

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07874

研究課題名(和文) GC/MS法を用いたオキシステロールの多項目同時測定系の確立とその臨床的意義

研究課題名(英文) Establishment of simultaneous determination of multiple oxysterol concentrations by GC/MS method, and its clinical significance.

研究代表者

三井田 孝 (Miida, Takashi)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80260545

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)：オキシステロールはコレステロールの酸化産物で、酵素および非酵素的に産生され血中には微量にしか存在しない。しかし、オキシステロールは動脈硬化を促進する生物学的作用が強く、その血中濃度はコレステロールと必ずしも相関しない。本研究課題により、前処理を共通化することにより多項目を同時に正確に測定する方法を確立した。56名の2型糖尿病入院患者を対象とし、新たに開発した前処理法とGC/MS法を用いてオキシステロールを測定した。糖尿病患者の25ヒドロキシコレステロール濃度は、対照群の約2倍に上昇していた。各種危険因子を調整後、25ヒドロキシコレステロール濃度と頸動脈の動脈硬化との関連は有意ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシステロール濃度は報告者や方法で大きく異なり、測定項目数も少ないことが多い。測定が煩雑で多数検体を処理する方法が確立していないことが理由である。本研究課題で、オキシステロールに加えてその関連物質である植物ステロールやコレステロール前駆体、コレスタノールなど最大22項目を同時に正確かつ再現性よく測定する系を確立できた。臨床サンプルの検討により、LDL-Cなど日常診療で使用されている検査項目で検出できないハイリスク群が同定できる可能性が示唆された。疾患群によって異常を示すオキシステロールに差があることも明らかになった。脂質低下療法後の残余リスクを反映するバイオマーカーになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oxysterol is the oxidized products of cholesterol and generated by enzymatic and non-enzymatic reactions. Their plasma concentrations are extremely low. Some oxysterols have strong biological actions to promote atherosclerosis. The plasma concentrations are not always correlated with cholesterol concentrations. We have established the simultaneous multiple measurements of oxysterols as well as cholesterol precursors, plant sterols, and cholestanol in plasma using one-round pretreatment. We determined oxysterol concentrations by gas spectrometry coupled with mass spectrometry in fifty-six hospitalized patients with type 2 diabetes and controls subjects. We found that 25-hydroxycholesterol concentration in the diabetic patients was almost double that in the control subjects. After adjustment of other risk factors, we failed to show the significant correlations between plasma 25-hydroxycholesterol concentration and carotid atherosclerosis.

研究分野：病態検査学

キーワード：オキシステロール バイオマーカー 質量分析装置 動脈硬化 糖尿病 脂質異常症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去の多数の疫学調査により、LDL-Cが高いほど冠動脈疾患の発症率が高くなることは明らかである。しかし、スタチンでLDL-Cを強力に低下させても、冠動脈疾患はどの薬物介入試験でも30%前後しか低下しない。その後、スタチンと併用することで著明にLDL-Cを低下させる抗PCSK9抗体(エボロクマブ)の臨床試験(FOURIER試験)でも、LDL-Cは中央値で92-30mg/dLも低下したにもかかわらず冠動脈疾患は1年後で16%、それ以降でも25%しか低下しなかった(N Engl J Med 376:1713-22, 2017)。糖尿病患者や慢性腎臓病、末期腎不全の患者ではLDL-Cが高なくても冠動脈疾患を高率に発症するため、LDL-C以外の残余リスクをどう検出するかが重要である。

オキシステロールは、コレステロールが酸化された化合物である。オキシステロールには、細胞毒性やアポトーシスの誘導、細胞の分化誘導、コレステロールの細胞からの引き抜き低下など様々な生物活性がある。オキシステロールは、血中ではコレステロールに比べると極めて微量だが、動脈硬化薬のオキシステロール/コレステロール比は、血中より著明に高い(Atherosclerosis 142: 1-28, 1999)。LDL-Cが低くても冠動脈疾患を発症しやすいことが知られている糖尿病や透析患者では、血中の酸化ストレスが強く、オキシステロールが動脈硬化を促進していることが示唆される(Minerva Med 109:103-15, 2018)。

オキシステロールを患者群で測定した臨床研究も複数報告されているが、その濃度には大きな違いがある。オキシステロールは血清に大量に含まれるコレステロールと構造が非常に似ており、ガスクロマトグラフィー(GC)で両者の分離が悪いことも一因と考えられる。また、オキシステロールは加熱や長期凍結保存でも産生されうるため、脂質の抽出や誘導体化の過程でアーチファクトが生じ易い。また、過去の論文では報告者により血中オキシステロール濃度のばらつきが大きく比較ができない。このように、血中オキシステロールの正確な定量は困難である。

オキシステロールは、酸化ストレスで非酵素的に産生されるだけでなく、酵素的にも産生される。たとえば、マクロファージでは27-hydroxylaseの活性が高く、細胞内に蓄積したコレステロールを27-hydroxycholesterol(27-HOC)として血中に放出する。この酵素が欠損すると脳腫瘍を発症し動脈硬化が促進する。一方、酸化ストレスで産生されるオキシステロールで最も毒性が強い7-hydroperoxycholesterol(7-HOOC)は、すぐに3つのオキシステロールに代謝される(Proc Natl Acad Sci U S A 91: 11452-6, 1994)。また、加熱調理では食品のコレステロールから多種類のオキシステロールが産生され、腸管で吸収される。よって、動脈硬化を評価するには少数の血中オキシステロールを調べるだけでは不十分である。

2. 研究の目的

糖尿病や慢性腎不全などLDL-Cが低くても冠動脈疾患が高率な疾患では、血清中や動脈硬化薬のオキシステロール濃度が高い。よって、血中オキシステロール濃度が鋭敏な動脈硬化性疾患の予測因子の可能性がある。その原因を推定するためには、コレステロール合成や吸収のマーカーなど同時に多項目を測定することが有用である。本研究では、(1)多種類のオキシステロールを含むコレステロール代謝関連物質を同時に高精度に測定するガスクロマトグラフ質量分析法(GC/MS法)を確立し、(2)動脈硬化ハイリスク群で高いオキシステロールが何かを同定し、(3)動脈硬化性疾患の予後を予測できるオキシステロール値が設定できるか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

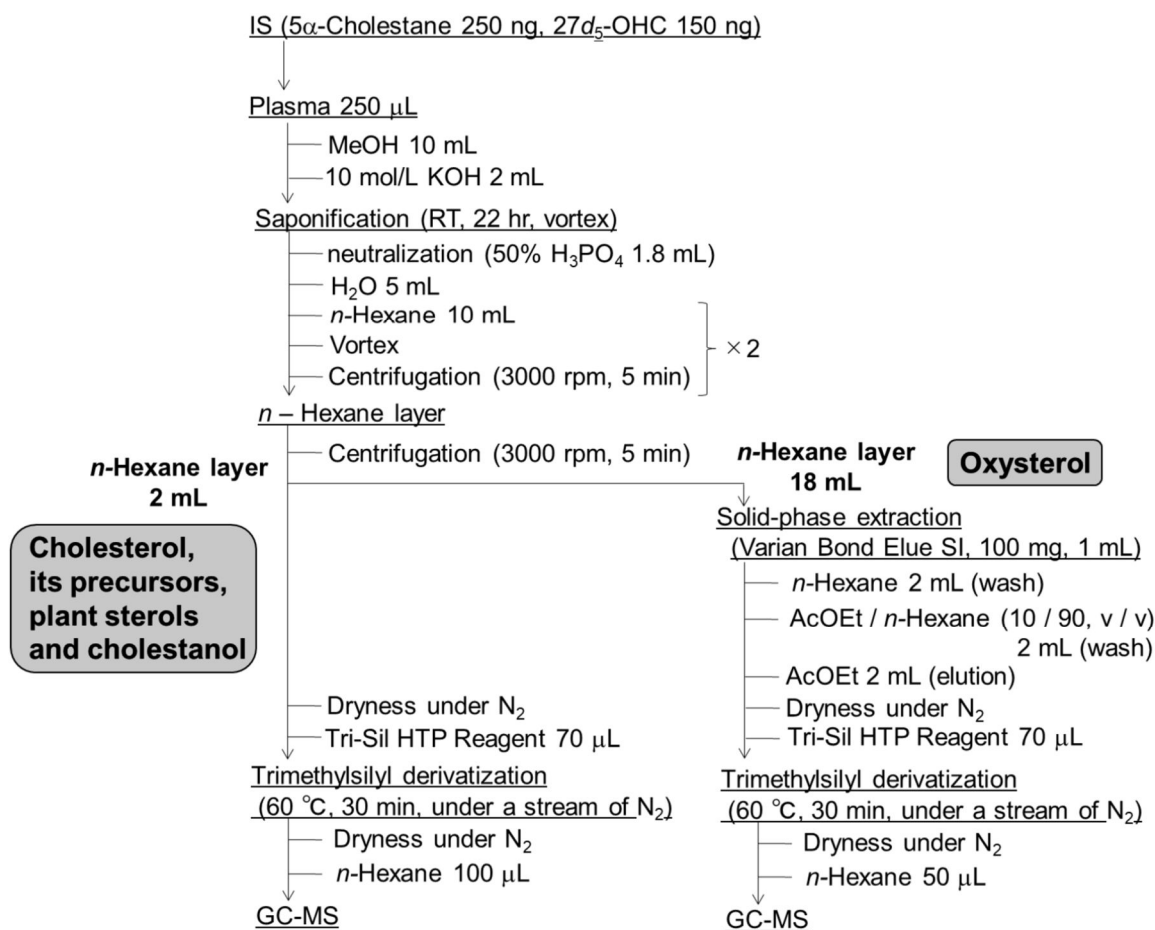
最初に多項目同時測定のために新しいサンプルの前処理法を開発し、従来の前処理法と比較した。従来法は、本研究組織が報告したHirayamaらの方法を用いた(Atherosclerosis 230: 48-51, 2013)。コレステロール前駆体と植物ステロール測定では、内部標準物質を添加した血漿に水酸化カリウム(10M)とメタノール(2:5, v/v)を加え1時間で鹸化を行った。50%リン酸でpHを7.0にした後、n-ヘキサンで脂質を抽出した。窒素ガス下で蒸発乾固し、Tri-Sil HTP試薬を加えてから60、30分加熱してトリメチルシリル誘導体化し、n-ヘキサンに溶解させてGC/MSで分析した。一方、オキシステロール測定では、内部標準物質を添加した血漿を15分で鹸化し、n-ヘキサンで抽出し、n-ヘキサンで前処理したBond Elut SIカートリッジに注入した。過剰なコレステロールは、カラムをn-ヘキサンと10%酢酸エチル(in n-ヘキサン)で洗浄して除き、カラムに残ったオキシステロールを酢酸エチルで溶出した。窒素下で蒸発乾固して、60・30分加熱してトリメチルシリル誘導体化し、n-ヘキサンに溶解させてGC/MSで分析した。

今回開発した前処理法は、Hirayamaらの方法を改良したものである。内部標準物質を添加した血漿に水酸化カリウム(10M)とメタノール(1:5, v/v)を加え22時間かけて鹸化を行った。50%リン酸でpHを7.0にした後、n-ヘキサンで脂質を抽出した。コレステロール、コレステロール前駆体、植物ステロール、コレスタノール測定では窒素ガス下で蒸発乾固し、Tri-Sil HTP試薬を加えてから60、30分加熱してトリメチルシリル誘導体化し、n-ヘキサンに溶解させてGC/MSで分析した。オキシステロール測定では、Isolute Biotage SI cartridgeを用いて固相抽出し、

溶出したオキシステロールを窒素下で蒸発乾固して、60 °C・30 分加熱してトリメチルシリル誘導体化し、*n*-ヘキサンに溶解させて GC/MS で分析した。新しく開発した前処理法の概要を図 1 に示す。

臨床サンプルを用いた検討は、入院 2 型糖尿病 53 名と健常者 50 名において、血中オキシステロール濃度を測定して比較した。また、2 型糖尿病患者については、頸動脈エコーを施行してプラークスコアを算出し、オキシステロールとの相関を調べた。

図 1：新規に開発したオキシステロールおよびその関連物質の前処理法



(Kuwabara N, et al. Med Mass Spectrom 2023 より引用)

4. 研究成果

本研究課題により、一回の前処理だけで血漿中のコレステロール、コレステロール水素化物であるコレスタノール、コレステロール前駆体（5 種類）、植物ステロール（3 種類）、オキシステロール（12 種類）の合計 22 種類を同時に測定できる GC/MS 法を確立した。使用する血漿の量は、前処理を共通化することにより 250 μL まで減らすことができた。小児患者の場合、検体量が不足で診断に必要なオキシステロール項目を測定できない場合が少なくないが、本法はそのリスクを低減できると考えらえる。これまでの報告を調べると、オキシステロールを含む関連物質を多項目測定する場合、通常は測定項目により前処理法が異なるだけでなく、測定機器も異なる。たとえば Mignarri らは、3 つの前処理法と 3 種類の測定機器を用いている (J Inherit Metab Dis 39: 75-83, 2016.)。我々の方法は、このような問題点を克服した。

添加回収試験の結果では、各成分の回収率は 85.0 ~ 115.5% と良好な結果が得られた。同時再現性および日差再現性の CV は、最大でもそれぞれ 11.0% と 14.2% であり、大多数は 10% 未満であった。6 つのサンプルを用いて、従来法で測定したコレステロール前駆体 3 項目、植物ステロール 3 項目、オキシステロール 3 項目の測定値と新しい方法で測定した値を比較した。その結果、新しい方法を用いた測定値は従来法を用いた測定値の 85.0% ~ 115.5% を示し良好な相関が得られた。

続いて行った臨床的な検討では、2 型糖尿病群でコレステロール 5, 6 -エポキシド (5, 6 -epoxide) とコレステロール 5, 6 -エポキシド (5, 6 -epoxide) が有意に低値で、7 -ヒドロキシコレステロール (7 -HOC)、25-ヒドロキシコレステロール (25-HOC)、27-ヒドロキシコレステロール (27-HOC) が有意に高かった (表 1)。これらの項目を総コレステロールで割った相対濃度で両軍を比較しても、同様の結果が得られた。ロジスティック回帰分析の結果、年齢、BMI、平均血圧、トリグリセライド、HDL-C、LDL-C、前述の 3 つのオキシステロール濃度を

調整しても、25-HOC は 2 型糖尿病の有意な説明因子であった (Odds ratio 1.51 [1.03-2.33], $p < 0.036$)。

さらに、単変量解析では、前述の 4 つのオキシステロールのうち 25-HOC のみが有意な頸動脈プラークスコアの説明因子であった ($r = 0.322$)。しかし、FDR(False Discovery Rate)で補正した p 値 (すなわち q 値) では、統計学的に有意ではなかった。

我々は、すでに複合型高脂血症や胆汁うっ滞を示す先天性代謝異常でもオキシステロールの臨床的意義を調べる研究を開始しており、その意義の解明が期待される。

表 1 : 対照群と 2 型糖尿病患者における血中オキシステロール濃度の比較

	対照群 ($n = 50$)	2 型糖尿病 ($n = 53$)	p values	q values
血中濃度 (ng/mL)				
4 -OHC	18.32 [13.33 24.49]	18.98 [13.40 24.34]	0.722	0.928
5 , 6 -epoxide	39.57 [29.05 57.03]	28.14 [19.11 40.59]	< 0.001	0.004
5 , 6 -epoxide	42.30 [32.38 67.56]	32.00 [22.12 48.77]	0.015	0.028
7 -HOC	47.27 [32.04 77.90]	49.50 [32.19 86.03]	0.966	0.972
7 -HOC	5.42 [4.21 11.68]	8.33 [6.36 11.72]	0.002	0.007
7-keto	16.88 [11.56 33.64]	18.65 [14.06 23.83]	0.864	0.972
24S-HOC	34.43 [31.72 43.69]	38.53 [29.46 46.82]	0.482	0.723
25-HOC	4.58 [3.45 5.44]	8.52 [6.37 11.26]	< 0.001	< 0.001
27-HOC	71.31 [63.44 86.69]	88.51 [74.44 116.53]	0.004	0.009

メジアン [四分位範囲]

(Kai T, et al. J Clin Lipidol, in press より抜粋して引用)

以上のように、本研究課題により少量の検体を用いて同時に多項目のオキシステロールおよびその関連物質を測定する系を確立した。動脈硬化の予防と治療において、未解決の残余リスクが何なのか本研究課題により明らかになることが期待される。また、前処理の共通化により必要サンプル量が少なくても測定できる点は、国内だけでなく国外でも小児代謝性疾患におけるオキシステロール測定を促進させると予想される。

臨床研究で十分にオキシステロールは、血清脂質と独立して変動しうるバイオマーカーである。その臨床的意義の解明には、さらに検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計26件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kai T, Hirayama S, Soda S, Fuwa F, Nakagawa S, Ueno T, Hori A, Miida T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Higher concentration of 25-hydroxycholesterol in treatment-naive patients with type 2 diabetes compared to healthy individuals.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clin Lipidol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kuwabara N, Fuwa F, Sato S, Hirayama S, Miida T, Nakagawa S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Simultaneous determination of cholesterol precursors, plant sterols, and oxysterols in plasma using one-round pretreatment.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Med Mass Spectrom	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) 10.24508/mms.2023.06.005	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 Miida Takashi	4. 巻 30
2. 論文標題 Blood Sampling on Admission in Patients with Acute Coronary Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.ED204	査読の有無 無
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 堀敦詞, 日高宏哉, 三井田孝	4. 巻 51
2. 論文標題 生体リン脂質及び糖脂質の脂質分子プロファイル測定と疾患への応用.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 123~128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Koyama Shingo, Sekijima Yoshiki, Ogura Masatsune, Hori Mika, Matsuki Kota, Miida Takashi, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 28
2. 論文標題 Cerebrotendinous Xanthomatosis: Molecular Pathogenesis, Clinical Spectrum, Diagnosis, and Disease-Modifying Treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 905 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17055	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 Kuroda Masayuki, Bujo Hideaki, Yokote Koutaro, Murano Takeyoshi, Yamaguchi Takashi, Ogura Masatsune, Ikewaki Katsunori, Koseki Masahiro, Takeuchi Yasuo, Nakatsuka Atsuko, Hori Mika, Matsuki Kota, Miida Takashi, Yokoyama Shinji, Wada Jun, Harada-Shiba Mariko.	4. 巻 28
2. 論文標題 Current Status of Familial LCAT Deficiency in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 679 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17051	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 Hiroshi Yoshida, Hayato Tada, Kumie Ito, Yoshimi Kishimoto, Hidekatsu Yanai, Hideaki Bujo, Tomonori Okamura, Katsunori Ikewaki, Tetsuo Shoji, Takashi Miida, Masayuki Yoshida, Masafumi Kuzuya, Shizuya Yamashita.	4. 巻 27
2. 論文標題 Reference intervals of serum non-cholesterol sterols by gender in healthy Japanese individuals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 409 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.50187	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 Miida Takashi, Hirayama Satoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Controversy over the atherogenicity of lipoprotein-X	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Endocrinol Diabetes	6. 最初と最後の頁 117 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MED.0000000000000466	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26件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 三井田孝
2. 発表標題 脂質に関する最近の話題. 『日常検査における注意点』から『次回ガイドラインの改訂』まで.
3. 学会等名 第70回日本医学検査学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀敦詞, 藍智彦, 平山哲, 日高宏哉, 三井田孝
2. 発表標題 血清中ガラクトシルスルファチド分子種の同定とラクトシルスルファチド分子種の検出.
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Hori, Tomohiko Ai, Satoshi Hirayama, Hiroya Hidaka, Takashi Miida
2. 発表標題 A new method to measure fractions of sulfatides in human serum samples using MALDI-TOF mass spectrometry.
3. 学会等名 ISA 2021. The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甲斐敬人, 平山 哲, 宗田 聡, 中川沙織, 上野 剛, 小堀祐太郎, 平山安希子, 相良利栄子, 堀 敦詞, 三井田孝
2. 発表標題 管理不良な2型糖尿病患者における血清脂質および動脈硬化関連オキシステロールの探索的解析
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会・年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 不破史子, 清水(太田)美穂, 平山 哲, 三井田孝, 中川沙織
2. 発表標題 一度の前処理によるコレステロール合成・吸収・代謝物の定量法の開発
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会・年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川沙織, 三井田孝, 佐藤眞治
2. 発表標題 臨床化学・薬学研究の相互活用術～微量分析技術から、ゲノム医療・AMR対策まで～. コレステロール合成・吸収・代謝物の定量法を用いた新規バイオマーカーおよび薬物などの新規作用の発見.
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計6件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap (三井田孝) https://researchmap.jp/read0180789

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	平山 哲 (HIRAYAMA SATOSHI) (10345506)	東京学芸大学・保健管理センター・教授 (12604)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中川 沙織 (NAKAGAWA SAORI) (30410228)	新潟薬科大学・薬学部・准教授 (33101)	

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