

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09001

研究課題名(和文)新規動脈硬化診断指標：LC-MS/MSイソプロスタン分析法の臨床的意義の確立

研究課題名(英文) Novel biomarker for atherosclerosis: clinical significance of isoprostanes analyzed by LC-MS/MS

研究代表者

瀬川 波子 (Segawa, Namiko)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：80352251

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)：酸化ストレスは、動脈硬化、アルツハイマー型認知症などを含む多くの疾患と関連している。尿中8-イソプロスタン(8-iso-PGF<sub>2</sub>)は、生体内酸化ストレスのマーカーとして確立されている。しかし、活性酸素種(ROS)の作用により、多価不飽和脂肪酸アラキドン酸から、様々な8-イソプロスタン異性体が産生されるが、その意義は不明である。動脈硬化の診断指標を探るために、動脈硬化と8-イソプロスタン異性体との関係を主成分分析(PCA)などの多変量解析法により検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスは、動脈硬化、アルツハイマー型認知症などを含む多くの疾患と関連する。体内において不飽和脂肪酸が非酵素的に酸化され、産生された過酸化脂質産物のうち、尿中8-イソプロスタンが非侵襲的酸化ストレスのマーカーとして確立されている。しかし、尿中8-イソプロスタンの濃度が低いことが分析を困難にしている。多変量解析手法を用い、網羅的イソプロスタン解析をすることにより、より測定精度の高い疾患マーカーの確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is linked with many diseases including atherosclerosis and Alzheimer disease. Urine 8-isoprostaglandin F<sub>2</sub> (8-iso-PGF<sub>2</sub>) was established as a biomarker of oxidative stress. However, reactive oxygen species (ROS) affects the polyunsaturated fatty acid (PUFA) arachidonic acid to produce many isoforms of 8-iso-PGF<sub>2</sub>, the biological significance of which is unclear. To explore the diagnosis marker of atherosclerosis, the relation between atherosclerosis and 8-iso-PGF<sub>2</sub> isoforms was examined using multivariate data analysis methods including principal component analysis (PCA).

研究分野：リポ蛋白質分析、統計データ解析

キーワード：動脈硬化 リポ蛋白質 過酸化脂質 不飽和脂肪酸 酸化ストレス 尿中イソプロスタン LC-MS/MS  
多次元固相抽出

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、動脈硬化、パーキンソン病、アルツハイマー型認知症などを含む多くの疾患と関連している。活性酸素種 (ROS) の過剰生成により、多価不飽和脂肪酸アラキドン酸から、様々な過酸化脂質 (F<sub>2</sub>-イソプロスタン) が産生され、尿中に排泄される。それらのうち、尿中 8-イソプロスタン (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) は、生体内酸化ストレスのマーカーとして確立されている。一方、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) という酵素の作用によりプロスタグランジン F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) が産生されるが、8-イソプロスタンは、PGF<sub>2α</sub> の立体異性体で、F<sub>2</sub>-イソプロスタンに含まれる。

F<sub>2</sub>-イソプロスタンは、立体構造によりいくつかのグループに分類される。8-イソプロスタンは、グループ III に分類される。グループ VI F<sub>2</sub>-イソプロスタンに分類される iPF<sub>2α</sub>-VI の尿中濃度は、8-イソプロスタンより高いことが以前の研究により分かっている<sup>1</sup>。しかし、8-イソプロスタンとの関係及び酸化ストレスが原因とされる疾患との関連は明らかでない。

尿中 8-イソプロスタンの代謝物は、腎臓で生成されないために、尿中 8-イソプロスタンより敏感な脂質過酸化のマーカーである可能性が示唆されている。

従って、F<sub>2</sub>-イソプロスタンの中には、8-イソプロスタンより高い精度で測定できる疾患マーカーが存在する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

新しい動脈硬化の診断指標を確立するために、グループ III F<sub>2</sub> イソプロスタン、グループ VI F<sub>2</sub> イソプロスタン及び F<sub>2</sub> イソプロスタン代謝物の関係、および尿中 F<sub>2</sub>-イソプロスタンと動脈硬化の関連を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿中イソプロスタンの分析

尿中イソプロスタンは、以前開発した多次元固相抽出 (MD-SPE) 液体クロマトグラフィー (LC)-タンデム質量分析 (MS/MS) 分析法にて測定した。クロマトグラフィーの解析は、MassLynx V4.1 を用いた。

### (2) データ解析

データの解析は、SAS (Statistical Analysis System) を用いて行った。尿中 F<sub>2</sub> イソプロスタンの関係は、Spearman correlation 及びクラスター分析にて検討した。Heatmap は、R3.6.1 (Comprehensive R Archive Network) を用いて作成した。主成分分析 (PCA) 及び偏最小二乗回帰 (PLS, Partial Least Squares Regression) などの多変量解析は、Simca 14 を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 尿中 F<sub>2</sub> イソプロスタンと動脈硬化の関係

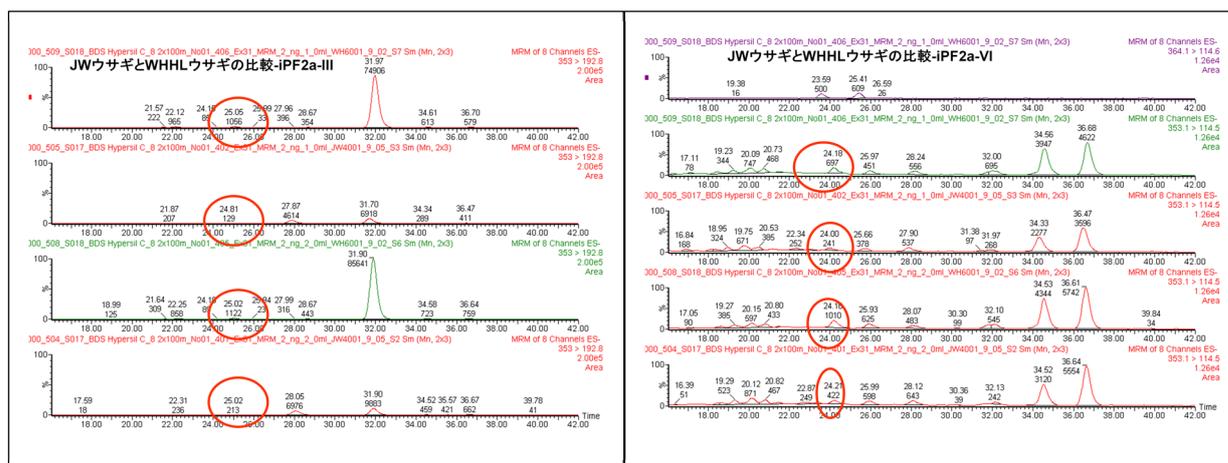


図 1. 正常 JW ウサギと高コレステロール血症と粥状動脈硬化を自然発症する家族性高コレステロール血症の動物モデル WHHL におけるグループ III F<sub>2</sub> イソプロスタン (左図) 及びグループ VI F<sub>2</sub> イソプロスタン (右図) の比較

図 1 に、動物モデルとして正常ウサギと高コレステロール血症と粥状動脈硬化を自然発症する WHHL ウサギにおける、尿中 F<sub>2</sub> イソプロスタンの LC-MS/MS によるクロマトグラフィーを示す。WHHL ウサギでは、グループ III F<sub>2</sub> イソプロスタンとグループ VI F<sub>2</sub> イソプロスタンともに、著明に増加した。この結果から、尿中 8-イソプロスタン及びその異性体は酸化ストレスの

増大を反映し、動脈硬化と関連することを示した。また、WHHL ウサギにおいて、プロスタグランジン  $F_2\alpha$  の増加が特に著しい。これは、炎症も動脈硬化と関連することを支持する結果である。

## (2) 多変量解析による尿中 $F_2$ イソプロスタンの関係

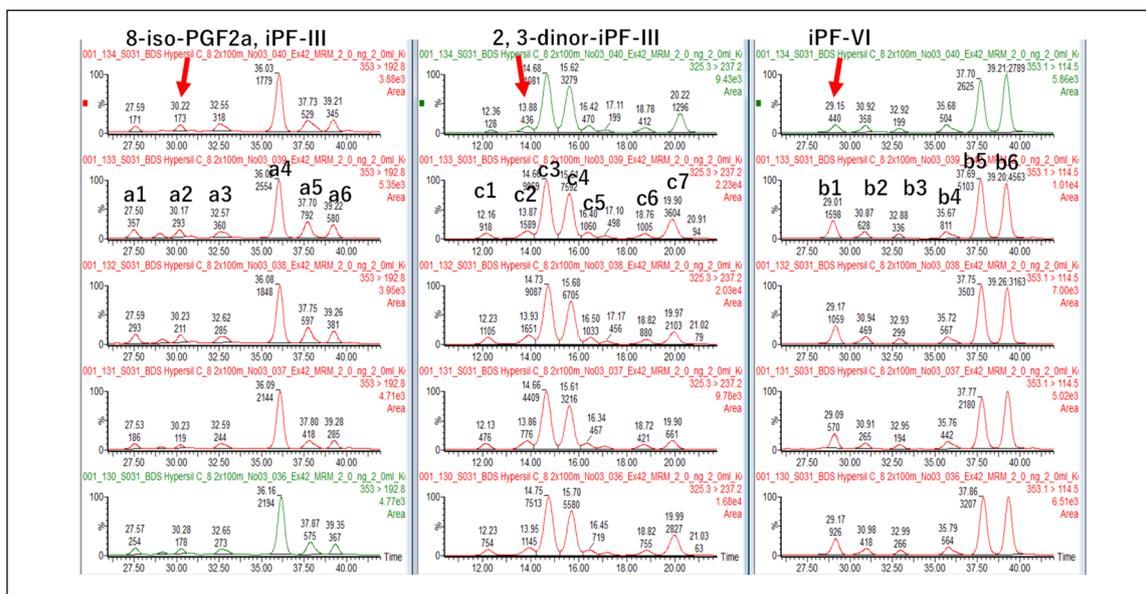


図 2. 経皮的冠動脈インターベンション前後、尿中  $F_2$  イソプロスタンの経時的変化。左図：グループ III  $F_2$  イソプロスタン、中図：グループ III  $F_2$  イソプロスタンの代謝物、右図：グループ VI  $F_2$  イソプロスタン

図 2 に経皮的冠動脈インターベンション前後、尿中  $F_2$  イソプロスタンの経時的変化を示す。グループ III  $F_2$  イソプロスタンは、6 つの異性体 (a1 - a6)、グループ VI  $F_2$  イソプロスタンは、6 つの異性体 (b1 - b6)、グループ III  $F_2$  イソプロスタンの代謝物は、7 つの異性体 (c1 - c7) を分離された。図 2 に示すように、 $F_2$  イソプロスタン異性体の濃度は、大きく異なる。PGF $2\alpha$  (a4) の産生量は、8-iso-PGF $2\alpha$  (a2) の約 10 であった。グループ VI  $F_2$  イソプロスタンのうち、b5, b6 の産生量が多かった。 $F_2$  イソプロスタンの代謝物のうち、c3, c4 の産生量が多かった。

図 3 に 19 個の  $F_2$  イソプロスタン異性体の相関関係を解析した結果を示す。8-iso-PGF $2\alpha$  (a2) は、グループ VI  $F_2$  イソプロスタンの 6 つの異性体と強く相関した。また、8-iso-PGF $2\alpha$  (a2) は、その代謝物 (c5) と強く相関した。PGF $2\alpha$  (a4) は、ほとんどの  $F_2$  イソプロスタンと負に相関した。同じような結果は、主成分分析によりも得られた (図 4)。特に、産生量の多いグループ VI  $F_2$  イソプロスタン b5, b6 ( $_{2_5, 2_6}$ ) は、産生量の多いグループ III  $F_2$  イソプロスタンの代謝物 c3, c4 ( $_{3_3, 3_4}$ ) と強く相関した。

図 5 に、8-iso-PGF $2\alpha$  を Y 変量とし、他の  $F_2$  イソプロスタンを X 変量として、X と Y の関係を PLS により検討した結果を示す。8-iso-PGF $2\alpha$  異性体の産生量は、8-iso-PGF $2\alpha$  とともに変化することが分かった。特に、8-iso-PGF $2\alpha$  の変化と一致するのが、b5, b6 ( $_{2_5, 2_6}$ ) と c3, c4 ( $_{3_3, 3_4}$ ) であった。

(3) 以上の解析結果により、 $F_2$  イソプロスタンは、動脈硬化と関連し、産生量の多い 8-イソプロスタン異性体は、8-イソプロスタンと同じように変動するために、新しい酸化ストレスマーカーであると考えられる。

### <引用文献>

1. Zhang B and Saku K. Control of matrix effects in the analysis of urinary  $F_2$ -isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. *J Lipid Res.* 2007;48:733-44.

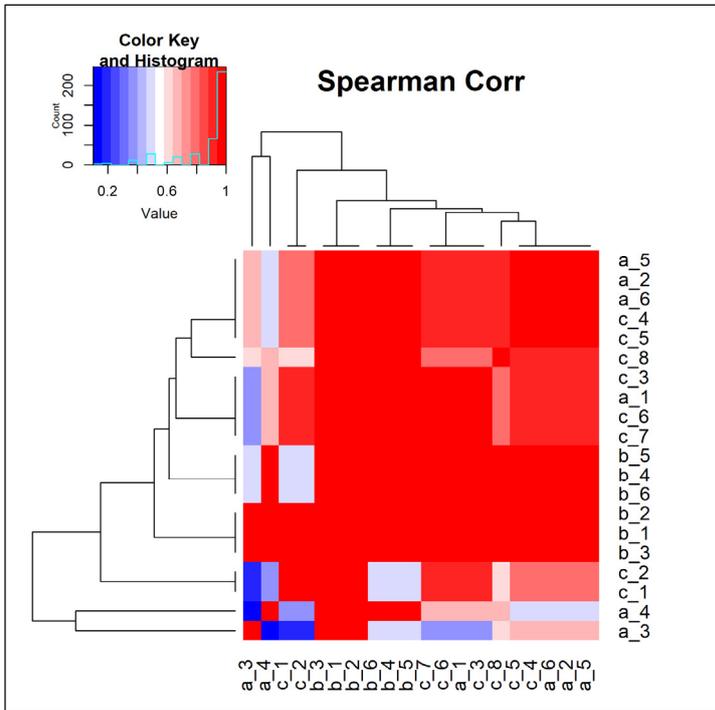


図3. クラスタ分析による19個のF<sub>2</sub>イソプロスタン異性体の相関関係

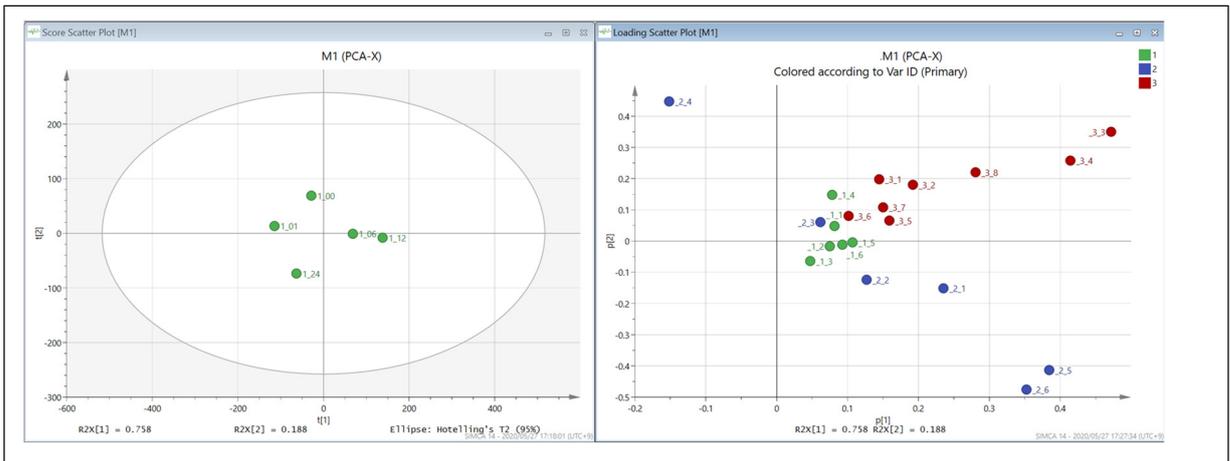


図4. 主成分分析によるF<sub>2</sub>イソプロスタン異性体の関係

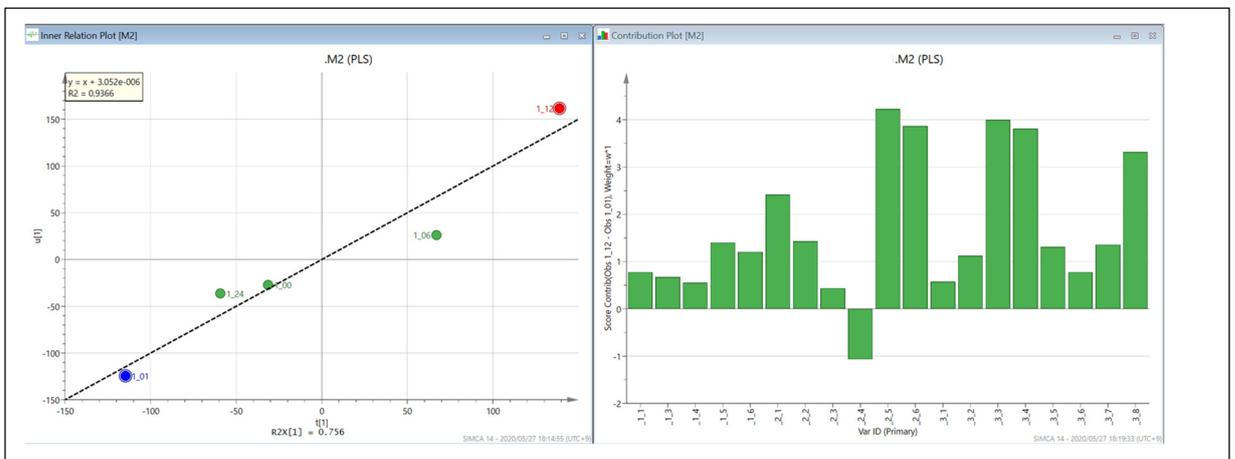


図5. PLSによる8-iso-PGF<sub>2α</sub>とF<sub>2</sub>イソプロスタン異性体の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Andraski Allison B., Singh Sasha A., Lee Lang Ho, Higashi Hideyuki, Smith Nathaniel, Zhang Bo, Aikawa Masanori, Sacks Frank M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of Replacing Dietary Monounsaturated Fat With Carbohydrate on HDL (High-Density Lipoprotein) Protein Metabolism and Proteome Composition in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2411～2430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.119.312889	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 該当する
1. 著者名 Kumagai Koichiro, Toyama Hideko, Zhang Bo	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of additional ablation of low voltage areas after Box isolation for persistent atrial fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Arrhythmia	6. 最初と最後の頁 197～204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/joa3.12169	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 Li Ming, Hirano Ken-ichi, Ikeda Yoshihiko, Higashi Masahiro, Hashimoto Chikako, Zhang Bo et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy: a rare cardiovascular disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-019-1087-4	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 Liu Gang, Zhang Bo, Hu Yang, Rood Jennifer, Liang Liming, Qi Lu, Bray George A., DeJonge Lillian, Coull Brent, Grandjean Philippe, Furtado Jeremy D., Sun Qi	4. 巻 19
2. 論文標題 Associations of Perfluoroalkyl substances with blood lipids and Apolipoproteins in lipoprotein subspecies: the POUNDS-lost study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Health	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12940-020-0561-8	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 該当する

1. 著者名 Suematsu Yasunori, Zhang Bo, Kuwano Takashi, Sako Hideto, Ogawa Masahiro, Yonemoto Naohiro, Nonogi Hiroshi, Kimura Takeshi, Nagao Ken, Yasunaga Shin' ichiro, Saku Keijiro, Miura Shin-ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Citizen bystander?patient relationship and 1-month outcomes after out-of-hospital cardiac arrest of cardiac origin from the All-Japan Utstein Registry: a prospective, nationwide, population-based, observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e024715 ~ e024715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2018-024715	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 Wang Yi-Xin, Wu Yan, Chen Heng-Gui, Duan Peng, Wang Liang, Shen He-Qing, Lu Wen-Qing, Sun Bin, Wang Qi, Zhang Bo, Chavarro Jorge E., Zhang Jie, Pan An	4. 巻 129
2. 論文標題 Seminal plasma metabolome in relation to semen quality and urinary phthalate metabolites among Chinese adult men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environment International	6. 最初と最後の頁 354 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envint.2019.05.043	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 該当する

1. 著者名 Yano Megumi, Matsunaga Akira, Harada Sadako, Zhang Bo, Kawachi Emi, Tadera Mikiko, Saku Keijiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Comparison of Two Homogeneous LDL-Cholesterol Assays Using Fresh Hypertriglyceridemic Serum and Quantitative Ultracentrifugation Fractions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 979 ~ 988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.47191	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 Shiiba M, Zhang B, Miura SI, Ike A, Nose D, Kuwano T, Imaizumi S, Sugihara M, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Shirai K, Yasunaga S, Saku K	4. 巻 33
2. 論文標題 Association between discordance of LDL-C and non-HDL-C and clinical outcomes in patients with stent implantation: from the FU-Registr	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 102 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-017-1036-x	査読の有無 有
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 Kato Y, Iwata A, Futami M, Yamashita M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K, Miura SI	4. 巻 97
2. 論文標題 Impact of von Willebrand factor on coronary plaque burden in coronary artery disease patients treated with statins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e0589 ~ e0589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000010589	査読の有無 有
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 Matsuoka Y, Ike A, Ogawa M, Gondo K, Shirai K, Sugihara M, Nose D, Nishikawa H, Iwata A, Kawamura A, Mori K, Zhang B, Yasunaga S, Miura SI, Saku K	4. 巻 71
2. 論文標題 Sex difference between target levels of cholesterol-related parameters and post-PCI long-term clinical outcomes: From the FU-Registry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2017.09.011	査読の有無 有
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 Yamashita M, Iwata A, Kato Y, Futami M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K, Miura SI	4. 巻 33
2. 論文標題 Impact of the triglyceride level on coronary plaque components in female patients with coronary artery disease treated with statins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 1175 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1173-x	査読の有無 有
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 Suzuki A, Yamaguchi S, Li M, Hara Y, Miyauchi H, Ikeda Y, Zhang B, Higashi M, Ikeda Y, Takagi A, Nagasaka H, Kobayashi K, Magata Y, Aoyama T, Hirano KI	4. 巻 67
2. 論文標題 Tricaprin Rescues Myocardial Abnormality in a Mouse Model of Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 983 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess18037	査読の有無 有
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 Yuta Kato, Atsushi Iwata, Bo Zhang, Shin-ichiro Miura, Satoshi Imaizumi, Takashi Kuwano, Amane Ike, Makoto Sugihara, Hiroaki Nishikawa, Shin'ichiro Yasunaga, Keiji Saku	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin on coronary atherosclerosis as assessed by intravascular ultrasound in type 2 diabetes mellitus with coronary artery disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 IJC Metabolic & Endocrine	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcme.2017.06.005	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 Gondo, K., Ike, A., Ogawa, M., Shirai, K., Sugihara, M., Nishikawa, H., Iwata, A., Kawamura, A., Mori, K., Zhang, B., Miura, S., Yasunaga, S., Saku, K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Is a bare-metal stent still useful for improving the outcome of percutaneous coronary intervention? From the FU-Registry	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cardiol	6. 最初と最後の頁 652-659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2016.06.009	査読の有無 有
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 Idemoto, Y., Miura, S. I., Norimatsu, K., Suematsu, Y., Hitaka, Y., Shiga, Y., Morii, J., Imaizumi, S., Kuwano, T., Iwata, A., Zhang, B., Ogawa, M., Saku, K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Evaluation of the antithrombotic abilities of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants using the Total Thrombus-formation Analysis System((R))	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 309-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-016-0864-4	査読の有無 有
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 Yamasaki Y, Uemura O, Nagai T, Yamakawa S, Hibi Y, Yamamoto M, Nakano M, Kasahara K, Bo Zhang.	4. 巻 59
2. 論文標題 Pitfalls of diagnosing urinary tract infection in infants and young children	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 786-792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13292	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Zhang B
2. 発表標題 Unsaturated Fat Replacing Carbohydrate or Protein Affects Protein-based HDL Subspecies of Different Functionality
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session, EPI/Lifestyle 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bo Zhang , Satoshi Yamaguchi , Ken-ichi Hirano
2. 発表標題 Effects of CNT-01 on the Composition of Lipids in Lipoproteins Produced from the Small Intestine in Mice
3. 学会等名 中性脂肪学会第1回学術集会
4. 発表年 2019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	安永 晋一郎  (Yasunaga Shin'ichiro)  (50336111)	福岡大学・医学部・教授    (37111)	
研究分担者	朔 啓二郎  (Saku Keijiro)  (40183371)	福岡大学・医学部・教授    (37111)	
研究分担者	三浦 伸一郎  (Miura Shinichiro)  (20343709)	福岡大学・医学部・教授    (37111)	

## 6. 研究組織 (つづき)

	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	ウォータース ブライアン (Waters Brian) (00609480)	福岡大学・医学部・助教  (37111)	
研究分担者	今泉 聡 (Imaizumi Satoshi) (60609478)	福岡大学・医学部・准教授  (37111)	
研究分担者	恵 淑萍 (Hui Shu-ping) (90337030)	北海道大学・保健学研究科・教授  (10101)	