

# 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

富田 陵子

福岡大学薬学部機器分析学教室 814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

## Development and applications of amino acid metabolomics on cancer cells

Ryoko Tomita

Department of Instrumental Analytical Chemistry,

Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Johnan, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

Metabolomics is a comprehensive analysis of numerous small endogenous molecules contained in cells, biological fluids, and tissues. In addition to a complementary understanding of physiological functions, metabolomics may be also a promising tool to explore potential biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapeutic response. In this study, we developed a method to evaluate states of cells treated with anticancer drugs under various conditions *via* the comprehensive analysis of amino acids, termed amino acid metabolomics. Intracellular and extracellular amino acids were quantified with liquid chromatography and the concentration data were further analyzed using multivariate analyses to represent samples on two-dimensional graphs. Using this approach, the effects of anticancer drug treatment could be distinguished at high discrimination rate. These results indicate the feasibility of our proposed method for assessing the effectiveness of anticancer drugs on various cancer cell lines in small laboratories or medical institutions.

**Keywords:** amino acids, metabolomics, cancer cells, liquid chromatography, anticancer drug

### 【緒言】

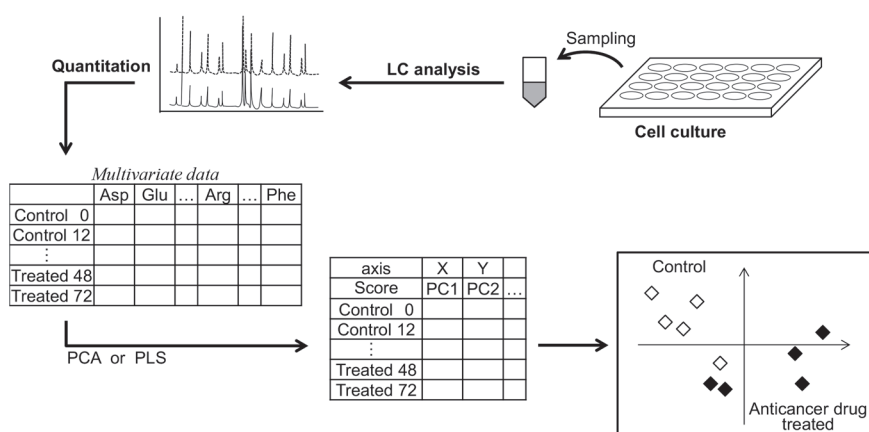
代謝物の総体を意味する「メタボローム」は、遺伝子情報の最終表現型であり、これら低分子代謝物を網羅的に解析することで生命現象を包括的に評価しようという技術が「メタボロミクス」である。生命体の僅かな代謝変動でさえも捉えられるというユニークな利点をもつことから、医療や生命科学、臨床研究、創薬、環境毒性学、食品科学など様々な研究で応用されている<sup>1-3)</sup>。その中でも近年、測定対象をアミノ酸などの同定および定量が容易な代謝物のみに限定したターゲットメタボロミクス研究に注目が集められており、実際に、健康状態や病気の可能性を評価する新しい検査法として様々な研究施設・医療機関にて採り入れられている<sup>4-6)</sup>。

そこで本研究では、がん細胞へのアミノ酸の取り込みが正常細胞に比べて増加していること<sup>7)</sup>に着目し、培養細胞レベルでのアミノ酸濃度変動に基づいて細胞状態の変化を判定する手法「アミノ酸メタボロミクス」を開発した。抗がん剤を用いる化学療法は現在のがん治療の主力であるが、患者ごとに薬剤応答性が異なることが根治を妨げる一因として問題となっている。そこで、効果的ながん治療を達成すべく抗がん剤感受性試験が実施されている。特に細胞内酵素活性を利用する方法は、低コストかつ操作

の簡便性から頻繁に用いられる。しかし、臨床効果との相関性などにおいて改善すべき問題も残っており、より高精度な抗がん剤効果判定法の開発が望まれている。細胞のアミノ酸代謝変動に基づいた細胞状態の評価（アミノ酸メタボロミクス）を新たな抗がん剤効果判定法として応用すべく、検討を行った。

## 【1】アミノ酸メタボロミクスの開発

<目的>



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

本研究で提唱する「アミノ酸メタボロミクス」による抗がん剤効果判定の概略を Fig. 1 に示す。アミノ酸メタボロミクスでは、がん細胞の培養培地中アミノ酸の濃度を LC 分析により測定し、得られた経時的変動データについて多変量解析を施す。これにより、アミノ酸濃度情報（定量結果）をスコアプロットと呼ばれる 2 次元グラフ上の 1 点に集約し、細胞状態の視覚的評価を容易に行うことができる。まずは、アミノ酸メタボロミクスの基盤となるアミノ酸分析法について検討した。

<実験方法>

がん細胞培養：10% ウシ胎児血清 (FCS)，ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を添加した培地 (RPMI 1640) を使用した。モデルがん細胞として、ヒト直腸結腸腺がん由来細胞株 colo201 を 72 時間連続で培養した。

プレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法：colo201 細胞を培養した培地にアセトニトリルを加えて除タンパク処理した上清に AccQ Fluor borate buffer (ホウ酸緩衝液, pH 8) および AccQ Fluor reagent (蛍光誘導体化試薬) を加えて攪拌した。55℃ にて 10 分加温して得られた反応溶液を試料とした。HPLC 分析用カラムには AccQ Tag amino acid analysis column (150 × 3.9 mm i.d., 4 μm; waters) を使用し、AccQ Tag 溶離液 A (pH 5.7) (A)，AccQ Tag 溶離液 B (pH 6.8) (B)，アセトニトリルおよび超純水の混液を移動相としてグラジエント溶離を行った。流速 1.0 ~ 1.3 mL/min で送液し、カラム恒温槽は 39℃ に設定した。蛍光検出波長は Ex 250 nm および Em 395 nm に設定した。

LC-MS/MS 分析：colo201 細胞を培養した培地に冷メタノールを加えて除タンパク処理後の上清を試料とした。LC 分析用カラムには Intrada amino acid column (100 × 3 mm i.d., 3 μm; Imtakt) を使用し、テトラヒドロフラン，25 mM ギ酸アンモニウム，アセトニトリル，ギ酸の混液 (75 : 16 : 9 : 0.3, v/v/v/v) (A) と 100 mM ギ酸アンモニウム，アセトニトリル (4 : 1, v/v) (B) を移動相としてグラジエント溶離を行った。

流速0.7 mL/minで送液し、カラム恒温槽は40℃に設定した。検出にはAB Sciex社製のAPI 4000 Qtrapを使用し、ESIポジティブおよびMultiple Reaction Monitoring (MRM) モードで測定した。

#### <結果および考察>

基礎検討の結果、高精度なアミノ酸濃度データを得られるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法<sup>8)</sup>や、簡便かつ迅速な分析が可能な非誘導体化LC-MS/MS法はいずれもアミノ酸メタボロミクスの基盤として有用であることが確認された。そこで、実試料 (colo201細胞の培養培地) 分析へと応用したところ、検体はスコアプロット上の1点として表され、検体間のアミノ酸濃度情報の差異は座標位置の違いとして反映された。さらに、ローディングプロットにおいて、検体の特徴を評価するのに寄与したアミノ酸を同定可能であることも確認することができた。以上より、細胞の状態を評価するためにアミノ酸濃度変動を測定することは、有用なアプローチであることが示された。

## [2] 大腸がん細胞に投与した3種抗がん剤の効果判定への応用

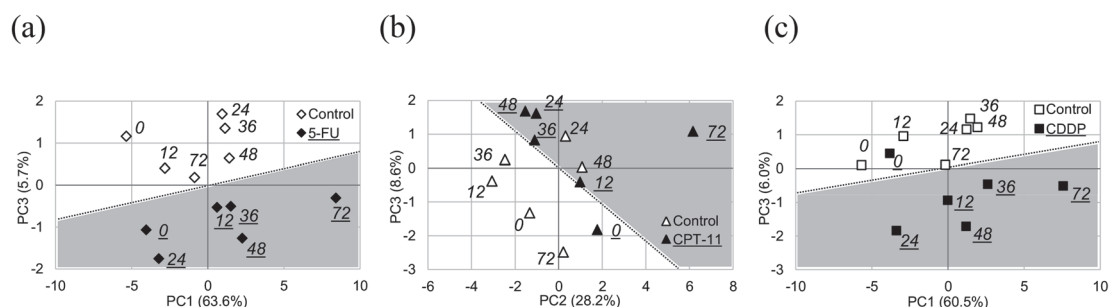
### <目的>

アミノ酸メタボロミクスが「がん細胞状態の変動」つまり「抗がん剤の効果」の評価に有用であることが示唆された。本法を抗がん剤効果判定法として構築するためには、薬剤の作用機序に依存することなく、効果判定が可能でなければならない。そこで、作用機序の異なる3種抗がん剤 (5-フルオロウラシル, 5-FU; イリノテカン, CPT-11; シスプラチン, CDDP) を投与したcolo201の培養培地に対してアミノ酸メタボロミクスを行い、抗がん剤がcolo201の増殖に及ぼす影響を評価した。培養培地中アミノ酸 (21種) 濃度は、AccQ・Tagを用いるプレカラム誘導体化-HPLC/蛍光検出法<sup>8)</sup>により測定した。得られた経時的濃度データについて主成分分析 (PCA) および部分最小二乗法 (PLS) による多変量解析を行った。さらに、得られたスコアプロット上における検体をクラスター分析 (CA) や判別分析 (DA) により分類した。

### <実験方法>

colo201培養: 10% FCS, ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を添加した培地 (RPMI 1640) を使用し、5-FU (10  $\mu$ g/mL), CPT-11 (20  $\mu$ g/mL) およびCDDP (20  $\mu$ g/mL) それぞれを添加した培地にて72時間連続で培養した。

試料調製: colo201細胞を培養した培地にアセトニトリルを加えて除タンパク処理した上清にAccQ Fluor borate buffer (ホウ酸緩衝液, pH 8) およびAccQ Fluor reagent (蛍光誘導体化試薬) を加えて攪拌した。55℃にて10分加温して得られた反応溶液を試料とし、HPLC/蛍光検出法による分析を行った。



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

### <結果および考察>

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

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

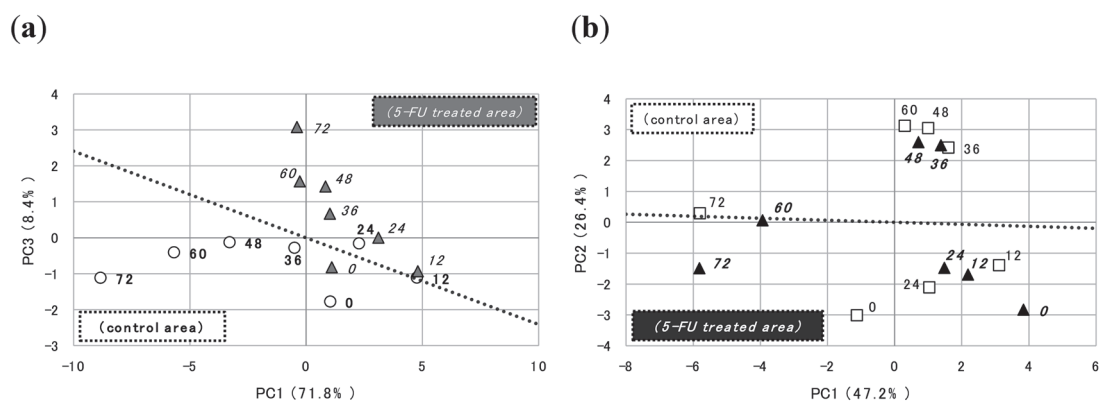
#### <目的>

ヒト固形がんには、細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素・栄養飢餓環境 (がん微小環境) が存在する。そのような過酷な環境においても代謝特性を変化させることでがん微小環境に適応したがん細胞は、放射線や多くの抗がん剤に対する感受性が低い<sup>9,10)</sup>。これは治療成績不良の主因であるばかりでなく、浸潤・転移・再発の温床となっており、難治性がんの悪性化にも影響を及ぼすことが懸念されている。しかしながら、低酸素や栄養飢餓状態による薬剤耐性の発生机序などは未だ十分に理解されておらず、新たな知見が求められている。そこで、通常酸素・グルコース豊富状態または低酸素・グルコース飢餓状態で5-FUを投与したヒト大腸がん由来細胞株DLD-1に対してアミノ酸メタボロミクスを行い、培養環境が抗がん剤感受性に及ぼす影響を評価した。培養培地中アミノ酸 (20種) 濃度は、非誘導体化LC-MS/MS法により測定した。得られた経時的濃度データについてPCA-CAおよびPCA-DAによる解析を行い、スコアプロット上で検体を分類した。

#### <実験方法>

**DLD-1培養**：10% ウシ胎児血清 (FBS) および非必須アミノ酸を添加した培地 (RPMI 1640) を使用した。グルコース飢餓状態はグルコース不含RPMI 1640を用いることで構築し、低酸素状態 (酸素濃度5%) は、DLD-1を播種した96ウェルプレート酸素吸収剤とともに密封袋へ封入することで作製した。通常酸素・グルコース豊富状態または低酸素・グルコース飢餓状態で5-FU (20  $\mu$ g/mL) 添加培地にて72時間連続で培養した。

**試料調製**：PANC-1細胞を培養した培地に冷メタノールを加えて除タンパク処理後の上清を試料とし、LC-MS/MS法による分析を行った。



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

#### <結果および考察>

通常酸素・グルコース豊富状態で5-FUを投与した場合、PCA-DAによりcontrol検体と5-FU投与検体の座標位置が、培養時間の経過に伴って大きく離れるスコアプロットが得られた。つまり、5-FUにより増殖が抑制されている状態を反映したスコアプロットであった (Fig. 3a)。一方、低酸素・グルコース飢餓状態で5-FUを投与した場合、PCA-DAで得られたスコアプロット上の検体は、培養時間が近いもの同士で近接し、5-FU投与の有無に依存した座標位置ではなかった。つまり、5-FUの抗がん効果が抑制されている状態を反映したスコアプロットであった (Fig. 3b)。これらの結果は、培養環境が変化したことによってDLD-1の5-FUに対する感受性が変化したことを示している。つまり、アミノ酸メタボロミクスは特殊な培養環境においても抗がん剤効果の有無を判定することが可能であった。

#### **【4】 膵臓がん細胞外および細胞内アミノ酸メタボロミクスの比較**

##### <目的>

これまでの検討では、培養培地中アミノ酸濃度の分析結果を基に解析を行った。がん細胞状態を評価するのであれば、細胞そのものに含まれるアミノ酸データを用いるべきとも考えられるが、その分析を行うための操作は培養培地の分析と比較して、一般に煩雑である。それゆえ、培養培地中アミノ酸濃度の解析結果が、細胞内アミノ酸濃度の解析結果と同質のものであると証明できれば、よりシンプルな評価法として提供することができる。そこで、ヒト膵臓がん由来細胞株PANC-1を用い、「培養培地中」つまり「細胞外」、および「細胞内」アミノ酸について、それぞれアミノ酸メタボロミクスを行い、培養培地の解析結果が細胞内の状態変動をどの程度反映できているのか評価した。グルコース豊富状態またはグルコース飢餓状態でゲムシタビン (GEM) またはピルベニウムパモ酸塩 (PP) を投与したPANC-1の細胞外および細胞内アミノ酸 (20種) 濃度は、非誘導体化LC-MS/MS法により別々に測定した。得られたそれぞれの経時的濃度データについてPCA-CAおよびPCA-DAによる解析を行い、スコアプロット上で検体を分類した。

##### <実験方法>

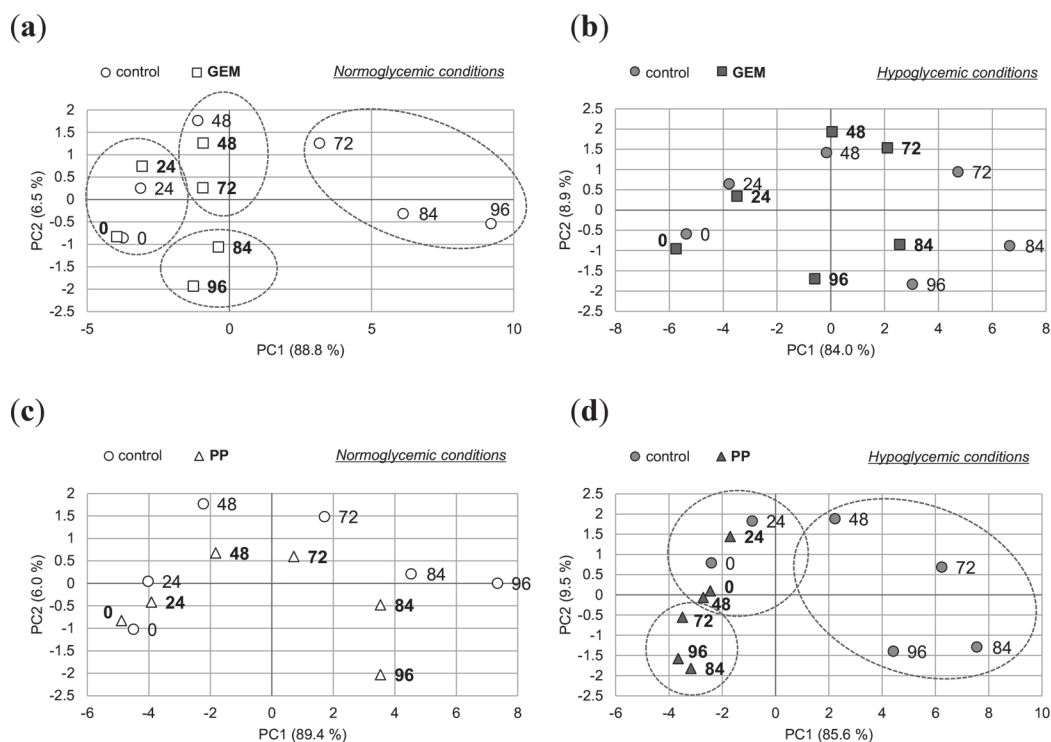
**PANC-1培養：**10% FBS, グルタミン, ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を添加した培地 (D-MEM) を使用した。グルコース飢餓状態はグルコース不含D-MEMを用いることで構築した。グルコース豊富状態またはグルコース飢餓状態でGEM (1  $\mu$ M) またはPP (0.05  $\mu$ M) 添加培地にて96時間連続で培養した。

**試料調製：**PANC-1細胞を培養した培地に冷メタノールを加えて除タンパク処理後、上清を分取し、培地中アミノ酸分析用の試料とした。また、PANC-1細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、希メタノールおよびクロロホルムで液液抽出した。細胞内代謝物を含む水層を分取し、適宜希釈または濃縮したものを細胞内アミノ酸分析用の試料とした。各試料について、LC-MS/MS法による解析を行った。

##### <結果および考察>

「細胞内」アミノ酸について解析した結果、GEMはグルコース豊富状態で投与した場合のみ (Figs. 4a, b), PPはグルコース飢餓状態で投与した場合のみ (Figs. 4c, d) 抗がん効果を示すことがPCA-CAで得られたスコアプロット上で示された。一方、「細胞外」アミノ酸について解析した場合も「細胞内」と同様に、GEMやPPの効果判別が可能なスコアプロットが得られた。つまり、「細胞外」アミノ酸濃度の変化を測定することで、抗がん剤投与により生じるPANC-1の増殖抑制という細胞の状態変化を評価することは、

十分可能であることが示された。



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

## 【総括】

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

## 【参考文献】

- 1) *PLoS One*, **2016**, *11*, e0150524.
- 2) *Food Chem.*, **2015**, *181*, 318.
- 3) *Metabolomics*, **2012**, *9*, 444.
- 4) *Amino Acids*, **2016**, *48*, 1339.
- 5) *Diagn. Pathol.*, **2013**, *8*, 203.

- 6) *Ningen Dock*, **2012**, 26, 911 .
- 7) *Semin. Cancer Biol.*, **2005**, 15, 254 .
- 8) *J. Chromatogr. A*, **1997**, 763, 11 .
- 9) *Cancer Sci.*, **2011**, 102, 975 .
- 10) *Cancer Res.*, **2009**, 69, 4918 .
- 11) *Drug Des. Devel. Ther.*, **2013**, 8, 39 .
- 12) *Cancer Res.*, **2006**, 66, 1751 .
- 13) *Cancer Sci.*, **2004**, 95, 547 .
- 14) *Cancer Res.*, **2002**, 62, 5248 .