

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710256

研究課題名(和文)メタボロミクスによる炎症性腸疾患の評価とその治療候補因子の同定

研究課題名(英文)Evaluation of inflammatory bowel disease by metabolomics and identification of the therapeutic molecule candidates

研究代表者

西海 信(Nishiumi, Shin)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命講師

研究者番号：20514706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性腸疾患について、メタボロミクスによる評価を行い、炎症性腸疾患の発症により低分子代謝物がどのように変動するのかを明らかにすることを目的とした。その結果、炎症性腸疾患マウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎発症マウスとIL10遺伝子欠損マウス、そして、潰瘍性大腸炎患者の大腸組織で共通して、グルタミンレベルが減少することを明らかにできた。さらに、代謝物の変動により、潰瘍性大腸炎の病勢を評価できることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate whether the pathogenesis of inflammatory bowel disease leads to alterations in the levels of low molecular weight metabolites by using metabolomics. As a result, the experiments using colon of sodium dextran sulfate-induced colitis mice, IL10 deficient colitis mice and ulcerative colitis patients found that the level of glutamine in the colon was decreased by the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In addition, it was also confirmed that disease activity of ulcerative colitis could be evaluated by metabolite alterations.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：炎症性腸疾患 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム塩基配列の完全解読が宣言され、ポストゲノム研究としてタンパク質や代謝物研究の重要性が認識されつつある。そして、遺伝子解析技術に続き、タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスや低分子代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスなど、タンパク質や代謝物解析に対する技術が近年、画期的な発展を見せている。メタボロミクスで解析対象とする低分子代謝物(メタボローム)は、遺伝子の総体であるゲノムやタンパク質の総体であるプロテオームと比較して、酵素の変動が生じて初めて変化し、タンパク質の活性に依存することから、生体の表現形に近い変動を示すことや、種差がないため小動物実験系の結果をヒト臨床研究に外挿しやすいなどの利点が挙げられる。これらのことから、メタボロミクスは疾患を含めた生体の様々な状態をより詳細に表現できると考えた。最近、様々な疾患の発症により低分子代謝物の変動することが明らかになりつつある(Hirayama et al., Cancer Res 2009; Sreekumar et al., Nature 2009)。研究代表者も、現在、メタボロミクス研究に従事しており、早期発見が困難かつ進行も早く、予後不良のがんである膵臓がんの発症により血清中低分子代謝物の変動すること、さらには、膵臓がんのステージの違いを低分子代謝物の変動により表現でき、ステージ1の早期の状態における低分子代謝物の変動も明らかにした(Nishiumi et al., Metabolomics 2010)。これらのことから、研究代表者は、発症機序が明らかにされていない疾患や治療方法が確立されていない疾患に対して、メタボロミクスが有益な情報を与えてくれると着想した。

研究代表者は、メタボロミクス研究とは別に、消化器系疾患、特に、消化管疾患の発症機構に関する研究も行ってきた。消化管感染症を含めた消化管疾患は、遺伝的素因のみならず、食事的要因や環境的要因により発症し、日常的に遭遇する可能性のある疾患が多い。Helicobacter pylori 感染において、H. pylori の持つ病原因子のひとつである CagA が同定されている(Odenbreit et al., Science 2000)が、研究代表者らはこれまでに、その CagA が樹状細胞の機能を低下させることで、宿主の免疫応答を抑制するということ(Tanaka et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 2010)や、病原性大腸菌である Citrobacter rodentium 感染において、その宿主における C. rodentium の排除には、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が産生する IFN- γ が必須であり、逆に、IL-4 は必要でないことを分子生物学的、ならびに、免疫学的検討により明らかにした(Shiomi et al., Infection and Immunity 2010)。そこで、消化管疾患に対してメタボロミクスによ

り更なる検討を実施し、これまでの蓄積されてきた知見と統合させることで、疾患発症のみならず、その治療方法の確立につながる情報を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性腸疾患に注目した。炎症性腸疾患は、主として消化管に原因不明の炎症を誘発する慢性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎とクローン病とに大別される。炎症性腸疾患の発症機構は未だ不明であり、その治療法も確立されていない。そこで本提案課題では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)潰瘍性大腸炎モデルにおいて、様々な低分子代謝物の変動を捉えていくことを目的とした。また、IL-10 遺伝子欠損マウスクローン病モデルも同様に低分子代謝物プロファイルを明らかにすることを目的とした。さらに、炎症性腸疾患患者検体での検証結果も踏まえて、炎症性腸疾患の発症により生体内でどのようなシグナル経路が変動するのかを低分子代謝物の変動を考慮にいれて検討するとともに、治療効果を有する低分子代謝物を見出すことを試みた。

3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患マウスモデルにおける生体内代謝物プロファイル

DSS 誘発性潰瘍性大腸炎モデルでの検討

DSS のマウスへの投与は、下痢や血便症状、大腸の組織形態学的特徴など、ヒトの潰瘍性大腸炎に類似した症状を誘発する(Cooper et al., Lab Invest 1993 etc)。そこで、DSS 投与による大腸炎の発症における生体内低分子代謝物プロファイルについて検討した。

具体的には、C57BL/6J マウスに DSS 溶液を 5 日間自由飲水させ、その後、蒸留水を自由飲水させた。DSS 処理により炎症急性期、続けて、炎症回復期を迎えることから、DSS 処理前、炎症急性期、そして、炎症回復期にそれぞれ、血清と大腸組織を採取した。血清と大腸組織から代謝物を抽出し、その抽出液を質量分析計による測定に供するために前処理を行い、続けて、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定を実施した。また、採取した大腸組織を用いて組織学的検討、ならびに、免疫学的検討を実施することにより、炎症急性期、炎症回復期、正常期を比較検討することで、潰瘍性大腸炎を特徴づける生体内低分子代謝物プロファイルを評価した。

IL-10 遺伝子欠損マウスクローン病モデルでの検討

IL-10 遺伝子欠損マウスは、Th1 型免疫応答や断続的な貫壁性炎症などクローン病様

病変を呈することが知られている (Madsen et al., Inflammatory Bowel Dis 1999 etc)。そこで、IL-10 遺伝子欠損マウスにおける腸炎発症における生体内低分子代謝物プロファイルについて検討した。

具体的には、IL-10 遺伝子欠損マウスとその野生型マウスからそれぞれ、血清と大腸組織を採取し、水溶性代謝物と脂溶性代謝物をそれぞれ抽出した。質量分析計測定のための前処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計、ならびに、液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供し、また、大腸組織の組織学的検討、ならびに、免疫学的検討も実施し、代謝物変動との比較検討することで、クローン病病変に特徴的な生体内低分子代謝物プロファイルについて評価した。

(2) 炎症性腸疾患患者におけるメタボロミクス

潰瘍性大腸炎患者、あるいは、クローン病患者からそれぞれ血清を提供して頂いた。また、潰瘍性大腸炎患者からは、病変部位組織と非病変部位組織を提供していただき、ヒト検体を用いた生体内低分子代謝物プロファイルについて検討した。なお、本研究では、神戸大学の医学倫理委員会で承認を得た上で、研究を遂行し、神戸大学附属病院で炎症性腸疾患を専門としている医師(大学院生)とともに実験を実施した。

具体的には、血清、あるいは、大腸生検組織から生体内代謝物を抽出し、質量分析計測定のための前処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供した。血清については、炎症性腸疾患患者と健常人との違いを、組織については、病変部位と非病変部位との違いを生体内低分子代謝物プロファイルにより検討した。

(3) 炎症性腸疾患に対して治療効果を発揮する分子の同定とその作用機序の解明

炎症性腸疾患の発症により存在量が減少し、かつ、その発症に大きく関与することが明らかとなった低分子代謝物を見出し、その代謝物が治療効果を有する可能性のある分子として、各種実験を実施した。

具体的には、炎症性腸疾患マウスモデル、あるいは、ヒト炎症性腸疾患患者における生体内低分子代謝物プロファイルの結果を、多変量解析等に供することで、代謝物プロファイルの特徴を統計学的に評価し、治療効果の可能性を有する代謝物を見出した。この代謝物を DSS 潰瘍性大腸炎モデルマウスに摂取させることで、治療効果を発揮できるか否かを組織学的検討、免疫学的検討により検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症性腸疾患マウスモデルにおける生体内代謝物プロファイル

DSS 誘発性腸炎モデルマウスの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類同定した。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、非炎症期のグループ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。炎症急性期では、大腸組織、ならびに、血清中のグルタミン量が正常な大腸組織と比較して減少し、炎症回復期においては、大腸組織のグルタミン量が正常な大腸組織レベルに回復することを見出した。他にも、同様な変動を示す代謝物が数種類存在することを見出した。これらの結果は、潰瘍性大腸炎の発症により、生体内代謝物プロファイルが変動することを示している。

続いて、Th1 型免疫応答や断続的な貫壁性炎症などクローン病様病変を呈することが知られている炎症性腸疾患モデル IL-10 遺伝子欠損マウスを用いて、腸炎発症における生体内低分子代謝物プロファイルについて検討した。その結果、大腸組織から 379 種類(液体クロマトグラフ質量分析計: 253, ガスクロマトグラフ質量分析計: 126)、血漿から 320 種類(液体クロマトグラフ質量分析計: 226, ガスクロマトグラフ質量分析計: 94)の代謝物が同定された。そのうち、IL-10 遺伝子欠損マウスの大腸組織では、雌雄共通して、プスファチジルコリン(PC) 18:0p-20:4 などの抗酸化作用を有するプラズマローゲン類が有意に減少していた。さらに、大腸組織と血漿中で共通して有意に変動した代謝物は 15 種類あり、その中には、ドコサヘキサエン酸(DHA)(22:6)やアシル基に DHA をもつ PC など、DHA 関連代謝物が多く存在した。このことは、IL-10 の欠損に伴う腸炎の発症とその慢性化に、DHA 代謝が強く関与していることを示唆している。また、DSS 誘発性腸炎モデルマウスを用いた検証により明らかにされたグルタミンが、IL-10 遺伝子欠損マウスにおいても、腸組織における存在量が減少していることを見出した。

(2) 炎症性腸疾患患者におけるメタボロミクス

潰瘍性大腸炎患者、あるいは、健常人から採取した大腸組織を用いてガスクロマトグラフ質量分析計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。これらの結果は、炎症性腸疾患の発症により、グルタミン欠乏が生じる可能性を示唆している。さらに、潰瘍性大腸炎患者やクローン病患者の血清では、グルタミン以外の様々なアミノ酸の存在量の低下が確認できたことから、炎症性腸疾患の病態とエネルギー欠乏との相関の可能性を提言することができ、本研究の成果は意義のあるものである。

続いて、より詳細な検証を行うため、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者、健常者の検体数を増やし、血清中代謝物分析を行い、潰瘍性大腸炎とクローン病、健常者との比較や、潰瘍性大腸炎の病勢との相関について評価を行った。その結果、潰瘍性大腸炎が発症することで、TCA 回路関連分子や尿素回路関連分子、数種のアミノ酸が有意に変動することが明らかとなった。また、潰瘍性大腸炎の活動期、寛解期、および、健常人群間において、特徴的な変動を示す 24 個の代謝物を同定できた。そこで、代謝物プロファイル結果を多変量解析に供し、潰瘍性大腸炎とクローン病、健常者との違いを、多重ロジスティック回帰分析モデルにより評価した。その結果、潰瘍性大腸炎と健常人とを識別するモデルは、感度が 93%以上であることを確認した。また、潰瘍性大腸炎とクローン病とを識別するモデルでも、感度が 83%以上になることが明らかとなった。さらに、潰瘍性大腸炎の病勢評価モデルについても構築してみた結果、感度は 84%以上で、clinical activity index と有意に高い相関性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、炎症性腸疾患と代謝物変動との関連性を強く結びつける可能性を示しており、今後、メタボロミクスを中心としたより詳細な検証を進めることで、炎症性腸疾患に対して新たな提言を与えることが可能となり、炎症性腸疾患に関わる研究の飛躍的な進歩が期待できると考える。

(3) 炎症性腸疾患に対して治療効果を発揮する分子の同定とその作用機序の解明

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、多変量解析である部分最小二乗法判別分析 (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することが、DSS 誘発性腸炎マウスや IL10 遺伝子欠損マウスにおいて確認できた。さらに、ヒト潰瘍性大腸炎患者の病変組織においても、グルタミンレベルの減少を明らかにできた。そこで、

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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kohashi M., Nishiumi S., Ooi M., Yoshie T., Matsubara A., Suzuki M., Hoshi N., Kamikozuru K., Yokoyama Y., Fukunaga K., Nakamura S., Azuma T., Yoshida M. A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum diagnostic and assessment approach to ulcerative colitis. Journal of Crohn's & colitis. in press. (査読有)

Ooi M., Nishiumi S., Yoshie T., Shioni Y., Kohashi M., Fukunaga K., Nakamura S., Matsumoto T., Hatano N., Shinohara M., Irino Y., Takenawa T., Azuma T., Yoshida M. (2011) GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. Inflammation Research, 60, 831-840. (査読有)

[学会発表](計3件)

西海信. メタボロミクスの消化器疾患診断・治療への応用. 日本薬学会第 134 年会シンポジウム (熊本). 2014.3.27-30.

西海信. メタボロミクスの消化器疾患への応用. 第 3 回日本質量分析学会 春季シンポジウム (大阪). 2013.6.20.

西海信, 和泉自泰, 松原惇起, 東健, 吉田優. メタボロミクスを用いた炎症性疾患に対する新規治療薬の探索への試み. 第 37 回日本医用マススペクトル学会年会 (愛知). 2012.10.25-26.

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西海 信 (NISHIUMI Shin)

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：20514706

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：