

研究助成題目：シングルセルメタボローム解析によるがん代謝研究

九州大学生体防御医学研究所 和泉自泰

研究成果の概要

メタボロミクスは、ゲノム情報の実行部隊であるタンパク質 (酵素) に基づく低分子化合物の化学変化を包括的に捉えたものであり、ゲノム情報に最も隣接した高解像度表現型解析手段である。従来のメタボローム解析は、技術的限界から、細胞集団 (10^5 - 10^7 cells) ごとの分析が主であり、「時間および空間で平均した細胞の応答」を観測してきた。近年、次世代シーケンサーの技術革新に伴い、1 細胞レベルでゲノム、エピゲノムおよびトランスクリプトーム情報の取得が可能となり、細胞周期、細胞老化、確率論的分布などの要因で生命システムには多種多様な個性を持つ細胞が不均一に存在することが明らかになってきた。また、がんにおいては、血液中に存在する循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC) が転移に、組織中のがん幹細胞 (cancer stem cell, CSC) は、治療耐性および薬剤耐性に関連していると考えられている。このような特徴ある細胞は、存在量がわずかであるため、血液や腫瘍組織のバルク分析では CTC や CSC と他のがん細胞との違いを明らかにできない。そのため、単一細胞解析は、がんの転移メカニズムの解明や、新しい治療戦略の開発への応用が期待されている。一方、メタボロミクスは質量分析 (mass spectrometry, MS) の技術革新の恩恵を受け発展してきた学問領域である。代謝物は、生命システムを理解するための重要分子であると同時にゲノム情報の実行の結果、すなわち高解像度のフェノタイプとしても捉えることができる。しかし、メタボローム解析は、核酸増幅法 (polymerase chain reaction, PCR) のような観測対象物の増幅操作ができないため、細胞内に存在する膨大な種類の分子種をそのまま検出する必要がある。そのため、1 細胞中のメタボローム情報を取得するためには、分析システムのさらなる高感度化および周辺技術の発展が必要不可欠である。

がん細胞では古くからワールブルク効果に代表される特別のエネルギー代謝機構が存在することが知られているものの、その全貌は未だ明らかにされていない。近年、九州大学生体防御医学研究所の中山敬一教授、新潟大学大学院医歯学総合研究科の松本雅記教授らとの共同研究を通じて、申請者らは安定同位体標識グルタミンを用いたバルクスケールのがん細胞株のメタボローム解析を行うことで、悪性のがんではグルタミン由来の窒素を DNA の合成に利用するための代謝系が亢進していることを明らかにした (Kodama et al., *Nat Commun.* 2020)。さらに、申請者らは一般的な動物 1 細胞からのメタボローム解析を可能にするために、(1) 顕微鏡下で標的とする細胞を迅速に単離する技術、(2) サンプルロスを抑減させるための微小空間内での前処理技術、(3) ナノフロー液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (Nano-LC/MS/MS) による高感度メタボローム分析法、(4) 微量試料を分析系に

導入する技術の開発を行ってきた。実際に、開発した 1 細胞メタボローム分析法を用いることで、ヒト頸がん由来細胞 (HeLa 細胞) のシングルセルから、18 種の親水性代謝物の検出に成功した。さらに、培養した HeLa 細胞集団から取り出した 22 個の単一 HeLa を分析して得られた代謝物ピークエリアを用いて階層的クラスター分析を行った結果、細胞の間に、代謝レベルで一定の類似度を示すサブクラスが複数存在することを世界で初めて示した (Naktani et al., *Mass Spectrom.* 2020)。しかしながら、現状の分析システムでは 1 細胞から検出できる代謝物数はわずかであり、がん細胞特異的な代謝機構を紐解くためには、観測可能な代謝物の網羅性および分析システムのさらなる高感度化が必要である。そこで本研究では、「ライブセルイメージング」×「1 細胞サンプリング技術」×「超高感メタボローム解析」を融合した 1 細胞レベルでの代謝機能を網羅的かつ定量的に数値化するための基盤技術を世界に先駆けて創生することを目的とした。

はじめに、1 細胞試料から代謝物を包括的に観測するために、1~3 級アミンおよび 4 級アンモニウム基を修飾したメタクリレートポリマー粒子を設計し、親水性相互作用と陰イオン交換作用を連続的に組み合わせた親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析法 (unified hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography tandem mass spectrometry, unified HILIC/AEX/MS/MS) の開発に取り組んだ (昭和電工マテリアルズ・テクノサービス株式会社との共同開発)。陽イオン性 (ヌクレオシド、核酸塩基、アミノ酸)、陰イオン性 (有機酸、糖リン酸、ヌクレオチド、補酵素) の代表的な代謝物を選定し、各種分離条件に対する保持挙動の変化を調査した結果、(1) 本カラムは陰イオン性化合物に対して非常に強い保持を示すこと、(2) 水系移動相の重炭酸アンモニウム濃度の増加あるいは pH を塩基性に寄せることで、保持の強い陰イオン性化合物の溶出が早まること、(3) 陽イオン性化合物の $\log P_{ow}$ と保持時間の間には強い相関があることが分かった。さらに、陽イオン性代謝物は、HILIC による分離モードによって溶出し、その後、AEX による分離モードによって陰イオン性代謝物が分離・溶出することを見出した。本手法は、ポリマー粒子系アミノカラムにおいて移動相 pH を塩基性に調整し、添加剤の種類と濃度およびグラジエント条件を最適化することで、HILIC と AEX の分離モードが段階的に働く新しいクロマト分離モードであると結論づけた。さらに、開発した充填剤を基に nano-LC カラムを作製することで高感度かつ網羅的な 1 細胞メタボローム分析法の確立に成功した。現在、細胞周期の進行をリアルタイムに観察可能な Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) HeLa 細胞を使用して、がん細胞における細胞周期ごとの代謝物の包括的かつ定量的な情報の取得を行っている。

本研究では、「ライブセルイメージング」×「1 細胞サンプリング技術」×「超高感メタボローム解析」を融合したシングルセルメタボローム解析技術の開発を行った。今後、これらの技術を基盤とした解析により、がん細胞の代謝の理解を深め、がんの治療戦略および新たな疾患バイオマーカー候補化合物の発見に貢献したい。