

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08980

研究課題名(和文)脂質メタボローム解析のための臨床検査法の構築とその臨床応用

研究課題名(英文)Clinical laboratory method for lipid metabolome analysis, and clinical study application

研究代表者

日高 宏哉 (Hidaka, Hiroya)

信州大学・学術研究院保健学系・准教授

研究者番号：10362138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの脂質は多種多様な構造をしており、脂質代謝産物は様々な物質代謝に関与している。それゆえ、病気の病理を解明し、適切な治療法のために脂質メタボロームを研究する必要がある。私達は、ヒト血液と気管支肺胞洗浄(BAL)液の脂質組成を分析する単純な質量分析に基づく方法を開発した。これにより、200種類以上の脂質分子を同定することができた。この方法を適用して、血液悪性腫瘍患者の血液および呼吸器疾患患者のBAL液中の特定の脂質組成を決定した。さらに、少量の生体試料から脂質試料を調製するための迅速で簡単な方法を開発し、脂質代謝産物の分析が臨床試験で実現可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの病態解析を目的とする臨床検査では、汎用性があり、操作が簡便で迅速に測定でき、保守が容易なMALDI-TOF質量分析やGC質量分析が適している。また、臨床検査において、患者個々の検体分析では、患者の状態や、病態の経時変化など様々な要因を考慮する必要がある。そのため、脂質分子を代謝的に捉える網羅的、包括的分析が必要である。本研究は、臨床検査の現場で応用できる、簡便で迅速なヒト脂質メタボローム解析法を開発し、臨床試験への応用を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Human lipids have a wide variety of structures, and lipid metabolites play roles in the metabolism of various substances. Therefore, it is necessary to study the lipid metabolome to elucidate the pathology of disease and determine appropriate treatment. We have developed a simple mass spectrometry-based method to analyze the lipid composition of human blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. This method allowed the identification of more than 200 types of lipid molecules. We then applied this method to determine the specific lipid compositions in blood from hematologic malignancy patients and in BAL from patients with respiratory disease. Furthermore, we have developed a rapid and simple method for preparing lipid samples from small amounts of biological samples, and the analysis of lipid metabolites has become feasible in clinical testing.

研究分野：臨床検査学

キーワード：脂質 質量分析 脂質代謝産物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの脂質は、様々な構造と物性を持つ分子種群であり、その代謝産物である脂質メタボローム(脂質代謝産物)は、物質代謝の調節物質として様々な機能を有している。そのため、病態解明や治療判定のための脂質分子種の分析では、一分子の定量ではなく、脂質の代謝を捉える網羅的、包括的分析が必要である。しかし、脂質分子は、多種多様な構造を有しており物理化学的な性質の相違から、それぞれの分子種に対応した分析法が必要とされる。また、脂質分子は、お互いが分解、再合成などに密接に関連しており、定量的に捉えるだけでなく、質的な分析により脂質代謝を理解する事が必要である。

(2) 生体内の脂質研究では、主に液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)が用いられている。しかし、分析操作が専門的で煩雑であり、機器の保守なども専門的な技術を要する。そのため、比較的簡便に脂質分子種を測定するには、Matrix support laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS)とガスクロマトグラフィー質量分析法(Gas liquid chromatography mass spectrometer (GC MS))が適している。

(3) 臨床検査に応用できる脂質メタボローム解析法の開発は、様々な臨床検体に応用でき、疾患の発症や進展の脂質代謝メカニズムの解明だけでなく、日常の診断や治療経過、疾患予防の把握に応用できる必要がある。また、分析手法を他施設とも共有することにより、臨床的に脂質メタボローム解析を利用することに寄与できる。

### 2. 研究の目的

- (1) 本研究では、MALDI-TOF MS と GC MS による質量分析法を用いた臨床検査に応用できる迅速で簡便な分析法を構築する。
- (2) 臨床検体による脂質分子種組成(プロファイル)の作成
- (3) 微量資料による簡便で迅速な脂質試料の調製法の構築

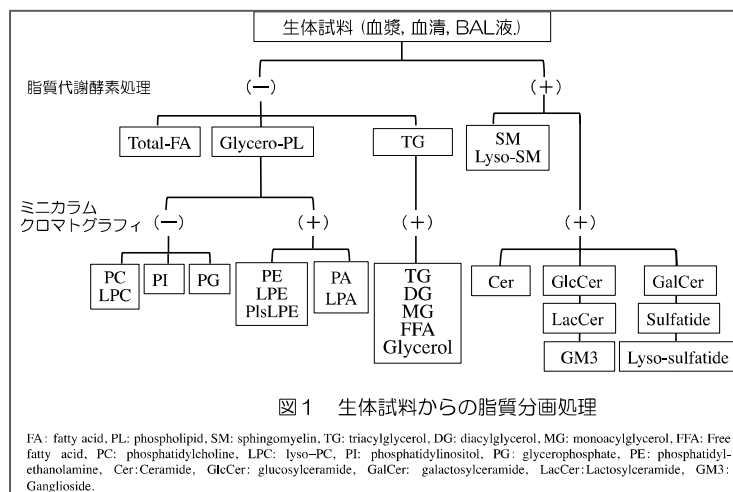
### 3. 研究の方法

生体試料からの質量分析用試料の調整のための脂質分画処理の概要を図1に示した。

#### (1) 脂質調製(ミニカラムクロマトグラフィ)

主要な脂質分子(グリセリン脂質、総脂肪酸)の分析には、脂質抽出液をそのまま使用したが、微量成分についてはそれぞれの目的分子に応じてミニカラムで部分精製した

脂質抽出：血清および気管支肺胞洗浄(BAL)液にクロロホルム/メタノール混液(C/M液；2/1 v/v)5倍量を加えて混和したのち、その1/5量の蒸留水を加えて混和した。下層は分取して遠心乾固したのち、C/M液で再溶解して脂質抽出液として、冷蔵庫で保存した。



脂質の部分精製：スフィンゴミエリン、スフィンゴ脂質、アシルグリセロールの分析では、血清中の目的脂質分子の分析に影響する他の脂質の影響を排除するために、脂質代謝酵素により加水分解を行った。さらに、微量成分についてはそれぞれの目的分子に応じてミニカラム(シリカゲル、フェニルセファロース、弱陰イオン交換樹脂)で部分精製した。脂質抽出液を遠心乾固したのち、目的物質に応じた有機溶媒(クロロホルム、C/M液など)に溶解し、充填し平衡済みのミニガラスカラム(5 x 10~20 mm)に添加した。試料は、有機溶媒混液で溶出し、目的の溶出分画を遠心乾固したのち、C/M液(2/1 v/v)で再溶解して、冷蔵庫で保存した。

## (2) 前処理

MALDI-TOF MS 質量分析: MALDI-TOF MS 質量分析試料は、マトリックス液と等量混和し MALDI-TOF MS サンプルプレートに添加した。Positive ion mode 測定ではマトリックスとして 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (2,5-DHB)、negative ion mode 測定のマトリックスは 9-Aminoacridine (9-AA) を用いた。

GC MS 質量分析: リン脂質、脂肪酸の GC MS 質量分析試料は、塩酸/メタノール混液を添加し、武富らの方法<sup>1)</sup>により脂質中の脂肪酸をメチルエステルとして抽出し、遠心乾固したのち、C/M 液で再溶解した。アシルグリセロールは、トリメチルシリル (TMS) 化誘導を行った。

高分子膜法: 高分子膜に脂質抽出液を添加し、有機溶媒で溶出し、遠心乾固したのち、C/M 液で再溶解した。薄層クロマトグラフィーシリカゲル中の試料は、高温加圧装置で高分子膜に転写して用いた。

## (3) 脂質の検出と定量

脂質分子の検出: 脂質分子の検出は、薄層クロマトグラフィー (TLC) 法で行った。展開溶媒として、石油エーテル: ジエチルエーテル: 酢酸 (17:3:0.2 v/v/v) またはクロロホルム: メタノール: 水 (19:10:2.4 v/v/v) で脂質を展開させ、展開プレートにプリムリン溶液を噴霧させ、UV 照射により脂質を検出した。

脂質の定量: 脂質抽出液中の脂質 (リン脂質、トリグリセライド、コレステロール) 濃度は、市販の生化学自動分析試薬を用いた酵素法で定量した。

## (4) 質量分析

MALDI-TOF MS 質量分析: MALDI-TOF MS 質量分析は、ABSCIEX 社の AB SCIEX TOF/TOF<sup>TM</sup>5800 を用いて分析した。分子種の同定は、プロダクトイオン分析を MS/MS モードに切り替え測定した。質量データ解析は、画像解析ソフト (Data Explore 社) を用いて、Excel ソフト (Microsoft 社、Albuquerque, NM) にてピークを数値化し行った。

GC MS 質量分析: GC MS 質量分析は島津製作所 GCMS-QP2010 (column: 90 % Cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (BPX90: 膜厚; 0.25  $\mu$ m、長さ; 60.0 m、内径; 0.25 mm) で、分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 健常者の血清中脂質組成

MALDI-TOF MS および GC MS による健常者の血清中の脂質分子種組成を同定した。

#### グリセロリン脂質

ヒト健常人ボランティア血清では、少なくとも (同じ  $m/z$ : 質量電荷数比で脂肪酸の組み合わせによる重複あり、以降同様) 14 分子種のホスファチジルコリン (PC)、8 分子種のリゾホスファチジルコリン (LPC) の 22 分子種、BAL 液では、17 分子種の PC、10 分子種の LPC の 27 分子種が同定された。さらに、血清中ホスファチジリエタノールアミン (PE) が 12 分子種、ホスファチジレイノシトール (PI) が 11 分子種、ホスファチジルグリセロール (PG) が BAL 液で 8 分子種が同定された。

#### スフィンゴ脂質

ヒト健常人ボランティア血清のスフィンゴミエリン (SM) 分子種は 15 分子種が同定され、サルファチドは 113 分子種同定された。サルファチドでは、脂肪酸として極長鎖脂肪酸 C24 と C22 や水酸基を持つヒドロキシ脂肪酸などが特徴的に含まれた。また、スフィンゴイド骨格構造にも差があり、多種多様な分子種群であった。現在、腎機能疾患の症例の検討を進めている。さらにセラミドが 3 分子種、ガングリオシドが 7 分子種、; Glucosylceramide (GulCer) が 22 分子種、Lactosylceramide (LacCer) が 27 分子種同定された。

## プラズマローゲン

ヒト健常人ボランティア血清のプラズマローゲン (PIs PE) 23 分子種、そのリゾ体 3 分子種が同定された。

## アシルグリセロール、脂肪酸

血清 200~500  $\mu$ L から、C/M/水による抽出液の下層をシリカゲルカラムに石油エーテルとクロロホルムを用いて、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロールをそれぞれ精製し、上層からはグリセロールをトリメリルシリル化してGC MSで測定した。総脂肪酸(T-FA)は、メチルエステル化してGC MS、遊離脂肪酸(FFA)は、弱アニオン交換樹脂により FFA 分画を精製し、MALDI-TOF MS で分析でき、主要な FA の 11 分子が分析できた。検体量を増加させることで、さらに微量な FFA も分析可能であった。

## ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸

健常者血清においてホスファチジン酸 (PA) は 8 分子種、リゾホスファチジン酸 (LPA) は 6 分子種を同定できた。健常者血漿においては、いずれの分子も検出感度以下であった。このことは、血液凝固時の血小板からの遊出によるものである。試料量や測定感度を上げることで、血流中での血小板変性や凝固 (血栓など) に伴い遊出する PA、LPA は検出できる可能はある。

## (2) 臨床症例によるリン脂質

呼吸器疾患における BAL 液のリン脂質分析において、疾患によるプロファイルに差が認められた。現在、その代謝産物の精査分析を行っている。また、血液悪性腫瘍患者においてもリン脂質プロファイルに差が認められた。今後、個別患者での治療経過による変動を捉える必要がある。

## (3) 脂質調製法

### 高分子膜法の回収率

血清中リン脂質、トリグリセライドは、改良 Folch 変法とほぼ同等に 95%以上の回収率であった。質量分析による組成比もほぼ同等のプロファイルを得られた。

表 1. 高分子膜脂質抽出法の測定精度(回収率)

項目	リン脂質		トリグリセライド	
	濃度(mg/dL)	回収(%) $\pm$ SD(CV%)	濃度(mg/dL)	回収率(%) $\pm$ SD(CV%)
血清	169.2	103.9 $\pm$ 7.9(7.6)	67.3	94.3 $\pm$ 4.9(5.2)

### シリカゲルからの脂質分画の回収

シリカゲルからの脂質分画の回収は、シリカゲルかき取りと高温高圧プロットング法で行った。両者の脂質プロファイルは、同等であった。後者は、前者に比べて操作が簡便で操作時間も短く、回収率に優れていた。

### 脂質代謝酵素処理

高分子膜法による脂質代謝産物の分析を行った。血清を脂質代謝酵素により加水分解し、分解産物海を薄層クロマトグラフィー (TLC) と質量分析で分析した。分解産物は、元の脂質分子に比べて水溶性が高くなるが、いずれも回収して分析できた。

主要な脂質分子では分析試料量が数  $\mu$ L で分析可能であり簡便で迅速な高分子膜法では、脂質調製に有用であった。微量成分の分析条件の設定を行っており、試料の調製はそれぞれの施設ででき、分析は MALDI-TOF MS で行うことで、臨床検体の分析が容易になった。

## < 引用文献 >

<sup>1)</sup> TTaketomi T, Hara A, Uemura K, Sugiyama E: J. Biochem. 120, 573-579 (1996)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 森田 温、日高宏哉	4. 巻 47
2. 論文標題 質量分析を用いた血中遊離脂肪酸プロファイル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroya Hidaka, Minoru Hongo,	4. 巻 5
2. 論文標題 Association between serum triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels in Japanese junior high school students	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 日高宏哉、五味 三寧子、本郷 実	4. 巻 40
2. 論文標題 中学生の血清脂質およびアポリポ蛋白組成におけるトリグリセライド濃度の影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 221-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 森田温、山浦 洵、佐藤 友、堀敦 詞、上原 剛、渡部俊之、三井田 孝、日高宏哉	4. 巻 40
2. 論文標題 ガスクロマトグラフィー質量分析による血清遊離グリセロール測定	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物試料分析科学	6. 最初と最後の頁 279-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山浦 洵, 日高 宏哉	4. 巻 46
2. 論文標題 血漿中のアシル型リゾホスファチジルエタノールアミンのMALDI -TOF質量分析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 133-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森田 温, 日高宏哉	4. 巻 47
2. 論文標題 質量分析を用いた血中遊離脂肪酸プロファイル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikiko Harada, Atsushi Izawa, Hiroya Hidaka, Keisuke Nakanishi Fumiko Terasawa, Hirohiko Motoki, Yoshikazu Yazaki, Uichi Ikeda, Minoru Hongo	4. 巻 69
2. 論文標題 Study Project on Prevention of Metabolic Syndrome among Children, Adolescents, and Young Adults in Shinshu: Importance of cystatin C and uric acid levels in the association of cardiometabolic risk factors in Japanese junior high school students.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 222-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2016.03.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 森田 温, 日高宏哉
2. 発表標題 質量分析装置を用いた血中遊離脂肪酸種の分析
3. 学会等名 第36回日本臨床化学会 甲信越支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sunao Morita, Makoto Yamaura, Tomo Sato, Atsushi Hori, Tsuyoshi Uehara, Hiroya Hidaka
2. 発表標題 Analysis of serum triacylglycerol metabolites in hypertriglyceridemia.
3. 学会等名 Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomo Sato, Makoto Ymaura, Sunao Morita, Atsushi Hori, Tsuyoshi Uehara, Hiroya Hidaka.
2. 発表標題 Analysis of human lipid molecular species using thin-layer chromatography fractionation and mass spectrometry
3. 学会等名 Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田 温, 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 上原剛, 日高宏哉
2. 発表標題 GC-MSを用いた血清中トリアシルグリセロール水解産物分析
3. 学会等名 第59回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田 温, 山浦 洵, 佐藤 友, 堀 敦詞, 上原 剛, 日高宏哉
2. 発表標題 質量分析装置を用いた血中遊離脂肪酸種の分析(日本臨床化学学会賞 YIA受賞演題)
3. 学会等名 第57回日本臨床化学学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山浦 洵, 森田 温, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉
2. 発表標題 血漿中のPE及びLPEの質量分析.
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会年次学術集会(学生シンポジウム)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 友, 森田 温, 山浦 洵, 堀 敦詞, 上原 剛, 日高宏哉
2. 発表標題 薄層クロマトグラフィー分画脂質の質量分析
3. 学会等名 . 第57回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田 温, 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉
2. 発表標題 GC-MSを用いた血清グリセロール及びアシルグリセロール測定
3. 学会等名 第27回生物試料分析科学年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀敦 詞, 森田 温, 山浦洵, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉
2. 発表標題 エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を用いた血清スフィンゴミエリン分子種分析
3. 学会等名 第27回生物試料分析科学年次学術集会
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 友彦  (Nkamura Tomohiko)  (70507798)	信州大学・医学部・特任教授   (13601)	
研究 分担者	上原 剛  (Uehara Takeshi)  (80402121)	信州大学・学術研究院医学系・准教授   (13601)	