厚生労働科学研究費補助金
（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

腹圧性尿失禁に対する脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療における新規･筋分化バイオマーカの開発 -脂肪結合蛋白(FABP)と品質評価法の標準化-

研究分担者　山本徳則　名古屋大学大学院医学系研究科　泌尿器科学　准教授
亀井　譲　名古屋大学大学院医学系研究科　形成外科学　教授

研究要旨
前年度は腹圧性尿失禁の再生治療に用いる脂肪由来幹細胞（ASCs）からFABPが分泌され、オートクリーン、パラクリーンに作用して、筋分化を促進することを遺伝子解析（カスケード解析）を用いてin vitroで明らかにした。今回は、筋分化について、さらにネットワーク解析及びExpression profile解析を用いて確認した。次に、メタボローム解析を行い、この現象は、ASCsが脂質の分解、取り込み、TCA回路亢進を介して行っていることを明らかにした。In vivoにおいてFABPは、代謝亢進を介したASCsの新規･筋分化バイオマーカとなる可能性が示唆された。

A．研究目的

本研究は、ヒト脂肪由来幹細胞として自己皮下脂肪組織由来幹細胞を(再生細胞：Adipose Derived Regenerative Cells：ADRCs)分離採取し、経尿道的内視鏡下に傍尿道に注入･移植することで、尿道括約筋再生により尿失禁の改善を図ることを目標とする。近年、脂肪前駆細胞は炎症性マクロファージにも分化しうることが明らかとなり、ASCs を炎症細胞ではなく、組織間葉系細胞へ分化･再生させるための品質評価法の確立が求められている。その際、脂肪由来幹細胞の分化マーカーとして注目されるのが、脂肪酸結合蛋白質（Fatty Acid Binding Protein; FABP）である。FABPは､細胞質内の脂肪酸と結合しミトコンドリアやペルオキシソームへ輸送することによりβ酸化を促し､エネルギー産生･恒常性の維持に寄与すると考えられる分子量約14KDaの蛋白質である｡脂肪細胞やマクロファージにはA型（aP2とも呼ばれる)、腎臓の近位尿細管上皮細胞にはL型､内皮細胞や転移性の癌細胞にはC型(E型とも呼ばれる)のFABPが発現することが知られている。近年、脂肪細胞由来A-FABPがオートクライン、あるいはパラクラインに働き､炎症性マクロファージの活性化､分化誘導を引き起こすことが報告された｡そこで本研究では､移植した脂肪由来幹細胞が適切に組織間葉系細胞へ分化･再生し得ること

を検証するため、ADSCs を用いた A-FABP, C-FABP の発現パターンの標準化を品質管理可能な評価法として採用できるのではないかと考えた。
本報告書では、下記内容について述べる
1)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)を検出しうる抗体の大量調製
2)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)の検出系構築
3)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)の高次構造解析
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

B.研究方法と結果
1. 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)を検出しうる抗体の大量調製
1-1. マウスへの C-FABP 免疫
取得したヒト C-FABP 組換え蛋白質を用いて3匹の MRL/MpJ マウスに免疫を行った。免疫スケジュールを図1に示す。

図1. 免疫スケジュール

1-2. 抗体価確認
2回目免疫の 10 日後に採取した免疫マウス血清に対して、ELISA アッセイとドットブロット及びウエスタンブロットを用いて、C-FABP に対する抗体価を確認した。

a. ELISA アッセイ
タンパク質固相化用プレートに C-FABP 及び L-FABP を固相化したプレートを作製した。一方、得られた3匹のマウスからそれぞれ血清を採取し (A, B, C)、3 倍から 100 倍希釈の系列を作製し、本固相化プレートに添加して反応性を確認した。図2に血清の抗体価確認の結果を示す。グラフはマウス A, B, C をそれぞれ青, 緑, 赤のラインで示し、コントロールとして Normal Mouse Serum (NMS) を評価した。
その結果、C-FABP に対しては 3 匹ともほぼ同等の抗体価上昇が確認された。L-FABP に対しては、マウス A のみ抗体価が低く、他の 2 匹は同様の抗体価が確認された。

b. ドットブロット
精製した C-, L-FABP と市販の I-, H-, B-FABP を親水化した PVDF 膜上に任意の濃度で液滴を作成した(メンブレン上の FABP 配置図は図3の上に示す)。膜上の液滴が乾燥したことを確認後、5%スキムミルクを含んだ TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、Can Get Signal (Wako) Solution 1 で 1000 倍に希釈したマウス抗血清 A, B, C をそれぞれ反応させ、室温で1時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄を行い、Can Get Signal Solution 2 で 2000 倍に希釈した Anti mouse IgG, HRP linked Antibody を反応させ、室温で1時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄を行い、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents

を用いて発光させバンドを検出した(図3の最下段)。なお、メンブレンへのFABPの固定の確認のため弊社保持の C-FABP pAbを用いて検出を行った(図3の中段)。その結果、マウスA,B,Cどの抗血清においてもC-FABPに対するドットが確認された。一方L-FABPに対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウスB,C ＞ Aとなっており、これは ELISA の結果と一致した傾向となった。また、I-,H-,B-に対しても共通して反応性が確認されており強度としてはB>C>Aであった。

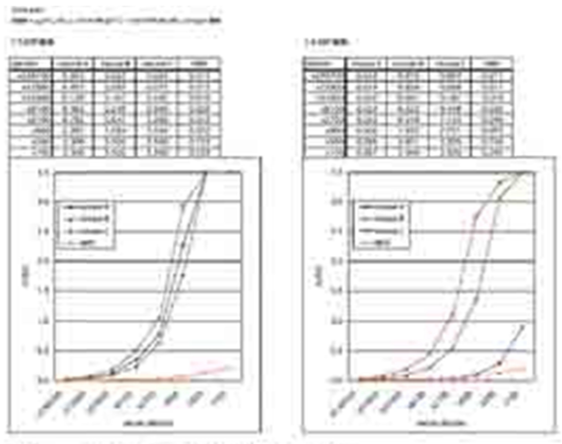


図2. マウス抗血清のELISA検定

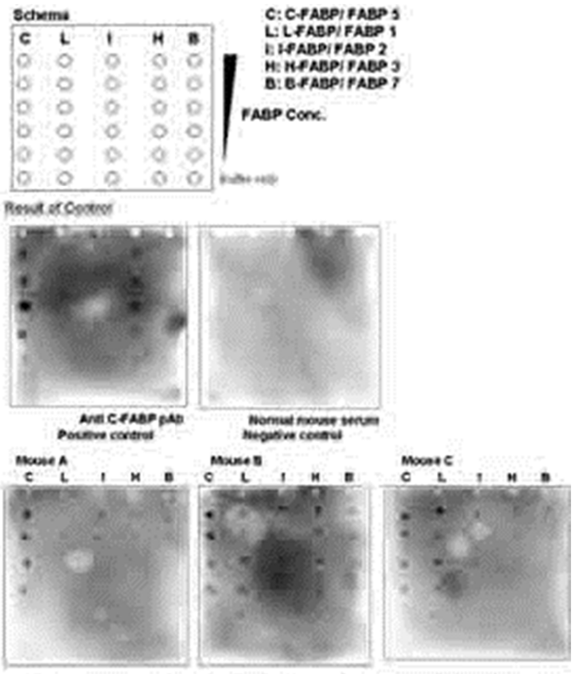


図3. マウス抗血清のドットブロット検定

c．ウエスタンブロット

上記ドットブロットと同様に各種 FABP を任意の濃度でNuPAGE 4-12%ビス-トリスゲルにアプライし、NuPAGE MES SDS ランニングバッファーにて 200 V, 35 分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを PVDF 膜に転写した。以下の作業は上記ドットブロットと同様のプロトコルにて検出を行った（図4)。

その結果、どのマウス抗血清においてもC-FABP に対する反応性が確認された。一方L-FABPに対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウスB,C ＞ Aとなっており、これはELISA,ドットブロットの結果と一致した傾向となった。また、マウスB, Cにおいては I-, H-, B-に対しても共通して反応性が確認されており、マウスAは僅かにB-FABPへの反応性が確認された。

以上より、C-FABP に比較的強く反応するマウスAと、他のFABPタイプにも広

く反応するマウス B を次の工程に進めることとした。

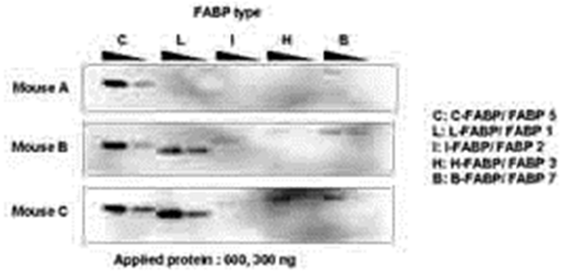


図4. マウス抗血清のウエスタンブロット検定

1-3. 細胞融合

マウス A，B から脾臓を採材し、B 細胞を取得した。本細胞を標準的な PEG 法を用いてミエローマ細胞と細胞融合させ、抗体産生細胞を作製した。得られた細胞について ELISA 及び、ドットブロットを用いて抗体のスクリーニングを行った。上記と同様の方法で ELISA，ドットブロットを実施したまとめを表１に示す。その結果 C-FABP に特異的に反応する抗体産生細胞を 9 クローン、様々な FABP タイプに広く反応する抗体産生細胞を 10 クローン取得した。

表1. 抗C-FABP抗体産生融合細胞スクリーニング

Clone No.	ELISA screening (OD value)			Dot Blot					
	C-FABP	L-FABP	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-A	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-B	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-C	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-D	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-E	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-F	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-G	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-H	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-I	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-J	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-K	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-L	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-M	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-O	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-P	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-R	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-S	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-T	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-U	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-V	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-W	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-X	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-Z	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-AA	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
TA-AB	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

1-4. 作製抗体の大量調製

1-3 で取得したクローンのうち、C-FABP に対する反応特異性の強い Clone No. TA-A，TA-K，TA-W と、他のアイソタイプにも反応する TA-J，TA-R について再度クローニングを行った後、マウス腹水化し精製を行うことで抗体の大量調製を行った。

マウス腹水化は 7～8 週齢のヌードマウスにプリスタンを 0.5mL/匹で腹腔内接種した。2～3 週間後、マウスに抗体産生細胞を $1x10^7$ 個腹腔内に接種した。さらに約 2 週間後、マウスが腹水化されたところで腹水を採取し、得られた腹水は硫安塩析法により抗体の精製を行った。

精製された抗体の IgG クラスはマイクロオクタニー法によって同定した。その結果、表 2 に示すように IgG1 の TA-A，TA-R と、IgG2a の TA-K，TA-W 及び、IgM の TA-J のモノクローナル抗体を取得した。

これらの抗体の反応性を確認するために、C-FABP 抗原を用いたタイトレーションアッセイを行った。各種抗原（C-FABP，L-FABP）を 1μg/mL（10mM PBS，1mM EDTA1Na，pH7.2）50μL/well でプレートに分注し、4℃で一晩静置して抗原固相化プレートを作製した。本固相化プレートを用い、洗浄及びブロッキングを行った後、１次反応として抗体濃度 3μg/mL x 3 倍希釈系列、50μL/well で分注し、室温にて１時間反応させた。反応プレートを洗浄後、次いで 2 次反応として、HRP 標識抗マウス IgG+M ポリクローナル抗体を 50μL/well で室温にて 1 時間反応させた。反応プレートを洗浄後、TMB 試薬（ScyTek）を分注し、室温にて 30 分間発色反応を行った。本タイトレーションアッセイの結果を図 5 に示す。その結果、IgM である TA-J は L-FABP に特異的な抗体であることが判明し、その他４種類は C-FABP 特異的な親和性を持

つ抗体であることが確認された。さらに上記４種の抗体については図 6 においてC-FABPのSDS-PAGE後ウエスタンブロットすることで反応を確認した。

表2. 精製モノクローナル抗体のIgクラス

No.	Clone No.	Ig class
1	TA-A	IgG1 (κ)
2	TA-J	IgM (κ)
3	TA-K	IgG2a (κ)
4	TA-R	IgG1 (κ)
5	TA-W	IgG2a (κ)

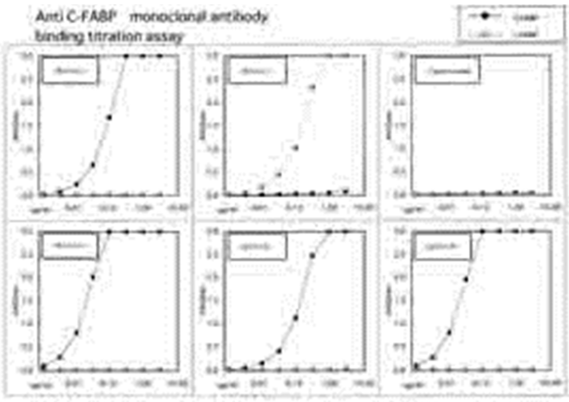


図5. 精製モノクローナル抗体を用いた比活性検定

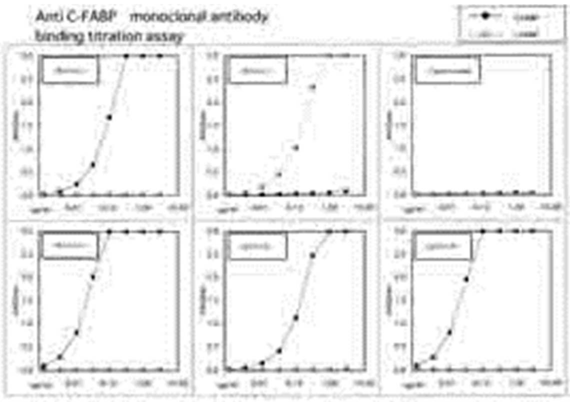


図5. 精製モノクローナル抗体を用いた比活性検定

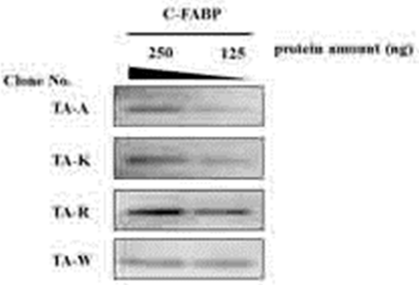


図6. 精製モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット
1st anti-body : Anti C-FABP mAb (x 2000 dilution)
2nd anti-body : Anti mouse IgG-HRP (x 2500 dilution)

2．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)の検出系構築

2-1．サンドイッチ ELISA 系の設計

上記「1．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)を検出しうる抗体の大量調製」の項で得られた抗ヒト C-FABP マウスモノクローナル抗体 4 種を用い、サンドイッチ ELISA 法によって試料中 C-FABP 量を測定する系を構築した。今回は感度の上昇を図るためビオチン-アビジン反応系を用いた検出系を設計した(図 7)。

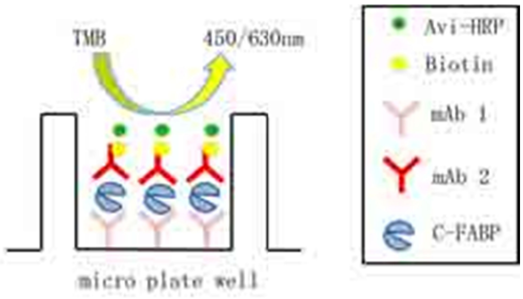


図7. C-FABP検出ELISA系の設計

2-2．アッセイ構築条件検討

a．ビオチン標識検出抗体の調製

4 種のモノクローナル抗体それぞれに対して Biotin Labeling kit-NH2（DOJINDO，LK03）を用いて抗体のビオチン化を行った。方法はキット添付操作マニュアルに従って行った。

得られたビオチン化抗体のビオチン化

を確認するために、C-FABP 直接固相化 ELISA を行った。50 mM 炭酸・炭酸水素緩衝液，pH9.6 を希釈液として、C-FABP を 100ug，10ug，1ug，100ng，10ng，1ng，0.1ng，0ng /well となるように C8 MAXISORP NUNC-IMMUNOMODULE（Thermo SCIENTIFIC，445101）に分注し、4℃で一晩固相化反応を行った。抗原固相化プレートを PBS-T（0.1 M リン酸緩衝液，pH7.6，150 mM NaCl，0.05% Tween 20）300μL/well x 3 回洗浄を行った。次にブロッキングバッファー（0.1 M リン酸緩衝液，pH7.6，150 mM NaCl，2% BSA）を 200μL/well で添加し、25℃にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、PBS-T を用いて 3 回洗浄を行い、各種ビオチン化モノクローナル抗体を 0.2μg/mL で 100μL/well ずつ分注し、25℃，2 時間反応を行った。その後、PBS-T で 3 回洗浄を行い、Avidin-HRP (1000 倍希釈)溶液を 100μL/well ずつ分注し 25℃，1 時間反応を行った。反応後、再度 PBS-T にて 3 回洗浄を行い、TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurMedics，TMBW-1000-01) を 100μL/well ずつ分注し 25℃，10 分間反応を行った。反応後、反応停止液（1N 硫酸）を 100μL/well ずつ添加し反応を停止した後、プレートの端を軽く叩き攪拌して、SPECTRAmax 340PC[384] を用いて主波長 450nm/副波長 630nm の吸光度を測定した。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank)を差し引いた値で解析を行った。その結果、TA-A，TA-K，TA-R，TA-W 全てのビオチン化モノクローナル抗体において抗原濃度依存的なシグナルの上昇が確認された（図 8）。また図 8 の反応曲線から、抗体の抗原に対する親和性は TA-A>TA-K>TA-R=TA-W であると考えられた。

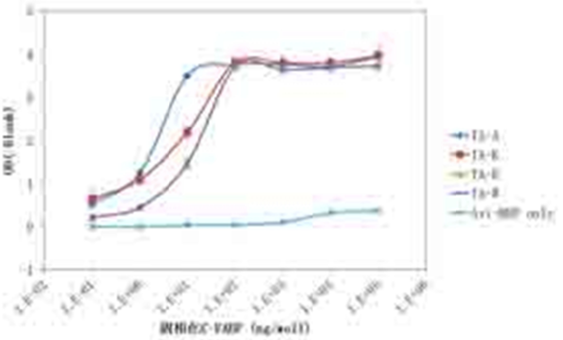


図8. ビオチン化検出抗体の評価

b. サンドイッチ ELISA 抗体マッチング

50 mM リン酸緩衝液，pH7.5 を希釈液として、各種抗体を 1μg/well となるように C8 MAXISORP NUNC-IMMUNOMODULE（Thermo SCIENTIFIC，445101）に分注し、4℃で一晩固相化反応を行った。抗体固相化プレートを洗浄液（50 mM リン酸緩衝液，pH7.5，3% スクロース，0.05% BSA，0.05% Tween 20）300μL/well x 3 回洗浄を行い室温にて 3 時間静置した。次に Well 内液を除いた後、ブロッキングバッファー（50 mM リン酸緩衝液，pH7.5，3% スクロース，0.05% BSA）を 200μL/well 添加し、25℃にて 1 晩ブロッキングを行った。ブロッキング後、内液を除き減圧デシケーター（0.085 MPa)で一晩プレートを乾燥させ抗体固相化プレートとした。

スタンダード希釈液（ダルベッコリン酸緩衝液，1% BSA，0.05% アジ化ナトリウム)を用いて C-FABP 組換え蛋白質を 10000，2000，400，80，16，3.2，0.64 ng/mL の濃度に希釈し、予め反応緩衝液 (0.1 M HEPES-NaOH，pH7.5，0.15 M NaCl，0.1% アジ化ナトリウム，1% BSA)で満たした抗体固相化プレートに分注し、25℃で 1 時間反応させた。反応後、PBS-T を用いて 3 回洗浄を行い、上記の各種ビオチン化モノクローナル抗体を 0.2μ

g/mL で 100μL/well ずつ分注し、25°C，1 時間反応を行った。その後、PBS-T で 3 回洗浄を行い、Avidin-HRP (1000 倍希釈)溶液を 100μL/well ずつ分注し 25°C，1 時間反応を行った。反応後、再度 PBS-T にて 3 回洗浄を行い、TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurMedics, TMBW-1000-01)を 100μL/well ずつ分注し 25°Cで 10 分間反応を行った。反応後、反応停止液 (1N 硫酸)を 100μL/well ずつ添加し反応を停止した後、プレートの端を軽く叩き攪拌した後、SPECTRAmax 340PC[384] を用いて主波長 450nm/副波長 630nm の吸光度を測定した。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank) を差し引いた値で解析を行った (図 9)。その結果、どの組み合わせも C-FABP 最大濃度 10μg/mL においてもシグナルの上昇が確認されなかった。

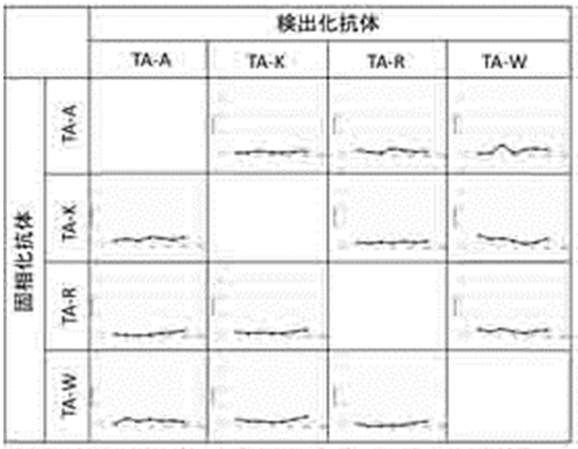


図9. サンドイッチELISA抗体マッチング試験 (前処理無)

上記の結果、どの抗体の組み合わせにおいても ELISA シグナルが検出されなかったことから、抗原の前処理を検討した。

c. 前処理検討

抗体固相化プレートに C-FABP を分注する前に、前処理液として 40 mM AAPH (ラジカル発生剤), 2% SDS, 2% SDS+10 mM DTT, 3% H_2O_2, 1.6 M 塩酸グアニジン (Gu-HCl)溶液を用いて C-FABP と 1:1 で混合し、25°Cにて 10 分間前処理反応を行い、上記と同様の操作で ELISA 反応を行った。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank)を差し引いた値で解析を行った (図 10)。その結果、どの前処理でも ELISA の値が上昇しない抗体の組み合わせがある一方で、SDS, H_2O_2, Gu-HCl の前処理によって ELISA 値が上昇する抗体の組み合わせが数組存在した。その中でもっとも低い抗原濃度域から ELISA 値が上昇する前処理と抗体の組み合わせが「前処理 SDS, 固相化 TA-K/検出 TA-R」と「前処理 SDS, 固相化 TA-W/検出 TA-A」であった。そのため以下はこの 2 つの組み合わせについて更なる検討を行った。

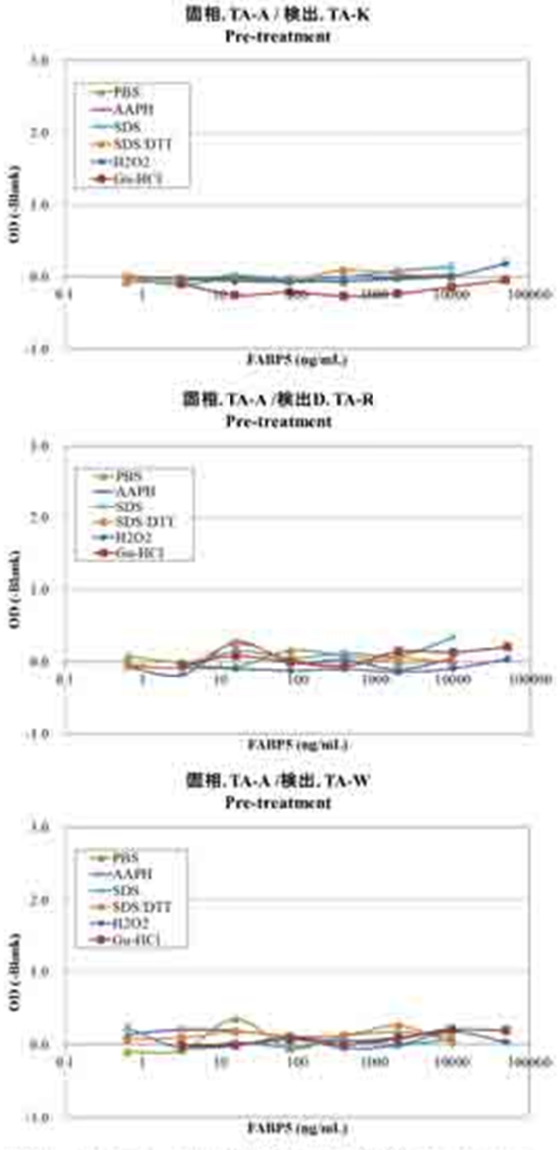


図10-1. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

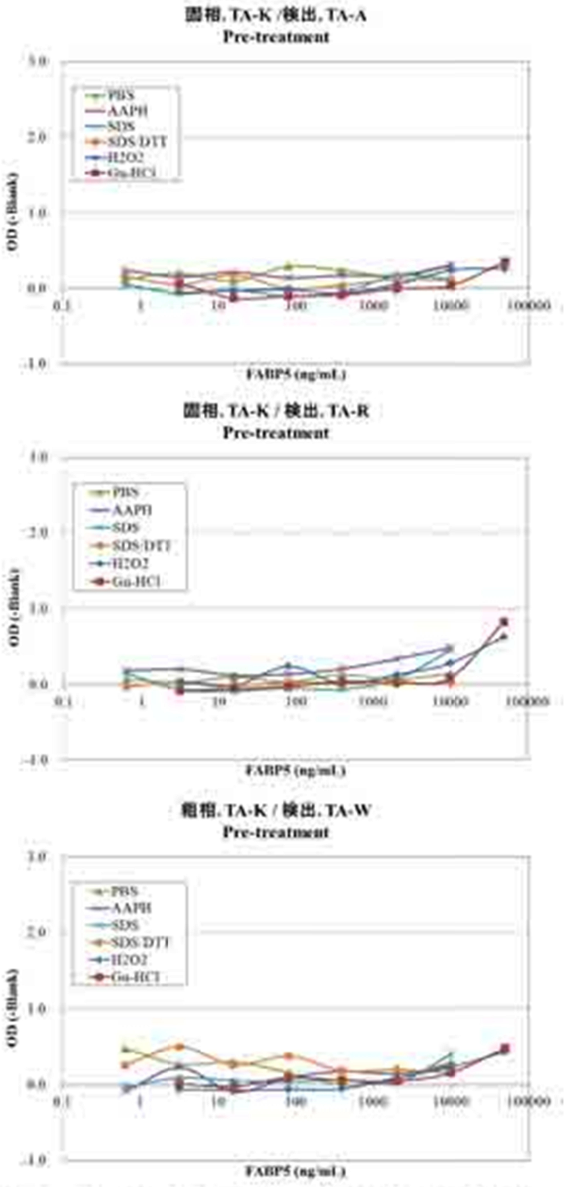


図10-2. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

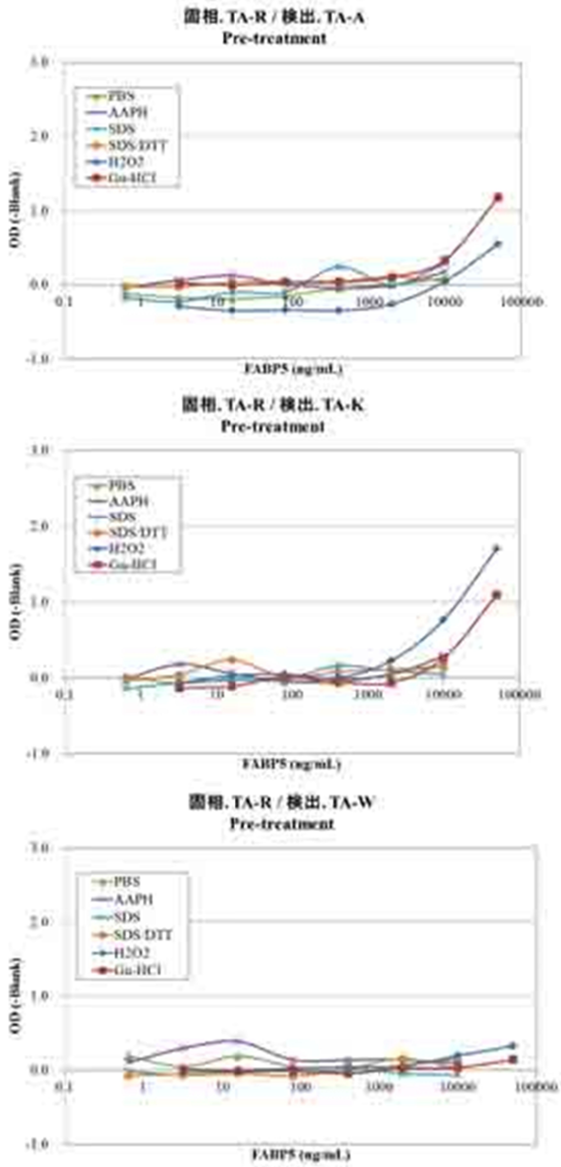


図10-3. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

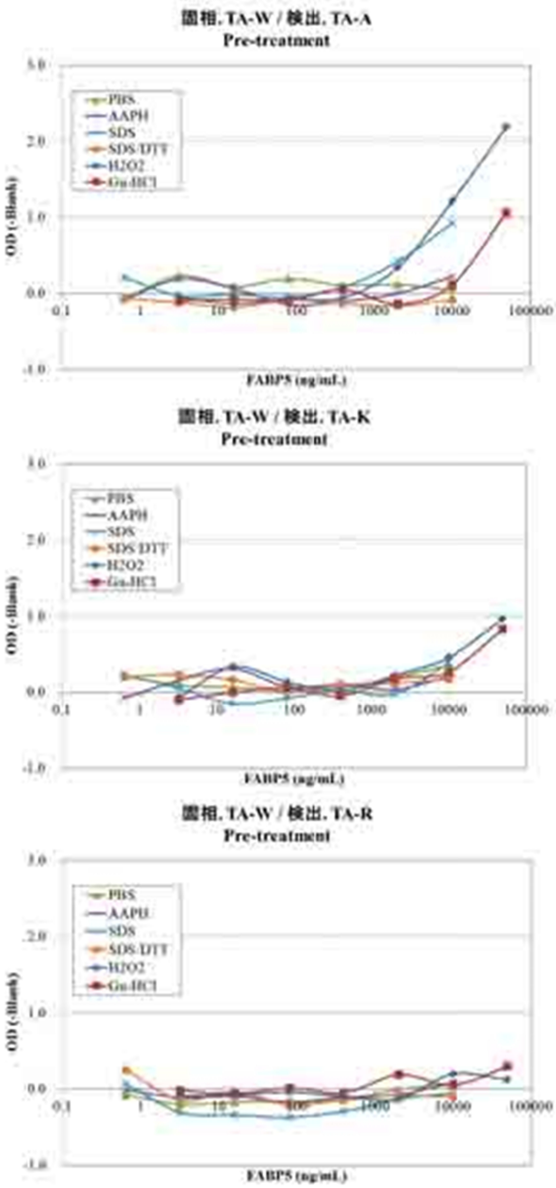


図10-4. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

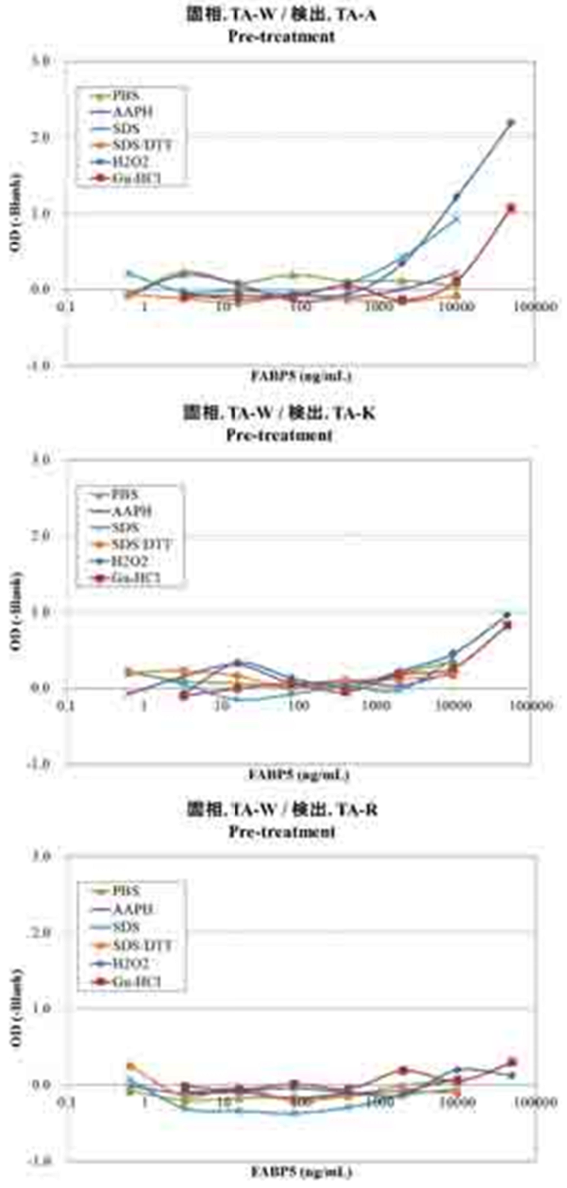


図10-L サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

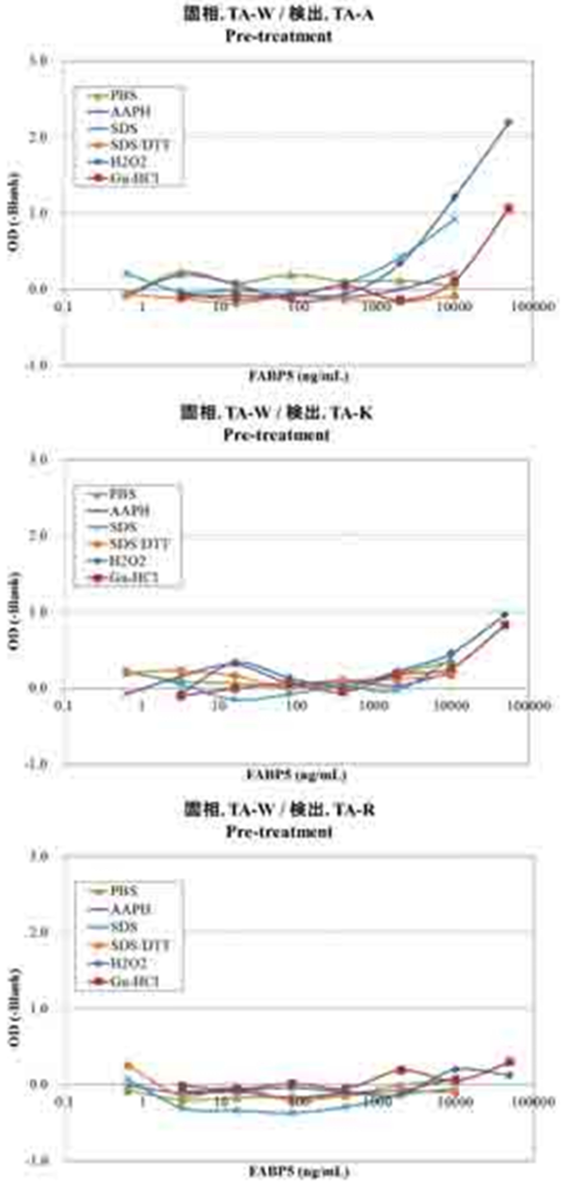


図10-L サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

d．各種条件検討

上記で選択した前処理・固相/検出抗体の組み合わせにおける固相抗体濃度の最適化検討を行った。

抗体固相化プレート作製時に固相化する抗体量を 5.0, 2.5, 1.0 μg に設定し、上記と同様の操作によって ELISA 反応を行った。その結果、固相 TA-K/検出 TA-R 系においては固相化抗体濃度依存的な ELISA 値の上昇は確認されなかった (図 11 A)。一方、固相 TA-W/検出 TA-A

系においては C-FABP 10～1000μg/mL の濃度域で固相化抗体濃度依存的なELISA値の上昇が確認された(図11 B)。しかし、固相化抗体量の増量によるシグナルの増幅効果と最小検出感度の上昇は顕著ではなかったため、原料のコストパフォーマンスの観点から、固相化抗体量は1μgと決定した。

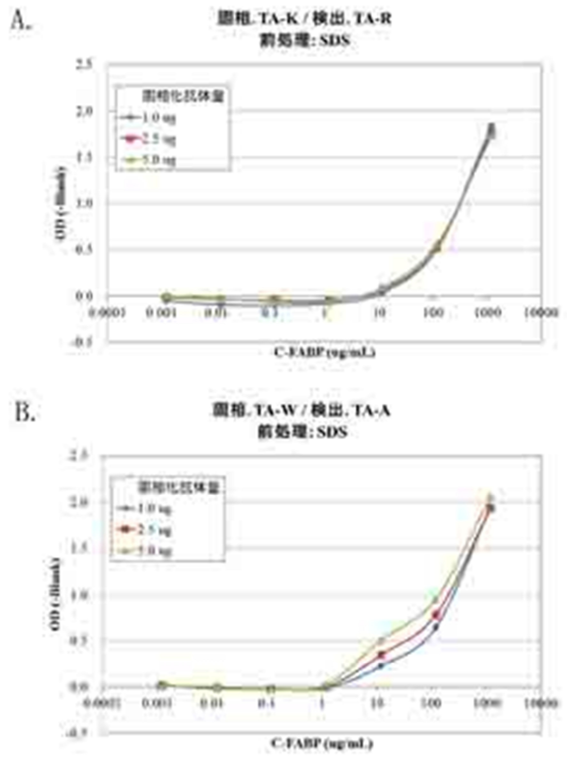


図11. 固相化抗体濃度の検討

次いで、固相化抗体量を1.0μgとして作製した抗体固相化プレートを用いて、検出抗体濃度の最適化検討を行った。ELISA反応は上記方法に則り、検出抗体の濃度を2.0, 4.0, 8.0μg/mLに設定した。検出抗体濃度上昇に伴いバックグラウンド吸光度の上昇が予想されたため、Avidin-HRP溶液は50,000倍希釈したものを用いて検討した。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図12 A, Bに、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図12 C, Dに示す。また、得られた測定値は、検出OD(図12 A, C)と、検出OD値から抗原濃度0 ng/mLのOD (Blank)を差し引いた値(図12 B, D)で解析を行った

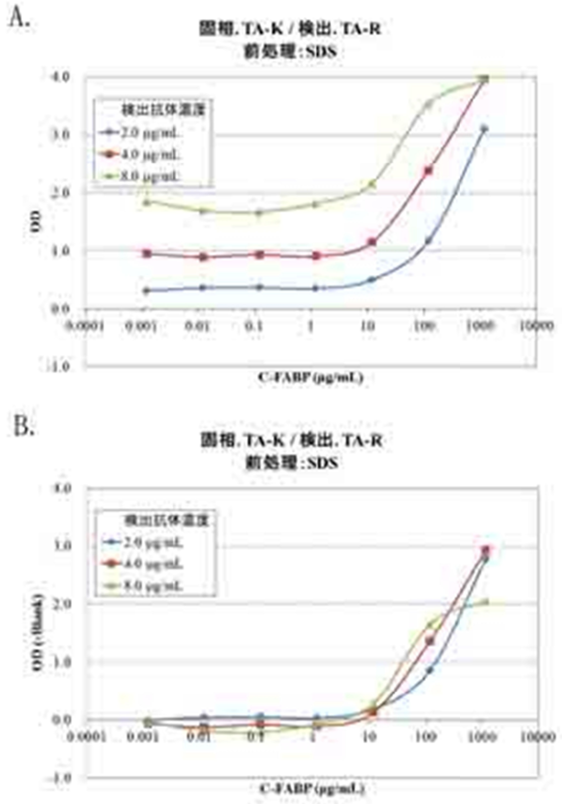


図12-1. 検出抗体濃度の検討

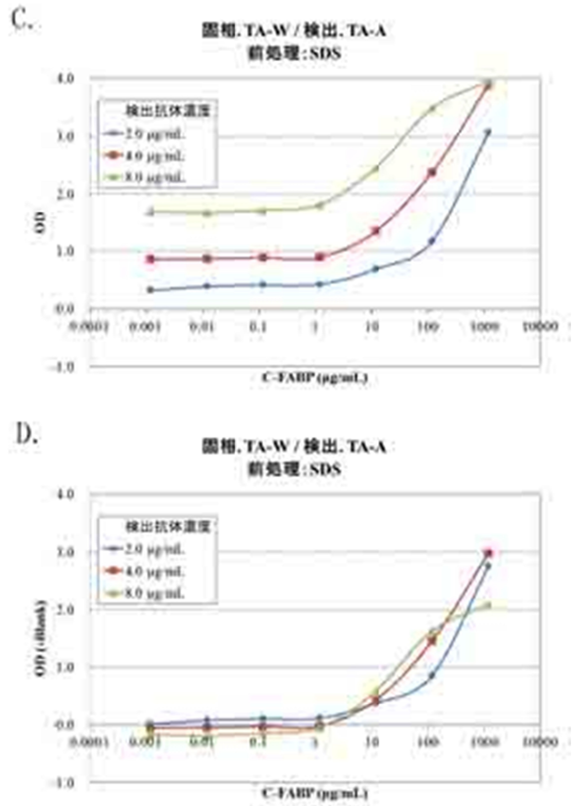


図12-2. 検出抗体濃度の検討

その結果、検出抗体濃度を増加させると、どちらの抗体の組み合わせも検出 OD 値の上昇が確認され、8.0 μg/mL では OD 値が 4.0 付近になり反応が飽和に達していることが確認された。しかし、OD (Blank)を差し引いた値での解析では、検出抗体量の増量によるシグナルの増幅効果と最小検出感度の上昇は顕著ではなかった（図 12 B, D)。よって、検出抗体濃度は 2.0 μg/mL とした。

さらに、上記条件（固相化抗体量 1.0 μg/well, 検出抗体濃度 2.0 μg/mL）の下で Avidin-HRP 溶液濃度の検討を行った。ELISA 反応は上記方法に則り、Avidin-HRP 濃度は原液濃度 5.0 mg/mL の希釈倍率を 5,000 倍(1.0 μg/mL), 15,000 倍(0.3 μg/mL), 50,000 倍(0.1 μg/mL)に設定した。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図 13 A に、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図 13 B に示す。また、得られた測定値は、検出 OD として解析を行った（図 13)。その結果、Avidin-HRP 溶液の希釈倍率の増加に伴いバックグラウンド吸光度の減少が確認された(図 13 A, B)。また、どちらの抗体の組み合わせでも 5,000 倍、15,000 倍希釈共に C-FABP 100 μg/mL において OD 値が 4.0 付近まで上昇し、反応が飽和していることが確認された。よって、Avidin-HRP 溶液濃度は 50,000 倍希釈(0.1 μg/mL)とした。

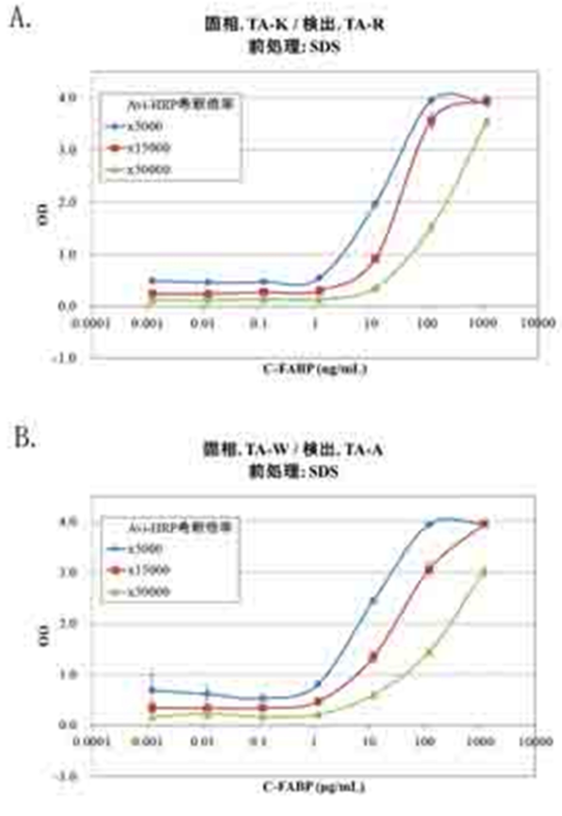


図13. Avidin-HRP濃度の検討

上記条件検討によって得られた C-FABP 検出 ELISA においては最低検出感度が 1 μg/mL 程度であるため感度の上昇が必

要である。そこで、図7で示したELISAの設計の範疇で感度上昇の検討を行うこととした。

先に述べた方法では抗原を前処理液と1:1で混合し、予め100 μLの反応緩衝液を満たした抗体固相化プレートに試料を20 μL添加することとしているが、この段階で反応系中では試料は12倍に希釈されている。この希釈比率を変えることで抗原の添加量の底上げを図ることとした。まず、前処理として用いているSDSが固相化抗体-抗原間の一次反応に影響するのかを検討するためにSDS濃度を検討した。

ELISA反応は上記方法に則り、SDS濃度は1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.17, 0.10%を設定した（先に示した条件は0.17% SDS）。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図14 Aに、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図14 Bに示す。また、得られた測定値は、検出ODとして解析を行った（図14）。その結果、SDS濃度0.17～0.25%でELISA値は最大値を示し、0.1% SDSではELISA値は減少することが確認され、0.5% SDS以上ではシグナルが顕著に減弱した。これは0.1% SDSでは抗原の前処理が不十分であり、0.5% SDS以上では一次反応に影響を与え固相化抗体を変性させてしまっているのではないかと考えられる。以上より、SDS濃度は0.25%まで増加させることが可能であると考えられた。

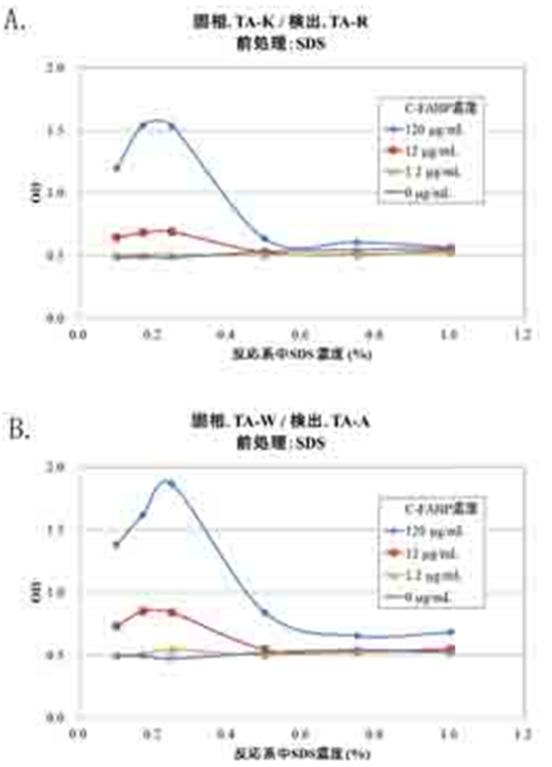


図14. 反応系中への混入SDS濃度の検討

次に上記検討の結果からSDS濃度0.25%に設定した場合の一次反応容量の最適化を検討した。ELISA反応は上記方法に則り、SDS濃度0.25%に固定して一次反応容量を100, 150, 200, 250, 300 μLとした。また、上記条件検討でのSDS濃度0.17%, 容量120 μLも同時に評価した。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図15 Aに、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図15 Bに示す。また、得られた測定値は、バックグラウンド吸光度を1としたS/N比を算出し解析を行った（図15）。その結果、どちらの抗体の組み合わせにおいても200 μLでS/N比の上昇が確認された。以上の結果より、一次反応容量は200 μLとすることとした。

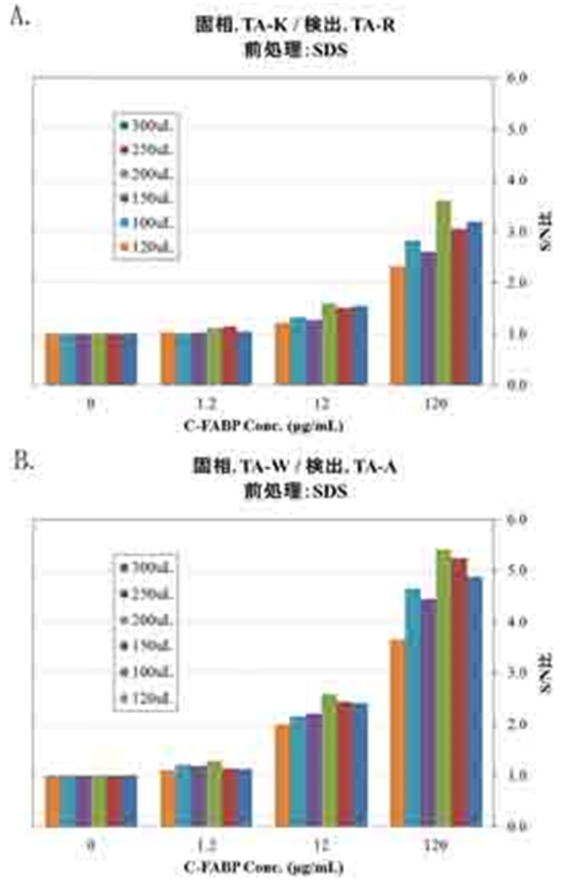


図15. 一次反応の容量検討

上記の各種条件検討によって試験的に決定したアッセイ条件を表3に示す。

表3. アッセイ条件のまとめ

C-FABP検出ELISAアッセイ条件	
抗体固相化プレート	固相化抗体濃度 1.0 μg
前処理	試料 + 1% SDS = 50 μL + 50 μL, 25℃, 10 min
反応プレートへの添加	前処理済試料 ＋ 反応緩衝液 =50 μL + 150μL 容量200 μL, SDS濃度 0.25%
1次反応	25℃, 60 min
2次反応	検出抗体濃度 2.0 μg/mL, 25℃, 60 min
Avi-HRP反応	Avi-HRP濃度 50000倍希釈(0.1 μg/mL), 25℃, 60 min
TMB反応	25℃, 15 min → 反応停止

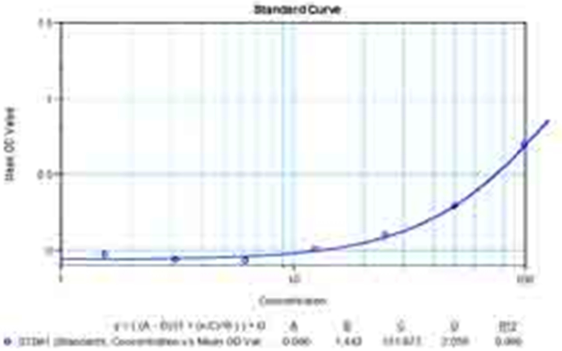
本条件によって「固相.TA-K/検出.TA-R」と、「固相.TA-W/検出.TA-A」の2つの組み合わせの ELISA 系において、C-FABP を用いた検量線（100, 50, 25, 12.5, 6.15, 3.125, 1.563 μg/mL)を作製した。なお、検量線のフィッティングカーブは 4-Parameter logistic model を用いて解析を行った（図 16)。「固相.TA-K/検出.TA-R」を図16 A と、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図16 B に示す。また、本検量線の回帰式を元に試料を試験的に測定し、C-FABP 濃度を算出した。表4ではそれぞれのカラム上部に ELISA 測定系の組み合わせ名（「固相.TA-K/検出.TA-R」、「固相.TA-W/検出.TA-A」および L-ABP ELISA）を示し、実際の測定 OD と濃度換算値を示す。なお、表4中で灰色に示されたセルは測定 OD 値がバックグラウンド以下になった試料であり、測定値として信頼性が低いため参考値である。

その結果、検量線の R^2 値は「固相.TA-K/検出.TA-R」系では 0.996、「固相.TA-W/検出.TA-A」系では 0.997 と高い寄与率が得られた。2つの系を比較すると感度、最大シグナル強度共に「固相.TA-W/検出.TA-A」＞「固相.TA-K/検出.TA-R」であり、「固相.TA-W/検出.TA-A」の方が優れた検出系であることが確認された。また、試験測定の結果、感度の低い「固相.TA-K/検出.TA-R」系で OD が正値を示した2試料については、感度の高い「固相.TA-W/検出.TA-A」系においても正の値を示している。また、同試料を L-FABP ELISA kit(CMIC)を用いて測定したところ、C-FABP の値と L-FABP の値の間に相関関係は見られなかったことから、本系が特異的な C-FABP のシグナルを反映していると考えられた。

以上の結果より、本検討によって C-FABP 検出 ELISA の試作系が構築できた。しかし、本試作系では C-FABP の正しい値付けを行っておらず、測定値はあくまでリコンビナント C-FABP Unit であり、また検出感度が非常に低い。そのた

め今後はC-FABP濃度の値付けと抗体の最適化等を行い検出感度の改善を検討する必要があると考えている。

A.



B.

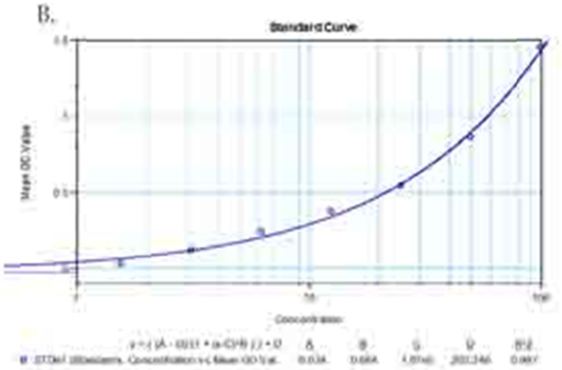


図16. C-FABP抗原の段階希釈検量線

表4. 試料の測定値

			固TA-K/標TA-R		固TA-W/標TA-A		L-FABP ELISA
	Sample	Wells	OD Values	Concentration	OD Values	Concentration	Concentration
名古屋大サンプル	Un-01	A3	−0.04	7204	0.029	655	0.6
	Un-02	B3	−0.08	0	−0.056	0	4.2
	Un-03	C3	−0.09	0	−0.058	0	0.3
	Un-04	D3	−0.173	0	−0.068	0	59.5
	Un-05	E3	−0.109	0	−0.003	289	1.0
	Un-06	F3	−0.099	0	−0.047	0	1.1
	Un-07	G3	−0.092	0	−0.054	0	3.0
	Un-08	H3	0.071	23742	0.154	4473	0.5
	Un-09	A4	−0.011	12266	−0.045	0	1.7
	Un-10	B4	−0.096	0	−0.048	0	0.1
	Un-11	C4	−0.046	6034	0.005	419	3.8
	Un-12	D4	−0.154	0	−0.1	0	1.4
	Un-13	E4	−0.168	0	−0.071	0	2.5
	Un-14	F4	−0.07	0	−0.058	0	5.6
	Un-15	G4	−0.074	0	−0.046	0	6.6
	Un-16	H4	−0.045	6159	−0.002	311	1.0
	Un-17	A5	−0.04	7263	−0.025	42	4.5
	Un-18	B5	−0.078	0	−0.008	226	0.8
	Un-19	C5	−0.095	0	−0.047	0	0.0
	Un-20	D5	−0.151	0	−0.045	0	1.0
	Un-21	E5	−0.125	0	−0.029	21	1.6
	Un-22	F5	−0.091	0	−0.027	31	0.0
	Un-23	G5	−0.063	1857	−0.023	57	23.7
	Un-24	H5	−0.03	9133	0.011	517	1.3
	Un-25	A6	0.057	21887	0.027	812	1.0
	Un-26	B6	−0.014	11777	−0.035	0	1.1
	Un-27	C6	−0.096	0	−0.058	0	0.4
	Un-28	D6	−0.117	0	−0.04	0	0.1
	Un-29	E6	−0.07	0	−0.052	0	0.5

*測定値はC-FABP組換え蛋白質を基準にした換算濃度(rC-FABP Unit = ng/mL)である
*L-FABP ELISAの測定値はng/mLを示す。

3. 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)の高次構造解析

FABP ファミリーは 2 本のαヘリックス鎖とアンチパラレルな 10 本のβ鎖からなる二枚貝様構造 (clam shell-like β-barrel structure)という特徴的な構造を有している。中でも本ファミリーに属する Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP)は生体内において抗酸化的な役割を担っていることが知られている。この機能に関しては未だ明らかになっていない部分が多いが、*in vitro* の実験において L-FABP の 4 種のメチオニン残基の SH 基が酸化されることが抗酸化作用の本体である可能性が報告されている(J Lipid Res. 2009 Dec;50(12):2445-54.)。既存の報告から図 17-1 では C-FABP と L-FABP のアミノ酸配列の比較を示し Met を黄色に色付けした。また、図 17-2 では C-FABP と L-FABP の X 線結晶構造解析による立体構造モデルの比較を示す。図 17-2 A は C-FABP、図 17-2 B は L-FABP を示した。それぞれ左右の図は横に 90°回転させた像を示し、それぞれのメチオニン残基を赤の ball and stick モデルで示す。この比較から同ファミリーの C-FABP 中のメチオニン残基は 5 箇所存在しており、そのうち L-FABP においても保存されているメチオニンは 3 箇所存在することが確認できた。このことからも C-FABP が L-FABP と同様の抗酸化作用を有している可能性が考えられる。

そこで本検討では L-FABP の *in vitro* 実験で用いられている AAPH と AMVN というラジカル発生剤を用いて C-FABP を酸化した後、MS 解析を行うことでメチオニンの酸化部位解析を行った。

```
C-FABP:  1  MATVQQLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGI
L-FABP:  1  M----SFSGKYQLQSQENFEAFMKAIGLPE

C-FABP: 31  ALRKMGAMAKPDCIITCDGKNLTIKTESTL
L-FABP: 27  ELIQKGKDIKGVSEIVQNGKHFKFTITAGS

C-FABP: 61  KTTQFSCTLGEKFEETTADGRKTQTVCNFT
L-FABP: 57  KVIQNEFTVGEECELETMTGEKVKTVVQLE

C-FABP: 91  DGALVQHQEWDGKESTITRKLKDGKLVVEC
L-FABP: 87  GDNKLVTTFKN-----IKSVTELNGDIITNT

C-FABP:121  VMNNVTCTRIYEKVE- 135
L-FABP:113  MTLGDIVFKRISKRI- 127
```

図17-1. C-FABPとL-FABPのアミノ酸配列比較

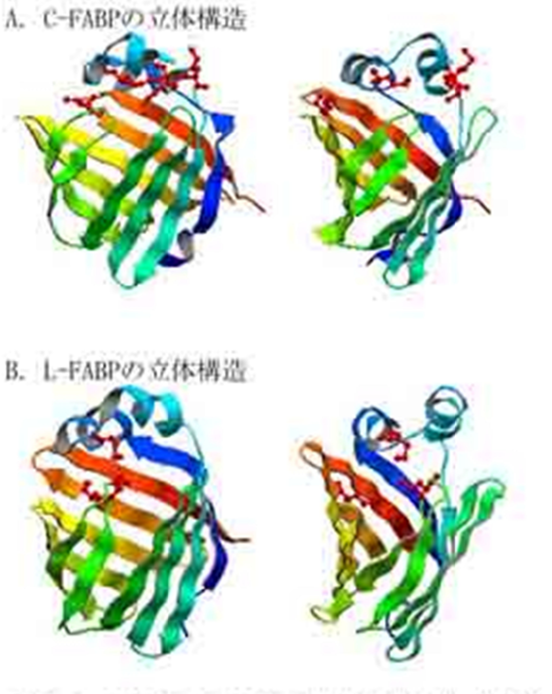


図17-2. C-FABPとL-FABPの立体構造比較 (PDBj)

3-1. C-FABP の酸化処理

上記ヒト C-FABP 組換え蛋白質を用いて実験を行う。水溶性ラジカル発生剤である AAPH と脂溶性ラジカル発生剤である AMVN は、L-FABP を用いた実験で酸化が確認された濃度である終濃度 200 mM, 50 mM で C-FABP と混和し、37℃のインキュベータで 90 分間静置し酸化反応を行った。反応後、3K MWCO の限外濾過器を用いて 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液に溶媒を置換した。本試料を 5 mM

炭酸水素アンモニウム溶液中で 5µg C-FABP につき 50 ng のトリプシンを用いて 37℃，6 時間消化反応を行い MS 解析試料とした。
MS解析はLTQ Orbitrap XL (Themo Fisher Scientific) nanoLC system：ADVANCE UHPLC system (MICHROM Bioresources, Auburn, CA)を用いて行った。試料5µLをトラップカラム (Lcolumn Micro 0.3 × 5 mm; CERI, Japan)に吸着させた後、分離用キャピリリーカラム (Magic C18 AQ nano column , 0.1 × 150 mm; MICHROM, Bioresources)でペプチドを分離した。クロマトグラフィーの条件は、A液(0.1%ギ酸) B液 (100%アセトニトリル) 0−15 min : B 5%−45%, 15−20 min : B 95%, 20−30 min : B 5%。流速 500 nL/min イオンソース：XYZ Stage ion source (AMR)。スプレーチップ:Fortis Tip (AMR) Spray voltage 1.8 kV, Scan range : 400 to 1800 m/z, Resolution 30000, Top 5 Data dependent Scanとした。
得られたマススペクトルからProteome Discoverer (Themo Fisher Scientific) を用いてMGF fileを作成し、in houseのMASCOTサーバでデータベース検索を行った。検索条件は、Database : Swissprot Enzyme: trypsin, allow 1 missed cleavage, Taxonomy : Human, Valuable modification : dehydro Cys, oxidation Met, Peptide tol. : 5 ppm, MS/MS tol. : 0.6 Daとした。

その結果、検出されたメチオニンを含むペプチドを図18に示す。検出されたメチオニンを含むペプチドは5種類存在し、③と④はメチオニンを2つ含んだN末側のリシン(K)の切れ残りの違いに由来する重複ペプチドが確認された。これは末端側に存在するメチオニンが酸化されることでトリプシンの切断に影響したためではないかと考えている。

その結果、ペプチドピーク①，⑤ではメチオニンがAAPH, AMVNによる酸化をほとんど受けていないのに対して、ペプチドピーク④ではAMVNの酸化が僅かにすすんでおり、ペプチドピーク②，③ではAAPHによる酸化が顕著に増加していることが確認された。なおペプチドピーク③，④にはメチオニンが2箇所存在しているが、２箇所共に酸化されたと思われる分子量のピークは僅かにしか確認されなかったことから、どちらか部位選択的に酸化される可能性が示唆された。さらに、ペプチドピーク③，④，⑤にはペプチド内に2つのシステインが存在しており、ペプチド内ジスルフィド結合が存在する場合、プロトンが2つ外れることからS-S結合を含むピークは検出可能である。今回の結果では③，④，⑤のピークはほとんどがジスルフィド結合を形成したピークとして検出されたことから、酸化剤によりシステインも酸化されていることが確認された（データ未掲載）。

今回の結果から、C-FABPはAAPHによって顕著に酸化を受けることが確認され、そ

のメチオニン酸化部位はMet23と、Met35もしくはMet38のどちらかであり､各所に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。

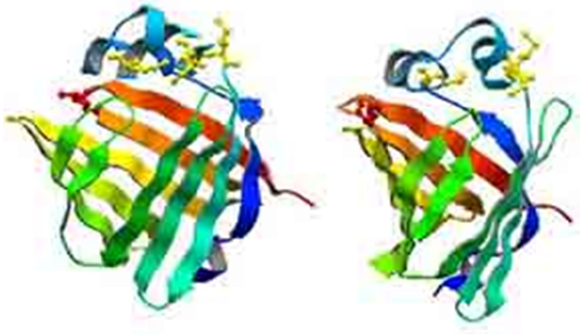


図19. 検出された酸化メチオニンを部位（PDBj）

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。

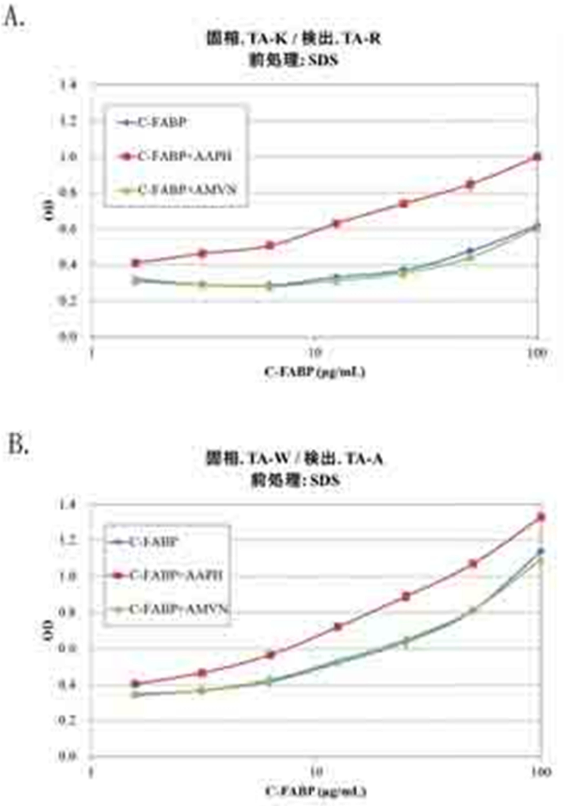


図20. 酸化C-FABPのELISA測定

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。

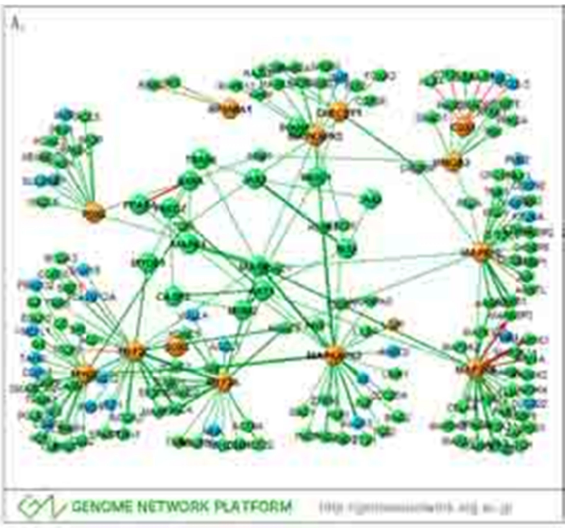


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

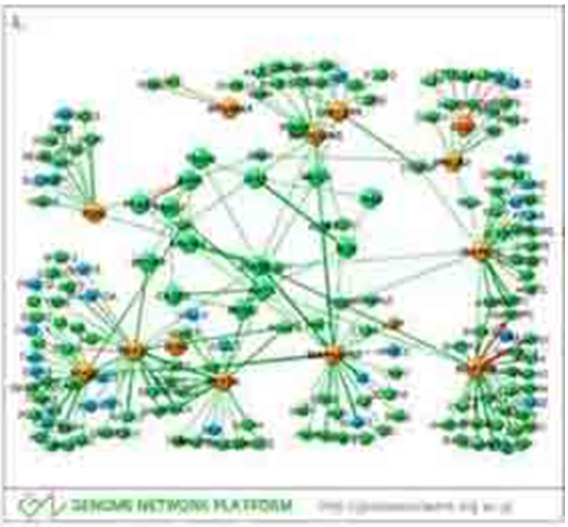


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

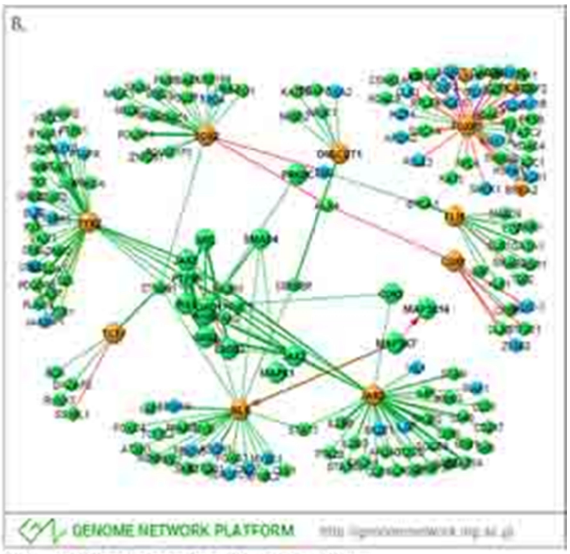


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

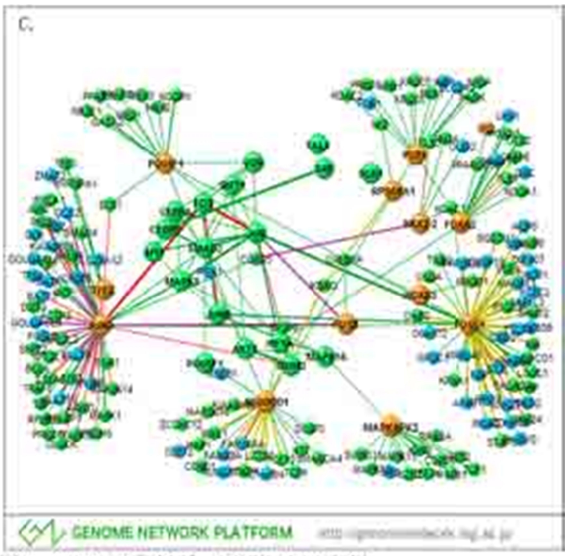


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

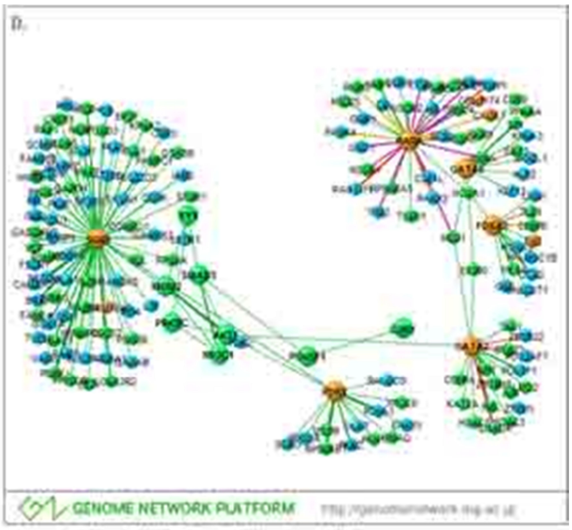


図21. カスケード解析データを用いたPPI解析

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。

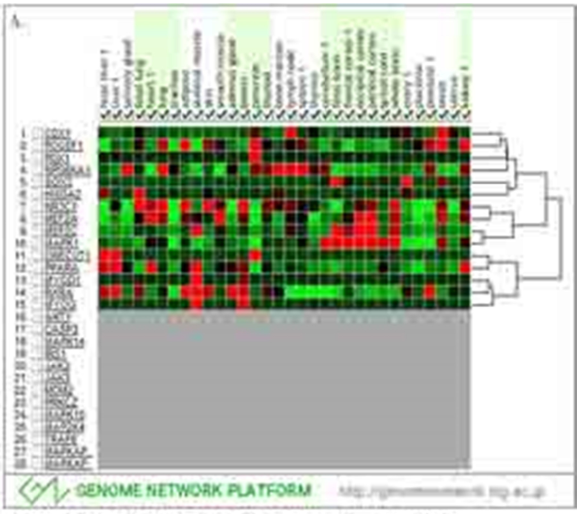


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

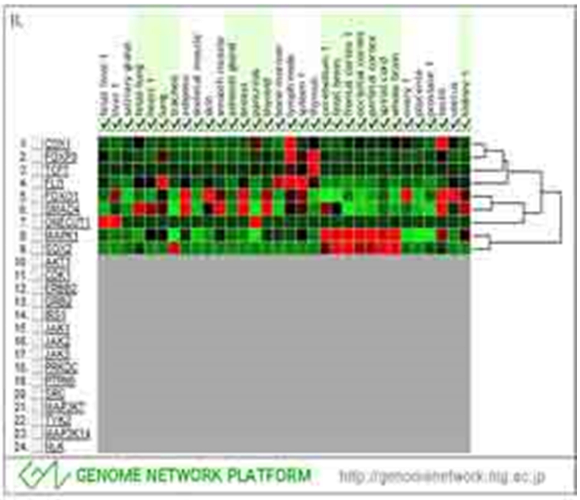


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

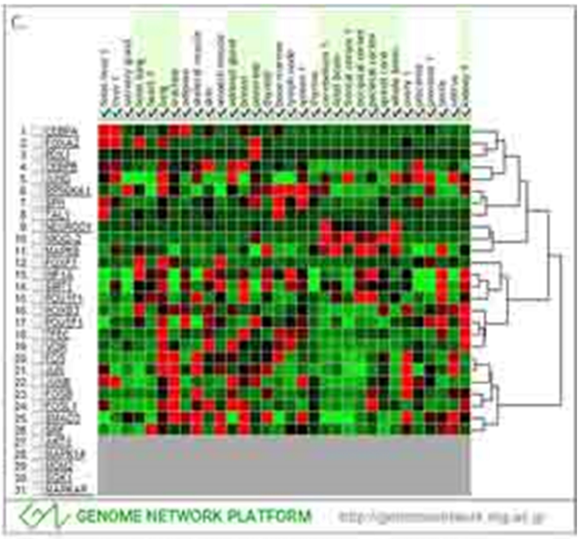


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

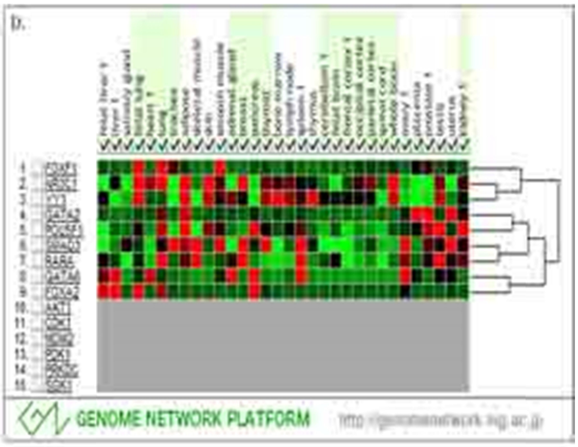


図22. カスケード解析データを用いたExpression profile解析

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 10cm^2 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 10^5 cell/dish でゲラチンコート 10cm^2 ディッシュに細胞を撒き、37°C, 5% CO_2 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 1μM で ASCs に添加し、引き続き 37°C, 5% CO_2 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（×10^6 cells）	群名	時系列(hour)
ctrl-1	1.7	コントロール	15
ctrl-2	1.7		15
ctrl-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
ctrl-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 800μL 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 1,000μL 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℃, 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℃, 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℃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℃にて凍結させサンプルを解析した。本サンプルを1,000 μL 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 × *g*, 4°C, 5 分）を行い、上清を回収した。これを乾固させ、100 μL 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 μm × 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 μm × 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)

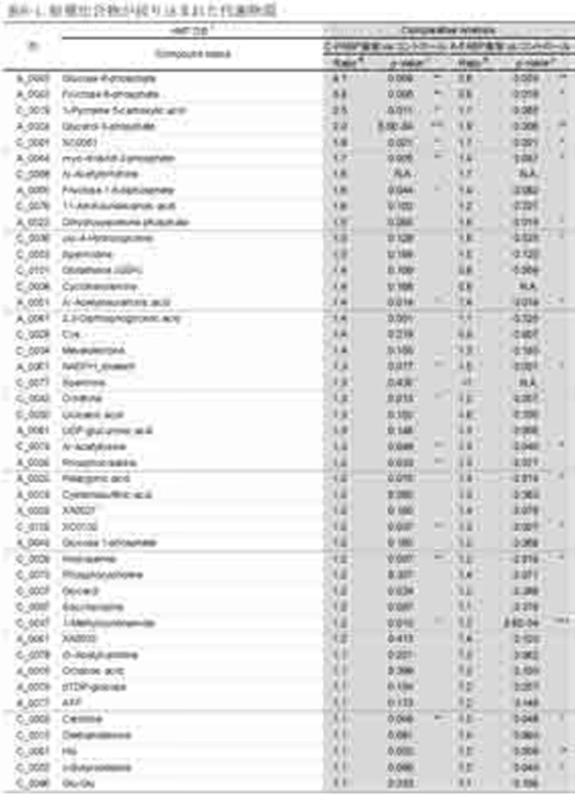
a．データ処理
CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.2.13.0.8.h（慶應義塾大学）を用いて、シグナル/ノイズ（S/N）比が3 以上のピークを自動抽出し、質量電荷比(*m/z*)、ピーク面積値、泳動時間（Migration time: MT）を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相対面積値に変換した。また、これらのデータにはNa^{+}やK^{+}などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、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。

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

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。

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

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[illegible] 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	HMT DB† Compound name	Comparative Analysis C-FABP添加 vs コントロール Ratio§	p-value‡	A-FABP添加 vs コントロール Ratio§	p-value‡
A_0079	GTP	1.1	0.269	1.1	0.248
A_0034	Lauric acid	1.1	0.360	1.4	0.022
C_0090	Isovalerylcarnitine	1.1	0.309	1.2	0.044
A_0015	Ethanolamine phosphate	1.1	0.014	1.2	0.002
C_0066	Phe	1.1	0.269	1.2	0.126
C_0007	3-Methylhistidine	1.1	0.581	1.2	0.102
C_0001	Ethanolamine	1.1	0.288	1.4	0.012
C_0061	4-Guanidinobutyric acid	1.1	0.180	1.2	0.032
A_0004	CTP	1.1	0.308	1.2	0.388
A_0081	UDP-glucose UDP-galactose	1.1	0.096	1.2	0.106
A_0064	CMP-N-acetylneuraminate	1.1	0.298	1.1	0.347
C_0013	Choline	1.1	0.066	1.8	0.007
C_0008	[illegible]	1.1	N.A.	1.1	N.A.
C_0079	Gly-Leu	1.1	0.068	1.1	0.020
C_0028	Thr	1.1	0.097	1.2	0.010
A_0053	CMP	1.1	0.615	1.2	0.362
C_0041	Asn	1.1	0.116	1.2	0.036
A_0009	2-Hydroxyglutaric acid	1.1	0.487	1.1	0.292
C_0008	5-Hydroxylysine	1.1	0.457	1.2	0.131
C_0079	Trp	1.1	0.057	1.1	0.066
A_0051	NAD+	1.1	0.434	1.2	0.071
C_0022	Thiamine	1.1	0.441	1.1	0.677
C_0002	2-Aminoadipic acid	1.1	0.108	1.6	0.062
A_0073	UTP	1.1	0.084	1.1	0.301
A_0063	UDP-N-acetylglucosamine	1.1	0.333	1.1	0.162
C_0024	Val	1.1	0.068	1.1	0.014
C_0009	Met	1.1	0.091	1.1	0.128
C_0037	Hydroxyproline	1.1	0.134	1.1	0.368
A_0020	cis-Aconitic acid	1.1	0.338	1.1	0.079
C_0010	2-Aminobutyric acid	1.1	0.038	1.1	0.006
C_0071	Citrulline	1.1	0.249	1.1	0.320
C_0003	Pipecolic acid	1.1	0.034	1.1	0.779
C_0011	GABA	1.0	0.408	1.1	0.324
C_0007	Glu	1.0	0.335	1.0	0.037
C_0000	Ile	1.0	0.611	1.2	0.129
C_0083	Cystathionine	1.0	0.098	1.1	0.354
C_0022	5-Aminovaleric acid	1.0	0.716	1.1	0.624
C_0109	S-Adenosylmethionine	1.0	0.080	1.1	0.024
C_0072	Tyr	1.0	0.306	1.1	0.018
A_0003	Pantothenic acid	1.0	0.616	1.1	0.196
C_0039	His	1.0	0.656	1.2	0.091
C_0089	Argininosuccinic acid	1.0	0.734	1.6	0.763
C_0070	Arg	1.0	0.746	1.2	0.009
C_0044	Asp	1.0	0.550	1.1	0.060
C_0040	Leu	1.0	0.761	1.0	0.005

表[illegible] 候補化合物が絞り込まれた代謝物質

ID	HMT DB† Compound name	Comparative Analysis C-FABP添加 vs コントロール Ratio§	p-value‡	A-FABP添加 vs コントロール Ratio§	p-value‡
A_0071	XA0005	1.0	0.710	1.0	0.206
C_0054	Lys	1.0	0.783	1.1	0.174
C_0021	Pro	1.0	0.878	1.1	0.100
A_0087	NADP+	1.0	0.968	0.9	0.083
A_0082	ADP-glucose GDP-fucose	1.0	0.876	1.1	0.110
C_0086	Butyrylcarnitine	1.0	0.922	1.1	0.414
C_0010	Hypotaurine	1.0	0.573	1.1	0.270
A_0050	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	1.0	0.960	1.0	0.611
C_0001	Methionine sulfoxide	1.0	0.577	1.0	0.308
C_0014	Ser	1.0	0.891	1.1	0.308
C_0030	Gln	1.0	0.788	1.1	0.371
C_0001	β-Ala	1.0	0.824	1.0	0.092
A_0031	Citric acid	1.0	0.727	1.0	0.078
C_0009	N^6-Ethylglutamine	1.0	0.872	<1	N.A.
C_0023	Betaine	1.0	0.640	1.1	0.521
C_0082	β-Ala-Lys	1.0	0.909	1.0	N.A.
C_0124	Cysteine glutathione disulfide	1.0	0.881	1.0	0.044
C_0080	Kynurenine	1.0	0.935	1.1	0.064
C_0007	Gly	0.9	0.544	1.1	0.304
C_0055	N-Acetyl[illegible]	0.9	0.248	0.9	0.483
C_0001	Glycerophosphocholine	0.9	0.936	1.0	0.301
C_0006	Homoserine lactone	0.9	0.937	1.1	0.408
A_0030	Gluconic acid	0.9	0.246	1.0	0.830
A_0012	4-Methyl-2-oxovaleric acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid	0.9	0.696	1.5	0.020
C_0036	Creatine	0.9	0.402	1.0	0.083
A_0029	3-Phosphoglyceric acid	0.9	0.430	1.0	0.966
C_0043	Thiaproline	0.9	0.479	0.9	0.120
C_0040	Adenine	0.9	0.199	1.1	0.221
A_0008	Fumaric acid	0.9	0.009	1.0	0.060
C_0032	XC0016	0.9	0.411	1.1	0.089
A_0013	Malic acid	0.9	0.280	1.0	0.990
C_0030	Taurine	0.9	0.549	1.0	0.752
A_0030	Mucic acid	0.9	0.031	1.0	0.969
A_0060	GMP	0.9	0.271	1.1	0.249
A_0086	NADH	0.9	0.230	1.1	0.899
C_0100	Glutathione (GSSG)_divalent	0.9	0.246	1.2	0.118
A_0049	Sedoheptulose 7-phosphate	0.9	0.283	1.0	0.618
A_0004	Lactic acid	0.8	0.146	1.1	0.327
C_0020	Creatinine	0.8	0.328	1.0	0.368
A_0014	Threonic acid	0.8	0.070	0.9	0.484
C_0003	Putrescine	0.8	0.190	1.0	0.612
A_0046	Sorbitol 6-phosphate	0.8	0.077	1.2	0.680
A_0070	GDP	0.8	0.170	0.8	0.495
C_0030	N-Acetylputrescine	0.8	0.194	1.2	0.051
A_0005	AMP	0.8	0.031 *	1.2	0.801
A_0068	ADP	0.8	0.016 *	1.2	0.620
A_0054	UMP	0.8	0.092	1.1	0.181
A_0073	dTTP	0.7	0.104	0.8	0.195
A_0010	Succinic acid	0.7	0.096	0.9	0.307
A_0011	5-Oxoproline	0.7	0.018 *	0.8	0.181
A_0007	Glyceric acid	0.7	N.A.	0.9	0.577
A_0039	Ribulose 5-phosphate	0.6	0.098	0.7	0.124
C_0094	2'-Deoxyguanosine	0.5	0.045 *	0.6	0.041
C_0029	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	0.5	N.A.	0.02	N.A.
A_0027	O-Phosphoserine	0.5	0.061	0.6	0.099
A_0066	UDP	0.5	0.032 *	0.7	0.084
A_0063	CDP	0.4	0.015 *	0.7	0.046
C_0090	Guanine	0.4	0.090	0.7	0.280
C_0080	2'-Deoxycytidine	0.4	0.120	0.5	0.382
C_0096	Guanosine	0.3	0.014 *	0.4	0.056
C_0081	Adenosine	0.2	0.017 *	0.4	0.064
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	[illegible]	N.A.	<1	N.A.

IDは測定モードの頭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. 検出対象であるが、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、前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)
ピーク強度が飽和したGlu, Pro, Gln, Glyに関しては[13]C(Relative Area)を用いている。
C-FABP添加 / コントロールでソート(降順)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 C-FABP添加 vs コントロール Ratio[1]	p-value[1]	
A_0024	Glycerol 3-phosphate	[illegible]	5E-04	[illegible]
A_0044	myo-Inositol 2-phosphate	[illegible]	0.005	[illegible]
A_0042	Fructose 6-phosphate	[illegible]	0.006	[illegible]
C_0026	Homoserine	[illegible]	0.007	[illegible]
C_0063	Carnitine	[illegible]	0.008	[illegible]
A_0045	Glucose 6-phosphate	[illegible]	0.009	[illegible]
C_0047	1-Methylnicotinamide	[illegible]	0.010	[illegible]
C_0019	1-Pyrroline 5-carboxylic acid	[illegible]	0.011	[illegible]
C_0042	Ornithine	[illegible]	0.012	[illegible]
A_0051	N-Acetylneuraminic acid	[illegible]	0.014	[illegible]
C_0098	Guanosine	[illegible]	0.014	[illegible]
A_0065	CDP	[illegible]	0.015	[illegible]
A_0061	NADPH_divalent	[illegible]	0.017	[illegible]
C_0002	Adenosine	[illegible]	0.017	[illegible]
A_0066	UDP	[illegible]	0.020	[illegible]
A_0068	AMP	[illegible]	0.021	[illegible]
C_0081	XC0061	[illegible]	0.021	[illegible]
A_0011	5-Oxoproline	[illegible]	0.028	[illegible]
A_0036	Phosphocreatine	[illegible]	0.030	[illegible]
A_0066	ADP	[illegible]	0.035	[illegible]
C_0102	XC0132	[illegible]	0.037	[illegible]
C_0094	2'-Deoxyguanosine	[illegible]	0.040	[illegible]
A_0056	Fructose 1,6-diphosphate	[illegible]	0.044	[illegible]
C_0074	N-Acetyllysine	[illegible]	0.046	[illegible]

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 A-FABP添加 vs コントロール Ratio[1]	p-value[1]	
C_0047	1-Methylnicotinamide	[illegible]	[illegible]	[illegible]
A_0045	Glucose 6-phosphate	2.6	0.003	[illegible]
A_0015	Ethanolamine phosphate	1.2	0.005	[illegible]
A_0024	Glycerol 3-phosphate	1.9	0.006	[illegible]
C_0070	Arg	[illegible]	0.006	[illegible]
C_0013	Choline	1.4	0.007	[illegible]
C_0061	His	1.2	0.009	[illegible]
C_0001	Ethanolamine	1.4	0.010	[illegible]
C_0028	Thr	1.2	0.015	[illegible]
A_0020	Pelargonic acid	[illegible]	0.014	[illegible]
C_0024	Val	1.2	0.014	[illegible]
A_0022	Dihydroxyacetone phosphate	1.8	0.015	[illegible]
C_0026	Homoserine	1.2	0.016	[illegible]
A_0042	Fructose 6-phosphate	2.6	0.018	[illegible]
A_0051	N-Acetylneuraminic acid	1.4	0.018	[illegible]
C_0072	Tyr	1.1	0.019	[illegible]
C_0075	Gly-Asp	1.1	0.020	[illegible]
C_0081	XC0061	[illegible]	0.021	[illegible]
C_0051	4-Guanidinobutyric acid	[illegible]	0.022	[illegible]
A_0034	Lauric acid	1.4	0.022	[illegible]
A_0013	4-Methyl-2-oxovaleric acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid	[illegible]	0.023	[illegible]
C_0038	cis-4-Hydroxyproline	[illegible]	0.023	[illegible]
C_0103	S-Adenosylmethionine	[illegible]	0.023	[illegible]
C_0057	Glu	[illegible]	[illegible]	[illegible]

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（μ=0，σ=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。

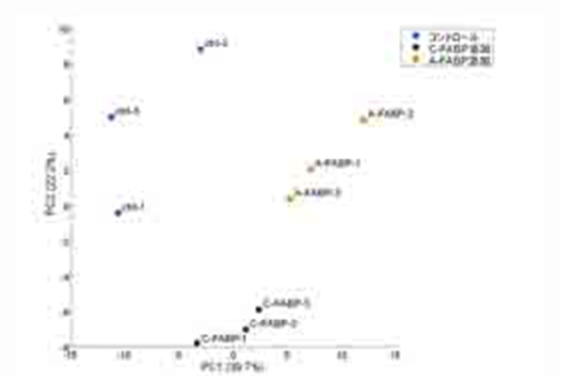


図23. PCA結果
PC1, PC2はそれぞれ第1主成分得点、第2主成分得点を示し、
括弧内の数字は各主成分の寄与率を示す。
各プロットのラベルはサンプル名を示す。

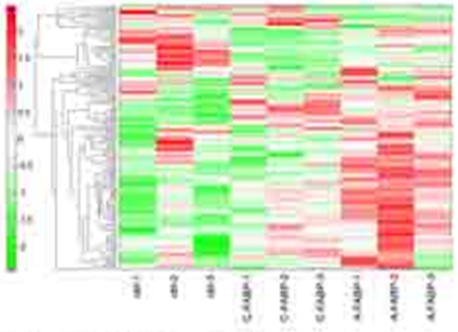
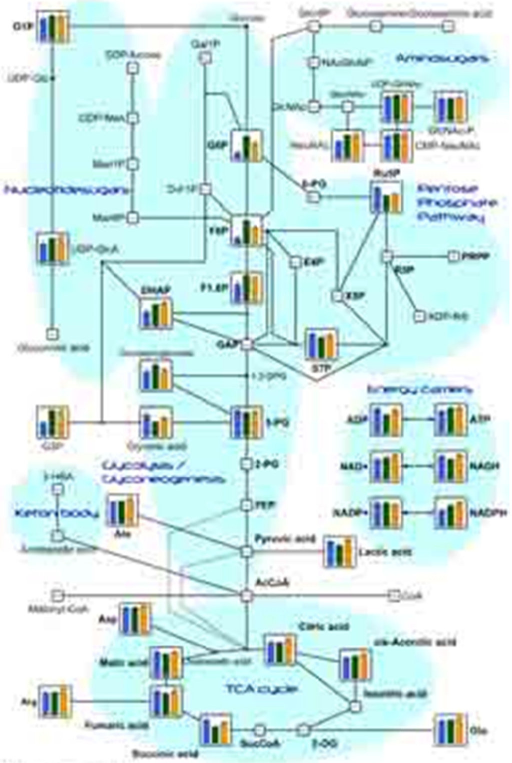


図24. HCA結果（HeatMap表示）
横軸はサンプル名、縦軸はピークを示す。
ピークに対してHCAを実施し、
ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。
緑が濃いほど平均よりも小さいことを示し、
赤が濃いほど平均よりも大きいことを示す。



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）。

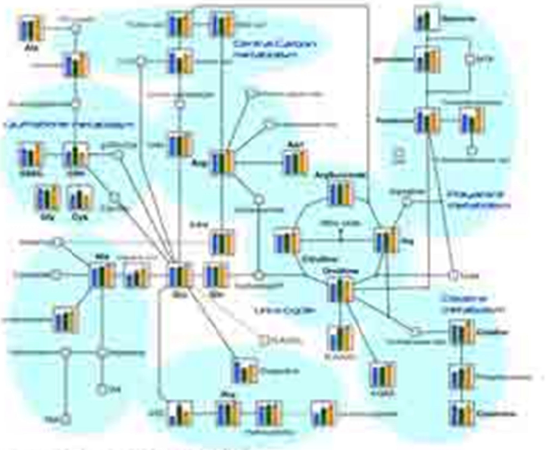


図27 代謝物質の経路図（尿素回路と関連アミノ酸の代謝）
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール（青色）、L-FABP添加（緑色）、A-FABP添加（橙色）の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected

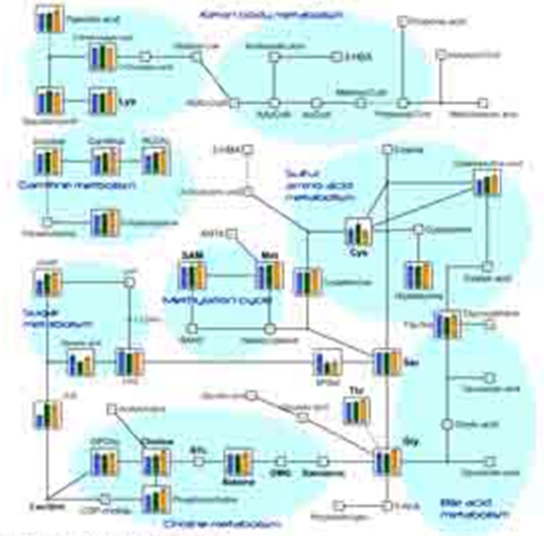


図28 代謝物質の経路図（脂質代謝とアミノ酸の代謝）
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール（青色）、L-FABP添加（緑色）、A-FABP添加（橙色）の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected

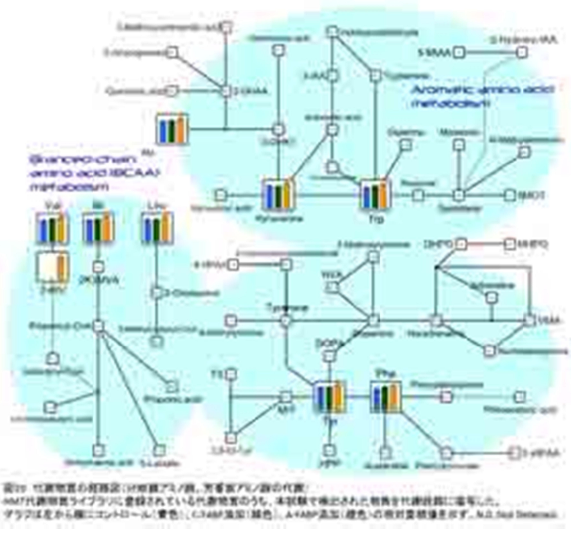


図29 代謝物質の経路図（分岐鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸の代謝）
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール（青色）、L-FABP添加（緑色）、A-FABP添加（橙色）の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected

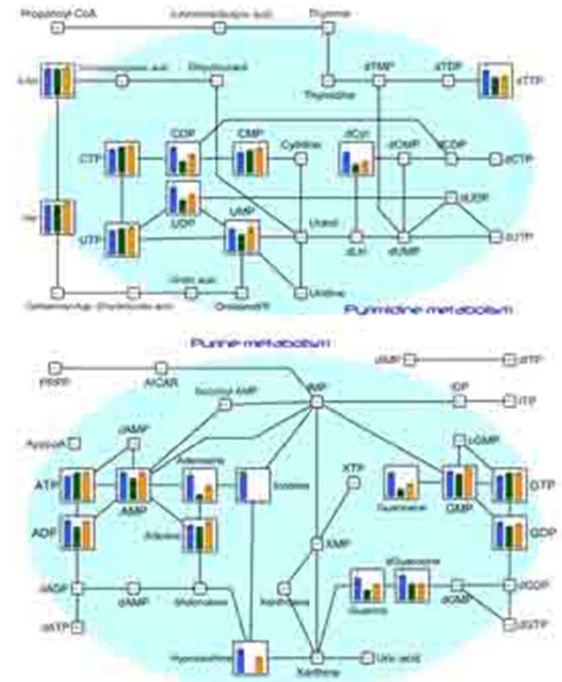


図30 代謝物質の経路図（核酸の代謝）
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール（青色）、L-FABP添加（緑色）、A-FABP添加（橙色）の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected

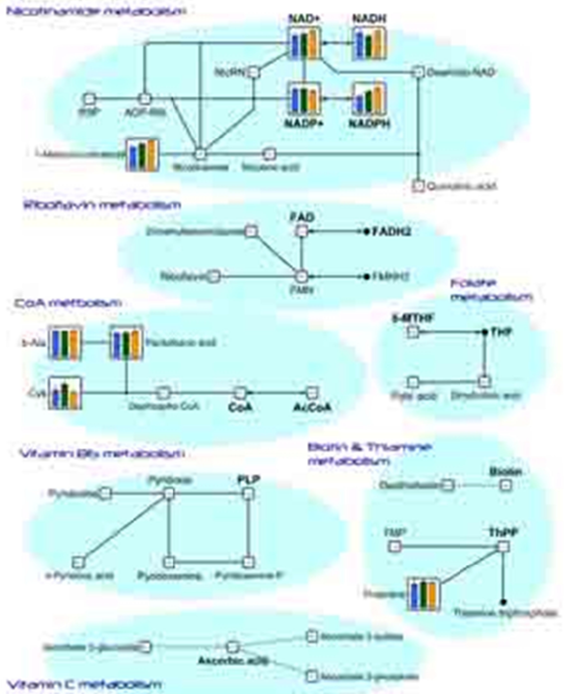


図31 代謝物質の経路図（補酵素の代謝）
HMT代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描写した。
グラフは左から順にコントロール（青色）、L-FABP添加（緑色）、A-FABP添加（橙色）の相対面積値を示す。N.D.:Not Detected

4-2-4. LC-TOFMS 解析

本試験では、ポジティブモード、ネガティブモードのLC-TOFMS 測定を以下に示す条件で行った。得られたピーク強度から判断して、注入量は1 µLとした。陽イオン性代謝物質（ポジティブモード）装置

LC system : Agilent 1200 series RRLC system SL（Agilent Technologies 社）
Column : ODS column, 2×50 mm, 2 µm
MS system : Agilent LC/MSD TOF（Agilent Technologies 社）4 号機

測定条件

Column temp. : 40°C
Mobile phase : A : H20 / 0.1% HCOOH
Mobile phase : B : Isopropanol: Acetonitrile: H20 (65:30:5) / 0.1% HCOOH, 2 mM HCOONH4
Flow rate : 0.3 mL / min
Run time : 20 min
Post time : 6 min
Gradient condition : 0-0.5 min : B 1%, 0.5-13.5 min : B 1-100%, 13.5-20 min : B 100%
MS ionization mode : ESI Positive
MS Nebulizer pressure : 40 psi
MS dry gas flow : 10 L / min
MS dry gas temp : 350°C
MS capillary voltage : 4,000 V
MS scan range : *m/z* 100-1,700

陰イオン性代謝物質（ネガティブモード）装置

LC system : Agilent 1200 series RRLC system SL（Agilent Technologies 社）
Column : ODS column, 2×50 mm, 2 µm
MS system : Agilent LC/MSD TOF（Agilent Technologies 社）4 号機

測定条件

Column temp. : 40°C
Mobile phase : A : H20 / 0.1% HCOOH
Mobile phase : B : Isopropanol: Acetonitrile: H20 (65:30:5) / 0.1% HCOOH, 2 mM HCOONH4
Flow rate : 0.3 mL / min
Run time : 20 min
Post time : 6 min
Gradient condition : 0-0.5 min : B 1%, 0.5-13.5 min : B 1-100%, 13.5-20 min : B 100%
MS ionization mode : ESI Negative
MS Nebulizer pressure : 40 psi
MS dry gas flow : 10 L / min
MS dry gas temp : 350°C
MS capillary voltage : 4,000 V
MS scan range : *m/z* 100-1,700

a. データ処理

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、保持時間（Retention time: RT)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RT 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RT の値をもとに代謝物質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 RT で ±0.5 min、*m/z* で ± 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 3 検体についてLC-TOFMS によるメタボローム解析を行った。HMT 代謝物質ライブラリに登録された物質の*m/z* 及びRT の値から20 ピークに候補化合物が付与された（表8）。

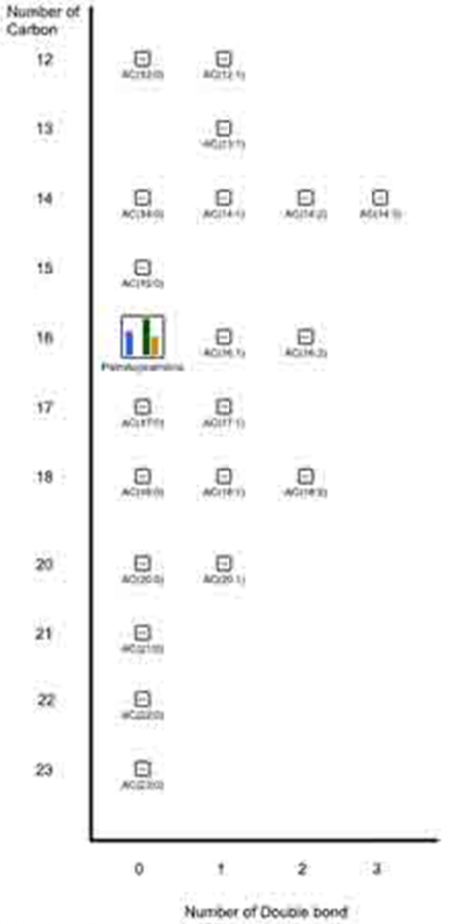
表8. [illegible]

ID	HMT DB Compound name	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	Stearic acid	[illegible]	[illegible]
[illegible]	Palmitic acid	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	Oleic acid	[illegible]	[illegible]

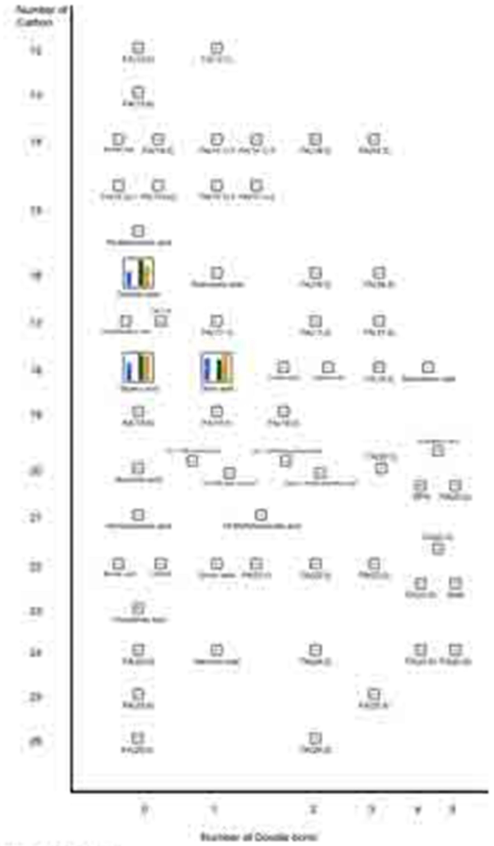
c. 候補化合物の描画

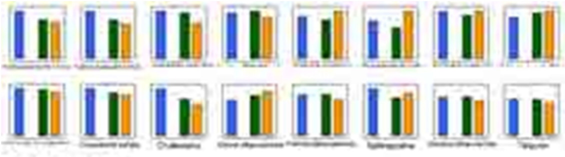
描画にはVANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) 4)を用いた。

絞り込まれた候補化合物をアシルカルニチン、脂肪酸及びその他の物質に分類し、描画した（図33～35）



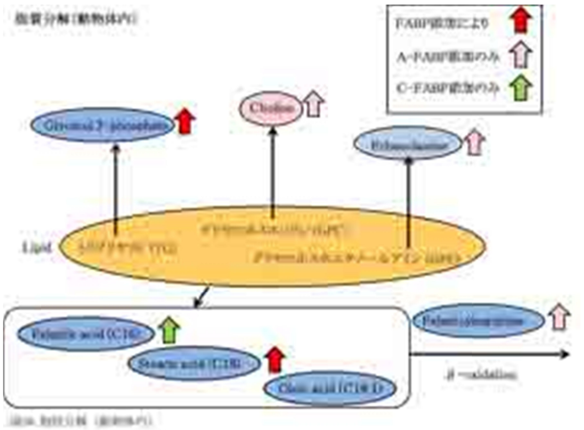
[illegible]

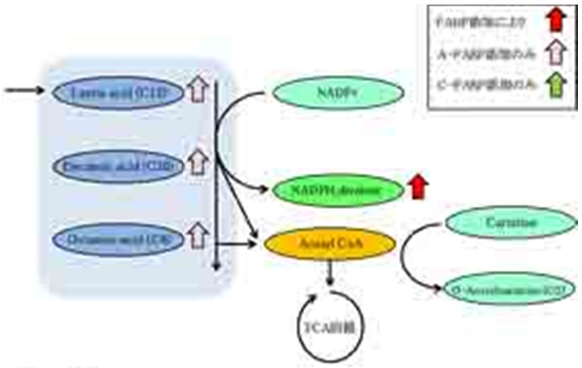




4-3. メタボローム解析の考察

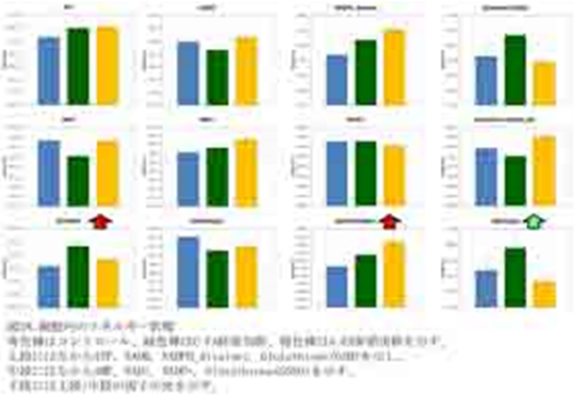
CE-TOFMS と LC-TOFMS 測定の有意差検定による群間比較解析の結果、アミノ酸及びその代謝中間体の多くが A-FABP 添加群で高値であった。また、FABP 添加に共通した特徴として、(Glycerol 3-phosphate)G3P や(Dihydroxyacetone phosphate)DHAP の高値が確認されたことから、脂質（主にトリグリセリド）の分解、取り込みの亢進が推測された。また、A-FABP 添加では Choline や Ethanolamine も高値であることから、あわせてリン脂質の分解、取り込みが亢進した可能性も上げられる(図 36, 37)。





さらに、核酸代謝においては、C-FABP 添加群では核酸プールが低値を示しており、C-FABP 添加では DNA 複製や転写活性化によりヌクレオチドの消費が激しくなり、それを補充する役割としてペントースリン酸回路が亢進される可能性が考えられた。さらに、C-FABP 添加群では糖代謝では解糖系上流中間体の蓄積が大きかった。この現象は今回の結果だけで論じるのは困難だが、仮説としては G3P が上昇していることから、解糖系への糖リン酸の供給はこの G3P 由来で補われていることや、ペントースリン酸回路を経由しての NADPH 産生などが考えられる。またグルタチオンの挙動として、GSH と GSSG の量比から GSH が優勢に傾いており、細胞内の酸化還元状態はコントロールとも異なる挙動を示し

た(図 38)。



以上の結果から、本試験では FABP 添加により、脂質、糖、アミノ酸など広範囲な代謝変化が誘導されることを確認した。C-FABP 添加と A-FABP 添加は異なる特徴が観察されており。β酸化の亢進や阻害を断定するためには、Acetyl CoA、Malonyl CoA などの産物・前駆体の挙動を変化条件件の強度や時間等のプロファイリング比較を行い、更なる解析が望まれる。

C.考察

1) 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)を検出しうる抗体の大量調製

5株のハイブリドーマと4種の抗 C-FABP モノクローナル抗体を取得した。抗体量としてはそれぞれ数十 mg の抗体を確認し、以降の評価に十分な量の取得に成功した。

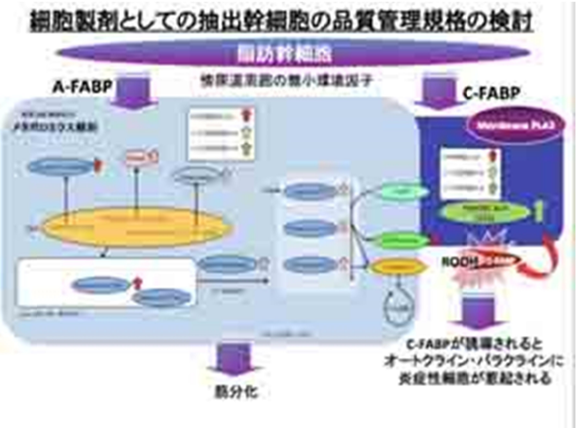
2) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白(FABP)の検出系構築

2 組の C-FABP 検出 ELISA 系の構築に成功し、試料を測定することで C-FABP 特異的なシグナルを確認した。しかし、値付けや感度の問題があるため更なる検討が必要である。本検討で構築した系を ASCs の筋細胞分化の品質管理に利用することを検討する。

3) 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)の高次構造解析

C-FABP 組換え蛋白質を酸化させることで 2 個のメチオニンが酸化されることが確認された。また、C-FABP が酸化されることで C-FABP ELISA 反応性が上昇したことから、抗体認識性に影響を及ぼす C-FABP の高次構造変換が生じた可能性が示唆された。生体内においても同様の酸化修飾が起こりうる場合、C-FABP の高次構造変換が生理機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。以上のことから、ASCs の筋細胞分化の品質管理において酸化 C-FABP がどのように影響するのかということにも焦点を当てながら検討を行う必要があると考える。

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)を用いた発現解析



カスケード解析のデータを用いた PPI ネットワーク解析及び Expression profile 解析の結果から、ADSC に A-FABP

を添加する事象に筋細胞に発現が確認される因子を再度確認することができた。また、メタボローム解析の結果から、FABP 添加に共通した現象としては、糖リン酸（解糖系中間体）、長鎖脂肪酸の上昇が確認されたことから、脂質（主にトリグリセリド）の分解、取り込み亢進が推測された。A-FABP 添加特異的な現象としてはアミノ酸や TCA 回路中間体、核酸（三リン酸化）、Choline や Ethanolamine も上昇が確認されことから、リン脂質の分解取り込みも亢進したと推測された。C-FABP 添加特異的な現象としてはプリンヌクレオチド類の減少が確認され、細胞内の GSH/GSSG 比も異なる挙動が確認されたことから、細胞増殖亢進や細胞内酸化還元状態の偏りが推測された。今回の結果だけでは前年度の報告にある ASCs への A-FABP 添加による筋細胞への分化という現象を評価することができなかったが、FABP 添加による脂質の取り込み亢進が起きることや、A-FABP 添加と C-FABP 添加で TCA 回路の依存度が異なる可能性が考えられるため、2 者の間にエネルギー獲得経路の異なる特性をもつ細胞に分化している可能性も考えられた。今後はさらに A-FABP 添加による分化を添加量や共培養時間を検討し、オミクス解析を用いて筋細胞への分化を追うと共に、代謝物質の解析からも品質管理の検討を行う。また、A-FABP 及び C-FABP のオートクライン、パラクラインに細胞に作用する機能を特異的抗体を用いて阻害できるかについての検討も必要となる。腹圧性尿失禁に対する ADRCs が作り出す微小環境因子を活用した治療法、診断法の開発について下記の図に示す。

腹圧性尿失禁症例において、傍尿道周囲に注入する ADRCs から分泌され、筋分化を促進する FABP を測定することによって、FABP が ADRCs を作り出す微小環境を反映する臨床バイオマーカとなりうる可能性が示唆された。

D.結論

In vivo において FABP は、代謝亢進を介した ASCs の新規･筋分化バイオマーカの可能性が示唆された。

E.研究発表

論文発表

1. Yamamoto T, Gotoh M
   Editoial comment to Sacral Neuromodulation Effective Option for Non-Obstructive Urinary Retention In Men with Cerebral Palsy　Int J Urol. 2013 in press

2. Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Majima T, Takai S, Gotoh M. Intravesical Application of Rebamipide Suppresses Bladder Inflammation in a Rat Cystitis Model. J Urol. 2013 Nov 18. doi:pii: S0022-5347(13)05979-X. 10.1016/j.juro.2013.11.026. [Epub ahead of print]

3. Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, Ogasawara E, Katagiri D, Tanaka T, Yamamoto T, Sugaya T, Nangaku M, Noiri E,A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist sarpogrelate reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1　AJP Renal　2013 Dec 15;305(12):F1796-803.

4. Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama T, Kamei Y, Hirakawa, A, Mastukawa Y, Funahashi Y Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients Int J Urol. 2013 Aug 29. doi: 10.1111/iju.12266. [Epub ahead of print]

5. Yamamoto T, Gotoh M.　Editorial Comment to Regenerative medicine as a new therapeutic strategy for lower urinary tract dysfunction.　Int J Urol. 2013 Jul;20(7):675. doi: 10.1111/iju.12173. Epub 2013 May 15.

6. Yamamoto T Editorial Comment to Contrast-enhanced transrectal ultrasonography for the measurement of prostate cancer tumor size in the peripheral zone and correlation with radical prostatectomy specimens Int J Urol. 2013 May 20. doi: 10.1111/iju.12164. [Epub ahead of print] No abstract available.

7. Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Kato M, Yoshino Y, Gotoh M NPRETREATMENT OF RENAL SUPSCAPULAR ADMINISTRATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS AMELIORATE ISCHEMIA-REPERFUSION-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY Hirosaki Med．J.　64（Suppl.）：S1—S3，2013

F．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

1) 高濃度脂肪組織由来間葉系幹細胞含有脂肪による声門閉鎖不全の治療　発明者　藤本保志、鳥山和宏、西尾直樹、須賀研治、亀井　譲、高成啓介、後藤百万、山本徳則、岩田義弘、内藤健晴　特許願人　名古屋大学　出願日平成26年2月4日特願 2014−019425

2) 精子活性化方法及びその用途
山本 徳則、鈴木　哲、松川 宣久、舟橋 康人、佐藤 義朗、後藤 百万、村瀬 哲磨　特許願人　名古屋大学　出願日平成25年10月25日特願2013-222630

3）尿路感染症の予防又は治療
山本徳則、柴田玲、渕　真悟、鈴木哲、舟橋康人、後藤百万　特許願人　名古屋大学　出願日平成25年10月21日特願2013-215980

4）細胞製剤及び細胞の活性を高める方法
山本徳則、渕真悟、竹田美和、鈴木哲、柴田玲、舟橋康人、後藤百万、大山力、飛澤悠葵　特許願人　名古屋大学　出願日平成25年1月21日特願2013-008355 国際出願2014年

1月18日（PCT/JP2014/050862）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし