

用されている。

メタボローム測定の難しさ

解糖系、クエン酸回路などに代表される中心代謝の代謝中間体のほとんどは、リン酸基やカルボキシ基、アミノ基をもつイオン性化合物である(図1)。たとえば、大腸菌の場合は代謝物の約90%がイオン性化合物である。これらの代謝物の多くは、紫外吸収がなく不揮発性であり、物理的・化学的性質が類似しているものから、まったく異なる性質をもつものまでが混在する。このような性質をもつ化合物群を網羅的に測定できる分析法は存在せず、さらに細胞内に数百から数万種類の代謝物が存在することが、メタボローム測定をきわめて困難にしていた。

近年いくつかのメタボローム測定法が開発された。ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)法(文献1)は高感度、高分離能をもつ。しかし、GC/MS法によるメタボローム測定では誘導体化反応が必要であり、測定可能な代謝物は数百種類である。液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)法は(文献2)は、中性の代謝物や脂質の分析に適している。しかし、イオン性代謝物が保持されず最初に多くの物質が溶出するため、イオンサプレッション(夾雑物によってイオン化が抑制される現象)の影響を受けて定量性に乏しい。NMR法(文献3)は簡便であるが、感度が低い。どの方法も短所があり、決定的なメタボロームの測定技術は未だ開発されていない。

CE-MSによるメタボローム測定法

筆者らは、イオン性化合物に対して高い分離能を示すキャピラリー電気泳動(CE)と高感度、高選択検出器である質量分析計(MS)を組合わせたCE-MSによるメタボローム測定法を開発した(文献4)。測定原理を図2に示す。CE-MSに注入された各代謝物は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計で検出される。試料中の陽イオン性物質は陰極方向に、反対に陰イオン性物質は陽極方向に、その物質の電荷/水和イオン半径の比に基づく速度で移動し、キャピラリー出口に接続された質量分析計で選択的に検出される。現在は、飛行時間型質量分析計(TOFMS)をCEに接続させたCE-TOFMS法(文献5)によって、数千種類の代謝物のいっせいで分析が可能である。

がんの診断法の問題

がんを根治するためには、早期の段階でがんを発見し、全摘出することが必要である。しかし、早期のがんはほと

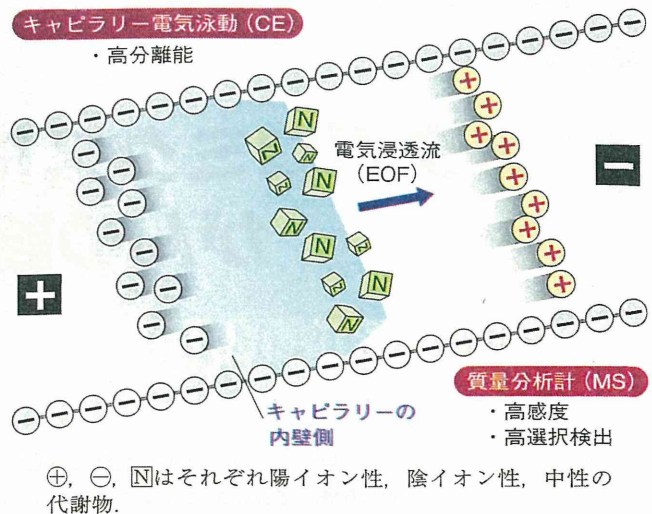
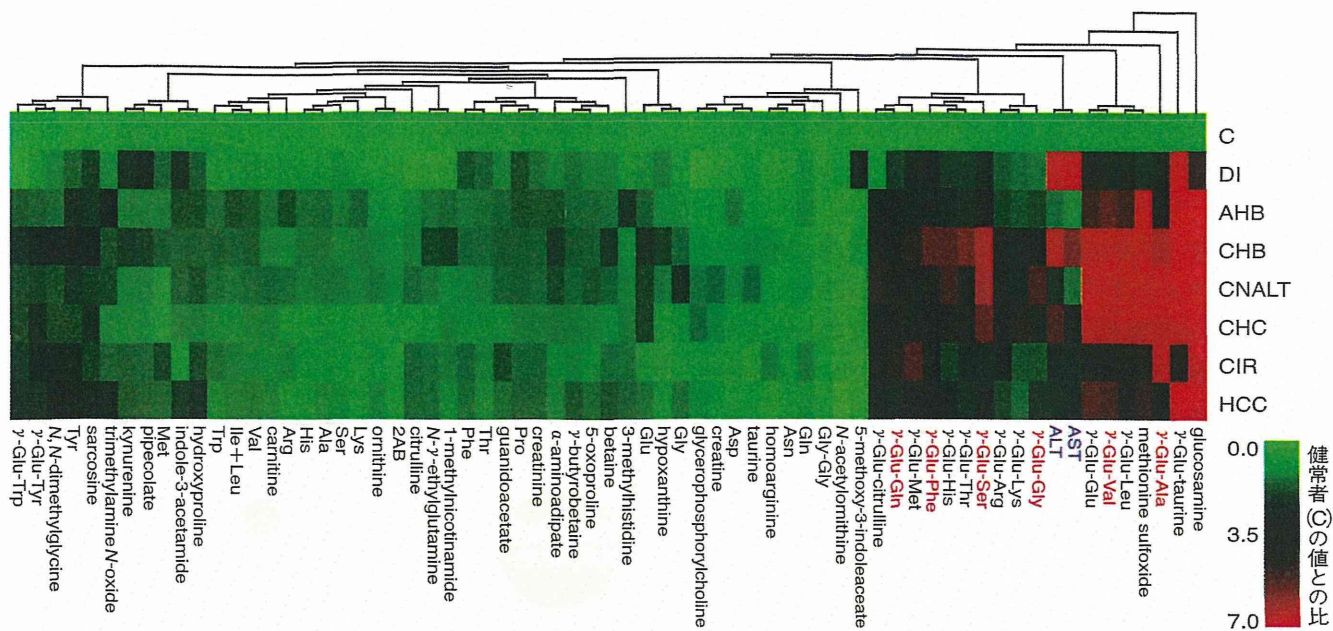


図2 キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるイオン性代謝物の測定方法

んどが無症状であり、症状が現れた際には治療が困難な場合が多い。現在がんの診断には、腫瘍マーカーや陽電子放射断層撮影法(PET)検査(文献6)が用いられる。しかし、既存の腫瘍マーカーの多くは、化学療法や放射線療法の治療効果を判断するために開発されたものであり、がんの早期診断を目的として確立されたものではない。一方、PET検査は、がん細胞がグルコースを活発に取込む性質を利用した画像診断法であり、大腸がんなどの診断には有効な手法である。しかし、胃がん、腎がん、膀胱がん、前立腺がん、肝細胞がんなどでは診断が困難であることが知られている。現在、各種のがんを早期に発見できる診断法はほとんど存在せず、低侵襲で精度の高い各種のがんの早期診断技術が待ち望まれている。筆者らは、各種のがん患者および非がん患者から採取された血液、尿、唾液などをCE-MSメタボロミクスを用いて網羅的に測定し、腫瘍マーカーの探索を精力的に行っている。成果の一部を紹介したい。

CE-MSメタボロミクスによる肝疾患の診断マーカー探索

肝炎ウイルスに感染した患者は、高い確率で慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんに進行する。肝疾患は症状もなく進行し、症状が現れたときは治療が手遅れになる場合も多く、疾患の進行度を簡便に診断できる方法が望まれている。筆者らは肝疾患の低分子診断マーカーを探索するために、山形大学医学部附属病院(試験コホート)および東京大学医学部附属病院(検証コホート)で得られた237例の各種肝疾患患者、薬剤性肝炎(DI)27例、B型肝炎持続性感染(AHB)16例、B型慢性肝炎(CHB)14例、C型肝炎持続性



C : 健常者, DI : 薬剤性肝炎, AHB : B型肝炎持続性感染, CHB : B型慢性肝炎, CNALT : C型肝炎持続性感染, CHC : C型慢性肝炎, CIR : C型肝炎肝硬変, HCC : C型肝炎細胞がん.

図3 各肝臓疾患患者の血清中の代謝物の濃度

感染 (CNALT) 18例, C型慢性肝炎 (CHC) 35例, C型肝炎肝硬変 (CIR) 18例, C型肝炎細胞がん (HCC) 32例および健常者 (C) 57例の血清中の代謝物をCE-TOFMSによって網羅的に測定した (文献7). 図3にヒートマップを作成したが, 各種の肝疾患で十数種類の γ -グルタミルジペプチド類 (γ -Glu-X; X=アミノ酸) が高値を示した. 図4に各

肝疾患のAST, ALT値と γ -グルタミルジペプチド類の濃度の箱ひげ図を示した. ASTとALTは現在の肝機能マーカーだが, B型やC型肝炎持続感染では, 健常者と有意な差はなかった. 一方, γ -グルタミルジペプチド類の多くは, 各種の肝疾患で有意に高い値を示した.

肝疾患で γ -グルタミルジペプチド類が血清中に増加す

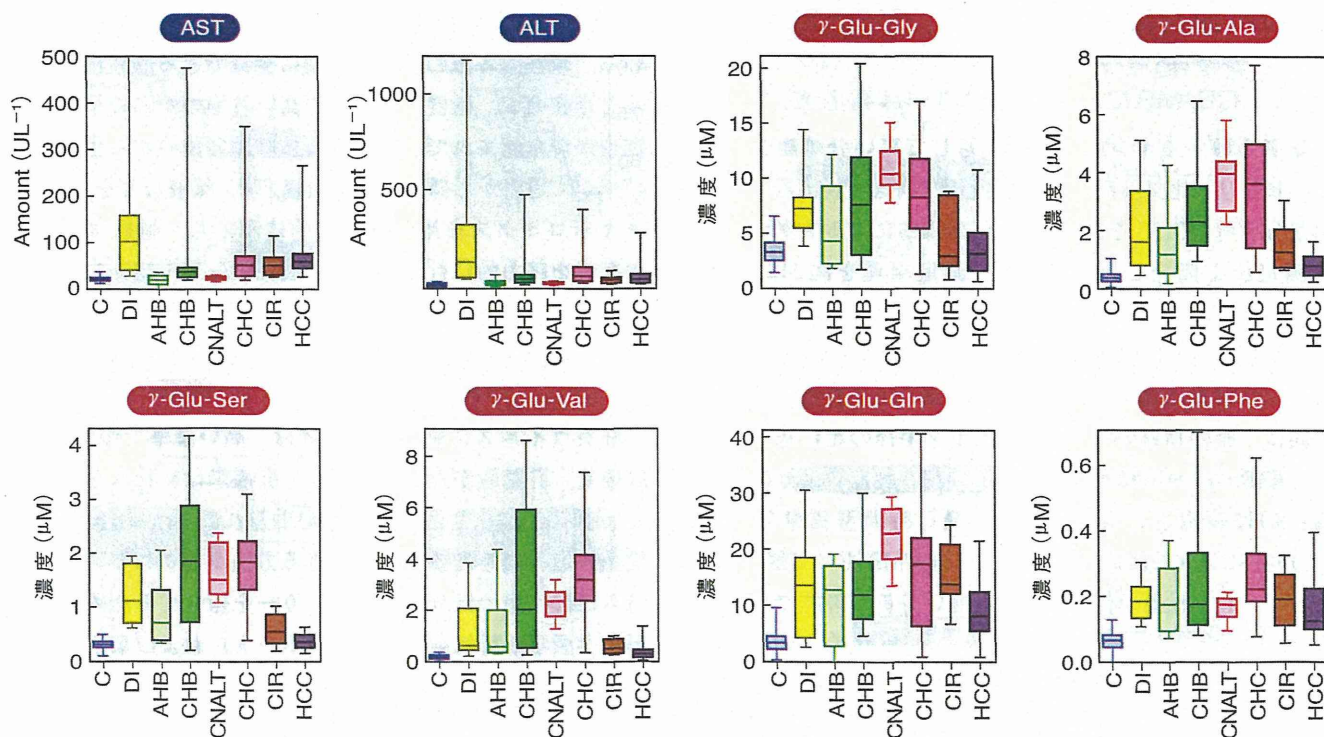
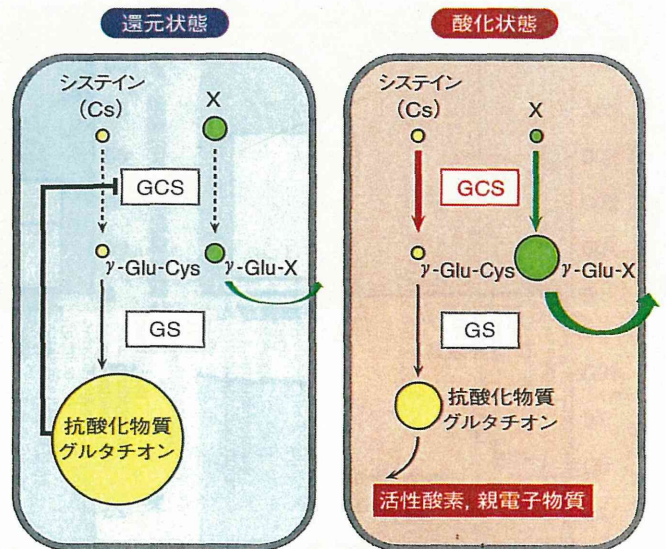


図4 各肝臓疾患患者の肝機能マーカー (AST, ALT) と血清中の γ -グルタミルジペプチド類の濃度

る機序も解明した(文献7)。もともと活性酸素種や親電子物質などの酸化ストレスが、肝疾患に深く関与していることが知られている。肝臓は酸化ストレスにさらされると、身を守るためにアミノ酸の一種システインから抗酸化物質であるグルタチオンを生合成する(図5)。筆者らは、このときに副産物として γ -グルタミルジペプチド類が多くのアミノ酸から生合成され、血中に輸送されることを見いだしたのである(図5)。

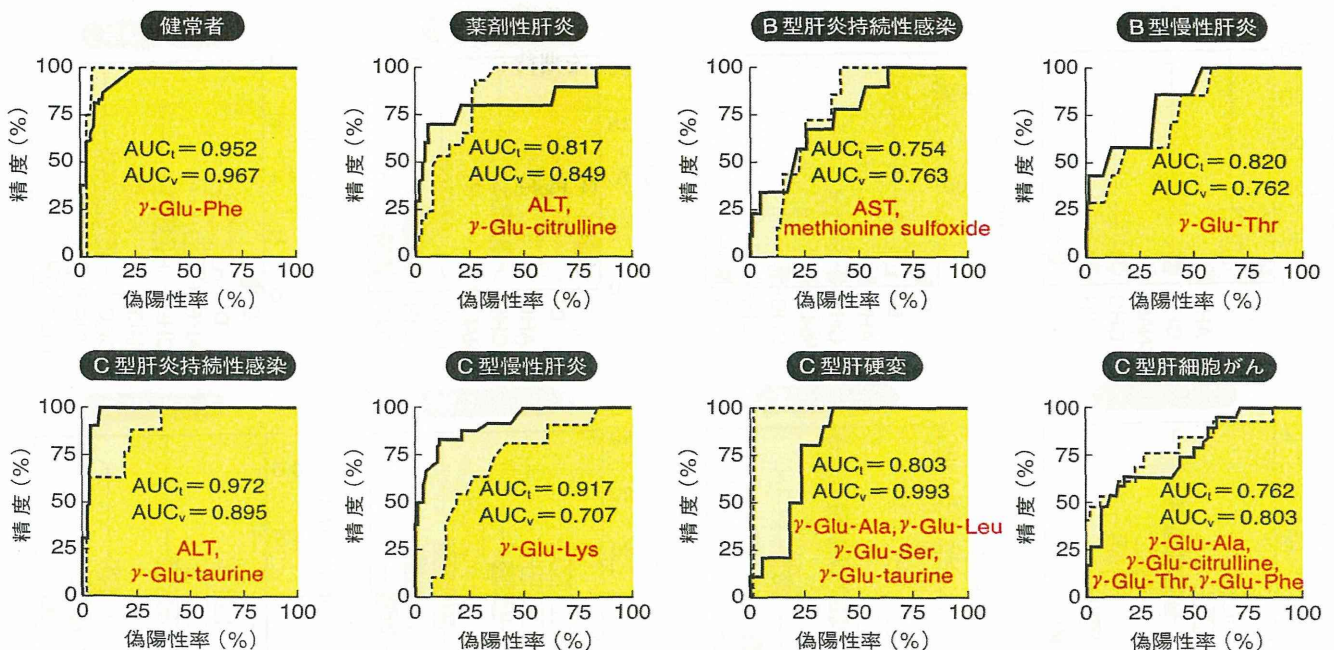
γ -グルタミルジペプチド類による 肝疾患スクリーニング

図4から、AST、ALTおよび γ -グルタミルジペプチド類は、肝疾患の種類に応じてそれぞれ特徴的な濃度で血清中に存在すること、不思議なことに、 γ -グルタミルジペプチド類の種類によって肝疾患に対する変動パターンが異なることがわかった。そこで、いくつかの物質を組み合わせれば各肝疾患を判別できるのではないかと考え、多変量解析の一つである多重ロジスティック回帰を用いて肝疾患を見分ける診断マーカーを探索した(図6)。診断マーカーの精度は、受信者動作特性(ROC)曲線以下の面積(AUC)で示される。たとえば、健常者を7種類の肝疾患患者から見分ける場合は、 γ -Glu-Pheの値を用いるとAUCは試験コホートで0.952、検証コホートで0.967と高い精度で健常者



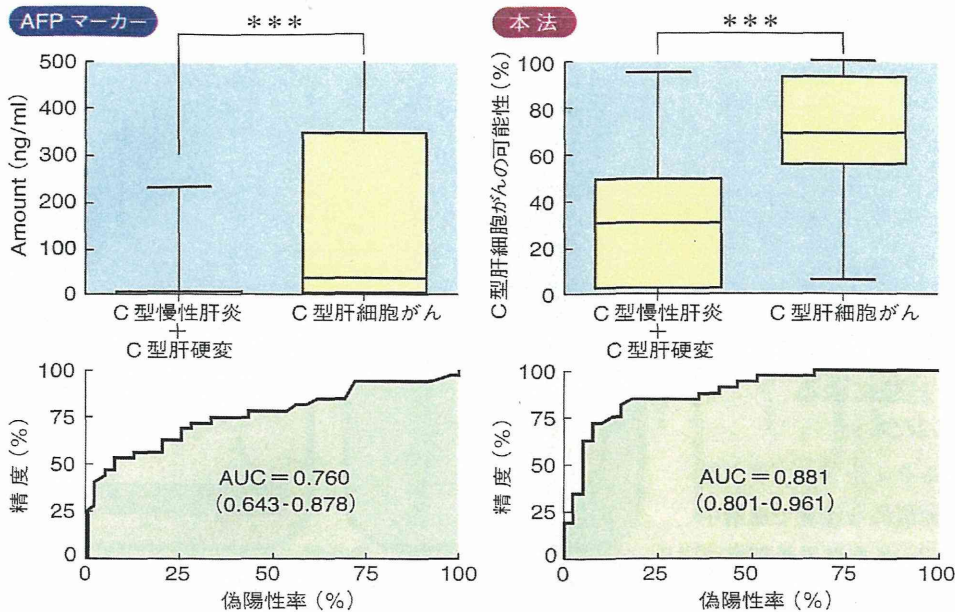
肝臓内の抗酸化物質であるグルタチオンは、システインから γ -グルタミルシステインシンセターゼ(GCS)とグルタチオンシンセターゼ(GS)によって生合成される。そのときに、多くの種類のアミノ酸やアミン(X)を基質としてGCSによって γ -グルタミルジペプチド類(γ -Glu-X)が生合成される。還元状態(健常者)では、肝臓内にグルタチオンが大量に存在するため、フィードバック制御を受けてGCSが抑制されている。しかし、酸化状態では、活性酸素や親電子物質を除去するためにグルタチオンが消費されると、GCSが活性化し、グルタチオンを生合成する。そのときにGCSによって γ -グルタミルジペプチド類が生合成され血中に輸送される。

図5 肝疾患で γ -グルタミルジペプチド類が生合成される機序



実線が試験コホート、点線が検証コホートのROC曲線。AUC_t、AUC_vは、それぞれ試験コホート、検証コホートのAUC値。グラフの中央下に色で示した代謝物をマーカーに用いて診断を行った。

図6 各肝疾患患者の受信者動作特性(ROC)曲線



C型の慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がん患者の中から、肝細胞がんの診断精度を既存の α -フェトプロテイン (AFP) 法と比較した。

図7 肝細胞がんの診断精度の比較

を診断できることがわかった (文献7)。C型肝細胞がんをそれ以外の6種類の肝疾患および健常者から見分ける場合は、4種類の γ -グルタミルジペプチドの値を用いると試験コホートで0.762、検証コホートで0.803の精度であった。ほかの肝疾患も、いくつかを組み合わせることで、高い精度ではほかの疾患と区別可能であった。

さらに本法によって、C型肝細胞がん患者をC型慢性肝炎、C型肝硬変患者からどのくらいの精度で見分けることができるか、既存の肝細胞がんマーカである α -フェトプロテイン (AFP) と比較した (図7)。AFP法でのAUC値は0.760であったが、本法では0.881であり、本マーカによる方法は、AFPよりも高い精度でC型肝細胞がんを慢性肝炎や肝硬変から見分けることができた (文献7)。

肝細胞がんの場合は、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんと進行するため、どの段階の肝疾患か診断が可能な本法を用いれば、肝細胞がんの早期予測も可能であるだろう。筆者らは、山形県鶴岡市でメタボロームコホート研究も開始しており、本法によって肝細胞がんを早期診断することができるか検証を行う予定である。

おわりに

メタボロミクスはまだ課題も多く、有望な腫瘍マーカーとしてせっかく検出されても同定できない代謝物が半数以上存在する。未知代謝物の特定以外にも、測定精度の向上、さらなる高感度化、ハイスループット化など、やり遂げなければならない課題も多い。今後、分析化学、有機化学、合成化学、生化学などを専門とする若手の研究者がこの研究分野に参入し、メタボローム解析がさらに発展することを期待したい。

参考文献

1. O. Fiehnほか, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157 (2000).
2. R. Plumbほか, *Analyst*, 128, 819 (2003).
3. N. V. Reo, *Drug Chem. Toxicol.*, 25, 375 (2002).
4. T. Sogaほか, *J. Proteome Res.*, 2, 488 (2003).
5. T. Sogaほか, *J. Biol. Chem.*, 281, 16768 (2006).
6. G. J. Cookほか, *J. Clin. Oncol.*, 16, 3375 (1998).
7. T. Sogaほか, *J. Hepatol.*, 55, 896 (2011).

