

平成 26年 5月28日

財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

|   |                     |          |
|---|---------------------|----------|
| 教育機関名 : 富山大学                                  | 助成金額 : 950 千円       |          |
| 研究代表者 : 吉田淑子                                  | 所属 : 医学薬学研究部 再生医学講座 | 職位 : 准教授 |
| 研究題目 : 肝硬変に効果を有する羊膜幹細胞を用いて、肝硬変の早期診断マーカーを同定する。 |                     |          |

【研究概要】

生活習慣病の一つである肝臓疾患は、慢性に症状が推移しやすく、気づいたときにはかなり重篤になっている場合がおおい疾患である。我々は、肝硬変に対する対処方法として、二つの方法で検討を行う必要があると考えた。

一つは、既に肝硬変になってしまった肝臓の組織の線維化を減少させること、もう一つは早期発見のためのマーカーを開発することである。

羊膜は古くから被覆材として使用されており、そこから単離した羊膜細胞は、免疫拒絶を起こし難く、分化能、抗炎症効果を持つ細胞である。加えて羊膜からは十分な量の細胞を採取することが可能であり、再生医療材料、移植細胞としてきわめて有効である。

本研究では、四塩化炭素による肝硬変誘発モデルマウスにこの羊膜細胞を用い、上記2つの命題について検討した。

1) 肝硬変モデルマウスの作成

6週齢のICRマウスにオリーブオイルに溶解した四塩化炭素（オリーブオイル：四塩化炭素=4：1）を0.1mlずつ、一週間に2回の頻度で一ヶ月間腹腔に投与し、肝硬変モデルを作成した。

2) 細胞の移植

富山大学倫理委員会により承認されたヒト羊膜から採取し、当教室で樹立した羊膜間葉系幹細胞（HAM  $\alpha$ 細胞）をPKHでマークし、脾臓経由で一匹あたり $10^6$ 個移植した。移植後2日目および7日目に肝臓を採取し、凍結試料、パラフィン包埋試料を作成し、形態的解析およびメタボローム解析を実施した。

3) 形態学的解析

凍結試料では、凍結切片を作成し移植細胞の存在部位を確認した。パラフィン包埋試料は、通常のH-E染色およびsirius red染色を施し、肝臓における線維化量を画像解析した。

4) メタボローム解析

マウス肝臓 18 検体について、CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。本試験では、HMT 代謝物質ライブラリ及び Known-Unknown ピークライブラリに登録された物質を対象として解析を行った。

① 検体の調整

検体に1,500  $\mu$ lあるいは3,000  $\mu$ lの50%アセトニトリル水溶液（v/v）（カチオン用20  $\mu$ M 及びアニオン用5  $\mu$ M 内部標準物質）を加え、冷却下にて卓

上型破砕機 (bms, BMS-M10N21)を用いて破砕 (1,500 rpm, 120 秒 ×5 回) した。組織破砕後、遠心分離 (2,300 ×g, 4° C, 5 分) を行った。遠心分離後、上層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に400 μL ×2 本移し取った。これを遠心 (9,100 ×g, 4° C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び50 μL の Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

## ②データ処理

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver. 2.13.0.8.h (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式†2 を用いて相対面積値に変換した。

$$\text{相対面積値} = \text{目的ピークの面積値} \div \text{内部標準物質の面積値} \times \text{試料量}$$

## ③候補代謝物質検索

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに HMT 代謝物質ライブラリ及び Known-Unknown ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。

## ④統計解析 (PCA, HCA)

主成分分析 (PCA) は SampleStat ver. 3.14 (HMT 開発) を用いて行った。また、階層的クラスタリング解析 (HCA) 及び Heatmap 表記は PeakStat ver. 3.18 (HMT 開発) を用いて行った。

四塩化炭素の投与期間に相関し、肝臓における線維化は増強する。今回の実験では、四塩化炭素を1ヵ月間投与し、肝臓の組織像を観察した。肝臓の線維化は既に、グリソン氏鞘に起こっており、正常 (control, normal) では認めがたい肝小葉が明瞭に観察された。sirius red 染色切片により、画像解析を行ったところ、細胞移植2日目で既に、四塩化炭素投与群に比べ、線維化が減少する傾向が認められた。

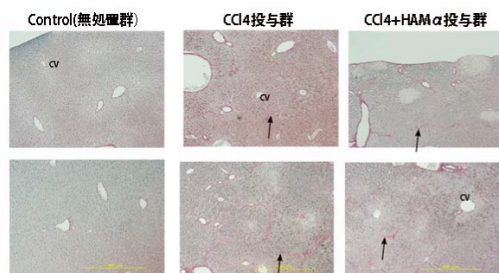


Fig1 肝硬変モデルマウスの増殖の組織像  
CCl4 投与群では、CCl4 投与群では、肝小葉全体を取り巻くようにグリソン氏鞘に線維化 (赤) が明瞭に観察される (矢印)。一方、HAMα 投与群では、一部に線維化がないところも観察される。  
CV: 中心静脈

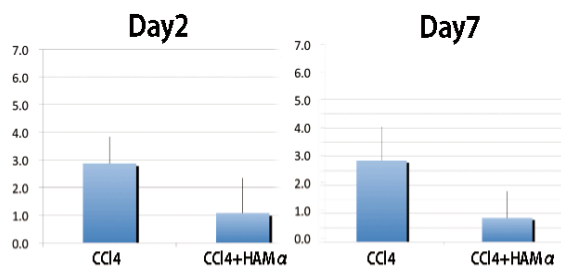


Fig2 線維化領域の画像解析  
CCl4 投与群比べ、HAMα 投与群では線維の量が減少する傾向が見られた。

メタボローム解析により260 (カチオン152, アニオン108) のピークが検出され、これらの物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に描画した。

HCAの結果、normal群とCCl4投与群およびCCl4+HAMα投与群では○で囲んだ部位の物質に変動が見られた。特に変動の著しかった物質は、Leu, Phe, Butyrylcamithine, Isovalerylalanine, 2-Hydroxybutyric acid, N-Glycolylneuronic acidであり、7日目には減少する傾向にあった (Fig3)。

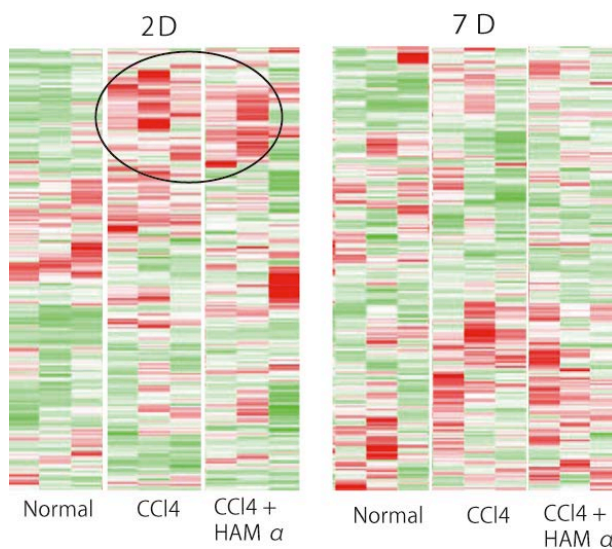


Fig3 HCAの結果  
細胞移植後、2日目と7日目では発現パターンが異なっていた。特に○の領域に着目した。

また、細胞投与2日目と7日目を比較し、経時的な代謝産物の変動をHMDBの分類で検討したところ、CCl4投与群でのみ、apoptosisやCholesterolの代謝に関与する物質の変動が認められた。肝臓疾患に関与する代謝産物の動向は、正常とHAM $\alpha$ 投与群では7日目で有意に減少することがわかった (Table1)。

メタボロームの解析により、肝硬変初期に変化する物質及びHAM $\alpha$ の投与により変化する物質が同定された。画像解析の結果とあわせて考えると、これらの

物質はHAM $\alpha$ の投与による線維減少のメカニズムを解明する手がかりとなる可能性が示唆された。

画像解析の結果とメタボローム解析を照合することで、肝硬変初期の

| Compound name                | Comparative Analysis |                      |                      |                      |                    |                      |       |   |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-------|---|
|                              | A, 7 day vs A, 2 day |                      | B, 7 day vs B, 2 day |                      |                    | C, 7 day vs C, 2 day |       |   |
|                              | Ratio <sup>†</sup>   | p-value <sup>‡</sup> | Ratio <sup>†</sup>   | p-value <sup>‡</sup> | Ratio <sup>†</sup> | p-value <sup>‡</sup> |       |   |
| N <sup>6</sup> -Acetyllysine | 1.0                  | 0.886                | 0.8                  | 0.041                | *                  | 1.0                  | 0.770 |   |
| Choline                      | 0.7                  | 0.123                | 2.1                  | 0.001                | **                 | 1.2                  | 0.514 |   |
| Nicotinamide                 | 1.1                  | 0.364                | 1.4                  | 0.007                | **                 | 1.0                  | 0.819 |   |
| N <sup>6</sup> -Acetyllysine | 1.0                  | 0.886                | 0.8                  | 0.041                | *                  | 1.0                  | 0.770 |   |
| 3-Hydroxybutyric acid        | 0.8                  | 0.439                | 0.7                  | 0.360                |                    | 0.5                  | 0.030 | * |
| NADP <sup>+</sup>            | 1.0                  | 0.856                | 0.9                  | 0.473                |                    | 1.4                  | 0.044 | * |
| Pipecolic acid               | 2.0                  | 7.5E-04              | ***                  | 2.2                  | 0.152              | 1.9                  | 0.014 | * |

Table1 HMDB物性分類による検討

細胞移植後、2日目と7日目の値で比較したときに、変動の大きかった物質。

上から順に、apoptosis, Fatty acid metabolism, Cholesterol, cell function, Fatty acid metabolism, Electron carrier, liver diseaseに関与する物質として分類されている。

A:Normal B:CCl4投与群 C:CCl4+HAM $\alpha$ 投与群

物質の変動および肝臓の線維化を減弱させる物質を同定することが可能となった。

#### 【成果要約】

これまで、肝硬変の解明にほとんど利用されなかったメタボローム解析を実施することにより、肝線維化の初期変化に関与する物質を見つけることができた。また、HAM $\alpha$ 投与後、2日目で既に線維量が減少することや、これに関連する代謝物質の変動を捉えることが出来た。肝硬変の早期診断および治療効果判定試薬開発への第一歩となり得る。

(別添資料)

|              |   |         |             |
|--------------|---|---------|-------------|
| 研究成果<br>発表状況 | 【雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ, 産業財産権 (特許権等) の出願・取得状況について記入】<br>学会発表<br>吉田淑子、岡部素典、吉田佳奈美、小池千加、王 芳、齊藤 滋、二階堂敏雄<br>「ヒト羊膜間葉系幹細胞 (HAM $\alpha$ ) および臍帯静脈上皮 (HUVEC) 移植後のマウス肝硬変モデル」第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日～6 日、京都<br>吉田淑子 「羊膜 (プラセンタ) は生活習慣病、アンチエイジングに有効！」<br>第 14 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム、2014 年 6 月 6 日～8 日、大阪 |         |             |
| 経費の<br>執行状況  | 区分  | 執行額 (円) | 備考          |
|              | Metabolome Analysis in HMT  | 630,000 | メタボローム解析検査料 |
|              | 抗体等   | 281,777 |             |
|              | 消耗品   | 1,092   |             |
|              | 文具  | 531     |             |
|              | 旅費  | 36,600  |             |
|              | 合計  | 950,000 |             |