

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06853

研究課題名（和文）同重体タグを利用したリポドミクスー大規模検体に対応できる分析技術の構築

研究課題名（英文）Lipidomics using isobaric mass tags: Development of analytical methodology for large scale samples

研究代表者

徳岡 涼美 (Tokuoka, Suzumi)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任講師

研究者番号：60511376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：同重体タグリポドミクスでは測定ターゲットを増加させた。イオンモビリティを活用することで1検体3分間の短時間測定系を確立した。データ補正のための標準血液試料の準備・検討を実施し十分な量と質を確保して長期の運用を可能とした。多検体血液検体の前処理のスループットを数倍に向上させた。数千検体のデータ処理を可能にするため共同研究者の協力にて新規ソフトウェアの構築を行いデータ解析のボトルネックを解消した。4000検体の血液検体を測定し、血液検査値情報との統合解析を行い、特定の脂質成分同士の間関係とともに、様々な臨床検査値と脂質が特定のパターンで相関することが示され、本手法の有用性が検証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の分析技術の向上によりこれまで解析が難しかった脂質を網羅的に研究するリポドミクスが注目されている。本研究ではヒトの血液検体を用いたリポドミクスの発展のために不可欠な課題解決として、大規模化する測定に耐えうる安定性とスループットの向上を実現する分析手法の構築を行った。数千検体の測定・解析が容易な本分析手法の活用は今後にさらに大規模な検体セットを解析し続けることが可能であり、血液中脂質情報を疾患のバイオマーカー探索や疾患メカニズムの解明へと利用するための研究手法として有用な系となる。

研究成果の概要（英文）：The number of target lipids for isobaric mass-tagging lipidomics was increased. A short time measurement system of 3 minutes per sample was established by utilizing ion mobility. Standard blood samples for data correction were prepared and examined to ensure sufficient quantity and quality for long-term operation. The throughput of the pretreatment procedure of multiple blood samples was improved several-fold. In order to solve the bottleneck of data analysis, new software was built with a collaborator to enable data processing of several thousand samples. Four thousand blood samples were measured, and integrated analysis with blood clinical test value information was performed. Correlations among specific lipid components as well as specific patterns of correlations between various blood clinical test values and several lipids were demonstrated, validating the usefulness of this method.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リポドミクス 脂質 血液検体 質量分析

1. 研究開始当初の背景

近年においてメタボローム研究が発展し、各個人の生体内の状態を把握して疾患の要因の探索や治療法の開発に役立てようとする動きが盛んに行われ始めている。メタボローム研究の中でも、類似した構造が数多くあるためにこれまで分析が困難であった脂質のオミクス解析（リポミクス）は質量分析技術の発展に伴い、数多くの論文が発表されるようになった。

しかし大規模化する測定に耐えうる分析系の安定性とスループットの向上は、質量分析計を用いた研究の課題となっている。ESI-LC/MS/MS を用いた分析は感度が高く、多くの生体分子の定量に有用な測定系である。均一な解析データが得られるモデル動物や細胞と違い、多様性に富むヒト検体を分析して意義のある成果を出すためには大量の検体数が必要となるが、リポミクスで主流の ESI-LC/MS/MS を用いた分析は、NMR 測定などに比べると測定系の安定性が比較的悪く長期にわたる分析結果の統合が難しい。それを補正するためには、ターゲット脂質の安定同位体ラベル品を用いるのが常套であるがしばしば入手が困難であり購入できる場合でも数多くのターゲット成分について購入する必要があるため非常に高価となる。また、スループットを高めるためには測定時間の短縮が必要であるが、網羅性と分析時間はトレードオフの関係にあるため、クロマトグラフィーの分析時間を短縮するほど検出可能な脂質数は減少する。大規模分析に必要な系の安定性とスループットを実現することは、この分野の研究者に向けられている課題である。

2. 研究の目的

脂質を主な分析対象とし質量分析技術を用いて、疾患のバイオマーカー（進行度・治療への指標）および疾患分子メカニズムの解明の研究に役立てるための、長期的で大規模な臨床検体（ヒト血液などの検体）の解析に耐えうるスループットと安定性を兼ね備えた測定系の構築とその検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

スループットと安定性を兼ね備えた測定法として、同重体ラベルを用いたリポミクス手法を開発していた（文献 1）。またイオンモビリティによる分離を利用したリポミクスのスループット向上及びクオリティコントロール検体を用いた測定安定性向上にも取り組み、これらを活用してスループットと再現性を重視する系を構築しながら、大規模検体の測定を実際に行い、有用性と課題について検証した。

4. 研究成果

同重体タグを活用したリポミクスでは、これまでに構築していたリン脂質や脂肪酸をターゲットとする測定に加えて、さらに構造上同重体タグを付加させることが可能と想定できる血中脂質成分に付いて前処理方法、誘導体化方法及び測定系について検討し、本手法での測定ターゲット成分を増加させた。特に近年腸内細菌叢との関連や核内受容体を介した生理活性について注目されている胆汁酸について、カルボキシを持つ胆汁酸成分については遊離脂肪酸と同様の方法で誘導体化が可能なことを明らかにし、実際にヒトの血中にて微量でも感度よく安定して測定できる系を構築した。

イオンモビリティの活用については、1 検体 3 分間の短時間測定系を確立した。時間を短縮することにより減少する検出成分数は、従来の LC と TOF による分離に加えてイオンモビリティの分離を加えることで増加すること、数百検体に及ぶ実検体の測定中を行い、各成分のシグナル値、リテンションタイム、 m/z 、イオンモビリティのドリフトタイムから算出される CCS 値の安定性について検証した。これにより 1 日に 400 検体以上の測定が可能な系が構築できた。

多検体の前処理法について、人為的ミスや測定誤差を最小に抑えつつ処理速度を数倍短縮する系を構築した。ヒト血液検体リポミクスの 3 分間測定のために行う前処理では、96 ウェル 8 枚分、計 786 検体の前処理を 4 時間程度で完了する系を構築し実運用を行った。また、同重体タグの誘導体化についても、マルチピペッターを活用して 96 ウェルフォーマットにて脂質抽出と誘導体化を行うことで、前処理に要する時間を 4 倍短縮することが可能となった。

長期間に安定した定量を担保する手段の 1 つとして、データ補正のための Pooled 標準血液試料（クオリティコントロール、QC）の準備・検討・運用を行った。病院の血液検査後に廃棄され

る検体を利用した。100人、300人、1000人分の検体を混ぜ合わせた pooled 検体を複数用意して、ロット差の現れ方を検証した。1000人分の混ぜ合わせ血清を Pooled 標準血液試料(QC)としてストックし実運用を行いこの手法の有用性を確認した。

同重体タグを用いた多検体同時分析系をこれまでに確立した三連四重極型質量分析計によるワイドターゲット MRM 測定から、スループットとデータの安定性の向上を目的としてアンターゲットタイプの測定系—具体的には四重極質量分析計によるスキャンやイオンモビリティ分離を搭載した精密質量分析計などでの測定 - に変更することの利点を検討した。感度と測定速度や測定安定性及びデータ解析スループットにおいては現状の MRM 測定に利があると考えられたため、MRM 測定を採用しつつ LC 条件と多検体前処理の効率化を行うことでスループットの向上を成し遂げた。

イオンモビリティ分離と TOF 型質量分析計を活用した 3 分間測定では 1 検体あたりのデータが非常に重くなるため、数百を超える検体数の場合で既に既存のソフトウェアを用いたデータ処理が通常のコンピュータの処理能力を超えてしまうことに課題があることが本研究期間中に明らかとなった。これについては共同研究者の協力を得て新しいソフトウェアの構築によりこの問題を克服した。CCS 値と精密質量を効率的に利用して、数千を超える検体セットのデータ処理が可能となった。

臨床検査値情報を豊富に持った 4000 検体の血液検体セットをイオンモビリティを活用した 3 分間測定法で測定し、構築した新規ソフトウェアを利用してリピドームデータを作成した。この検定セットの血液検査値情報との統合解析を行ったところ、特定の脂質成分同士の相関関係が観察できたとともに、血液検査による臨床検査値と脂質が特定のパターンを持って相関することが明確になり本手法の有用性が確認できた。数千規模の検体を臨床検査値と脂質の相関をもとに層別化して解析していくことが可能になり、疾患メカニズムの解明や生体内における血液脂質変動の分子機構の解明に向けて、時間的・費用面においても実運用が可能な基盤が構築できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳岡涼美、浜野文三江、小林絢子、北芳博、小田吉哉
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患の血漿マルチオミクス
3. 学会等名 第16回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北 芳博、徳岡 涼美、小田 吉哉
2. 発表標題 軽量MRMデータブラウザTRACESを用いたワイドターゲット脂質解析
3. 学会等名 第17回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------