



Metabolomic analysis to discover candidate therapeutic agents against acute pancreatitis

坂井, 文

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5619

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005619>

※ 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

Metabolomic analysis to discover candidate therapeutic agents against acute pancreatitis

メタボロミクスを用いた膵炎治療薬の探索

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員：東 健 教授)

坂井 文

メタボロミクスを用いた膵炎治療薬の探索

A. 研究目的

急性膵炎は年々増加傾向にある疾患のひとつである。膵腺房細胞内でプロテアーゼなどの酵素が活性化することで膵組織を自己消化と言われていているものの、正確な病態は未だ明らかにされていない。細胞内酵素が活性化されると、好中球浸潤を伴った炎症反応が生じ、全身性炎症反応症候群に発展し死亡することもある。そのため、新たな治療薬の探索が必要であ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代謝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、急性膵炎で生じる低分子代謝物の変動を評価するため、2つの膵炎モデルマウス、すなわち、セルレイン誘発性膵炎モデルとアルギニン誘発性膵炎モデル、における血清、ならびに、膵組織中の代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) により分析し、その変動代謝物が急性膵炎の重症度に影響するか否かについて検討した。

B. 研究方法

セルレイン膵炎モデル作成のため、C57BL/6J マウス (9-10 週齢、オス) に 50 μ g/kgBW セルレインを一時間毎に 6 回腹腔内投与し、初回投与から 8 時間後に血清、ならびに、膵組織を採取した。また、アルギニン膵炎モデル作成のため、C57BL/6J マウス (9-10 週齢、オス) に 4.7 g/kgBW L-アルギニン塩酸塩を 1 時間毎に 2 回腹腔内投与し、初回投与から 48 時間、72 時間後に血清と膵組織とを採取した。両モデルにおいて、血清中の膵アミラーゼ活性を測定し、また、膵組織はホルマリン固定後組織切片を作成して HE 染色を行うことで組織学的評価を実施した。上記方法により膵炎モデルが作成されていること、特に、アルギニン膵炎では 48 時間後に比べ 72 時間後では膵炎が軽快傾向であることを確認した。このセルレイン膵炎モデルマウスと陰性対照群、アルギニン膵炎モデルマウス (48 時間、ならびに、72 時間後) と陰性対照群の血清と膵組織を用いてメタボローム解析を実施し、代謝物プロファイルを比較検討した。各検体から水溶性代謝物を抽出し、GCMS 測定のため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-QP2010 Ultra) を用いて代謝物の網羅的解析を実施した。

また、グルタミン酸と O-ホスホエタノールアミン (PEA) をセルレイン膵炎モデルマウスに投与する実験を実施した。50 mg/kgBW or 100 mg/kgBW グルタミン酸、あるいは、200 mg/kgBW or 400 mg/kgBW PEA をセルレイン初回投与から 1 時間後より 1 時間毎に 5 回腹腔内投与し、8 時間後に血清と膵組織

とを採取した。血清中の膵アミラーゼ活性と膵組織中のミエロペルオキシダーゼ活性の測定、膵組織の HE 染色を行い、生化学的、および、組織学的に膵炎の変化を評価し、膵組織中のグルタミン酸・PEA 量を測定した。

C. 研究結果

1) セルレイン膵炎、アルギニン膵炎におけるメタボローム解析

マウスの血清と膵組織を用いて代謝物の解析を行った結果、膵炎群では陰性対照群に比べて有意に変動する代謝物を数種同定した。エネルギー産生に関与する TCA 回路の中間代謝物も有意に変動していた。また、膵炎特異的に変動する代謝物として、セルレイン膵炎とアルギニン膵炎 (48 時間) に共通して有意な変動を示す代謝物質を数種見出した。その中でも、膵組織中で有意に減少する代謝物としてグルタミン酸と 0-ホスホエタノールアミンに注目した。

2) グルタミン酸添加によるセルレイン膵炎への影響

グルタミン酸は両膵炎モデルにおいて膵組織中での存在量が有意に減少していたことから、セルレイン膵炎モデルマウスにグルタミン酸を投与する実験を実施した。この結果、グルタミン酸投与により膵炎の改善効果が得られることが明らかになった。また、膵組織のメタボローム解析を行ったところ、膵炎により減少したグルタミン酸量が正常レベルまで回復していることが観察できた。

3) 0-ホスホエタノールアミン (PEA) 添加によるセルレイン膵炎への影響

グルタミン酸と同様に、PEA も両膵炎モデルにおいて膵組織中で存在量が有意に減少していたことから、セルレイン膵炎モデルマウスに PEA を投与する実験を実施した。この結果、PEA 投与により膵炎の改善効果が得られることが明らかになった。また、膵組織のメタボローム解析を行った結果、膵炎により減少した PEA 量が正常レベル以上に容量依存的に増加していることが観察された。

D. 考察

メタボロミクスとは、内因性・外因性要因 (酵素因子・病理学的因子・環境因子・生活スタイル) などを含めた、ある条件下での低分子代謝物の特徴や相互的関係を包括的、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と考えられる。今回の研究結果では、急性膵炎が生じることによって代謝物プロファイルが変動することが明らかとなった。特に、エネルギー産生に関与する TCA 回路の中間代謝物は血清と膵組織とで変

動パターンが異なり、急性膵炎におけるエネルギー代謝の変化を全身レベル、ならびに、細胞レベルで評価できた。したがって、メタボローム解析の手法を採用することで急性膵炎における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 2 つの膵炎モデルにおいて共通して変動する代謝物が観察され、膵炎特異的に変動する代謝物と考えられた。その中でも、膵組織中で有意に減少する代謝物としてグルタミン酸と 0-ホスホエタノールアミン (PEA) が見出された。グルタミン酸はエネルギー産生過程における器質の一つである。急性膵炎では全身のエネルギー需要が増加する。また、膵腺房細胞内では ATP 量が減少し、膵炎の経過中に生じる他の障害を受けやすくなると言われている。グルタミン酸を添加した実験では、グルタミン酸投与により膵炎改善効果が得られ、膵組織内のグルタミン酸量が正常レベルまで回復していることが示された。この効果はエネルギー産生が増加したことで、膵液中に分泌されるグルタミン酸も増加し、小腸での栄養吸収に効果的に作用したためと考えられる。

PEA は生体膜磷脂質の主な構成成分であるホスファチジルエタノールアミンの前駆体であり、PEA 存在下で細胞増殖する場合には、PEA を効果的に細胞内、続いて、リン脂質内に取り入れる。また、膵炎では膵腺房細胞膜の流動性が上昇し、細胞障害や脆弱性に関係していると言われている。今回、PEA を添加した実験では、PEA 投与により膵炎改善効果が得られた。また、膵組織内の PEA 量は容量依存的に陰性対照群より増加していることが示された。この効果は、生体膜のリン脂質を合成する際の器質である PEA の増加によって細胞膜に効果的に影響を与えた可能性が考えられる。

E. 結論

急性膵炎モデルマウスの血清と膵組織を用いてメタボローム解析を実施した結果、メタボロミクスは膵炎における代謝物の変動を反映できるということ、さらには、メタボロミクスにより急性膵炎に対して治療効果のある物質を探索できることが証明できた。これらの結果は、メタボロミクスを通じてこれまで明らかにされていない様々な病態やその治療に導くことができる可能性を示している。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2273号	氏 名	坂井 文
論文題目 Title of Dissertation	メタボロミクスを用いた膵炎治療薬の探索 Metabolomic analysis to discover candidate therapeutic agents against acute pancreatitis		
審査委員 Examiner	主 査 平井 みとる Chief Examiner 副 査 西尾 久英 Vice-examiner 副 査 味木 徹夫 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【発表要旨】

<目的>

急性膵炎は膵腺房細胞内でプロテアーゼなどの酵素が活性化することで膵組織を自己消化と言われていて、正確な病態は未だ明らかにされていない。メタボロミクスは、様々な条件下における低分子代謝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、急性膵炎で生じる低分子代謝物の変動を評価するため、2つの膵炎モデルマウス、すなわち、セルレイン誘発性膵炎モデルとアルギニン誘発性膵炎モデルにおける血清、ならびに、膵組織中の代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計により分析し、その変動代謝物と急性膵炎の重症度の関連性を検討した。

<方法>

セルレイン膵炎モデル作成のため、C57BL/6J マウス(9-10 週齢、オス)に 50 μ g/kgBW セルレインを、アルギニン膵炎モデル作成のため、C57BL/6J マウス(9-10 週齢、オス)に 4.7 g/kgBW L-アルギニン塩酸塩を腹腔内投与し、初回投与から 48 時間、72 時間後に血清と膵組織とを採取、膵炎モデルが作成されていることを確認した。このセルレイン膵炎モデルマウスと陰性対照群、アルギニン膵炎モデルマウスと陰性対照群の血清と膵組織を用いて解析を行った。

<結果>

1)セルレイン膵炎、アルギニン膵炎におけるメタボローム解析

マウスの血清と膵組織を用いて代謝物の解析を行った結果、膵炎群では陰性対照群に比べて有意に変動する代謝物を数種同定した。膵炎特異的に変動する代謝物として、両膵炎に共通して有意な変動を示す代謝物質を数種見出し、グルタミン酸と O-ホスホエタノールアミンに注目した。

2)グルタミン酸添加によるセルレイン膵炎への影響

エネルギー産生系に関与するグルタミン酸は、両膵炎モデルにおいて膵組織中での存在量が有意に減少していた。セルレイン膵炎モデルマウスにグルタミン酸を投与する実験を実施した結果、膵炎の改善効果が得られることが明らかになった。

3)O-ホスホエタノールアミン(PEA)添加によるセルレイン膵炎への影響

セルレイン膵炎モデルマウスに PEA を投与する実験を実施した結果、PEA 投与により膵炎の改善効果が得られることが明らかになった。

<考察とまとめ>

今回の研究結果、急性膵炎が生じることによって代謝物プロファイルが変動することが明らかとなった。特に、TCA 回路の中間代謝物は血清と膵組織とで変動パターンが異なり、急性膵炎におけるエネルギー代謝の変化を全身レベル、ならびに、細胞レベルで評価できた。

今回の研究では 2 つの膵炎モデルにおいて共通して変動する物質が観察され、膵組織中で有意に減少する代謝物としてグルタミン酸と PEA が見出された。グルタミン酸投与により膵炎改善効果が得られ、膵組織内グルタミン酸量が正常レベルまで回復していることが示された。

PEA は生体膜脂質の主な構成成分であるホスファチジルエタノールアミンの前駆体であり、増殖する際、細胞は PEA を効果的に細胞内、続いて、リン脂質内に取り入れる。また、膵炎では膵腺房細胞膜の流動性が上昇し、細胞障害や脆弱性に関係していると言われていて、今回、PEA 投与により膵炎改善効果が得られたことから、PEA の増加によって細胞膜に効果的に影響を与えた可能性が考えられた。

以上、急性膵炎モデルマウスの血清と膵組織を用いてメタボローム解析を実施した結果、メタボロミクスは膵炎における代謝物の変動を反映できるということ、さらには、メタボロミクスにより急性膵炎に対して治療効果のある物質を探索できることが明らかになった。