

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590563

研究課題名（和文） 炎症性腸管疾患の脂質およびアポ蛋白代謝機序と質量分析による病態指標検査法の開発

研究課題名（英文） Analysis of lipid and apolipoprotein reflecting clinical condition of inflammatory bowel disease by mass spectrometry

研究代表者

日高 宏哉（HIDAKA HIROYA）

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：10362138

研究成果の概要（和文）：

炎症性腸管疾患の病態を反映する生化学標識の迅速な測定システムの確立と検査への適用のために、我々はヒト血清で脂質と蛋白質代謝に関する分子異常の濃度、構成と構造を分析した。マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF-MS）やガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて、血清リン脂質およびその代謝産物やシステインやホモシステインなどの含硫アミノ酸で修飾された蛋白の分析法を確立した。疾患患者では、炎症指標は高値であったが、脂質、アポ蛋白、含硫アミノ酸は低値傾向であり、リン脂質組成は特徴的なプロファイルを示した。

研究成果の概要（英文）：

For investigation of a rapid measurement system and its application to a laboratory study of the biochemical markers reflecting the clinical condition of inflammatory bowel disease, we analyzed the concentration, composition, and structure of molecular abnormalities of lipid and protein metabolism in human serum. We established methods for analysis of phospholipids and their metabolites, as well as modified protein with sulfur-containing amino acids, cysteine, and homocysteine, using matrix-associated ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), gas chromatography electron impact mass spectrometry (GC/MS), and high-performance liquid chromatography (HPLC). The inflammation index of the patient was high, but levels of lipids, apoproteins, and sulfur-containing amino acids were low, and the phospholipids showed a characteristic composition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学, 脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性の腸管疾患は増加傾向に有り、特に消化器全般の慢性炎症性疾患は若年者で増加していることが報告されている。炎症性の腸管疾患の分子レベルでの発症や悪性化原因として炎症性生理活性物質が注目されているが、その詳細は明らかでない。そのため、本疾患では、内科治療効果は悪く栄養療法が用いられていることが多い。

疾患の発生率は動物性脂肪の摂取量と比例し、多価不飽和脂肪酸の $\omega 3$ 系/ $\omega 6$ 系比(抗炎症性脂肪酸/炎症性脂肪酸比)と反比例することや、細菌感染とリポ蛋白代謝の関係や、リン脂質とその代謝産物(リゾリン脂質)の脂質メディエーターとしての関与など、炎症性の腸管疾患では脂質代謝との密接な関係が注目されている。しかし、食餌や脂肪組織などからの血流中への脂質の吸収・分泌障害、脂質の脂肪酸組成異常、血漿中での脂質代謝機序などが十分に明らかでない。しかも、その臨床検査の指標は、まだ十分に確立されていないのが現状である。臨床栄養や治療経過(症状の悪性度や予後)の判定などのための指標の分析とその臨床検査プロトコールの作成が不可欠である

2. 研究の目的

本研究では、炎症性の腸管疾患における脂質の吸収および分泌障害機序、血清リポ蛋白脂質代謝異常と機能障害機序を解明するため、血清中のリポ蛋白、脂質、リン脂質およびその代謝産物、脂質の脂肪酸側鎖、血漿微量金属、含流アミノ酸などの測定系の開発を行う。次いで、臨床評価のプロトコールの作成を行い、炎症性の腸管疾患の発症原因、生理学的機序、病態の解明に寄与する。

3. 研究の方法

血清リポ蛋白中の脂質やアポ蛋白の量的および質的分析のため、脂質の代謝異常や脂質代謝に関わるアミノ酸や生体微量金属などの分析法を作成する。脂質分画やその代謝物やアポ蛋白などの定量分析としてのマイ

クロプレートを用いた特異性の高い測定系を構築する。リン脂質およびその代謝産物分析のためにマトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)、脂肪酸組成分析のためにガスクロマトグラフィ質量分析法(GC/MS)、脂質分別のために薄層クロマトグラフィ法(TLC)を臨床検査に適用できるように構築する。アポ蛋白の分析・精製および含流アミノ酸分析のために高速液体クロマトグラフィ法(HPLC)、アミノ酸修飾アポ蛋白分析のためにMALDI-TOF-MS法を構築する。生体微量金属分析は、原子吸光分析を用いて、簡易な検体処理法により測定迅速化と簡易化をはかる。これらの方法を統合して、腸管疾患の脂質代謝異常の指標の検出を行なうための臨床検査プロトコールを作成する。

4. 研究成果

血清およびリポ蛋白中の脂質分画およびアポ蛋白の分析のために酵素法および免疫比濁法を用いたマイクロプレート法を確立した。特にコリン含有リン脂質亜分画の測定として、特異的リン脂質分解酵素によるホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリン(SM)の定量法を開発し、リン脂質代謝産物のリゾホスファチジルコリン(LPC)、ホスホコリン、コリンの測定法が可能となった。次いで、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF-MS)による血清リン脂質分析の基礎的研究を行い、血清リン脂質分子の脂肪酸側鎖の違いを簡易に検出する分析法を確立した。MALDI-TOF-MSにより脂肪酸側鎖別の血清リン脂質分子を定量的な測定を行うための測定条件の検討を行った結果、PC、SM、LPCを定量的に測定が可能であることを見いだした。さらに酵素法と質量分析法を組み合わせることにより、脂肪酸側鎖別の血清リン脂質分子の定量的な測定が可能となった。

血清中の脂肪酸組成の分析として、脂肪酸メチルエステル化してガスクロマトグラフィ質量分析計(GC/MS)による迅速分析法を確立した。有機溶媒により血清脂質(内部標準物質を添加)を抽出し、薄層クロマトグラ

フィー (TLC) で血清脂質を分画しゲルをかき取った後、ゲルに塩酸メタノールを加えて電子レンジで処理することで、脂質にエステル結合した脂肪酸をメチルエステル化できた。その後、ヘキサン抽出後 GC/MS で測定した結果、再現性および直線性に優れた測定結果が得られた。本測定プロトコールにより、従来の方法に比べて数倍迅速に血清から脂肪酸組成の分析ができ、臨床検査への適用が可能となった。

リン脂質代謝産物の生成機序を観察するために、血清高比重リポ蛋白 (HDL) やリン脂質標品に脂質分解酵素を反応させて、その生成物を MALDI-TOF-MS で分析した。その結果、PC の分解比率と LPC の分解比率に差が生じたことを観察した。さらに PC、LPC リポソームを作成して、脂質分解酵素の反応性を観察した結果、PC の分解より LPC 方の分解率が高く、また脂肪酸側鎖により分解の差があることが見いだされた。これより、脂質分解酵素の特異性などを観察する方法として、MALDI-TOF-MS 分析が適用できることを示した。

脂質の吸収および代謝に関わるリン脂質の組成および代謝について検討した。血清 PC および代謝産物である LysoPC の定量的分析法を、MALDI-TOF-MS を用いた内部標準法により確立した。LysoPC は主に高比重リポ蛋白 (HDL) に分布していたが、LysoPC/PC 比率の変化は、脂質負荷の影響を受けることが見いだされた。リン脂質分解酵素の機能に影響を与えると考えられる含硫アミノ酸は、アポ蛋白に結合して血清リポ蛋白全体に分布しており、その含硫アミノ酸組成比率はほぼ同様であったが、蛋白あたりの結合比率はアポ蛋白により異なっていた。含硫アミノ酸の結合比率の差は、リン脂質分解酵素に影響をあたえる可能性が示唆された。ついで、患者血清から抽出した脂質試料の MALDI-TOF-MS 分析を行ったところ、リン脂質分子で健常者より脂肪酸側鎖の小さい分子が検出された。またリン脂質代謝産物においても同様に検出された。これらの分子は、脂肪酸側鎖の二重結合の数の差 (飽和脂肪酸が不飽和脂肪酸に置き換わっている) によるものと、炭素数の短い分子によるものであった。今後、食事内容や栄養液成分などと比較する必要がある

が、健常者と異なる血清リン脂質組成のリポ蛋白中での代謝機序を検討する必要がある。

クローン病患者 (倫理承認済み) の生化学検査において、血清総コレステロール (TC) は $140.4 \pm 48.8 \text{ mg/dL}$ と低値傾向であったが、中性脂肪の平均濃度は $112.7 \pm 54.4 \text{ mg/dL}$ であったが、 $32\text{--}227 \text{ mg/dL}$ と幅広い分布を示した。アポ蛋白分析から HDL や LDL は粒子数の減少を示した。低 TC 血症患者 ($129.3 \pm 31.6 \text{ mg/dL}$) の炎症度は高く (CRP: 2.43 mg/dL)、また活動度の評価インデックス (IOIBD スコア: 0-5 点で基準値は 0 点) も悪く (平均 1.8)、患者脂質濃度が炎症度と関連していた。

生体微量金属は、消化器からの吸収や炎症性や酸化ストレスの評価として原子吸光分析計により検討した。血清亜鉛および血清セレンとも酸性前処理により試料調製ができ、血清亜鉛はフレイム原子化法、血清セレンはグラファイトアトマイザ原子化法による測定プロトコールを作成した。疾患患者のセレンと亜鉛の血清濃度の平均値は、Zn: $759.3 \pm 211.0 \text{ ng/mL}$ 、Se: $142.0 \pm 13.5 \text{ ng/mL}$ (参考基準値はそれぞれ $650\text{--}11000 \text{ ng/mL}$, $106\text{--}174 \text{ ng/mL}$)、いずれも基準値内であったが、亜鉛は症例の約 2 割が基準値より低値であり、セレンは 3% であった。血清亜鉛およびセレン共に、総蛋白、アルブミンやトランスサイレチン (TTR) と相関係数 $0.40\text{--}0.69$ の弱い正相関を示し、LDL-C または TG と弱い正相関を示した。他の研究者らの報告では、炎症性消化器疾患の血清亜鉛およびセレンのいずれも低値となるとされており、血漿蛋白や脂質濃度との関連性があり、栄養状態や酸化ストレス度など病態の重症度との関連性が示唆された。

血清中トランスサイレチン (TTR) は、サイロイドホルモンやビタミン A の血中運搬に関わり、短期血漿蛋白代謝の指標としての栄養評価項目の 1 つであり、急性相反応物質として炎症状態の指標である。この TTR への含硫アミノ酸 (ホモシステイン; Hcy、システイン; Cys) の結合増加が、TTR 分子の変性を引き起こす一因となっている。この含硫アミノ酸の結合は蛋白の酸化に関連し、酸化ストレスに抵抗性が減弱化すると考えられている。また、Hcy は動脈硬化症の独立した危険因子であり、アポ蛋白への含硫アミノ酸の結合は

アポ蛋白の機能に影響すると考えられている。心血管障害の発症率の高い透析患者で、含硫アミノ酸は健常者の数倍の高値を示し、含硫アミノ酸濃度に比例して蛋白への結合量が増加した。しかし、炎症性腸疾患では、Hcy および Cys とも血清総濃度(t)、蛋白非結合型(f)、蛋白結合型(b=t-f)濃度の平均は、t-Cys: 108.1±20.5mg/dL, f-Cys: 6.1±3.4 mg/dL, b-Cys:102mg/dL, t-Hcy:5.7± 3.3 mg/dL, f-Hcy:0.8± 0.7 mg/dL, b-Hcy:4.9 mg/dL であり、いずれも健常者より低値を示した。この結果は、他の研究者らの報告とは異なっており、今回の症例では、血漿蛋白の酸化度やアポ蛋白などの機能性蛋白への影響が少ない可能性を示唆した。また、TTR やアポ蛋白濃度も低値傾向を示し、これらの蛋白への含流アミノ酸の影響は少ないことが考えられた。血清中の含硫アミノ酸濃度のモニターにより、含硫アミノ酸濃度を低値に維持することで、炎症性であっても酸化ストレスを低く抑えられる可能性が示唆され、本疾患の現在の治療方法との関連が注目される。

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7件)

- ① 日高宏哉, MALDI-TOF MS と酵素法による血清リン脂質の分析, 臨床化学, 40, 45-53, 2011. 査読無
- ② 塩澤 勉, 中村啓章, 田村克彦, 長澤正樹, 羽生 登, 本田孝行, 日高宏哉, 透析患者におけるホモシステインと透析療法の検討, 腎と透析・ハイパフォーマンス・メンブレン' 10, 69, 164-169, 2010. 査読有
- ③ Hongo M, Hidaka H, Sakaguchi S, Nakanishi K, Ichikawa M, Hirota N, Tanaka N, Tsuruta G, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U, Koike K, Circulation Journal, 74, 1570-1577, 2010. 査読有
- ④ Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N, Hidaka H, Kondo M, Allsop D, Nakagawa M, High-molecular-weight {beta}-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients, FASEB J, 24:2716-2726, 2010. 査読有
- ⑤ Hanyu N, Shimizu T, Yamauchi K, Okumura N, Hidaka H, Characterization of cysteine and homocysteine bound to human serum trans-thyretin. Clin Chim Acta, 403, 70-75, 2009. 査

読有

- ⑥ Hidaka H, Yamauchi K, Ota H, Akamatsu T, Honda T, Katsuyama T, Specific, rapid, and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in serum and lipid extracts, Clinical Biochemistry, 41, 1211-1217, 2008. 査読有
<https://soar-ir.shinshu-u.ac.jp/dspace/handle/10091/2985>
 - ⑦ 日高宏哉, ヒト血清中コリン含有リン脂質とその脂肪酸組成, 生物試料分析, 31, 271-282, 2008. 査読無
- [学会発表] (計19件)
- ① 羽生 登, 塩澤 勉, 田村克彦, 長澤正樹, 山下 峰, 日高宏哉, 透析療法患者の血清中ホモシステインとシステイン濃度の検討, 第21回生物試料分析科学年次学術集会, 2011.2.20, 松山
 - ② 山下 峰, 日高宏哉, MALDI-TOF MS による血清リゾホスファチジルコリン定量の検討, 第21回生物試料分析科学年次学術集会, 2011.2.19, 松山
 - ③ 日高宏哉, MALDI-TOF MS と特異的酵素定量法による血清リン脂質分子分析法の開発(学術賞受賞講演), 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ④ 羽生 登, 塩澤 勉, 田村克彦, 見谷敦司, 日高宏哉, 本田孝行, 透析療法患者の血中含硫アミノ酸濃度の検討, 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ⑤ 山下 峰, 滝脇正貴, 日高宏哉, 川崎健治, 菅野光俊, 日高恵以子, 本田孝行, 質量分析によるリゾホスファチジルコリン定量の検討, 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ⑥ 石黒達哉, 山下 峰, 日高宏哉, 川崎健治, 菅野光俊, 日高恵以子, 本田孝行, GC-MS による血清脂肪酸分析の検討, 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ⑦ 村上あや子, 山下 峰, 日高宏哉, 川崎健治, 菅野光俊, 日高恵以子, 本田孝行, 血清アポ蛋白結合含硫アミノ酸の分析, 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ⑧ 滝脇正貴, 宇治義則, 北島 勲, 山下 峰, 日高宏哉, 川崎健治, 菅野光俊, 日高恵以子, 本田孝行, コレステロールエステラーゼ処理における血清HDL脂質の分析, 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010.9.24, 甲府
 - ⑨ 日高宏哉, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 血漿中脂肪酸組成および脂質構成脂肪酸組成の質量分析, 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010.9.12, 東京
 - ⑩ 羽生 登, 塩澤 勉, 田村克彦, 長澤正樹, 川崎健治, 菅野光俊, 日高恵以子, 本田孝行, 日高宏哉, 透析患者の血清中ホモシステイン

とシステイン濃度の HPLC 法による分析, 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 2010.9.10, 東京

- ⑪ 日高宏哉, 滝脇正貴, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 武富保, MALDI-TOF MS によるコレステロールエステル標品のリン脂質分解能の分析, 第 52 回日本脂質生化学, 2010.6.15, 群馬
- ⑫ 日高宏哉, 滝脇正貴, 見谷敦司, 菅野光俊, 川崎健治, 本田孝行, 脂質負荷試験における血漿中脂質濃度およびコリン含有リン脂質組成の変動, 第 49 回日本臨床化学会年次学会, 2009. 9. 20, 長崎
- ⑬ 滝脇正貴, 見谷敦司, 菅野光俊, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉, 血漿中コリン含有リン脂質の MALDI-TOFMS による分析. 第 49 回日本臨床化学会年次学会, 2009. 9. 20, 長崎
- ⑭ 見谷敦司, 滝脇正貴, 菅野光俊, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉, ヒト血漿中の含硫アミノ酸結合リボ蛋白の分析, 第 49 回日本臨床化学会年次学会, 2009. 9. 20, 長崎
- ⑮ 日高宏哉, 滝脇正貴, 見谷敦司, 菅野光俊, 川崎健治, 本田孝行, 武富保, 脂質負荷試験における血漿中コリン含有リン脂質の MALDI-TOF MS による分析, 第 51 回日本脂質生化学学会, 2009. 7. 30, 名古屋
- ⑯ 見谷敦司, 滝脇正貴, 開美絵子, 羽生登, 山内一由, 本田孝行, 日高宏哉, 血清トランスサイレチンの分子変性の検討, 第 19 回生物試料分析科学会大会, 2009. 2. 22, 名古屋
- ⑰ 滝脇正貴, 見谷敦司, 菅野光俊, 川崎健治, 山内一由, 本田孝行, 日高宏哉, MALDI-TOF 質量分析による血清リン脂質分析の基礎的研究, 第 19 回生物試料分析科学会大会, 2009. 2. 22, 名古屋
- ⑱ 日高宏哉, 滝脇正貴, 見谷敦司, 小林麻衣子, 菅野光俊, 川崎健治, 山内一由, 本田孝行, リン脂質分画の酵素定量法の開発と臨床的意義, 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 2008. 11. 29, 名古屋
- ⑲ 羽生登, 清水敏夫, 菅野光俊, 川崎健治, 山内一由, 本田孝行, 日高宏哉, 血清中システイン化トランスサイレチンの分析と臨床的意義, 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 2008. 11. 28, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 宏哉 (HIDAKA HIROYA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号 : 10362138

(2) 研究分担者

太田 浩良 (OTA IROYOSHI)
信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 50273107

本田 孝行 (HONDA TAKAYUKI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号 : 80238815

赤松 泰次 (AKAMATSU TAIJI)
信州大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号 : 80212413

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

滝脇正貴 (TAKIWAKI MASAKI)
信州大学大学院・医学系研究科・博士前期課程
研究者番号 : なし

見谷敦司 (MITANI ATSUSHI)
信州大学大学院・医学系研究科・博士前期課程
研究者番号 : なし

山下 峰 (YAMASHITA MINE)
信州大学大学院・医学系研究科・博士前期課程
研究者番号 : なし

