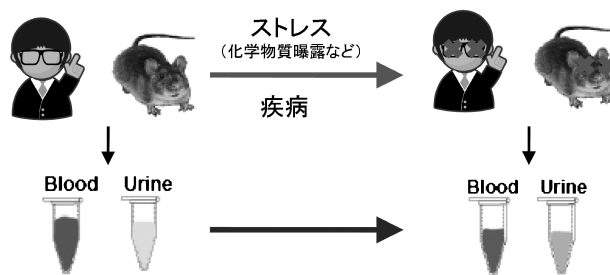


アドメノート

実験材料及び評価系開発の最近の動向(第5回):
質量分析装置を用いた薬物動態研究の新たな展開
医学・薬学研究におけるメタボロミクスの可能性

米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)
松原 勤



生理状態の変化が代謝産物に反映

図1 メタボロミクスの理念



1. はじめに

メタボロミクス(Metabolomics)は、細胞の活動によって生じる特異的な代謝産物を網羅的に解析する研究であり、メタボローム(Metabolome; 代謝産物群)が生物の生理状態の全貌を映すという理念の下にある(図1)。現在行われているメタボロミクスは、検出されるメタボロームが試料からの抽出法や代謝物の分析法に影響されるため、その代謝産物変化の一部を観察しているにすぎない。細胞や組織標本のメタボロームを直接的に解析する方法が開発されているが、その手法は、感度ならびに定量的再現性が乏しく、一般的に汎用される精度に至っていない。このように、メタボロミクスは、まだ発展途上にあるものの、他の網羅的解析、トランスクリプトミクス(Transcriptomics)ならびにプロテオミクス(Proteomics)と同様に、生命活動の変化を測定する手法の一つとして確立されつつある。メタボロミクスの成熟は、医学・薬学研究のみならず多くの研究分野の革新的発展をもたらすと期待されている。

2. バイオマーカー探索のメタボロミクス

メタボロミクスは、細胞や組織などの数千の低分子を評価する事で生化学的現象を捉え、その現象の代謝的特徴(Metabolic signature)を定義する学問でもあり、疾病診断マーカー探索に応用されている。特に、尿や血液といった非侵襲試料を用いた研究は臨床応用が容易であるため、それらのメタボロームが解析されている。

一般的なバイオマーカー探索の行程を図2に示した。試料は、検出法(UPLC-ESI-TOFMSやGC-MSやNMR等)に適した方法で抽出され、分析される。次に得られたデータを統計学解析によって、グループ化し特徴的变化を呈したイオン(代謝産物; バイオマーカー候補)を絞り込む。そのイオン(代謝産物)の同定ならびに定量を行い代謝

的特徴の決定し、バイオマーカーになり得るか否かを判断する。バイオマーカーの同定に、The METLIN Metabolite Database (<http://www.scripps.edu>)や The Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>)といったデータベースは利便性が高く汎用されている。詳細は、文献¹⁻³⁾を参考にして頂きたい。こうして決定された代謝的特徴をもとに Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)のようなゲノムデータベースと比較検討し、その分子機序の推定を行う。筆者も、疾病モデルマウスを用いて、胆汁うっ滞⁴⁾や脂肪肝炎(2011年10月時点査読中)の代謝的特徴を定義し、それらの疾病診断バイオマーカー候補を報告した。

ヒト試料を用いた新規疾病診断マーカーの探索も幅広く行われているが⁵⁻⁸⁾、疾病の分子機序と結びついた研究は少ない。今後、疾病モデル動物のメタボロームとヒトのメタボロームの統合解析が必要と考えられる。

3. 新規薬物代謝経路探索のメタボロミクス

薬物代謝経路の理解にもメタボロミクスが汎用されている。メタボロミクスで多くの研究成果を報告している Frank J. Gonzalez 博士研究室(Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute, National Institutes of Health)では、疾病の分子機序の理解や新規診断マーカーの探索のみならず、ファーマコメタボロミクス(Pharmacometabolomics)を含めた Xenobiotic metabolomics にも着目している。メタボロミクスの特性を活かして、シクロフォスファミドならびにイソフォスファミドの新規代謝物の発見⁹⁾、また遺伝子改変マウスと組み合わせてメラトニンの主要代謝経路の同定に成功している¹⁰⁾。さらに、同研究室では、安定同位体重水素ラベルを使って、投与した化合物の尿中代謝産物の同定を効率よく行っている。対照ならびに薬物 A、重水素ラベルされた薬物 A(薬物 a)を投与したマウスの尿を回収し、UPLC-ESI-TOFMS を用いて解析した代謝産物データの主要成分分析をした結果、その Loading plot は Y 字型を示した(図3)。薬物 A とその代

2012年1月以降の連絡先
大阪市立大学大学院医学研究科 機能細胞形態学講座
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

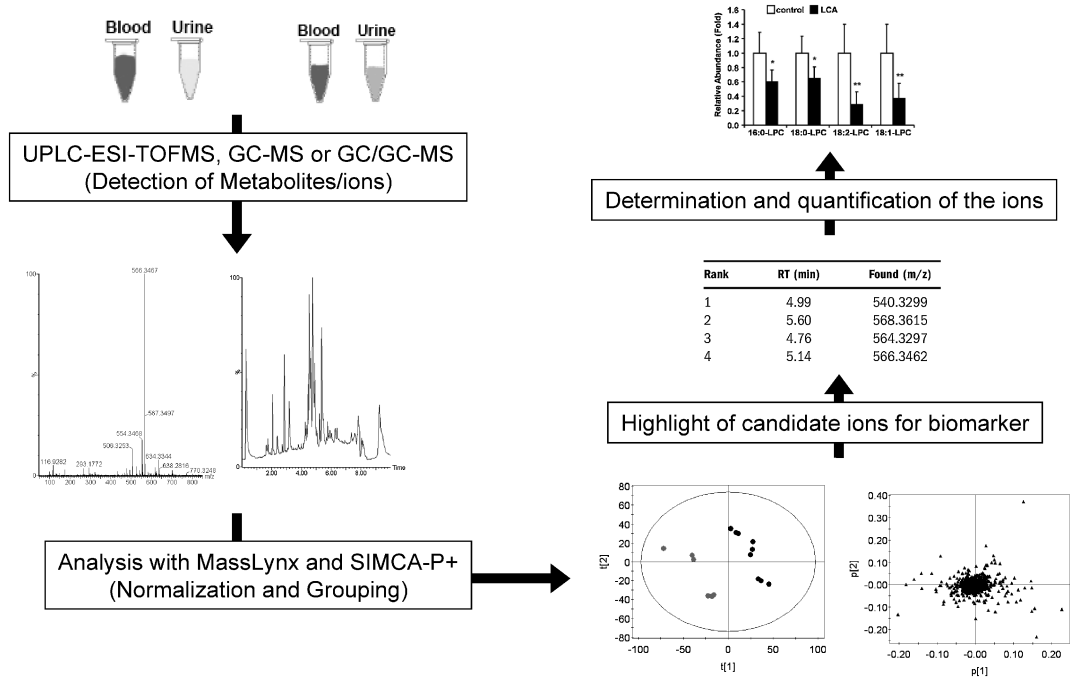


図2 メタボローム解析のフローチャート

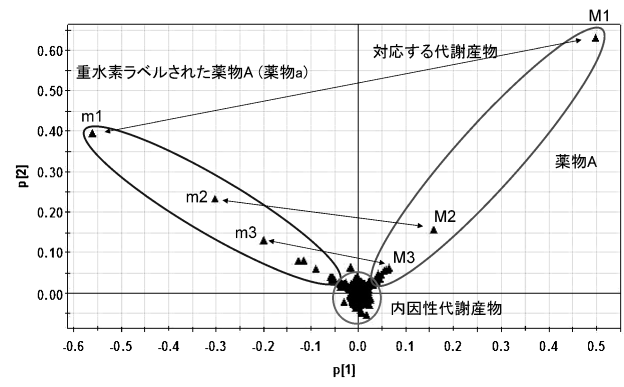


図3 重水素ラベルを用いた新規代謝産物の同定

代謝物 (M1-M3, 赤の円) が右の方に、一方、薬物 a とその代謝物 (m1-m3, 青の円) が左の方に分布され、実験系に重水素ラベルした薬物投与群を加えることで、薬物代謝物の同定が比較的容易に行える。重水素ラベルは、非酵素学的反応で水素原子置換を起こす問題はあるものの、新規代謝経路を同定する強力な手法である。さらに、Cytochrome P450 のヒト化動物を使用することで、分布を考慮した代謝・排泄経路の同定が可能となり、代謝系の種差も克服できる。メタボロミクスは、新規薬物代謝経路の発見に有用であり、吸収、分布や排泄を含め、薬物動態を理解するための手段として最適である。

4. 薬効・毒性評価におけるメタボロミクス

血中薬物濃度と薬理効果ならびに毒性発現は相関しないことがあるため、新薬開発において毒性評価マーカーや薬効評価マーカーが求められている。医薬品開発の前臨床試験でメタボロミクスが使われ始めているが、その適応範囲は小さい。メタボロミクスを用いた毒性評価マーカー探索は確立した毒性指標が多くあるのでそれほど難しくないと予想されるが、そのメタボロームには直接作用ならびに代償作用が反映されることを考慮する必要がある。薬物(化合物)曝露後のメタボロームの経時変化を調べるとともに、代表的なパラメーター(血清 ALT や ALP 活性など)ならびに病理診断との比較検討によって、慎重に見極める必要がある(図4に例示)。

一方、薬効評価マーカーは、効率の良い医薬品開発を促す。しかし、薬理効果における代謝産物の変化と薬物代謝・排泄などによる代償的代謝産物の変化を明確に区分できていない現在、有用性の高い薬効評価マーカーの同定は難しい。その上、疾病の代謝的特徴の理解は十分と云えず、メタボロミクスによる薬効評価マーカー探索が活発に行われるには、しばらく時間がかかるかもしれない。現時点での薬効評価は、診断パラメーターの変化を指標にせざるを得ないと思われる。

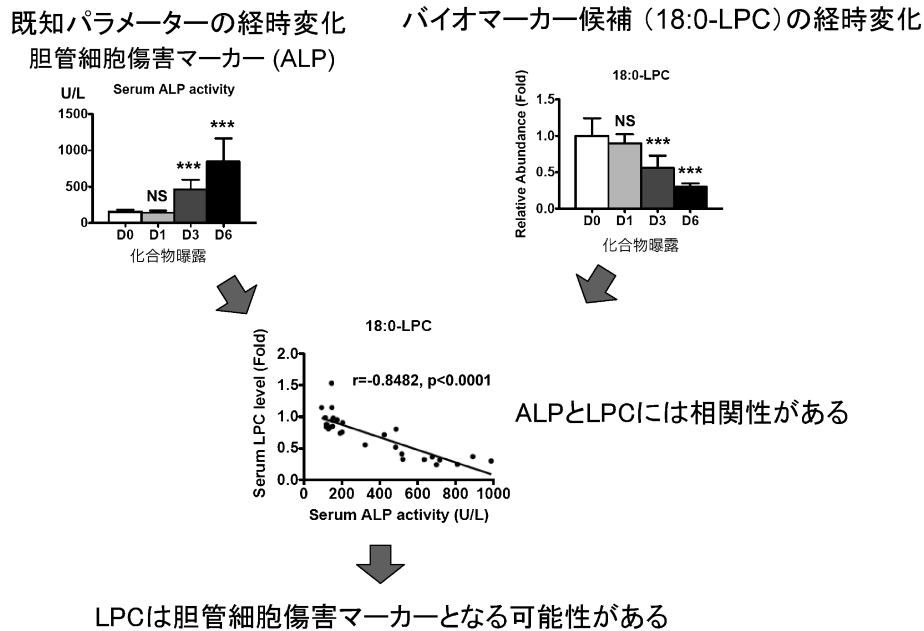


図4 既知マーカーとバイオマーカー候補の比較検討例

5. メタボロミクスの今後

メタボロームには、トランスクリプトーム(Transcriptome; 転写産物群)やプロテオーム(Proteome; 翻訳産物群)と異なり、外来異物の曝露を含めた環境因子によって質的变化をもたらされる欠点があることを忘れてはならない。モデル動物研究では、成分調整食を与え飼育環境を整える事によって外来異物の影響を比較的容易に除ける。しかしながら、臨床応用研究では、外来異物の影響を除く事は、ほぼ不可能である。薬物や公害物質、食品添加物を含めた数百万の外来異物に曝露される可能性があり¹⁾、臨床応用研究でバイオマーカー候補から外来異物を的確かつ解析早期に排除可能になることが今後の課題である。近年、ヒト血清中内因性代謝産物群が報告され¹¹⁾、その情報がデータベース The Serum Metabolome Database (<http://www.serummetabolome.ca>)に公開された。今後、ヒト尿中内因性代謝物のデータベースができ、その問題点が解消されるかもしれない。

メタボロミクスは、その代謝的特徴の決定に加え、疾病、薬物動態ならびに毒性発現の分子機序の理解に役立つ、生理現象を非侵襲的に観察できるツールである。近い将来、様々な代謝的特徴が決定し、疾病、薬物動態ならびに毒性発現の知見が統合され、ファーマコメタボロミクスとファーマコジェノミクス(Pharmacogenomics)を融合させたバイオインフォマティクス(Bioinformatics)が確立されるだろう。メタボロミクスを中心とした疾病の予測・診断・治療、医薬品開発ならびに薬効・毒性発現の個人差予

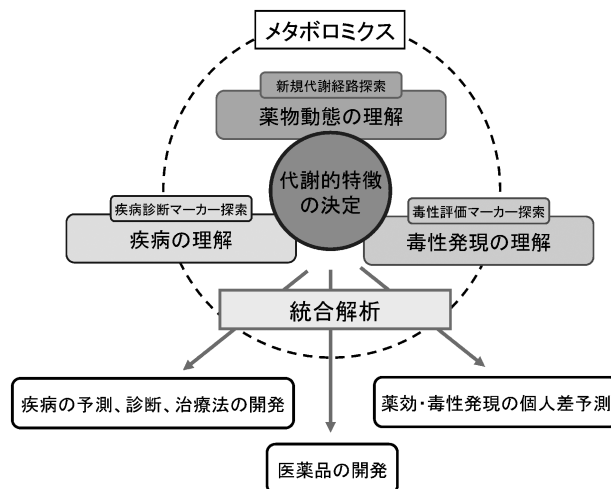


図5 メタボロミクスの展望

測が行われる時代が幕開けし(図5)、現在と様相の異なる医学・薬学研究が展開される日は、そう遠くはない。

謝辞

この総説は、Frank J. Gonzalez 博士ならびに Andrew D. Patterson 博士(National Cancer Institute, NIH, 現 The Pennsylvania State University)の協力のもと、筆者が日本学術振興会海外特別研究員(NIH)の時に執筆されたものである。Frank J. Gonzalez 博士ならびに Andrew D. Patterson 博士に深く感謝します。

参考文献

- 1) Idle, J. R. and Gonzalez, F. J.: Metabolomics. *Cell Metab.*, **6**: 348–351 (2007).
- 2) Johnson, C. H., Patterson, A. D., Idle, J.R. and Gonzalez, F. J.: Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2011).
- 3) Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S. and Weinshilboum, R. M.: Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **48**: 653–683 (2008).
- 4) Matsubara, T., Tanaka, N., Patterson, A. D., Cho, J. Y., Krausz, K. W. and Gonzalez, F. J.: Lithocholic acid disrupts phospholipid and sphingolipid homeostasis leading to cholestasis in mice. *Hepatology*, **53**: 1282–1293 (2011).
- 5) Chen, T., Xie, G., Wang, X., Fan, J., Qiu, Y., Zheng, X., *et al.*: Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Proteomics*, **10**: M110 004945 (2011).
- 6) Chen, J., Zhang, X., Cao, R., Lu, X., Zhao, S., Fekete, A., *et al.*: Serum 27-nor-5beta-cholestane-3,7,12,24,25 pentol glucuronide discovered by metabolomics as potential diagnostic biomarker for epithelium ovarian cancer. *J. Proteome Res.*, **10**: 2625–2632 (2011).
- 7) Ikeda, A., Nishiumi, S., Shinohara, M., Yoshie, T., Hatano, N., Okuno, T., *et al.*: Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomed. Chromatogr.* (2011).
- 8) Wen, H., Yoo, S. S., Kang, J., Kim, H. G., Park, J. S., Jeong, S., *et al.*: A new NMR-based metabolomics approach for the diagnosis of biliary tract cancer. *J. Hepatol.*, **52**: 228–233.
- 9) Li, F., Patterson, A. D., Hofer, C. C., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J. and Idle, J. R.: Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC–ESI–QTOFMS–based metabolomics. *Biochem. Pharmacol.*, **80**: 1063–1074 (2010).
- 10) Ma, X., Chen, C., Krausz, K. W., Idle, J. R. and Gonzalez, F. J.: A metabolomic perspective of melatonin metabolism in the mouse. *Endocrinology*, **149**: 1869–1879 (2008).
- 11) Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., *et al.*: The human serum metabolome. *PLoS ONE*, **6**: e16957 (2011).