

論文内容の要旨

Pattern Recognition Analysis of Proton Nuclear Magnetic
Resonance Spectra of Extracts of Intestinal Epithelial Cells
under Oxidative Stress

プロトンNMRスペクトルのパターン認識による
腸管上皮細胞の酸化ストレスに関する基礎研究

日本医科大学大学院医学研究科 侵襲生体管理学分野

大学院生 中田 敬司

Journal of Nippon Medical School (2014年掲載予定)

【背景】

ショックに伴う腸管虚血再灌流は、強い酸化ストレスによる腸粘膜脱落とバリア機能の破綻を惹起させ全身状態悪化の要因となる。腸粘膜損傷後の修復過程において、腸管上皮細胞の増殖による粘膜被覆は非常に重要な最初の過程である。腸管上皮細胞における酸化ストレスの研究は分子生物学的な研究が多く行われてきているが、細胞内変化全体を包括した研究は少ない。近年、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル解析が、複雑な病態把握への応用として注目されている。我々はラット腸管上皮細胞 (IEC-6 細胞) の酸化ストレスによる細胞傷害モデルを用いて、パターン認識を用いた細胞抽出物の NMR スペクトル解析による細胞内の包括的情報が細胞傷害の程度、細胞増殖能と関連することが可能か基礎的研究を実施した。

【方法】

○実験 1. 過酸化水素の濃度による違い

IEC-6 細胞を使用し、酸化ストレスとして過酸化水素水 (H_2O_2) 0.25mM、0.5mM を暴露させ、24 時間の細胞と、同条件で培養した非暴露細胞とを比較対照した。細胞増殖能は顕微鏡下で追跡し、また細胞傷害の評価は細胞生存率 (Trypan Blue 法) により実施した。NMR 計測用の細胞として、コントロール及び過酸化水素暴露させ 24 時間後に細胞を採取した。採取した細胞を PBS にて洗浄した後、液体窒素下で凍結破砕、混合溶媒 (水/メタノール/クロロフォルム) を加えて遠心抽出した二層の抽出液の上層 (水/メタノール) についてプロトン NMR 計測を行い、各データのスペクトル処理を行って数値化し、Partial Least Squares-Discriminant Analysis(PLS-DA)法による解析を行った。

○実験 2. 過酸化水素の暴露時間による違い

IEC-6 細胞を使用しコントロール、および酸化ストレスとして過酸化水素水 (H_2O_2) 0.5mM 暴露させ、一定時間 (0、6、12、24 時間) における、実験 1 と同様の細胞傷害と細胞増殖能の解析を実施した。NMR 計測用の細胞として、コントロール及び過酸化水素暴露を同条件で行い、0、6、12、24 時間暴露後にそれぞれ細胞を採取した。同様に細胞を抽出し NMR 計測を行い、各データのスペクトル処理を行って数値化し、PLS-DA 法による解析を行った。

【結果】

○結果 1. 細胞増殖能はコントロール ($40.8 \pm 3.4 \mu\text{m}$)、過酸化水素 0.25 mM ($33.1 \pm 2.0 \mu\text{m}$)、過酸化水素 0.5 mM ($19.8 \pm 1.5 \mu\text{m}$) であり、過酸化水素の濃度依存的に抑制され、また細胞生存率はコントロール ($95.4 \pm 1.0\%$)、過酸化水素 0.25 mM ($88.1 \pm 1.2\%$)、過酸化水素 0.5 mM ($68.1 \pm 2.3\%$) であり、過酸化水素の濃度依存的に低下傾向を示した。各グループ 10 検体のスペクトルデータを用いて PLS-DA 法による解析を行った結

果、スコアプロット上でコントロール群、 H_2O_2 0.25mM 群、0.5mM 群では明らかにクラスター化して分離された。NMR データの解析結果から、各群の過酸化水素濃度の違いによる細胞の包括的情報がそれぞれ異なることが示され、細胞傷害の程度、細胞増殖能と対応することが示すことができた。

○ 結果 2. 細胞増殖能は過酸化水素 0.5 mM 6 時間 ($4.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$)、12 時間 ($13.3 \pm 1.4 \mu\text{m}$)、24 時間 ($19.8 \pm 1.5 \mu\text{m}$)、コントロール 6 時間 ($11.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$)、12 時間 ($28.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$)、24 時間 ($40.8 \pm 3.4 \mu\text{m}$) であり、コントロールと比較すると時間の経過とともに抑制の傾向が認められた。細胞生存率は過酸化水素暴露後 6 時間 ($90.2 \pm 0.5\%$)、12 時間 ($89.5 \pm 1.2\%$)、0.5 mM 24 時間 ($68.4 \pm 1.2\%$) であり、コントロール 0 時間 ($97.3 \pm 0.2\%$)、6 時間 ($97.1 \pm 0.9\%$)、12 時間 ($96.6 \pm 0.8\%$)、24 時間後 ($96.6 \pm 0.4\%$) であった。 H_2O_2 暴露 6、12 時間後が同程度に低下し、暴露 24 時間でさらに低下した。各グループ 10 検体の NMR スペクトルデータを用いて PLS-DA 法によるクラス分類を行った結果、スコアプロット上で時間経過のコントロール群と過酸化水素暴露群は明らかにクラスター化した。過酸化水素暴露群の 6 時間と 12 時間は類似し、また 24 時間群とは明らかにクラスター化して分離された。各群の細胞の包括的情報は細胞増殖能、細胞傷害の程度と対応することが示すことができた。

【結論】

パターン認識による NMR スペクトル解析で得られた細胞内の包括的情報が、細胞傷害の程度、細胞増殖能と関連することを示すことができた。