



GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis

大井, 充

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5328

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005328>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた潰瘍性大腸炎におけるアミノ酸と
TCA サイクル関連分子のプロファイリング

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
内科学講座 消化器内科学分野
(指導教員：東 健 教授)

大井 充

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた潰瘍性大腸炎におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング

A. 研究目的

炎症性腸疾患は、クローン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その結果として炎症性腸疾患が発症すると考えられている。近年、免疫と炎症におけるアミノ酸の役割が明らかになるにつれ、炎症性腸疾患に対するアミノ酸の関与が注目され始めた。そこで本研究では、潰瘍性大腸炎患者のアミノ酸プロファイルがその病態に起因するの否かを検討するため、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いて潰瘍性大腸炎患者の大腸生検組織と血清中のアミノ酸と TCA サイクル関連分子の分析を実施した。

B. 研究方法

神戸大学附属病院、ならびに、兵庫医大病院通院中の炎症性腸疾患患者から提供されたサンプルを用いて実験を実施した。本研究は両病院の倫理委員会の許可を得るとともに、患者に対する十分なインフォームドコンセントのもと行った。大腸組織に関しては 22 例の潰瘍性大腸炎患者の大腸内視鏡における生検組織を、また、血清は 13 例の潰瘍性大腸炎患者と 21 例のクローン病患者、および 17 例の健常人のものを使用した。得られた血清と大腸組織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、GCMS-QP2010plus を用いて、アミノ酸と TCA サイクル関連分子を分析した。

C. 結果

1) 潰瘍性大腸炎大腸組織におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング

はじめに、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜組織を用いてアミノ酸と TCA サイクル関連分子の解析を行った。盲腸を対照サンプルとして、また、直腸を病変組織として測定を実施し、19 種類のアミノ酸と 7 種類の TCA サイクル関連分子の存在を決定した。そのうち 16 種類のアミノ酸と 5 種類の TCA サイクル関連分子の存在量が病変組織において対照組織に比べて有意に低下していた。

2) 炎症性腸疾患患者の血清におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング

健常人、潰瘍性大腸炎患者、ならびに、クローン病患者の血清サンプルを用いてアミノ酸と TCA サイクル関連分子の解析を行った。その結果、血清中において

20 種類のアミノ酸と 7 種の TCA サイクル関連分子の存在を見出した。血清から得られたアミノ酸と TCA サイクル関連分子のデータに基づいて多変量解析のひとつである PLS-DA を実施し、PLS-DA loading plots において各群における特徴的なアミノ酸・TCA サイクル関連分子を見出した。潰瘍性大腸炎患者ではアスパラギン酸とグリシンが、クローン病患者ではフマル酸とリンゴ酸、プロリンが特徴的な物質であった。また、炎症性腸疾患患者と健常者においては、血清中のヒスチジンとグルタミン、トリプトファン量に有意な違いが認められた。

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。今回の実験では、低分子代謝産物の中でもアミノ酸と TCA サイクル関連分子に着目し、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織と血清中のアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリングを、GCMS を用いて実施した。潰瘍性大腸炎患者の大腸組織を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリングでは、16 種類のアミノ酸と 5 種類の TCA サイクル関連分子の存在量が、病変組織において対照組織に比べて有意に低下することを確認した。このことは潰瘍性大腸炎の病変組織において炎症により損傷した粘膜を修復するために必要なエネルギー代謝が十分に行われていないことを示唆していると考えた。また、アミノ酸や TCA サイクル関連分子のレベルの低下が潰瘍性大腸炎そのものの病勢とあまり相関関係がなかったことから、アミノ酸や TCA サイクル関連分子のプロファイルが潰瘍性大腸炎の病態生理と深く関係すると考えた。さらに、血清を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリングにおいて、健常者と潰瘍性大腸炎患者の間に有意な違いを認めたことから、この血清プロファイルの違いは病変組織でのアミノ酸代謝と関係する可能性が示唆された。さらに、詳細な解析により潰瘍性大腸炎とクローン病、健常人間を特徴づける分子の同定も可能であったことから、血清を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリングが潰瘍性大腸炎やクローン病の新しい診断ツールとして有用である可能性が示唆された。今まで汎用的に臨床の場で用いられてきた CRP が上昇していない患者サンプルでも著明な変化が認められたことから、確定診断の難しい早期の段階においても診断ツールとして有用ではないかと考えられた。

E. 結論

GCMS を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子プロファイリングによって

明らかになった潰瘍性大腸炎患者大腸組織や血清におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子の変動は、潰瘍性大腸炎の病態生理に深く結びつく可能性を示唆しているとともに、GCMS を用いたアミノ酸と TCA サイクル関連分子プロファイリングは潰瘍性大腸炎の早期診断に有用であ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 2199 号	氏 名	大井 充
論文題目 Title of Dissertation	GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた潰瘍性大腸炎におけるアミノ酸と TCA サイクル関連分子のプロファイリング		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 具 英次 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		
審査修了日	平成 23 年 6 月 15 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

炎症性腸疾患は、クローン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その結果として炎症性腸疾患が発症すると考えられている。近年、免疫と炎症におけるアミノ酸の役割が明らかになるにつれ、炎症性腸疾患に対するアミノ酸の関与が注目され始めた。申請者らは、潰瘍性大腸炎患者のアミノ酸プロファイルがその病態に起因するの可否かを検討するため、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて潰瘍性大腸炎患者の大腸生検組織と血清中のアミノ酸と TCA サイクル関連分子の分析を実施した。

(方法)

神戸大学附属病院、ならびに、兵庫医大病院通院中の炎症性腸疾患患者から提供されたサンプルを用いた。大腸組織に関しては 22 例の潰瘍性大腸炎患者の大腸内視鏡における生検組織を、また、血清は 13 例の潰瘍性大腸炎患者と 21 例のクローン病患者、および 17 例の健常人のものを使用した。得られた血清と大腸組織から水溶性代謝産物を抽出し、GC/MS 測定のための誘導体化処理を行った後、GC/MS-QP2010plus を用いて、アミノ酸と TCA サイクル関連分子を分析した。

(結果)

はじめに、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜組織を用いてアミノ酸と TCA サイクル関連分子の解析を行った。盲腸を対照サンプルとして、また、直腸を病変組織として測定を実施し、19 種類のアミノ酸と 7 種類の TCA サイクル関連分子の存在を決定した。そのうち 16 種類のアミノ酸と 5 種類の TCA サイクル関連分子の存在量が病変組織において対照組織に比べて有意に低下していた。

次に、健常者、潰瘍性大腸炎患者、ならびに、クローン病患者の血清サンプルを用いてアミノ酸と TCA サイクル関連分子の解析を行った。その結果、血清中において 20 種類のアミノ酸と 7 種の TCA サイクル関連分子の存在を見出した。血清から得られたアミノ酸と TCA サイクル関連分子のデータに基づいて多変量解析のひとつである PLS-DA を実施し、PLS-DA loading plots において各群における特徴的なアミノ酸・TCA サイクル関連分子を見出した。潰瘍性大腸炎患者ではアスパラギン酸とグリシンが、クローン病患者ではフマル酸とリンゴ酸、プロリンが特徴的な物質であった。また、炎症性腸疾患患者と健常者においては、血清中のヒスチジンとグルタミン、トリプトファン量に有意な違い

が認められた。

(考察)

今回申請者らは低分子代謝産物の中でもアミノ酸とTCAサイクル関連分子に着目し、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織と血清中のアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングをGC/MSを用いて実施した。潰瘍性大腸炎患者の大腸組織を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングでは、16種類のアミノ酸と5種類のTCAサイクル関連分子の存在量が、病変組織において対照組織に比べて有意に低下することを確認した。このことは潰瘍性大腸炎の病変組織において炎症により損傷した粘膜を修復するために必要なエネルギー代謝が十分に行われていないことを示唆していると考えた。また、アミノ酸やTCAサイクル関連分子のレベルの低下が潰瘍性大腸炎そのものの病勢とあまり相関関係がなかったことから、アミノ酸やTCAサイクル関連分子のプロファイルが潰瘍性大腸炎の病態生理と深く関係すると考えた。さらに、血清を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングにおいて、健常者と潰瘍性大腸炎患者の間に有意な違いを認めたことから、この血清プロファイルの違いは病変組織でのアミノ酸代謝と関係する可能性が示唆された。さらに、詳細な解析により潰瘍性大腸炎とクローン病、健常人間を特徴づける分子の同定も可能であったことから、血清を用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子のプロファイリングが潰瘍性大腸炎やクローン病の新しい診断ツールとして有用である可能性が示唆された。今まで汎用的に臨床の場で用いられてきたCRPが上昇していない患者サンプルでも著明な変化が認められたことから、確定診断の難しい早期の段階においても診断ツールとして有用ではないかと考えられた。

本研究は、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織や血清についてアミノ酸とTCAサイクル関連分子の変動を明らかにしたものであるが、この結果は、潰瘍性大腸炎の病態生理を解明する可能性を示すとともに、GC/MSを用いたアミノ酸とTCAサイクル関連分子プロファイリングが潰瘍性大腸炎の早期診断に有用である可能性が示したものとして価値あるものと認める。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。