

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07952

研究課題名（和文）質量分析法を利用した先天代謝異常症の臨床検査法の開発と応用

研究課題名（英文）Development of clinical assay for LSDs using LC-MS/MS

研究代表者

真嶋 隆一（Ryuichi, Mashima）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臨床検査部・上級専門職

研究者番号：00401365

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）：本研究では、質量分析法を用いたライソゾーム病の臨床検査方法の確立を行なった。研究課題は2つ設定した。1つはファブリー病とニーマンピック病型のバイオマーカーの高感度分析法の確立であり、もう1つはスフィンゴ脂質の長鎖塩基の分子種分析の網羅的解析である。まずバイオマーカーについてはイオン交換法を利用した前処理法を検討し、高感度分析を可能とした。次にスフィンゴ脂質の網羅的解析については炭素差数、二重結合数、水酸基の数をあらかじめ計算したMRM同定テーブルを準備して一斉分析を可能にした。以上、本研究では診断における定量と定性の両面から有用な情報を提供できる臨床検査分析システムの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、方法論的に新規なバイオマーカー測定法を開発した点である。近年、質量分析技術の感度向上は著しく、これと逆相関する形で検体の微量化が進んでいる。これまで必要であった手間のかかる前処理手法が、質量分析法の高感度化に伴って不要となり、より簡便な方法へ進化してきていることは、分析化学的に学術的意義が高い。また、本研究の社会的意義は、確立した臨床検査方法を診断に応用できることである。確立した手法は個々の分析装置によって多少の変更は必要であるが、大まかにはどの分析装置でも定量可能な方法のため、その汎用性の高さから社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have developed novel analytical methods for the lysosomal storage disorders using LC-MS/MS in this research project. First, we established an analytical procedure for LysoGb3 and sphingosylphosphorylcholine as the biomarkers for Fabry disease and Niemann-Pick disease type C, respectively. This assay uses a small amount of human plasma (0.1 mL) with structurally related compounds for these biomarker as the analytical standard. Next, we established a long-chain base-targeted lipidomics assay platform for clinical samples. Comparison of human plasma and fetal bovine serum revealed that human plasma contained a trace amount of exogenous long chain bases in the sphingolipids, which is found in fetal bovine serum at higher concentration. These results demonstrated that a novel assay using LC-MS/MS provides a robust assay for lysosomal storage disorders in clinical chemistry.

研究分野：分析化学、臨床検査学、小児科学

キーワード：LC-MS/MS ライソゾーム病 バイオマーカー 網羅的手法 スフィンゴ脂質 長鎖塩基

## 1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とするファブリー病とニーマンピック病C型はスフィンゴリン脂質蓄積症として知られている (Mashima R & Maekawa M 2018)。主な蓄積物質は、ファブリー病ではグロボトリアオシルスフィンゴシン (LysoGb<sub>3</sub>)、ニーマンピック病C型ではスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) である (図1)。この二つの疾患の発症頻度は数万分の1程度と推定されており、いずれも希少疾患である。自然歴の解析から、病的遺伝子変異および発症時期や標的臓器などの表現型の関係も蓄積してきている。現在治療薬として、ファブリー病では酵素製剤やシャペロン化合物が、ニーマンピック病C型では基質減少作用やコレステロール排出機能を持つ化合物が上市され、有用な治療法となっている。

近年、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) の高感度化により、血漿や尿に含まれる nM レベルの極低濃度のバイオマーカーの濃度が正確に測定可能となってきた。このことは診断に必要不可欠であるのみならず、新規治療薬の薬効評価にも有用である。

本課題における研究領域では、以下の課題の解決が必要とされている。

(1) 臨床検査学領域におけるバイオマーカー測定では、医薬品と異なりクロマトグラフィー定量の指針がない。そこで医薬品に準じて定量下限を定め、臨床検査学的に改正医療法が求める分析バリデーションが必要である。

(2) スフィンゴ脂質に *N*-アシル結合する脂肪酸と比して、長鎖塩基 (図1の灰色部分) の分子種の構成は不明な点が多い。網羅的解析手法でこれを明らかにし、スフィンゴ脂質の代謝メカニズムを解明する必要がある。

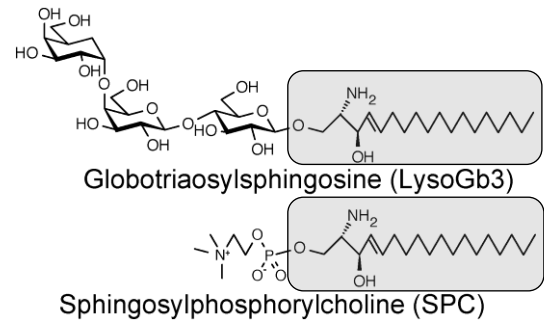


図1 本研究で対象とするバイオマーカー：LysoGb<sub>3</sub> (ファブリー病) と SPC (ニーマンピック病C型)。囲みは長鎖塩基。

## 2. 研究の目的

近年、臨床検査学領域におけるバイオマーカー測定の有用性が注目され、高感度質量分析法を用いた定量法の開発が進んでいる。しかし、臨床検査学領域における分析バリデーションには指針やガイドラインはない。特に定量下限の算出は測定対象が内因性化合物の場合にはあいまいであり、カットオフ値やクロスバリデーションに影響を与えることもある。

本研究では、質量分析法を利用した先天代謝異常症の臨床検査法の開発と応用を、スフィンゴ脂質蓄積症であるファブリー病とニーマンピック病C型に注目して行った。平成31 (令和元) 年度はこれらのバイオマーカー測定の分析バリデーションを行った。平成32 (令和2) 年度以降はこれらバイオマーカーに含まれる長鎖塩基の種類を、網羅的手法で定量的に解析した。いずれのバイオマーカーも健常人の値は定量下限近傍であり、代替マトリクスを利用して定量下限を算出した上で罹患者とのカットオフ値を検討した。ヒトのスフィンゴ脂質の長鎖塩基にはスフィンゴシン以外の化合物も検出されており、その理由を代謝学的に解明した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ファブリー病

平成 31 (令和元) 年度において、まず既報に従い (Auray-Blais C *et al* 2012)、ヒト血漿 (100  $\mu$ L) に 0.2%リン酸 (500  $\mu$ L) とメタノール (500  $\mu$ L) および内部標準物質 (LysoGb<sub>3</sub>-Gly) を加え、混和後、遠心上清を得た。次に前処理を行うため陽イオン交換カラム MCX (30 mg, Waters 社) に添加した。洗浄後、2%NH<sub>3</sub> 含有メタノール溶液 (600  $\mu$ L) で溶出した。乾固後、再懸濁して LC-MS/MS で定量した (図 2A)。

次にヒト血漿に含まれる LysoGb<sub>3</sub> 量を測定するための分析バリデーションを行なった。代替マトリクスを使用して 7 点で検量線を作成した (図 2B)。定量下限値は真度および精度が 15% 以上かつ 20% 以下となる濃度より決定した。罹患者検体を分析し、正常値の範囲とカットオフ値

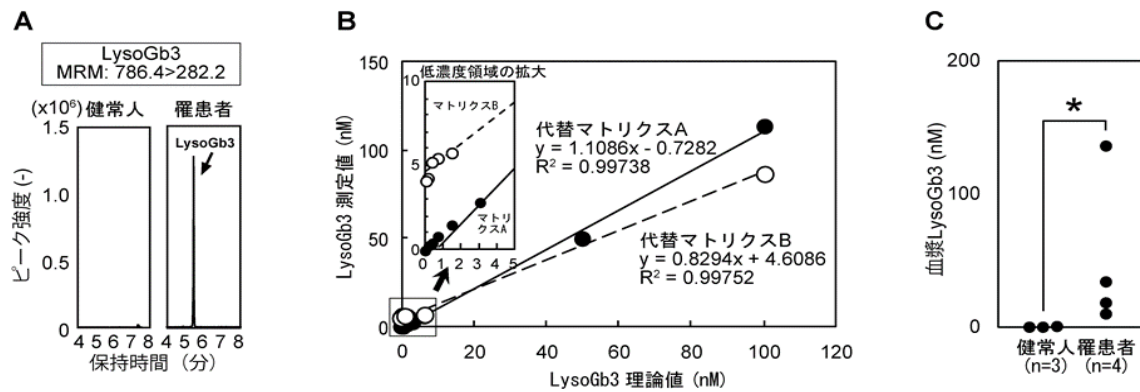


図 2 LC-MS/MS による LysoGb<sub>3</sub> の分析。(A) 代表的な分析クロマトグラム。(B) 代替マトリクスの検討。マトリクス A の方が低濃度領域での定量性が良好。(C) 罹患者における LysoGb<sub>3</sub> の上昇。

を検討した (図 2C)。異常高値の場合、酵素活性を測定した (Mashima R *et al* 2017)。

#### (2) ニーマンピック病C型

スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) に注目し、この測定法を確立する。既報の文献をもとにした予備検討では逆相系の固相抽出の利用が可能であった (Welford RW *et al* 2014)。SPC の定量を目的とした分析バリデーションでは、この前処理方法を利用した。内部標準物質として C17-SPC (Avanti Polar Lipids 社) を添加し、【1】同様、前処理を行い、LC-MS/MS で分析した (図 3A)。その後、分析バリデーションを行い、臨床検体への応用を進めた (図 3B)。

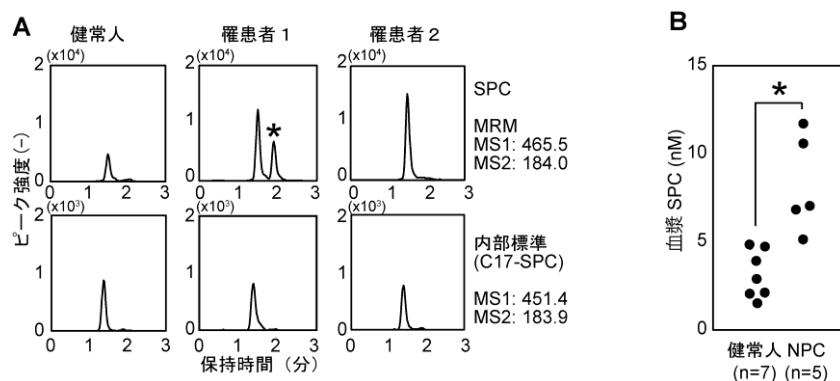


図 3 LC-MS/MS による SPC の分析。(A) 代表的な分析クロマトグラム。(B) 罹患者における SPC の上昇 (Mashima R *et al* 2018)。

### (3) 同時測定系の開発

平成 32 (令和 2) 年度においては、罹患検体もしくは代替マトリクスに 2 つの内部標準物質 (LysoGb<sub>3</sub>-Gly および C17-SPC) を添加し、同時測定系の構築を検討する。

### (4) 網羅的解析手法の構築

炭素鎖長、二重結合数、水酸基数、脱水の組み合わせを考慮し、多重反応モニタリングの設定を網羅的に構築する。逆相クロマトグラフィーで分子種の分離分析を行った (図 4)。長鎖塩基の検出の際、必要に応じて確認イオンを用い、トリヒドロキシ体とジヒドロキシ体を区別する。定量に供する解析ソフトウェアは、研究の初期では MassLynx (Waters 社) を使用する。理研の津川先生が開発された専用ソフトウェア MRMPROBS の活用も検討する (Tsugawa H *et al* 2014)。本研究の対象はヒトに検出される長鎖塩基の分子種解析であり、その他の脂質の解析を対象としないことなどを採用の判定基準とした。平成 33 (令和 3) 年度においては、確立した測定方法を利用して、引き続き臨床検体や、動物検体、その他生物学的試料の分析を行った。

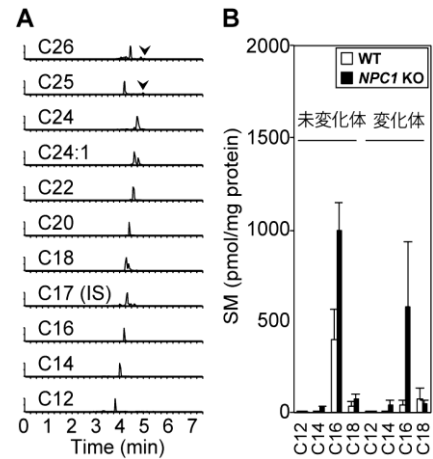


図 4 スフィンゴ脂質の LC-MS/MS 解析 (逆相系)。(A) 代表的なクロマトグラム。(B) NPC1 KO マウス肝臓中の SM 量。WT (n=6), NPC1 KO (n=3)。

## 4. 研究成果

### (1) ファブリー病

平成 31 (令和元) 年度に重点的に進めた。LysoGb<sub>3</sub> の血漿中の値は、先行研究によると、健常人の場合、約 1 nM 以下、古典型の場合、約 50nM 以上、遅発型の場合、その中間程度であることが知られている。本研究でも少数例の検体で測定したところ、同様の結果を得た。(Ohira M *et al* Separations 2020)。

### (2) ニーマンピック病C型

SPC の血漿中の値は、健常人では約 xx nM 以下、罹患者ではそれ以上であるが、一部、健常人と罹患者で測定値が重なることが知られている。そこで、本研究では、その後に提唱された新しいバイオマーカーである SM-509 (のちに化学構造が同定されて、N-acyl-0-phosphocholineserines、PPCS と命名された) との同時測定系を検討した。本研究の実施時において、PPCS の標準物質は入手できなかった。そのため、簡易的に SPC の定量に用いる C17-SPC に対するピーク面積値 (相対値) を無次元数として算出し、臨床検体への応用を試みた。その結果、当初の予想通り、SPC のみをバイオマーカーとした場合には一部の健常者と罹患者の区別ができなかった。しかし、新しいバイオマーカーである SM509 (PPCS) を組み合わせた判定方法を用いたところ、入手可能な検体を測定する限り、健常者と罹患者の区別が可能であった。

### (3) 同時測定系の開発

平成 32 (令和 2) 年度に検討した。ファブリー病のバイオマーカーである LysoGb3 とまた NPC のバイオマーカーである SPC はいずれも脱 N-アシル化されたスフィンゴ脂質であり、二つの化合物に共通に、 $-NH_2$  基が存在する。そこで、この 2 つの化合物の同時測定系の開発を検討した。しかし、研究開発時において、NPC の新規バイオマーカーとして上述の SM-509/PPCS の論文報告がされていたこと、また、PPCS の安定同位体標識化合物である標準物質の合成も報告した研究者の間では行われていたものの、この化合物の市販化までには時間がかかりそうであった。このため、NPC のバイオマーカー測定のための標準物質として用いていた C17-SPC を使って同時測定系の検討も考えたが、SM-509/PPCS の標準化合物の市販化を待って、分析アッセイ系を構築する方が臨床現場への混乱も少ないだろうと考えて、同時測定系の開発は見送りとした。

### (4) 網羅的解析手法の構築

平成 32 (令和 2) 年度において十分な研究時間が得られたため、予定の計画より前倒しで検討した。計画書に記載の予備的に構築した網羅的解析手法を、分離分析と MRM の感度向上の点から実験的により良い測定条件へ改善し、種々の生物試料中も長鎖塩基の種類を解析した。まず健康人血漿中には、ヒトで生合成可能な長鎖塩基である d18:1 (二重結合が 1 つ、炭素数 18, 水酸基 1 つ) が主成分であり、その濃度は 1nM 以下であった。次に、比較の対象として、動物由来の血清として、容易に入手可能な細胞培養用のウシ血清 (FBS) に注目し、4 ロットの解析を行った。その結果、ロット間で濃度差が認められたものの、まず濃度としては数十 nM と、健康人血漿に比べて高濃度であることが分かった。次に調査塩基の解析を行ったところ、d18:1 以外に、炭素数のより大きい d20:1 など、二重結合数が多い、d18:2 など、また水酸基数が 3 つである t18:0 などの多様な長鎖塩基が豊富に認められた。これらを生合成する遺伝子は動物には存在せず、植物や菌類には存在している。従って、FBS で認められたこれらの長鎖塩基成分は、食餌由来もしくは動物体内に強制する細菌類によって産生された成分を、FBS 中で検出している可能性も考えられた。最後に少数例のファブリー病患者の血漿の解析を行ったところ、濃度的に最も高いものは d18:1 であり、その他の長鎖塩基成分も特に高感度の質量分析装置で測定すると検出可能ではあるが、濃度的にはヒトで生合成される d18:1 よりも少なかった。

平成 33 (令和 3) 年度においては、確立した測定方法を利用して臨床検体や、動物検体、その他生物学的試料の分析を引き続き行った。得られた知見は、初年度および 2 年目に得られた結果と矛盾の無いものであった。最終年度は生体試料の測定を進めるとともに成果の取りまとめ、論文作成、学会発表等を行い、本研究内容に関する研究討議を行った。国内学会では、本研究領域の研究者が少ないため議論が少なかったが、国際学会では同様の解析を行っている研究チームがあり、有意義な議論がなされた。特にシンガポールのリピドームの研究者と議論し、少数成分の長鎖塩基として検出可能な d18:2 に関して知見を深めた。具体的にはヒトにおいてこれまで長鎖脂肪酸 CoA リガーゼ 3 (FADD3) として同定されていた遺伝子産物が、スフィンゴ脂質の長鎖塩基の C8-C9 位のトランス不飽和活性を有することを生化学的に報告していた。本研究で網羅的解析を行って見出した d18:2 のヒトにおける新たな生合成経路の発見であり、今後さらに少数成分の長鎖塩基の生合成について責任酵素が同定されてゆくことが予想された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mashima Ryuichi, Okuyama Torayuki, Ohira Mari	4. 巻 21
2. 論文標題 Biomarkers for Lysosomal Storage Disorders with an Emphasis on Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2704 ~ 2704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082704	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 Ohira Mari, Okuyama Torayuki, Mashima Ryuichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Long-Chain Base (LCB)-Targeted Lipidomics Study Uncovering the Presence of a Variety of LCBs in Mammalian Blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Separations	6. 最初と最後の頁 57 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/separations7040057	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 Maekawa M, Jinnoh I, Matsumoto Y, Narita A, Mashima R, Takahashi H, Iwahori A, Saigusa D, Fujii K, Abe A, Higaki K, Yamauchi S, Ozeki Y, Shimoda K, Tomioka Y, Okuyama T, Eto Y, Ohno K, Clayton P, Yamaguchi H, Mano N.	4. 巻 20(20)
2. 論文標題 Structural determination of lysosphingomyelin-509 and discovery of novel class lipids from patients with Niemann-Pick disease type C.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E5018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205018.	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 Mashima R, Okuyama T, Ohira M.	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Biosynthesis of long chain base in sphingolipids in animals, plants, and fungi.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Future Sciences OA	6. 最初と最後の頁 FS0434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/fsoa-2019-0094.	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 Ohira M, Kikuchi E, Mizuta S, Yoshida N, Onodera M, Nakanishi M, Okuyama T, Mashima R	4. 巻 26(11)
2. 論文標題 Production of therapeutic iduronate-2-sulfatase enzyme with a novel single-stranded RNA vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene Cells	6. 最初と最後の頁 891-904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12894	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 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 真嶋隆一、辰巳暁也、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 LPC26をバイオマーカーとした副腎白質ジストロフィーの新生児スクリーニングの予備検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真嶋隆一
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィーの新生児スクリーニングを目指した予備検討
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 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 LC-MS/MSによるライソゾーム病酵素活性の同時測定
3. 学会等名 第67回日本質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 質量分析法による11疾患ライソゾーム酵素活性同時測定系の検討
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 ライソゾーム酵素原因酵素の同時測定法の検討
3. 学会等名 第92回生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 質量分析法による11疾患ライソゾーム酵素活性同時測定系の検討
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋隆一
2. 発表標題 質量分析法による11疾患ライソゾーム酵素活性同時測定系の検討
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 質量分析法を用いたライソゾーム病原因酵素の酵素活性測定値について
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之
2. 発表標題 質量分析法による11疾患ライソゾーム酵素活性同時測定系の検討
3. 学会等名 第46回日本マススクリーニング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平麻里、奥山虎之、真嶋隆一
2. 発表標題 質量分析法を用いたヒト血漿LysoGb3の定量分析
3. 学会等名 第24回日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2. 発表標題 Quantification of 11-plex enzyme activity of lysosomal storage disorders using LC-MS.
3. 学会等名 2019 APHL Newborn Screening and Genetic Testing Symposium, Chicago, USA. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2 . 発表標題 Quantification of 11-plex enzyme activity of LSDs using LC-MS/MS.
3 . 学会等名 67th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, Georgia, USA. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2 . 発表標題 Quantification of 11 enzyme activities of lysosomal storage disorders by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
3 . 学会等名 International Conference on Biology of Lipids, Tokyo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2 . 発表標題 Quantification of 11 enzyme activities of lysosomal storage disorders using LC-MS/MS.
3 . 学会等名 SSIEM Annual symposium 2019, Rotterdam, The Netherlands. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2 . 発表標題 Multiplex-measurement of enzyme activity for lysosomal storage disorders using LC-MS/MS.
3 . 学会等名 10th International Society for Neonatal Screening, Hangzhou, China. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Mashima R, Ohira, M, Okuyama T.
2. 発表標題 Multiplex measurement of LSD enzyme activity using LC-MS/MS.
3. 学会等名 16th WORLDSymposium, Orlando, USA. (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------