

メタボローム解析技術の開発と今後の展望

大日本住友製薬(株) 薬物動態研究所 十 亀 祥 久
 安全性研究所 坂 東 清 子
 ゲノム科学研究所 村 山 一 久
 住友化学(株) 生物環境科学研究所 味 方 和 樹

はじめに

メタボロミクスは、ゲノミクス、プロテオミクスと同様、オミックス解析の1分野であり、2000年頃から注目され始めた比較的新しい研究分野である^{1),2)}。ゲノミクスが遺伝子、プロテオミクスがタンパク質を対象とするのに対して、メタボロミクスは内因性の低分子化合物(以下、代謝物)を対象としている(Fig. 1)。細胞内または生体内の代謝物を網羅的に解析するメタボローム技術は、医薬品、食品、環境など様々な分野で応用され始めている。メタボロミクスが他のオミックスと比べて有利な点は、ゲノミクスやプロテオミクスに比べて対象となる代謝物の数が少ないことがあげられる。また、低分子代謝物には種差がないこと、代謝物は最終の表現系なので病態と関連した分子が見つかりやすいとも言われている³⁾。ここ数年、メタボローム解析による疾患バイオマーカーの報告が増えてきており⁴⁾⁻⁶⁾、バイオマーカー探索の有用な手段として期待されている。しかし、その一方で、例えば試料の採取や処理方法、分析装置の選択、データ解析等において標準となる評価系は未だ確立されていない。

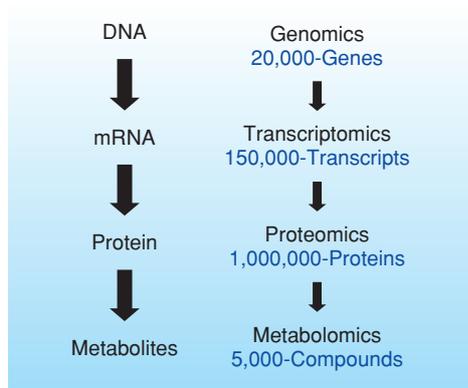


Fig. 1 Metabolomics is the omics approach that inspects the movement of endogenous metabolites comprehensively and searches for a toxicological mechanism or biomarker.

大日本住友製薬(株)と住友化学(株)は医薬品や農薬開発におけるメタボロミクスの応用を目的として、メタボロミクスの技術開発に共同で取り組み、社内における評価系を確立した。今回、その概要およびメタボローム解析の一例として、肝毒性物質(ヒドラジン)を投与したラット血漿の解析結果を紹介する。

メタボローム解析の概要

メタボローム解析は、主として質量分析計(MS)や¹H-NMR(核磁気共鳴法)による試料分析とそこで得られたデータ解析の2つの過程に分けられる。

以下、我々が実施したメタボローム解析の手順を記載する。

- ① 化合物の投与
- ② 試料(血漿や尿)の経時的な採取
- ③ LC-MSやGC-MSによる測定
- ④ データの変換
- ⑤ 主成分分析(PCA)などの多変量解析によるデータマイニング
- ⑥ 群間比較およびローディングプロットから指標となる代謝物の特定

なお、試料採取においては、摂食条件、採取の時刻や採取条件(温度)等により代謝物の質や量変動するため注意が必要である。

肝毒性の評価

肝毒性物質として知られており、メタボローム解析に関する報告があるヒドラジンを技術レベルの確認のため評価した。ラットにヒドラジンを120 mg/kgあるいは240 mg/kgで単回経口投与し、投与後24時間および48時間の試料(血漿、尿)を採取した。毒性評価の結果、120 mg/kg投与以上でタンパク質、脂質系パラメータが変動し、トランスアミナーゼの減少が認められた。病理組織学的検査では核の大小不同、脂肪変性、グリコーゲン蓄積などが認められた。毒性は投与

Table 1 Alterations in the parameters of blood biochemistry in rats treated with hydrazine

	24 hr			48 hr		
	Dose (mg/kg)			Dose (mg/kg)		
	0	120	240	0	120	240
AST (mg/dL)	67±10.6	27±5.5**	21±2.9**	78±36.4	60±10.3	41±11.4##
ALT (mg/dL)	25±2.4	18±2.1**	20±6.7	26±2.5	16±2.2##	18±5.2##
TP (g/dL)	5.0±0.12	4.9±0.12	4.5±0.23**	5.2±0.25	5.0±0.22	4.8±0.16##
TC (mg/dL)	68±8.7	49±9.8**	31±10.3**	70±8.7	65±8.0	43±16.3##
PL (mg/dL)	120±8.3	103±14.4*	77±18.0**	127±15.4	112±13.9	96±21.6##
TG (mg/dL)	53±23.0	29±11.4*	37±19.4	76±39.7	38±27.8#	23±8.4##

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, TP: total protein, TC: total cholesterol, PL: phospholipid, TG: triglyceride
 * : significantly different from the control group (24 hr) ($p < 0.05$), ** : significantly different from the control group (24 hr) ($p < 0.01$)
 # : significantly different from the control group (48 hr) ($p < 0.05$), ## : significantly different from the control group (48 hr) ($p < 0.01$)

Table 2 Treatment-related histopathological findings of the liver in rats treated with hydrazine

Histopathological findings	Groups	0 mg/kg		120 mg/kg		240 mg/kg	
		24 ^{a)}	48	24	48	24	48
Grade		8 ^{b)}	8	8	8	8	8
Fatty degeneration, midzonal							
Slight		0 ^{c)}	0	3	3	2	2
Mild		0	0	2	0	3	2
Moderate		0	0	0	0	1	1
Anisonucleosis							
Slight		0	0	1	0	5	2
Single cell necrosis							
Slight		0	0	2	0	2	2
Increase, Pas-positive granules, centrilobular							
Slight		0	0	3	0	3	3
Mild		0	0	0	0	0	2
No abnormality detected		8	8	2	5	0	0

a) Hours after dosing

b) Number of animals examined

c) Number of animals bearing the lesion

後24時間の方が強く表われ、48時間後には回復する傾向を示し、120 mg/kg投与後48時間では、ほとんど変化がなかった (Table 1 および Table 2)。

メタボローム解析

メタボロームの測定には、これまで¹H-NMRが用いられることが多かったが、我々は汎用性のあるLC-MSおよびGC-MSを用いた測定に取り組み、血漿や尿中の多数の内因性代謝物を一斉に測定できる方法を確立した。現在、LC-MSでは約500個、GC-MSでは約200個の標準物質を有しており、これらの代謝物を同定することが可能である。以下に、LC-MSによる血漿中代謝物を測定したときのメタボローム解析の結果を示

す。測定した代謝物データをPCAした結果、投与量に依存した動物群のクラス分けが認められた。120 mg/kg群は48時間でコントロール群の位置に近づいていることから、動物が薬物の影響から回復していると考えられた。一方、240 mg/kg群は48時間で回復傾向が認められたが、120 mg/kg群ほどの回復ではなかった。この結果は毒性評価の結果を反映するものであった (Fig. 2)。なお、GC-MSによる測定でも同様の結果が得られた。

次に、ヒドラジン投与群において、クラス分けに寄与する代謝物を調べたところ2-アミノアジピン酸、チロシン、シトルリン、クレアチン、β-アラニンをはじめとする複数の代謝物がクラス分けに寄与するもの

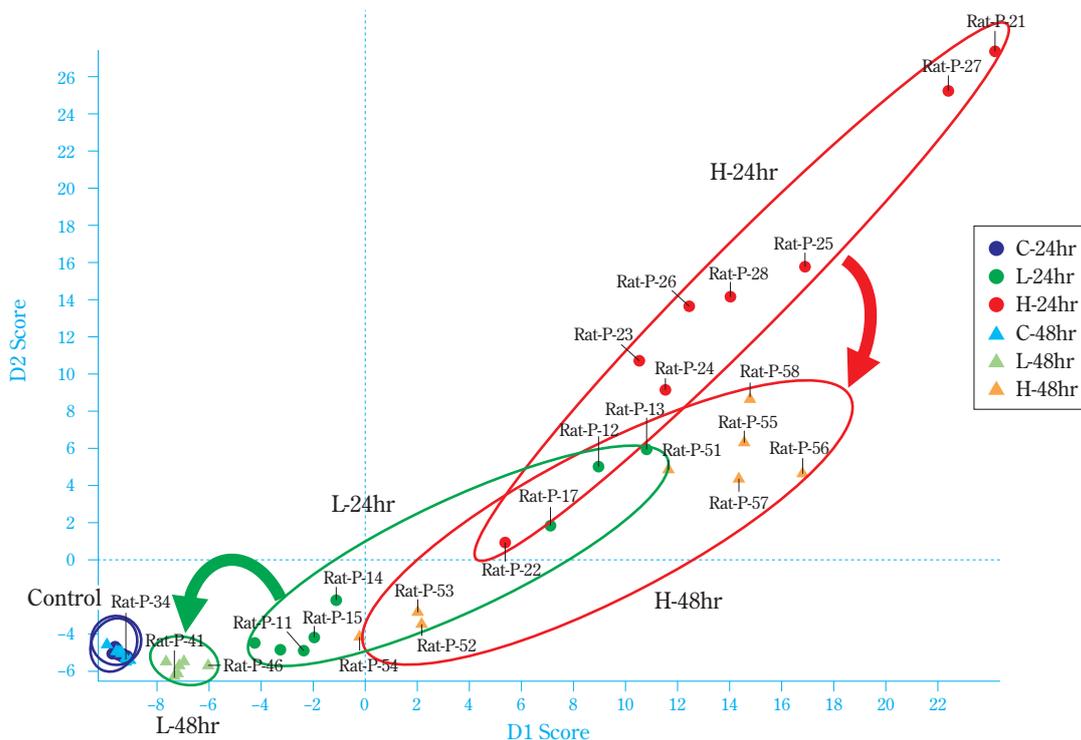


Fig. 2 Principal components analysis (PCA) scores plot of LC-MS spectra of plasma data from rats treated with hydrazine.

Key: L = low dose (120 mg/kg), H = high dose (240 mg/kg).

として認められた。これら代謝物の変動は、ヒドラジンが種々の代謝酵素の活性を変化させ、アミノ酸代謝やTCA回路、尿素回路の代謝に影響を与えたことにより毒性が惹起されたものと考えられた。変動した代謝物は、ヒドラジン投与による肝毒性を評価する際のバイオマーカー候補の可能性が示唆された。

我々が用いたLC-MSおよびGC-MSによる測定結果は、既に報告されている¹H-NMRによるものとよく一致し^{7,8)}、新たな変動を示した代謝物も複数観測されたことから、汎用性の高いLC-MSやGC-MSを用いたメタボローム解析が十分に利用できる技術であることが分かった。また、メタボローム解析は化学物質投与に関連するバイオマーカー探索や毒性メカニズムの解明に有用な手段であることが示された。

おわりに

メタボロミクスはバイオマーカー探索や毒性メカニズムの解明といった化学物質の生体への影響を評価する手段として実用化がすでに始まっている。他のオミックス評価（ゲノミクス、プロテオミクス）と組

み合わせることで、さらに有効な手段として活用できると考えられる。今後も継続的に最新の情報を収集しながら技術の更新に努めると共に、ノウハウを蓄積していくことが必要である。メタボロミクスを用いることにより、医薬品や農薬の研究開発の成功確度の向上に寄与することが期待される。

引用文献

- 1) J.K. Nicholson, J.C. Lindon, and E. Holmes, *Xenobiotica*, **29** (11), 1181 (1999).
- 2) D.G. Robertson, M.D. Reilly, R.E. Sigler, D.F. Wells, D.A. Paterson, and T.K. Braden, *Toxicol. Sci.*, **57**, 326 (2000).
- 3) 森田 宏俊, 老年精神医学雑誌, **20** (9), 953 (2009).
- 4) L.A. Paige, M.W. Mitchell, K.R.R. Krishnan, R. Kadurah-Daouk, and D.C. Steffens, *Int. J. Geriatr. Psychiatry.*, **22**, 418 (2007).
- 5) N. Greenberg, A. Grassano, M. Thambisetty, S. Lovestone, and C. Legido-Quigley, *Electrophoresis.*, **30** (7), 1235 (2009).

-
- 6) A. Sreekumar, L.M. Poisson, T.M. Rajendiran, A.P. Khan, Q.Cao, J. Yu, B. Laxman, B. Laxman, R. Mehra, R.J. Lonigro, Y. Li, M.K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G.S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D.C. Alexander, A. Berger, J.R. Shuster, J.T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, and A.M. Chinnaiyan, *Nature.*, **457**, 910 (2009).
- 7) A.W. Nicholls, E. Holmes, J.C. Lindon, J.P. Shockcor, R.D. Farrant, J.N. Haselden, S.L.P. Damment, C.J. Waterfield, and J.K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 975 (2001).
- 8) M.E. Bollard, H.C. Keun, O. Beckonert, T.M.D. Ebbels, H. Antti, A.W. Nicholls, J.P. Shockcor, G.H. Cantor, G. Stevens, J.C. Lindon, E. Holmes, and J.K. Nicholson, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**, 135 (2005).