



A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium

塩見, 優紀

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5200

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005200>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	塩見 優紀
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5200 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium(DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおけるメタボローム解析)

審 査 委 員

主 査	教 授	伊藤 智雄
	教 授	的崎 尚
	教 授	平田 健一

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium

DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおけるメタボローム解析

神戸大学大学院医学系研究科内科学講座消化器内科学分野専攻

消化器内科学

(指導教員：東 健 教授)

塩見 優紀

DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

A. 研究目的

炎症性腸疾患は、Crohn 病と潰瘍性大腸炎に代表される慢性の腸管炎症を主体とした原因不明の疾患である。これまでの広範な基礎研究や臨床研究から、遺伝的素因に加えて環境因子が作用し、過剰な免疫応答が生体に生じて炎症性腸疾患が発症すると考えられている。メタボロミクスは、様々な条件下における低分子量代謝産物の特徴や相互作用を、包括的、かつ、網羅的に探索する研究手法である。そこで、炎症性腸疾患の病態解明を目的として、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎マウスモデルを、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いたメタボロミクスに供し、腸炎マウスから採取した血清と大腸組織中の低分子量代謝産物の変動について評価した。

B. 研究方法

C57BL/6J マウス (6-8 週齢、メス) に 3%DSS 溶液を 5 日間投与し、その後、水に変更し 10 日目まで体重変化や便の性状などの臨床症状を毎日観察した。また、7 日目と 10 日目にマウスから血清を採取するとともに、大腸を取り出して大腸の長さを測定後、ホルマリン固定し、組織切片の作製、HE 染色を行うことで組織学的評価を実施した。なお、炎症の程度は既法に基づき数値化した。体重変化、臨床症状、組織学的変化により、7 日目は炎症期、10 日目は炎症収束期と設定して矛盾しないことを確認した。この炎症期群と炎症収束期群に陰性対照群を加えた合計 3 群に分類し、血清と大腸組織を用いてメタボローム解析を実施し、代謝産物プロファイルを比較検討した。各検体から水溶性代謝産物を抽出し、GCMS 測定のための誘導体化処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010plus) を用いて、代謝産物の網羅的な解析を実施した。

また、グルタミンを飲水に溶解し、DSS 誘発性腸炎モデルマウスに摂取させる実験を実施した。このグルタミンを添加した DSS 誘発性腸炎モデルマウスからも同様に血清と大腸粘膜組織を採取し、グルタミン量を測定するとともに、大腸の組織学的評価を実施した。さらに、DSS 誘発性腸炎モデルマウスの実験結果のヒトへの適用性を確認するために、潰瘍性大腸炎患者、あるいは、健康人から採取した血清と大腸組織とを用い、血清中、ならびに、大腸中のグルタミン量を測定した。

C. 研究結果

1) DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

マウス血清と大腸粘膜組織とを用いて代謝産物の解析を行った結果、炎症期と炎症収束期において、非炎症期に比して有意に変動する代謝産物を数種

同定した。組織から得られた代謝産物のデータに基づいて多変量解析を実施し、炎症期と炎症収束期、非炎症期のグルーブ化が可能であることを確認できたとともに、各群における特徴的な代謝産物を見出した。

2) グルタミン添加による DSS 誘発性腸炎への影響

大腸組織から得られた代謝産物プロファイルに基づいて、多変量解析である PLS-DA を行った。PLS-DA loadings plots の中で、腸炎の進展を反映して変動する物質のひとつとしてグルタミンを見出した。グルタミンは、代謝産物プロファイリングの結果においても腸炎の進展によってその存在量が劇的に減少し、炎症の収束に伴い回復する傾向が確認できたことから、DSS 誘発性腸炎のモデルマウスにグルタミンを摂取させる実験を実施した。この結果、グルタミン投与により腸炎治療効果が得られることが明らかとなった。このモデルマウスから、血清と大腸粘膜組織を採取しメタボローム解析を行い、グルタミン値を測定した。DSS 投与後にグルタミンを摂取させることで、血清中グルタミン値は減少していたが、大腸組織においてはその用量依存的にグルタミン値が増加する傾向が観察された。

3) 潰瘍性大腸炎患者の血清と組織におけるグルタミン値

潰瘍性大腸炎患者、あるいは、健常人から採取した血清と大腸組織とを用いて GCMS によるメタボローム解析を実施した。潰瘍性大腸炎患者の血清グルタミン量は健常人に比して有意に減少しており、潰瘍性大腸炎患者の炎症部位の組織中のグルタミン量もまた、非炎症部位の値に比して減少している結果が得られた。この結果は、腸炎モデルマウスにおけるグルタミンの変動と同様な結果であった。

D. 考察

メタボロミクスとは、遺伝的背景、環境因子、発達過程などを含めた、ある条件下での低分子量代謝産物の特徴や相互関係を包括的、かつ、網羅的に探究する研究手法である。すなわち、メタボローム解析を実施することで、細胞や組織の代謝過程について様々な情報を得ることができる。今回の研究結果では、腸炎が生じることによって代謝産物プロファイルが変動することを明らかにした。したがって、メタボローム解析の手法を採用することによって、他の疾患についての遺伝的背景だけでなく、環境因子、疾患の進展程度をもふまえた代謝過程の全体的な展望をみることができると考える。

また、今回の研究では、大腸組織から得られた代謝産物のデータに基づいて、多変量解析を実施し、腸炎の進展をよく反映して変動した物質のひとつとしてグルタミンを見出した。代謝産物プロファイリングの結果においても、グルタミンは腸炎の進展によって劇的に変動することを確認しており、これはグルタミン値が炎症の程度によって変動することを示すと考えられた。さらに、潰瘍性大腸炎患者から採取した検体におけるグルタミン値の変動は、こ

のモデルマウスにおけるグルタミン値の変動と同様な結果であることも確認しており、このことはメタボロミクスの医学分野における有用性を示している。腸管粘膜にとってグルタミンは主要なエネルギー源であり主な呼吸基質でもある。このグルタミンを添加した実験結果から、グルタミン投与により腸炎治療効果が得られることが示された。この効果は、腸管動脈経路だけでなく管腔経路によっても腸粘膜へのグルタミン供給が増加し代謝促進につながったことと、グルタミン投与による免疫細胞の機能増強により、腸管損傷に対してグルタミンが効果的に作用したためと考える。

E. 結論

炎症性腸疾患モデルマウスの血清と大腸組織とを用いてメタボローム解析を実施した結果、メタボロミクスは腸炎の進展を反映することができるということ、さらには、メタボロミクスにより、炎症性腸疾患に対して治療効果を発揮できる物質を探索できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2167号	氏 名	塩見 優紀
論文題目 Title of Dissertation	A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおけるメタボローム解析		
審査委員 Examiner	主 査 岸森 智雄 Chief Examiner 副 査 的 崎 尚 Vice-examiner 副 査 平 田 健 一 Vice-examiner		

メタボローム解析が近年盛んに行われるようになってきたが、腸炎に関しての報告はまだほとんど行われていないのが現状である。そこで、発表者は腸炎モデルマウスを用い、その血清や大腸組織における metabolites の変化をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を用いて検討した。まず、腸炎を惹起するために、C57BL/6J マウスに 3.0% dextran sulfate sodium (DSS) を混和したものを5日間飲ませた。その後は水のみとして飼育した。この結果腸炎が惹起されるが、体重、腸の長さ、さらに組織学的な炎症スコアの経時的な観察を行った。組織学的検討は、7日目と10日目に行い、過去にみられる論文を参考として組織学的な炎症程度をスコアリングし、比較を行った。Metabolites のうち、TCA サイクルの中間産物とアミノ酸の変化を検討した。そして、Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) によってクラスタリング解析を行い、腸炎の程度によってパターンが異なるかどうかを検討した。さらに、発表者はグルタミンに着目し、これを経口投与させることによって、腸炎の変化を観察した。

その結果、マウスの体重はコントロール群に比較して5日目より有意となる低下を示し始め、7日後より回復傾向となった。組織学的炎症スコアは7日目が高く、10日目には消退傾向を示した。このことから、7日目は急性期を反映し、10日目は回復期であるということが示唆されるものである。

低分子量の metabolites は血清と腸組織から検討され、92の metabolites のうち77種類が同定された。それぞれの peak intensity は 2-isopropylmalic acid を internal control として normalize され、比較された。血清では7日目においては12種類の metabolites がコントロールマウスと比較して高値を示した。また、14種類の metabolites は逆に低値を示していた。10日目では10種類の metabolites が高値、8種類が低値となっていた。大腸では、7日目では32種類が高値、2種類が低値であった。これらから、腸炎の変化は metabolites の変化と関連性があることが明らかになった。TCA サイクルでの検討では、citric acid, isocitric acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid の血清中での減少が7日目に観察された。さらに、10日目にはこれらの値は回復がみられた。組織中では、citoric acid, isocutoric acid, succinic acid は逆に7日目では低下していた。アミノ酸の変化では23種類のアミノ酸とそれらの derivatives が血清中で検出された。大部分は7日目では上昇がみられたが、glutamine, tryptophan, tyrosine, asparagine, glycine は低値となった。

Glutamine を投与したマウスでは、7日目において用量依存性に histological score の改善がみられ、炎症抑制効果が認められた。

以上、本研究は、腸炎モデルマウスにおけるメタボローム解析の有用性を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腸炎におけるアミノ酸などの変化に関して重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。