



2013年 6月 25日 筑波分子医学協会 様

See the future in Metabolomics

through our CE-MS

メタボロミクスをはじめよう

印刷用1

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社
技術開発本部 大賀拓史

Human Metabolome Technologies, Inc.

E-130223

今日のトピックス

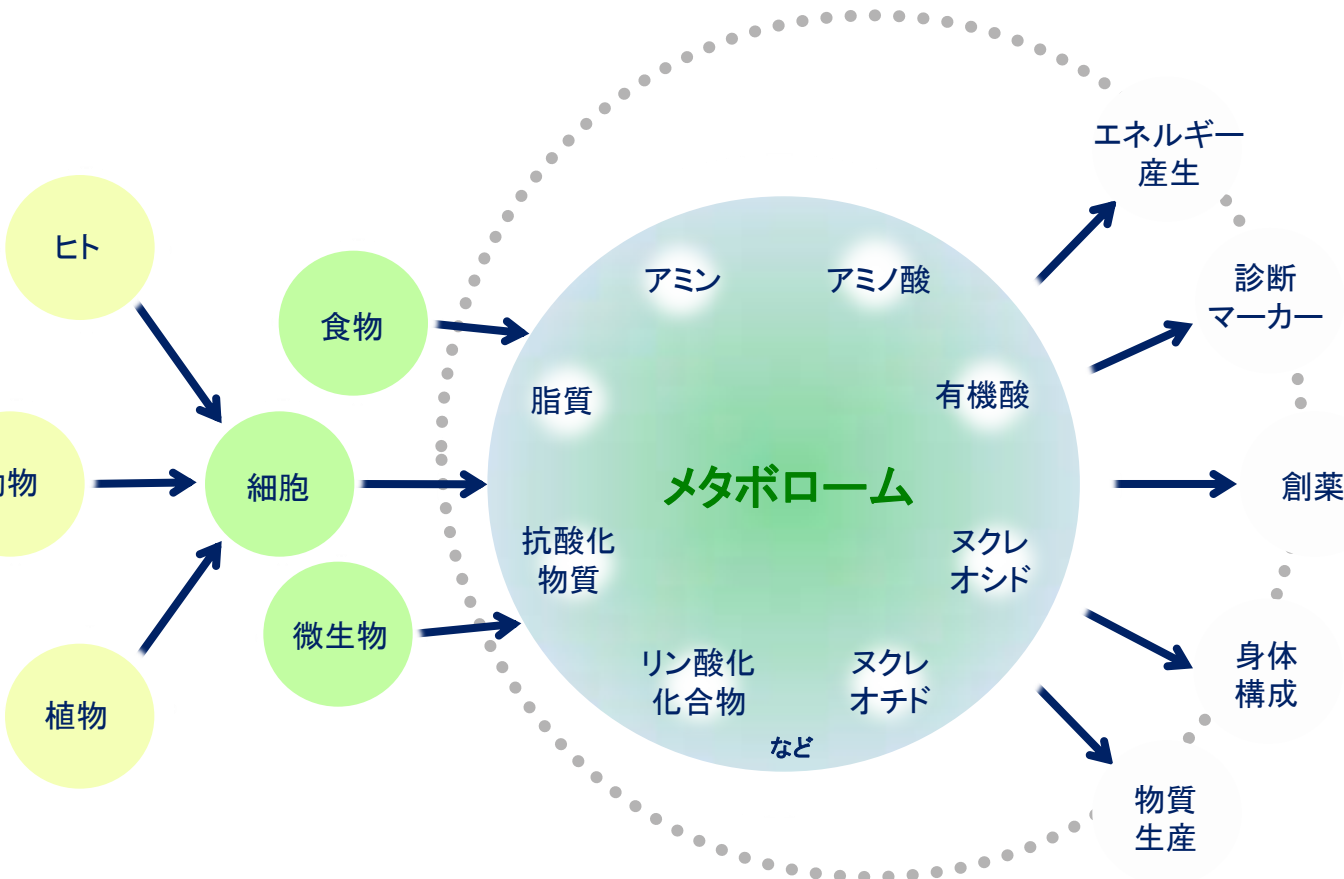
- メタボロミクス総説
- メタボローム解析ソリューションのご紹介
- 疾患メタボロミクスの応用例
 - 大うつ病の診断バイオマーカーの探索
 - がん組織の代謝プロファイリング
 - 高脂血症モデル動物の代謝異常の解析
- メタボローム研究の組み立て方(論文にするには?)
- 質問コーナー



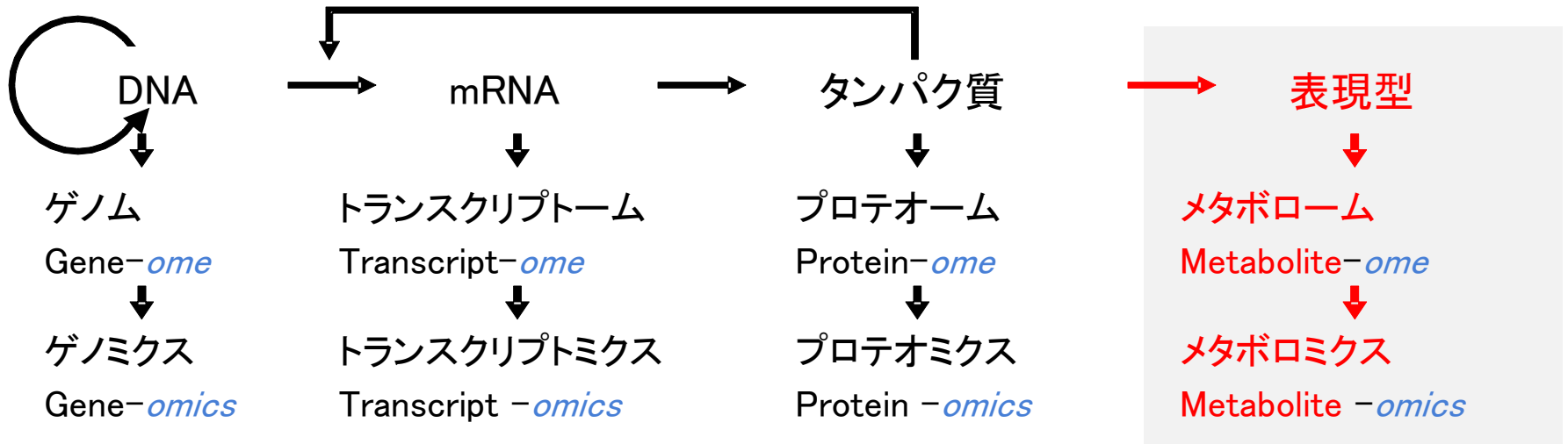
メタボロームとは？

メタボローム

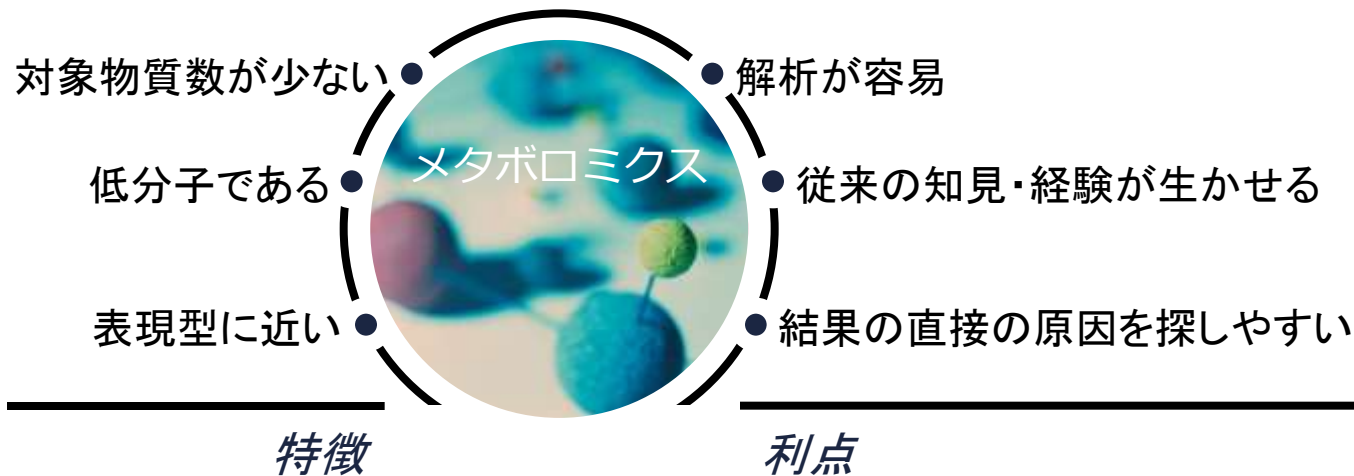
動物・植物が自ら作り出す低分子(質量1000以下、脂肪酸、アミノ酸など)の化学物質



メタボロームとは？



セントラルドグマの次を調べるために新しいオミクスとしてメタボロミクスが興った



最新のメタボロミクス国際情勢

NORTH AMERICA

Dr. E. C. Soo, NRC-Inst. Marine Biosci., CANADA
Prof. P. Britz-McKibbin, McMaster Univ., CANADA

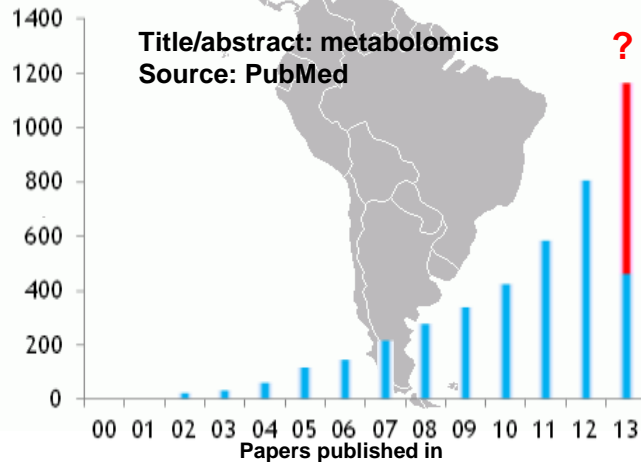
Prof. J. D. Keasling, Univ. California, Berkley, USA
Prof. J. Smith, Southeastern Oklahoma State Univ., USA
Prof. R. T. Kennedy, Univ. Michigan, Ann Arbor, USA
Prof. B. O. Palsson, Univ. California, San Diego, USA

EUROPE

Prof. P. J. Oefner, Univ. Regensburg, GERMANY
Prof. A. Polettini, Univ. Verona, ITALY
Prof. J. Bergquist, Uppsala Univ., SWEDEN

ASIA & Japan

Prof. T. Soga, M. Tomita, Keio Univ., JAPAN
Prof. M. Suematsu, Keio Univ., JAPAN
Prof. Y. Tanigawara, Keio Univ., JAPAN
Drs. R. Rakwal & H. Iwahashi, Nat. Inst. Adv. Ind. Sci. Tech., JAPAN
Prof. E. Fukusaki, Osaka Univ., JAPAN
Dr. Y. Ohashi, Human Metabolome Tech., Inc., JAPAN
Prof. K. Saito, Chiba Univ. & RIKEN, JAPAN
Dr. S. Yoshida, Kirin Holdings, Co. Ltd., JAPAN
Dr. K. Matsuno, Ajinomoto, Co. Ltd., JAPAN
Dr. P. J. Gao, Chinese Acad. Sci., CHINA



As of May, 2013

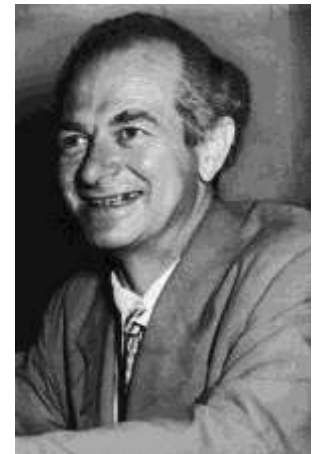
どうやってメタボロームを測ろう？

“Information about the genetic nature of an individual human being, as reflected in the rates of various chemical reactions that take place in his body, usually catalyzed by enzymes, could be obtained by the through quantitative analysis of body fluids. Moreover, the through quantitative analysis of body fluids might permit differential diagnosis of many diseases in a more effective way than is possible at the present time.”

*—Linus Pauling, 1971
when he proposed the idea of metabolome analysis of urine.*

ひとりの人間の遺伝的性質に関する情報は、その身体で起きている多くの化学反応速度の反映であることから、体液の定量的分析を通して与えられる。さらに、体液の定量的分析を通して、現在よりもより効果的な方法で多くの疾病の診断を行うことができるかもしれない。

ライナス・ポーリング



研究目的に応じた分析法の選択

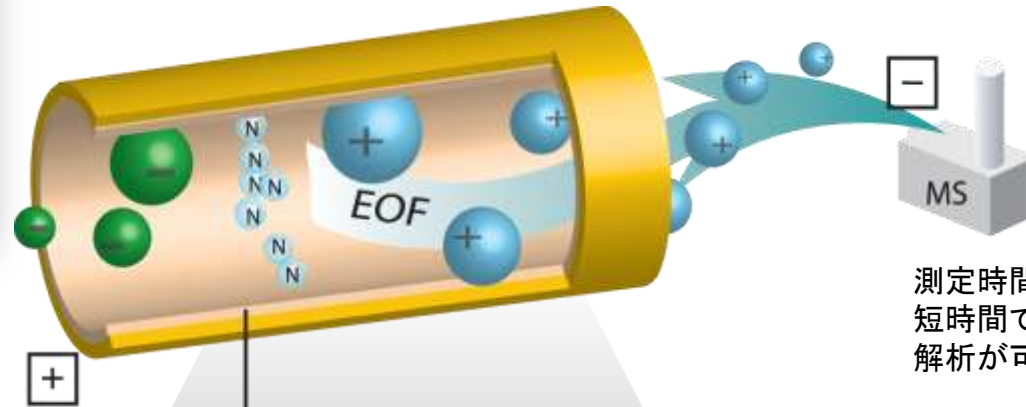
	CE-MS	GC/MS	LC-MS	FT-ICRMS	NMR
主な標的代謝物	イオン性分子	揮発性分子	主に 中性分子	主に イオン性分子	(制限なし)
網羅性	◎	◎ (誘導体化)	△	×	○
誘導体化反応	不要	揮発性分子 以外の多く	不要	不要	不要
分離能	○ (構造異性体も)	○	×	×	◎ (原子レベル)
感度	○	○	◎	△	×
定量性	◎	○	△	×	△
操作性	×	○	△	△	○

それぞれの研究で注目する代謝分子や求められる分析精度によって装置を選択

CE-MS による高精度な代謝プロファイリング



CE-TOFMSシステム

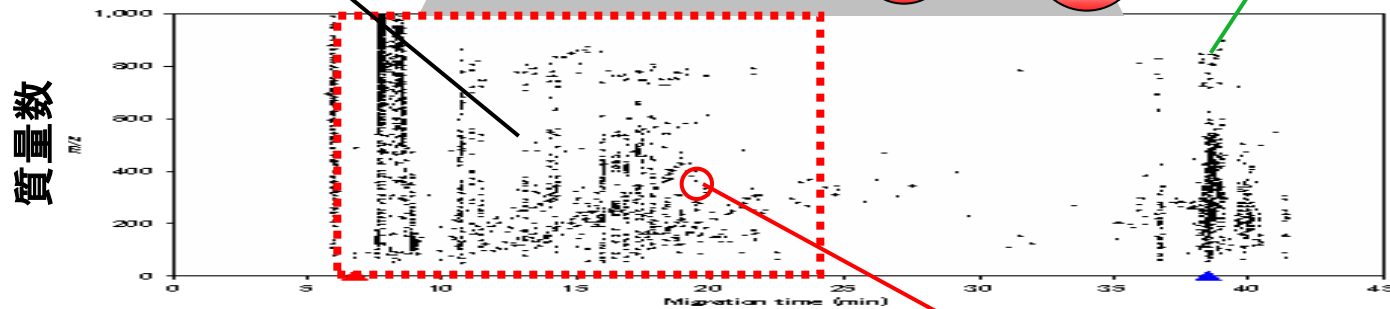


測定時間は30分-45分程度の短時間で代謝物質の包括的解析が可能！

Inner surface is coated by silanol, which dissociates and generates EOF.

低分子イオン性代謝物質

中性物質



泳動時間 (min)

ドットは一つ一つの代謝物質

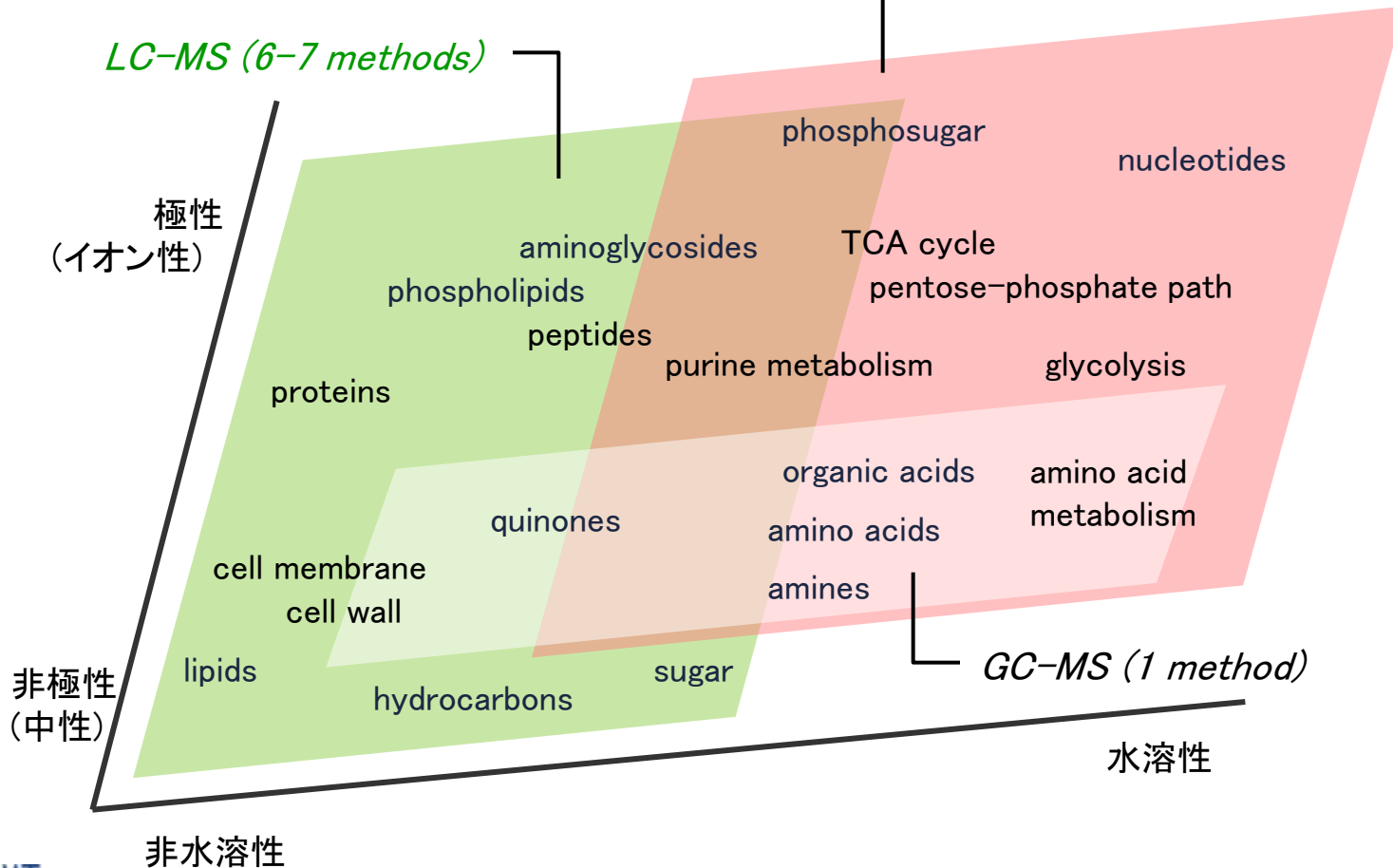
研究目的に応じた分析法の選択

代謝物質はDNAやタンパク質と違い、
さまざまな物性を持つ化学物質の集合
すべての代謝物質を一度に分析できる手法はない

CE-MS (2 methods)

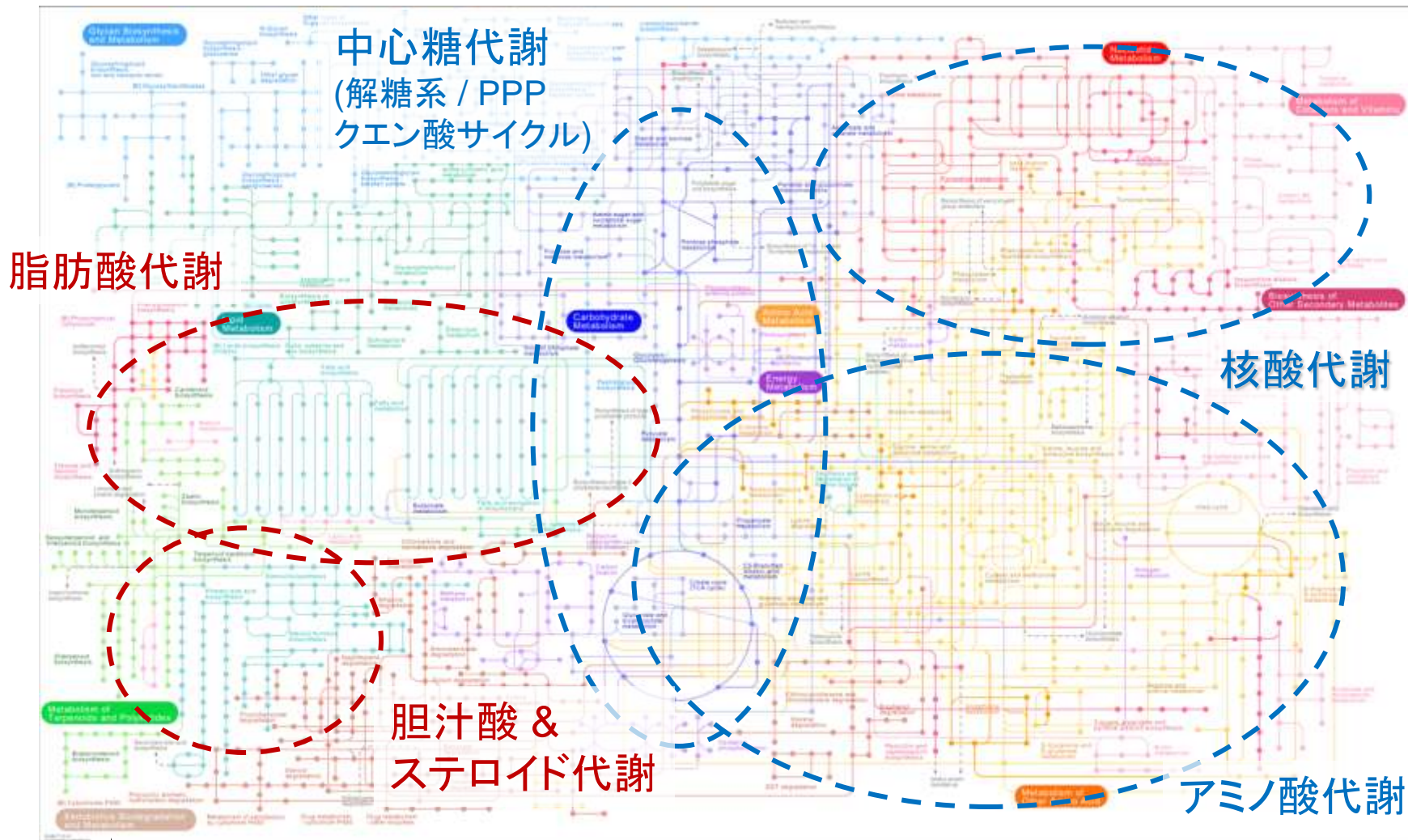
CE-MS法は多成分を高い精度で簡便に測定
するために開発された手法
→メタボロミクスに適している

LC-MS (6-7 methods)



CE-TOFMSとLC-TOFMSによる包括解析

KEGG Pathway



目的に応じて、**CE-TOFMS** と **LC-TOFMS** を使い分けると効果的。



メタボローム解析ソリューションのご紹介

- 事業内容:
 - 受託解析
 - バイオマーカー開発
 - メタボロミクスキット販売
- 設立： 2003年7月1日
- 営業所： 東京・京都・ボストン (USA)
- 提携受託実績：
武田薬品工業(株)、田辺三菱製薬(株)、
味の素(株)、協同乳業(株)、(株)ミツカングループ本社、
他 製薬・食品・化学企業、学術機関 等
年間 >300 PJ (2012年度)
- Web access :
<http://humanmetabolome.com>



メタボローム受託解析サービス

お客様

サンプリング

※試料を安全に送っていただくため
専用の試料送付箱をご提供します。
試料準備前にお問い合わせください。

検体送付

お客様に行っていただく前処理(代表的なもの)

細胞・微生物など

メタノールによるクエンチングののち、
-80℃で凍結保存。

血漿など

サンプリングののち、-80℃で凍結
保存。

組織など

サンプリングののち、液体窒素で凍
結。-80℃で保存。

ご利用の流れ

試料を準備していただくだけです！



HMT

測定できる状態まで前処理

サンプル測定

データ処理

データ解析

報告書作成・納品



幅広い研究分野での実績

これまでにHMTで解析を行った実績がある試料例

生体液

血漿、血清、全血、血球、尿、涙、汗、母乳、脳脊髄液

その他生体由来

肝臓、腎臓、肺、筋、脳、血管壁、膵臓、前立腺、皮膚、毛髪、脂肪組織、腸粘膜、培養細胞(接着・浮遊)、大便

微生物

培養微生物(大腸菌、枯草菌、酵母、乳酸菌、糸状菌など)、培養液、藻類

植物

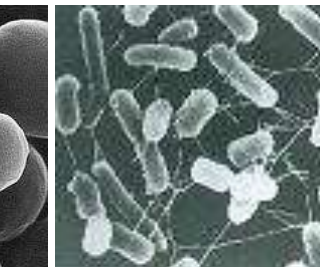
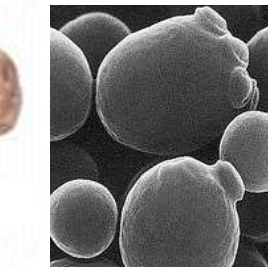
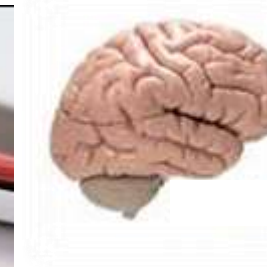
植物葉、茎、果実、花弁、種子、藻類

食品

醗酵乳、各種酒など

その他

魚個体丸ごとなど



※上記以外の解析実績についてはHPをご確認下さい。解析実績がない試料種については、サンプルテストの実施を推奨いたします。

幅広い研究分野での実績

- Y Mitsuishi *et al.*, ***Cancer Cell***. 2012, 22(1) 66-79 ‘Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming.’
- JM Fusin *et al.*, ***Cell Rep***. 2012, 1(4) 341-349. ‘Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites.’
- Y Hirotsu *et al.*, ***Mol Cell Biol***. 2012, 32(14) 2760-2770 ‘NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1 β genes.’
- HJ Kwon *et al.*, ***Cell Death Dis***. 2012, 3:e278. ‘Synchronized ATP oscillations have a critical role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis.’
- C Watanabe *et al.*, ***Diabetes***. 2012, 61(1) 74-84. ‘Remodeling of hepatic metabolism and hyperaminoacidemia in mice deficient in proglucagon-derived peptides.’
- K KamiY *et al.*, ***Mitochondrion***. 2012, 12(6) 644-653 ‘Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations.’
- Y. Suzuki *et al.*, ***Plant Cell Environ***. 2012, 35(8) 1369-1379. ‘Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content.’
- O Resendis-Antonio *et al.*, ***PLoS Comput Biol***. 2012, 8(10):e1002720. ‘Functional modules, structural topology, and optimal activity in metabolic networks.’

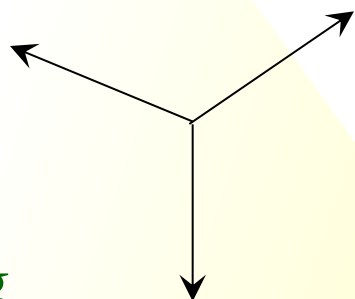
研究目的に応じた解析プラン

それぞれの試験で必要とされる
解析プラットフォームの性能

BM Screening

網羅性
解析効率

定量性
同定能



データベース
生化学的知見

Target
analysis

● マーカー探索

診断・創薬マーカー など

- ◎ 統計モデル解析、多変量解析
- ◎ 未同定分子の同定

● プロファイリング

化合物スクリーニング、品質管理 など

- ◎ リピドミクス、ペプチドミクス
- ◎ 大規模なデータベース

● ターゲット解析

基礎研究におけるメカニズム解明

- ◎ 代謝経路解析
- ◎ 安定同位体ラベル解析

研究目的に合わせた解析プラン

Advanced Scan

Biomarker
screening

Basic Scan

Dual Scan

LC-MS Lipidomics

C-SCOPE

Mechanism &
Target analysis

				
分析法	CE-TOF (水溶性代謝物)	CE-QqQ (中心代謝)	CE/LC-TOF (脂質)	
解析対象	全ピーク (未知込)	900 物質	116 物質	1200 物質
検出数	~250	~150	-	~200
上: 体液	~400	~200	~110	~300
下: 組織				
定量		相対値 (1点検量OP)	濃度 (3点検量)	相対値
レポート	代謝経路/ 統計解析	代謝経路/ 統計解析 (OP)	代謝経路/ 統計解析/ 生化学指標	代謝経路/ 統計解析 (OP)
納期		~60日	~90日	~60日
価格例	300万円 / 20検体~	20万円 / 1検体~	120万円 / 10検体~	195万円 / 10検体~

大うつ病の診断バイオマーカーの探索

平成23年度3次予算「震災復興技術イノベーション創出実証研究事業」

うつ病血液診断バイオマーカーの探索と実用化



血液中に含まれるリン酸の濃度を測り、うつ病を診断する検査法を、慶応大の研究チームもとにしたベンチャー企業が開発した。従来、研究されてきた血液による診断法に比べ簡便なことが特徴。健康診断で使うことで早期発見につながる可能性がある。開発したのは「ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ」

ベンチャーが開発

うつ病の血液診断、簡便に



ズ（山形県鶴岡市）。22日に、東京都で開かれる日本生物学的精神医学学会で発表する。同社は、国立精神・神経医療研究センターで「大うつ病性障害（うつ病）」と診断された31人と、年齢や性別の構成が近い

大うつ病障害 (MDD)

生涯罹患率は10% (時点では2%)

多くが希死念慮

年間10%が自殺企図

年間1%が自殺により死亡

多くは治療可能なので早期発見がカギ

→ 簡易かつ安価な診断基準が求められる

うつ病と間違いやすい病気

適応障害(ストレスによる抑うつ気分)

心的外傷後ストレス障害(PTSD)

気分変調性障害(ずっと気分が晴れない)

不安障害(不安にさいなまれている)

→ 複雑な愁訴を鑑別できる指標が求められる

血液中の代謝成分の変動からうつ病に特徴的な変化を抽出し、これを用いた実用的な診断キットの開発を行う。

大うつ病診断マーカー

大うつ病マーカー探索試験 (Feasibility study)

Non-MDD 対照群

MDD 患者群

	Healthy	Adjustment Disorder	MDD
Subjects	31	7	34
Age	37.8 (20-63)	49.4 (27-78)	38.9 (20-70)
Gender	M 15, F 16	M 2, F 5	M 14, F 20
BMI	21.8 (16.6-30.4)	23.7 (18.7-33.3)	22.9 (18.6-31.2)
CES-D (Score)	7.7 (0-17)	21.6 (13-34)	31.6 (8-50)

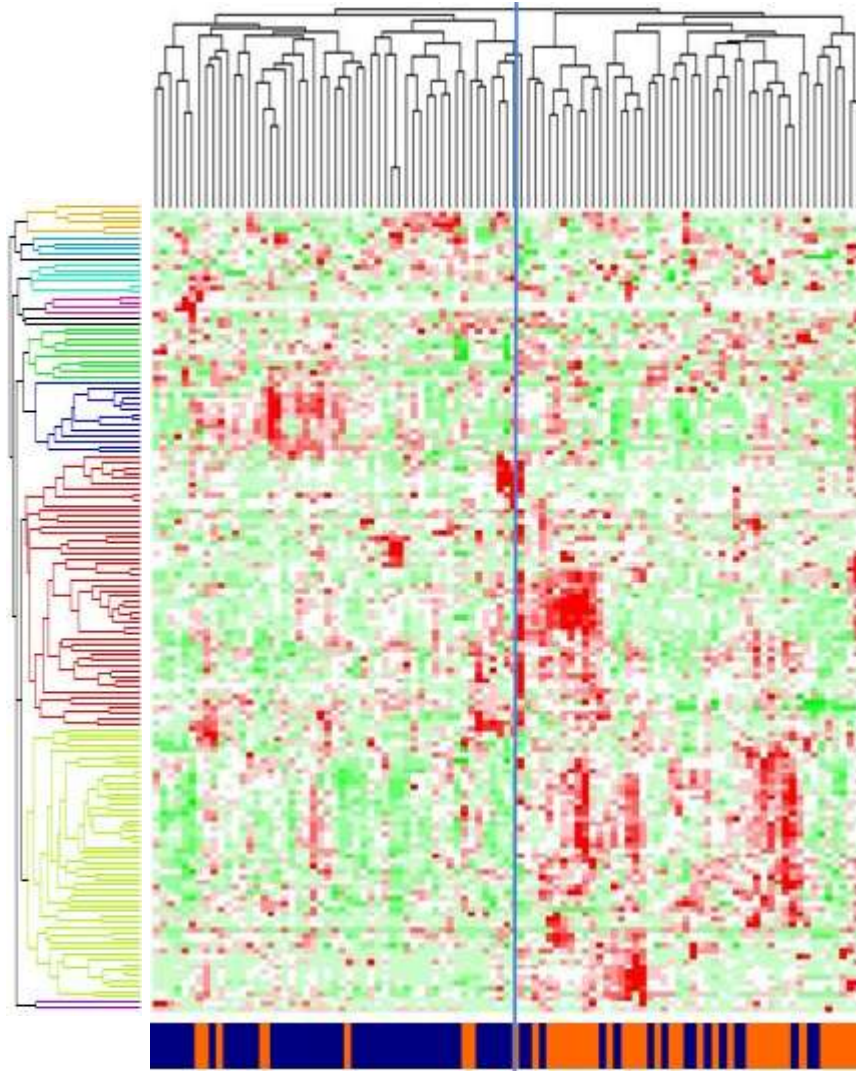
- 共同研究: 国立精神神経センター (NCNP)
- 被験者 : 日本(主に東京) 在住のアジア人
- 診断基準: DSM-IV-TR. SCID.

CES-D (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale) > 18

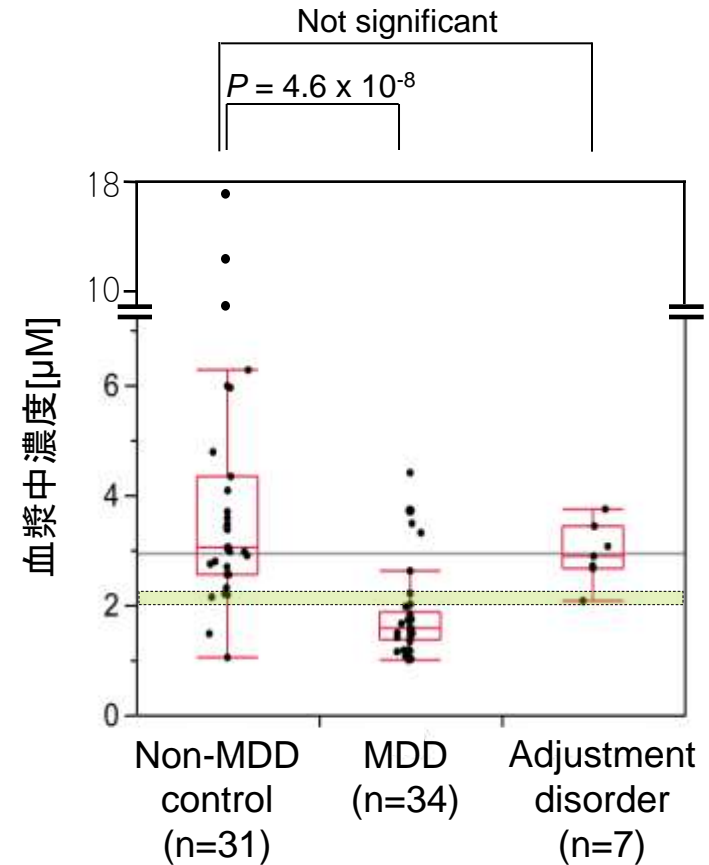
大うつ病診断マーカー

マーカー分子の絞り込み:

MDD と Non-MDD の鑑別が可能なマーカー



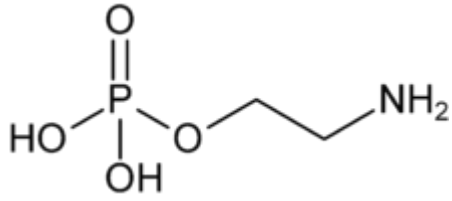
■ MDD ■ Non-MDD (including AD)



Wilcoxon rank-sum test: $P < 0.0001$ after Bonferroni correction.

Green shaded bars: 95% CI of the threshold segregating MDD and non-MDD individuals determined by a bootstrapping.

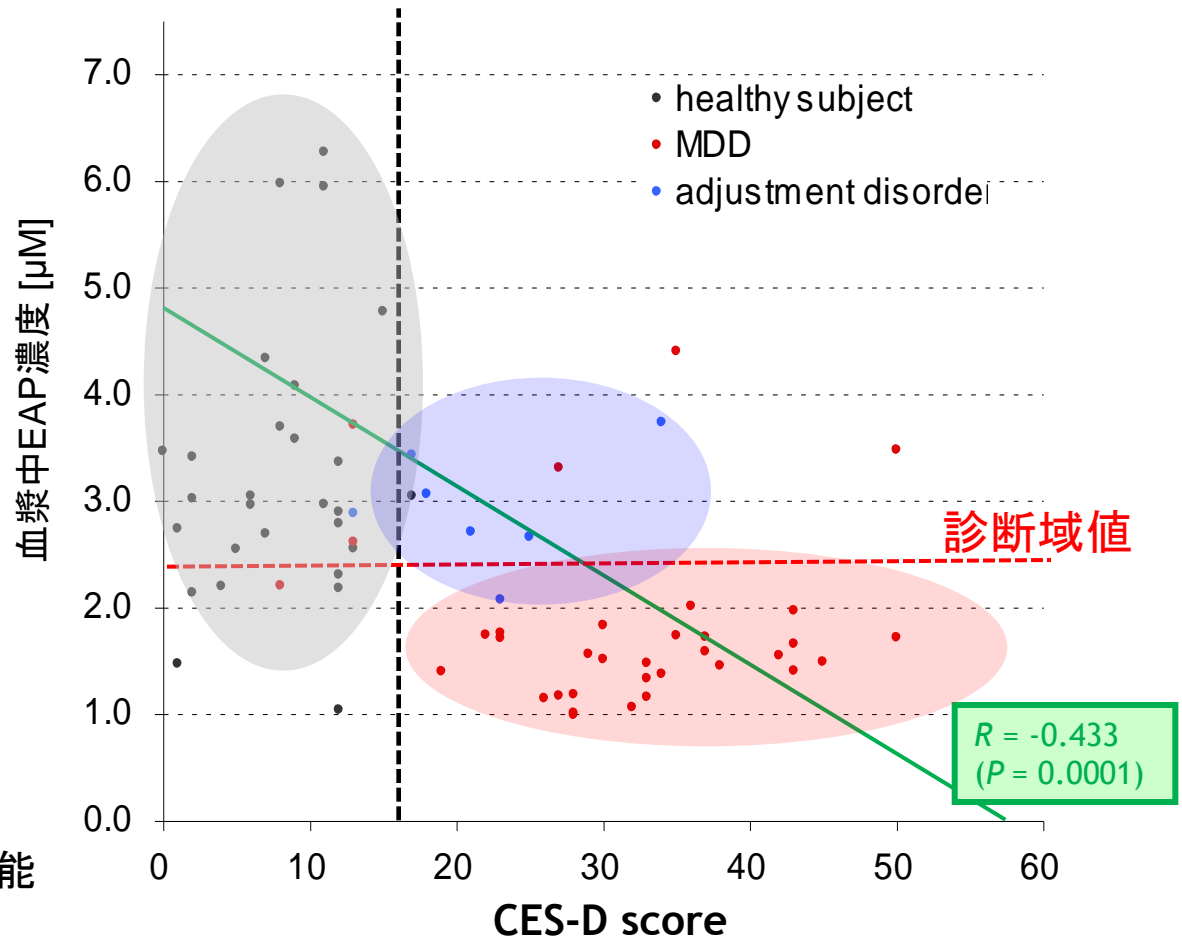
大うつ病診断マーカー



Ethanolamine phosphate (EAP)

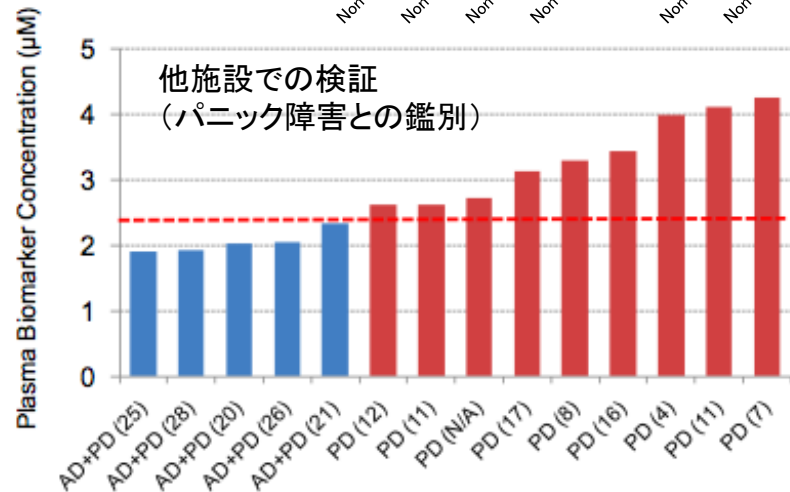
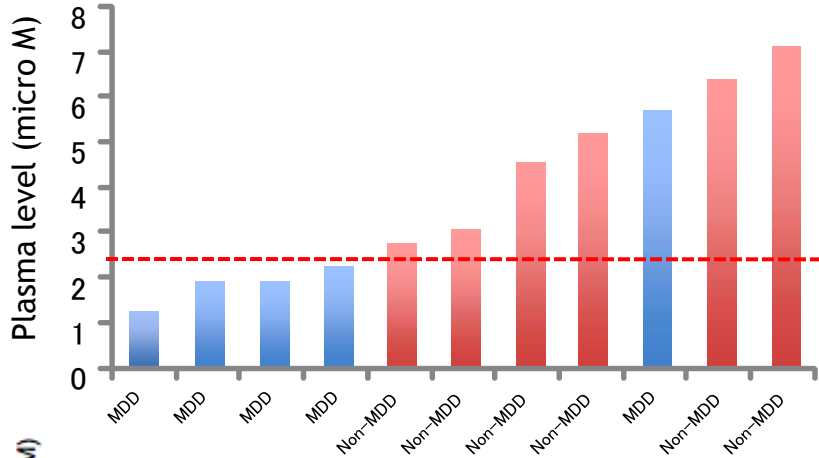
感度 82% / 特異度95%
AUC = 0.87
(95%CI: 0.78-0.96)

- 血中濃度は MDD で低下し、CES-D スコアと負の相関である
- AD は Non-MDD の濃度域に含まれるのでMDD との鑑別が可能

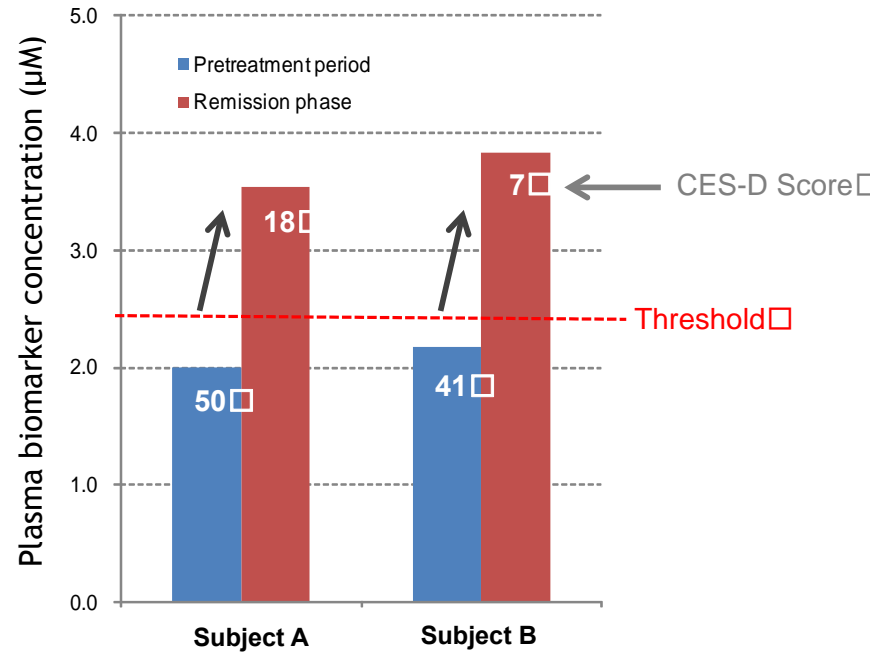


大うつ病診断マーカー

検証試験 (盲検・多施設)

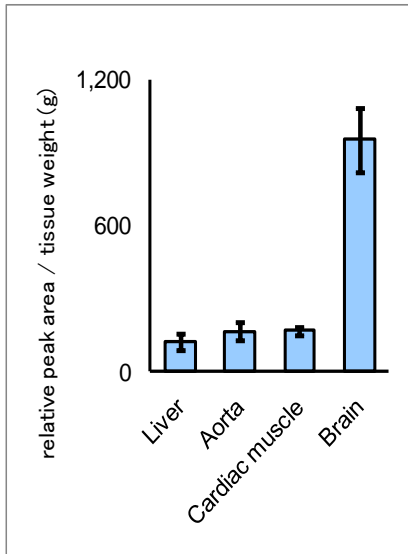


治療応答性 (SSRI)



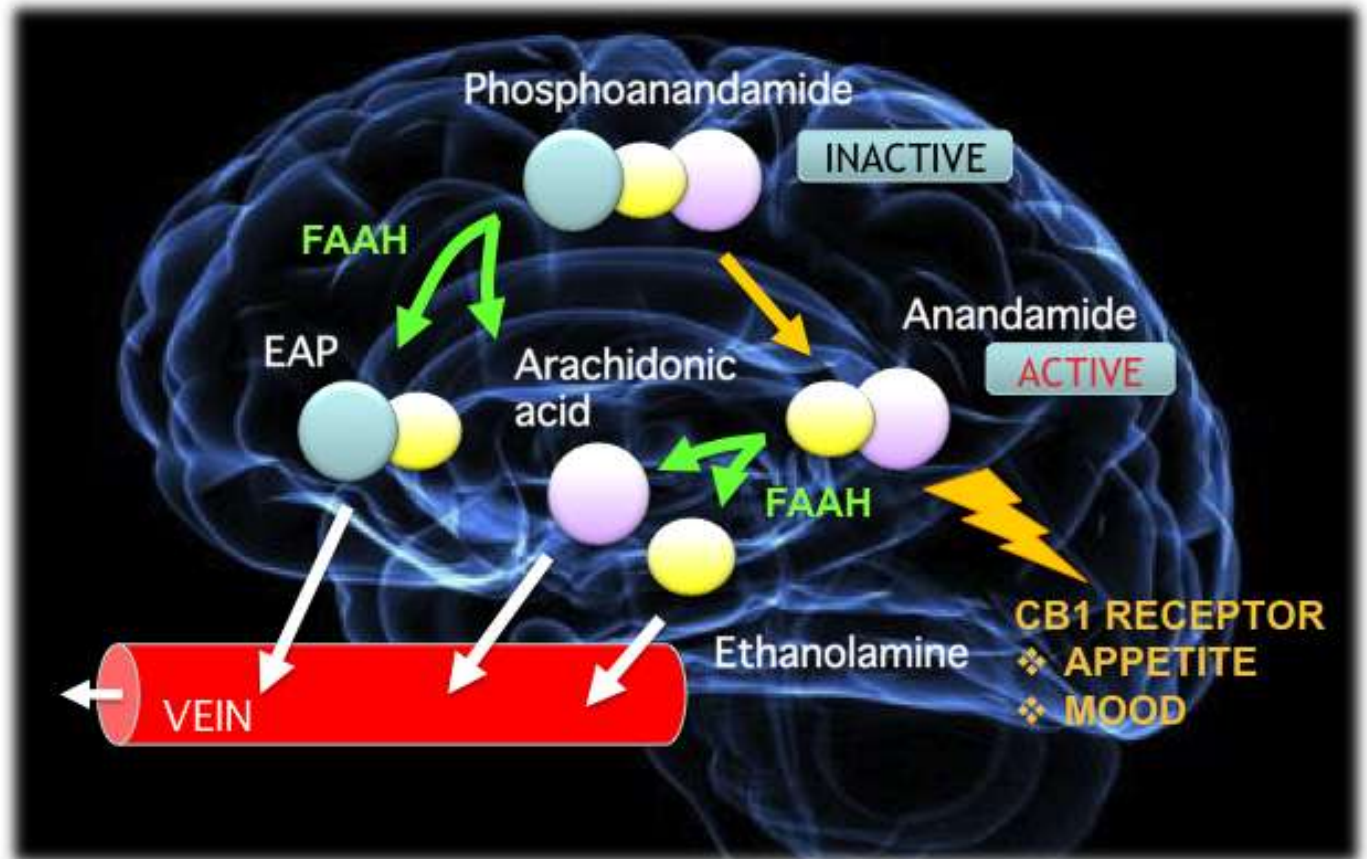
大うつ病診断マーカー

EAPが関わる脳内シグナルがうつ病とどう関わるのだろうか？



EAPは脳に局在している
(モデルウサギ)

→
脳内の変動が血液中にも
反映されやすい



結論:

大うつ病の患者さんでは脳内シグナルの変化を示唆する血液中のEAPが低下している。



See the future in Metabolomics

お問い合わせ先

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ

営業マーケティング部 山領佐津紀(やまりょうさつき)

s.yamaryo@humanmetabolome.com

080-8860-0362