

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510223
 研究課題名 (和文) 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の疾患マーカーの同定, 化学合成と測定法の開発
 研究課題名 (英文) Chemical Synthesis and Highly Sensitive Analysis of Abnormal Δ^5 -Bile Acid Multi Conjugates Present in Patients with Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis.
 研究代表者
 飯田 隆 (IIDA TAKASHI)
 日本大学・文理学部・教授
 研究者番号 60060125

研究成果の概要：

本研究課題は先天性胆汁酸代謝異常症患者尿中に顕著かつ、特異的に排泄される 3β -hydroxy- Δ^5 構造をもつ多重抱合型胆汁酸を取り上げ、有機合成化学的手法を用いて標品の高効率な化学合成法を確立すると共に、液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC-MS) 法を駆使し、生体試料中に存在する 3β -hydroxy- Δ^5 胆汁酸多重抱合体を疾患マーカーとする高感度で信頼度の高い直接一斉分析法を確立する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,100,000	255,000	1,355,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	765,000	3,565,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体分子, PFIC 症, 二次異常代謝産物, ステロイド多重抱合体, LC-MS

1. 研究開始当初の背景

近年、乳幼児の原因不明な胆汁うっ滞の中に先天性胆汁酸代謝異常症が存在することが明らかにされつつあり、本邦においても報告される症例数が著増している。現在までに先天性胆汁酸異常症とされている疾病には、Zellweger's 症候群、脳髄黄色腫症 (CTX)、

3β -hydroxy- Δ^5 - C_{27} steroid dehydrogenase/isomerase (3β -HSD) 欠損症、 $3\text{-oxo-}\Delta^4\text{-steroid } 5\beta\text{-reductase}$ 欠損症、 $3\beta\text{-hydroxysteroid } \Delta^7\text{reductase}$ 欠損症、 $25\text{-hydroxylation pathway}$ 異常症、 $\text{cholesterol } 7\text{-hydroxylase}$ 欠損症、Dubin-Johnson 症候群、進行性家族性肝内胆汁う

つ滞症 (Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis; PFIC 症; 別名、Byler 病) が報告されている (J. Sjovall, *Lipids*, **39**, 703, 2004)。これら先天性胆汁酸代謝異常症はコレステロールから胆汁酸の生合成の各段階における酵素の先天的欠損や失活あるいは胆汁酸トランスポーター遺伝子異常に起因すると言われているものの、成因が明確でないものが多い。このうち、Zellweger's 症候群、CTX 症、 3β -HSD 欠損症については、尿中の非抱合型胆汁酸代謝異常成分、つまり二次代謝異常代謝産物を疾病マーカーとする確定診断法が先に確立され、臨床の場で有効に活用され患者の福音となっている。しかし、その他多くの先天性肝疾患については、マーカー分子が特定されおらず、早急に病態解析されなければならない焦燥な課題として残されている。

2. 研究の目的

進行性家族性肝内胆汁うつ滞症 (PFIC 症) などの先天性胆汁酸代謝異常症では、ステロイド生合成あるいは代謝の恒常性に重大な障害をきたし、尿中に特異な構造をもつ二次代謝異常成分である多重抱合型胆汁酸異常代謝産物が有意な量で常在し、疾病の進行と共に増加蓄積する。従って、それらが疾病の特異的診断マーカーになり得るものと期待されている。本研究課題では第一にこれら多重抱合型胆汁酸を取り上げ、先ず、先駆的な有機合成化学的手法を用いて異常胆汁酸代謝産物を化学合成し、生体内異常胆汁酸の構造決定、第二に液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC-MS) 法による高感度で信頼度の高い直接一斉分析法の確立、第三に健康者と肝疾患の異常代謝産物の体内動態

を比較精査して的確な診断指標を確定すると共に病態解析を行ない、疾病、ひいては確定診断法も早期発見に資することを目的とした。

3. 研究の方法

先ず、生体試料の LC-MS 分析から得られる情報から候補化合物の構造をいずれも 3β -hydroxy- Δ^5 構造をもつ一連の胆汁酸多重抱合体 (以下 3β -OH- Δ^5 胆汁酸, Fig. 1) であると推定し、これら高極性・高

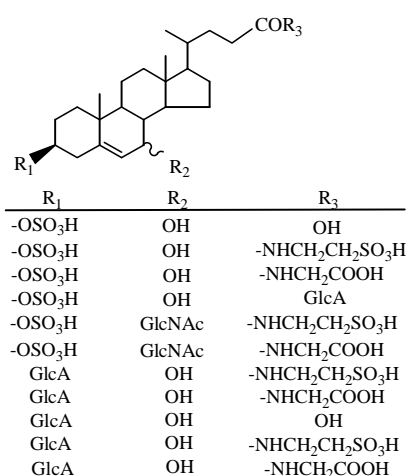


Fig. 1

分子量の抱合型胆汁酸成分の合成を計画した。このような構造の互いに酷似した 3β -OH- Δ^5 胆汁酸の合成には、原料のステロイド骨格 (あるいは側鎖) への位置並びに立体選択的な官能基 (特に水酸基) の効率的な導入法の確立がキーポイントになるものと考えられた。そこで先ず、 3β -OH- Δ^5 構造を基本骨格にもつコレステロールを用いて、各種ジオキシラン類による直接一段階遠隔水酸化反応について検討を加え、種々のオキシステロール抱合体の高効率合成法を確立することを企てた。次いで、その手法を用いて目的とする

3β-OH-Δ⁵胆汁酸を高効率に合成することを計画した。さらに、生体試料中の多重抱合体をLC-MS法で高精度・高感度に定量するには、適切な内部標準物質 (IS) が不可欠となることから、ISの分子設計並びにその合成についても計画した。以上のプロセスにて、一連の3β-OH-Δ⁵胆汁酸とIS標品を合成後、LC-MS分析の予備実験として、蒸発光散乱検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ELSD) によるプレリミナリーな分析条件を検討した。次いで、種々の生体試料 (尿, 血液, 胆汁など) からの多重抱合体胆汁酸群のイオン交換樹脂 (PHP-LH20 など) と固相抽出法による分画条件についても併せて検討を加えた。以上のプロセスを経て、最終的に極微量分析と構造解析能に大きな威力を発揮するLC-MS法による多重抱合型胆汁酸の信頼度の高い直接一斉プロファイル分析法を構築するという一連の研究計画を企てた。以下、その手法と成果を記す。

4. 研究成果

先ず、標的とする先天性胆汁酸代謝異常症患者尿中に存在が予測された一連の3β-OH-Δ⁵系異常胆汁酸多重抱合体の標品合成に取り組んだ。3β-OH-Δ⁵胆汁酸を効率的に合成するための手法の一環として、ステロイド分子中の不活性炭素を直接水酸化する最適方法について検討した。すなわち、コレスタン化合物 (5α-cholestan-3β-yl acetate) のその場発生ジオキシラン類による一段階遠隔水酸化反応について詳細な検討を加えた。その結果、コレスタン側鎖の

C-25位を直接酸化し、25-hydroxy-5α-cholestan-3β-acetateを高効率にて得る方法を見出した (Fig. 2)。

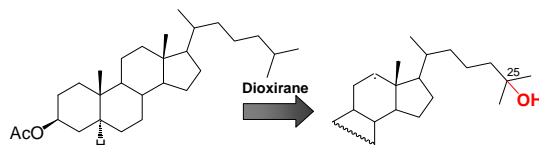


Fig. 2

さらに、3β-OH-Δ⁵構造を基本骨格にもつ、コレステロールに上記方法を適用し、オキシステロール類 (25-ヒドロキシコレステロール, 24-オキシコレステロール) の短段階合成を達成した (*Steroids*, **74**, 81-87 (2009)) (Fig. 3)。

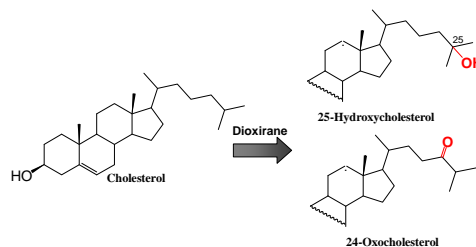


Fig. 3

ここで得られた知見を基に、次いで一連の異常胆汁酸多重抱合体の標品合成を行なった (*Steroid*, **71**, 18-29, (2006))。また、LC-ESI/MS法でターゲットとする3β-OH-Δ⁵胆汁酸を高感度に定量するには、適切な内部標準物質 (IS) が必須となる。そこで、IS候補として至適な化合物4種を分子設計し (Fig. 4)、これらの化学合成を行ない、合成したIS候補化合物、

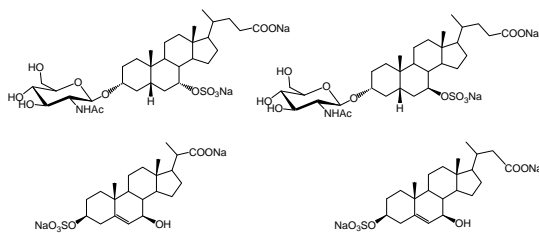


Fig. 4

と標的3β-OH-Δ⁵胆汁酸標品用いて、

HPLC-ELSD によるプレリミナリーな分析条件を検討し、至適 IS 化合物を特定した。その結果、 3β -sulfooxy- 7β -hydroxy- 24 -nor- 5β -cholanoic acid が IS として最適であることが判明した (*Steroids* 誌印刷中)。このようにして、一連の標品並びに IS の合成が終了したので、LC-ESI/MS 分析メソッドのバリデーションを行い、並行して種々の生体試料、すなわち各種脊椎動物胆汁、並びに尿中からの標的 3β -OH- Δ^5 胆汁酸の効率的な抽出条件にも検討を加えた。尚、本研究過程において、オーストラリア産有袋類、ウォンバット (*J. Lipid Res.* **48**, 2682-2692 (2007)) と南米産珍鳥、シギダチョウ (*J. Lipid Res.* **50**, 651-657 (2009)) から新規胆汁酸抱合体を、またメダカ胆汁からは魚類胆汁としては極めて稀な C_{27} 胆汁酸抱合体 (投稿準備中) を発見するに至った (Fig. 5)。

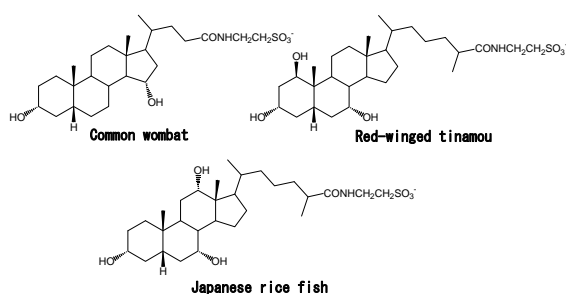


Fig. 5

健常人と肝障害を併発した先天性代謝異常症 (ニーマン・ピック病 C_1 型) の患者尿に検討を加えた結果、 $3\beta, 7\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid の 3-硫酸、7-*N*-アセチルグルコサミン、24-タウリン (またはグリシン) 抱合体 (Fig. 6)

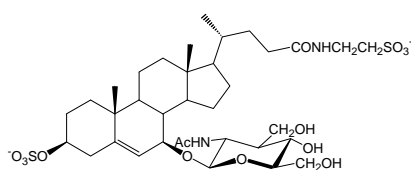


Fig. 6

が、疾患尿に極めて顕著かつ特異的な量で排泄されることが明らかとなった。現在、当該化合物が本先天性胆汁酸代謝異常症の特異的診断マーカー分子となるものと強く期待され、それらの高感度・高選択 LC-ESI/MS による定量法の開発を現在継続進行中である。本研究における成果は、以下の国際学術雑誌 4 件、国際学会発表 1 件、国内学会発表 17 件、特許 1 件に纏められている。

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 4 件)

以下、すべて査読あり

- ① Kakiyama G, Muto A, Iida T, Mano M, Goto J, Hofmann A.F. “Chemical Synthesis of 3β -Sulfooxy- 7β -hydroxy- 24 -nor- 5β -cholanoic Acid: An Internal Standard for Mass Spectrometric Analysis of the Abnormal Δ^5 -Bile Acids Occurring in Niemann-Pick disease, *Steroids* (in press).
- ② Hagey L.R, Kakiyama G, Muto A, Iida T, Mushiake K, Goto T, Mano N, Goto J, Oliveira C.A, Hofmann A.F. “Identification of a new C_{27} bile acid from Red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*): (25*R*)- $1\beta, 3\alpha, 7\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestan-27-oic acid” *J. Lipid Res.* **50**, 651-657 (2009).
- ③ Ogawa S, Kakiyama G, Muto A, Hosoda A, Mitamura K, Ikegawa S, Hofmann A.F., Iida T. “A Facile Synthesis of C -24 and C -25 Oxysterols by *in situ*

Generated Ethyl(trifluoromethyl) dioxirane” *Steroids* **74** 81-87 (2009).

- ④ Kakiyama G, Tamegai H, Iida T, Mitamura K, Ikegawa S, Goto T, Mano N, Goto J, Holz P, Hagey L. R, Hofmann A. F. “Isolation and Chemical Synthesis of a Major, Novel Biliary Bile Acid in the Common Wombat (*Vombatus ursinus*): 15 α -hydroxylithocholic acid” *J. Lipid Res.* **48**, 2682-2692 (2007).

[学会発表] (計 18 件)

- ①. 高野 重永、永沼 知里、小川 祥二郎、為我井 秀行、飯田 隆、若槻 康雄「抗菌フィルムをめざした機能性モノマーのROM重合」日本化学会第 89 春季年会・2009 年 3 月 27-30 日 (千葉)
- ②. 小川 祥二郎、飯田 隆、牧野 三津子、藤本 康雄、秋久俊博、安川憲、畠恵司、堀一之「未利用トリテルペンの有効利用を指向した金属ポルフィリン錯体/酸素供与体系による生理活性物質の創製と生物活性」日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 26-28 日 (京都)
- ③. 武藤 晃奈、柿山 玄太、Alan Hofmann、飯田 隆「ジオキシランによる遠隔酸素官能基化反応を鍵とした、コレステロールからオキシステロール類の短段階、高効率合成」日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 26-28 日 (京都)
- ④. 柿山玄太、武藤晃奈、眞野成康、後藤順一、Alan F. Hofmann、飯田隆「アカハネシギダチョウ胆汁から新規高級胆汁酸、1 β ,3 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholestan-27-oyl taurine, の単離と同定」日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 (京都)
- ⑤. 三田 村邦子、貴田 亜希子、吉岡 慎司、河本 里鶴、武藤 晃奈、柿山 玄太、飯田 隆、村井 毅、黒澤 隆夫、Hirotooshi Fude、Charles A. Strott、池川 繁男「LC/MS による硫酸抱合型オキシステロール高感度定量法の開発」日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 (京都)
- ⑥. 沖原 梨香、森 愛、長谷川 真紀、三田村 邦子、武藤 晃奈、柿山 玄太、飯田 隆、池川 繁男「A/B-trans構造を有するテトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの合成とESI-MSにおける挙動」日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 (京都)
- ⑦. 柿山 玄太、武藤 晃奈、眞野 成康、後藤 順一、Alan F. Hofmann、飯田 隆「アカハネシギダチョウ胆汁から新規高級胆汁酸の単離と同定」第 18 回 日本小児胆汁酸研究会 2009 年 2 月 (東京)
- ⑧. 柿山 玄太、武藤 晃奈、三田村 邦子、池川 繁男、Alan F. Hofmann、飯田 隆「*in situ* 発生ジオキシランの遠隔酸素官能基化反応を利用したオキシステロール類の短段階合成」第 30 回 胆汁酸研究会 2008 年 10 月 18 日 (広島)
- ⑨. 小川 祥二郎、高野 重永、若槻 康雄、飯田 隆「生理活性ステロイドを化学結合させた新規機能性高分子重合体の創製」第 30 回胆汁酸研究会 2008 年 10 月 18 日 (広島)
- ⑩. 沖原 梨香、長谷川 真紀、三田村 邦子、柿山 玄太、飯田 隆、清水 力、池川 繁男「LC/ESI-MSⁿによる尿中硫酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの直接一斉分析」第 48 回 日本臨床化学会年次学術集会 2008 年 8 月 29 日~31 日 (静岡)

- ⑪. Kakiyama G, Iida T, Muto A, Mano N, Goto J, Hagey L. R, Hofmann A. F. “Isolation, Identification, and chemical synthesis of novel bile acids in vertebrates” *Falk Symposia 2008 ; Bile Acids and Cholesterol Metabolism and its Therapeutical Implications (XVIII International Bile Acid Meeting)*, June 18-19th, 2008 (Amsterdam, The Netherlands).
- ⑫. 高野 重永、小川 祥二郎、飯田 隆、若槻康雄「ステロイド分子を結合した高分子フィルム」の合成」日本化学会第 88 春季年会・2008 年 3 月 26-30 日（東京）
- ⑬. 柿山 玄太、武藤 晃奈、小川 祥二郎、園田健、飯田 隆、三田村 邦子、池川 繁男「*in situ*発生ジオキシランによるコレスタン側鎖C-25位の直接水酸化とオキシステロール類合成への利用」日本薬学会 128 年会、2008 年 3 月 26～28 日（横浜）
- ⑭. 外浦 亜耶子、細田 敦子、柿山 玄太、飯田 隆、阿部 幸平、後藤 順一、眞野 成康「Niemann-Pick病Type C₁鑑別診断法の確立を目的とする三重抱合型胆汁酸の高感度LC/MS/MS分析」日本薬学会 128 年会、2008 年 3 月 26～28 日（横浜）
- ⑮. 沖原 梨香、長谷川 真紀、三田村 邦子、柿山 玄太、飯田 隆、池川 繁男「硫酸抱合型テトラヒドロコルチゾール並びに 11-デオキシテトラヒドロコルチゾールの合成とESI-MSⁿにおける挙動」日本薬学会 128 年会、2008 年 3 月 26～28 日（横浜）
- ⑯. 小川 祥二郎、高野 重永、飯田 隆、若槻康雄「徐放性医薬と分子認識基材の開発

を目的とした新規機能性ステロイドポリマーの創製」日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日（横浜）

- ⑰. 牧野 三津子、小川 祥二郎、古川 めぐみ、藤本 康雄、飯田 隆、畠 恵司、堀 一之・「ルペオール誘導体の含酸素官能基化と生物活性」日本薬学会第 128 年会・2008 年 3 月 26-28 日（横浜）
- ⑱. 沖原 梨香、長谷川 真紀、三田村 邦子、柿山 玄太、飯田 隆、池川 繁男「コルチコステロイド並びにテトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートのESI-MSⁿにおける挙動」第 20 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2007 年 7 月 2 日～4 日（東京）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 1 件）
若槻 康雄、飯田 隆、小川 祥二郎、高野重永「生理活性物質を化学結合したノルボルネン系高分子重合体、その製法及び用途」国際出願、PCT/JP2008/53758、2008年3月3日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
飯田 隆 (IIDA TAKASHI)
日本大学・文理学部・教授
研究者番号：60060125
- (2) 研究分担者
柿山 玄太 (KAKIYAMA GENTA)
日本大学・文理学部・助手
研究者番号：7045386
- (3) 連携研究者
なし