

存在するシステインもデヒドロ化されることが確認された。なお、先に述べたL-FABP酸化実験ではAAPH処理で全てのメチオニンが酸化されることが確認されているが、L-FABPとC-FABPで保存されているメチオニンのうち、C-FABPで酸化されたメチオニンはMet23のみであり、L-FABPでもっとも酸化され易いメチオニンに相当するC-FABPのMet122は全く酸化が確認されなかった。これらの結果をC-FABPの立体構造モデルに適用したものを図19に示す。図17-2で示したC-FABPの立体構造モデルに今回の結果で観察された酸化メチオニンを黄色のball and stickモデルで示す。この結果から、FABPはアイソタイプによって酸化される部位が異なり、抗酸化機能もアイソタイプによって異なる可能性が示唆された。

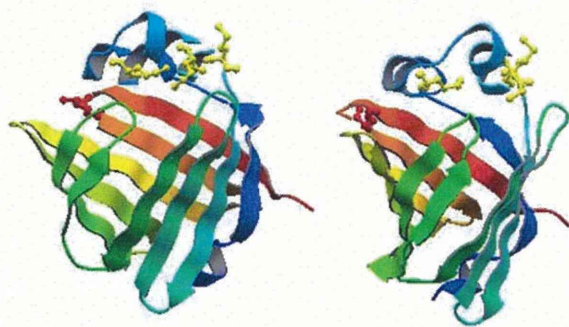
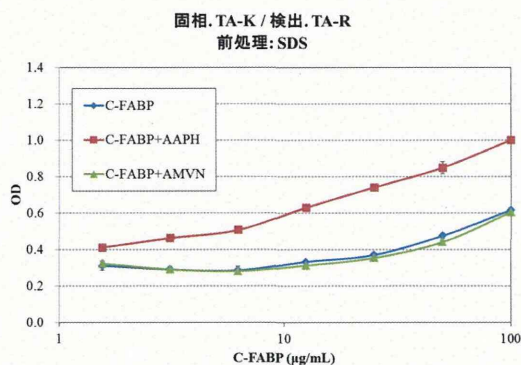


図19. 検出された酸化メチオニンを部位 (PDB)

さらに、上記2項にて構築したC-FABP検出ELISA系を用いて、本酸化C-FABPの測定を行った。図20 Aに「固相. TA-K/検出. TA-R」を、「固相. TA-W/検出. TA-A」を図20 Bに示し、青線がC-FABP、赤線がAAPH処理C-FABP、緑線がAMVN処理C-FABPの反応曲線を示し、それぞれのC-FABPタンパク量はNanoOrange Protein Quantitation Kit

(Molecular Probes)を用いて総タンパク量を測定し標準化した。その結果、未処理C-FABPとAMVN処理C-FABPの反応曲線はほぼ一致したが、AAPH処理C-FABPはどちらの系でも高い値を示したことから、AAPH処理C-FABPは抗体の認識性が上昇していることが確認された。以上の結果から、C-FABPはAAPHによってメチオニンが酸化され、ELISAにおける抗体認識性の変化が生じる立体構造変化が起こる可能性が示唆された。上記メチオニンの酸化反応の選択性やそれに伴う立体構造の変化がFABPの構造の僅かな違いによるものだと考えると、生体内におけるFABPの立体構造と生理機能が密接に関連しているのではないかと考えられる。

A.



B.

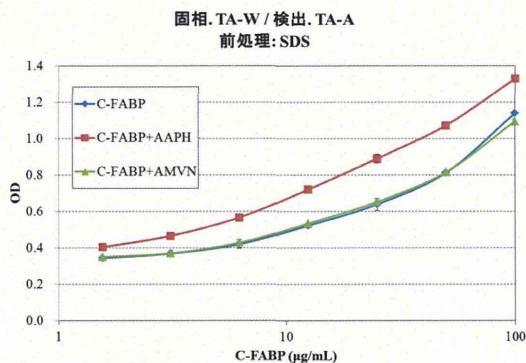


図20. 酸化C-FABPのELISA測定

4. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)に対する特異抗体を用いた発現解析

4-1. 遺伝子解析・カスケード解析

前年度に報告した ADSCs と 233A cells への A-FABP 及び C-FABP の添加・共培養後の遺伝子解析の結果を基にカスケード解析を行った結果を Genome Network Platform の PPI ネットワーク解析と Expression profile 解析を用いて再解析を行った。

解析に用いたデータはカスケード解析にて「本現象に関係すると思われる因子リスト」のカウント数が 10 以上の因子で、「ADSCvsA-FABP」では 41 因子、「ADSCvsC-FABP」では 35 因子、「233AvsA-FABP」では 37 因子、「233AvsC-FABP」では 24 因子である。図 21 に PPI 解析データを示し A は「ADSCvsA-FABP」、B は「ADSCvsC-FABP」、C は「233AvsA-FABP」、D は「233AvsC-FABP」を表した。

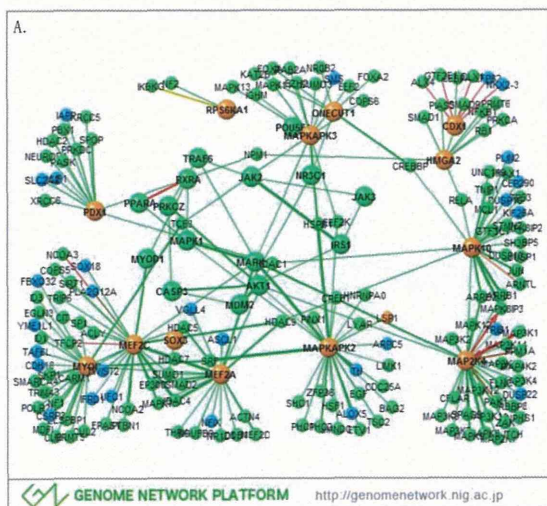


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

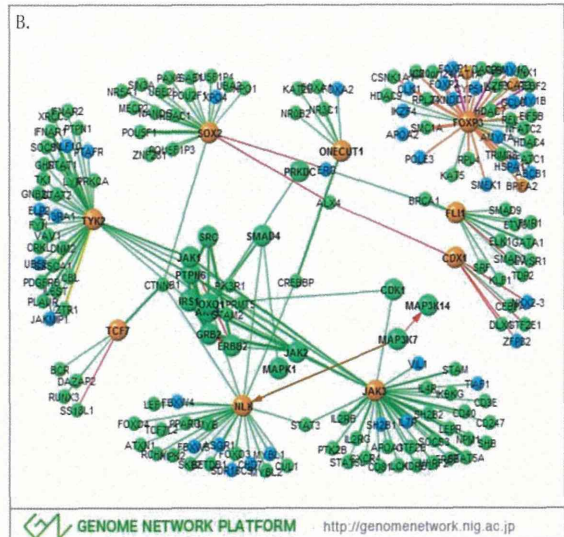


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

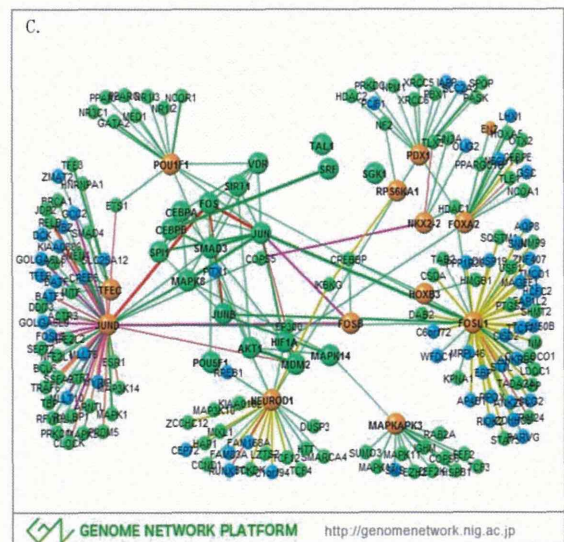


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

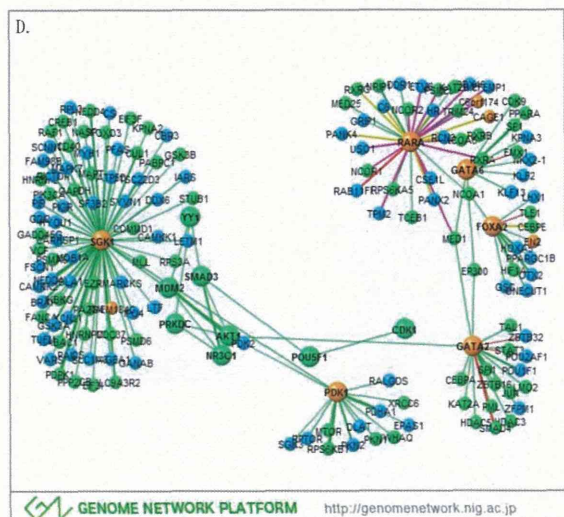


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

また、図 22 には Expression profile 解析の結果を示す。上記同様に本図でも A は「ADSCvsA-FABP」、B は「ADSCvsC-FABP」、C は「233AvsA-FABP」、D は「233AvsC-FABP」を表した。

これらのデータから先に報告した内容と同様に ADSC に A-FABP を添加した場合でのみ、関連する因子として検出された MYOD1 や MYOG が skeletal muscle に特異的に存在することが確認できた。しかしながら、筋細胞に発現が確認されていない因子も一部検出されていることから、分化の程度は不十分である可能性が考えられるため、A-FABP の添加条件に関して最適化検討を行う必要があると考えられた。また、PPI ネットワーク解析から MYOD1 や MYOG と相互作用する蛋白質が判明していることから、今後の解析にはこのような蛋白質の関連もひとつの指標にすることが可能であると考ええる。一方 ADSC に C-FABP を添加した場合で、関連する因子として検出された FOXP3、FLI1、TCF7 などはリンパ節や胸腺に発現が確認された蛋白質であった。これが C-FABP が癌転移と関連しているという既存の報告と関連があるとすれば非常に興味深い結果である。

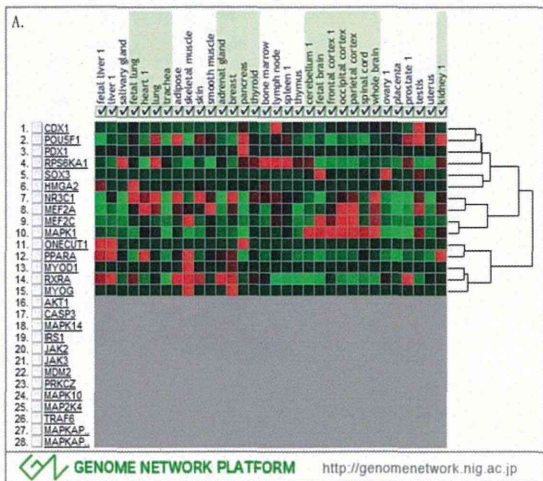


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

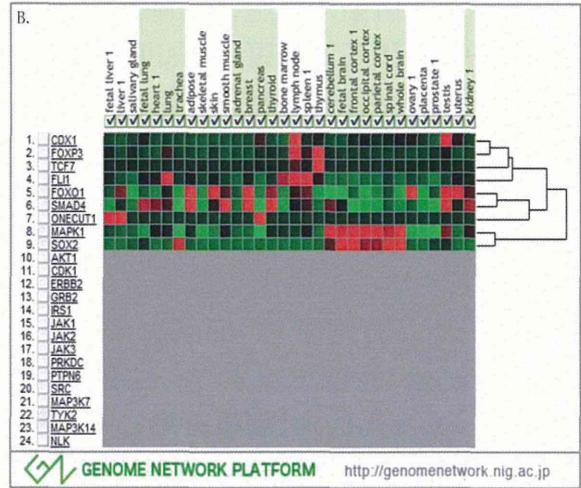


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

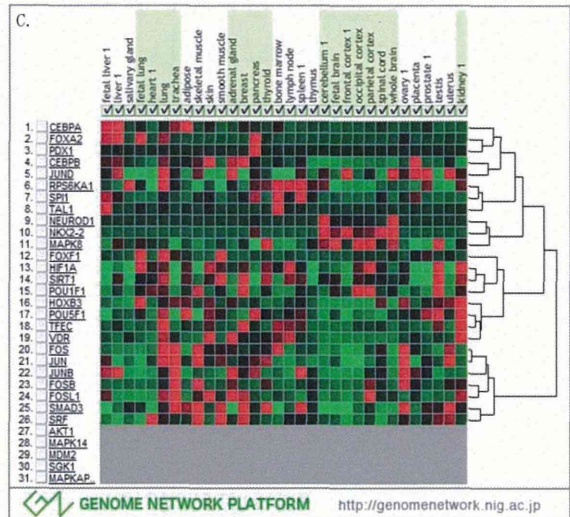


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

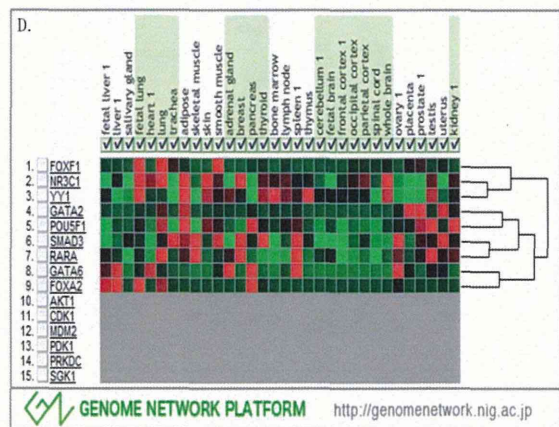


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

4-2. メタボローム解析

生体内には核酸 (DNA) やタンパク質のほかに、糖、有機酸、アミノ酸などの低分子が存在しており、これらの物質の多くは、酵素などの代謝活動によって作り出された代謝物質 (メタボライト) である。細胞の働きを理解しようとするとき、DNA 配列の網羅的解析 (ゲノミクス) やタンパク質の網羅的解析 (プロテオミクス) に加えて、代謝物質の網羅的解析 (メタボロミクス) が重要となる。メタボロミクスとは「代謝物質の種類や濃度を網羅的に分析・解析する手法」のことである。これは外部からの刺激 (温度や光など環境の変化や薬物摂取、食事など) や疾病などにより代謝が動くと、血液、尿、組織、細胞、液胞などの中に存在する代謝物質の種類や濃度に変化が起こる。その変化を分析することにより、バイオマーカーの探索や代謝の生化学的仮説立案・検証が可能となる。そこで前年度の報告で脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) と 233A cells (Renal epithelial cell line) に C-FABP, A-FABP を添加し共培養し、遺伝子発現解析を行うことで ASCs に A-FABP 添加特異的に筋細胞への分化と思われる遺伝子発現量の変化が確認されたことから、ASCs に C-FABP, A-FABP を添加し共培養することで ASCs で変化するメタボライトを解析することとした。本検討により FABP が細胞に対してオートクライン及び、パラクラインに働く機構を解析することを目的とする。また、ASCs への FABP 特異抗体添加で FABP のオートクライン及び、パラクラインに働く機構の阻害効果を確認するための評価方法としてメトボローム解析が有用かも同時に検討する。

4-2-1. 細胞培養

培養した ASCs (ゲラチンコート 10cm² ディッシュ) の培地を除去し、HUNK'S BALANCED SALT SOLUTION (SIGMA) で一度洗浄した。その後トリプシン-EDTA (invitrogen) を添加して、37°C のインキュベータで 3 分ほど静置し、細胞を遊離させた。遊離させた細胞は培地で十分に懸濁し、細胞数をカウントした。その後、細胞懸濁液を 1200 rpm, 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した後 MESEN PRO (invitroge) によって再度懸濁し 1.4 x 10⁵ cell/dish でゲラチンコート 10cm² ディッシュに細胞を撒き、37°C, 5% CO₂ 条件で培養を行った。セミコンフルエントになるまで培養を行った後に、C-FABP, A-FABP 組換え蛋白質を終濃度 1 μM で ASCs に添加し、引き続き 37°C, 5% CO₂ 条件で 15 時間培養を行った。解析に用いたサンプルを表 5 に示す。

表5. メタボローム解析試料情報

試料名	試料量 (×10 ⁵ cells)	群名	時系列 (hour)
ctr1-1	1.7	コントロール	15
ctr1-2	1.7		15
ctr1-3	1.7		15
C-FABP-1	1.6	C-FABP添加	15
C-FABP-2	1.6		15
C-FABP-3	1.6		15
A-FABP-1	1.5	A-FABP添加	15
A-FABP-2	1.5		15
A-FABP-3	1.5		15
ctr1-LC	1.7	コントロールLC	15
C-FABP-LC	1.6	C-FABP添加LC	15
A-FABP-LC	1.5	A-FABP添加LC	15

4-2-2. 前処理

a. CE-TOFMS 用

培養した細胞の培地を吸引除去し、10mLの細胞洗浄液で洗浄し、再度2mLの細胞洗浄液で洗浄した。洗浄液の取り残しがないように十分に吸引除去を行った細胞に800 μ Lのメタノール(Wako, 132-14524, AWJ4676)を添加し、ディッシュ全面にメタノールが行き渡る程度に振盪し30秒間静置させた。その後、上記混合液1,000 μ Lをマイクロチューブに回収し、すぐに氷冷した。得られた回収抽出液を2,300 x g, 4°C, 5分間遠心分離を行い沈殿物を除去した。本上清を2本の限外濾過ユニットに移し、9,100 x g, 4°C, 2-5時間遠心分離を行い完全に液を透過させた。透過した回収液は-80°Cにて凍結させサンプルを解析した。

b. LC-MS 用

培養した細胞の培地を吸引除去し、10mLの細胞洗浄液で洗浄し、再度2mLの細胞洗浄液で洗浄した。洗浄液の取り残しがないように十分に吸引除去を行った細胞にメタボライト抽出用エタノール溶液1.3mLを添加し、セルスクレーパーにて細胞を剥離した。抽出液を1.0mLと共に細胞塊も回収し、-80°Cにて凍結させサンプルを解析した。本サンプルを1,000 μ LのMilli-Q水を加え氷冷しながら超音波で5分間処理した後、遠心分離(2,300 x g, 4°C, 5分)を行い、上清を回収した。これを乾固させ、100 μ Lの50%イソプロパノール溶液(v/v)に溶解して測定に供した。

c. 細胞数の計測

上記 a. b. とは別に同様の操作を行った

細胞を用意し、細胞を回収後、セルカウンターを用いて細胞数を計測した。

4-2-3. CE-TOFMS 解析

本試験ではカチオンモード、アニオンモードを以下に示す条件で行った。

陽イオン性代謝物質 (カチオンモード) 装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 6号機

Capillary : Fused silica capillary i. d. 50 μ m \times 80 cm

測定条件

Run buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Rinse buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 10 sec

CE voltage : Positive, 27 kV

MS ionization : ESI Positive

MS capillary voltage : 4,000 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid : HMT Sheath Liquid (p/n : H3301-1020)

陰イオン性代謝物質 (アニオンモード) 装置

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 5号機

Capillary : Fused silica capillary i. d. 50 μ m \times 80 cm

測定条件

Run buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I3302-1023)

Rinse buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I3302-1023)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 25 sec

CE voltage : Positive, 30 kV

MS ionization : ESI Negative
 MS capillary voltage : 3,500 V
 MS scan range : m/z 50-1,000
 Sheath liquid : HMT Sheath Liquid
 (p/n : H3301-1020)

a. 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) を用いて、シグナル/ノイズ (S/N) 比が3 以上のピークを自動抽出し、質量電荷比 (m/z)、ピーク面積値、泳動時間 (Migration time: MT) を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相対面積値に変換した。また、これらのデータにはNa⁺やK⁺などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。精査したピークについて、 m/z とMT の値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。

$$\text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピークの面積値}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{細胞数}}$$

b. 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。検索のための許容誤差はMT で ± 0.5 min、 m/z では ± 10 ppmとした。

$$\text{質量誤差 (ppm)} = \frac{\text{実測値} - \text{理論値}}{\text{実測値}} \times 10^6$$

培養細胞9検体についてCE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。代謝物質ライブラリ及びKnown-Unknown ライブラリに登録された物質の m/z 及びMT の値から155 (カチオン92, アニオン63) ピークに候補化合物が付与された (表6)。

表6-1. 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	HMT DB ¹ Compound name	Comparative Analysis					
		C-FASP添加 vs コントロール	p-value ²	A-FASP添加 vs コントロール	p-value ³		
A_0045	Glucose 6-phosphate	4.1	0.009	**	2.6	0.033	**
A_0042	Fructose 6-phosphate	3.6	0.006	**	2.6	0.018	**
C_0019	1-Pyridoxine 5-carboxylic acid	2.5	0.011	*	1.7	0.082	
A_0024	Glycerol 3-phosphate	2.0	6.5E-04	***	1.9	0.006	**
C_0081	XC0051	1.8	0.021	*	1.7	0.021	*
A_0044	myo-Inositol 2-phosphate	1.7	0.005	**	1.4	0.047	*
C_0058	N-Acetylmethine	1.6	N.A.		1.7	N.A.	
A_0056	Fructose 1,6-bisphosphate	1.6	0.044	*	1.4	0.082	*
C_0076	11-Aminoundecanoic acid	1.6	0.102		1.2	0.221	
A_0022	Dihydroxyacetone phosphate	1.5	0.065	*	1.6	0.015	*
C_0036	cis-4-Hydroxyproline	1.5	0.128		1.8	0.025	*
C_0053	Spermidine	1.5	0.194		1.5	0.120	
C_0101	Glutathione (GS-H)	1.4	0.109		0.9	0.568	
C_0008	Cyclohexamine	1.4	0.168		0.8	N.A.	
A_0051	N-Acetyneuraminic acid	1.4	0.014	*	1.4	0.018	*
A_0047	2,3-Diphosphoglyceric acid	1.4	0.061	*	1.1	0.325	
C_0028	Cys	1.4	0.219		0.9	0.607	
C_0034	Mevalolactone	1.4	0.155		1.3	0.185	
A_0061	NADPH_givalent	1.3	0.017	*	1.5	0.031	*
C_0077	Spermine	1.3	0.430		<1	N.A.	
C_0042	Ornithine	1.3	0.013	*	1.2	0.057	*
C_0050	Urocinic acid	1.3	0.152		1.6	0.105	
A_0081	UDP-glucuronic acid	1.3	0.148		1.3	0.095	
C_0074	N-Acetylysine	1.3	0.049	*	1.3	0.040	*
A_0036	Phosphocreatine	1.2	0.033	*	1.3	0.071	*
A_0020	Pelargonic acid	1.2	0.075	*	1.4	0.014	*
A_0019	Cystenesulfonic acid	1.2	0.292		1.3	0.383	
A_0038	XA0027	1.2	0.195		1.4	0.076	*
C_0102	XC0132	1.2	0.037	*	1.3	0.027	*
A_0043	Glucose 1-phosphate	1.2	0.192		1.2	0.288	
C_0026	Homoserine	1.2	0.007	**	1.2	0.016	*
C_0073	Phosphorylcholine	1.2	0.337		1.4	0.071	*
C_0007	Glycerol	1.2	0.534		1.2	0.288	
C_0057	Saccharopine	1.2	0.087	*	1.1	0.316	
C_0047	1-Methylnicotinamide	1.2	0.010	*	1.3	8.8E-04	***
A_0041	XA0033	1.2	0.413		1.4	0.103	*
C_0078	O-Acetylcarnitine	1.1	0.221		1.3	0.062	*
A_0016	Octanoic acid	1.1	0.399		1.3	0.193	*
A_0079	cTDP-glucose	1.1	0.154		1.2	0.057	*
A_0077	ATP	1.1	0.173		1.2	0.148	*
C_0063	Carnitine	1.1	0.008	**	1.2	0.048	*
C_0015	Diethylamine	1.1	0.681		1.0	0.593	
C_0061	His	1.1	0.052	*	1.2	0.009	**
C_0052	γ -Butyrobetaine	1.1	0.069	*	1.2	0.043	*
C_0096	Glu-Glu	1.1	0.233		1.1	0.198	*

表6-2. 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	Compound name	Comparative Analysis			
		C-FABP添加 vs コントロール		A-FABP添加 vs コントロール	
		Ratio [†]	p-value [‡]	Ratio [†]	p-value [‡]
A_0078	GTP	1.1	0.264	1.1	0.245
A_0034	Leucic acid	1.1	0.390	1.4	0.022
C_0090	Isovalerylcarnitine	1.1	0.269	1.2	0.044
A_0015	Ethandiamine phosphate	1.1	0.054	1.2	0.005
C_0066	Phe	1.1	0.269	1.2	0.129
C_0067	3-Methylhistidine	1.1	0.191	1.2	0.162
C_0001	Ethandiamine	1.1	0.289	1.4	0.010
C_0061	4-Guandrobutyric acid	1.1	0.140	1.2	0.022
A_0074	GTP	1.1	0.306	1.2	0.169
A_0080	UDP-glucose UDP-galactose	1.1	0.096	1.2	0.138
A_0084	CMP-N-acetylneuraminate	1.1	0.296	1.1	0.347
C_0013	Choline	1.1	0.066	1.4	0.007
C_0058	Penicillamine	1.1	N.A.	<1	N.A.
C_0076	Gly-Asp	1.1	0.066	1.1	0.020
C_0025	Thr	1.1	0.067	1.2	0.010
A_0063	CMP	1.1	0.670	1.2	0.362
C_0041	Asn	1.1	0.135	1.2	0.036
A_0018	2-Hydroxyglutamic acid	1.1	0.487	1.1	0.293
C_0064	5-Hydroxylysine	1.1	0.457	1.2	0.131
C_0079	Trp	1.1	0.267	1.2	0.066
A_0085	NAD ⁺	1.1	0.434	1.2	0.071
C_0092	Thiamine	1.1	0.441	1.1	0.575
C_0062	2-Aminoacetic acid	1.1	0.109	1.0	0.862
A_0075	UTP	1.1	0.384	1.1	0.201
A_0083	UDP-N-acetylglucosamine	1.1	0.233	1.1	0.192
C_0024	Val	1.1	0.069	1.2	0.014
C_0059	Met	1.1	0.250	1.1	0.125
C_0037	Hydroxyproline	1.1	0.134	1.1	0.269
A_0026	cis-Aconitic acid	1.1	0.239	1.2	0.075
C_0010	2-Aminobutyric acid	1.1	0.209	1.1	0.066
C_0071	Citrulline	1.1	0.545	1.2	0.332
C_0033	Phecolic acid	1.1	0.654	1.2	0.375
C_0011	GABA	1.0	0.405	1.1	0.124
C_0057	Glu	1.0	0.335	1.2	0.027
C_0006	Ala	1.0	0.451	1.2	0.129
C_0083	Cystathionine	1.0	0.388	1.1	0.264
C_0022	5-Aminovaleric acid	1.0	0.714	1.1	0.626
C_0103	S-Adenosylmethionine	1.0	0.682	1.1	0.025
C_0072	Tyr	1.0	0.306	1.1	0.019
A_0037	Pantothenic acid	1.0	0.610	1.1	0.196
C_0030	Ile	1.0	0.638	1.2	0.030
C_0099	Argininosuccinic acid	1.0	0.734	1.0	0.793
C_0070	Arg	1.0	0.745	1.2	0.006
C_0044	Asp	1.0	0.553	1.1	0.050
C_0040	Leu	1.0	0.791	1.2	0.035

表6-3. 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	Compound name	Comparative Analysis			
		C-FABP添加 vs コントロール		A-FABP添加 vs コントロール	
		Ratio [†]	p-value [‡]	Ratio [†]	p-value [‡]
A_0071	XAN005	1.0	0.715	1.2	0.036
C_0054	Lys	1.0	0.764	1.1	0.174
C_0021	Pro	1.0	0.678	1.1	0.150
A_0067	NADP ⁺	1.0	0.968	0.9	0.583
A_0082	ADP-glucose GDP-glucose	1.0	0.976	1.1	0.312
C_0086	Butyrylcarnitine	1.0	0.802	1.1	0.414
C_0016	Hypotaume	1.0	0.874	1.1	0.370
A_0060	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	1.0	0.802	1.0	0.811
C_0065	Methionine sulfoxide	1.0	0.877	1.0	0.359
C_0014	Ser	1.0	0.891	1.1	0.356
C_0056	Gln	1.0	0.789	1.1	0.371
C_0005	β-Ala	1.0	0.824	1.0	0.693
A_0031	Citric acid	1.0	0.727	1.2	0.079
C_0069	N ^ε -Ethylglutamine	1.0	0.872	<1	N.A.
C_0023	Betaine	1.0	0.840	1.1	0.521
C_0082	β-Ala-Lys	1.0	0.909	1.0	N.A.
C_0104	Cysteine glutathione disulfide	1.0	0.861	1.6	0.044
C_0080	Kynurenine	1.0	0.305	1.1	0.066
C_0002	Gly	0.9	0.544	1.1	0.164
C_0055	N-Acetylserine	0.9	0.236	0.9	0.183
C_0091	Glycerophosphocholine	0.9	0.699	1.0	0.021
C_0009	Homoserine lactone	0.9	0.693	1.1	0.334
A_0032	Gluconic acid	0.9	0.248	1.0	0.650
A_0012	4-Methyl-2-oxovaleric acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid	0.9	0.596	1.5	0.023
C_0038	Creatine	0.9	0.455	1.2	0.093
A_0029	3-Phosphoglyceric acid	0.9	0.430	1.0	0.488
C_0043	Thiaproline	0.9	0.479	0.8	0.125
C_0045	Adenine	0.9	0.359	1.1	0.221
A_0008	Fumaric acid	0.9	0.304	1.0	0.660
C_0032	XC0016	0.9	0.431	1.1	0.095
A_0013	Malic acid	0.9	0.282	1.0	0.980
C_0030	Taurine	0.9	0.346	1.0	0.752
A_0035	Mucic acid	0.9	0.551	1.0	0.948
A_0060	GMP	0.9	0.271	1.1	0.249
A_0086	NADH	0.9	0.235	1.1	0.465
C_0100	Glutathione (SSSG) ₂ divalent	0.9	0.288	1.2	0.116
A_0049	Sedoheptulose 7-phosphate	0.9	0.393	1.0	0.619
A_0004	Lactic acid	0.6	0.145	1.1	0.327
C_0020	Creatinine	0.8	0.208	1.0	0.969
A_0014	Threonine acid	0.8	0.070	0.9	0.484
C_0003	Putrescine	0.8	0.190	1.0	0.913
A_0046	Sorbitol 6-phosphate	0.8	0.672	1.2	0.630
A_0070	GDP	0.8	0.170	0.9	0.485
C_0035	N-Acetylputrescine	0.8	0.194	1.3	0.053
A_0058	AMP	0.8	0.021	1.0	0.851
A_0069	ADP	0.8	0.035	1.0	0.622
A_0054	UMP	0.8	0.092	1.1	0.581
A_0073	dTTP	0.7	0.104	0.8	0.135
A_0010	Succinic acid	0.7	0.056	0.9	0.305
A_0011	5-Oxoproline	0.7	0.025	0.8	0.141
A_0007	Glyceric acid	0.7	N.A.	0.9	0.577
A_0039	Ribulose 5-phosphate	0.6	0.085	0.7	0.114
C_0094	2'-Deoxyguanosine	0.6	0.040	0.6	0.041
C_0029	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	0.6	N.A.	0.02	N.A.
A_0027	O-Phosphoserine	0.6	0.081	0.6	0.098
A_0066	UDP	0.5	0.020	0.7	0.064
A_0065	CDP	0.4	0.015	0.7	0.046
C_0060	Guanine	0.4	0.090	0.7	0.280
C_0085	2'-Deoxycytidine	0.4	0.120	0.5	0.192
C_0098	Guanosine	0.3	0.014	0.5	0.050
C_0093	Adenosine	0.2	0.017	0.6	0.044
A_0025	Decanoic acid	<1	N.A.	1.1	0.145
C_0046	Hypoxanthine	<1	N.A.	0.6	0.114
C_0095	Inosine	<1	N.A.	<1	N.A.
A_0009	2-Oxoisovaleric acid	N.A.	N.A.	<1	N.A.

IDは測定モードの略文字と通し番号からなり、Cはカチオンモード、Aはアニオンモードを示す。
 N.D.: Not Detected 解析対象であるが、検出限界以下であった。
 N.A.: Not Available. 計算対象であるが、データ不足のため計算不可であった。
[†] 検出ピークのm/zとMTからHMTデータベースに照合し得られた候補化合物
[‡] 2群間の検出平均値の比は、後者を分母として算出している。
[§] Welchのt-検定のp-valueとその範囲を示す。(*<0.05, **<0.01, ***<0.001)
 ピーク検出が検出したGlu, Pro, Gln, Glyに関しては¹³CのRelative Areaを用いている。
 C-FABP添加/コントロールモード(異同)している。

候補化合物が絞り込まれた 155 ピークについて、各群間の相対面積値比の算出及びWelchのt-検定を実施した(表7)。C-FABP添加群とコントロール群の比較の結果、24のピークがp<0.05であった(表7-1)。このピークのうち、上位は解糖系に含まれる糖リン酸Fructose 6-phosphate, Glucose 6-phosphateであり、C-FABP添加群で高値を示した。一方、プリンヌクレオシド類のAdenosine, AMP,

ADPなどはC-FABPで総じて低値を示した。A-FABP添加群とコントロール群間比較の結果、40ピークがp<0.05であった(表7-2)。このピークのうち上位にアミノ酸や脂質分解産物が多く含まれており、そのすべてがA-FABP添加群で高値を示した。一方、糖リン酸はC-FABP添加群と同様にA-FABP添加群で高値を示した。

表7-1. C-FABP添加群とコントロール群の群間比較

ID	HMT DB ¹ Compound name	Comparative Analysis CFABP添加 vs コントロール	
		Ratio ¹	p-value
A_0024	Glycerol 3-phosphate	2.0	6.5E-04 ***
A_0044	myo-Inositol 2-phosphate	1.7	0.005 **
A_0042	Fructose 6-phosphate	3.6	0.008 **
C_0026	Homoserine	1.2	0.007 **
C_0053	Carnitine	1.1	0.008 **
A_0045	Glucose 6-phosphate	4.1	0.009 **
C_0047	1-Methylnicotinamide	1.2	0.010 *
C_0019	1-Pyrroline 5-carboxylic acid	2.5	0.011 *
C_0042	Ornithine	1.3	0.013 *
A_0051	N-Acetylneuraminic acid	1.4	0.014 *
C_0058	Guanosine	0.3	0.014 *
A_0055	CDP	0.4	0.015 *
A_0081	NADPH_civalent	1.3	0.017 *
C_0053	Adenosine	0.2	0.017 *
A_0056	UDP	0.5	0.020 *
A_0058	AMP	0.8	0.021 *
C_0081	XC0051	1.8	0.021 *
A_0011	5-Oxoproline	0.7	0.025 *
A_0036	Phosphocreatine	1.2	0.033 *
A_0059	ADP	0.8	0.035 *
C_0102	XC0132	1.2	0.037 *
C_0094	2'-Deoxyguanosine	0.6	0.040 *
A_0056	Fructose 1,6-diphosphate	1.6	0.044 *
C_0074	N-Acetyllysine	1.3	0.049 *

表7-2. A-FABP添加群とコントロール群の群間比較

ID	HMT DB ¹ Compound name	Comparative Analysis AFABP添加 vs コントロール	
		Ratio ¹	p-value
C_0047	1-Methylnicotinamide	1.3	8.8E-04 ***
A_0045	Glucose 6-phosphate	2.8	0.003 **
A_0015	Ethanolamine phosphate	1.2	0.005 **
A_0024	Glycerol 3-phosphate	1.9	0.006 **
C_0070	Arg	1.2	0.006 **
C_0013	Choline	1.4	0.007 **
C_0061	His	1.2	0.009 **
C_0001	Ethanolamine	1.4	0.010 **
C_0025	Thr	1.2	0.010 **
A_0020	Pelargonic acid	1.4	0.014 *
C_0024	Val	1.2	0.014 *
A_0022	Dihydroxyacetone phosphate	1.6	0.015 *
C_0026	Homoserine	1.2	0.016 *
A_0042	Fructose 6-phosphate	2.6	0.018 *
A_0051	N-Acetylneuraminic acid	1.4	0.018 *
C_0072	Tyr	1.1	0.019 *
C_0075	Gly-Asp	1.1	0.020 *
C_0081	XC0061	1.7	0.021 *
C_0051	4-Guadinobutyric acid	1.2	0.022 *
A_0034	Lauric acid	1.4	0.022 *
A_0012	α-Methyl-β-oxovaleric acid	1.5	0.023 *
C_0036	β-Hydroxyproline	1.8	0.025 *
C_0103	S-Adenosylmethionine	1.1	0.026 *
C_0057	Glu	1.2	0.027 *

c. 統計解析 (PCA, HCA)

主成分分析 (PCA) はSampleStat ver. 3.14 (HMT) 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) を用いて行った。両解析とも、データの前処理としてピーク単位での標準化 ($\mu=0, \sigma=1$) を行っている。

検出されたピークを用いて主成分分析を行った結果を図 23 に示す。また、階層的クラスタリングを行い、HeatMap 表示させた結果を図 24 に示す。主成分分析の結果、PC1 で A-FABP がコントロール群から分離していることが確認された。これはアミノ酸や TCA 回路中間体などが高値であることを示している。また、PC2 で C-FABP が他群と分離していることが確認された。これは糖リン酸 (解糖系の中間体) が高値であることを示しており、一方でヌクレオシドは低値であることを示している。また、HeatMap 解析の結果でも、A-FABP 添加でアミノ酸、TCA 回路中間体、核酸 (三リン酸化) が高値を示し (図 24)、A-FABP, C-FABP どちらの FABP を添加でも共通して上昇しているのが、糖リン酸 (解糖系中間体)、長鎖脂肪酸であった。また、コントロール群で高値を示したものはプリンヌクレオシドであった。これらの測定において、外れ値となる検体が無かったことからデータの信頼性が確認できる。

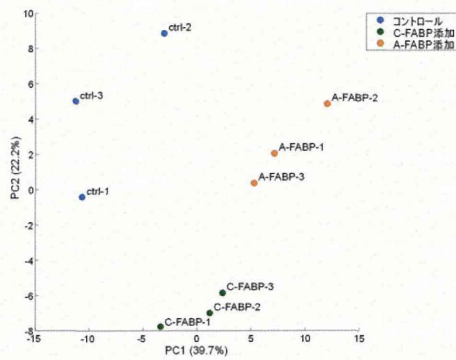


図23. PCA結果
PC1, PC2はそれぞれ第1主成分得点、第2主成分得点を示し、括弧内の数字は各主成分の寄与率を示す。各プロットのラベルはサンプル名を示す。

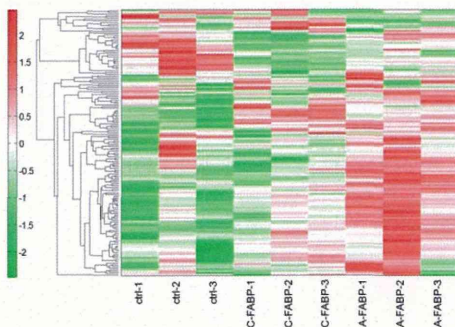


図24. HCA結果 (HeatMap表示)
横軸はサンプル名、縦軸はピークを示す。ピークに対してHCAを実施し、ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。緑が濃いほど平均よりも小さいことを示し、赤が濃いほど平均よりも大きいことを示す。

d. 代謝経路の描画

代謝物質定量データの代謝経路マップへの描画を実施した。代謝経路の描画には、VANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) を用いた。尚、代謝経路はヒトで確認された酵素を基に作成している。検出されたピークを候補化合物にもとづいて解糖系/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・ピリミジン代謝、補酵素代謝及び各種アミノ酸代謝経路に分類し、代謝経路上に描画した (図25~32)。

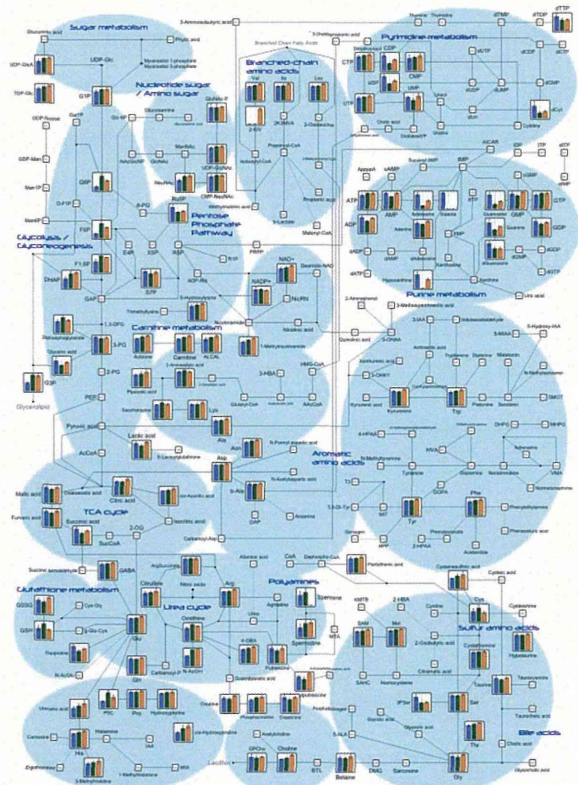


図25 代謝物質の経路図
HMDB代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描画した。グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.: Not Detected.

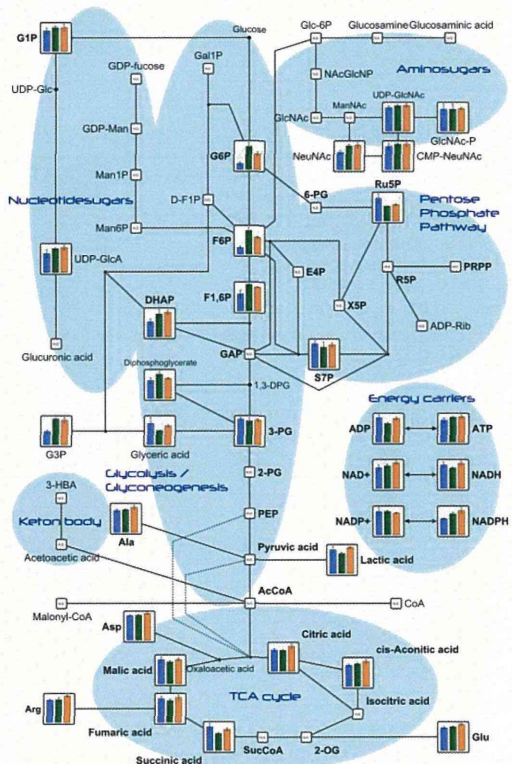


図26 代謝物質の経路図(中心炭素代謝)
HMDB代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描画した。グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.: Not Detected.

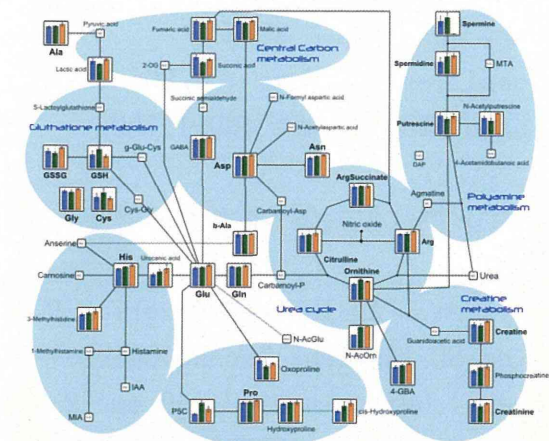


図27 代謝物質の経路図(尿素回路と関連アミノ酸の代謝)
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

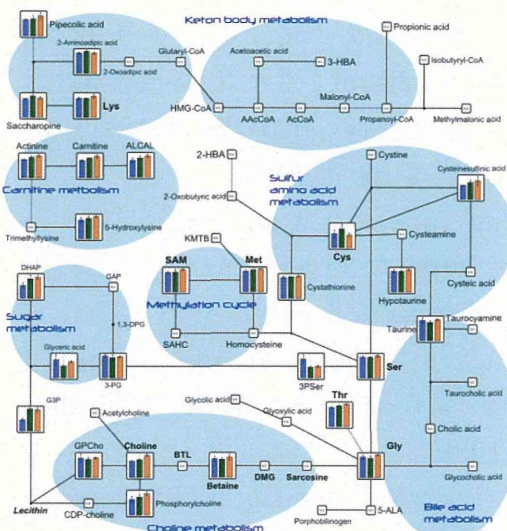


図28 代謝物質の経路図(脂質代謝とアミノ酸の代謝)
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

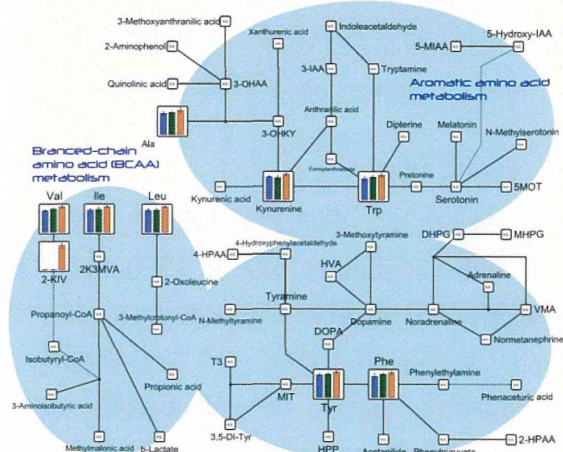


図29 代謝物質の経路図(分岐鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸の代謝)
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

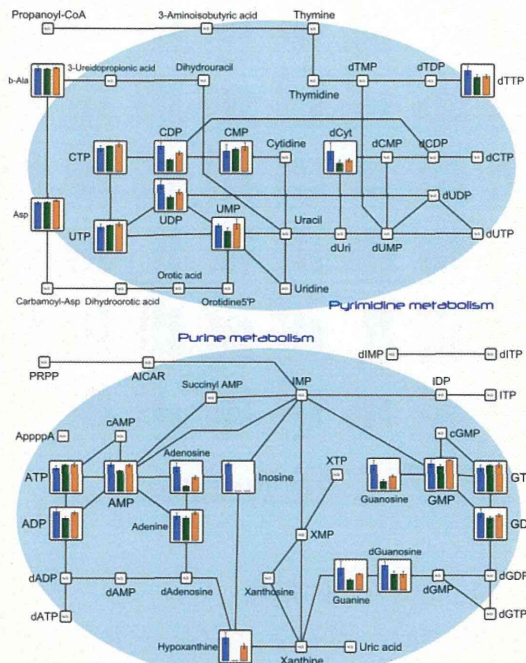


図30 代謝物質の経路図(核酸の代謝)
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.

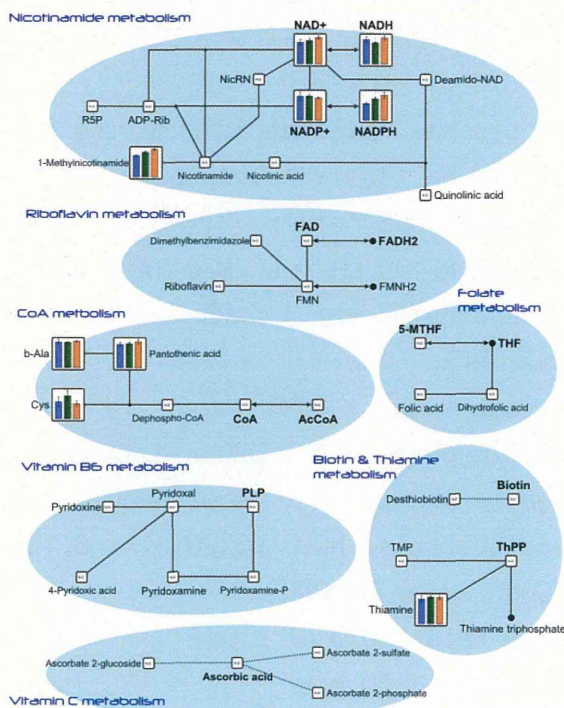


図31 代謝物質の経路図(補酵素の代謝)
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール(青色)、C-FABP添加(緑色)、A-FABP添加(橙色)の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected.