

図2 アセトアミノフェン (APAP) 投与後の肝臓中のAPAP関連代謝物質の変動

APAPは大部分がグルクロン酸か硫酸抱合を受け尿中に排泄されるが、1%が毒性の高い親電子物質NAPQIに代謝される。NAPQIは通常GSHが抱合し、尿中に排泄される。しかし、APAPが過剰に存在すると、NAPQIが蓄積し肝細胞の壊死を引き起こす。APAP投与後2時間ではCys以下の代謝経路の代謝中間体が軒並み減少した。

Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

ピラリー電気泳動-ハイブリッド四重極-飛行時間型質量分析計)を用いてGSHと未知物質のMS/MSスペクトルを採取した。図3に示すように未知物質の主要な4つのフラグメントイオンすべてに対して、質量が17.96Da高いフラグメントイオンがGSHに存在することがわかった。これは、GSHから質量17.96Daの官能基が外れた化合物が未知物質に近いものであることを示唆する。そこで17.96Daの質量を持つ官能基を探索した。しかし、17.96Daの質量の官能基は実存しなかった。試行錯誤した末に、17.96Daの差はSH基(32.980Da)が外れてCH<sub>3</sub>基(15.023Da)が結合すること(32.980Da-15.023Da=17.957Da)であり、未知物質はGSHのSH基(図3)がCH<sub>3</sub>基に置換されたオフタルミン酸(図3B)と推測された。そこで、オフタルミン酸の標品を入手し、マウスの肝臓サンプルに添加後、再びCE-Q-TOFMSで測定したところ、未知物質は予想ど

おりオフタルミン酸であることが確認された<sup>3)</sup>。

続いて、APAP投与によりオフタルミン酸が増加する機序を検討した。図4に示すようにGSH(γ-Glu-Cys-Gly)はγ-グルタミルシステインシンセターゼ(GCS)とグルタチオンシンセターゼ(GS)の二つの酵素によって、Cysから生合成されたトリペプチドである。筆者らは、オフタルミン酸(γ-Glu-2AB-Gly)はCysのSH基がCH<sub>3</sub>基に置換された2-アミノ酪酸(2AB)からGSHと同様にGCSとGSの酵素によって生合成されるのではないかと推測した(図4)。GCSを抑制するプチオニンスルフォキシミンやGCSを活性化する親電子物質ジエチルマレイン酸をマウスに投与し、GSHおよびオフタルミン酸合成経路の代謝物質の濃度変化の解析から、オフタルミン酸合成経路の存在が正しいことを証明した<sup>3)</sup>。

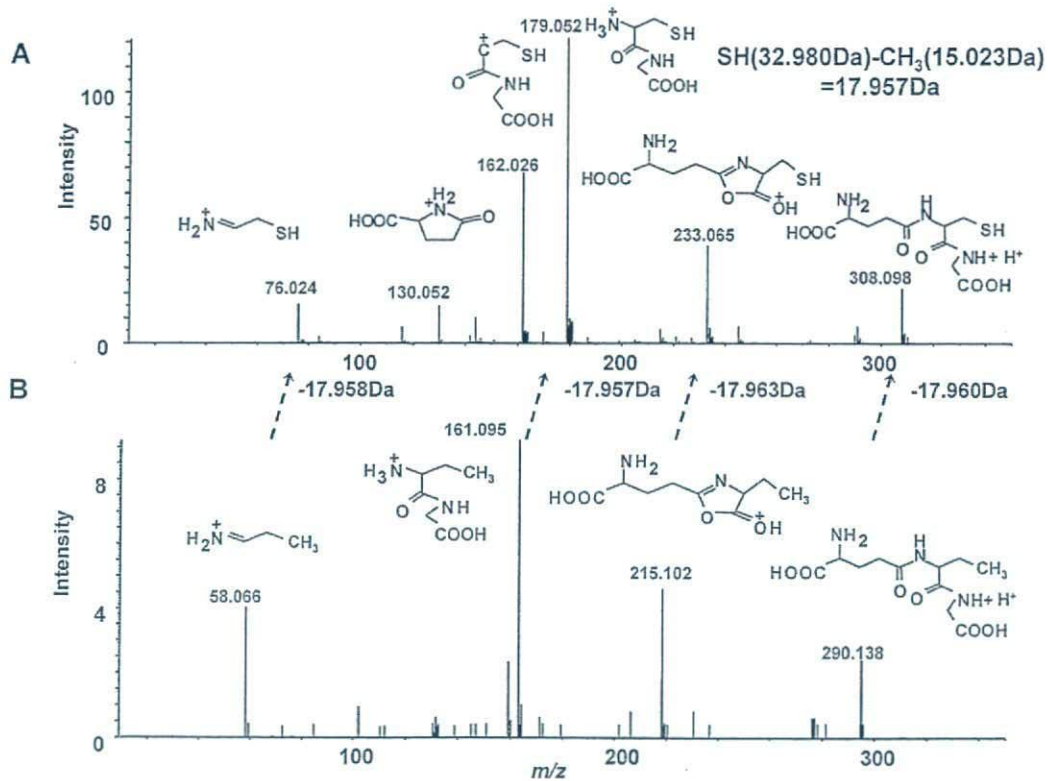


図3 GSHと未知物質のMS/MSスペクトル

AはGSH, Bは未知物質。二つの成分のMS/MSスペクトルをCE-Q-TOFMSで採取し, 比較した。未知物質の4つのスペクトル全てに対して, 質量が17.96Da高いスペクトルがGSHに存在した。17.96DaはSH基 (32.980Da) とCH<sub>3</sub>基 (15.023Da) の差 (32.980Da-15.023Da=17.957Da) であり, 未知物質はGSHのSH基がCH<sub>3</sub>基に置換されたオファルミン酸と推定された。

Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

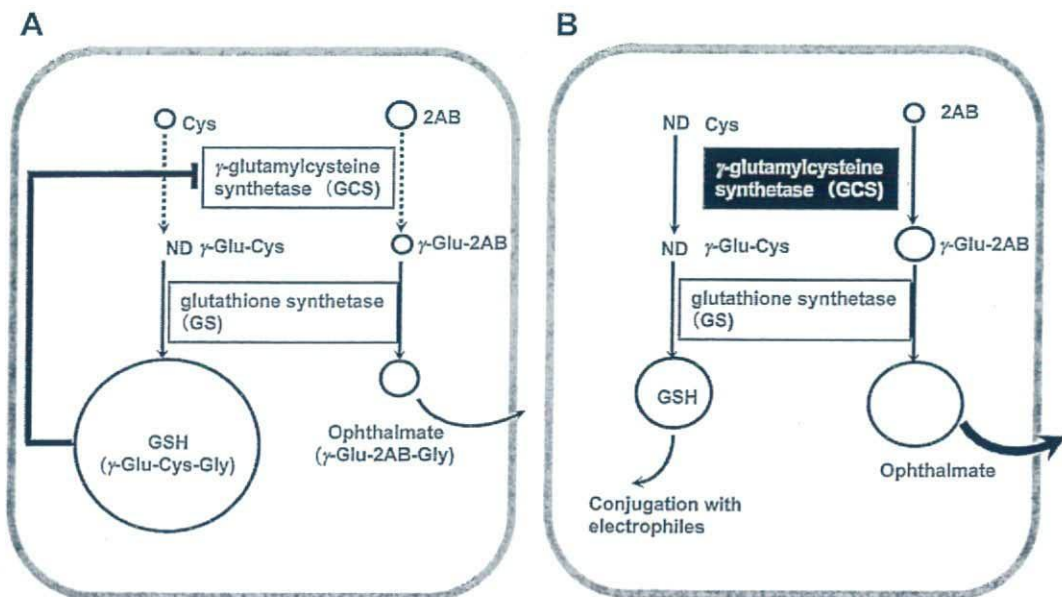


図4 肝細胞のオファルミン酸生合成経路

Aは還元状態, Bは酸化状態。還元状態では, 大量にあるGSHによってGCSがフィードバック制御されているためGSHやオファルミン酸の生合成は阻害される(図4A)。酸化状態ではGSHの消費に伴いGCSのフィードバック制御が解除され, GCSが活性化される。したがってオファルミン酸が生合成される。オファルミン酸は蓄積され, トランスポーター等で肝臓から輸送され最終的に血液に輸送される(図4B)。

Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

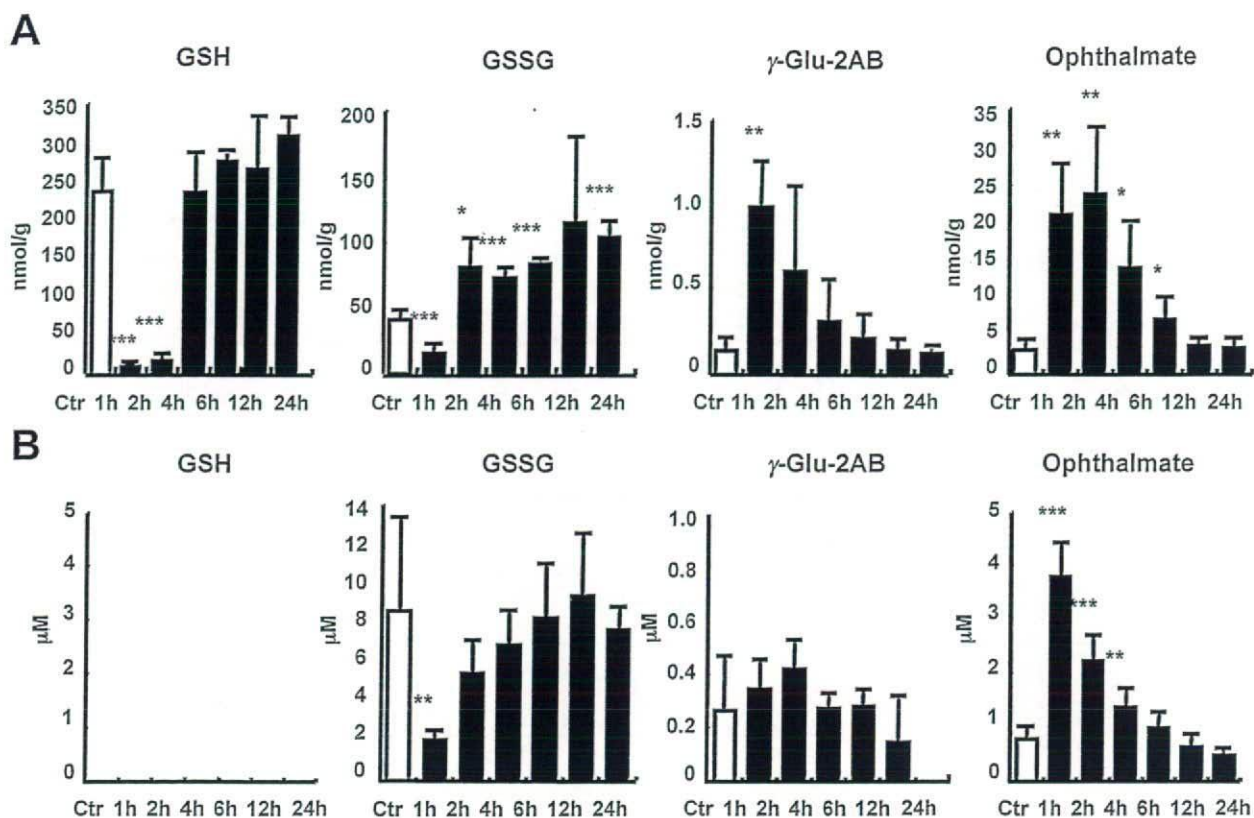


図5 APAP投与後に肝臓および血清中で変化のあった代謝物質  
 Aは肝臓、Bは血清の測定結果。APAPをマウスに投与し、肝臓と血清中のGSHやオフタルミン酸代謝経路の代謝物質の経時変化を測定した。肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAPAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。反対に肝臓および血清のオフタルミン酸が急増した。  
 Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

#### 4. 肝臓のグルタチオン枯渇マーカーの発見

図5に示すように肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAPAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。GSHの減少に反比例して肝臓内の $\gamma$ -Glu-2AB(オフタルミン酸の前駆体)とオフタルミン酸は急増した(図5A)。また、血清中のオフタルミン酸も肝臓と同様にAPAP投与1, 2時間後に急増した(図5B)。これらの結果は、血中オフタルミン酸は肝臓のGSHが低下したことを示すバイオマーカーであることを示す<sup>3)</sup>。

実験結果を総括すると、通常の還元状態(図4A)では、肝細胞内にGSHが大量に存在し、これがGCSをフィードバック制御しているためGSHやオフタルミン酸の生合成は阻害される<sup>8,9)</sup>。しかし、APAPの代謝で生じた親電

子物質(NAPQI)の解毒のためにGSHが消費されると(図4B)、GCSに対するフィードバック制御が解除され、GCSが活性化される。したがって、オフタルミン酸が生合成される。しかしオフタルミン酸はSH基を有していないため、親電子物質とは反応せず肝細胞内に蓄積し、トランスポーター等で最終的に血液中に排泄される(図4)<sup>3)</sup>。

筆者らが知る限り、オフタルミン酸の生理学的な役割はこれまで述べられていないが、オフタルミン酸はABCトランスポーターによるGSHの細胞外への輸送を競争的に阻害するという報告がある<sup>10)</sup>。肝細胞はオフタルミン酸を生合成して細胞外に排出することでGSHを細胞内に留め、親電子物質に対する防御機構を備えているのであろう。

## おわりに

その後のメタボローム測定により、オフタルミン酸は、ヒトをはじめとする各哺乳動物の各組織、植物、酵母、大腸菌等にも存在することが確認された。オフタルミン酸は、グルタチオンシステムを持つ生物には必ず存在しているのかもしれない。最近のCE-TOFMSによるメタボローム解析によって、APAPの副作用マーカであるオフタルミン酸のみならず、各種のがんや疾患の低分子バイオマーカー候補が発見されてきた。今後幅広い分野で本法が利用され、生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい。

## 謝 辞

本研究は慶應義塾大学医学部医化学教室(末松誠教授)との共同研究の成果である。

## ■ 文 献

- 1) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res*, **2**: 488-494, 2003.
- 2) Soga T, Ishikawa T, Igarashi S, Sugawara K, Kakazu Y, Tomita M: Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. *J Chromatogr A*, **1159**: 125-133, 2007.
- 3) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*, **281**: 16768-16776, 2006.
- 4) Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M: Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science*, **316**: 593-597, 2007.
- 5) Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M, Soga T: Depiction of Metabolome Changes in Histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol BioSyst*, **4**: 135-147, 2008.
- 6) Sato S, Soga T, Nishioka T, Tomita M: Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J*, **40**: 151-163, 2004.
- 7) Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, Hishiki T, Ueno Y, Nakayama Y, Tomita M, Suematsu M: Roles of hemoglobin allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J Biol Chem*, **282**: 10731-10741, 2007.
- 8) Richman PG, Meister A: Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*, **250**: 1422-1426, 1975.
- 9) Cuzzo JW, Kaiser CA: Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol*, **1**: 130-135, 1991.
- 10) Ballatori N, Dutczak WJ: Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem*, **269**: 19731-19737, 1994.

## Metabolome Analysis by CE-MS and Application to Biosciences

Tomoyoshi Soga\*

\*Institute for Advanced Biosciences, Keio University

## 数字

8-ニトロ-cGMP ..... 89

## 和文

## あ

アイソトポマー ..... 216  
 アストロサイト ..... 37  
 アンジオスタチン ..... 129  
 異種移植 ..... 56  
 一次耐性 ..... 74  
 遺伝子変異 ..... 48  
 イマチニブ ..... 74  
 イメージング ..... 208  
 栄養飢餓耐性 ..... 203  
 エネルギー代謝 ..... 215  
 エピジェネティクス ..... 34  
 炎症細胞 ..... 85  
 炎症発癌 ..... 85  
 エンドスタチン ..... 129  
 オートファジー ..... 219  
 オリゴデンドロサイト前駆細胞 ..... 37

## か

階層構造 ..... 52  
 解糖系 ..... 218  
 解糖系阻害剤 ..... 178  
 核医学的手法 ..... 209  
 活性型上皮増殖因子受容体 ..... 38  
 活性酸化窒素種 ..... 89  
 活性酸素 ..... 86, 89  
 活性窒素 ..... 89  
 カップリング ..... 115  
 滑膜肉腫 ..... 68  
 カドヘリン-11 ..... 119  
 可溶性 VEGFR-3-Ig ..... 165  
 癌遺伝子誘発性細胞老化 (OIS) ..... 33  
 肝癌 ..... 60  
 癌幹細胞 29, 43, 52, 58, 73, 114, 142  
 癌幹細胞ニッチ ..... 83  
 癌間質 ..... 197, 85  
 癌間質 (関連) 線維芽細胞 (CAF)  
 ..... 78, 82, 100

幹細胞ニッチ ..... 50  
 癌細胞の悪性化 ..... 85  
 癌細胞の浸潤 ..... 99  
 癌始源細胞 ..... 83  
 間質細胞 ..... 78, 98  
 癌転移 ..... 156  
 癌特異タンパク質 ..... 209  
 間葉系幹細胞 ..... 66, 93, 100, 115  
 間葉-上皮細胞分化転換 (MET)  
 ..... 24, 76, 109  
 キガマイシン ..... 204  
 急性骨髄性白血病 ..... 74  
 教育された細胞 ..... 83  
 筋線維芽細胞 ..... 92  
 クエン酸回路 ..... 218  
 グリオーマ ..... 37  
 グリオーマ幹細胞 ..... 38  
 グリオーマ起源細胞 ..... 37  
 グリオブラストーマ ..... 41  
 グルコース飢餓 ..... 174  
 鶏卵腫瘍移植モデル ..... 182  
 血液幹細胞 ..... 115  
 血液線維素溶解系 (線溶系) ..... 148  
 血管 ..... 156  
 血管機能解析 ..... 2, 13, 212  
 血管新生 ..... 26, 82, 128, 137, 199  
 血管新生 (促進) 因子 ..... 128, 203  
 血管新生ニッチ ..... 146  
 血管新生抑制因子 ..... 128  
 血管透過性亢進作用 ..... 122  
 血管内皮細胞 ..... 122, 137  
 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)  
 ..... 26, 95, 121, 134, 143, 184  
 血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR)  
 ..... 7, 122, 187  
 血管内皮前駆細胞 (EPC) ..... 161  
 血管平滑筋細胞 ..... 137  
 ゲノム不安定性 ..... 87  
 嫌気性菌 ..... 191, 192, 193, 194  
 嫌気的エネルギー産生 ..... 205  
 嫌気的解糖 ..... 203  
 抗癌剤 ..... 72  
 抗癌剤耐性 ..... 73  
 抗血管新生治療 (療法) ..... 134, 160  
 抗腫瘍効果 ..... 134  
 抗ヒト VEGF 中和抗体 ..... 125

骨髄ニッチ ..... 114  
 骨髄微小環境 ..... 50  
 骨髄由来細胞 ..... 144  
 骨髄由来線維芽細胞 ..... 80  
 骨転移 ..... 26  
 骨肉腫 ..... 68  
 混合型肝癌 ..... 60  
 混合肉腫 ..... 67

## さ

細胞移動 ..... 107  
 細胞外マトリックス (ECM)  
 ..... 25, 91, 167, 197  
 細胞周期静止期 ..... 50  
 細胞接着因子 ..... 114  
 細胞転換 ..... 107  
 酸化ストレス ..... 86, 89  
 酸素類似物質 ..... 180  
 自己複製能 ..... 29, 44, 52, 58  
 ジフテリア毒素 (DT) ..... 151  
 重症複合免疫不全 (SCID) ..... 144  
 腫瘍血管 ..... 121, 212  
 腫瘍随伴マクロファージ (TAM)  
 ..... 27, 98, 200  
 腫瘍免疫 ..... 25  
 上皮-間質相互作用 ..... 98  
 上皮-間葉細胞分化転換 (EMT)  
 ..... 23, 73, 92, 102, 109  
 小胞体ストレス ..... 171  
 小胞体ストレス応答 (UPR) ..... 170  
 所属リンパ節転移 ..... 163  
 神経幹細胞 ..... 37  
 神経提幹細胞 ..... 67  
 人工グリオーマ幹細胞 ..... 41  
 人工多能性幹細胞 ..... 70  
 浸潤突起 ..... 198  
 膝癌 ..... 59, 102, 203  
 ストック細胞 ..... 126  
 ストレス耐性 ..... 170  
 スニチニブ ..... 184  
 生体イメージング ..... 208  
 生体内還元活性化剤 ..... 180  
 生理機能イメージング ..... 7, 212  
 セリンスレオニンキナーゼ型受容体  
 ..... 21  
 線維化 ..... 24

な課題であるが、パモ酸ピルビニウムの例から示唆されるように、同様の薬理作用をもつ駆虫薬が有効な抗癌剤となり得ること、そしてこのCE-MSを基軸としたメタボローム解析が全く新しい癌の治療法の開発に貢献しうることが示された。

## おわりに

本稿ではイオン性低分子化合物の網羅的測定に有用で、特に生体試料の解析に多大な威力を発揮するCE-MSを基盤としたメタボローム解析技術を紹介し、癌のメタボローム研究における具体的な応用例を紹介した。われわれは他にも癌患者由来の体液（血液・尿・唾液など）のメタボローム解析による診断バイオマーカーの同定、遺伝子改変マウスやラットの組織中のメタボローム解析による癌関連遺伝子機能の解析やそれらのエネルギー代謝との関連性の解析、そして培養細胞を用いたメタボローム解析による発癌機序における代謝変化や、異なる培養条件による細胞のさまざまな代謝適応反応の解明など、多岐に渡る癌メタボローム研究を並行して行っている。癌細胞の増殖には癌種や個人の遺伝子型を問わずATPが必須である。癌細胞のエネルギー代謝を読み解くことで、癌種や個人差に依存しない普遍的な癌治療の開発に貢献できれば幸いである。

## 謝辞

本研究の一部は厚生労働省がん研究助成金、文部科学省グローバルCOEプログラム「In Vivoヒト代謝システム生物学」、21世紀COEプログラム「環境・遺伝素因相互作用に起因する疾患研究」、山形県および鶴岡市の支援によるものである。メタボローム測定および膨大なデータの処理に関して技術的なサポートを頂いた慶應義塾大学先端生命

科学研究所の杉本昌弘博士、戸谷吉博氏、五十嵐沙織氏、および小池沙香氏にこの場を借りて感謝いたします。

## 文献

- 1) Soga, T. et al. : J. Proteome Res., 2 : 488-494, 2003
- 2) Soga, T. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 16768-16776, 2006
- 3) 「メタボローム研究の最前線」(富田勝, 西岡孝明/編), シュプリンガーフェアラーク東京, 2003
- 4) Yoshida, S. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 74 : 2787-2796, 2008
- 5) Ishii, N. et al. : Science, 316 : 593-597, 2007
- 6) Soga, T. et al. : Anal. Chem., 74 : 2233-2239, 2002
- 7) Sato, S. et al. : Plant. J., 40 : 151-163, 2004
- 8) Kinoshita, A. et al. : J. Biol. Chem., 282 : 10731-10741, 2007
- 9) Toya, Y. et al. : J. Chromatogr. A, 1159 : 134-141, 2007
- 10) Sugimoto, M. et al. : Anal. Chem., 77 : 78-84, 2005
- 11) Warburg, O. : Science, 123 : 309-314, 1956
- 12) Gambhir, S. S. : Nat. Rev. Cancer, 2 : 683-693, 2002
- 13) Izuishi, K. et al. : Cancer Res., 60 : 6201-6207, 2000
- 14) Kita, K. et al. : Trends Parasitol., 23 : 223-229, 2007
- 15) Esumi, H. et al. : Cancer Sci., 95 : 685-690, 2004
- 16) Mathew, R. et al. : Nat. Rev. Cancer, 7 : 961-967, 2007
- 17) Junker, B. H. et al. : BMC Bioinformatics, 7 : 109, 2006

## <筆頭著者プロフィール>

紙健次郎：カリフォルニア大学サンディエゴ校生物工科学部および細胞生物学生化学部を卒業後、現在慶應義塾大学政策・メディア研究科博士課程に在籍。グローバルCOE研究員。国立がんセンターの他、さまざまな大学および研究機関と癌メタボロームに関する共同研究を進める傍ら、慶應義塾大学先端生命科学研究所が所在する山形県鶴岡市の地元民とジャズバンドを結成し音楽活動にも余念がない。

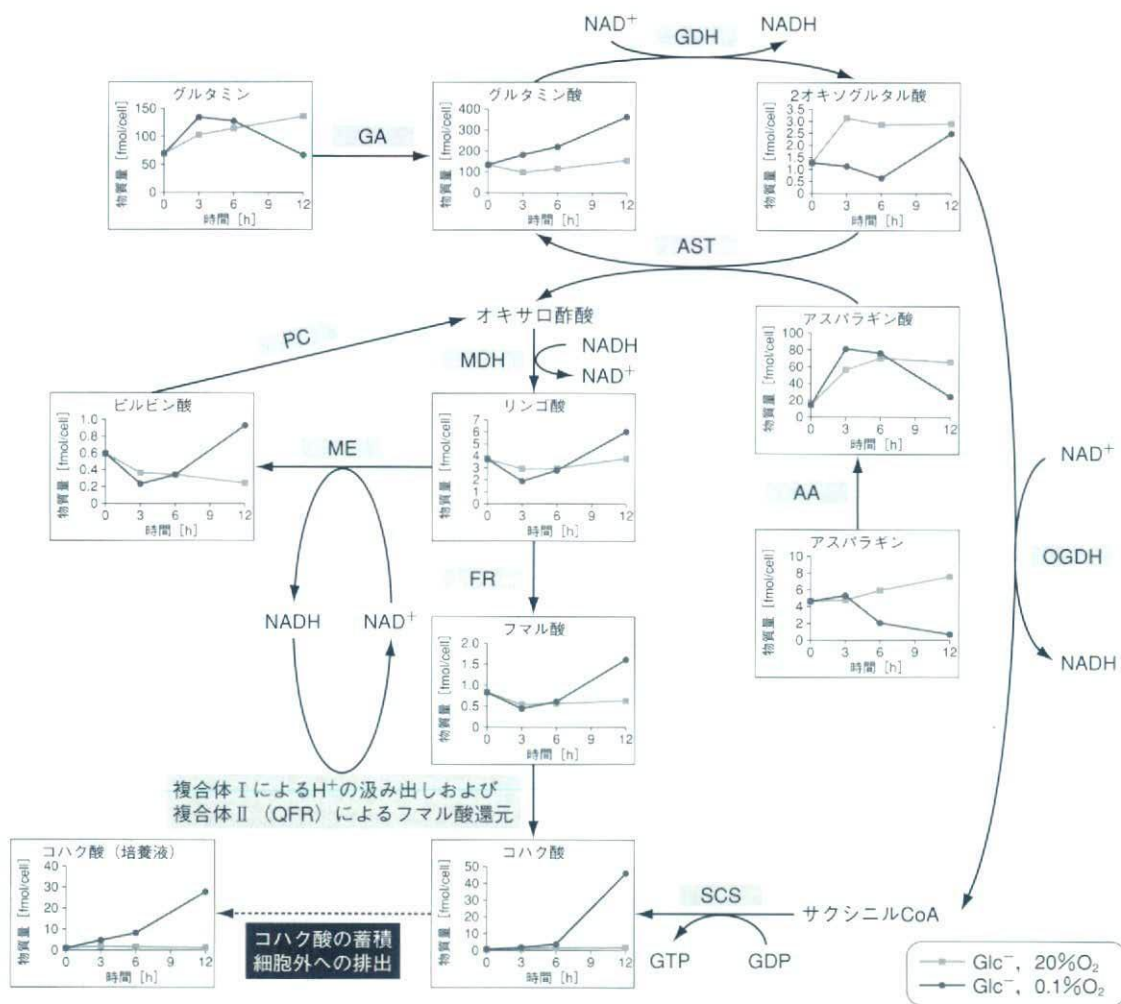


図4 栄養飢餓状態における癌細胞のフマル酸呼吸による仮説的なエネルギー代謝経路

主にアスパラギンやグルタミンよりアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) の反応によりオキサロ酢酸を生じさせ、クエン酸回路の一部を逆に回転させることによりフマル酸を供給していると考えられる。さらにリンゴ酸酵素 (ME) の反応などにより生じたNADHを基質として複合体Iを介したプロトン (H<sup>+</sup>) のミトコンドリア膜間腔への汲み出しを行い、複合体IIのキノール-フマル酸還元活性によりフマル酸からコハク酸を生じさせる (フマル酸呼吸)。また、クエン酸回路における2オキソグルタル酸からコハク酸までの反応により基質レベルでGTPが生成される。極度の栄養飢餓状態ではこれらの反応が活発になり、細胞内にコハク酸が蓄積し培養液中に排出されていることが示唆される。各物質量の時系列変化は、図2に示したPanc-1のメタボローム解析結果より抜粋した。各反応における酵素の略称はそれぞれ以下の酵素を示す。GDH：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、AST：アスパラギン酸アミノ基転移酵素、GA：グルタミンナーゼ、AA：アスパラギナーゼ、PC：ビルビン酸カルボキシラーゼ、ME：リンゴ酸酵素、MDH：リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、FR：フマルラーゼ、QFR：キノール-フマル酸還元酵素、OGDH：オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ、SCS：サクシニルCoA シンセターゼ

らに複合体Iに依存するフマル酸呼吸はNADHが必須であることやグルタミン酸が顕著に増加したことなどから、極度の栄養飢餓状態における癌細胞のエネルギー代謝として図4に示したような経路が考えられる。時系列メタボローム解析を駆使した本実験から、哺

乳類細胞ではこれまでに知られていなかった、グルコースや酸素分子に依存しないATPの生成経路の存在が示された。クエン酸回路の一部を通常とは逆向きに回転させるこのユニークな代謝経路の活性作用機序および癌細胞における存在の普遍性の解明は今後の大き

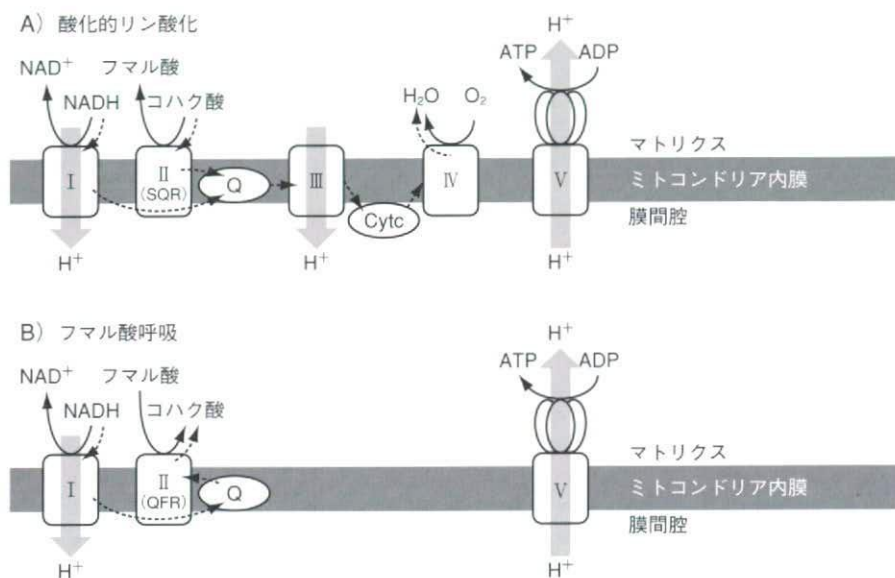


図3 酸化リン酸化 (A) およびフマル酸呼吸 (B) における電子伝達およびATP生成  
 ローマ数字 (I, II, III, IV, V) はそれぞれ対応するミトコンドリア内膜複合体を、Q はキノンを、SQR はコハク酸キノ還元酵素、QFR はキノールフマル酸還元酵素、Cyt c はシトクロム c を示す。また、実線は酵素反応による物質の変化、破線は電子の動き、太矢印はマトリクスおよびミトコンドリア膜間腔間のプロトンの移動を示す。酸化リン酸化における電子の最終受容体は酸素であり水 (H<sub>2</sub>O) が生成されるが、フマル酸呼吸においてはフマル酸が電子を受容し、結果としてコハク酸が蓄積することになる

表1 栄養状態による癌細胞のエネルギー代謝の変化

代謝	栄養状態		
	Glc <sup>+</sup> , O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Glc <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Glc <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
解糖	++	-	-
酸化リン酸化	+	++	-
フマル酸呼吸	-	+	++
副産物	乳酸, H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , コハク酸	コハク酸

### 3) グルコースと酸素の供給状態による 癌の代謝の変遷

ワーバグ効果で知られているように、グルコースと酸素がふんだんに供給される多血性の癌細胞の多くは恐らく解糖系を中心としたエネルギー代謝を行っていると考えられる。ところが、グルコース欠乏状態ではパモ酸ピルビニウムが毒性を発揮することからも、一部のATP生成をフマル酸呼吸に依存している可能性がある。さらにグルコースも酸素も途絶えると、フマル酸呼吸に依存せざるを得なくなりコハク酸が細胞

内外に蓄積するものと考えられる (表1)。

フマル酸呼吸の活性化に伴い基質となる大量のフマル酸が必要である。グルコース欠乏状態におけるフマル酸の供給源としてはアミノ酸と脂肪酸が考えられるが、脂肪酸の分解産物であるアセチルCoAやクエン酸の増加がみられないことから、アスパラギンなど一部のアミノ酸であると思われる。また、グルコース飢餓状態や低酸素下ではオートファジーが生じやすいことが知られており<sup>16)</sup>、分岐鎖アミノ酸を含む必須アミノ酸の増加はオートファジーの発生を示唆している、さ



で増殖する癌種とは異なるエネルギー代謝を行っている可能性がある。血流不足により解糖も酸化的リン酸化も慢性的に制限された環境において、細々と、しかし着実に生き永らえる癌細胞は、増殖に必要なエネルギーをいったいどのように捻出しているのだろうか？ われわれは、上述したCE-MSによるメタボローム解析技術を応用し、このような乏血性癌細胞のエネルギー代謝に関するジレンマの解明を試みた。

### 3 メタボローム解析による癌細胞の特殊なエネルギー代謝機構の解明

#### 1) グルコースも酸素もなしに癌細胞はATPをつくれるか？

グルコース欠乏かつ低酸素状態における癌細胞の生き残り戦略をエネルギー代謝の観点から解明する目的で、腫瘍癌の培養細胞であるPanc-1およびヒト皮膚線維芽細胞であるHDFを用いて時系列メタボローム解析を行った。具体的には、グルコース欠乏かつ常酸素( $\text{Glc}^-$ ,  $\sim 20\% \text{O}_2$ )またはグルコース欠乏かつ低酸素( $\text{Glc}^-$ ,  $\sim 0.1\% \text{O}_2$ )状態に暴露したPanc-1およびHDFから経時的に細胞および培養液をサンプリングし、CE-MSによりメタボローム測定を行い、エネルギー代謝に関連する130種の物質について定量を行った(図2: Panc-1の細胞内メタボロームデータのみ掲載)。興味深いことに、Panc-1ではグルコース欠乏かつ低酸素ストレス負荷後12時間で、コハク酸が細胞あたり量で40倍以上、培養液中濃度で20倍以上も増加した(図2コラム)。

解糖系およびクエン酸回路中間物質の多くが枯渇するなかで、コハク酸の蓄積は一見意外である。しかしながら、実は嫌気性微生物や回虫などの寄生虫およびある種の二枚貝では、嫌気環境においてフマル酸呼吸<sup>※3</sup>(特に寄生虫では「NADH-フマル酸還元系」と呼ばれる特殊な代謝を行うことによりATPを嫌氣的に生成し、その副産物としてコハク酸が大量に蓄積

#### ※3 フマル酸呼吸

電子伝達系における電子の最終受容体として酸素分子の代わりにフマル酸を使いコハク酸を生成し、共役する複合体(複合体I)の動きによりプロトンの勾配を生じさせATP合成を行う反応。通常の酸化的リン酸化によるATP合成に比べエネルギー効率は悪いが、無酸素下でATPの合成が可能であるため、嫌気性微生物や寄生虫、ある種の二枚貝などでその存在が確認されている。

することが知られている<sup>14)</sup>。これは、電子伝達系における最終的な電子の受容体として酸素の代わりにフマル酸が使われ、結果として水ではなくコハク酸を生成することによりミトコンドリア膜間腔のプロトン勾配を維持しATP生成を可能にするものである(図3)。つまり、リンゴ酸からフマル酸、そしてコハク酸の生成へと、クエン酸回路の後半部分が通常とは逆向きに回転することになりコハク酸が蓄積する。

しかしながら、哺乳類におけるフマル酸呼吸はこれまでに確認されておらず、コハク酸からフマル酸を生成するコハク酸デヒドロゲナーゼの逆反応の存在も未知であった。そこで、それぞれの細胞株からミトコンドリアを単離し、NADH存在下におけるフマル酸からコハク酸の生成、つまりフマル酸呼吸を示すミトコンドリア内膜タンパク質の逆回し活性を調べた。驚くべきことに、Panc-1およびHDFのいずれの細胞株にもフマル酸からコハク酸を生成する活性が確認され、Panc-1のそれがHDFのおよそ3倍であった(論文投稿中)。

#### 2) 虫下しが癌に効く?!

ところで体内に寄生したギョウ虫や回虫などを駆除する目的で、その薬理作用があまりはっきりしないままに古くから臨床的に使われてきた駆虫薬(虫下し)の1つにパモ酸ピルビニウム(pyrvinium pamoate)があるが、われわれはこのパモ酸ピルビニウムが実はフマル酸呼吸を阻害する薬剤であることを示唆するデータを得ている(論文投稿中)。さらに、パモ酸ピルビニウムはPanc-1などさまざまな細胞株に対しグルコース飢餓状態においてのみ顕著な毒性を発揮しネクロシスを誘発させることが知られており、動物実験においても腫瘍の増殖抑制効果が確認されている<sup>15)</sup>。

そこで、グルコース飢餓かつ低酸素という極度の栄養飢餓状態において、Panc-1およびHDFがどの程度フマル酸呼吸依存的にATPを生成しているかを検証する目的で、この条件下にパモ酸ピルビニウムを添加したうえで再度細胞および培養液サンプルのメタボローム解析を行った。その結果、薬剤投与群ではいずれの細胞株でもコハク酸の蓄積は有意に抑えられ、特にPanc-1におけるATPは3時間で枯渇した。ここから栄養飢餓環境におけるフマル酸呼吸のATP生成に関する貢献度の高さを窺い知ることができる。

Panc-1細胞の時系列メタボローム

Glc<sup>-</sup>, 20%O<sub>2</sub> : □  
 Glc<sup>-</sup>, 0.1%O<sub>2</sub> : ●

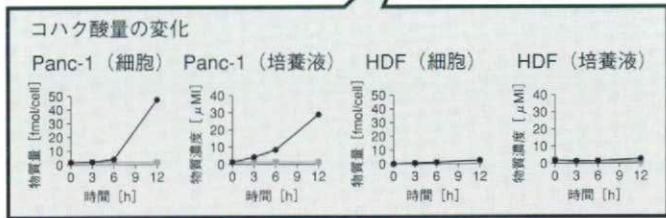
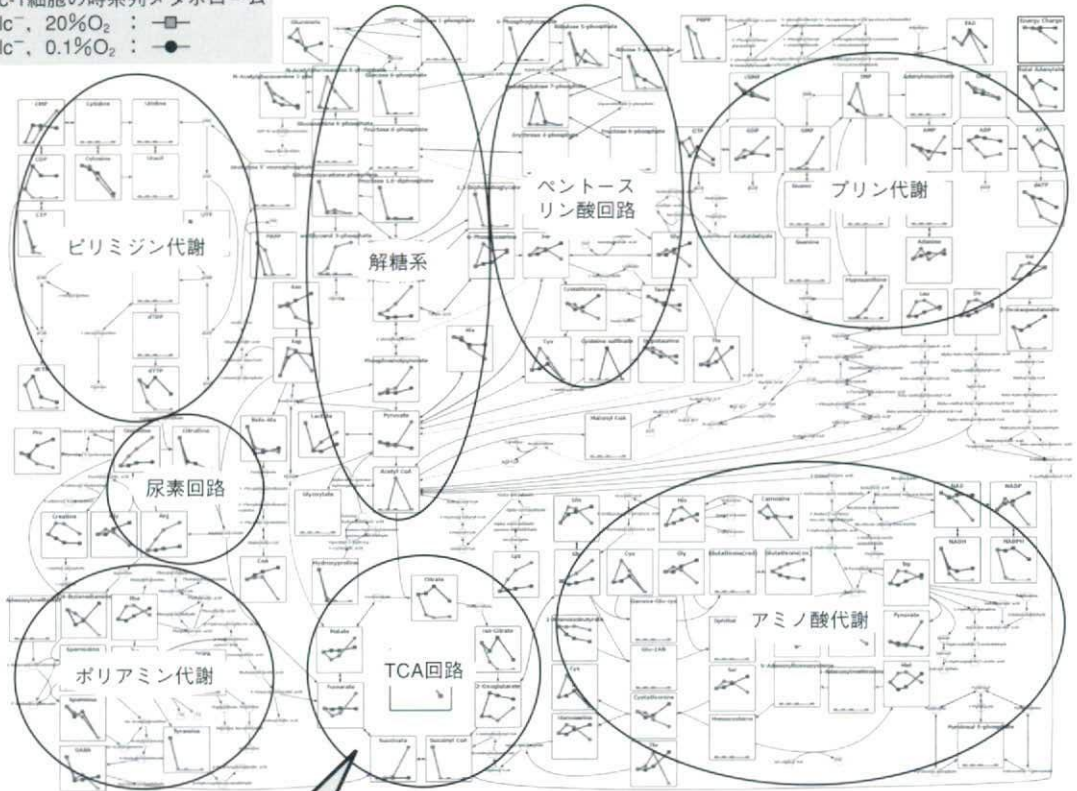


図2 Panc-1細胞におけるグルコース欠乏かつ常酸素 (Glc<sup>-</sup>, 20% O<sub>2</sub>) またはグルコース欠乏かつ低酸素 (Glc<sup>-</sup>, 0.1% O<sub>2</sub>) 条件下での時系列メタボロームデータ

VANTED<sup>17)</sup> により代謝マップ上に可視化した。サンプリングはそれぞれ、0、3、6、12時間後、縦軸は1細胞あたりに換算した物質量を示す。またコラム内はPanc-1およびHDF細胞それぞれの細胞および培養液中のコハク酸量の変化を示す

癌細胞によるグルコースの取り込み効率が高いことを利用した近年のPET診断<sup>12)</sup>は、まさに癌の代謝特性

を利用した画期的な癌の早期発見手法である。しかしながら、膵臓癌など一部の癌種では血流が乏しいために酸素およびグルコースの供給が不十分となり、癌細胞が栄養的にきわめて劣悪な環境で生存・増殖していることが知られている<sup>13)</sup>。このような癌は早期発見が難しいばかりでなく、標準的な化学療法によっても奏効率は低く再発の可能性が高い。したがって、このような癌細胞のエネルギー代謝を解糖系の亢進だけで説明することは難しく、多血性で栄養的に恵まれた環境

※2 ワーバーグ効果

ドイツ人生理学者オットー・ワーバーグ (Otto Warburg) により報告された、多くの癌細胞が酸素の有無にかかわらず主に解糖系に依存したエネルギー代謝を行う現象。この現象が生じる原因として、低酸素環境への適応や癌遺伝子によるミトコンドリア機能の抑制などがあげられているが、近年さらに議論が白熱している。

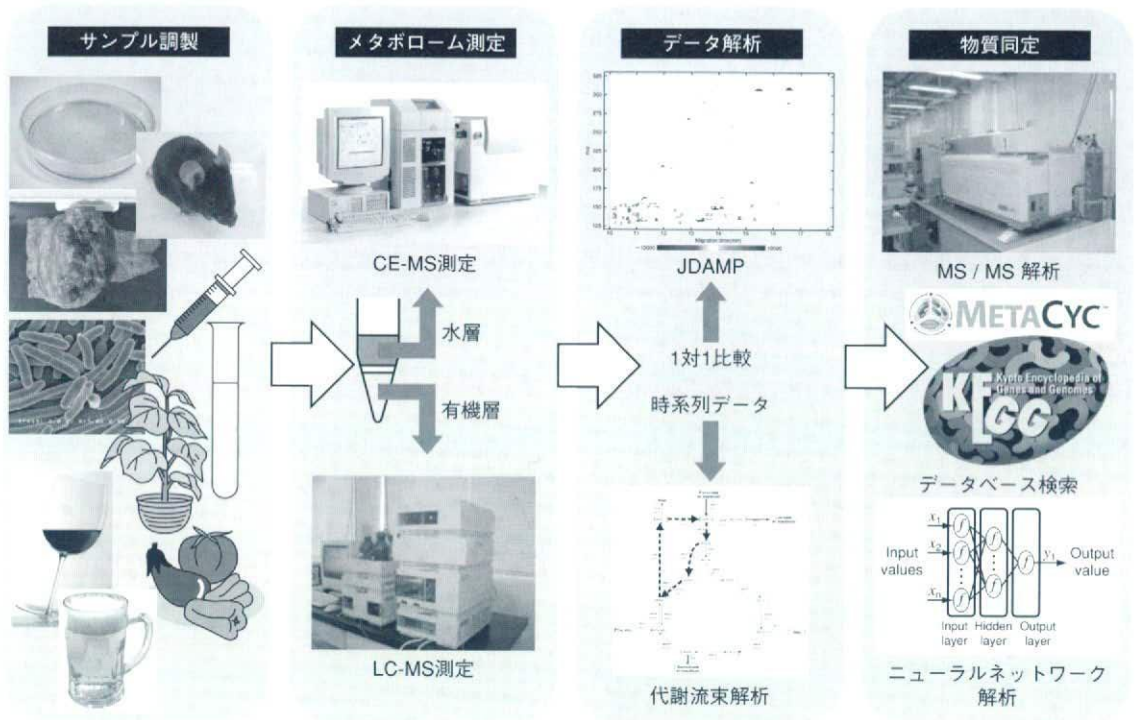


図1 メタボローム解析の流れ (巻頭カラー図17参照)

血液・尿・臨床組織などのヒト由来サンプル以外にも、微生物・植物・食品・飲料品など実にさまざまなサンプルの測定が可能である。必要に応じてLC-MSやGC-MSなどを併用し、中性物質や脂溶性物質の測定を行うことによりさらに網羅性を向上させている。また、バイオマーカー候補となる未知物質の同定にはMS/MS解析などが欠かせない

活かしてすでに微生物<sup>1)~6)</sup>をはじめ動植物組織<sup>2) 7)</sup>、血液・尿・唾液・涙などの体液<sup>8)</sup>、食品および飲料に至るまで幅広いサンプルの分析を実現してきた。

癌メタボローム研究においても、マウスやラットのさまざまな組織切片や体液、ヒトの臨床検体、そして培養細胞における細胞および培養液サンプルなどのメタボローム解析手法を確立してきた。具体的には解糖系やペントースリン酸回路、クエン酸回路、尿素回路、アミノ酸およびポリアミン代謝、プリン体およびピリミジン代謝経路など、まさにエネルギー代謝に関与する物質群の一意定量に適している。また、膨大なメタボロームデータの比較解析や解釈を促進するソフトウェアの開発も同時に行っている。例えばJDAMP<sup>2)</sup>は、比較検討したい2群のサンプル(例えば腫瘍および正常組織、あるいは遺伝子欠損株および野生株)から得られたメタボロームデータを網羅的に比較し、有意差のある物質のみを二次元マップに表示させること

が可能である。また、同位体標識した物質(例えば<sup>13</sup>C-グルコースなど)を細胞内に取り込ませることで生成される同位体組成の異なる異性体(アイソトポマー)を測定し、添加した同位体標識物質の細胞内における代謝流束を計算的に予測するソフトも開発した<sup>9)</sup>。メタボローム解析からバイオマーカーの候補となるピークが検出された場合には、MS/MS解析<sup>2)</sup>やニューラルネットワーク<sup>10)</sup>を応用した手法により未知物質の同定も行っている。これら一連の基盤技術の確立により(図1)、CE-MSを主軸としたわれわれのメタボローム解析技術は、癌研究のみならず医療・環境・食品関連など幅広い分野への応用が可能である。

## 2 乏血性癌の微小環境と代謝

癌細胞が好气的環境下でも酸化的リン酸化よりもむしろ解糖系依存的に代謝を行う現象はワーバーグ効果<sup>2 11)</sup>と呼ばれ、さまざまな癌種において確認されている。

## 8. メタボローム解析による 癌微小環境のエネルギー代謝の解明

紙健次郎, 冨塚江利子, 冨田 勝, 北 潔, 江角浩安, 曾我朋義

メタボローム解析技術は近年目覚ましい発展を遂げ、特にキャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS) によるイオン性低分子化合物の一斉分析は、生体由来サンプルに含まれる代謝物質の網羅的解析にきわめて有用である。一方、癌の微小環境における代謝に関してはワーバーク効果など古くから着目されてきたものの、効果的な分析手法の欠如などの理由からいまだ未知の部分が多い。ここではCE-MSによるメタボローム解析の流れとその技術を応用した癌の微小環境における特殊なエネルギー代謝機構の解明に向けた取り組みを紹介する。

### はじめに

メタボローム解析技術の進歩により、近年のメタボロミクス研究の発展は目覚ましいものがある。さまざまな解析手法がしのぎを削るなか、われわれはキャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS<sup>※1</sup>) を用いたイオン性低分子化合物の網羅的測定法を確立した。CE-MSによるメタボローム解析技術の詳細については文献<sup>1)~3)</sup>を参照されたい。特にエネルギー代謝に

関連する一連の物質を一斉に同定・定量可能であるこの手法は、疾患や副作用に関するバイオマーカーの探索はもちろんのことさまざまな遺伝子変異や環境ストレスによる癌細胞内外の代謝変化の解明に最適である。そこで本稿では、まずCE-MSによるメタボローム解析の概要を述べ、次にこの装置を応用した癌メタボロミクスに関する研究成果を紹介する。

### 1 CE-MSによるメタボローム解析技術

CE-MSは、現在一般的に使われているNMRやLC-MS, GC-MSなどでは一斉分析が難しいイオン性低分子化合物の網羅的な測定が可能であり、この特徴を

#### 【キーワード&略語】

メタボローム解析, 癌微小環境, エネルギー代謝, フマル酸呼吸, パモ酸ビルビニウム

**CE-MS** : capillary electrophoresis mass spectrometry

(キャピラリー電気泳動質量分析装置)

**PET** : positron emission tomography

(陽電子放射断層撮影法)

**HDF** : human dermal fibroblast

(ヒト皮膚線維芽細胞)

#### ※1 CE-MS

キャピラリー電気泳動装置 (capillary electrophoresis : CE) を質量分析装置 (mass spectrometry : MS) に接続した分析装置。サンプル溶液に含まれる化合物が、キャピラリーの両端に印加した高電圧により各物質の (電荷/イオン半径) の比に基づいて移動し、質量分析計により各物質の固有の質量にて高選択、高感度に一斉分析される測定法。

#### Metabolome analysis of energy metabolism in tumor microenvironment

Kenjiro Kami<sup>1)</sup>/Eriko Tomitsuka<sup>2) 3)</sup>/Masaru Tomita<sup>1)</sup>/Kiyoshi Kita<sup>3)</sup>/Hiroyasu Esumi<sup>2)</sup>/Tomoyoshi Soga<sup>1)</sup> : Institute for Advanced Biosciences, Keio University<sup>1)</sup>/Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East<sup>2)</sup>/Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo<sup>3)</sup> (慶應義塾大学先端生命科学研究所<sup>1)</sup>/国立がんセンター東病院臨床開発センター<sup>2)</sup>/東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物医学教室<sup>3)</sup>)

EXPERIMENTAL MEDICINE

実験医学 増刊

別 刷

 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail : eigyo@yodosha.co.jp

URL : <http://www.yodosha.co.jp/>

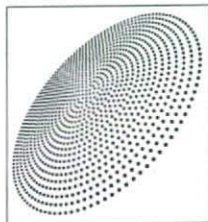
# 臨床化学

Vol.37 No.4 2008 別刷

特集

がんメタボロームによる  
エネルギー代謝の解析と  
がんの微小環境を標的と  
した治療薬の開発に向けて

紙健次郎・富塚江利子・北 潔・  
富田 勝・曾我朋義・江角浩安



# がんメタボロームによるエネルギー代謝の解析とがんの微小環境を標的とした治療薬の開発に向けて

紙 健次郎\* 冨塚江利子\*\* 北 潔\*\*\*  
冨田 勝\* 曾我朋義\* 江角浩安\*\*

## はじめに

メタボローム解析技術は近年目覚ましい発展を遂げ、微生物や植物分野に加え臨床や薬効評価<sup>1,2)</sup>そしてがん研究<sup>3,4)</sup>にも活発に応用され始めている。様々な解析手法がしのぎを削る中、我々は特にキャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いたイオン性低分子化合物の網羅的測定法を確立した(CE-MSによるメタボローム解析手法の詳細については曾我の項および文献<sup>5,6)</sup>を参照)。CE-MSは、現在よく使われているNMRやLC-MS, GC-MSなどでは一斉分析が難しいイオン性低分子化合物の網羅的な測定が可能であり、具体的には解糖系やペントースリン酸回路、クエン酸回路、尿素回路、アミノ酸およびポリアミン代謝、プリン体およびピリミジン代謝経路など、エネルギー代謝に関与する物質群の一斉定量に極めて有用である。一方、がんの代謝に関する研究は古くから行われているものの、様々な環境ストレスに曝されつつも増殖を続けることが可能ながん細胞のエネルギー代謝にはいまだ未知の部分が多い。従って、

CE-MSによる代謝物質の網羅的な解析は、がんの微小環境におけるエネルギー代謝を明らかにする上で最適である。ここではCE-MSによるメタボローム解析技術を応用したがんの微小環境における特殊なエネルギー代謝機構の解明や、その特殊な生育環境を標的とした新規抗腫瘍性物質に関する研究成果を紹介する。

## 1. がんの微小環境とエネルギー代謝

がん細胞が好気的環境下でも酸化的リン酸化よりむしろ解糖系依存的にエネルギー代謝を行う現象はワーバーク効果<sup>7)</sup>と呼ばれ、様々ながん種において観察されている。がん細胞によるグルコースの取り込み効率が高いことを利用した近年の陽電子放射断層撮影(PET)診断<sup>8)</sup>は、まさにがんの代謝特性を利用した画期的ながんの早期発見手法である。ところが膵臓癌など一部のがん種では、血流が乏しいために酸素およびグルコースの供給が不十分となり、がん細胞が栄養的に極めて劣悪な環境で生存・増殖していることが知られている<sup>9)</sup>。このようながんは早期発見が難しいばかりでなく、標準的な化学療法によっても奏効率は低く再発の可能性が高い。従って、解糖系の亢進だけでこのようながん細胞

\*慶應義塾大学先端生命科学研究所

\*\*国立がんセンター東病院臨床開発センター

\*\*\*東京大学大学院医学系研究科

のエネルギー代謝を説明することは難しく、多血性で栄養的に恵まれた環境で増殖するがん種とは異なる代謝機構に依存している可能性がある。がんが高い浸潤能を有するには、がん細胞の増殖に伴い局所的に生じる慢性的な虚血状態やアシドーシスなどのストレスに対する適応性の獲得が条件であると言われている<sup>10)</sup>。解糖も酸化的リン酸化も制限された乏血性の微小環境におけるがん細胞は、増殖に必要なエネルギーをいったいどのように捻出しているのだろうか？我々は、CE-MSによるメタボローム解析技術を駆使し、このよ

うな乏血性がん細胞のエネルギー代謝に関するジレンマの解明を試みた。

## 2. 栄養飢餓状態におけるがん細胞の特殊なエネルギー代謝

### 2.1 グルコースおよび酸素非依存的なATP生成

極度の栄養欠乏状態におけるがん細胞のエネルギー代謝を解明する目的で、膵臓癌の培養細胞であるPanc-1およびヒト皮膚線維芽細胞であるHDFを用いて時系列メタボローム解析を行った。具体的には、グルコース欠乏か

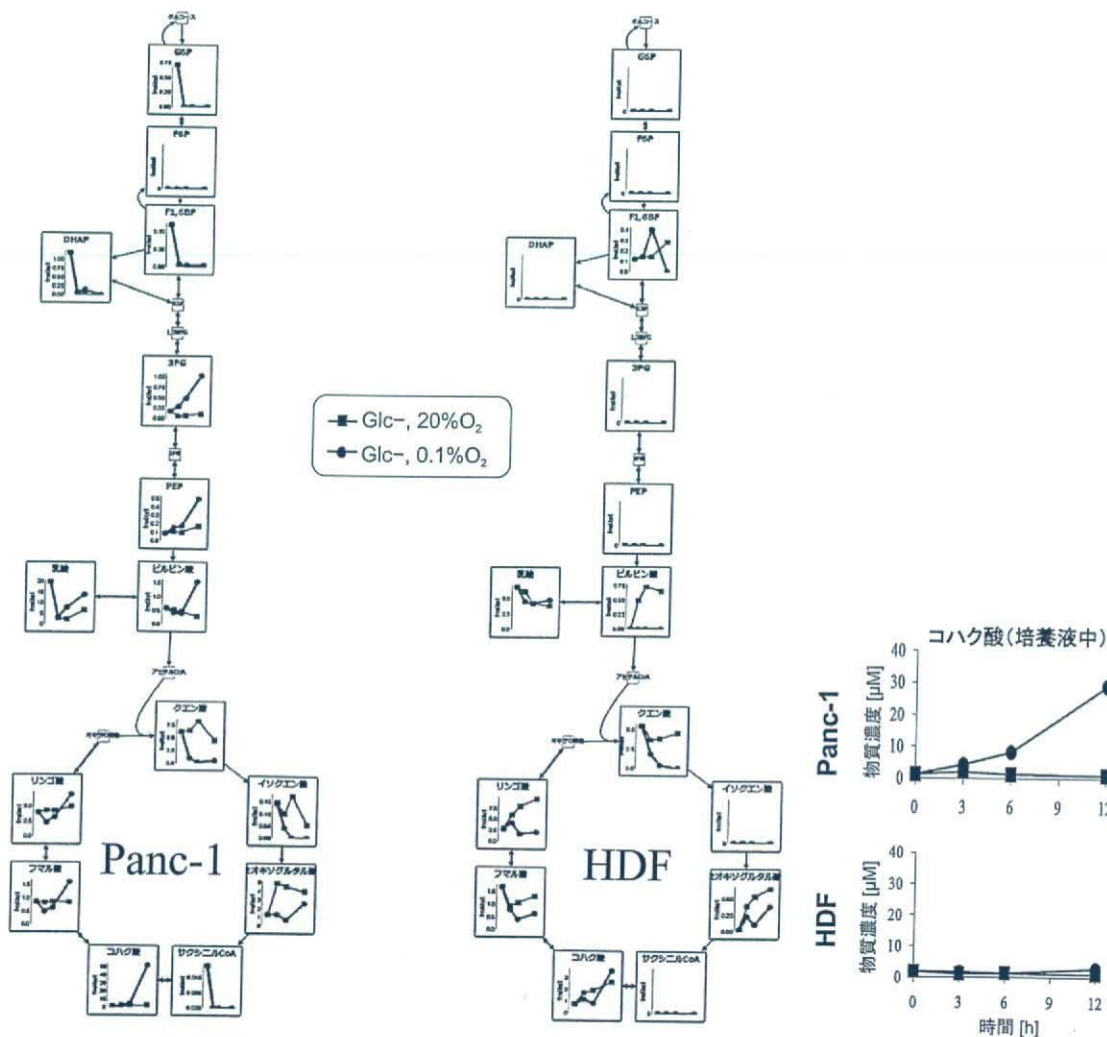


図1 栄養飢餓状態 (Glc-,20%O<sub>2</sub> vs Glc-,0.1%O<sub>2</sub>) におけるPanc-1およびHDFの時系列メタボローム解析結果 (左: 解糖系およびクエン酸回路中間物質のデータのみ抜粋) および培養液中のコハク酸濃度の変化 (右)



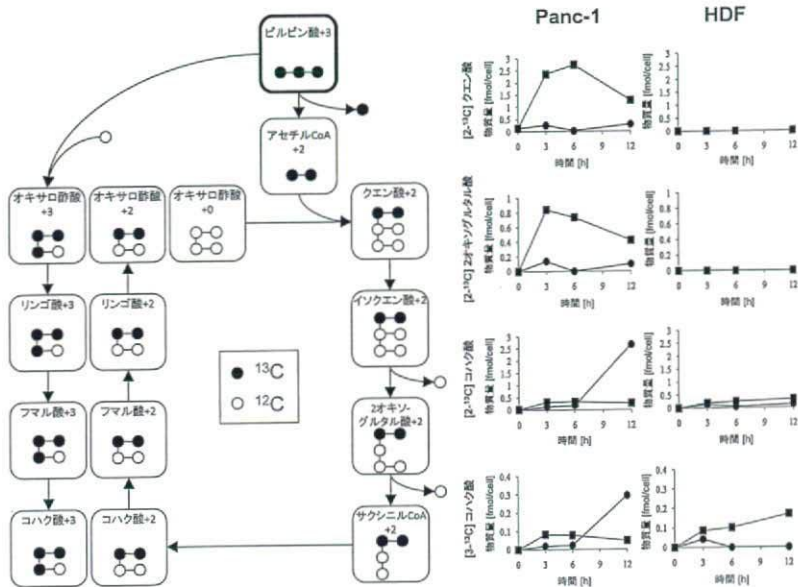


図2 U-<sup>13</sup>Cピルビン酸から生成されるクエン酸回路中間物質のアイソトポマー(左)および[2-<sup>13</sup>C]クエン酸、[2-<sup>13</sup>C]2オキソグルタル酸、[2-<sup>13</sup>C]コハク酸、および[3-<sup>13</sup>C]コハク酸の時系列変化(右) 物質名に続く+2および+3は、各アイソトポマーに含まれる<sup>13</sup>Cの数を示す。

つ常酸素 (Glc-, ~20% O<sub>2</sub>) またはグルコース欠乏かつ低酸素 (Glc-, 0.1% O<sub>2</sub>) 状態にて培養したPanc-1およびHDFから細胞および培養液サンプルを経時的に採取し、CE-MSによるメタボローム測定を行い、130種のエネルギー代謝関連物質の定量を行った。結果、グルコース欠乏かつ低酸素条件における特徴的な変化として、解糖系およびクエン酸回路中間物質の多くが枯渇する一方で、特にPanc-1ではコハク酸濃度が細胞内で40倍以上、培養液中で20倍以上も増加した(図1)。また、予め培養液中に添加した<sup>13</sup>C標識付ピルビン酸(U-<sup>13</sup>Cピルビン酸)に由来する[2-<sup>13</sup>C]コハク酸および[3-<sup>13</sup>C]コハク酸量も増加した(図2)。これは、培養液中から取り込まれたピルビン酸の代謝経路および代謝流束を考察する目的で行ったもので、ここから図2に示したような反応経路によりクエン酸回路中間物質などの様々なアイソトポマーが生成されることになる。特にグルコース欠乏かつ低酸素条件でのPanc-1において、[2-<sup>13</sup>C]クエン酸や[2-<sup>13</sup>C]2オキソグルタル酸がほとんど検出されない一方で、[2-<sup>13</sup>C]コハク酸や[3-<sup>13</sup>C]コハク酸が蓄積し

ているのは興味深い。また、[3-<sup>13</sup>C]クエン酸の蓄積は、ピルビン酸からオキサロ酢酸およびリンゴ酸を經由して、フマル酸からコハク酸を生成するコハク酸デヒドロゲナーゼによる通常とは逆向きの反応の存在可能性を示唆する結果である。クエン酸回路の停滞が予想される極度の低酸素下においてコハク酸の蓄積は一見意外である。しかしながら、実は嫌気性微生物や回虫などの寄生虫およびある種の二枚貝は、嫌気環境において「フマル酸呼吸」(特に寄生虫ミトコンドリアでは「NADH-フマル酸還元系」と呼ばれる特殊な代謝機構によるATP生成が可能であり、その副産物としてコハク酸を蓄積することが知られている<sup>11)</sup>。フマル酸呼吸では、電子伝達系における最終的な電子の受容体として酸素の代わりにフマル酸が消費され、結果として水ではなくコハク酸が生成される(図3)。通常の酸化的リン酸化に比べエネルギー効率では劣るものの、この反応により酸素無しで電子の伝達が完結することになり、ミトコンドリア膜間腔のプロトン勾配が維持されATP生成が可能となる。従って、活発なフマル酸呼吸に伴い、リンゴ

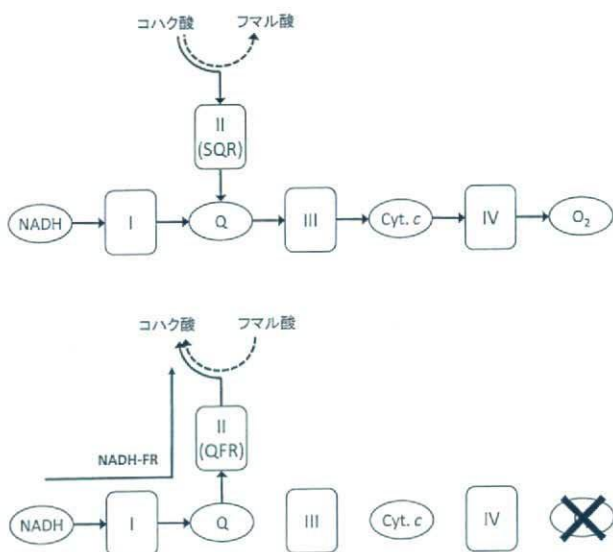


図3 酸化リン酸化における電子伝達(上)およびフマル酸呼吸における電子伝達(下) 実線は電子の流れ、破線は代謝反応を示す。I, II, III, IVはそれぞれ対応する複合体、Qはキノン、Cyt. cはシトクロムc、SQRはコハク酸-キノン還元酵素、QFRはキノール-フマル酸還元酵素を示す。また、NADH-FRは活性測定を行ったNADH-フマル酸還元経路を示す。

酸からフマル酸、そしてコハク酸へと、クエン酸回路の左半分が通常とは逆向きに半回転する代謝流束が増大し、結果としてコハク酸が蓄積することになる。しかしながら、哺乳類におけるフマル酸呼吸の存在およびフマル酸からのコハク酸の生成(つまりコハク酸デヒドロゲナーゼの逆反応)もこれまで未知であった。そこで、それぞれの細胞株からミトコンドリアを単離し、NADH存在下におけるフマル酸からコハク酸の生成、つまりフマル酸呼吸を示すミトコンドリア内膜タンパク質の逆回し活性を調べた。驚くべきことに、Panc-1およびHDFのいずれの細胞株にもフマル酸からコハク酸を生成するフマル酸還元活性(図3: NADH-FR)が確認され、さらにPanc-1におけるフマル酸還元活性がHDFのそれに比べ3倍程度も高いことが明らかとなった(論文投稿中)。

## 2.2 駆虫薬から抗がん剤候補物質へ

ところで以前から抗線虫薬の目的で使われてきた薬剤にはその標的がフマル酸還元酵素とされているものが多かった。しかしそれを示す直接的な証拠はなかった。そこで著者ら

は回虫ミトコンドリアを用いた実験から、抗線虫薬であるパモ酸ピルビニウム(Pyrrvinium pamoate)が実際にフマル酸呼吸の阻害剤であることを突き止めた(論文投稿中)。そこで、グルコース飢餓かつ低酸素という極度の栄養飢餓状態においてフマル酸呼吸を阻害した場合のエネルギー代謝への影響を調べる目的で、グルコース欠乏かつ低酸素環境に暴露したPanc-1およびHDFにパモ酸ピルビニウムを添加した上で再度メタボローム解析を行った。結果、薬剤投与群ではいずれの細胞株でもコハク酸の蓄積は細胞内および培養液のいずれにおいても有意に抑えられ、さらにPanc-1においてはATPが3時間で枯渇した。すなわち栄養飢餓環境に曝されたPanc-1のATP生成におけるフマル酸呼吸の役割が、極めて重要であることが示唆されたことになる。さらに興味深いことに、パモ酸ピルビニウムはPanc-1など様々な細胞株に対しグルコース飢餓状態においてのみ顕著な毒性を発揮するというユニークな性質を備えており、ヌードマウスに移植したヒト膵臓癌モデルにおいても腫瘍の増殖抑制効果が確認されている<sup>12)</sup>。栄養飢餓状

態におけるフマル酸呼吸への依存性やパモ酸ピルビニウムの毒性が、どの程度がん細胞に特異的なものであるかは今後特に重点的に調べる必要があるが、これらの結果は薬理作用が類似した様々な駆虫薬<sup>11)</sup>が抗がん剤として有効である可能性を示すものとして興味深い。

### 2.3 栄養飢餓状態におけるがん細胞のエネルギー代謝

ワーバーグ効果で知られているように、グルコースと酸素がふんだんに供給される多血性のがん細胞の多くは恐らく解糖系を中心としたエネルギー代謝を行っていると思われる。ところが、パモ酸ピルビニウムは酸素の有無に拘わらずグルコース欠乏状態で毒性を發揮

することから、グルコースの供給が途絶えると、常酸素下においても一部のATP生成をフマル酸呼吸に依存している可能性がある。さらにグルコースに加え酸素の供給まで滞ると、酸化リン酸化が機能しなくなりフマル酸呼吸への依存度が高まるはずである。フマル酸呼吸の基質となるフマル酸の供給源として、グルコース欠乏状態においては主にアミノ酸と脂肪酸が考えられるが、脂肪酸の分解産物であるアセチルCoAやその結果生じるはずのクエン酸の増加が見られないことから、アスパラギンやグルタミンなど一部のアミノ酸ではないかと思われる。また、グルコース飢餓や低酸素など極度の栄養飢餓状態ではオート

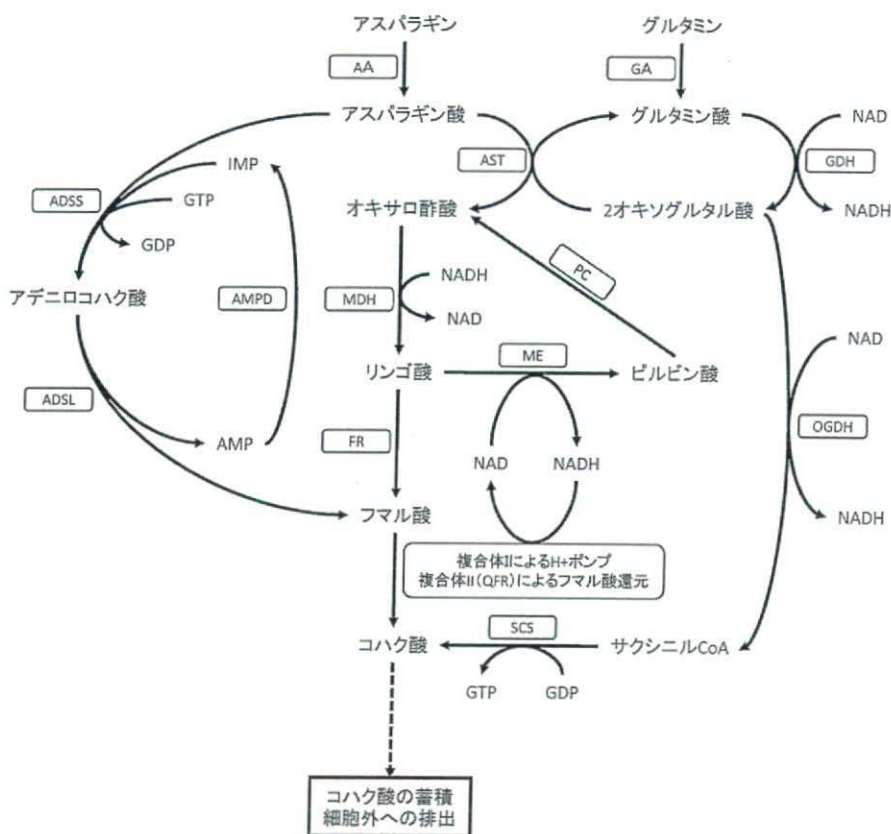


図4 栄養飢餓状態におけるがん細胞のフマル酸呼吸による仮説的なエネルギー代謝経路  
各反応における酵素の略称はそれぞれ以下の酵素を示す。AA:アスパラギナーゼ、GA:グルタミンナーゼ、AST:アスパラギン酸アミノ基転移酵素、GDH:グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、PC:ピルビン酸カルボキシラーゼ、MDH:リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ME:リンゴ酸酵素、FR:フマラーゼ、QFR:キノール-フマル酸還元酵素、OGDH:オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ、SCS:サクシニルCoAシンセターゼ、ADSS:アデニロコハク酸合成酵素、AMPD:AMPデアミナーゼ、ADSL:アデニロコハク酸リアーゼ

ファジーが生じやすいことが知られており<sup>13)</sup>, メタボローム解析結果からも分岐鎖アミノ酸など必須アミノ酸が増加する一方でアスパラギンなど一部のアミノ酸が顕著に減少している。さらにフマル酸呼吸は複合体Iに依存しているためNADHが必須であることやグルタミン酸が顕著に増加したことなどから, 極度の栄養飢餓状態におけるがん細胞のエネルギー代謝として図4に示したような経路が考えられる。

時系列メタボローム解析を駆使した本実験から, 哺乳類細胞ではこれまでに知られていなかった, グルコースや酸素分子に依存しないATPの生成経路の存在が強く示唆された。クエン酸回路の一部を通常とは逆向きに回転させるこのユニークな代謝経路の活性に関する制御機構や, がん細胞におけるフマル酸呼吸の普遍性の解明は今後の大きな課題であるが, CE-MSを基軸としたメタボローム解析技術が, 解糖や酸化的リン酸化といった従来のエネルギー代謝のみでは説明のつかない新たな代謝経路の発見や, がんの微小環境における特殊なエネルギー代謝を利用した全く新しいがんの治療法の開発に貢献し得ることが示された。

## おわりに

本項ではイオン性低分子化合物の網羅的測定に有用で, 特に生体試料の解析に大いに威力を発揮するCE-MSによるメタボローム解析技術を駆使し, 栄養飢餓状態におけるがんの特殊なエネルギー代謝を解明したがんメタボローム研究を紹介した。著者らは他にもがん患者由来の体液(血液・尿・唾液など)のメタボローム解析による診断バイオマーカーの探索, 遺伝子改変マウスやラットの組織中のメタボローム解析によるがん関連遺伝子機能の解析やそれらのエネルギー代謝との関連性の解析, そして培養細胞を用いたメタボローム解析による発がん過程における代謝変化や, 異なる培養条件による細胞の様々な代謝適応反応の解明など, 多岐に渡るがんメタボロ-

ーム研究を行っている。がん細胞の増殖にはがん種や個人の遺伝子型を問わずATPが必須である。がん細胞のエネルギー代謝を読み解くことで, がん種や個人差に依存しない普遍的ながん治療の開発に貢献できれば幸いである。

## 文献

- 1) Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinsilboum RM: Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**: 653-683, 2008.
- 2) Chen C, Gonzalez FJ, Idle JR: LC-MS-based metabolomics in drug metabolism, *Drug Metab Rev*, **39**: 581-597, 2007.
- 3) Yang C, Richardson AD, Osterman A, Smith JW: Profiling of central metabolism in human cancer cells by two-dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modeling, *Metabolomics*, **4**: 13-29, 2007.
- 4) Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH: A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer, *Anal Biochem*, **363**: 185-195, 2007.
- 5) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry, *J Proteome Res*, **2**: 488-494, 2003.
- 6) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption, *J Biol Chem*, **281**: 16768-16776, 2006.
- 7) Warburg O: On the origin of cancer cells, *Science*, **123**: 309-314, 1956.
- 8) Gambhir SS: Molecular imaging of cancer with positron emission tomography, *Nat Rev Cancer*, **2**: 683-693, 2002.
- 9) Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H: Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy, *Cancer Res*, **60**: 6201-6207, 2000.
- 10) Gatenby RA, Gillies RJ: A microenvironmental model of carcinogenesis, *Nat Rev Cancer*, **8**: 56-61, 2008.
- 11) Kita K, Shiomi K, Omura S: Advances in drug discovery and biochemical studies, *Trends Parasitol*, **23**: 223-229, 2007.
- 12) Esumi H, Lu J, Kurashima Y, Hanaoka T: