

ラマン分光法による、尿素サイクル異常症肝臓細胞の薬剤への応答モニタリング

【代表者】石垣 美歌 島根大学 戦略的研究推進センター 講師

【研究の目的と内容】

尿素サイクル異常症(UCD)は、尿素合成経路の代謝系に先天的な異常があり、高アンモニア血症などを発症する疾患である。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。UCD には根治治療がないため、新規治療法の開発が望まれる。

ラマン分光法は光学計測の一種である。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。UCD 疾患に対する治療法を開発するためには、細胞内の代謝変化をリアルタイムにモニタリングして、薬剤への応答性をリアルタイムに細胞を生かしたまま評価する必要がある。そこで本研究では、2種類の UCD(シトルリン血症2型: Cit2、OTC 欠損症: OTC)由来の iPS 細胞と、健常者由来の iPS 細胞を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、UCD の疾患別に特異的な代謝由来の分子組成変化を同定し、細胞種を非破壊的にあるがまま識別することを目指した。

UCDは、尿素サイクル(図1)のどの箇所に問題があるかによって現れる症状が異なる。例えば Cit2 では、ミトコンドリア内のアスパラギン酸を細胞内に輸送するタンパク質の欠損により、尿素サイクルを回すことができない(図1①)。その結果、細胞内のアンモニアやシトルリンなどの濃度が上昇し、アルギノコハク酸の濃度が減少する。しかし OTC では、アンモニアとオルニチン濃度が上昇し、シトルリンの濃度が減少する(図2②)。このように、UCD の疾患の原因によって、細胞内におけるアンモニア代謝が異なり、その結果細胞内で濃度が上昇、または減少する物質が異なる。本研究ではまず、それぞれの疾患に応じて異なる分子組成変化をラマン分光法により捉え、細胞種を識別できるか検証した。

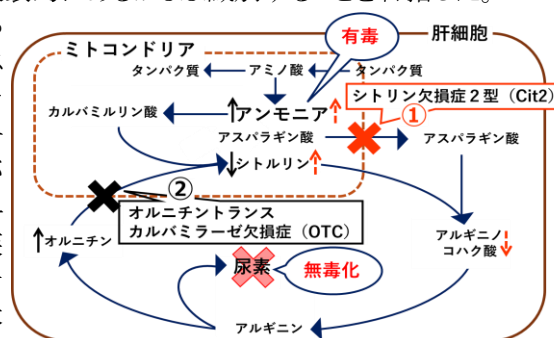


図1：尿素サイクル。

【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)】

健常者の iPS 細胞(585A1)、OTC 欠損症(OTC)、2種類のシトルリン欠損症2型(cit2-1、cit2-2)の計4種類の iPS 細胞を培養し、実験に供した。iPS 細胞を Day0 とし、20 日間の肝細胞への分化過程において、Day0、Day4、Day8、Day16、Day20 の計5段階でラマン測定を行った。ラマンスペクトルは、倒立型顕微ラマン分光装置(HORIBA XploRA Inv)を用い、石英セルに細胞を播種し、60倍水浸レンズ、励起波長785nm、波数領域1900-400 cm^{-1} 、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1.0 μm 、37°Cでマッピング測定を行った。得られたスペクトルを、5次多項式近似でベースライン補正した後、1003 cm^{-1} のバンド強度が1になるよう規格化した。その後、主成分分析(PCA)やラマンイメージングにより解析した。

各細胞種間における細胞内分子組成の違いを分析するため、5段階の分化過程において取得した各細胞種のデータセットに対してPCAを行った。その結果、Day0では細胞種間に特徴的なスペクトル成分は検出されなかった。一方、Day20では、細胞種間で1040 cm^{-1} 付近のラマンバンドの強度の違いを確認した。主成分(PC)1のローディングには、タンパク質のスペクトルパターンと類似したスペクトル成分が検出されており、タンパク質濃度がCit2-1で低く、OTCで高いことが示された。さらに、細胞種間の分子組成の違いは、分化が進むにつれて明確になることも分かった。さらに、細胞の分化度に伴う分子組成変化を解析したところ、585A1では平均ラマンスペクトルにおいて1040、1125、1445、1655 cm^{-1} 付近のラマンバンドの強度変化を検出した。そして、PCAのスコアプロットでは、細胞の分化度に応じてデータが明確に分類され、Day0では他の分化段階の細胞よりも糖濃度が相対的に高く、分化に伴ってタンパク質濃度が高くなることも示された。この585A1で示された変化は、他の細胞種でも見られた。これらのPCAによる結果は、ラマンイメージングにおいても同様の結果が得られ、細胞内分子組成の細胞種間による違いや、分化度に伴う変化を可視化することができた。

以上のことから、UCD疾患由来のiPS細胞では、健常者由来のiPS細胞と分子組成の違いはなく、分化に伴って各疾患に特異的な代謝の違いにより、細胞種を識別できることが分かった。本結果から、UCD疾患別の細胞代謝の違いを、細胞を生かしたまま非侵襲的、かつリアルタイムに評価できることが明らかとなった。