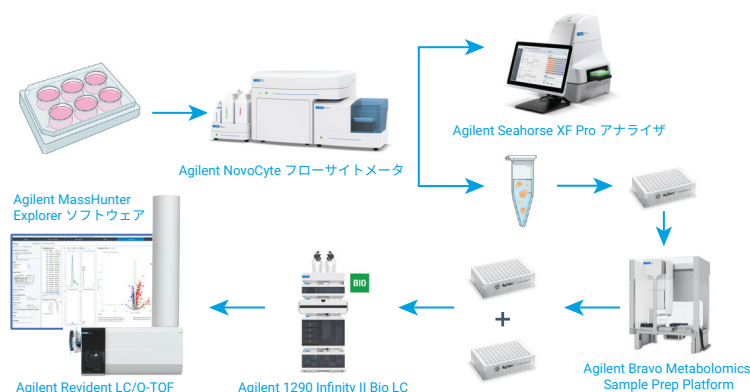


LC/MS オミクスによる生体エネルギー測定 の組み合わせを用いた、薬剤処理に対する 細胞と分子の反応の解明



著者

Mark Sartain,
Genevieve Van de Bittner,
Natalia Romero, James Pyke,
Yoonseok Kam,
Maria Apostolidi, and
Dustin Chang
Agilent Technologies, Inc.

概要

複数の代謝細胞分析手法を組み合わせると、1つの分析手法では解明できない新たな生物学的知見を得ることができます。このアプリケーションノートでは、Agilent Seahorse XF 生体エネルギー分析と Agilent Revident Q-TOF LC/MS メタボロミクス分析およびリポミクス分析を組み合わせ、薬剤処理したがん細胞における代謝適応を調査しています。チロシキナーゼ阻害剤で処理した白血病細胞は、ミトコンドリア機能が低下し、代謝パスウェイの使用が変化しました。ミトコンドリア機能、メタボロミクス、リポミクスの知見を組み合わせるだけで、新しい生物学的仮説が解明されました。それは、処理した白血病細胞はアナプレロティック反応をアップレギュレートしてミトコンドリア機能の低下を克服するが、2つの阻害剤のうちの1つにのみ反応するというものです。この複数の手法、細胞から分子へのワークフローを使用することで、薬物化合物の作用とオフターゲット効果の代謝メカニズムを解明できます。

概要

がん細胞は、代謝再プログラミングによって、構成要素とエネルギー代謝物の産生を変えます。¹ がん内部の再プログラミングされた代謝パスウェイと推定治療法に対する代謝パスウェイの反応を特定することは、新しい治療ターゲットや併用療法の開発にとって有望な戦略です。つまり、相補的な技術により、がん細胞の薬物誘発代謝パスウェイモジュレーションに関するより深い知見を得るための、相乗的機能を提供できます。

特に Agilent Seahorse XF Pro アナライザで分析すると、酸素消費量 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) の測定により、代謝物フラックスを細胞レベルでモニタリングできます。ECAR データと OCR データで解糖と呼吸の速度を観察することで、生細胞の機能を解明できます。解糖およびミトコンドリア代謝パスウェイは、活性化、増殖、分化、細胞死、疾患の進行などのさまざまな細胞プロセスにおいて重要な役割を果たすためです。いっぽう、LC/MS ベースのオミクスおよび定性フラックス分析では、代謝物のアバundanceやその同位体標識取り込みの程度を測定することで、代謝パスウェイ修飾を分子レベルでモニタリングできます。

このアプリケーションノートでは、アジレントのハードウェア、ソフトウェア、アッセイキットの幅広いポートフォリオを包括的なワークフロー (図 1) で組み合わせて、チロシキナーゼ阻害剤ファミリーの 2 種類の推定抗がん剤の代謝パスウェイ効果を調査します。この 2 種類の阻害剤は、以前のアプリケーションノート²から選択したものです。このアプリケーションノートでは、80 化合物のチロシキナーゼ阻害剤ライブラリを Agilent Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイでスクリーニングして、解糖およびミトコンドリア ATP 産生速度に対する阻害剤の急性効果を評価しました。

選択したチロシキナーゼ阻害剤の代謝的影響の作用の推定メカニズムを特定するため、長期間のインキュベーション後に Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイを繰り返し、薬剤処理した細胞のプロトンリークとスペア呼吸容量 (SRC) を分析して長時間の特性解析を実施しました。これら 2 つの測定には、Agilent Seahorse XF Mito ストレストテストを使用しました。それとは別に、Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform による自動サンプル前処理によって可能になるメタボロミクスおよびリピドミクス LC/MS 分析を用いて、選択したチロシキナーゼ阻害剤の分子代謝に対する影響を評価しました。³ 細胞抽出物の分析には検出ワークフローで Agilent Revident LC/Q-TOF と MassHunter Explorer ソフトウェアを使用し、代謝パスウェイの摂動の特定には LC/MS 分析を使用しました。

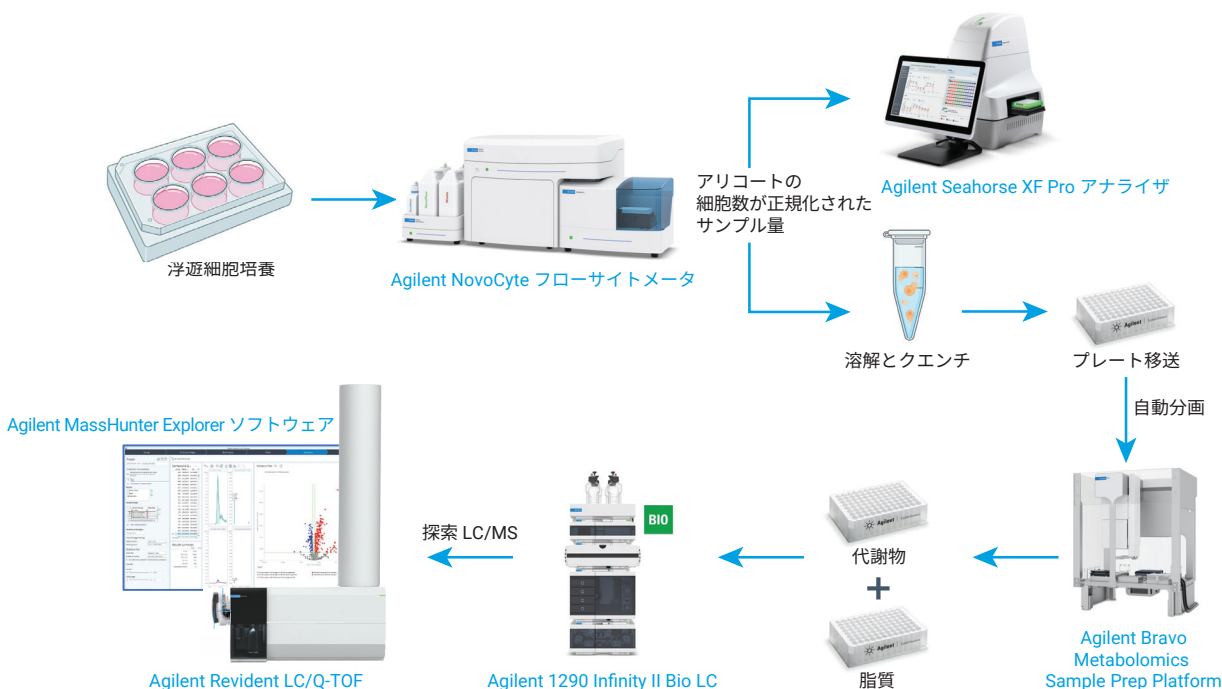


図 1. 細胞培地から Seahorse XF まで、および細胞培地から自動サンプル前処理を経て Q-TOF LC/MS 分析に至るまでのワークフローの概要。このアプリケーションノートで説明している主要技術については、青色で強調表示しています。この画像の細胞培地プレートとマイクロチューブの部分は、BioRender.com で作成しました。

実験

試料調製

American Type Culture Collection から THP-1 細胞株を入手し、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) の完全培地に 0.05 mM の 2-メルカプトエタノール (Life Technologies) を加えて培養しました。薬物化合物 AG-879 (99 % HPLC グレード) と SU1498 (≥ 98 % HPLC グレード)、および化合物媒体 DMSO (滅菌済み) は、MilliporeSigma から購入しました。

サンプル前処理溶媒および化学薬品

LC/MS グレードのメタノール (MeOH)、NMR グレードのトリフルオロエタノール (TFE)、≥ 99.5 % GC グレードのジクロロメタン、高純度 (> 99.5 %) のエタノール、LC グレードまたは純度 99.9 % のブタノール、LC/MS グレードのアセトニトリル (ACN) を使用しました。

LC/MS 移動相溶媒および試薬

ギ酸アンモニウムと酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。MeOH (LC/MS のハイパーグレード、LiChrosolv)、ACN (LC/MS のハイパーグレード、LiChrosolv)、2-プロパノール (LC/MS のハイパーグレード、LiChrosolv) は、Supelco (ベルフォント、ペンシルバニア州、米国) から購入しました。サンプル前処理と LC/MS 分析用の超純水は、LC-Pak Polisher と 0.22 μm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジ (MilliporeSigma) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。

装置構成

Agilent NovoCyte Advanteon フローサイトメータ (3 本のレーザー) と Agilent NovoSampler Q システム (部品番号 2010201) を組み合わせて使用しました。Agilent NovoCyte Quanteon および Penteon フローサイトメータも、NovoSampler Q システムと組み合わせれば、このワークフローにも適しています。このアプリケーションノートのデータは、NovoCyte Quanteon フローサイトメータと NovoSampler Q システムを用いて採取しました。フローサイトメータで使用したアクセサリと消耗品には、次のようなものがあります。

- Agilent NovoCyte 品質管理およびキャリブレーション粒子 (部品番号 8000004)
- Agilent NovoCyte 大容量流体カート (部品番号 2010117AA)

Agilent Seahorse XF Pro アナライザ (部品番号 S7855A) と次の消耗品：

- Agilent Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイ (部品番号 103592-100)
- Agilent Seahorse XF Cell Mito ストレストキット (部品番号 103015-100)
- Agilent Seahorse XFe96/XF Pro PDL FluxPak Mini (部品番号 103798-100)

Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (製品番号 G5589AA) では次の追加プロトコルを使用しました。

- 追加の代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 VWorks プロトコル (詳細は、アジレントの自動化ワークフローのスペシャリストにお問い合わせください)

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムの構成：

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (製品番号 G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ、サーモスタット付き (製品番号 G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (製品番号 G7116B) と Agilent InfinityLab クイックチェンジ 2 ポジション/10 ポート Bio バルブ、130 MPa (製品番号 G5641A)

Agilent Revident LC/Q-TOF とデュアル Agilent Jet Stream 技術イオン源 (製品番号 G6575A) も使用しました。

ソフトウェア

Revident LC/Q-TOF システムの操作には、LC/Q-TOF 用の Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェアバージョン 12.0 を使用しました。

ピーク抽出と差分解析には、Agilent MassHunter Explorer ソフトウェアバージョン 1.0 を使用しました。代謝物の分析には、Default-Metabolomics.M メソッドと次の修飾を使用しました。高さフィルタ：1,500、イオン種：-H、+CH₃COO、マルチパスの徹底的なグループ化が可能、質量許容範囲 ± 10 ppm、スコア (MFE) ≥ 70 (1 つ以上のサンプルグループの 75 % 以上のデータファイルで)、RT 補正が可能 (参照データファイルを使用)。脂質の分析には、Default-Metabolomics.M メソッドと次の修飾を使用しました。高さフィルタ：600、イオン種：+H、+NH₄、+Na、マルチパスの徹底的なグループ化が可能、RT 許容範囲 ± 0.15 分、質量許容範囲 ± 10 ppm、スコア (MFE) ≥ 70 (1 つ以上のサンプルグループの 75 % 以上のデータファイルで)。両プロジェクトではバックグラウンド除去のために、すべてのグループに対し、2 つおよび 1 つの最小ペアのカットオフを用いて、抽出ブランク (コントロール) に対する倍率変化テストを適用しました。その他のパラメータを図に示しています。

より詳しい差分分析と結果の視覚化には、Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアバージョン 15.1 を使用しました。MassHunter Explorer プロジェクトから、ファイル (.pfa) をデータソースとしてインポートしました。ポジティブイオン脂質データセットは、「リピドミクス」実験タイプで作成しました。パーセントイルシフト正規化アルゴリズム (75 %) を使用し、すべてのサンプルの中央値に対してデータセットをベースライン補正しました。

Agilent MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアバージョン 1.0 をデフォルトのメソッドパラメータで使用しました。ただし、ポジティブイオンモードの分析には、 $[M + H]^+$ プリカーサと $[M + NH_4]^+$ プリカーサのみを考慮しました。FAHFA 脂質クラスは選択解除しました。

細胞培地

追加の RPMI 培地で培養した THP-1 細胞を、 $2 \sim 8 \times 10^5$ 細胞/mL に維持しました。細胞培地は、 $4.98 \mu\text{M}$ の SU1498、 $1.36 \mu\text{M}$ の AG-879、または DMSO 媒体で、最終 DMSO 含有量 1% (v/v) で 2 時間または 18 時間処理しました。18 時間の処理の場合、細胞を 6×10^5 細胞/mL の濃度で植え付け、18 時間後にターゲット濃度 7.5×10^5 細胞/mL に達するようにしました。2 時間の処理の場合、前日に使用した細胞培地から細胞を取り出し、18 時間の培地処理を施して、Seahorse XF アッセイの開始前に、2 時間および 18 時間処理した細胞で、同じ細胞分割と培地条件が維持されるようにしました。

NovoCyte 細胞カウントによるサンプル正規化

Seahorse XF Pro アナライザと LC/MS サンプル正規化の両方で細胞カウントを使用し、NovoCyte Quanteon フローサイトメータと NovoSampler Q、および前の説明と同様の手順を使用して細胞カウントを完了しました。⁴ DMSO コントロールサンプルからの $400 \mu\text{L}$ の画分を $200 \mu\text{L}$ ずつ 2 つに分けて、生/死滅細胞サンプルコントロールを作成しました。1 つの $200 \mu\text{L}$ 画分を室温で保管し、もう 1 つの $200 \mu\text{L}$ 画分を 65°C になるまで 10 分間加熱し、死滅細胞コントロールを作成しました。加熱サンプルを室温で数分間冷却した後、生細胞と死滅細胞のサンプルを再度一緒にして静かに混ぜました。生/死滅サンプルからの 2 つの $100 \mu\text{L}$ 画分と、各実験サンプルからの 1 つの $100 \mu\text{L}$ 画分を、U 底の 96 ウェルプレートに移しました。細胞生存率の分析用に、7-AAD の $1 \mu\text{L}$ 画分 (0.1 mg/mL) を、未染色の対照群として取っておいた 1 つの生/死滅サンプルをサンプルにそれぞれ添加しました。ピペットでサンプルを静かに混ぜ、データ採取のためにプレートを NovoSampler Q に配置しました。データ解析中に、生/死滅細胞サンプルを使用して、生細胞と死滅細胞のゲートを定義しました。Seahorse XF Pro アナライザの細胞数正規化には、生細胞数を使用しました。生細胞のみが OCR 信号と ECAR 信号に寄与するためです。LC/MS 細胞数正規化には、細胞の総数を使用しました。すべての細胞がピークアバンドランス信号に寄与するためです。

Seahorse XF Pro アナライザの細胞前処理

18 時間の処理では、 1.4 mL の細胞培地画分を 12 ウェルプレートに添加し、治療用化合物または媒体を添加し、サンプルを完全に混合しました。18 時間後に、ピペットでサンプルをよく混ぜて均一な細胞懸濁液を作り、 $100 \mu\text{L}$ の画分を細胞カウント用にとっておきます。同時に、 1 mL の各サンプルを 1.5 mL の微量遠心チューブに移し、室温で $250 \times g$ で 5 分間遠心分離して細胞を沈殿させました。細胞カウントが完了したら、 1 mL の細胞培地画分から上澄みを除去しました。次に、治療用化合物または媒体を含む Agilent Seahorse XF RPMI 培地を、100 万個の細胞/mL となる量で各サンプルに添加しました。各サンプルの $50 \mu\text{L}$ の画分を Seahorse XFe96/XF Pro PDL 細胞培地マイクロプレートに移し、ウェルあたり 50,000 個の細胞を植え付けました。非 CO_2 インキュベータで 20 分間沈殿させた後、細胞培地マイクロプレートを $300 \times g$ で 5 分間、室温で遠心分離しました。さらに、適切な治療用化合物または媒体を含む $130 \mu\text{L}$ の Seahorse 培地を、細胞の植え付け後、Seahorse アッセイを開始する前に、各ウェルに添加しました。2 時間の処理では、単一細胞のカウントを完了してから、Seahorse XF 培地で細胞を再懸濁し、細胞を分取し、治療用化合物または媒体を添加し、各処理グループから PDL 細胞培地マイクロプレートに $50 \mu\text{L}$ の画分を移しました。細胞の沈殿時間、遠心分離、追加の Seahorse 培地の添加は、18 時間の処理メソッドと同じです。

LC/MS メタボロミクスおよびリピドミクス分析用の細胞の溶解とクエンチング

LC/MS 分析用にサンプルを前処理するため、前述の³細胞抽出メソッドを適用しました。このメソッドでは、室温状態で TFE を利用して哺乳類細胞を溶解させ、代謝をクエンチします。特に TFE のクエンチングは、低温液体のクエンチングの課題を克服し、安全性を向上させます。また、ロボットによる自動化に適しています。NovoCyte 細胞カウントを使用して、サンプルあたり 100 万個の THP-1 細胞を収穫するのに必要な細胞培地量を計算しました。収穫した細胞サンプルは、 1 mL の室温の PBS で洗浄してから、室温で $100 \mu\text{L}$ の 1:1 トリフルオロエタノール:水で溶解およびクエンチし、ボルテックスミキサーで混ぜ、室温で 10 分間培養しました。

Bravo の自動化された代謝物 + 脂質のデュアル分画法

以前に説明した³ Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (図 2)での自動メソッドを使用して、媒体および薬剤処理した THP-1 細胞に対応する TFE 細胞溶解液から、極性の代謝物と脂質を連続的に抽出しました。このメソッドでは、96 ウェルの Agilent Captiva EMR-Lipid プレートを使用しました。このプレートには、アシル炭化水素鎖を含む脂質を選択的に保持する独自の固体充填剤が含まれています。つまり、タンパク質の沈殿後に、TFE でクエンチした抽出物をプレートに添加し、Captiva EMR-Lipid 充填剤の上のフィルタでタンパク質を捕捉しました。極性代謝物が充填剤を通過するときに、充填剤の上で脂質を保持しました。

この通過した極性代謝物は乾燥しているため、HILIC-LC/MS 分析の前に 200 μ L の 4:1 アセトニトリル:水で再溶解しました。脂質の溶出には別の収集用プレートを使用しました。このプレートではより強力な溶出溶媒で脂質を溶出させてから乾燥させ、逆相 (RP) LC/MS 分析用に 200 μ L の 9:1 メタノール:クロロホルムで再溶解しました。再溶解を促進するため、いずれのプレートも室温、500 rpm で 20 分間振とうしました。MS/MS 実験を繰り返し実施するために、5 倍に濃縮し、プールの脂質サンプルを前処理しました。その方法は、すべてのウェルからの 20 μ L の画分と治療薬の複製を混合し、真空中で乾燥させ、別のバイアルで 1/5 量の 9:1 メタノール:クロロホルムで再懸濁するというものです。

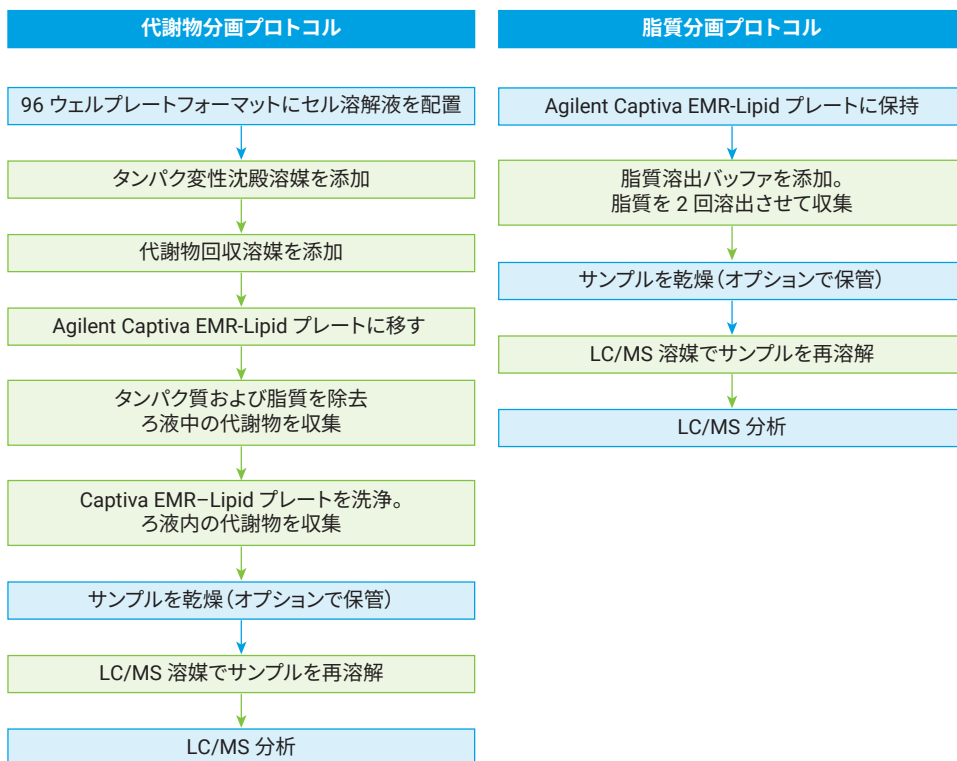


図 2. 細胞溶解液の代謝物 + 脂質の自動デュアル分画法。³ 緑色のステップは、Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform で実行します。

LC/MS メソッド

代謝物の HILIC LC メソッドパラメータは、以前のアプリケーションノートを参考にしました。⁵ 脂質の LC メソッドパラメータは、以前のアプリケーションノートを参考にしました。⁶ LC 条件および LC/Q-TOF Auto MS/MS パラメータの実験メソッドの詳細については、表 1～4 をご覧ください。また、ネガティブイオン代謝物の LC/Q-TOF MS のみのデータは、2 スペクトル/秒の MS 取り込みレートをを用いて、個々のサンプルで採取しました。ポジティブイオン脂質の LC/Q-TOF All Ions データは、8 スペクトル/秒の取り込みレートと 0 eV、10 eV、20 eV、40 eV のコリジョンエネルギーを用いて、個々のサンプルで採取しました。すべてのワークリストはランダム化しました。

表 1. 代謝物の HILIC-LC 機器パラメータ

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II Bio LC																																				
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部品番号 683775-924)																																				
インラインフィルタ	Agilent 1290 Infinity II Bio インラインフィルタキット, 0.3 μm (部品番号 5720-0020)																																				
カラム温度	15 °C																																				
注入量	10 μL (MS と MS/MS)																																				
オートサンブラ温度	5 °C																																				
ニードル洗浄	標準洗浄, 10 秒, イソプロパノール:ACN:水 1:1:1																																				
移動相	A : 20 mM 酢酸アンモニウムと 5 μM Agilent InfinityLab 不活性化添加剤 (部品番号 5191-3940) 水溶液, pH 9.3 B : ACN																																				
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> <th>流量 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>1</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>8</td><td>78</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>12</td><td>60</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>15</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>18</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>19</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>19.1</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>22</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>22.1</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>23</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	0	90	0.4	1	90	0.4	8	78	0.4	12	60	0.4	15	10	0.4	18	10	0.4	19	90	0.4	19.1	90	0.5	22	90	0.5	22.1	90	0.4	23	90	0.4
時間 (分)	%B	流量 (mL/min)																																			
0	90	0.4																																			
1	90	0.4																																			
8	78	0.4																																			
12	60	0.4																																			
15	10	0.4																																			
18	10	0.4																																			
19	90	0.4																																			
19.1	90	0.5																																			
22	90	0.5																																			
22.1	90	0.4																																			
23	90	0.4																																			
ストップタイム	23 分																																				
ポストタイム	なし																																				

表 2. 代謝物の LC/Q-TOF 機器パラメータ

Auto MS/MS メソッドパラメータ	Agilent Revident LC/Q-TOF
機器のモード	750 Fragile
イオン源	Agilent Dual Jet Stream
極性	ネガティブ
ガス温度	225 °C
乾燥ガス (窒素)	9 L/min
ネブライザガス	40 psi
シースガス温度	375 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	3,000 V
ノズル電圧	500 V
フラグメント	100 V
スキマ電圧	45 V
オクタポール RF Vpp	750 V
リファレンス質量	m/z 112.985587, m/z 980.016375
MS 範囲	m/z 50 ~ 1,400
MS/MS 範囲	m/z 25 ~ 1,000
MS 取り込みレート	8 スペクトル/秒
最小 MS/MS 取り込みレート	6 スペクトル/秒
選択幅	狭い (~ 1.3 m/z)
コリジョンエネルギー	10, 20, 40 eV
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	2
可変取り込みレート	あり、ターゲットカウント MS/MS : 25,000
MS/MS 累積時間制限の使用	あり
ターゲット TIC に到達できないプリカーサの除去	なし
プリカーサの閾値	5,000 カウントおよび 0.001 %
アクティブな排除	無効
純度	ストリンジエンシー 100 %, カットオフ 30 %
同位体モデル	一般的な有機分子
プリカーサ荷電状態の選択と設定	1、2、不明、荷電状態による
m/z 包含範囲	m/z 50 ~ 1,400
反復 MS/MS 質量誤差許容範囲	20 ppm
反復 MS/MS RT 排除許容範囲	± 0.2 分

表 3. 脂質の RP-LC 機器パラメータ

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II Bio LC																						
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、100 x 2.1 mm、1.8 μ m (部品番号 959758-902)																						
インラインフィルタ	Agilent 1290 Infinity II Bio インラインフィルタキット、0.3 μ m (部品番号 5720-0020)																						
カラム温度	45 °C																						
注入量	5 μ L (All Ions と Auto MS/MS)																						
オートサンブラ温度	20 °C																						
ニードル洗浄	標準洗浄、10 秒、1:1 移動相 A:B																						
移動相	A : 10 mM ギ酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウム、 5 μ M InfinityLab 不活性化添加剤の 5:3:2 水:アセトニトリル:イソ プロパノール溶液 B : 10 mM 酢酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウムの 1:9:90 水:アセトニトリル:イソプロパノール溶液																						
流量	0.4 mL/min																						
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>15</td></tr> <tr><td>2.5</td><td>50</td></tr> <tr><td>2.6</td><td>57</td></tr> <tr><td>9</td><td>70</td></tr> <tr><td>9.1</td><td>93</td></tr> <tr><td>11</td><td>96</td></tr> <tr><td>11.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.2</td><td>15</td></tr> <tr><td>16</td><td>15</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	15	2.5	50	2.6	57	9	70	9.1	93	11	96	11.1	100	12	100	12.2	15	16	15
時間 (分)	%B																						
0	15																						
2.5	50																						
2.6	57																						
9	70																						
9.1	93																						
11	96																						
11.1	100																						
12	100																						
12.2	15																						
16	15																						
ストップタイム	16 分																						
ポストタイム	なし																						

表 4. 脂質の LC/Q-TOF 機器パラメータ

Auto MS/MS メソッドパラメータ	Agilent Revident LC/Q-TOF
機器のモード	1,700 Stable
イオン源	Agilent Dual Jet Stream
極性	ポジティブ
ガス温度	320 °C
乾燥ガス (窒素)	8 L/min
ネブライザガス	45 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V
ノズル電圧	1,000 V
フラグメンタ	175 V
スキマ電圧	45 V
オクタポール RF Vpp	750 V
リファレンス質量	m/z 121.050873、 m/z 922.009798
MS 範囲	m/z 100 ~ 1,700
MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 1,700
MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒
最小 MS/MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒
選択幅	狭い (~ 1.3 m/z)
コリジョンエネルギー	20 eV
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	3
可変取り込みレート	あり、ターゲットカウント MS/MS : 25,000
MS/MS 累積時間制限の使用	あり
ターゲット TIC に到達できない プリカーサの除去	なし
プリカーサの閾値	5,000 カウントおよび 0.001 %
アクティブな排除	有効、2 スペクトル後に排除、 0.05 分後に開放
純度	ストリンジエンシー 70 %、カットオフ 0 %
同位体モデル	一般的な有機分子
プリカーサ荷電状態の選択と設定	1、2、不明、アバundanceによる
m/z 包含範囲	m/z 151 ~ 1,700
反復 MS/MS 質量誤差許容範囲	20 ppm
反復 MS/MS RT 排除許容範囲	\pm 0.1 分

結果と考察

Seahorse XF Pro アナライザの結果から、薬剤処理ではミトコンドリア脱共役により glycoATP と mitoATP の産生速度が低下することが判明

以前のアプリケーションノートでは¹、80 化合物のチロシンキナーゼ阻害剤ライブラリを Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイでスクリーニングして、ミトコンドリア ATP (mitoATP) と解糖 ATP (glycoATP) の ATP 産生速度に対する阻害剤の急性効果を、がん性 THP-1 と健康な末梢血単核細胞 (PBMC) の両方で評価しました。このアプリケーションノートでは、これらの結果から 2 種類の化合物を選択し、その作用に基づいてさらに調査しました。AG-879 では THP-1 がん細胞と健康な PBMC の両方で mitoATP の産生速度が低下しましたが、SU1498 ではがん性 THP-1 細胞では mitoATP の産生速度が低下しましたが、健康な PBMC では低下しませんでした。ここで、これらの化合物の代謝効果に対して、さらに Seahorse XF 特性解析を実行しました。

最初のステップとして、Seahorse XF リアルタイム ATP Rate アッセイを使用して、選択した 2 種類の薬剤による短時間 (2 時間) および長時間 (18 時間) の処理が mitoATP と glycoATP の産生速度に与える影響を測定しました。使用した薬剤の濃度は、以前に測定した mitoATP の最大阻害剤濃度の半分 (IC_{50}) です。¹ いずれの処理時間でも、AG-879 と SU1498 により glycoATP の産生速度が向上し、mitoATP の産生速度の低下が相殺されていました (図 3A および B)。18 時間処理した後、ATP の総産生速度は、18 時間の DMSO 溶媒対照より 20 ~ 30 % 低下しました。これは、処理時間が長いと AG-879 と SU1498 の急性効果が増幅されることを示しています。細胞は、生存している生細胞数に基づいて、Seahorse アッセイ用にプレートに配置しました。このため、チロシンキナーゼ阻害剤の処理による総体的な ATP 産生速度の低下の原因は、細胞生存率の低下ではありませんでした。特に、18 時間の処理後の細胞生存率は高く (> 92 %)、溶媒対照と薬剤処理のグループ全体で一貫していました (図 3C)。

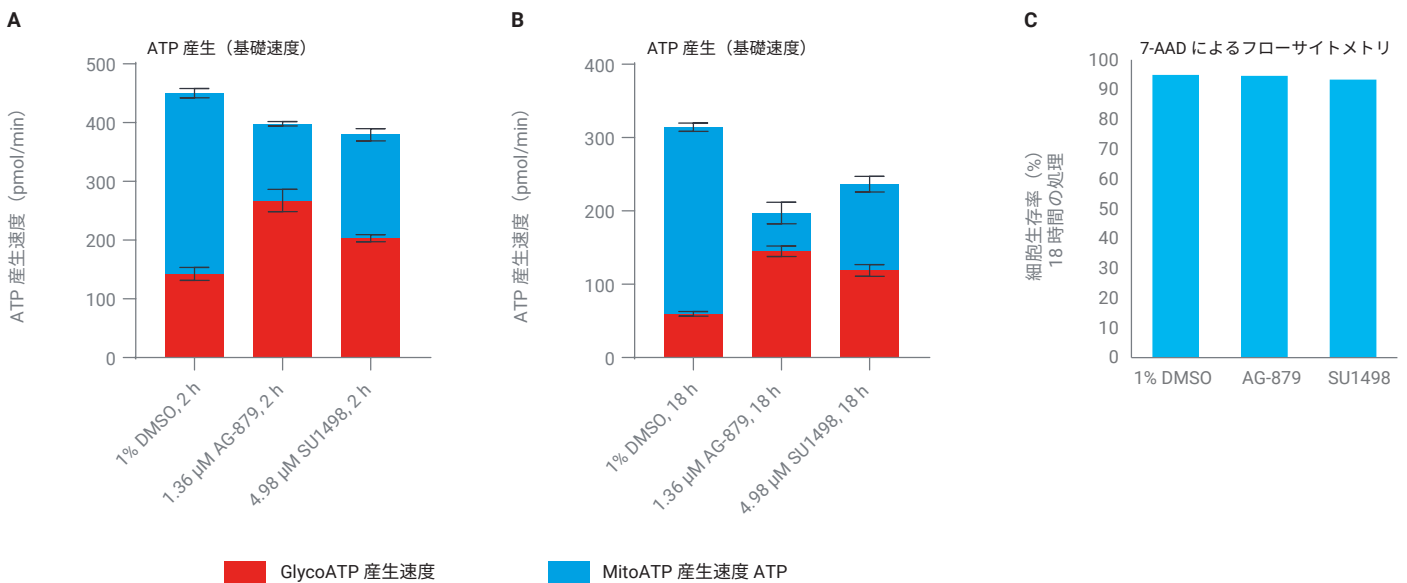


図 3. Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate アッセイは、薬剤処理によるミトコンドリアおよび解糖 ATP 産生速度のモジュレーションを示しています。THP-1 細胞は、溶媒対照 (1% の DMSO)、1.36 μ M の AG-879、または 4.98 μ M の SU1498 で、(A) 2 時間および (B) 18 時間前処理し、mitoATP と glycoATP の産生速度を分析しました。(C) 18 時間の処理の後に、フローサイトメトリと 7-AAD による染色を用いて細胞生存率を測定しました。

ミトコンドリア呼吸速度に対する薬物の影響をより詳しく調べるため、プロトンリークと SRC を分析しました。これらは、Seahorse XF Mito ストレステストキットで提供されている一般的な測定方法です。各種処理グループの細胞のミトコンドリア脱共役の程度の定量化には、プロトンリークを使用しました。ミトコンドリア脱共役とは、細胞がまだミトコンドリア伝達鎖によって酸素を消費しているが、この酸素消費から ATP を効率的に産生できなくなっているため、プロトンがリークしている状態を指す用語です。いずれのチロシンキナーゼ阻害剤も、「ミトコンドリア脱共役剤」となることがわかりました。これは、媒体で処理した細胞と比べてプロトンリークが増加しているためです (図 4A)。ミトコンドリア脱共役を補うため、細胞の glycoATP 速度が向上します (図 3A および B)。

AG-879 と SU1498 により、さまざまな動態で THP-1 のミトコンドリア脱共役が進みました。特に、AG-879 によるプロトンリークは、2 ~ 18 時間の処理で増加しました。これは、脱共役効果が比較的遅いことを示しています (図 4A)。これに対し、SU1498 によるプロトンリークは、2 ~ 18 時間の処理の間に減少しました。これは脱共役が迅速に始まり、18 時間の時点では細胞の酸素消費のダウンレギュレートが、もっと前に発生した脱共役に反応して始まっていたことを示しています。この酸素消費のダウンレギュレーションが、トリカルボン酸 (TCA) サイクル中間体の相対レベルでの摂動の原因となった可能性があります。これは LC/MS メタボロミクス分析により評価しました。また、SU1498 により SRC が減少することもわかりました。SRC は細胞適応度に関連する特性です (図 4B)。AG-879 によって SRC が完全に喪失しました。これは、AG-879 で処理した細胞は、代謝再プログラミングによって薬剤耐性を促進しうる生存信号を使用するための容量が少ない可能性が高いことを示しています。

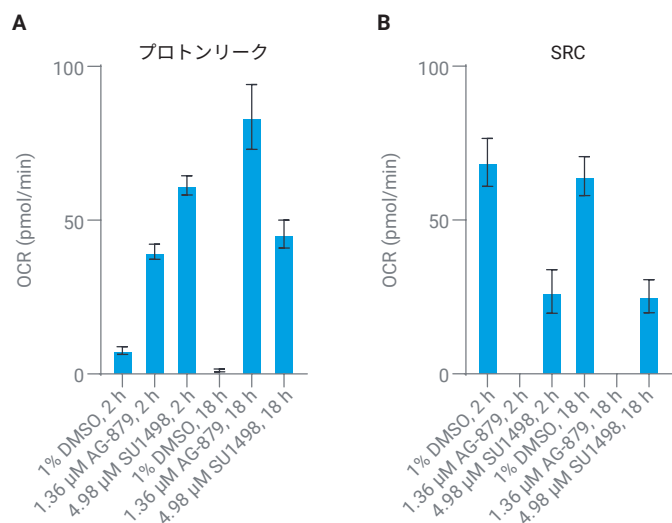


図 4. AG-879 と SU1498 の処理により、ミトコンドリア脱共役が起こり、細胞適応度が低下しました。THP-1 細胞は、溶媒対照 (1% の DMSO)、1.36 μM の AG-879、または 4.98 μM の SU1498 で 2 時間および 18 時間前処理し、(A) プロトンリークと (B) SRC を分析しました。

ノンターゲットメタボロミクスで、Seahorse XF Pro アナライザの結果と相関性が高い解糖とミトコンドリア呼吸に関連する主要代謝物の変化を特定

再溶解した代謝物フラクションの96 ウェルプレートで、特殊な不活性合金 (MP35N) で構成される 1290 Infinity II Bio LC に配置しました。この鉄を含まない流路は、リン酸化合物の分析に優れた性能を発揮します。⁶ 抽出物はこれまでに確立した、細胞代謝物の分離に適した堅牢な HILIC クロマトグラフィーメソッドで分離し、Revident LC/Q-TOF で分析しました。これによりスペクトル品質が向上するため、質量分解能と同位体忠実度が向上し、ダイナミックレンジが拡大します。

HILIC LC/Q-TOF データセットは MassHunter Explorer で処理しました。MassHunter Explorer は、ワークフローガイド付きのユーザーインターフェースを備えた、ノンターゲット LC/Q-TOF データのデータ抽出、正規化、データ解析、フィーチャーの同定を 1 つのアプリケーションでまとめて実行できるソフトウェアです。差分解析を有効にし、薬剤処理の影響を受ける代謝物を見つけるため、溶媒対照、AG-879、SU1498、抽出ブランクのデータファイルを MassHunter Explorer プロジェクトに追加しま

した。データの抽出と正規化の後に、抽出ブランクと細胞サンプルの両方で、同等レベルで検出された化合物をプロジェクトから除外し、1,802 種類の化合物グループを残しました。次に、薬剤 SU1498 と AG-879 に相当する質量値を持ついくつかの化合物グループをプロジェクトから除外し、1,797 種類の化合物グループを残しました。MassHunter Explorer のグラフィカルユーザーインターフェース (GUI) では、ナビゲーションリボンで前後に移動でき、さまざまなワークフロー手順の結果がリンクされています。このケースでは、統計に移動する前に、まず化合物グループを同定しました。内因性代謝物を同定するため、純正標準試料の HILIC-Z リテンションタイムで精査した Agilent METLIN パーソナル化合物データベースおよびライブラリの 471 化合物のサブセットに対して、データベース検索を実行しました。⁵ 必須のデータベース (DB) マッチング基準として質量とリテンションタイムの両方を選択した結果、1,797 種類のアノテーション済み化合物グループのうち、101 種類が残りました (図 5)。質量誤差許容範囲を ± 5 ppm に設定してデータベース検索を実行して、79/101 の化合物の Δ ppm が < 1.0 であったことは、Revident LC/Q-TOF の優れた質量精度を示しています。

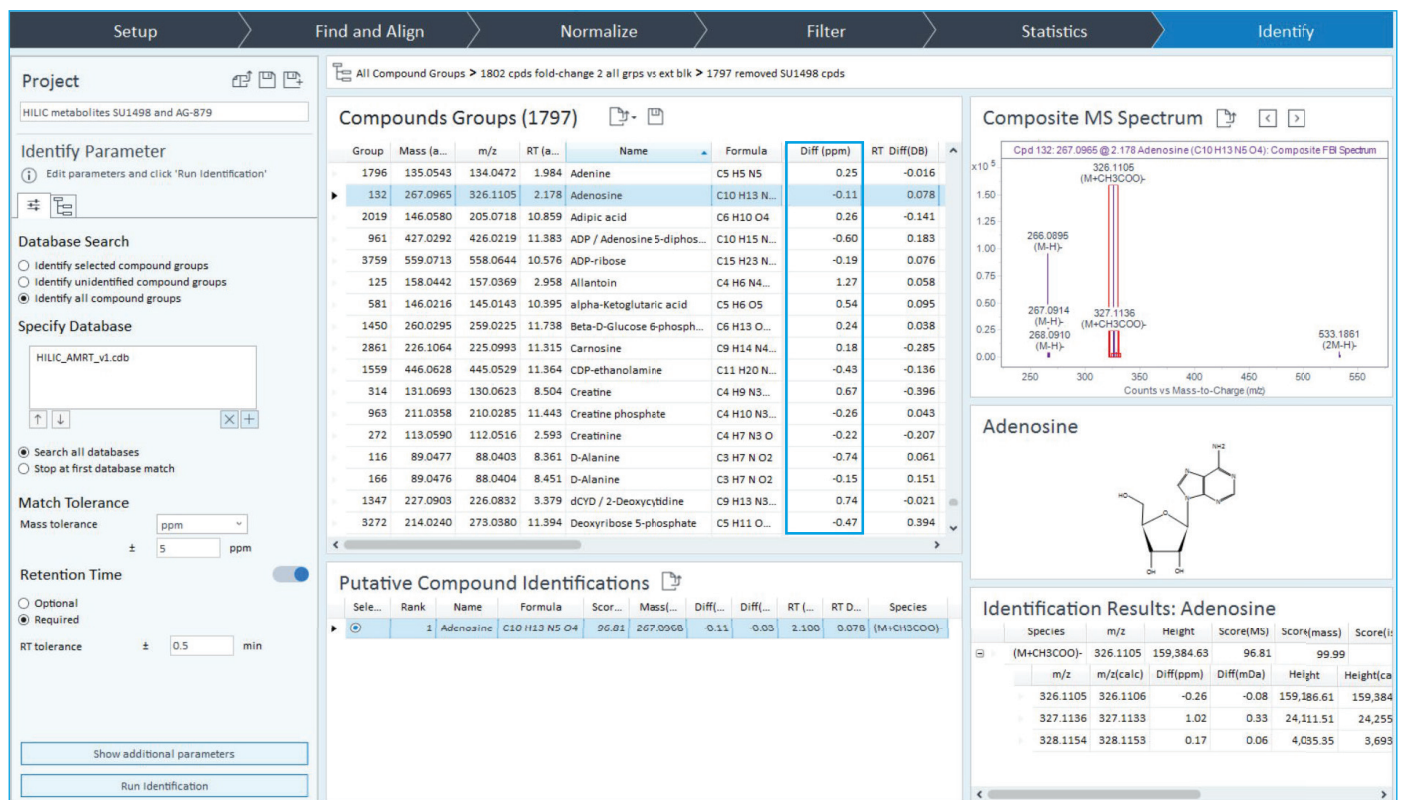


図 5. 「同定」手順からの結果が表示された Agilent MassHunter Explorer ソフトウェアの GUI。471 種類の化合物を含む精査済みデータベース (HILIC RT を含む) を指定した結果、その一部の 101 種類のアノテーション済み化合物グループが表示されています。質量許容範囲は ± 5 ppm、RT 許容範囲は ± 0.5 分でした。 Δ ppm 値は、青色のボックスで強調表示しています。

化合物グループを同定するための統計テストとしては、ボルケーノプロットを使用しました。この結果、薬剤処理したサンプルグループと溶媒対照グループの間に大きな差が見られました。SU1498 で処理したサンプルでは、131 種類の化合物グループが、倍率変化 > 1.5、P < 0.05 の統計的

有意性を示しました (図 6)。同じ統計テストで、AG-879 のボルケーノプロットで有意性を示したのは 6 種類の化合物グループのみでした (図なし)。

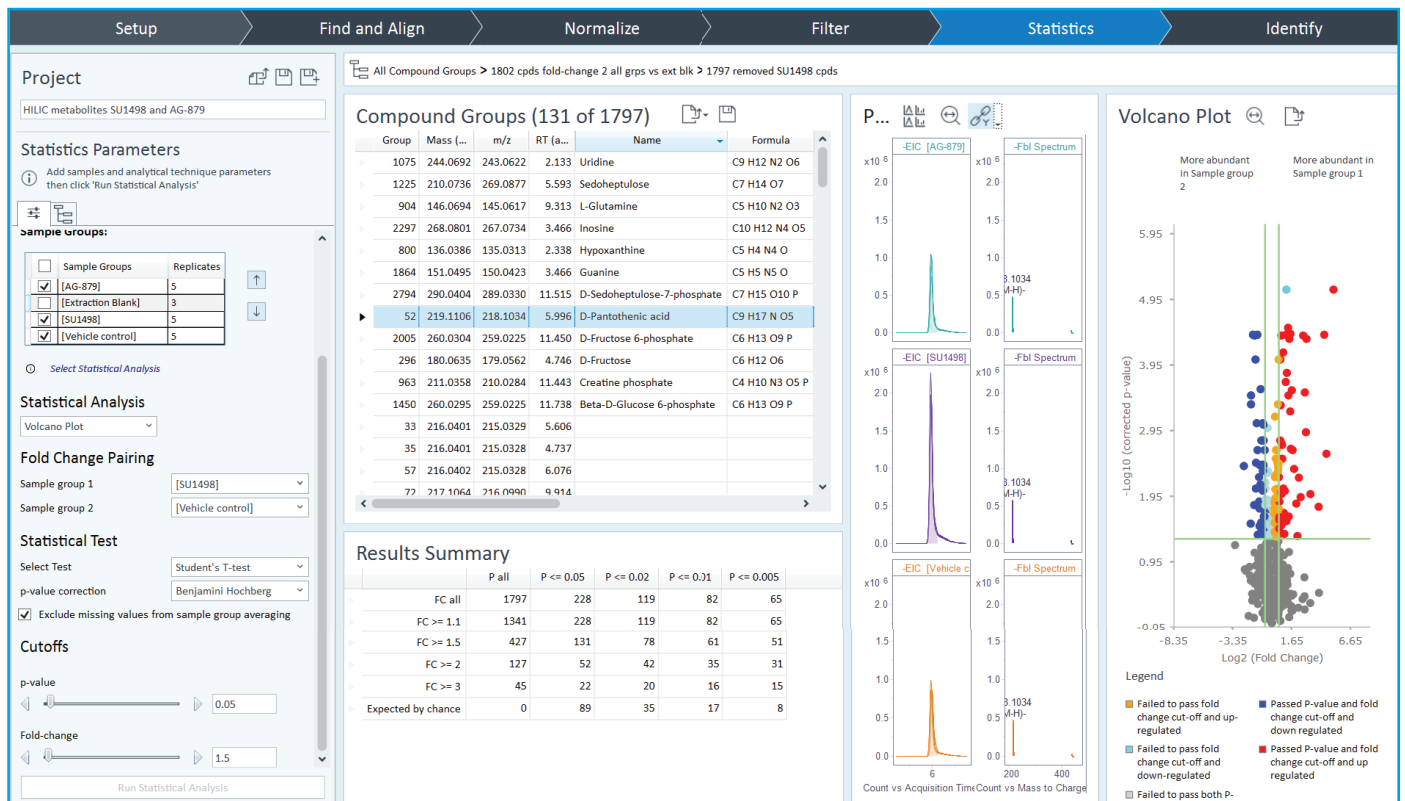


図 6. 「統計」手順からの結果が表示された Agilent MassHunter Explorer ソフトウェアの GUI。SU1498 処理グループで図中のパラメータを適用してボルケーノプロットを実行し、溶媒対照グループの結果と比較しました。d-パントテン酸のアノテーション済み化合物グループが選択されています。対応する抽出イオンクロマトグラムと質量スペクトルをリンクして迅速に視覚化および検証し、ボルケーノプロット内の対応するデータポイントを自動的に水色で強調表示しています。

MassHunter Explorer ソフトウェアの GUI には、主成分分析 (PCA) プロットが表示されています。これは、正規化ステップ、フィルタ、統計テストが適用されるたびに自動更新されます。131 種類の有意な化合物グループに基づく PCA では、薬剤処理したグループと溶媒対照グループが明確に分かれました (図 7A)。主成分 1 (X 軸) はプロットのばらつきへの寄与が最も大きく (68 %)、AG-879 グループは SU1498 グループと溶媒対照グループの間でした。図 7B は、AG-879 と SU1498 の結果の比較と、アノテーション済み代謝物の挙動を示しています。特に、AG-879 処理の 6 種類の有意な化合物グループはすべて SU1498 処理でも見られ、3 種類の共通のアノテーション済み代謝物はいずれの薬剤処理でも減少しました。総合すると、(1) PCA によるサンプルグループの分離度、(2) AG-879 での有意な化合物グループ数の減少、(3) 両方の処理における共通の代謝挙動はすべて、AG-879 処理による細胞代謝への効果は、SU1498 処理と似てはいますが、より弱いものであったことを示しています。AG-879 に反応したミトコンドリア脱共役の動態は SU1498 より低速です。このため AG-879 で長時間処理すれば、AG-879 で 18 時間処理した後よりも、より多くの化合物グループで有意な増減が検出される可能性があります。または、AG-879 の弱い効果の原因は、細胞内の SRC の欠損が原因である可能性もあります。これにより、代替代謝パスウェイを使用するための細胞容量が減少する可能性があります。

いくつかの結論は、Seahorse XF Pro アナライザの結果に関連する特定の代謝物の増減から導き出すことができます。いずれの薬剤処理でも、解糖と同時ペントース (PP) の両方のリン酸塩パスウェイに属するいくつかの糖リン酸が減少しました。Seahorse XF Pro アナライザの結果から、いずれの薬剤処理でも glycoATP の速度が向上したことがわかります (図 3)。またこれは、解糖 (およびおそらく PP パスウェイ) の増加により、糖リン酸を含む解糖中間生成物が激減していることを示します。いっぽう、SU1498 処理ではパントテン酸が増加しました。パントテン酸は、TCA サイクルと脂質生合成に必要なコエンザイム A (CoA) のプリカーサです。前に述べたとおり、SU1498 処理でのプロトンリークデータは、18 時間の処理後の TCA サイクルのダウンレギュレーションを示していました。これは、このプリカーサ化合物の蓄積と深い相関性があります。SU1498 処理による最も顕著な変化は、ウリジン、イノシン、ヒポキサンチン、グアニンが大幅に増加したことです。これらはすべて、プリンおよびピリミジン代謝に含まれる代謝物です。解糖および PP パスウェイフラックスの増加は、これらの代謝物に影響を与える可能性があります。リボース-5-ホスフェートは、プリンおよびピリミジン生合成のプリカーサであるからです。そのため SU1498 処理では、プリン/ピリミジン代謝のその他のプリカーサである L-グルタミンが減少しました。このため、Seahorse XF Pro アナライザで同定した主要なエネルギーパスウェイ外の攪乱代謝物の LC/MS ベースの検出は、LC/MS から得られる知見がこれらの細胞の新たな脆弱性を示す可能性があることの一例であり、これにより治療の組み合わせに関する情報を得ることができます。

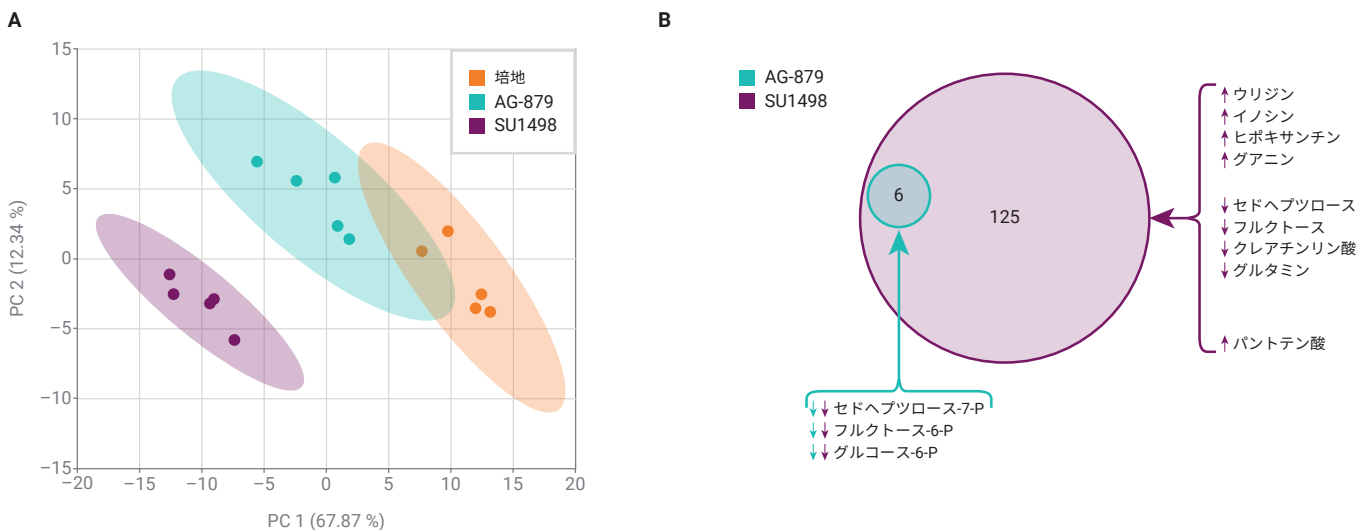


図 7. AG-879 と SU1498 の結果の比較。(A) 131 種類の有意な化合物に基づく PCA。(B) AG-879 処理と SU1498 処理の共通の有意な化合物グループを示すベン図。アノテーション済み代謝物と変化の方向を示しています。矢印は、薬剤処理グループにおける代謝物の濃度の上昇 (↑) または下降 (↓) を、溶媒対照グループとの比較で示しています。

ノンターゲットリポミクスにより、Seahorse XF Pro アナライザおよび LC/MS メタボロミクスの結果と相関性が高い解糖とミトコンドリア呼吸に関連する主要脂質の変化を解明

再溶解した 96 ウェルの脂質プレート を 1290 Infinity II Bio LC に配置し、Revident LC/Q-TOF と接続し、同じハードウェア構成を代謝物の分析に使用しました。抽出物は HILIC-LC ではなく、脂質分離用に最適化された確立済みの RP-LC メソッドで分離⁶、溶出液は Revident LC/Q-TOF で、ポジティブイオンモードで分析しました。

リポミクスデータ解析は、前述の代謝物分析と同様のワークフローに従って実行しました。まず、差分解析を有効にし、薬剤処理の影響を受ける脂質を見つけるため、溶媒対照、AG-879、SU1498、抽出ブランクのデータファイルを MassHunter Explorer プロジェクトに追加しました。データの抽出と正規化の後に、抽出ブランクと細胞サンプルの両方で、同等レベルで検出された化合物をプロジェクトから除外し、2,662 種類の化合物グループを残しました。

統計に進む前に、化合物グループをアノテーションしました。脂質アノテーションを可能にするために、まず MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアを使用して脂質データベースを構築しました。脂質データベースは MS/MS スペクトルからの in silico ライブラリマッチングをベースとしたものです。これらの MS/MS スペクトルは、この実験で使用した THP-

1 細胞と処理、および別の実験で使用した K562 細胞と処理でプールされた、代表的な細胞抽出物から取得しました。特に、6 ポジティブイオンモードと 6 ネガティブイオンモードの、一連の反復的な MS/MS データファイルを解析しました。その結果、16 個のクラスを示す、ポジティブイオンモードでアノテーションした 562 種類の脂質 (図 8A) と、22 個のクラスを示す、ネガティブイオンモードでアノテーションした 500 種類の脂質 (図 8B) を取得できました。MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアの結果をエクスポートして、その結果のデータベース (.cdb) ファイルを MassHunter Explorer ソフトウェアで連続的に検索し、アノテーションを MassHunter Explorer プロジェクトの化合物グループにマッピングしました (図 8C)。MassHunter Explorer プロジェクトはポジティブイオンからのみのデータファイルから作成しましたが、化合物グループの中性質量の計算結果により、極性に関係なくデータベースの中性質量に対してマッチングできました。さらにネガティブイオンデータベースを検索することで、より多くのアノテーションを取得でき、一部のアノテーションの特異性が向上しました。アシル鎖情報は、ネガティブイオンモードの MS/MS データから得られることが多いためです。必須のデータベースマッチング基準として質量とリテンションタイムの両方を選択した結果、23 種類の脂質クラスの 2,662 種類の化合物グループのうち、507 種類のアノテーションが得られました。

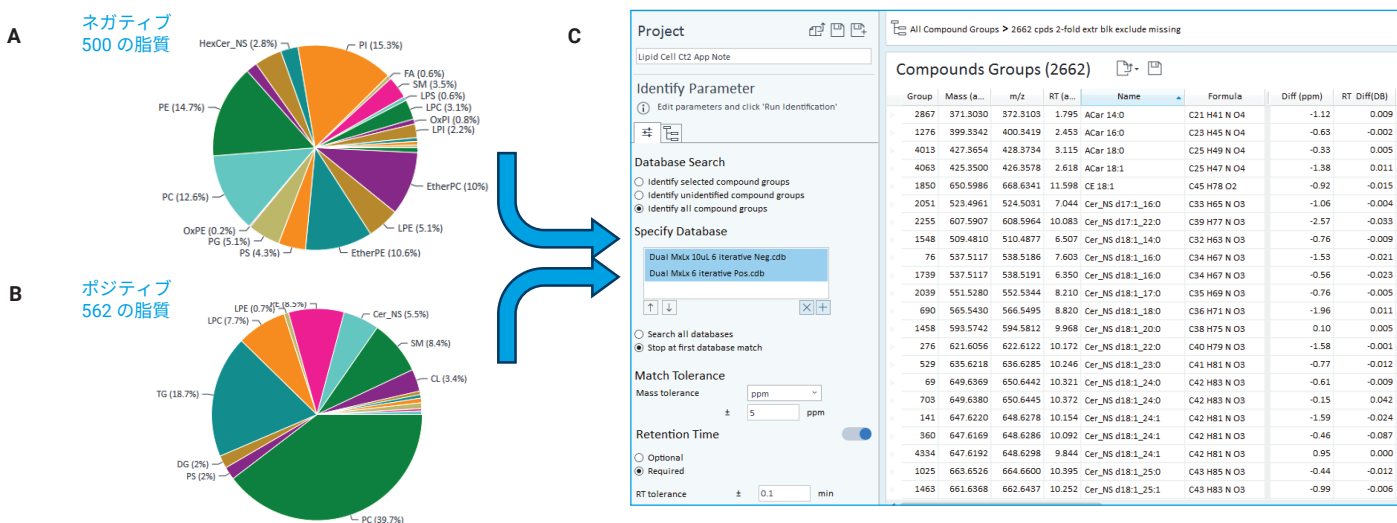


図 8. 脂質のアノテーション方法。6 回の MS/MS のデータファイルを、Agilent MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアでまとめて解析しました。上の円グラフは、(A) ネガティブイオン化モード、(B) ポジティブイオン化モードの主要な脂質クラスの割合を示しています。(C) Agilent MassHunter Explorer ソフトウェアの「ワークフローの特定」ステップで、データベースを連続して利用しました。質量許容範囲は ± 5 ppm、RT 許容範囲は ± 0.1 分でした。

同じようにボルケーノプロットを使用して、代謝物の場合と同様に、有意な脂質化合物を特定しました。SU1498 で処理したサンプルでは、521 種類の化合物グループが、倍率変化 > 1.5、 $P < 0.05$ の統計的有意性を示しました (図 9A)。同じ統計テストで、AG-879 のボルケーノプロットで有意性を示したのは 23 種類の化合物グループのみでした (図 9B)。521 種類の有意な化合物に基づく PCA プロットは、薬剤処理したグループと溶媒対照グループの間に明確な違いがありました (図 9C)。またベン図では、AG-879 処理での 23 種類の有意な化合物グループがすべて、SU1498 処理でも見られました (図 9D)。つまり、このような脂質の結果は代謝物の結果を明確に反映するものであり、細胞代謝に対する AG-879 処理の効果は、SU1498 処理と似ているが、より弱いものであると言えます。またこの原因は、プロトンリークデータが示す AG-879 処理の低速な動態や、AG-879 で処理した細胞における SRC の欠損である可能性もあります。アノテーション済み脂質に関する最も顕著な結果は 62 種類のトリグリセリド (TG) 脂質の増加であり、SU1498 では溶媒対照の

最大 8 倍にもなりました。TG 含有量の増加は、Seahorse XF Pro アナライザによって特定された SU1498 のプロトンリークデータが示すとおり、パントテン酸と同様に、TCA サイクルのダウンレギュレーション後のエネルギープリカーサの蓄積に関連する可能性があります。または、グルタミン濃度の減少と TG の増加を合わせて考えると、SU1498 で処理した細胞が、グルタミンを使用して TCA サイクルを促進し、脂質を産生するアナプレロティック反応の再プログラミングと実行により、処理に適応している可能性があります。これで、パントテン酸の増加も説明できます。アナプレロティック反応の間に産生されるアセチル-CoA は、パントテン酸の動態のフィードバック阻害剤であり、パントテン酸を 4'-ホスホパントテン酸に変換するからです。アナプレロティック反応を利用した糖新生により、glycoATP の産生とその他の生合成プロセスに使用されている解糖フラックスの増加を促進する場合があります。

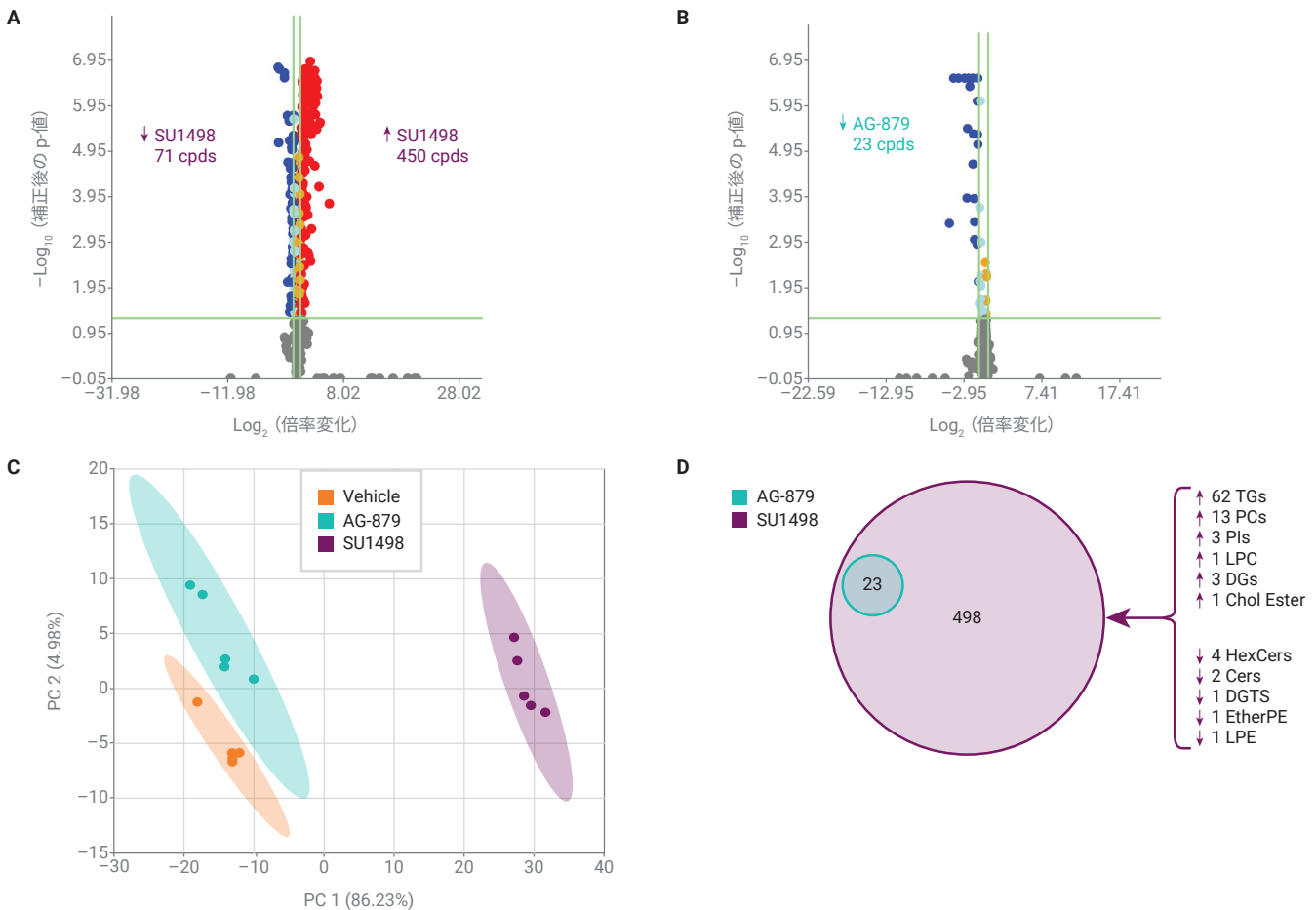


図 9. AG-879 と SU1498 の脂質の結果比較。(A) SU1498 処理グループと溶媒対照グループの比較、および (B) AG-879 処理グループと溶媒対照グループの比較について、ボルケーノプロット分析を行いました。(スチューデントの t 検定、 $FC > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 、ベンジャミニ-ホックバーグ補正を使用) (C) 521 種類の有意な化合物に基づく PCA。(D) AG-879 処理と SU1498 処理の共通の有意な化合物グループを示すベン図。92 種類のアノテーション済み脂質と変化の方向を示しています。矢印は、SU1498 処理における脂質濃度の上昇 (↑) または低下 (↓) を示しています。

MassHunter Explorer ソフトウェアの結果を MPP にエクスポートすることで、高度な統計と視覚化が可能になります。このため、脂質の結果についてより深い知見を得るため、MassHunter Explorer プロジェクトを .pfa ファイルとして MPP にエクスポートしました。脂質マトリックスプロットを作成して、脂質クラス内のアバンダンスの差異を視覚化することができました。TG に基づく脂質クラスマトリックスプロットではほぼ例外なく、溶媒対照よりも SU1498 での TG 脂質のアバンダンスが大きくなっています (図 10A)。前述の MassHunter Explorer のボルケーノプロットでも同様の結果が出ています。ただし、このマトリックスプロットではまた、TG 脂質のプロファイルに明確な差異が見られました。これは、二重結合

の含有量が多い TG は一般的に、SU1498 処理で増えやすいことを示しています。ホスファチジルイノシトール (PI) に基づいて脂質クラスのマトリックスプロットを調べたところ、2 つの特殊な脂質種 (PI 18:1_18:2 と PI 38:6) を除き、PI プロファイルは一般的に不変であることがわかりました (図 10B)。これらの脂質の MS/MS スペクトルは、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) によるエステル化の証拠を示しています。すなわち、リノール酸 (18:2) とアラキドン酸 (20:4) の両方が、エイコサノイド生成に供給されています (図なし)。PI は、これらのシグナル伝達脂肪酸のリザーバとして機能し、がん細胞、特にこの調査で使用する THP-1 細胞株のような p53 変異を含む細胞では、これらの特定の PI 脂質が減少することが

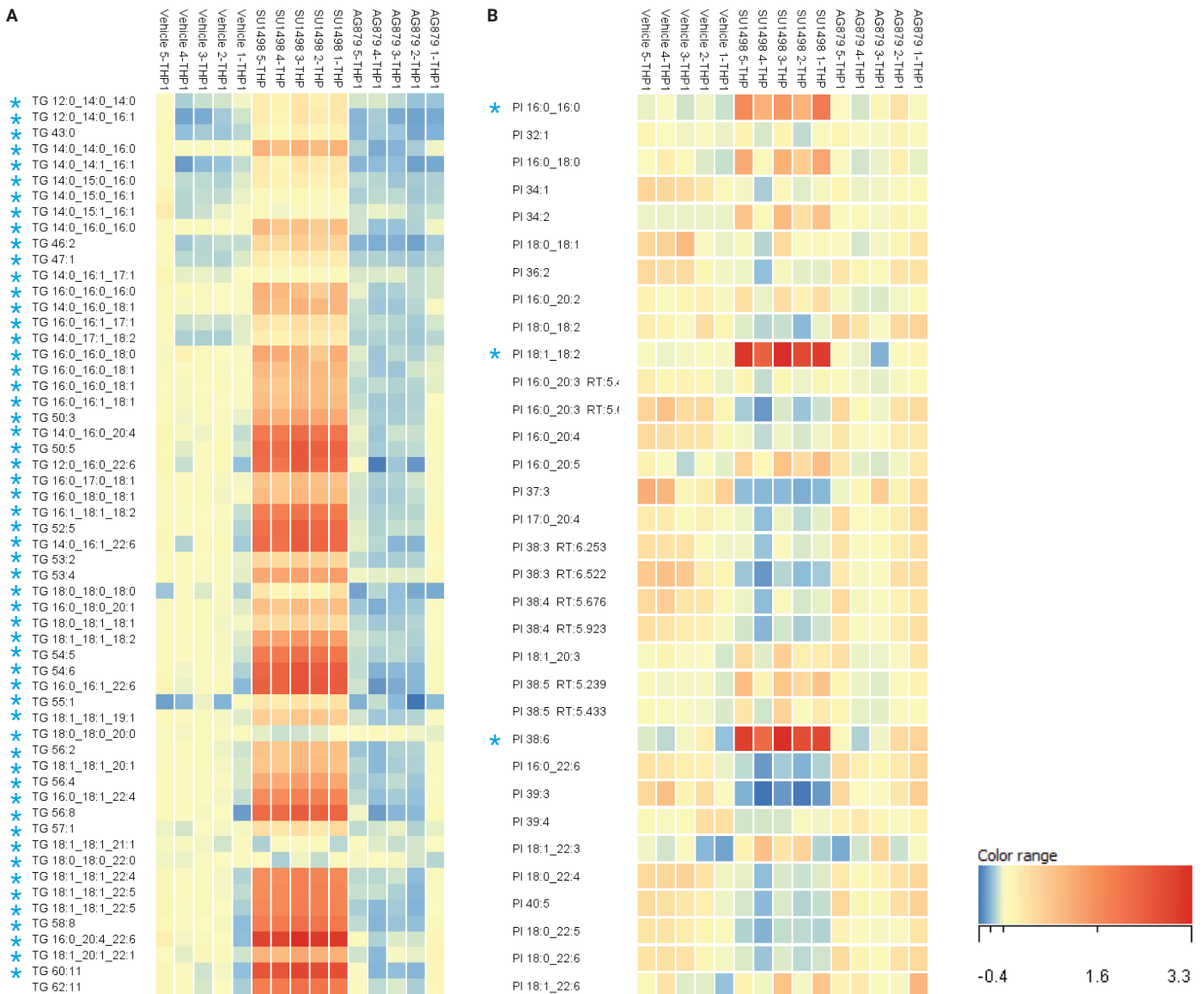


図 10. Agilent MPP ソフトウェアによる、SU1498 処理、AG-879 処理、溶媒対照の複数回のサンプル分析の脂質マトリックスプロット。(A) は TG の 57 種類の脂質フィーチャー、(B) は PI の 33 種類の脂質フィーチャーを示します。Agilent MassHunter Explorer ソフトウェアのボルケーノプロット分析で測定した、SU1498 処理で増加した有意な化合物には、青色のアスタリスク (*) が付いています。

わかっています。結果は、SU1498 処理によって THP-1 細胞中でこれらの PI 脂質の濃度が上がり、これらの細胞の下流のシグナル伝達系に影響している可能性があることを示しています。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Seahorse XF Pro アナライザと Q-TOF LC/MS を組み合わせて、薬剤処理に対するがん細胞の細胞および分子代謝反応に関するより深い知見を提供する包括的なワークフローについて説明しています。特に、AG-879 処理と SU1498 処理の XF 分析は以前の結果を裏付けるものであり¹、いずれの薬剤もミトコンドリア脱共役を引き起こすことが新たにわかりました。ノンターゲットメタボロミクスでは、解糖とミトコンドリア呼吸で影響を受ける主要代謝物の変化を特定しました。これは XF の結果と相関性があります。さらに、プリン/ピリミジン代謝に含まれる、影響を受ける代謝物も特定しました。ノンターゲットリポミクスでは、SU1498 処理と、PUFA を含む PI 脂質でのエンリッチメントにより、TG 含有量が増加しました。後者は、SU1498 処理によってシグナル伝達系が変わったことを示している可能性があります。特に、ミトコンドリア脱共役 (XF)、グルタミンの減少とパントテン酸の増加 (メタボロミクス)、TG の大幅な増加 (リポミクス) などの結果を組み合わせると、SU1498 で処理した細胞がそのシグナル伝達パスウェイを再プログラミングして、アナプレロティック反応を利用して脂質を作っていたという新たな仮説が生まれます。このような仮説の形成は、細胞分析手法を組み合わせることによってのみ可能となります。AG-879 処理の後で検出されるより限定的な代謝物と脂質の変化は、さまざまな要因で発生する可能性があります (AG-879 による SRC の欠損、2 つの阻害剤の動態の違い、選択した薬剤の濃度など)。さらに調査を進めるには、さまざまな方法があります。例えば (1) 未知の有意なフィーチャーのさらなるマイニング、(2) Agilent MassHunter VistaFlux ソフトウェアによる定性フラックス分析⁸、(3) Agilent Seahorse XF 基質酸化ストレステストキットを用いた、薬剤処理による燃料依存の評価、(4) 健康な PBMC 細胞で同様の調査を実施し、THP-1 がん細胞への代謝パスウェイの摂動を比較する、などです。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45477.0354166667

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, July 30, 2024

5994-7449JAJP

参考文献

1. Vander Heiden, M. G.; et al. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, 324(5930), 1029–1033.
2. Kam, Y.; et al. Rapid Bioenergetic Functional screening of Anticancer Drug Candidates. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5651EN, **2023**.
3. Van de Bittner, G. C.; et al. 哺乳類細胞サンプル用の代謝物 + 脂質のデュアル自動化サンプル前処理ワークフロー . Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-5065JAJP, **2022**.
4. Wang, G.; et al. Using the Agilent NovoCyte Flow Cytometer for Immune Suspension Cell Normalization in Agilent Seahorse XF Assays. Agilent Technologies application note, publication number 5994-6245EN, **2023**.
5. Yannell, K.; et al. An End-to-End Targeted Metabolomics Workflow. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5628EN, **2023**.
6. Huynh, K.; et al. 包括的なハイスループットメソッドによる血漿リポドームの詳細分析. Agilent Technologies application note, publication number 5994-3747JAJP, **2021**.
7. Feith, A.; et al. 鉄を含まない流路によるメタボロミクス分析の改善. Agilent Technologies application note, publication number 5994-4622JAJP, **2022**.
8. Wattananavitchakorn, S.; et al. HepG2 細胞中の 13C グルコースの定性フラックス分析. Agilent Technologies application note, publication number 5994-0713JAJP, **2019**.