, H. Yamamoto, M. Yamakado, N. Okamoto, F. Hirahara, *Int. J. Clin. Oncol.*, **2014**, *19*, 364.
- 18) Y. Noguchi, Q.-W. Zhang, T. Sugimoto, Y. Furuhashi, R. Sakai, M. Mori, M. Takahashi, T. Kimura, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2006**, *83*, 513S.
- 19) Q.-W. Zhang, M. Takahashi, Y. Noguchi, T. Sugimoto, T. Kimura, A. Okumura, T. Ishikawa,

- S. Kakumu, *Hepatol. Res.*, **2006**, *34*, 170.
- 20) Y.-Y. Zhao, J. Liu, X.-L. Cheng, X. Bai, R.-C. Lin, *Clin. Chim. Acta*, **2012**, *413*, 642.
 - 21) P. Kaur, N. Rizk, S. Ibrahim, Y. Luo, N. Younes, B. Perry, K. Dennis, M. Zirie, G. Luta, A. K. Cheema, *Mol. Biosyst.*, **2013**, *9*, 307.
 - 22) R. A. Williams, C. D. S. Mamotte, J. R. Burnett, *Clin. Biochem. Rev.*, **2008**, *29*, 31.
 - 23) B. C. Fuchs, B. P. Bode, *Semin. Cancer Biol.*, **2005**, *15*, 254.
 - 24) N. Okamoto, *Ningen Dock*, **2012**, *26*, 911.
 - 25) J. Yatabe, M. S. Yatabe M, K. Ishibashi, Y. Nozawa, H. Sanasa, *Diagn. Pathol.*, **2013**, *8*, 203.
 - 26) E. Simińska, M. Koba, *Amino Acids*, **2016**, *48*, 1339.
 - 27) H. Nakanishi, Y. Iida, T. Shimizu, R. Taguchi, *J. Chromatogr. B*, **2009**, *877*, 1366.
 - 28) W. Pongsuwan, E. Fukusaki, T. Bamba, T. Yonetani, T. Yamahara, A. Kobayashi, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 231.
 - 29) N. J. C. Bailey, M. Oven, E. Holmes, J. K. Nicholson, M. H. Zenk, *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 851.
 - 30) A. T. Miccheli, A. Miccheli, R. D. Clemente, M. Valerio, P. Coluccia, M. Bizzarri, F. Conti, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 1723.
 - 31) M. Li, Y. Song, N. Cho, J. M. Chang, H. R. Koo, A. Yi, H. Kim, S. Park, W. K. Moon, *PLoS One*, **2011**, *6*, e25563.
 - 32) 味の素株式会社, “アミノ酸ハンドブック”, **2003**, 工業調査会.
 - 33) K. Shimbo, S. Kubo, Y. Harada, T. Oonuki, T. Yokokura, H. Yoshida, M. Amao, M. Nakamura, N. Kageyama, J. Yamazaki, S. Ozawa, K. Hirayama, T. Ando, J. Miura, H. Miyano, *Biomed. Chromatogr.*, **2010**, *24*, 683.
 - 34) K. Azuma, Y. Hirao, Y. Hayakawa, Y. Murahata, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, Y. Okamoto, N. Ito, *Metabolites*, **2016**, *6*, 3.
 - 35) J. Ziegler, S. Abel, *Amino Acids*, **2014**, *46*, 2799.
 - 36) J. R. Benson, P. E. Hare, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **1975**, *72*, 619.
 - 37) S. A. Cohen, D. P. Michaud, *Anal. Biochem.*, **1993**, *211*, 279.
 - 38) C. van Wandelen, S. A. Cohen, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *63*, 11.
 - 39) S. A. Cohen, *Methods Mol. Biol.*, **2003**, *211*, 143.
 - 40) K. Muramoto, H. Kamiya, H. Kawauchi, *Anal. Biochem.*, **1984**, *141*, 446.
 - 41) G. Nouadje, H. Rubie, E. Chatelut, P. Canal, M. Nertz, P. Puig, F. Couderc, *J. Chromatogr. A*, **1995**, *717*, 293.
 - 42) Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner, B. L. Karger, *Anal. Biolchem.*, **1981**, *115*, 123.
 - 43) P. Furst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, P. Stehle, *J. Chromatogr.*, **1990**, *449*, 557.
 - 44) S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **2001**, *15*, 295.

- 45) P. Gandhi I. Yazawa, *LC GC N. AM.*, **2013**, *31 Special Issues*, Dec. 01.
- 46) F. E. Grubbs, *Technometrics*, **1969**, *11*, 1.
- 47) K. Matsuzuka, E. Kimura, K. Nakagawa, K. Murata, T. Kimura, T. Miyazawa, *Food Chem.*, **2013**, *140*, 91.
- 48) 石村貞夫, “SPSS による多変量データ解析の手順 第2版”, **2002**, 東京図書.
- 49) 柳井久江, “エクセル統計 実用多変量解析編”, **2005**, オーエムエス出版.
- 50) T. Kondo, T. Kubota, H. Tanimura, H. Yamaue, S. Akiyama, Y. Maehara, N. Tanigawa, H. Takagi, *Anticancer Res.*, **2000**, *9*, 2389.
- 51) S. Hori, S. Nishiumi, K. Kobayashi, M. Shinohara, Y. Hatakeyama, Y. Kotani, N. Hatano, Y. Maniwa, W. Nishio, T. Bamba, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, Y. Nishimura, M. Yoshida, *Lung Cancer*, **2011**, *74*, 284.
- 52) A. Ikeda, S. Nishiumi, M. Shinohara, T. Yoshie, N. Hatano, T. Okuno, T. Bamba, E. Fukusaki, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida, *Biomed. Chromatogr.*, **2012**, *26*, 548.
- 53) S. Nishiumi, T. Kobayashi, A. Ikeda, T. Yoshie, M. Kibi, Y. Izumi, T. Okuno, N. Hayashi, S. Kawano, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida, *PLoS One*, **2012**, *7*, e40459.
- 54) O. Warburg, *Science*, **1956**, *123*, 309.
- 55) J. M. Brown, *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 5863.
- 56) J. M. Brown, W. R. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 437.
- 57) A. L. Harris, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 38.
- 58) N. C. Denko, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*, 705.
- 59) A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, T. Soga, *Cancer Res.*, **2009**, *69*, 4918.
- 60) H. Onozuka, K. Tsuchihara, H. Esumi, *Cancer Sci.*, **2011**, *102*, 975.
- 61) A. I. Minchinton, I. F. Tannock, *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 583.
- 62) K. Kasuya, A. Tsuchida, Y. Nagakawa, M. Suzuki, Y. Abe, T. Itoi, H. Serizawa, T. Nagao, M. Shimazu, T. Aoki, *Oncol. Rep.*, **2011**, *26*, 1399.
- 63) B. J. Toley, D. E. Ganz, C. L. Walsh, N. S. Forbes, *J. Vis. Exp.*, **2011**, *57*, e2425.
- 64) G. G. Powathil, K. E. Gordon, L. A. Hill, M. A. J. Chaplain, *J. Theor. Biol.*, **2012**, *308*, 1.
- 65) D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 330.
- 66) S. Kobayashi, D. E. Millhorn, *J. Neurochem.*, **2001**, *76*, 1935.
- 67) A. M. Weljie, F. R. Jirik, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2011**, *43*, 981.
- 68) D. Huang, C. Li, H. Zhang, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **2014**, *46*, 214.
- 69) V. Heinemann, Y.-Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L. W. Hertel, G. B. Grindey, W. Plunkett, *Mol. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 567.
- 70) M. M. A. Valenzuela, J. W. Neidigh, N. R. Wall, *Chemotherapy (Los Angel.)*, **2014**, *3*, 137.
- 71) T. W. H. Meijer, J. H. A. M. Kaanders, P. N. Span, J. Bussink, *Clin. Cancer Res.*, **2012**, *18*,

5585.

- 72) E. Tomitsuka, K. Kita, H. Esumi, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2010**, 1201, 44.
- 73) H. Esumi, J. Lu, Y. Kurashima, T. Hanaoka, *Cancer Sci.*, **2004**, 95, 685.
- 74) E. Tomitsuka, K. Kita, H. Esumi, *J. Biochem.*, **2012**, 152, 171.
- 75) I. Ishii, Y. Harada, T. Kasahara, *Front. Oncol.*, **2012**, 2, 137.
- 76) M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, *Talanta*, **1997**, 44, 1299.
- 77) R. R. Daga, P. Bolaños, S. Moreno, *Curr. Biol.*, **2003**, 13, 2015.
- 78) V. L. Gabai, I. V. Zamulaeva, A. F. Mosin, Y. M. Makarova, V. A. Mosina, K. R. Budagova, Y. V. Malutina, A. E. Kabakov, *FEBS Lett.*, **1995**, 375, 21.
- 79) N. Akakura, M. Kobayashi, I. Horiuchi, A. Suzuki, J. Wang, J. Chen, H. Niizeki, K. Kawamura, M. Hosokawa, M. Asaka, *Cancer Res.*, **2011**, 61, 6548.
- 80) R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, C. B. Thompson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 19345.
- 81) M. H. Kim, H. Kim, *J. Cancer Prev.*, **2013**, 18, 221.
- 82) C. A. Lyssiotis, J. Son, L. C. Cantley, A. C. Kimmelman, *Cell Cycle*, **2013**, 12, 1987.
- 83) J. Son, C. A. Lyssiotis, H. Ying, X. Wang, S. Hua, M. Ligorio, R. M. Perera, C. R. Ferrone, E. Mullarky, N. Shyh-Chang, Y. Kang, J. B. Fleming, N. Bardeesy, J. M. Asara, M. C. Haigis, R. A. DePinho, L. C. Cantley, A. C. Kimmelman, *Nature*, **2013**, 496, 101.
- 84) K. Sato, K. Tsuchihara, S. Fujii, M. Sugiyama, T. Goya, Y. Atomi, T. Ueno, A. Ochiai, H. Esumi, *Cancer Res.*, **2007**, 67, 9677.
- 85) D. Hashimoto, M. Bläuer, M. Hirota, N. H. Ikonen, J. Sand, J. Laukkarinen, *Eur. J. Cancer*, **2014**, 50, 1382.
- 86) J. Zhang, L. Liu, S. Wei, G. A. Nagana Gowda, Z. Hammoud, K. A. Kesler, D. Raftery, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **2011**, 41, 469.
- 87) 紙健次郎, 冨塚江利子, 冨田勝, 北潔, 江角浩安, 曾我朋義, *実験医学増刊*, 江角浩安, 高倉伸幸, 宮園浩平, 森正樹 (編), 羊土社, **2009**, 27, 215.
- 88) J.-Y. Ueda, S. Athikomkulchai, R. Miyatake, I. Saiki, H. Esumi, S. Awale, *Drug Des. Devel. Ther.*, **2013**, 18, 39.
- 89) J. Lu, S. Kunimoto, Y. Yamazaki, M. Kaminishi, H. Esumi, *Cancer Sci.*, **2004**, 95, 547.
- 90) S. Awale, J. Lu, S. K. Kalauni, Y. Kurashima, Y. Tezuka, S. Kadota, H. Esumi, *Cancer Res.*, **2006**, 66, 1751.
- 91) K. B. Peters, J. M. Brown, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 5248.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始変わらざる温かい御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部機器分析学教室 藤岡 稔大 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究について、終始丁寧かつ熱心な御指導を賜りました福岡大学薬学部薬品分析学教室 山口 政俊 教授、能田 均 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、有益な御指導と懇切な御助言を賜りました福岡大学薬学部免疫・分子治療学教室 中島 学 教授に深謝致します。

本研究並びに本稿作成に際し、丁寧かつ熱心な御指導を賜りました福岡大学薬学部薬品分析学教室 吉田 秀幸 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究について、終始御懇篤な御指導と激励を賜りました福岡大学薬学部機器分析学教室 巴山 忠 准教授に謹んで感謝致します。

本研究を行うにあたり、多くの有益な御助言を賜りました福岡大学薬学部薬化学教室 丸岡 博 教授に深く感謝致します。

そして、本研究は静岡県立大学薬学部生体機能分子分析学分野 轟木 堅一郎 教授の終始変わらざる温かい御指導のもとに行われました。謹んで感謝申し上げます。

また、本研究において惜しめない御協力を頂きました福岡大学薬学部機器分析学教室の特別実習生の皆様、支えてくれた友人達、並びにお世話になった全ての方々に感謝の意を表します。

最後になりましたが、この機会を与えてくれ、温かく励まし見守ってくださった私の家族に心より感謝致します。