

「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤
技術の創出」

平成 25 年度採択研究代表者

H26 年度
実績報告書

福崎英一郎

大阪大学大学院工学研究科
教授

医歯工連携によるユーザーフレンドリーなメタボロミクス技術の開発ならびに
生活習慣病研究への応用

§ 1. 研究実施体制

(1)「福崎」グループ

- ① 研究代表者: 福崎英一郎 (大阪大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目: 「疾患メタボロミクス解析システムの開発」
 - ・対象代謝物の固相抽出分画によるワイドターゲット分析の高精度化
 - ・化合物同定のための高精度な確率的評価法の確立, 及びデータ解析の完全自動化へ向けたソフトウェアの開発
 - ・代謝性疾患の詳細解析に資するノンターゲット代謝動態解析手法の開発

(2)「下村」グループ

- ① 主たる共同研究者: 下村伊一郎 (大阪大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目: 「メタボロミクス技術を用いたメタボリックシンドローム/糖尿病/動脈硬化関連の病態解明および新たな診断・治療法の開発」
 - ・ヒト血液メタボローム解析による糖尿病大血管症の病態解明と早期診断
 - ・メタボリックシンドロームの病態基盤である肥満脂肪組織代謝異常の網羅的分析(メタボリックマップの構築と予防標的の探索)

(3)「久保庭」グループ

- ① 主たる共同研究者: 久保庭雅恵 (大阪大学歯学部附属病院、講師)
- ② 研究項目: 「メタボローム解析による歯周病重症化メカニズムの解明」
 - ・唾液メタボローム解析による歯周病由来慢性炎症バイオマーカーの探索
 - ・メタボローム解析による歯周病重症化メカニズムの解明

§ 2. 研究実施の概要

福崎グループ

当該研究では、疾患医療分野における実用メタボロミクス技術を構築することも目的として、(1) 対象代謝物の固相抽出分画によるワイドターゲット分析の高精度化、(2) 化合物同定のための高精度な確率的評価法の確立、及びデータ解析の完全自動化へ向けたソフトウェアの開発、(3) 代謝性疾患の詳細解析に資するノンターゲット代謝動態解析手法の開発を中心とした基盤技術開発に取り組む。

本年度は、(1)においては、固相抽出法をベースとしたサンプル調製技術の開発ならび親水性から疎水性の幅広い代謝物を統合解析するためのワイドターゲット分析系の構築に取り組んだ。固相抽出条件ならびに分析系構築のための代表的な代謝物を選定し、それらを組合せた標準品を用いて各種条件の検討を行った。結果、固相カートリッジを組み合わせて使用することで、代謝物の分画の幅が広がることを確認した。(2)においては、ワイドターゲット分析より得られる分析データをハイスループットで解析するためのソフトウェア、MRM-DIFFを開発した。本ソフトウェアにより、保持時間やMRM分析条件に特化した正確な化合物同定が可能となり、数百サンプルデータのインポートから統計解析までの流れが30分ほどで実行可能となった。(3)においては、これまでに構築した、ガスクロマトグラフィー/電子イオン化/質量分析(GC/EI/MS)によるノンターゲット代謝ターオーバー解析システムの検証を行った。既知の代謝摂動を対象として検証し、目的の摂動経路をノンターゲットにて検出することが可能であった。

下村グループ

糖尿病・メタボリックシンドロームと動脈硬化症は、東アジアで爆発的に増加している。下村グループは、福崎グループとの医工連携により、上記疾患群の病態解明、バイオマーカー探索を目的とした疾患メタボロミクス解析システムの実用化を目指している。

(1) 血液メタボローム解析による糖尿病大血管症の病態解明と早期診断

糖尿病患者を対象に、血液サンプル中に含まれる代謝物をメタボロミクス技術を用いて網羅的に解析すること等により、新規の疾患発症予測バイオマーカーの検出と糖尿病大血管症(動脈硬化性疾患)の発症・進展に関わる未知の代謝異常(パスウェイ)の同定を目指す。平成 26 年度は、2 型糖尿病患者のコホートを対象に、後ろ向きデザインによる血清中代謝物のノンターゲット・メタボローム解析を実施した。観察期間中に冠動脈疾患を発症した群としなかった非発症群との群間比較を実施した結果、12 種のマーカー候補代謝物質を抽出することに成功した。また、1 型および 2 型糖尿病患者を対象としてサブクリニカルな動脈硬化性変化を詳細に評価し、血中代謝物と動脈硬化に関連する表現型との関連を検討する横断的/前向き観察研究を開始した。

(2) メタボリックシンドロームの病態基盤である肥満脂肪組織代謝異常の網羅的分析～メタボリックマップの構築と予防標的の探索～

脂肪組織は、脂質合成・分解を活発の行う代謝臓器である。本研究では、肥満時の糖・脂質・アミノ酸・核酸代謝を含んだ代謝異常全容を、メタボローム解析技術を用いて明らかにする。スナップショット解析に加え、研究代表者(福崎グループ)で確立している安定同位体を用いた動的解析

(代謝ターンオーバー解析)を駆使して、肥満脂肪組織での“代謝の流れ“の異常を解明することを目指している。平成26年度は、肥満モデル動物の脂肪組織、肝臓、骨格筋、血漿におけるスナップショット解析を進め、肥満脂肪組織特異的なアミノ酸代謝周辺はじめ複数の代謝物の変化を捉えた。そして、”代謝の流れ“の異常をあきらかにすべく、安定同位体を用いた組織培養実験、in vivo 投与実験の条件検討を開始した。また、脂肪重量が変化する遺伝子改変モデルマウスの脂肪組織と、脂肪組織中の免疫細胞における脂質合成酵素の発現量を測定した。

久保庭グループ

唾液は口腔細菌や剥離上皮、食渣などを内包する複雑な生体試料である。それゆえ、唾液メタボロームは宿主由来と口腔細菌などの非宿主由来の物質が混在する。つまり、口腔清掃状態は唾液メタボロームの解析確度に大きな影響を及ぼす。更に、慢性炎症を伴う疾患である歯周病を発症している被験者の場合、炎症組織より持続的に放出される代謝物質も唾液メタボロームに含有されていると考えられる。しかしながら、これらを詳細に検討した研究はいまだ成されてはいない。そこで、本研究においては、まず“口腔細菌や食渣などは可及的に排除されているが、炎症を有する歯周組織由来の代謝物質は含有されている”状態の唾液を採取するためのプロトコルを構築し、口腔細菌や食渣等を排除する前の唾液とのメタボロームの異同を調べることとした。

これまでの研究進捗状況としては、本研究実施に必要な書類(倫理審査委員会申請書、同意書等)の作成、倫理審査委員会からの研究実施承認取得を完了し、平成26年度に、被験者を対象とした唾液採取と歯周病に関する臨床データの収集を開始した。現在までに、少数のサンプルを用いた予備的メタボローム解析により、①唾液メタボロームは口腔衛生状態の影響を受けること、②専門的口腔清掃により口腔衛生状態が唾液メタボロームに及ぼす影響を減弱できること、を示す結果が得られている。

平成27年度は、被験者の募集を継続し、臨床データ収集と唾液試料採取を実施する。また、採取した唾液をサンプルとしたメタボローム解析を行い、歯周病進行程度に応じて炎症組織より特異的に放出される代謝物質を決定するためのデータを蓄積する。さらに、これらの情報から、口腔細菌叢が歯周病原性を亢進させるトリガーとなる代謝物質を同定するための手がかりを得る。

