

腹水と血清中における代謝物質の網羅的分析による 子宮内膜症特異的な代謝物質の探索

- 1) 慶應義塾大学先端生命科学研究所
- 2) 同・環境情報学部
- 3) 同・医学部産婦人科学教室

川田 陽子^{1,2)}, 島田 友恵^{1,2)}, 浅田 弘法³⁾, 杉本 昌弘¹⁾, 平山 明由¹⁾
阿部しのぶ¹⁾, 古谷 正敬³⁾, 内田 浩³⁾, 浜谷 敏生³⁾, 梶谷 宇³⁾
丸山 哲夫³⁾, 久慈 直昭³⁾, 吉村 泰典³⁾, 曾我 朋義¹⁾, 富田 勝^{1,2)}

緒 言

子宮内膜症は、臨床的に内診所見、超音波検査やMRIによる画像、CA125などの腫瘍マーカーにより診断されているが、確定診断には腹腔鏡下手術を中心とした外科的診断が必要である。一方、子宮内膜症に対する薬物治療はNSAIDs、低容量ピル、GnRH製剤、プロゲステン製剤などが使用されている。これらの薬剤は治療効果または症状緩和効果が認められるものの、低容量ピル、NSAIDs以外の薬剤は、副作用という観点からも子宮内膜症の確定診断がなされずに使用されることは望ましくない。したがって外科的手段によらない子宮内膜症の診断、病勢評価の開発は重要な課題である。近年特定の病態に関わる代謝物質を網羅的に解析する手法がバイオマーカーの探索に応用されている。われわれは子宮内膜症病巣が腹腔内を中心に進展する傾向に着目し〔1〕、腹腔内の代謝環境が子宮内膜症細胞の増殖と維持を促進している可能性があるとして推測した。本研究では子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹水と血清を用い、メタボローム解析することで子宮内膜症に関連する腹腔内代謝環境を評価し、新たなバイオマーカー探索を目的として研究を行った。

対象と方法

1. 対象

本研究は、2008年4月～2008年11月までの間

に慶應義塾大学病院で腹腔鏡手術を行い、子宮内膜症の有無を診断した患者の腹水 (n=14) と血清 (n=5)、および非患者の腹水 (n=15) と血清 (n=5) を用いた。それぞれの血清5サンプルは、腹水サンプルのうちの5名と同一人物から蒐集したものである。患者のサンプルは revised American Society for Reproductive Medicine (rASRM) 分類の、stage III および stage IV に分類される比較的進行した患者サンプルを用いた。

2. 方法

キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析装置 (CE-TOFMS) と液体クロマトグラフィー時間飛行型質量分析装置 (LC-TOFMS) の技術を用い、質量分析から代謝物質を特定する網羅的なメタボローム測定と解析を行った〔2〕。

【CE-TOFMSによるイオン性代謝物質の網羅的測定】

CE-TOFMSによりイオン性の代謝物質を網羅的に測定した。用いたサンプルは子宮内膜症患者腹水 (n=5) と血清 (n=5)、非内膜症患者腹水 (n=5) と血清 (n=5) で、腹水と血清は同一人物から蒐集したものである。患者と非患者の腹水中の代謝物質どうし、および血清中のそれどうしの代謝物質濃度を比較した。

【LC-TOFMSによる中性代謝物質の網羅的測

定]

LC-TOFMS により CE-TOFMS では測定できない中性の代謝物質を網羅的に測定した。用いたサンプルは子宮内膜症患者腹水 (n=9) と非内膜症患者腹水 (n=10) である。CE-TOFMS とは異なったサンプルを使用し、患者と非患者の腹水中に含まれる代謝物質の濃度を比較した。

3. サンプル処理

【CE-TOFMS】

50 μ l の試料に対し、標準物質 (IS) となる 450 μ l の MeOH と 10 μ M の Methionine sulfone, D-Camphor-10-sulfonic acid, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 500 μ l の CHCl₃ と 200 μ l の脱イオン水を加え、遠心分離した。上清を取りカラム付きのチューブに入れ、再び遠心分離する。ろ液を遠心乾固させ、100 μ M の 3-Amino-pyrrolidine と Trimesate を含む 12.5 μ l の脱イオン水を加え CE-TOFMS の機械で測定を行った。

【LC-TOFMS】

腹水 100 μ L にアセトニトリル 900 μ L を加え、ボルテックスで混和し、5,000rpm, 4度で 5 分間遠心分離し、上清のみを採取した。さらに、濃縮遠心機にて採取した上清を乾固し、アセトニトリル 50 μ L で再溶解を行い、2 倍濃縮し、LC-TOFMS の機器で測定を行った。

4. メタボローム解析

データ解析は、内製ソフト MasterHands を用いて行った。本ソフトは、資料中の 1 代謝物質を 1 ピークとして検出し、その代謝物質の精密質量を電荷比で割った質量電荷比 (m/z) と移動時間、ピーク面積、ピーク面積を標準物質 (IS) の面積で補正したもの (RelArea), Intensity (ピークの高さ) などを知ることが可能である。検出した代謝物質のピークを患者と非患者で比較することで濃度差を知ることができる [3]。統計解析では、患者と非患者の比較においてはノンパラメトリックの Mann-Whitney の検定を用いた。測定した代謝物に関して、予め測定しておいたアミノ酸などを含む標準物質と

ピークが一致する物質は物質名を同定でき、一致しない物質は代謝物質のデータベースである KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [4] や HMDB (Human Metabolome DataBase) を用いて推定した。

成績

1. CE-TOFMS を用いたイオン性代謝物質の解析

CE-TOFMS を用いた腹水と血清の解析では、アミノ酸などのイオン性代謝物質を 95 物質検出できた。そのうち 14 物質の定量値が子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹水で統計的な有意差を認めた ($P < 0.05$; Mann-Whitney 検定)。14 代謝物質には Methionine や Serine, Tyrosine, Threonine, Arginine, Alanine, Proline, Glutamine などの解糖系周辺のアミノ酸や KEGG の Glutathione metabolism 代謝経路上にある 5-Oxoproline などがあり、どれも子宮内膜症患者の腹水において高濃度であることが明らかとなった。また、これらのアミノ酸のうち、Methionine と Tyrosine, Alanine と Proline に関しては、血清中においても子宮内膜症患者と非内膜症患者において有意差がみられ、患者の方が有意 ($P < 0.05$; Mann-Whitney 検定) に高濃度であった。

2. LC-TOFMS を用いた中性代謝物質の解析

また LC-TOFMS を用いた解析では、腹水中から 130 の中性代謝物質を検出することができた。そのうち子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の間で、8 つの物質に統計的な有意差が検出された (表 1)。物質名は推定であり、同定には至っていない。

考察

CE-TOFMS の解析については、アミノ酸において患者と非患者の腹水や血中の濃度に有意差がみられ、患者の方が腹水中にも血清中にも代謝物質が高濃度に存在することが明らかとなった。大腸癌細胞では、正常細胞と比較して、癌細胞でアミノ酸が高濃度に存在し、matrix metalloproteinase (MMP) による細胞外マトリックスの分解がアミノ酸濃度と関係している可能性が示唆されている [5]。ある種の MMP

表1 LC-TOFMSで患者と非患者で有意差のあった代謝物質

候補物質名	腹水： 患者／非患者の比率	P-value
282.1 <i>m/z</i>	3.173	$P < 0.05$
397.1 <i>m/z</i>	2.852	$P < 0.05$
399.2 <i>m/z</i>	2.602	$P < 0.05$
455.2 <i>m/z</i>	2.830	$P < 0.05$
483.2 <i>m/z</i>	3.470	$P < 0.05$
515.3 <i>m/z</i>	2.595	$P < 0.05$
541.3 <i>m/z</i>	2.599	$P < 0.05$
762.9 <i>m/z</i>	2.417	$P < 0.05$

P -value < 0.05 (Mann-Whitney)

未知物質は代謝物質の精密質量を電荷比で割った質量電荷比 m/z を記載している。

は子宮内膜症病巣においても高濃度に存在し、病巣の進行と関連していることが知られており〔6〕、子宮内膜症病巣に存在するMMPによるタンパク質分解が、腹水中の高濃度アミノ酸に関与している可能性がある。

また、Methionine, Tyrosine, Alanine と Proline の4つに関しては患者と非患者に有意差がみられ、かつ腹水と血清の両者において患者の方が高濃度という同じ傾向がみられ、非侵襲のバイオマーカーとして利用できる可能性も考えられる。しかし、今後の検討課題として、今回検出された患者特異的な代謝物質を多数症例においても評価する必要がある。

LC-TOFMSの中性代謝物質の解析では、唯一541.3*m/z*の物質がLysophosphatidylglycerolであると推定できた。この物質はリン脂質の一種で、ヒトの卵巣癌細胞において脂質リガンドとして働き、さまざまなシグナル分子を活性化している〔7〕。子宮内膜症においても患者特異的にシグナル分子の活性化により何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

CE-TOFMSやLC-TOFMSの手法を用いて、

複数の代謝物質を子宮内膜症患者特異的な物質として検出することが可能であった。これらの分子が、今後各種疾患の新たなバイオマーカー探索に有効である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金（生命システム情報領域、疼痛学）および山形研究費の助成を受けて実施されている。

文 献

- [1] Harada T et al. Increased interleukine-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 593-597
- [2] Soga T et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 2006; 281: 16768-16776
- [3] Sugimoto M et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2009; DOI 10: 1007/s11306-009-0178-y
- [4] Kanehisa M et al. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30
- [5] Hirayama A et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 2009; 69: 4918-4925
- [6] Gaetje R et al. Expression of membrane-type 5 matrix metalloproteinase in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23: 567-573
- [7] Park KS et al. Effect of lysophosphatidylglycerol on several signaling molecules in OVCAR-3 human ovarian cancer cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 675-681