

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06507

研究課題名(和文) 定量の正確性を担保したターゲットリポミクス解析法の開発とその臨床的応用

研究課題名(英文) Development of targeted lipidomics analysis with accurate determination method and its clinical application

研究代表者

巴山 忠 (Hayama, Tadashi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：90549693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ジアシルグリセロール(DAG)類の正確な測定法の開発を行った。本研究にて開発した方法では、Bligh-Dyer法による脂質抽出液から、フルオラス溶媒抽出によってリン脂質(LCMS測定におけるマトリックス効果の主原因)の選択的除去を行うことができる。本法を血中DAG類の測定に適用したところ、リン脂質は99.9%以上除去されており、マトリックス効果を受けず、正確にDAG類の測定を行うことが可能であった。さらに、本法の実用性と有用性をうつ病患者由来の血液試料に適用して検証し、関連疾患におけるDAG類のバイオマーカーとしての利用可能性を示唆する結果が得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジアシルグリセロール類は、種々の疾患との関連が報告されている。しかしながら、生体内には多種多様の脂質類が存在しており(とくにリン脂質の妨害を受けやすいこと)、必ずしも正確な測定を行うことは限らない。そこで本研究では妨害となるリン脂質を選択的に除去することで、ジアシルグリセロール類のLC-MS定量における正確性を担保することとした。実際に、本法をうつ病患者から得られた臨床試料(血液)に適用したところ、その正確な定量値から健常人の有意差を見出すことが可能であった。今後、このような疾患のバイオマーカー測定法として早期診断や治療効果判定などに大きく貢献できることを期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an accurate method for determining diacylglycerols (DAGs) in human plasma using a fluorous solvent extraction method followed by LC-MS analysis. The lipid mixture in the plasma was extracted using the Bligh-Dyer method, and then, the resulting solution was subjected to fluorous solvent extraction to remove phospholipids via the specificity of fluorous affinity by forming a complex with a perfluoropolyethercarboxylic acid-lanthanum () salt. The remaining DAGs in the non-fluorous solvent could be directly injected into the LC-MS/MS system. The removal rate of the phospholipids through the fluorous extraction was more than 99.9%; thus, the matrix effect-eliminating analysis of DAGs in human plasma with LC-MS was enabled. Furthermore, the applicability of this method and the possibility of using DAGs as biomarkers were demonstrated by applying this method to human plasma obtained from the major depressive disorder as a related disease.

研究分野：Analytical Chemistry

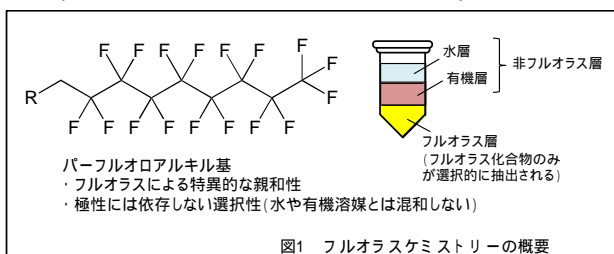
キーワード：ジアシルグリセロール 液体クロマトグラフィー/質量分析計 マトリックス効果 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内における脂質類の網羅的解析に焦点を当てた「リポドミクス」に注目が集められており、生活習慣病（ガンや肥満など）、循環器疾患や脳疾患などの疾病に対する有効なマーカーの発見のみならず、それらの病態解明へと貢献できる可能性があるものとして大きく期待されている。これら脂質類は、例えば、癌やアルツハイマー病（*Nat. Med.*, **20** (2015) 415 など）などの疾病の他、うつ病など精神疾患（*J. Neural. Transm.*, **122** (2015) 487 など）にも関与していることが報告されている。とくに、グリセロ脂質の一つであるジアシルグリセロール類（DAGs）は、リン脂質やグリセロ糖脂質の生合成における中間体や前駆体として知られているが、心肥大、糖尿病や脂肪毒性などのインスリン抵抗性関連疾患に関与していることが報告されている他、中枢疾患との関連性も指摘されている（*J. Alzheimers Dis.*, **48** (2015) 537 など）。これら脂質類の測定には、LC/MS 法が多用される。しかしながら、その測定は必ずしも容易なものではない。とくに、多成分の一斉測定では、試料共存成分による影響（例えば、ESI イオン源におけるイオン化干渉に起因するマトリックス効果など）を無視できない場合が多々あるため、LC/MS 測定における定量の正確性については議論の余地が多分にある。近年のオミクス研究では、測定対象物質の数（網羅性）にばかり気を取られがちであるが、網羅性と定量性は必ずしも両立できるわけではなく、定量性の拙さを数の多さで補っている一面があることを必ずしも否認しない。例えば、リポドミクスによる網羅的解析における問題点として、ホスファチジルセリンの測定の場合はホスファチジルコリン（*Anal. Chem.*, **88** (2016) 9103）が、リゾホスファチジン酸の場合はリゾホスファチジルコリン（*J. Chromatogr. B*, **877** (2009) 3739）が、それぞれの定性あるいは定量を妨害してしまうことなどが報告されている。すなわち、測定結果の正確性の是非が、バイオマーカーを有効利用するにあたって極めて重要であり、そのための測定方法を開発していくことが強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では「フルオラスケミストリー」の概念を取り入れた前処理(抽出法)を施すことにより、対象となる脂質の定量性を向上させることとした。我々の研究室では、これまでに測定対象への選択性を極端に向上させることで定量の正確性を担保するといった方法論を開発し、種々の生体試料の分析へと応用してきた（例えば、*J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1074-1075** (2018) 86 や *Talanta*, **156-157** (2016) 1 など）。本研究では、これまでの研究で得られた知見を応用して対象脂質の LC/MS 測定における定量性を飛躍的に向上させ得る方法を開発し、それによるターゲットリポドミクス（臨床適用）を実施することを目的とした。この「フルオラス」とは、「親フッ素性の」という意味の造語であり、パーフルオロアルキル構造をもつ化合物同士が示す極性に依存しない特異的な親和性のことを指す。パーフルオロアルキル基を有する化合物は、パーフルオロアルカン類（例えば、パーフルオロヘキサン）などのフルオラス溶媒（水や多くの有機溶媒とは一切混合しない）やパーフルオロアルキル担持シリカゲルカラムなどにて極めて選択的に抽出される（図1）。脂質分析に限ったことではないが、LC/MS 測定において正確な定量を妨げる最大の要因は「マトリックス効果」であり、その主原因はリン脂質の一種であるホスファチジルコリン類（PCs）であることが知られている（例えば、*J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50** (2009) 867 など）。本研究では、フルオラスケミストリーによる前処理（液液分配抽出）にて、PCs を試料中から選択的に除去（マトリックス効果を排除）し、対象脂質（PCs 以外）の正確な定量に焦点を当てたターゲットリポドミクスを実施することとした。今回本研究では、測定の対象として DAGs を選択し、検討を行うこととした。図1に示すとおり、フルオラス溶媒を用いた抽出は、非フルオラス層となる溶媒の種類や極性（水や有機溶媒）を問わない。そのため、本法では、血液試料からの総脂質抽出液（Bligh-Dyer 法による）に、直接フルオラス二相系抽出に適用できるといった利点がある。さらに、フルオラス抽出後に得られる溶液（非フルオラス溶媒層）を LC/MS にて直接測定することも可能である。



3. 研究の方法

多くの脂質（DAGs や PCs）は、パーフルオロアルキル構造を有しておらず、直接、フルオラスによる親和性を利用した抽出を行うことはできない。誘導体化反応などによってパーフルオロアルキル基を化学修飾する方法が考えられるが、スループットなどの点において必ずしも有用な方法とはなり得ない。そのため、本研究ではイオンペアや金属キレートアフィニティー（Metal Chelate Affinity, MCA）の原理を利用した抽出を行うこととした。すなわち、フルオラス溶媒抽出を行うための「媒体」として、PCs がもつリン酸基やコリン基を捕捉可能な官能基かつフルオラス性をもつ試薬類（図2）を用い、それらとの複合体として PCs のみをフルオラス溶媒

にて抽出・除去することとした。リン酸基をもたない DAGs はフルオラス抽出されることはない。それらを分別することが可能となる。本研究ではまず、本法の基礎的条件を確立するため、フルオラス溶媒の種類・組成や、フルオラス試薬の種類及び濃度など本抽出条件を最適化するとともに、PCs への選択性を詳細に確認することとした。次いで、適当な DAGs 標準品や市販ヒト血液試料を用いて LC/MS 条件の最適化や、それらの定量性・精度（抽出後のマトリックス効果の有無なども含む）などを検証し、本法における詳細なバリデーションを実施した。その後さらに、本法をうつ病患者由来の臨床試料（血液）中 DAGs 測定へと適用し、本法により定量の正確性が担保されたターゲットリポドミクスを実施するとともに、本抽出の前後での測定結果を比較することで本法の有用性を証明することとした。

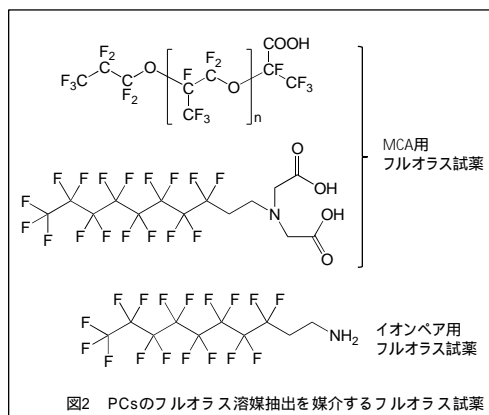


図2 PCsのフルオラス溶媒抽出を媒介するフルオラス試薬

4. 研究成果

本研究では、「フルオラスケミストリー」の概念を取り入れた選択的リン脂質抽出法の開発を目的とした。本法を用いることで、血液試料からリン脂質のみを除去することができ、分析対象であるジアシルグリセロール類（DAGs）を、リン脂質によるマトリックス効果を受けることなく、正確に LC-MS 装置にて測定・定量することが可能となる。本研究ではまず、フルオラス抽出法の基礎的検討を行った。すなわち、フルオラス溶媒であるパーフルオロアルカン類ならびにリン脂質抽出のための媒体として利用する試薬の選定、金属キレートアフィニティー様相互作用を用いて抽出を行うために用いる金属類のスクリーニングの最適化を行った。その結果、パーフルオロポリエーテルカルボン酸を媒体とし、La(III)の存在下、パーフルオロヘキサ中へとリン脂質であるホスファチジルコリン類（PCs）を抽出することができ、このとき試料である非フルオラス溶媒から 99% 以上の PCs が除去されていた（図3）。なお、同条件下において、ジアシルグリセロールはフルオラス溶媒中には全く抽出されないことも確認している。次いで、市販のヒト血清及び血漿への重水素標識化 DAGs 標準添加試料を用いて本法の有用性を検証した。その結果、血中に内在する PCs を本抽出法にて除去することが可能であると同時に、添加した重水素標識化 DAGs のみを LC-MS にて測定することが可能であった。本抽出による効果を確認すべく、抽出の前後における重水素標識化 DAGs 測定におけるマトリックス効果を算出したところ、フルオラス抽出前の状態では、DAGs 添加濃度に対して -60.1~ -20.3 程度のマトリックス効果による定量誤差がみられたが、抽出後の試料からは、-9.2~ 1.5% 程度と、マトリックス効果を大幅に改善できることを証明することができた。標準未添加の市販血液試料を用いて、内在性 DAGs についても本法にて定量可能であることを確認している。

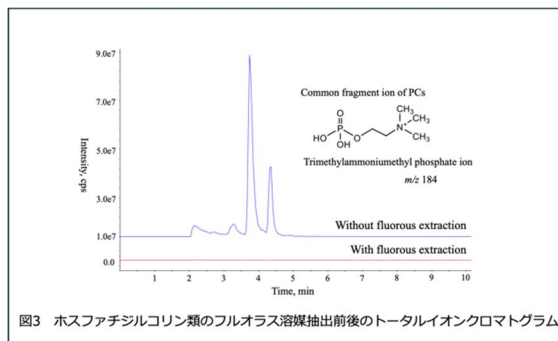


図3 ホスファチジルコリン類のフルオラス溶媒抽出前後のトータルイオンクロマトグラム

最後に、本法の実用性と有用性をさらに検証するため、共同研究先（佐賀大学病院薬剤部）から提供された健常人ならびにうつ病患者から得られた血液試料（倫理申請済み）における DAGs の定量を行い、ターゲットリポドミクスを試みた。DAGs は、うつ病を含む種々の疾患との関連が報告されており、それら疾患のバイオマーカーとしての利用されることが期待されている。しかしながら、既報による結果には必ずしも一貫性がみられているとは限らない。その原因は LC-MS 測定の正確性にあると思われる。実際に、本法を適用せずに測定を行った場合、マトリックス効果によって定量値には大きなばらつきがみられ、試料間の有意差を確認することはできなかった（表1左）。一方、本法を適用した場合、正確に測定された両試料間の血中 DAGs には明らかに差がみられており、そのバイオマーカーとしての利用可能性を十分に示すことをできる結果が得られた（表1右）。

表1 うつ病患者及び健常人における血中DAGsの定量結果

DAG	Found concentration (µg/g lipid)			
	Without fluoruous ext.		With fluoruous ext.	
	Control	MDD	Control	MDD
16:0-16:0	66.8	48.6	139	71.9 *
16:0-18:1	351	240	637	353 *
16:0-18:2	42.0	29.6	78.2	48.8 *
18:0-16:0	109	89.5	216	74.1 #
18:0-18:2	46.9	31.7	95.9	48.9 *
18:0-20:4	8.1	5.2 *	23.8	12.4 #
18:0-22:6	4.2	3.1	22.2	9.2 #
18:1-18:0	446	278	648	313 *
18:1-18:1	1004	655	1755	988 #
18:1-18:2	709	466	1268	748 #
18:2-18:2	1242	878	2425	1444 #

Student t-test, # P < 0.01, * P < 0.05, versus control.

以上のとおり、フルオラス抽出法で、LC-MS 測定におけるマトリックス効果の原因物質である PCs を除去するという試みはこれまでに報告はないものであるが、その有用性を本研究において十分に示すことができた。本研究の成果は、ターゲットリポドミクス及びその関連分野の発展に大きく貢献できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nishijo Nao, Hayama Tadashi, Tomita Ryoko, Fujioka Toshihiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Accurate LC-MS/MS Analysis of Diacylglycerols in Human Plasma with Eliminating Matrix Effect by Phospholipids Using Fluorous Biphasic Extraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14898 ~ 14904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.3c01998	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 一ノ瀬綾斗、合田瞳優、西條 尚、富田陵子、巴山 忠
2. 発表標題 フルオラス二相系によるリン脂質の選択的抽出と蛍光分析
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西條尚、巴山忠、富田陵子、藤岡稔大
2. 発表標題 試料中リン脂質の抽出・除去によるジアシルグリセロール類のマトリックス効果フリーLC-MS/MS 分析
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------