

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19905

研究課題名(和文)突然死特有の「血液が固まらない」現象に着目した、分子病態解明への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to elucidate molecular pathology of sudden death by focusing on the unique phenomenon that "blood does not clot"

研究代表者

長野 一也 (Nagano, Kazuya)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40548301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、突然死特有の「血液が固まらない」現象に着目し、その関連因子であるプロスタノイド：PNの発現変動を理解するため、その律速であった一斉定量系の構築を試みた。PNの定量では、その血中安定性が低いため、安定な尿中代謝物に着目した。尿中代謝物を精製し、適切に定量するため、逆相とイオン交換カラムによる二段階固相抽出法を適用した結果、全ての代謝物を一斉に定量できた。そこで、有用性を検証するため、PNが関連するクローン病患者の尿を解析した。その結果、既存の報告通り、PGE2の代謝物量が健康者よりも有意に多いことが示され、本手法の実用性が示唆された。今後、突然死に適用し、その分子病態の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロスタノイド：PNは、生理機能を担っている一方で、その破綻は、病態の発症/悪化に関連することが知られている。特に、痛覚過敏では、PGE2とPGI2が相互に協調し合っている。そのため、生体内のPN変動を理解することが、突然死を始め、各種病態解明に繋がると期待される。しかし、PNは血中半減期が短いため、適切な定量は困難であった。

本研究では、上記課題を解決するため、二段階固相抽出法を応用し、独自の尿中PN代謝物一斉定量系を開発した。また、ヒト尿試料を用い、その実用性を示してきた。今後、突然死を始め、様々な疾患に本手法を応用することで、新たな分子病態の解明と、診断/治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a simultaneous quantification system for prostanoids (PNs) tried to be constructed, to understand the alternation of PN expression profiles which may be related to of the phenomenon "blood does not clot" unique to sudden death. In quantifying PNs, stable metabolites in urine were focused, because PNs were unstable in blood. By purification using a reverse phase column, the matrix effects against the final PGD2, PGE2, and PGF2 metabolites were low, and their accuracies were nearly 100%. In contrast, the matrix effects against the final PGI2 and TXA2 metabolites were high. By combining reverse phase and ion exchange columns, the matrix effects decreased so that the accuracy was nearly 100%. To validate the method, the urinary metabolites of Crohn's disease (CD) patients and healthy individuals were quantified. The data showed that final PGE2 metabolite levels were significantly higher in CD patients, so that the urinary metabolite profiles of CD patients is determined.

研究分野：動態学

キーワード：突然死 プロスタノイド

## 1. 研究開始当初の背景

突然死は、徴候が現れてから1時間以内の内因死として受け入れられている。この原因に関しては、その知見が乏しいこともあり、死因としてさえ一般的には認知されていないものの、専門家の指摘では、突然死による死亡者の推定数は、死因の上位にあたるほど多いと言われており（世界で350万人[3位の慢性閉塞性肺疾患以上]）、その克服は喫緊の課題である。

このような背景のもと、少ないながら進められている研究では、心臓や自律神経系の関与が指摘されているものの、突然死でよく言われる「昨日までは元気だったのに」「健康診断では異常値は何もなかったのに」という突然性や、遺体を解剖しても何の所見も認められない Negative Autopsy の割合が突然死に多い（日本では、突然死の解剖例の7割が Negative Autopsy）ことを考えると、突然死の理解のためには、これまで我々が用いてきた健康の科学的指標（血圧や心電図など）では不十分であり、別の切り口から解析する必要があると考えられる。

本観点から、突然死共通の「死んでもなお、血液が固まらない」というユニークな現象に着目し、血液凝固や線溶に関わる各種生理活性物質を指標として解析を試みることにした。血液凝固や線溶に関連する生理活性物質の中でも、プロスタグランジン (PG) D<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub> とトロンボキサン (TX) A<sub>2</sub> から成るプロスタノイド (PN) に関しては、その産生に必須の酵素群の競合基質となる ω-3 系脂肪酸やシクロオキシゲナーゼを阻害するアスピリンの摂取が、突然死発症率を有意に低減することが疫学的に報告されていることから、PN の変動を解析することによって、突然死関連マーカーの同定、診断法・予防法の確立を目指している。

ここで、PN の定量評価では、PN の安定性が低い（血中半減期が数十秒～数分）ことから、安定な尿中代謝物を解析することとした。また、尿中の代謝物を解析する利点として、安定性の観点のみならず、突然死に伴う腎機能の停止により、死亡後の影響を受けず、死亡前の状態が反映されやすいため、高確度な解析が可能となることが考えられる。さらに、PN を指標とした解析では、例えば血管系イベントでは、1) 頻脈の場合は PGF<sub>2α</sub> と TXA<sub>2</sub> が働き、2) 虚血再灌流障害の際には PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> の産生量が増加し作用を発揮するなど、PN が相互に協調しあって作用することが知られており、突然死を理解する際にも、各化合物単独ではなく、PN 全体の挙動を捉えることが重要である。しかし 2、PN の最終代謝物と考えられている tetranor-PGDM (PGDM) , tetranor-PGEM (PGEM) , tetranor-PGFM (PGFM) , 2,3-dinor-6-keto PGF<sub>1α</sub> (DKPGF1α) , 2,3-dinor TXB<sub>2</sub> (DTXB2) は、その化学的性質により、全化合物の同時定量は未だ実現されていない。例えば、PGDM と PGEM は水酸基とカルボニル基の位置が入れ替わっただけの位置異性体であり、同一の分子量と類似の化学的性質により、これらの分離が困難である。その一方で、PGDM と DTXB2 は化学的性質が異なるものの、逆に、同一条件での測定が困難であり、これら定量系が、PN 全体の発現プロファイルを理解するにあたっての律速となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では突然死の理解に向け、尿の前処理や解析手法を最適化することで、尿中の PN 最終代謝物の一斉定量法を確立し、その有用性を評価した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 試薬類・ヒト尿試料・機器

尿中の PN 最終代謝物 (PGDM, PGEM, PGFM, DKPGF1α, DTXB2) と内部標準 (IS) として用いた重水素化合物 (PGDM-d<sub>6</sub>, PGEM-d<sub>6</sub>, DKPGF1α-d<sub>6</sub>, DTXB2-d<sub>6</sub>)、各種 PN (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) は Cayman Chemical Co. より購入した。固相抽出カラム Phenomenex STRATA C18-E は Phenomenex より購入し、InertSep MA-2 はジーエルサイエンスより購入した。尿の前処理や LC-MS/MS による測定に関連するそれ以外の試薬や溶媒は全て LC-MS 規格に適合するものを使用した。健常者尿試料は Lee Biosolutions Co. より購入した。患者の尿試料は BioIVT Co. より購入した。LC-MS/MS は Waters Acquity UPLC (Waters; Milford, MA) と Waters Quattro Premier XE (Waters) が連結した装置を使用した。

### 3-2. 固相抽出法のバリデーション

#### 1) 溶出溶媒条件の検討

逆相カラム：水および対象マトリクスである尿 1.0 mL に標品を添加して調製した試料溶液を、コンディショニング後の固相抽出カラムにアプライし、洗浄後、10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%の濃度に調製したメタノール/水溶液を低メタノール濃度から 1.0 mL ずつ添加し、溶出された各画分の標的分子回収率を LC-MS/MS により解析した。

イオン交換カラム：水および対象マトリクスである尿 1.0 mL に標品を添加して調製した試料溶液を、コンディショニング後の固相抽出カラムにアプライし、洗浄後、ギ酸濃度 0.1%, 0.3%, 1.0%, 3.0%, 10%に調製したメタノール溶液を低ギ酸濃度から 1.0 mL ずつ添加し、溶出された各画分の標的分子回収率を LC-MS/MS により解析した。

2) マトリクス効果の評価：右の式で算出した。 マトリクス効果 (%) =  $(1 - B/A) \times 100$

A は抽出溶媒と同一組成に調製した溶媒に標品か、標品の重水素化体を添加して LC-MS/MS で測定した際のピークエリア、B は尿を固相抽出した後の抽出溶媒に標品か、標品の重水素化体を添加して LC-MS/MS で測定した際のピークエリアを示す。マトリクス効果 (%) が 0 以上の場合、イオン化サプレッション、0 以下の場合、イオン化エンハンスメントが生じていることを示す。

3) 固相抽出回収率の評価：右の式で算出した。 回収率 (%) =  $C/B \times 100$

B は尿を固相抽出した後の抽出溶媒に標品もしくは標品の重水素化体を添加して LC-MS/MS で測定した際のピークエリア、C は標品もしくは標品の重水素化体を尿に添加して固相抽出した後の抽出溶媒を LC-MS/MS で測定した際のピークエリアを示す。

### 3-3. 尿試料の前処理

尿 1.0 mL に、0.1%ギ酸水 2.0 mL (Sigma-Aldrich Corporation) と IS (PGDM- $d_6$ , PGEM- $d_6$ , DKPGF1  $\alpha$ - $d_6$ , DTXB2- $d_6$ ) を加えて調製した試料溶液を、固相抽出カラム (Phenomenex STRATA C18-E (Phenomenex)) に添加した。添加後、40%メタノール水溶液 1.0 mL で PGDM, PGEM, PGFM を抽出し、70%メタノール水溶液 1.0 mL で DKPGF1  $\alpha$  と DTXB2 を抽出した。70%メタノール抽出画分については、続いてイオン交換カラム; InertSep MA-2 250 mg/6 mL (GL Science) で精製した。

### 3-4. 血中プロスタノイドと尿中最終代謝物の相関評価

市販の PN のうちヒトと最終代謝物の共通する PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (Cayman Chemical Co.) をエタノールで 1 mg/mL に調製後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で各投与濃度 (5, 10, 20  $\mu$ g/mL) に希釈して投与液を作製した。調製液を、ICR マウス (♂) 7 週齢 (日本エスエルシー) に尾静脈より投与した (50  $\mu$ g/kg, 100  $\mu$ g/kg, 200  $\mu$ g/kg; 各濃度 n = 3)。投与後すぐにマウスを代謝ケージへ入れ、投与 12 時間後の蓄尿を採取した。採取した尿に IS を添加後、前処理し、LC-MS/MS により最終代謝物量を測定した。なお、尿の濃さによる最終代謝物濃度の個体差を小さくするため、最終代謝物濃度は尿中クレアチニン濃度により補正した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 標的とする PN 最終代謝物の分離測定条件の構築

尿中プロスタノイド最終代謝物を Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) により、一斉に評価するためには、5 種類の最終代謝物を分離して測定する必要がある。そこで本項ではまず、標品を用いて分離定量条件の構築を試みた。ここで、5 種類の最終代謝物の中でも、特に PGDM と PGEM は五員環上の水酸基とカルボニル基が入れ替わっただけの位置異性体であり、これらの分離が課題であった。

PGDM と PGEM は位置異性体であるため、 $m/z$  は同値であり、MS/MS での分離は困難であったため (実験方法参照)、HPLC の移動相組成を連続的に変化させながら溶出させることで分離を試みた。検討したほとんどの条件で、ピークが重なり、分離定量ができなかったものの、PGDM と PGEM が溶出されるまで徐々に有機溶媒濃度を上昇させることで、PGDM と PGEM を別々のピークとし

て検出・定量することを可能とした。また、PGFM, DKPGF1 $\alpha$ , DTXB2 についても高い定量性で解析できることを確認しており、標的とする全ての最終代謝物の分離定量条件を確立した。

#### 4-2. 尿の前処理方法の初期検討

尿中プロスタノイド最終代謝物を LC-MS/MS を用いて、一斉に評価するためには、5 種類の最終代謝物の分離測定に加えて、一連の操作で尿中から最終代謝物を安定した回収率で精製する必要がある。ここで、LC-MS/MS による分析においては、試料を MS でイオン化する必要があるものの、尿のように夾雑物が多い試料では、夾雑物によりイオン化される分子が増えて、ピークエリアが増幅する場合（イオン化エンハンスメント）や、逆にイオン化が阻害されてピークエリアが減少する場合（イオン化サプレッション）がある。この現象はマトリクス効果と呼ばれ、マトリクス効果が生じると正確な定量評価が困難となる。そのため、尿中から標的とする分子を正確に定量するには、マトリクス効果に影響する尿中夾雑物を除去し、標的とする分子を安定した回収率で精製する必要がある。そこで、本検討では尿中の最終代謝物を精製するため、固相抽出（SPE）による前処理を試みることにした。

固相抽出は、目的分子と夾雑物のカラムに対する吸着力の差を利用して、試料を精製する手法であり、手順は4つのステップ（1. 固相カラムのコンディショニング、2. 試料のアプライ、3. 夾雑物の洗浄、4. 標的分子の抽出）から構成される。このうち、特に、夾雑物の洗浄と標的分子の抽出のステップでは、最適な溶媒を選択することで、より精製度を高めることができる。例えば、疎水性のカラムを用いる場合には、有機溶媒濃度をできる限り高くして洗浄することで、より多くの夾雑物を洗い流すことができる。

そこでまずは、最適な洗浄溶媒と抽出溶媒のスクリーニングを試みた。水に標品を添加し、組成の異なるメタノール/水混合溶媒（0~100%まで10%刻みで調製）で溶出し、LC-MS/MSにより定量した。なお、固相カラムには、標的となる最終代謝物の化学的特徴を考慮し、C18 カラムを選択した。その結果、PGDM, PGEM, PGFM については30%メタノールで溶出が始まり、およそ40%で溶出しきることが観察された。また、DKPGF1 $\alpha$  と DTXB2 では、60%メタノールで溶出が始まり、70%メタノールで溶出しきることが明らかとなった。この結果から、20%メタノールで夾雑物を洗浄することとした。また、5つの最終代謝物を二つのグループに分け、PGDM, PGEM, PGFM については、40%メタノールで抽出し、DKPGF1 $\alpha$  と DTXB2 については、70%メタノールで抽出することとした。

そこで次に、上記の条件で溶出した際のマトリクス効果を評価すべく、尿成分を含まない溶媒中で検出される標品のピークエリアに対して、尿を固相抽出したあとの抽出液中で検出される標品のピークエリアの割合を算出した（正の値はイオン化サプレッション、負の値はイオン化エンハンスメントを示す）。その結果、いずれの最終代謝物についてもマトリクス効果が認められたものの、PGDM, PGEM, PGFM ではそれぞれ12%、-13%、23%であり、ISを用いる事で補正が可能と考えられた。そこで、PGDM, PGEM, PGFM については、ISを同時に添加し、それぞれの回収率を評価した。その結果、固相抽出による最終代謝物の損失は少なく、ISにより補正することで、100%近い回収率を達成した。その一方で、DKPGF1 $\alpha$  と DTXB2 のマトリクス効果を評価したところ、ほぼ100%イオン化が抑制され、ISを用いても測定が困難なことが予想された。

#### 4-3. DKPGF1 $\alpha$ と DTXB2 の前処理の最適化

DKPGF1 $\alpha$  と DTXB2 を尿中から高い純度で精製するため、標的とする最終代謝物の化学的特性をふまえ、次にイオン交換カラムによる精製を検証した。

イオン交換カラムによる固相抽出では、標的分子とカラム充填剤のpKaに着目し、溶出溶媒のpHを調節することで、標的分子を精製する。そこで、溶出溶媒のpHをスクリーニングし、最適な溶出溶媒として1.0%ギ酸メタノールを選定したうえで、マトリクス効果を評価した。その結果、イオン交換カラムを用いた固相抽出でも、逆相カラムを用いた固相抽出と同様に、マトリクス効果は100%近い値を示し、さらなる検討が必要となった。

そこで、夾雑物をより少なくするために、別の原理のカラム（除去できる夾雑物の種類が異

なる)を組み合わせた二段階固相抽出法に着目した。まず、イオン交換カラムで精製した後に逆相カラムでも精製した場合には、各カラム単独の固相抽出で100%近かったマトリクス効果は、DKPGF1 $\alpha$ とDTXB2いずれも約45%にまで低下した。また、精製する順番を逆にして、逆相カラムで精製した後にイオン交換カラムでも精製した場合には、大きな変動は認められなかったものの、DKPGF1 $\alpha$ とDTXB2のマトリクス効果はそれぞれ約41%、約27%と若干改善された。そこで、逆相カラム→イオン交換カラムの順で精製した場合の回収率を評価した。その結果、2度の固相抽出によっても最終代謝物の損失は少なく、ISを用いることで、安定で良好な回収率でDKPGF1 $\alpha$ とDTXB2の精製が可能となった。

以上の検討から、1)尿をまず、逆相カラムで固相抽出することで、PGDM, PGEM, PGFMを精製し、2)抽出液をさらにイオン交換カラムで固相抽出することによって、DKPGF1 $\alpha$ , DTXB2の精製も可能となった。したがって、尿中のPN最終代謝物全てを一連の操作で精製し、一斉に評価する基盤技術を構築することができた。

#### 4-4. 尿中PN最終代謝物の新規一斉定量系の有用性評価

##### ～血中PNと尿中最終代謝物の相関評価～

臨床検体の測定に向け、本手法の有用性を評価すべく、実際に血中の各種PNが生体内で代謝され、尿中から検出できるかを評価した。

市販されているPNのうち、ヒトと最終代謝物が共通する3種類(PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> )をマウスの尾静脈から投与(50, 100, 200  $\mu$ g/kg)し、尿中の最終代謝物量を評価した。その結果、血中に投与したPNの最終代謝物はいずれも尿で検出され、生体内で代謝されたPNを尿中で検出できることが実証された。また、検出された最終代謝物量は、血中に投与したPN量依存的であった。したがって、尿中の最終代謝物量は、血中のPN量と相関することが示され、本手法を用いることで、生体内のPN量を尿中最終代謝物から評価できることが示唆された。

#### 4-5. 健常者とクローン病患者の尿中PN代謝物の定量を通じた本手法の実用性評価

構築した手法の実用性を検証するにあたり、クローン病に着目した。クローン病は、代表的な炎症性腸疾患の一つであり、小腸、大腸など、消化管のいたるところに慢性的な炎症をきたす疾患である。また、これまでに、トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)で誘発されるクローン病モデルラットの尿中PGEM(PGE<sub>2</sub>由来)レベルが上がるといった報告がなされている。したがって、実際に、ヒトのクローン病患者においても、PGE<sub>2</sub>を始めとするPN発現量に変動し、尿中PN代謝物のプロファイルが健常者と異なっていることが考えられた。そこで、健常者とクローン病患者の尿から、PN代謝物の網羅的な定量を試みた結果、健常者とクローン病それぞれ5例に対して、いずれの代謝物も全て定量できた。さらに、変動を解析すると、PGDM, PGFM, DKPGF1 $\alpha$ , DTXB2では、健常者とクローン病患者群で、有意な変動は認められなかったのに対し、PGEMについては、モデルラットでの先行研究と同様に、健常者に比較して、クローン病患者群で、有意に高値を示した。したがって、我々が最適化した定量系は、内在的な尿中PN代謝物をも一斉に定量が可能であり、疾患の発症・悪化に伴う変動も、検出しうることが示された。

#### 4-6. まとめ

本研究では、突然死の分子病態の解明を目指し、まず、尿中PN最終代謝物の一斉定量系の構築を試みた結果、独自の二段階固相抽出法を適用することで、全ての代謝物を一斉に定量できる系を開発した。そこで、その有用性を検証するため、PNが関連するクローン病患者の尿を解析した結果、既存の報告通り、PGE<sub>2</sub>の代謝物量が健常者よりも有意に多いことが示され、本手法の実用性が示唆された。今後、本手法を突然死に適用することで、その分子病態の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tian-qi Zhang, Hirotaka Kuroda, Kazuya Nagano, Soshi Terada, Jian-Qing Gao, Kazuo Harada, Kazumasa Hirata, Hirofumi Tsujino, Kazuma Higashisaka, Hiroshi Matsumoto, Yasuo Tsutsumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Development and evaluation of a simultaneous and efficient quantification strategy for final prostanoid metabolites in urine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids	6. 最初と最後の頁 102032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plefa.2019.102032.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張 天齊, 長野一也, 黒田博隆, 原田和生, 平田收正, 東阪和馬, 松本博志, 堤 康央
2. 発表標題 プロスタノイドの尿中最終代謝物同時定量法の確立とその評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zhang T., Nagano K., Kuroda H., Terada S., Harada K., Hirata K., Tsujino H., Higashisaka K., Matsumoto H., Tsutsumi Y.
2. 発表標題 Development and evaluation of a simultaneous quantification method for final metabolites of prostanoids in urine.
3. 学会等名 第12回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 天齊, 長野一也, 黒田博隆, 寺田壮志, 原田和生, 平田收正, 辻野博文, 東阪和馬, 松本博志, 堤 康央
2. 発表標題 プロスタノイドの尿中最終代謝物同時定量法の最適化と応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4. 張 天齊, 長野一也, 黒田博隆, 寺田壮志, 原田和生, 平田収正, 辻野博文, 東阪和馬, 松本博志, 堤 康央
2. 発表標題 乳がん遠隔転移症例における尿中プロスタノイド代謝物量の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	堤 康央  (Tsutsumi Yasuo)		
研究協力者	東阪 和馬  (Higashisaka Kazuma)		
研究協力者	辻野 博文  (Tsujino Hirofumi)		
研究協力者	松本 博志  (Matsumoto Hiroshi)		
研究協力者	有澤 光弘  (Arisawa Mitsuhiro)		

## 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
研究協力者	黒田 博隆  (Kuroda Hirotaka)		
研究協力者	張 天斎  (Zhang Tian-qi)		
研究協力者	寺田 壮志  (Terada Soshi)		