

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05569

研究課題名(和文) 発がんリスク指標DNA損傷体の分析における実用・定量性の追求と革新的感度の獲得

研究課題名(英文) Research for practical and quantitative analysis methods of DNA damage base as a cancer risk index and for acquisition of innovative sensitivity of them

研究代表者

江坂 幸宏 (Esaka, Yukihiro)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70244530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：発がんリスクマーカーとしての核酸損傷塩基の高感度分析法の開発を行った。LC/MS/MSを用いた実用性の高い手法とともに、極めて先進的なキャピラリー電気泳動場での微小体積内、高倍率濃縮とナノESI-MSシステムを組み合わせた、極めて先進的かつ超高感度分析法も開発に成功した。それらを実分析応用に適用するための検討を主としてヒト由来培養細胞を題材に行った。また、損傷体分析結果をアルキル化抗がん剤の治療効果を高めるための指標に適用するための検討を行い、有用な知見を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長寿社会になった先進国、特に日本では、健康寿命を延ばすことが社会保険費の削減に極めて効果的であり、喫緊の課題になっている。本研究は、老いの本質の一つと言えるDNA、RNAの損傷の蓄積状況を、量と内容から分析するための方法論の開発をおこなったものであり、この計画の遂行の結果、実用的な方法と極めて高感度な方法が開発された。本研究の成果は、検診での損傷体分析の実現を近づけるものである。加えて、本法は、日本人の半分が罹患するがんの薬物治療効果を高めるための薬効のパロメーターとして損傷体を分析することにも役立つ方法にもなった。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method for analyzing nucleic acid damaged bases as carcinogenic risk markers. Along with the development of a highly practical method using LC/MS/MS, we have also succeeded in developing an ultra-sensitive analytical method that combines high-magnification concentration within a microvolume in a capillary electrophoresis field with a nano-ESI-MS system. Studies for applying them to practical analysis applications were carried out mainly using human-derived cultured cells. In addition, we studied the application of damage analysis as an index for enhancing the therapeutic effect of alkylating anticancer drugs and obtained useful knowledge.

研究分野：分析化学

キーワード：DNA損傷 RNA損傷 発がんリスクマーカー LC/MS/MS CE濃縮;ナノESI-MS グリオーマ テモゾロミド 飲酒

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生物個体が一生を全うするためには、その固有の DNA の遺伝情報を変わずに維持することが必要である。しかし、化学物質としての DNA は、むしろ周辺環境に存在する様々な分子と比較容易に反応し、日常的な太陽光による変性も受け、塩基構造の変異が起こる。生命の維持は、その修復が迅速に、継続的に行われていることで支えられている。長寿社会の日本ではガンによって死を迎える人が最も多いが、それは損傷の発生と修復のバランスが崩れることによって始まる。損傷の原因と個人の修復の能力を知ることで、個人が生活と習慣を見直し、健康寿命を延ばすことができれば、個人と社会にとっての恩恵は極めて大きなものになる。そのために、個人の発がんリスクを表す通知表としての DNA の損傷状況を分析する手法の確立が求められている。

発がん物質と知られる有名なベンツピレン、活性酸素以外にも、身近な変異原物質が多く知られてきた。2000 年以降には、疫学研究を契機に、飲酒由来の発がんを支持するアセトアルデヒドによるグアニン変異の化学的ルートが示されるようになった。ターゲットとなる損傷体の種類は増加している。これらを総合的に分析することは実は容易でない。数億の正常塩基の中に 1 つ程度の頻度で存在する様々な損傷体の分析には、適切でデリケートな前処理と高度な分離分析法、きわめて高い感度と選択性を有する質量分析法を駆使した手法の開発と整備が必要になる。研究レベルでの生体 DNA 中の損傷体分析の報告はさまざまになされているが、実際に検診レベルで使用可能な方法は、依然として確立されていない。

2. 研究の目的

本計画の目的は、まず、①生体 DNA、RNA を対象に、数億に 1 つの頻度で存在する多種の損傷体を、日常的に検査可能な感度で定量できる実用的な手法の確立、②より微量な損傷体の分析を可能にする現在可能な最高レベルで高感度な手法の開発を行うことである。そして、③これらの整備された手法を医薬学の分野で活用することである。その応用の内容では、日常的な損傷に加えて、抗がん剤による損傷もターゲットにし、治療の目安に役立つ情報の獲得を目指した。

3. 研究の方法

①について：LC/ESI-MS/MS 法を分析法の基盤とし、主として ESI におけるイオン化効率の向上を主戦略にした飛躍的な感度向上を目指した。具体的には、検出形態の選択、溶離液組成の揮発性とイオン化促進性能の観点からの最適化を行った。また、定量性の確保の観点から、ターゲット損傷体の同位体内部標準物質の合成を行った。また、DNA、RNA から損傷体を高効率で切り出す方法、MS 分析を干渉する正常塩基等のマトリックス成分を除去する固相抽出剤の合成を検討した。

②について：CE による μL から nL 体積への微小体積・高倍率濃縮とナノ ESI-MS/MS 検出を結合した超高効率検出法を開発し、それによる飛躍的な絶対感度獲得を目指した。

③について：将来の生体血液、組織分析を想定した培養細胞、動物肝臓試料をモデル試料とした損傷体分析を①②で開発した手法で検討した。培養細胞では変異原物質の共存下での培養の結果、DNA 上に生じる変異体の検出を行った。一方で、抗がん剤による変異体形成を追跡する方法を確立し、抗がん作用と変異体形成の相関を観察し、抗がん剤の投与戦略に有用な知見の獲得を目指した。

多くの検討は、飲酒由来の損傷グアニンを検出ターゲットとして追跡した。抗がん剤による損傷体ではメチル化グアニンを追跡した。

4. 研究成果

1. LC/MS/MS をプラットフォームとする実用発がんリスク検査法の包括的開発：

1) 損傷体切り出し条件、干渉成分除去条件の最適化：

飲酒由来損傷体にフォーカスし、DNA 損傷体をヌクレオシド形態、および塩基形態で定量的に回収する方法を確立した。即ち、前者では、アセトアルデヒド損傷体(グアニン付加体)を、1 時間で定量的に 5' -dXMP に切り出すヌクレアーゼとして Ba131 を見出した。後者については、0.1 M HCl 中、80°C、1 時間の条件で完全な解離を確認した。

RNA については、酵素反応での回収が不十分であることが示され、120°C、ギ酸と塩酸の混合作用条件での定量的回収条件を確立した。

干渉成分(主に膨大な正常塩基の大半)の除去目的の固相抽出条件を綿密に検討し確立した。また、固相処理する場合に、極性の高い塩基体は添加時に保持が十分にしにくいことが判明し、諸条件検討した結果、水でなく、塩溶液への溶解で固相保持が達成された。

対象をメチル化グアニンへ拡大した。即ち、生体 DNA に検出される主なアルキル化グアニンの一部である O6 メチルグアニン、N7 メチルグアニンを新たな対象とした定量法を確立した。

2) ESI 効率向上による MS 検出感度向上：

移動相組成が有機溶媒主体の HILIC の採用、重炭酸アンモニウムの添加により、ESI を促進することで感度を 2 桁程度向上した。様々な条件下で詳細なプロダクトイオンの分析を行い、添加

による過渡的中間体の形成の可能性を示した。

3) 前処理抽出基材の開発：核酸塩基の回収のために、核酸塩基やポリエチレンジアミンで表面修飾した固定相を開発し、特徴的な濃縮水層が形成される新規固定相の開発を行った。さらに、充填剤を化学的に架橋して、ペレット状に形成し、多検体簡易処理に有用な簡易使用を可能にする方法を確立した。

4) 重水素化内部標準の整備：重水素化アセトアルデヒドを用いた安価な損傷体同位体 IS のヌクレオシド体および塩基体の製造に成功した。

5) 実試料分析への展開：肝臓細胞から抽出した DNA 中の損傷分析に展開した。

2. キャピラリー電気泳動 (CE) オンライン濃縮-ESI-MS 検出による革新的絶対感度獲得：

酸性条件下で損傷塩基をカチオン状態にして、大量注入電場増強スタッキングと過渡的等速電気泳動を組み合わせた LDIS 法により 1 μ L 試料から 1000 倍濃縮し、本法を CE-シーストレス ESI-MS /MS と組み合わせることで数アトモルの損傷塩基の検出を達成した。(図 1, 2)

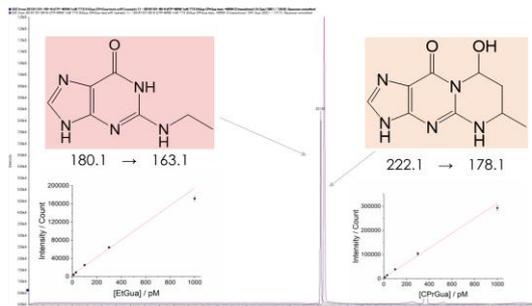


図 1. LDIS-CZE-MRMによるEt-Gua及びCPr-Gua (10 nM each in 1 μ L)の検出

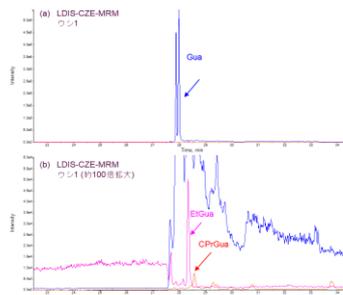


図 2. LDIS-CZE-MRMによるウシ由来試料NO.1の分析結果.

3. 医薬学への本法の応用の検討：

1) 実試料中の飲酒由来損傷体の分析：アセトアルデヒド (AA) 共存下でのヒト肝がん細胞の培養で、AA 濃度依存的な飲酒由来損傷体の発現を確認した。

2) 抗がん剤の効果指標としてのメチル化グアニン分析への展開：抗がん剤によって生じた培養グリオーマの DNA 中のメチルグアニンの定量を通して、より効果的な化学療法を実行するために有用な知見を獲得した。即ち、グリオーマ培養細胞 DNA 中の抗がん剤テモゾロミド (TMZ) によって発生したメチル化体を定量し、修復酵素 O6 メチルグアニン DNA トランスフェラーゼ (MGMT) の発現量との相関、経時的な変動、MGMT の阻害剤の効果について検討した。MGMT 高発現 (TMZ 耐性) と低発現のグリオーマへの TMZ 投与とメチル化グアニン量の分析を行い、メチル化の差を定量的に確認した。また、MGMT の阻害剤の添加が TMZ の効果を高めることを示唆する結果が得られた。

3) RNA 損傷の研究：生命のレギュレーションを担う RNA について、同じ損傷条件で、DNA 中より 20 倍ほど高い頻度で RNA 中に飲酒由来損傷体が見いだされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Hideki, Kawashima Nana, Yamamoto Takahiro, Nakama Mina, Otsuka Hiroki, Ago Yasuhiko, Sasai Hideo, Kubota Kazuo, Ozeki Michio, Kawamoto Norio, Esaka Yukihiro, Ohnishi Hidenori	4. 巻 44
2. 論文標題 <i>In vitro</i> functional analysis of four variants of human asparagine synthetase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12408	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 該当する
1. 著者名 MIKI Yuta, MURAKAMI Hiroya, IIDA Keisuke, UMEMURA Tomonari, ESAKA Yukihiro, INOUE Yoshinori, TESHIMA Norio	4. 巻 38
2. 論文標題 Preparation and Evaluation of Molding-type Solid-phase Extraction Media Binding with Commercially Available Adhesives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 307 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21P265	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 該当する
1. 著者名 ESAKA Yukihiro, ARUGA Hiromitsu, KUNISHIMA Saki, YAMAMOTO Takehei, MURAKAMI Hiroya, SAWAMA Yoshinari, SAJIKI Hironao, UNO Bunji	4. 巻 36
2. 論文標題 Preparation of <i>N</i>²-Ethyl-2 -deoxyguanosine-<i>d</i>₄ as an Internal Standard for the Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometric Determination of DNA Damage by Acetaldehyde	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 877 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19N034	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 Murakami Hiroya, Omiya Miho, Miki Yuta, Umemura Tomonari, Esaka Yukihiro, Inoue Yoshinori, Teshima Norio	4. 巻 217
2. 論文標題 Evaluation of the adsorption properties of nucleobase-modified sorbents for a solid-phase extraction of water-soluble compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 121052 ~ 121052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2020.121052	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 MIKI Yuta, MURAKAMI Hiroya, IIDA Keisuke, UMEMURA Tomonari, ESAKA Yukihiro, INOUE Yoshinori, TESHIMA Norio	4. 巻 36
2. 論文標題 Molding-type Solid-phase Extraction Media Glued with Commercially Available Adhesives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1153 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20C012	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 MURAKAMI Hiroya, SUGIYAMA Takuya, MIKI Yuta, UMEMURA Tomonari, ESAKA Yukihiro, INOUE Yoshinori, TESHIMA Norio	4. 巻 36
2. 論文標題 Development and Evaluation of HILIC-type Sorbents Modified with Hydrophilic Copolymers for Solid-phase Extraction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20P084	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 濱田修作, 高須蒼生, 山本拓平, 山本拓平, 宮城清弦, 中村信介, 嶋澤雅光, 原英彰, 江坂幸宏, 江坂幸宏
2. 発表標題 LVSEP-CZE 間接吸収検出法による虚血性疾患時に変動する網膜中有機酸定量に関する研究
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川一輝, 西山悠太, 高須蒼生, 山本拓平, 村上博哉, 江坂幸宏
2. 発表標題 DNA付加体のLC/MS/MS分析法構築-プリン塩基形態での分析
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木 雄太, 村上 博哉, 後藤 万凜, 梅村 知也, 江坂 幸宏, 井上 嘉則, 手嶋 紀雄
2. 発表標題 化学結合を利用した吸着剤粒子の成形技術の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎裕也, 加茂田玲奈, 江坂幸宏, 梅村知也
2. 発表標題 BAL31固定化マイクロリアクターによるデオキシヌクレオチドの迅速切断
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江坂幸宏, 吉川一輝, 村上博哉, 川井隆之
2. 発表標題 LDIS-CZE-ESI-MS法による超高感度DNA損傷分析に関する研究
3. 学会等名 第41回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田修作, 徳橋侑紀, 高須蒼生, 山本拓平, 江坂幸宏
2. 発表標題 LVSEP-CZE-間接吸収検出法及びCZE-C4D検出法による生体イオン成分の未修飾定量分析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江坂 幸宏、濱田 修作、宮城 清弦、原 英彰、廣川 健
2. 発表標題 LVSEP-CZE 間接吸収検出法による網膜中コハク酸定量法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究紹介 https://www.gifu-pu.ac.jp/lab/bunseki/post.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
---------	---------