

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07175

研究課題名（和文）血清由来エクソソーム含有低～中分子の定性・定量と統合失調症リスク診断への展開

研究課題名（英文）Qualitative and quantitative of low-and medium-molecular weight metabolites in exosomal fraction of serum and its application to schizophrenia-risk diagnosis

研究代表者

小野里 磨優（ONOZATO, Mayu）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：50610094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：血清中メチオニン/ホモシステイン比の低下は、精神病発症危険状態（ARMS）から初回エピソード精神病（FEP）の期間におけるARMSとFEPの判別マーカーとなり得ると示唆された。エクソソーム画分中チオール化合物の組成比は、血清中と同様であると見出された。新規アミノ酸標識化試薬CIMA-OSuは微量D-アミノ酸の定量や1級アミン標識体と他のアミン標識体のピークの識別も容易に可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARMS群のエクソソームに関する報告はほとんどないため、本成果は新たな同疾患の診断法として医療や生命科学研究の発展に繋がる可能性がある。血清エクソソームの定量値の異常が分かれば、統合失調症の発症機構解明に繋がることも期待できる。新規アミノ酸標識化試薬の活用は、エクソソームに含まれるペプチド解析、特に新規ペプチドの同定にも有効であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Decrease in the serum methionine/homocysteine ratio may be a risk factor for developing psychosis during the transition from at-risk mental state (ARMS) to first-episode psychosis (FEP), and may prove to be a useful marker of the phase between ARMS and FEP. A composition of thiol-containing amino acids in exosomal fraction of human serum was similar to those in the corresponding native serum. A novel derivatization reagent, CIMA-OSu, is able to determine trace D-amino acids, and furthermore, to distinguish peaks derived from primary amino acids from other amines easily.

研究分野：分析化学

キーワード：血清 エクソソーム LC-MS/MS 誘導体化 チオール化合物 アミノ酸 ARMS 統合失調症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは正常細胞やがん細胞を含むほぼ全ての細胞から産生・放出され、体内を循環している直径 30–200 nm の顆粒状物質である。その内部には miRNA、タンパク質などが含まれ (*Nucleic Acids Res.*, 40, D1241–1244, 2012) 内包されている物質は細胞間で受け渡され、受容した細胞内で機能するため、エクソソームは細胞間コミュニケーションを担う顆粒として注目されている (*Nat Rev Immunol.*, 2, 569–579, 2002)。しかし、内包されている高分子に関しては種々の報告があるが、ペプチドやアミノ酸等の低分子～中分子物質についてはほとんど報告がない。

そこで、研究代表者は低分子物質に着目し、血清 300 μ L から抽出した血清エクソソーム画分 (約 25 μ L, 図 1) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -蛍光定量法により測定した結果、健康人 ($n=9$) の血清エクソソーム画分では、血清中に比べ D-セリンの割合 (D/D+L 比) が有意に高く ($p < 0.01$)、シスチン (Cys-Cys, 図 2) が濃縮されている ($p < 0.01$) ことに加え、他のアミノ酸数種も血清とエクソソーム画分では有意差があるなどの新たな知見を見出した (*Onozato et al., Prac Lab Med.*, 12, e00099, 2018)。

一方、統合失調症 (幻覚、幻聴を伴う陽性症状、引きこもり、自閉などの陰性症状、認知機能障害などが見られる精神疾患) は、発症早期での適切な治療が遅れると寛解が困難になるため、精神科医療では、精神疾患を発症する前段階である精神病発症危険状態 (At-Risk Mental State; ARMS) を捉え、早期に介入することで、予後の改善や発症自体を予防する試みが注目されている。そのため、血液検査による精度が高い診断法の開発が急務となっており、多数のグループで診断マーカーとなり得る血液中成分の探索が行われてきた (*Schizophr Res.*, 195, 32–50, 2018)。研究代表者の所属研究室でも、本学医療センターとの共同研究で、統合失調症患者群、ARMS 群と健常対照群の血清中低分子物質 (NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンを含むアミノ酸、脂肪酸等) の濃度差異を報告してきた (*Fukushima et al., PLoS ONE* 9, e101652, 2014)。

また、研究代表者らは多様なバイオマーカー探索のため、アミノ基、チオール基、フェノール性ヒドロキシ基と反応する標識試薬 COXA-OSu (ならびに重水素体 $^2\text{H}_5$ -COXA-OSu) (図 3) をデザインし、合成した。両試薬による水溶性 (高極性) 物質の標識、次いで水溶性 (高極性) 物質の分離に適する親水性相互作用 (HILIC) 型固定相を用いた HPLC-タンデム型質量分析法 (LC-MS/MS) を開発し、この方法により、D-および L-アミノ酸の一斉光学分離定量の高感度・高精度化に取り組んできた。

2. 研究の目的

研究代表者らのこれまでの報告 (*Onozato et al., Prac Lab Med.*, 12, e00099, 2018) により、エクソソーム中の Cys-Cys 濃度が高いことが分かっている。Cys-Cys はシステイン (Cys) を経て、抗酸化作用を有するトリペプチドのグルタチオン (GSH) に生合成される。エクソソームが細胞間コミュニケーションの担い手であれば、エクソソームは組織における GSH 合成原料の供給を担っていると推察される。一方、所属研究室をはじめ、他のグループからも統合失調症患者では血清中 GSH 濃度の有意な低下が示され、同患者は酸化ストレスを受け易い状態であることが示唆されている。以上より、統合失調症患者ではエクソソーム中の Cys-Cys 濃度が低いのではと考えられた。また、エクソソーム画分中には Cys-Cys 以外にも特徴的な低～中分子 (ペプチド) が存在することも考えられる。そこで、本研究では、ヒト血清エクソソームに含まれる低～中分子の定性・定量による統合失調症発症予測法の確立を目指し、ARMS 群および健常対照群の血清由来エクソソームに含まれる Cys-Cys をはじめとする低分子から、GSH のようなトリペプチドや他の中分子ペプチドを COXA-OSu (図 3) および LC-MS/MS を活用して一斉に高感度定量し、各濃度の異常と病態進行との関連性を見出すことを目的とした。

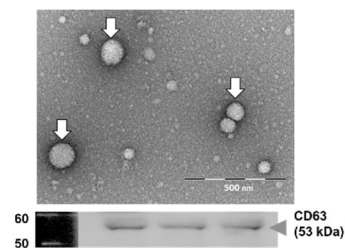


図 1 (上) TEM によるエクソソーム観察 (白矢印), (下) 抗 CD63 抗体を用いたウェスタンブロットによるエクソソームの検出

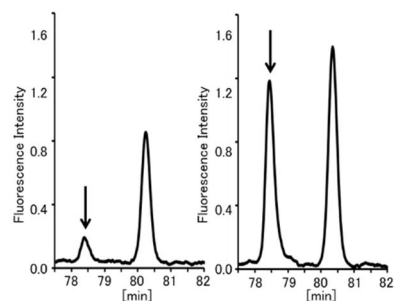


図 2 アミノ酸組成の比較 (左)血清, (右)血清エクソソーム画分 (: シスチン)

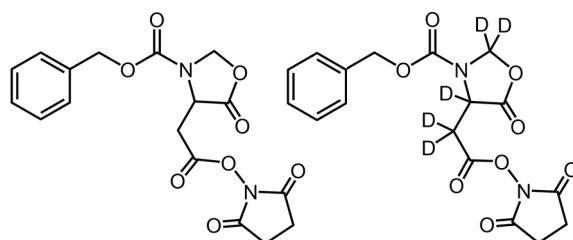


図 3 新規標識試薬 COXA-OSu (左) ならびに重水素体 ($^2\text{H}_5$ -COXA-OSu (右))

3. 研究の方法

(1) FEP 群および ARMS 群のヒト血清中のチオール化合物濃度の比較解析

初回エピソード精神病 (FEP) 群、精神病発症危険状態 (ARMS) 群、健常対照群 (Control 群) の血清 10 μ L を使用し、血清中チオール化合物を SBD-F により誘導体化した後、HPLC-蛍光検出法により、ホモシステイン (Hcy) を含む血清中チオール化合物濃度を調べた。加えて、Hcy 代謝に関わるアミノ酸であるメチオニン (Met) の血清中濃度を LC-MS/MS を用いて調べ、3 群間における血清中チオール化合物・メチオニン濃度を比較解析した。加えて、FEP 群 + ARMS 群の血清中分子濃度と臨床症状スコア (PANSS) との関連性を検討した。

なお、本研究で使用したヒト血清および ARMS 群の臨床症状スコアなどの患者情報は、本学医療センター大森病院で研究協力者 (辻野) が診察し、倫理委員会で承認された手続きを経て、被験者より同意を得たものである。

(2) ヒト血清由来エクソソーム画分中のチオール化合物の検出

ヒト血清より、市販キットを用いて既報 (Onozato *et al.*, *Prac Lab Med.*, 12, e00099, 2018) に従って単離・回収したエクソソーム顆粒画分にメタノールを添加してエクソソームの膜を破壊した後、得られたヒト血清由来エクソソーム画分を血清の場合と同様に SBD-F により誘導体化し、LC-MS/MS を用いてチオール化合物の検出を行った。血清およびヒト血清由来エクソソーム画分に含まれるチオール化合物の組成比を比較解析した。

(3) 安定化を向上させたアミノ基標識試薬の開発とその試薬の活用

当教室においてデザイン・開発された LC/MS 用誘導体化試薬 COXA-OSu (図 3) は、COXA 標識アミノ酸の安定性が乏しいという欠点があった。そこで、COXA 標識体の不安定性の原因となっているオキサゾリジノン構造を、より安定なイミダゾリジノンに変換した新規化合物 CIM_a-OSu (図 4) をデザインし、合成を試みた。さらに、CIM_a-OSu 標識アミノ酸の開裂パターンを検討した。

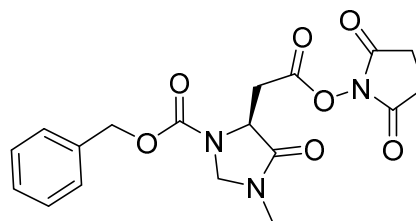


図 4 (S)-CIM_a-OSu

4. 研究成果

(1) FEP 群および ARMS 群のヒト血清中のチオール化合物濃度の比較解析

FEP 群では、血清中 Met 濃度が Control 群よりも有意に低下し ($p = 0.0381$)、Hcy 濃度は Control 群 ($p = 0.0170$)、ARMS 群よりも有意に増加した ($p = 0.0158$)。FEP 群の Met/Hcy 比は、Control 群や ARMS 群よりも有意に低下した (図 5)。更に、FEP 群 + ARMS 群における Met/Hcy 比と陽性症状スコアとの間に有意な負の相関が認められた (図 6)。

これらの結果より、Met/Hcy 比の低下は、ARMS から FEP の期間における ARMS と FEP の判別マーカーとなり得ることが示唆された。本成果を論文発表 (Onozato *et al.*, *Clin Biochem.*, 77, 48-53, 2020) および日本薬学会第 140 年会にて学会発表した。

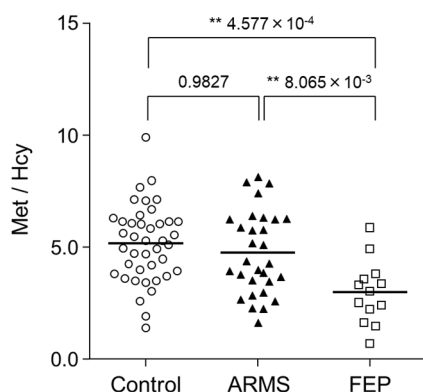


図 5 3 群間における Met/Hcy 比の比
**

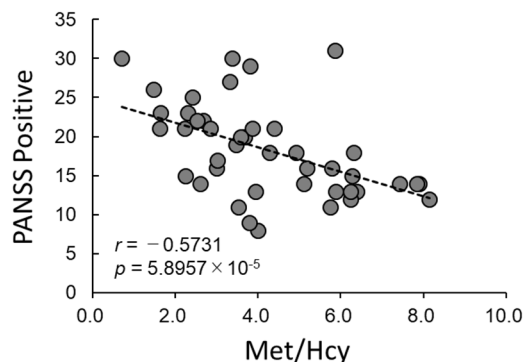


図 6 FEP 群 + ARMS 群における Met/Hcy 比と陽性症状スコアとの相関関係

(2) ヒト血清由来エクソソーム画分中のチオール化合物の検出

エクソソーム画分から Hcy、Cys、GSH、 γ -グルタミルシステイン (γ -GluCys) が検出され、エクソソーム画分内におけるそれらの組成比は、血清中における組成比と同様であると見出された (図 7)。本成果を論文発表した (Onozato *et al.*, *J Chromatogr Sci.*, 58, 636-640, 2020)。

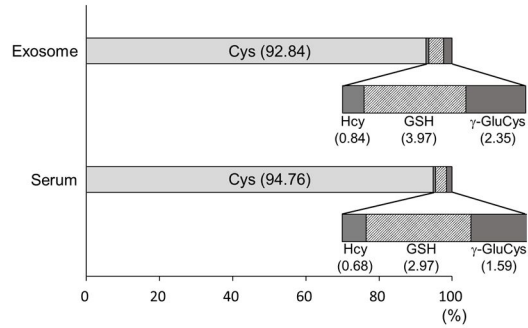


図7 エクソソームと血清に含まれるチオール化合物の組成比の比較

(3) 安定化を向上させたアミノ基標識試薬の開発とその試薬の活用

新規標識化試薬CIM_a-OSu (図4) を合成し、アミノ酸を標識したところ、COXA標識アミノ酸に比べて安定性が改善された。加えて、CIM_a-OSu標識アミノ酸の開裂パターンの検討より、1級アミン標識体でのみ [M-H] > [M-H-43] および [M-H-194] が生じ、既存のCOXA-OSuと同様のMS開裂の特徴が見られた (図8)。また、D-アミノ酸を含む発酵食品の1つである味噌を測定対象として、本誘導体化試薬を適用したところ、D-SerやD-Alaなどの微量D-アミノ酸も同時に定量が可能であった。さらに、CIM_a標識体を検出したクロマトグラムと、1級アミン特異的に検出 ([M-H] > [M-H-194]) した両クロマトグラムを比較することでL-Pro等の2級アミン標識体のピークを容易に識別できた。本成果を論文発表 (Sakamoto, Onozato *et al.*, *J. Chromatogr. A.*, 1652, 462341, 2021) および日本薬学会第141年会にて学会発表した。

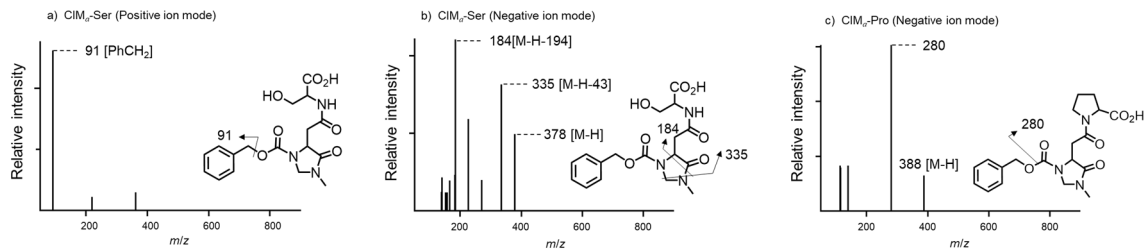


図8 CID マススペクトルの比較: CIM_a-標識セリン ((+)モード; a, (-)モード; b)、CIM_a-標識プロリン ((-)モード; c)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onozato M, Kobata K, Sakamoto T, Ichiba H, Fukushima T	4. 巻 58
2. 論文標題 LC-MS/MS analysis of thiol-containing amino acids in exosomal fraction of serum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Chromatogr Sci.	6. 最初と最後の頁 636-640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/chromsci/bmaa028.	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 Onozato M, Uta A, Magarida A, Fukuoka N, Ichiba H, Tsujino N, Funatogawa T, Tagata H, Nemoto T, Mizuno M, Fukushima T	4. 巻 77
2. 論文標題 Alterations in methionine to homocysteine ratio in individuals with first-episode psychosis and those with at-risk mental state.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Biochem.	6. 最初と最後の頁 48-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2019.12.003	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 Sakamoto T, Onozato M, Uekusa S, Ichiba H, Umino M, Shirao M, Fukushima T	4. 巻 1652
2. 論文標題 Development of derivatization reagents bearing chiral 4-imidazolidinone for distinguishing primary amines from other amino acids and application to the liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of miso	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Chromatogr A .	6. 最初と最後の頁 462341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chroma.2021.462341	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 0件）

1. 発表者名 坂本 達弥、小野里 磨優、植草 秀介、一場 秀章、海野 真帆、白尾 美佳、福島 健
2. 発表標題 タンデム型質量分析計により1級アミン構造を識別する4-イミダゾリジノン型試薬の創製と味噌成分アミノ酸分析への応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野里 磨優、雅樂 晏里沙、曲田 彩夏、福岡 尚実、一場 秀章、辻野 尚久、田形 弘実、船渡川 智之、根本 隆洋、水野 雅文、福島 健
2. 発表標題 初回エピソード精神病及び精神病発症危険状態におけるHcy-Met代謝の変動
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〕

東邦大学薬学部薬品分析学教室 https://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analchem/index.html 東邦大学薬学部薬品分析学教室 https://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analchem/article/index.html
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------