

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01652

研究課題名(和文) 質量分析を用いたストレスマーカーの一斉定量法の確立とその有用性の検討

研究課題名(英文) Establishment of a simultaneous quantification method of stress markers by using mass spectrometry and examination of its usefulness

研究代表者

山田 和夫 (Kazuo, Yamada)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：30240005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病、高血圧、がんなどの疾患の原因と考えられている酸化ストレスマーカーを含む複数のストレスマーカーを液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC/MS/MS)を用いて一斉に定量できる方法を開発した。高血圧自然発症ラット(SHR)およびWKYラットに4%あるいは8%食塩含有食を与え、血漿中のストレスマーカーをLC/MS/MSで解析し、8%食塩含有食の投与により、SHRおよびWKYのKYA濃度が有意に減少すること、また、4%食塩含有食投与により、SHRのSDMA濃度が有意に上昇することが明らかとなり、KYAおよびSDMAが食塩感受性のストレスマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a simultaneous quantification method of several stress markers including oxidative stress which is involved in diseases such as diabetes, hypertension, and cancer by using LC/MS/MS. Administration of foods containing 4% or 8% sodium chloride to spontaneously hypertensive rat (SHR) and Wistar kyoto (WKY) rat decreased KYA concentration in both SHR and WKY plasmas, and that of food containing 4% sodium chloride increased SDMA concentration in SHR plasma, suggesting the possibility that KYA and ADMA could be a salt-sensitive stress marker.

研究分野：細胞生物学

キーワード：質量分析 ストレスマーカー 疾患モデル動物 高血圧自然発症ラット

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスを含む複数のストレスが糖尿病、高血圧、がんなど多くの疾患をもたらすことが報告されてきた。このため、生体内のストレス状態を評価し、その低減をはかることは病態把握、疾病予防に役立つと考えられる。しかしながら、これまで酸化ストレスマーカーを含む多くのストレスマーカーは個々に測定されることが多く、構造や化学的性質の異なる複数のストレスマーカーを一斉に定量する方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は糖尿病、高血圧、がんなどの疾患の原因と考えられている酸化ストレスマーカーを含む複数のストレスマーカー(8-OHdG(8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン)、3-NT(3-ニトロチロシン)、4-HNE(4-ヒドロキシノネアル)、GSH(還元型グルタチオン)、GSSG(酸化型グルタチオン)、ADMA(非対称ジメチルアルギニン)、SDMA(対称ジメチルアルギニン)、TRP(トリプトファン)、Ky(キヌレニン)、3-HK(3-ヒドロキシキヌレニン)、3-HA(3-ヒドロキシアントラニル酸)、KYA(キヌレン酸))を液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC/MS/MS)を用いて一斉に定量する方法を開発し、ストレス状態の評価におけるこの方法の有用性について疾患モデル動物を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ストレスマーカーを LC/MS/MS で一斉に定量する方法の確立

ストレスマーカーの検出条件の検討

ストレスマーカー標準液をエレクトロスプレー四重極型タンデム質量分析計(サーモフィッシャーサイエンティフィック、Access MAX)に注入し、LC/MS で検出するために最適な親イオン、娘イオンの質量電荷比(m/z)、衝突エネルギーを調べた。

ストレスマーカーの LC/MS/MS での分離、溶出条件の設定

C18 逆相カラム、イオン交換カラム、逆相

イオン交換カラムを用い、質量分析で主に使用されるギ酸、ギ酸アンモニウム、メタノール、アセトニトリルの組み合わせにより、ストレスマーカーを一斉に分離、溶出する条件を LC/MS/MS で検討した。

ストレスマーカーの検量線の作成

それぞれのストレスマーカー物質の濃度希釈系列を作成し、で決定した条件で LC/MS/MS で解析し、定量限界値(S/N=10)、定量範囲を決定した。

(2) LC/MS/MS による生体試料のストレスマーカーの検出の検討

GSH、GSSG の分解抑制の検討

血漿中で GSSG、GSH は GSH 分解酵素(ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ (GGT))により分解されることが知られている。そこで GSH、GSSG の分解を抑制するため、Wistar Kyoto(WKY)ラット血漿に GSH、GSSG とともに GGT 阻害剤 GGS TOP(3-[[[3-Amino-3-carboxypropyl)methoxyphosphinyl]oxy]benzeneacetic acid)を添加し、GSH、GSSG の変動を LC/MS/MS で解析した。

ストレスマーカーの血漿での抽出効率、再現性の検討

WKY ラット血漿にストレスマーカーを添加し、種々の有機溶媒を用いて除タンパク後、LC/MS/MS でそれぞれを定量し、抽出効率、再現性(変動係数)を検討した。さらに、ストレスマーカーが血漿中に検出されるかどうかを検討した。

(3) 高血圧自然発症ラット(SHR)を用いてのストレス状態の評価におけるこの方法の有用性の検討

高血圧自然発症ラット(SHR)および WKY ラットにコントロール食(0.5% 食塩含有食)、4% 食塩含有食、8% 食塩含有食を与え、血圧および血漿中のストレスマーカーの変動を解析した。

尚、動物実験は島根大学・動物実験専門委員会において、「質量分析によるストレスマーカーの一斉定量法の確立と高血圧自然発症ラットを用いての有用性の検討」の課題名で承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) ストレスマーカーを LC/MS/MS で一斉に定量する方法の確立

ストレスマーカーの検出条件の検討

それぞれのストレスマーカーに特異的な親イオン、娘イオンの質量電荷比(m/z)、衝突エネルギーを決定した。

ストレスマーカーの LC/MS/MS での分離、溶出条件の設定

逆相-イオン交換カラム (Imtakt 社製 Scherezoo SS-C18) を用いて 0.5% ぎ酸溶媒から 30 mM ぎ酸アンモニウム、90% メタノール溶媒に濃度勾配をかけることにより、ストレスマーカーを一斉に分離、溶出する方法を確立した。

ストレスマーカーの検量線の作成

定量限界は 20 nM から 400 nM、定量範囲はストレスマーカーによって異なり、最小 20 nM から最大 100 μ M までであった。

(2) LC/MS/MS による生体試料のストレスマーカーの検出の検討

GSH、GSSG の分解抑制の検討

GSH、GSSG の血漿中での分解を検討したところ、GGT 阻害剤 GGsTOP (3 mM) は WKY ラット血漿への GSH、GSSG 添加による GSH、GSSG の分解を抑制することが明らかとなった。

ストレスマーカーの血漿での抽出効率、再現性の検討

WKY ラット血漿でのストレスマーカーの抽出効率、再現性についてメタノール、アセトニトリル、ぎ酸 (15 : 85 : 0.2) の混合溶媒を用いて検討したところ、抽出効率は概ね 70% 以上、変動係数は 20% 未満であった。WKY 血漿中では 8-OHdG、3-NT、3-HK、3-HA

は定量限界以下であった。4-HNE は用いた抽出溶媒では検出されなかった。

(3) 高血圧自然発症ラット (SHR) を用いてのストレス状態の評価におけるこの方法の有用性の検討

本法のストレス状態の評価における有用性を SHR および WKY ラットにコントロール食 (0.5% 食塩含有食)、4% 食塩含有食、8% 食塩含有食を与え、血圧および血漿中のストレスマーカーの変動を解析した。

血圧の変動

4% 食塩含有食、8% 食塩含有食を SHR に投与すると、血圧は 200 mmHg 以上に上昇した。一方、WKY では 4% 食塩含有食投与での血圧は 120 mmHg 程度で正常血圧値の範囲内であった。また、8% 食塩含有食投与により血圧は上昇したが 200 mmHg 以上の高値は示さなかった。

ストレスマーカーの変動

4% 食塩含有食、8% 食塩含有食の 10 週間投与により、SHR および WKY とともにコントロール食に比べ、血漿中の KYA 濃度が有意に減少すること、また、4% 食塩含有食 10 週間投与により、SHR 血漿中の SDMA 濃度がコントロール食に比べ、有意に上昇すること、他のストレスマーカーの有意な変動は認められないことが明らかとなり、KYA および SDMA が食塩感受性のストレスマーカーとなりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Matsuda C, Shiota Y, Sheikh AM, Okazaki R, Yamada K, Yano S, Minohata T, Matsumoto KI, Yamaguchi S, Nagai A. Quantification of CSF cystatin C using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta 478. 1-6, 2018. (査読有) doi: 10.1016/j.cca.2017.12.016.
Kawakami K, Yamada K, Yamada T, Nabika T, Nomura M. Antihypertensive effect

of γ -aminobutyric acid-enriched brown rice on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 64. 56-62, 2018. (査読有) doi: 10.3177/jnsv.64.56
Yamada K, Watanabe A, Takeshita H, Matsumoto K. A method for quantification of serum tenascin-X by nano-LC/MS/MS. *Clinica Chimica Acta* 459. 94-100, 2016. (査読有) doi: 10.1016/j.cca.2016.05.022.
Kawakami K, Yamada K, Notsu Y, Zahid H.M, Nabika T, Yamada T. Development of one-handed milking device to collect milk from lactating rats : Analysis of feeding with progressive lactation. *Shimane Journal of Medical Science* 32. 13-18, 2015. (査読有) <http://ir.lib.shimane-u.ac.jp/ja/journal/M-SJM/32/1/article/34460>
Sato K, Yamada K, Maniwa T, Oda T, Matsumoto K. Monitoring of serial presurgical and postsurgical changes in the serum proteome in a series of patients with calcific aortic stenosis. *Disease Markers* 60. 17-21, 2015. (査読有) doi: 10.1155/2015/694120.

[学会発表](計 18 件)

Kazuo Yamada, Atsushi Watanabe, Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Haruo Takeshita, Ken-ichi Matsumoto. Development of diagnostic method of Ehlers-Danlos syndrome using nano-LC/MS/MS. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)・第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会. 神戸 2017

山田和夫, 藤原純子, 竹下治男, 木村かおり, 安田年博. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) 遺伝子における SNP (rs27434) と臓器重量等との関連. 日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会. 東京 2017

木村かおり, 藤原純子, 山田和夫, 安田年博, 竹下治男. 塩基除去修復 (BER) 経路に関わる DNA polymerase β (POLB) 遺伝子多型の世界分布. 日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会. 東京 2017

竹下治男, 藤原純子, 木村かおり, 山田和夫, 安田年博. 国内外の多集団における Interleukin 8 遺伝子 (CXCL8) 内-251 A/T 多型解析においてみられた地理的勾配および喫煙率との相関. 第 43 回日本法医学会学術中四国地方集会. 松山 2017

山田和夫, 渡辺淳, 古庄知己, 木村かおり, 藤原純子, 竹下治男, 松本健一. ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析法によるテネascin X ハプロ不全関

節亢進型エーラスダンロス症候群の診断法への応用. 第 49 回日本結合組織学会学術大会. 津 2017

木村かおり, 藤原純子, 山田和夫, 長谷川有紀, 倉田さつき, 安田年博, 竹下治男. SIDS にて死亡した第一子, Shaken Baby Syndrome であった第 2 子の同胞例. 第 101 次日本法医学会学術全国集会. 岐阜 2017

安田年博, 飯田礼子, 植木美鈴, 竹下治男, 藤原純子, 木村かおり, 山田和夫, 河合康幸. 自己免疫疾患に關与する DNase family 遺伝子の functional SNPs. 第 101 次日本法医学会学術全国集会. 岐阜 2017

川上浩平, 山田和夫, 山田高也, 野村正人. 高血圧自然発症ラット (SHR) における GABA 富化玄米の血圧降下作用. 第 64 回日本実験動物学会総会. 郡山 2017

Kohei Kawakami, Hiroyuki Matsuo, Kaoru Niiya, Kazuo Yamada, Takaya Yamada, Mari Okita, Masahiko Motoya, Masato Nomura, Toru Nabika. Inhibition of an increase in the blood pressure by food produced by processing residues after fruit juice extraction in spontaneously hypertensive rats (SHR). The 17th International SHR Symposium. Tokyo 2016

山田和夫, 渡辺淳, 木村かおり, 藤原純子, 安田年博, 竹下治男, 松本健一. Nano-LC/MS/MS を用いたテネascin X 欠損型エーラスダンロス症の診断法の開発. 日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会. 柏 2016

木村かおり, 藤原純子, 安田年博, 倉田さつき, 小湊慶彦, 佐野利恵, 山田和夫, 竹下治男. 日本国内および世界人口におけるインターロイキン 8 内-251 A/T 多型解析. 日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会. 柏 2016

山田和夫, 藤原純子, 木村かおり, 松本健一, 安田年博, 竹下治男. 質量分析を用いたストレスマーカーの一斉定量法の開発とその法医解剖への応用へ向けて. 第 33 回日本法医学会学術中四国地方集会, 広島 2016

Takuto Fujii, Kazuo Yamada, Haruo Takeshita, Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto. Search of new biomarkers for angina pectoris by proteomic analysis. 第 89 回日本生化学会大会. 仙台 2016

山田和夫, 渡辺淳, 古庄知己, 竹下治男, 松本健一. ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いたエーラスダンロス症の診断法の開発. 第 48 回日本結合組織学会学術大会. 長崎 2016

川上浩平, 松尾裕之, 新谷薫, 山田和夫, 山田高也, 並河徹. 新型脳梗塞モデルと

なりうるか？ 高食塩食負荷高血圧自然発症ラット(SHR)での検討. 第 63 回日本実験動物学会総会. 川崎 2016

Kohei Kawakami, Kazuo Yamada, Takaya Yamada, Ryuji Takeda, Akiyoshi Sawabe, Masato Nomura, Toru Nabika. Effect of GABA-enriched brown rice on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. Honolulu, USA. 2015

Kazuo Yamada, Atsushi Watanabe, Haruo Takeshita, Ken-ichi Matsumoto. Development of a quantification method of serum tenascin-X by nano-LC/MS/MS. 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸 2015
Kazumi Satoh, Kazuo Yamada, Tomoko Maniwa, Ken-ichi Matsumoto. Proteomic analysis of serial presurgical and postsurgical sera of patients with calcific aortic stenosis. 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸 2015

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和夫 (YAMADA, KAZUO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：30240005

(2) 研究分担者

()