

平成30年 5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20900

研究課題名(和文) 体液中脂質プロファイルの効率的解析に基づくニーマンピック病C型新規診断法の構築

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for Niemann-Pick disease type C based on efficient analysis of lipid profile in body fluid

研究代表者

前川 正充 (MAEKAWA, Masamitsu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70572882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：従来の検査法の種々の課題から新規診断法開発が望まれていた脂質異常疾患であるニーマンピック病C型の新規診断法構築を目的とし、種々検討を行った。各種コレステロール代謝物類、スフィンゴ脂質類のMS/MS条件検討を行い、それぞれに特徴的なフラグメントパターンを見出すとともに、それらを識別可能なLC条件を見出した。それらの条件を活用したフォーカスドメタボロミクス法により、ニーマンピック病C型患者体液中に特徴的な分子を見出した。それら代謝物の精密定量について検討し、化学診断に有用な分析法を開発するとともに、検討した代謝物が非常に診断マーカー性能に優れていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing a novel diagnostic method for Niemann-Pick disease type C, which is a lipid abnormal disease that was desired to develop a novel diagnostic method, various investigations were conducted. MS/MS conditions of various cholesterol metabolites and sphingolipids were investigated, and characteristic fragment patterns were found. In addition, LC conditions, which can identify them, were optimized. By focused metabolomics using these conditions, we found characteristic molecules in body fluids of Niemann-Pick disease type C patients. In next, we investigated the accurate analysis method for these metabolites. As a result, we developed an analytical method useful for diagnosis and found that the metabolites have very excellent diagnostic marker performances.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：ニーマンピック病C型 コレステロール代謝物 LC/MS/MS 化学診断 バイオマーカー フォーカスドメ
タボロミクス 誘導体化

1. 研究開始当初の背景

ニーマンピック病 C 型 (NPC) は発症時期や臨床症状が多様な常染色体劣性の先天性疾患である。早期発症例では劇症型の消化器症状を、遅発になるにつれて、中枢神経症状や精神疾患様症状を呈するとされる。進行性の中枢神経脱落によって、嚥下困難、気管切開、寝たきりとなる難病である。治療薬としては、神経症状改善効果のあるミグルスタットが承認されているほか、シクロデキストリンや HDAC 阻害薬なども研究開発が進んでいるなど、治療に関する進歩が著しい。

しかしながら、NPC 治療における課題は診断にある。NPC は遺伝病であるにもかかわらず、上述のように新生児から成人までと発症時期が広い。また、症状の多くは他の先天性疾患、神経疾患、精神疾患とも重複する。NPC を専門とする医師も少ないことから、他疾患への誤診や見逃しが起こってしまう。こうした背景から、容易に NPC 検査に使用可能なスクリーニング法や他疾患との鑑別が可能な診断法の開発が望まれている。

原因遺伝子である *NPC1* および *NPC2* は、リソソーム内コレステロール輸送に関わる膜タンパク質あるいは分泌型タンパク質をコードする。それらの変異がコレステロール輸送排出に異常をもたらし、コレステロールの蓄積を惹起し、さらに、スフィンゴ脂質の二次的な蓄積を引き起こす。従来確定診断には、フィリピン染色と遺伝子診断が用いられるが、検査にかかる時間的・費用的コストが大きい上、侵襲性も高く、気軽に検査できないといった課題があった。

一方、申請者らは、一例の NPC 患者で報告されていた尿中抱合型コレステロール代謝物、すなわち、SNAG- Δ^5 -CA、SNAG- Δ^5 -CG および SNAG- Δ^5 -CT (図 1A-C) の液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 測定法を構築した。コレステロール代謝異常症である 3 β -ヒドロキシステロイド- Δ^5 -C₂₇-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ欠損症と健常人に比較して、NPC 患者尿中のそれらの濃度は高値である可能性があったため (Maekawa *et al.*, *Steroids*, **78** (2013) 967-972)、その後、症例数を増やして検討した結果、いずれも優れた診断マーカー性能を示したが、わずかに偽陰性も存在したため、抱合代謝物のみを特異的かつ網羅的に検出するフォーカスドメタボロミクスを構築し、NPC 患者尿へ応用し、新たなマーカー候補分子を見出した。

2. 研究の目的

こうした背景から、NPC では、複雑な脂質代謝変動の可能性があり、そうした病態に基づく分子変化を網羅的に解析することで、新規診断マーカー候補が探索できると考えた。そこで、NPC において変動すると考えられている、コレステロールおよびスフィンゴ脂質の両代謝物群を網羅的かつ詳細にプロファ

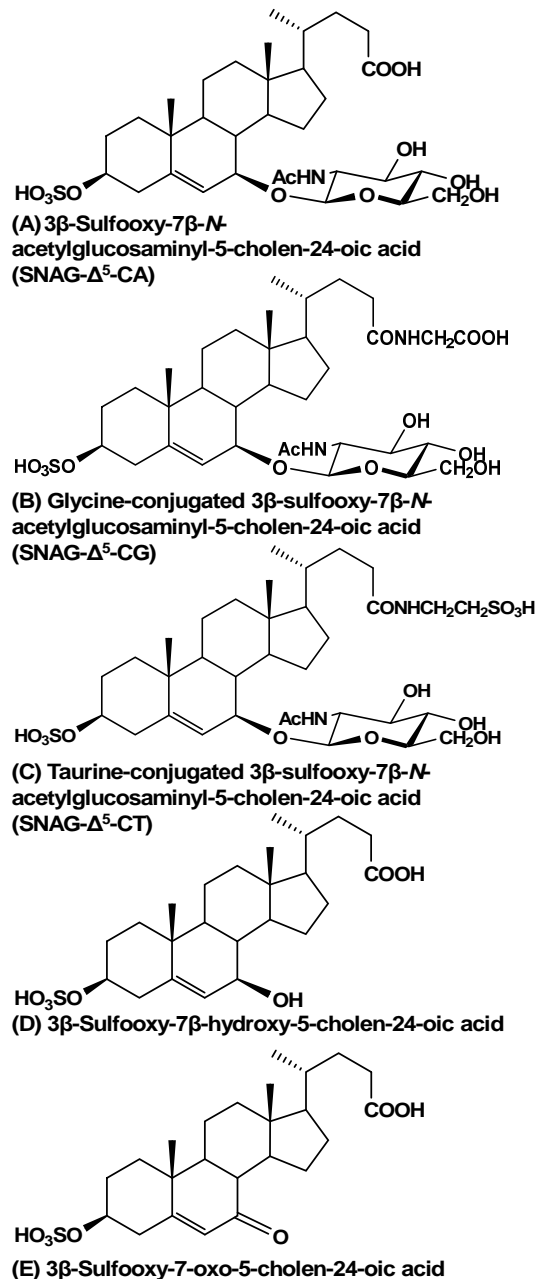


図 1 本研究で有用性が見出された NPC 診断マーカー候補代謝物

イリングし、それらと病態の関連を解析するフォーカスドメタボロミクスの手法を構築し、それを活用して得られた結果を基に、マーカー候補分子を選択し、その精密分析法を構築し、新規 NPC 化学診断法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 効率的マーカー分子探索を可能とするフォーカスドメタボロミクス解析法の構築

一般的なメタボロミクス手法は膨大なピークを検出できることが利点であるが、解析も困難になりがちである。申請者はある種の分子群、すなわち、コレステロール代謝物と

スフィンゴ脂質のみを対象とすることとし、MS/MS スキャンによるフォーカスドメタボロミクスを活用することとした。

まず、コレステロール代謝物およびスフィンゴ脂質類を網羅的に解析可能な分析条件の検討を行った。

- (2) 体液中脂質プロファイル解析ならびに疾患マーカー分子探索と新規診断法の開発

構築したフォーカスドメタボロミクス解析法を用いて、NPC 患者体液ならびにコントロール検体の体液を測定することによって、新規診断マーカー分子を探索し、それを対象とする精密分析法を構築することで、新規 NPC 化学診断法を開発することとした。

4. 研究成果

- (1) 効率的マーカー分子探索を可能とするフォーカスドメタボロミクス解析法の構築

まず、MS/MS 条件の検討を行った。代表的なスフィンゴ脂質の一種である、リゾスフィンゴミエリンは、感度よく m/z 184 のピークを生成し、高感度に検出できることがわかった一方、ステロイド類の直接分析は難しいことがわかった。そこで、既報 (Yamashita *et al.*, *Steroids*, 72 (2007) 50-59.) に従い、ピコリン酸による誘導体化を試みることにした。その結果、ピコリン酸誘導体に変換したいずれのステロイド類も、ナトリウム付加イオンとして高感度に検出可能であった。さらに、MS/MS においては、ピコリン酸部分に由来する m/z 146 のイオンあるいは、ピコリン酸部分の脱離による 123 Da のニュートラルロスで検出されることがわかった。

次いで、LC 条件の検討を行った。ステロイド類には、組成式が同一であるゆえに質量が等しいが、構造の異なる異性体が多数存在する。これらは MS/MS でほぼ同一の挙動を示すため、それのみによる識別は不可能であり、LC 分離が不可欠である。カラム、移動相について、種々の検討を行った結果、すべての異性体を分離することに成功し、それらを識別可能な条件を見出した。

また、前処理についても検討を行い、ステロイド類はいずれも液液抽出を用いて効率的に回収可能であることがわかった。また、スフィンゴ脂質については、除タンパクあるいは固相抽出によって良好に回収できることがわかった。

検討した条件を適切に設定した LC/MS/MS によって、対象となる脂質を網羅的に解析できることがわかった。

- (2) 体液中脂質プロファイル解析ならびに疾患マーカー分子探索と新規診断法の開発

上記の検討によって構築した、各種脂質類

を測定対象とするフォーカスドメタボロミクス法を用いて、NPC 患者各種体液の解析を行った。

その結果、尿中のコレステロール代謝物ピーク (m/z 469 および m/z 467) が NPC 患者に特徴的であることがわかった。これらを最終的に 3 β -スルホオキシ-7 β -ヒドロキシ-5-コレン酸および 3 β -スルホオキシ-7-オキソ-ヒドロキシ-5-コレン酸と同定した (図 1D および E)。これら 2 種の精密定量分析法を構築することが NPC の新規診断法構築につながると考えられたため、新規に同定した 2 種とこれまで測定対象としていた 3 種の代謝物、計 5 種 (図 1) を一斉に測定する LC/MS/MS 法の開発を行うこととした。

MS/MS 条件、LC 条件を検討した結果、いずれの化合物も相互に分離し、なおかつ、いずれの夾雑ピークとも分離可能な条件を見出した。分析法バリデーション試験についても行い、構築した手法が信頼性に優れることを証明した。構築した手法により、NPC 患者と健常人尿の測定を行ったところ、代謝物のうち 1 種は、両者を完全に識別できるマーカー性能を有することがわかり、構築した分析法は、NPC 化学診断法として有用であるとわかった。本成果は現在、論文化の準備中である。

一連の成果は国内外ともに広く認められ、2016 年版 NPC 診断アルゴリズムに関する説にも取り入れられるなど、広く認知されるに至っており (Papandreou *et al.*, *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 9 (2016) 216-229)、現在も国内の NPC 診療における社会実装へ向け、臨床研究を続けている。

また、血中のスフィンゴ脂質代謝物についても、高濃度に存在する興味深いピークを検出したが、同定するには至っておらず、さらに今後も、NPC における脂質異常を深く解析する必要があると考えている。

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 6 件)

論文

1. Ryuichi Mashima, Masamitsu Maekawa, Aya Narita, Torayuki Okuyama, Nariyasu Mano: Elevation of plasma lysosphingomyelin-509 and urinary bile acid metabolite in Niemann-Pick disease type C-affected individuals. *Mol. Genet. Metab. Rep.*, 査読有, Vol. 15, 2018, pp. 90-95, <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.03.005>.
2. 前川正充、山口浩明、眞野成康: 医療現場で活躍する分析技術. *分析化学*, 査読有, Vol. 66, No. 6, 2017, pp. 413-419, <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.66.4>

- 13.
3. Masamitsu Maekawa, Kaoru Omura, Shoutaro Sekiguchi, Takashi Iida, Daisuke Saigusa, Hiroaki Yamaguchi, Nariyasu Mano: Identification of two sulfated cholesterol metabolites found in the urine of a patient with Niemann-Pick disease type C as novel candidate diagnostic markers. *Mass Spectrom. (Tokyo)*, 査読有, Vol. 5, 2016, S0053, <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.S0053>.
 4. Francesca Mazzacuva, Philippa Mills, Kevin Mills, Stephane Camuzeaux, Paul Gissen, Elena-Raluca Nicoli, Christopher Wassif, Danielle te Vrugte, Forbes D. Porter, Masamitsu Maekawa, Nariyasu Mano, Takashi Iida, Frances Platt, and Peter T. Clayton: Identification of novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett.*, 査読有, Vol. 590, 2016, pp. 1615-1662, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12196>.

総説

1. Ryuichi Mashima, Masamitsu Maekawa: Lipid biomarkers for the peroxisomal and lysosomal disorders: their formation, metabolism and measurement. *Biomarker Med.*, 査読有, Vol. 12, No. 1, 2018, pp. 83-95, <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0225>.
2. Nariyasu Mano, Masamitsu Maekawa, Hiroaki Yamaguchi: Clinical chemistry based on highly accurate separation analysis technology. *Chromatography*, 査読有, in press, <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2018.003>.

〔学会発表〕(計 16 件)

依頼講演

1. 眞野成康、前川正充、山口浩明: オミクス解析を基盤とした臨床化学分析、日本薬学会第 138 年会、2018.3.27、ANA クラウンプラザホテル (金沢市)。
2. 前川正充: 尿中抱合型コレステロール代謝物の LC/ESI-MS/MS 分析による代謝異常疾患の診断マーカー探索、日本薬学会第 138 年会、2018.3.26、ANA クラウンプラザホテル (金沢市)。
3. 前川正充、山口浩明、眞野成康: コレステロール代謝物の疾患メタボロミクス、第 57 回日本臨床化学学会年次学術集会、2017.10.7、北海道大学学術交流会館 (札幌市)。
4. 前川正充: 質量分析技術を基盤とした医療薬学的研究展開、平成 29 年度日本薬学会東北支部第 16 回医療薬学若手研究者セミナー、2017.9.23、東北大学医学部 6 号館 (仙台市)。

5. 前川正充、山口浩明、眞野成康: 質量分析法を活用したニーマンピック病 C 型化学診断法の開発、日本薬学会第 137 年会、2017.3.27、東北大学川内北キャンパス (仙台市)。
6. 前川正充、山口浩明、眞野成康: フォーカスドメタボロミクスによるニーマンピック病 C 型の診断マーカー探索、第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会、2016.12.4、パレア熊本 (熊本市)。
7. 前川正充、山口浩明、眞野成康: ニーマンピック病 C 型の化学診断を目的とする尿中抱合型コレステロール代謝物の LC/ESI-MS/MS 分析、第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2016.9.2、京都大学桂キャンパス (京都市)。

一般講演

1. 前川正充、河俣圭太、庄子彩織、須賀隆浩、三枝大輔、小川祥二郎、東達也、山口浩明、眞野成康: コレステロール代謝物網羅的解析法の基礎的検討、第 37 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2017.11.30、東北大学環境科学研究科 (仙台市)。
2. 前川正充、河俣圭太、三枝大輔、小川祥二郎、東達也、山口浩明、眞野成康: 誘導体化 LC/ESI-MS/MS によるコレステロール代謝物の網羅的分析法に関する基礎的検討、第 28 回クロマトグラフィ科学会議、2017.11.16、京都大学吉田キャンパス (京都市)。
3. 前川正充、神納勇、成田綾、山口浩明、眞野成康: 5 種の尿中抱合型代謝物をマルチバイオマーカーとして用いるニーマンピック病 C 型の化学診断法の開発、第 59 回日本先天代謝異常学会総会、2017.10.12、ウエスタ川越 (川越市)。
4. 前川正充、神納勇、成田綾、山口浩明、眞野成康: 5 種の硫酸抱合型コレステロール代謝物同時定量法の構築とニーマンピック病 C 型化学診断への有用性評価、第 57 回日本臨床化学学会年次学術集会、2017.10.7、北海道大学学術交流会館 (札幌市)。
5. 神納勇、前川正充、飯田隆、成田綾、山口浩明、眞野成康: ニーマンピック病 C 型患者に特徴的な尿中抱合型異常代謝物の LC/ESI-MS/MS 分析法の構築、第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2017.8.29、東京大学大学院薬学系研究科 (東京都)。
6. 前川正充、河俣圭太、三枝大輔、小川祥二郎、東達也、山口浩明、眞野成康: 誘導体化 LC/ESI-MS/MS を用いるコレステロール代謝物の網羅的分析法の検討、第 28 回日本臨床化学学会東北支部総会、2017.7.29、秋田大学本道会館 (秋田市)。
7. 神納勇、前川正充、飯田隆、成田綾、山口浩明、眞野成康: ニーマンピック病

C型患者に特徴的な尿中抱合型異常代謝物のLC/ESI-MS/MS分析法の構築、第24回クロマトグラフィースンポジウム、2017.6.16、星陵オーデトリウム(仙台市)。

8. 河俣圭太、前川正充、三枝大輔、小川祥二郎、東達也、山口浩明、眞野成康: 誘導体化LC/ESI-MS/MSを用いるコレステロール代謝物の網羅的分析系の構築、日本薬学会第137年会、2017.3.27、仙台国際センター(仙台市)。
9. 前川正充、大村薫、飯田隆、成田綾、山口浩明、眞野成康: 尿中抱合型異常胆汁酸のLC/ESI-MS/MS分析によるニーマンピック病C型化学診断の試み、第64回質量分析総合討論会、2016.5.19、ホテル阪急エキスポパーク(大阪市)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 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 0 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

前川 正充 (MAEKAWA, Masamitsu)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：70572882

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

成田 綾 (NARITA, Aya)

真嶋 隆一 (Mashima, Ryuichi)