

## ラマン分光法による、尿素サイクル異常症由来 iPS 細胞の肝臓細胞への分化モニタリング

【代表者】石垣 美歌 島根大学 戦略的研究推進センター 助教

### 【研究の目的と内容】

尿素サイクル異常症は、尿素合成経路の代謝系に先天性な異常があり、高アンモニア血症などを発症する疾患である。尿素サイクル異常症には、最も頻度の高いオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症をはじめ、シトルリン血症、アルギニノコハク酸尿症などがある。例えば、シトルリン欠損症は肝臓細胞における解糖系、脂質合成、 $\beta$ 酸化が障害され、肝臓細胞のエネルギー欠乏をもたらす。小児では低血糖症、成人では高アンモニア血症により、脳に障害をもたらす重篤な疾患である。尿素サイクル異常症は、新生児スクリーニングによって発見することが望まれるが、新生児期を過ぎてから発症する症例がとらえきれていない現状がある。また、これらの疾患には根治治療がないため、新規治療法の開発が望まれる。

本研究では、光学計測の一種であるラマン分光法を用いた。本分光分析手法は、生体からタンパク質、脂質、核酸などの生体分子情報を非破壊、蛍光フリー、ラベルフリーに取得することができるため、生体分析に適している。そこで本研究において、尿素サイクル異常症由来の iPS 細胞と、健常者由来の iPS 細胞が肝臓細胞へ分化誘導する過程をラマン分光法により分析し、細胞代謝の違いを、細胞を活かしたまま捉えることができるか検証した。

### 【研究の成果(本研究によって得られた知見、成果、論文、学会発表、外部資金への応募見込み等)】

まず本研究期間において、健常者、及び3種類の尿素サイクル異常症由来の合計4種類(585A1、OTC、cit2-1、cit2-2)の iPS 細胞の培養と、肝臓細胞への分化誘導プロセスをマスターし、細胞培養する環境を確立することに成功した。定常的に細胞を培養する中で、iPS 細胞から肝臓細胞への分化誘導過程の4段階においてポイント測定、マッピング測定を実施した。ラマン測定には、倒立型顕微ラマン分光装置 (HORIBA XploRA Inv) を使用し、励起波長 785 nm、波数領域 1900-400/3900-400 $\text{cm}^{-1}$ 、60 倍の水浸レンズで測定した。ポイント測定では、露光時間 5 秒、積算回数 6 回、マッピング測定では、露光時間 5 秒、積算回数 2 回、測定対象領域 20 $\times$ 20  $\mu\text{m}$ 、空間分解能 1 $\mu\text{m}$  で測定を行った。取得したラマンスペクトルの前処理として、5次多項式近似でベースライン補正し、フェニルアラニンのピーク強度が1になるように規格化した後、石英由来のラマンシグナルを差し引いた。

取得したラマンスペクトルデータを主成分分析 (PCA) などにより解析し、分化に伴う細胞内分子組成変化や、細胞種間の分子組成に違いがあるか検証した。その結果、全ての細胞において分化に伴う分子組成の変化を検出し、細胞の分化度によって主成分が分かれることが分かった。さらに、4 種の iPS 細胞のラマンスペクトルデータに対する PCA の結果から、分化前の細胞間でも分子組成に違いがあることが分かった (図1)。

このように、疾患別の iPS 細胞、肝臓細胞が、細胞内の代謝の違いから非破壊的に識別できる可能性が示された。今後、それらの違いと疾患別の代謝の違いとの対応関係について考察を深め、尿素サイクル異常症のスクリーニングや、新薬開発への応用が期待される。

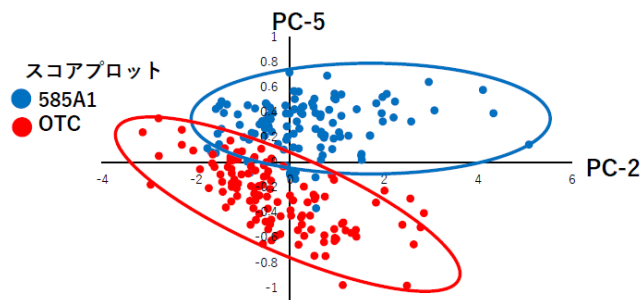


図1：健常者 (585A1) と OTC 欠損症の iPS 細胞から取得した、ラマンスペクトルデータに対する PCA スコアプロット。