

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07399

研究課題名(和文) 精神病発症危険状態および発症患者の血清分子網羅解析：発症予測マーカー分子の確立

研究課題名(英文) Metabolomics of biomolecules in serum from individuals with at-risk mental state and first-episode psychosis: discovery of reliable marker to develop psychosis

研究代表者

福島 健 (Fukushima, Takeshi)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：00272485

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)：精神病発症危険状態(ARMS)の方への適切な早期治療介入は、精神病発症後の症状緩和や予後の改善に有効である。しかしながら、現況では、ARMSにおける生体分子濃度の変化などの生化学的、臨床化学的な情報は未だ少ない。

本研究では、ヒト血清中に存在するカルボキシ基を有する有機酸を、新規にデザイン、合成したプレカラム誘導体化試薬CIM-C2-NH₂を活用して、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)により、それらの濃度を調べた。その結果、ARMS群ではL-乳酸濃度が有意に減少していることがわかり、ARMSでは解糖系に異常がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神科医療の現場では、患者の血圧測定や血液中グルコース濃度のように、数値で示される客観的な疾患診断マーカーとなりうるものがない。本研究では精神病を発症するかもしれない発症危険状態(ARMS)に着目した。ARMSの血清を、当研究室で開発したオリジナル分析法で調べた結果、ARMS血清ではL-乳酸とグルコースの比(L-乳酸/グルコース)が健常人の方よりも著しく低かったため、ARMSは、精神病の発症前であるが、すでに解糖系に異常がある可能性が見いだされた。本研究で得られた結果を基にして、精神病の発症予防や早期治療に繋がる研究が今後、展開され、精神科医療に役立っていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：Early intervention to subjects with at-risk mental state (ARMS) is effective for preventing the etiology of serious psychiatric diseases, however, there have been a few reports on biochemical or clinically chemical studies such as changes of biomolecules levels in ARMS subjects.

In the present study, several organic acids having one or two carboxyl groups in human serum were derivatized with a newly designed and synthesized pre-column reagent, CIM-C2-NH₂, and subsequent quantitative analysis by LC-MS/MS. As a consequence, serum L-lactate levels in ARMS subjects were significantly decreased than those in healthy subjects, suggesting that some disorder of glycolytic pathway may occur in ARMS.

研究分野：分析化学

キーワード：At-risk mental state LC-MS/MS 乳酸 有機酸 プレカラム誘導体化試薬

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症などの重篤な精神疾患は、精神病発症危険状態 (At-risk mental state; ARMS) を経て発症に至る。ARMS の方への適切な早期治療介入は、精神病発症後の症状緩和や予後の改善に有効である。しかしながら、現況では、ARMS における生体分子濃度の変化などの生化学的、臨床化学的な情報は未だ少ない。つまり、精神科に来院される ARMS の方を対象とした、生体分子濃度変化に着目した研究は少ないと言える。

2. 研究の目的

最終的な研究目的は、統合失調症の発症を“予測”できる客観的な指標 (= 血清中の分子変動) を確立し、精神科を受診する ARMS の中から、近い将来に統合失調症を発症する患者を特定できるのかどうか? である。そこで、本研究期間内では、ARMS と健常人の血清を試料として、生体分子濃度の変動解析を目的として研究を進めた。その過程で、生体分子にはカルボキシ基 (-COOH) を有する物質があり、また、光学異性体が存在する物質もあるので、これらの分子定量に必要な分析試薬 (= 高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 用のプレカラム誘導体化試薬) を創出する実験をはじめに行うことにした。次いで、ヒト血清試料へ応用した。

3. 研究の方法

(1) 対象者ならびに血清の採取

本研究は、本学医学部倫理委員会および薬学部生命倫理委員会にて承認を受けてから実施した (本学医学部倫理委員会承認番号 A17039-26012、薬学部生命倫理委員会承認番号 Y2021-001)。文書による同意を得た ARMS および健常人の血清を使用した。ARMS は、本学医療センター大森病院精神科医師による構造化面接により診断され、本研究の内容説明後、同意が得られ、抗精神病薬を未服用の方のみに参加頂いた。

採血 (約 10 mL) は、前日の午後 9 時から飲食をせず、当日の朝食を採らずに午前 8 時 ~ 午前 9 時に腕の静脈から採血管 (Venoject II AUTOSEP チューブ) を使って行った。血液を室温で 30 分間放置し、 $1,200 \times g$ で 15 分間遠心分離した後、得られた血清を 100 μ L ずつ、スクリューキャップ付きのプラスチックチューブに小分けし、実験に使用するまで -80 で保存した。

(2) カルボキシ基を標的とするプレカラム誘導体化試薬

図 1 に示す合成経路で、目的とする試薬 CIM-C₂-NH₂ を合成した。出発原料として Cbz-L-Glu(OtBu)OH (図 1 a) から、4 工程を経て、CIM-C₂-NH₂ (図 1 b) を合成した。

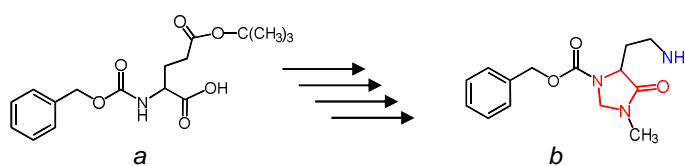


図 1 カルボキシ基を標的とするプレカラム誘導体化試薬の合成経路
a: Glu(OtBu)OH b: CIM-C₂-NH₂ (赤色部分がキラルイミダゾリジノン環)

4. 研究成果

(1) 水溶性が高い有機酸は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で汎用されている逆相型固定相で分離検出することが難しく、また、光学異性体の区別ができない課題がある。そこで、カルボキシ基を有する水溶性の有機酸を特異的に LC-MS/MS で検出するために、カルボキシ基と反応し、且つ、カルボキシ基の目印となるプロダクトイオンを生成する新規の機能性試薬の創製を目指した。そこで、当研究室で 2020 年に特許出願したアミノ基に反応するプレカラム誘導体化試薬 CIMa-OSu の化学構造式を基にして、光学異性体分離に有用であったキラルイミダゾリジノン環を有し、カルボキシ基に対してアミノ基 (青色) とのアミド結合が可能な新規機能性試薬 CIM-C₂-NH₂ (図 1 b) を創製した (引用文献)。CIM-C₂-NH₂ を用いることで、図 2 に示すようにカルボキシ基を有する有機酸の標準品 (図 2 c) を縮合剤 (TPP、DPDS) により CIM-C₂-NH₂ と結合 (誘導体化) させ (図 2 d)、LC-MS/MS を用いて分離分析を行った。その結果、図 3 に示すように乳酸の光学異性体の分離が可能であった。乳酸のほかにも、酒石酸や 3-ヒドロキ

シ酪酸、シトラマル酸などの不斉炭素有する有機酸の光学異性体の分離分析が可能であった。また、CIM-C₂-NH₂で誘導体化したことで、カルボキシ基を有する目印となる *m/z* 91 の特徴的なプロダクトイオンを生じることを確認した。

一方で、コハク酸などのジカルボン酸では、CIM-C₂-NH₂の誘導体は *m/z* 278 の特徴的なプロダクトイオンを生じることもわかり、マススペクトル上でモノカルボン酸とジカルボン酸の識別も可能であった（引用文献 ）。

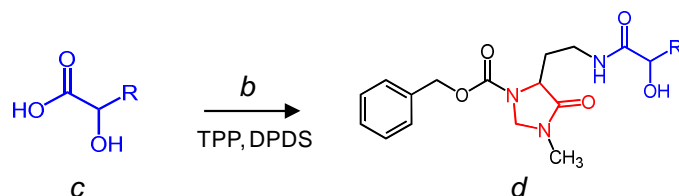


図2 CIM-C₂-NH₂ (b) による有機酸 (c) の誘導体化反応

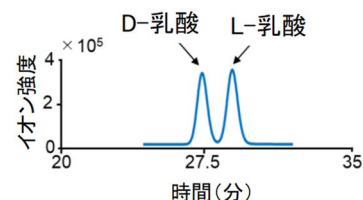


図3 CIM-C₂-NH₂ により誘導体化後のD-, L-乳酸のクロマトグラム

次に、LC-MS/MSによる固定相及び移動相条件の最適化検討を行った後、実試料分析への応用として、食材、果実やそのジュースを購入し、それらに含まれる有機酸の濃度を調べた。その結果、リンゴジュースや酒類に、有機酸が豊富に含まれていることがわかり、酒類にはL-乳酸のみではなく、D-乳酸も含まれていた。また、リンゴ及びリンゴジュースに含まれるシトラマル酸はR体のみで、S体は含まれていなかった。R-シトラマル酸の濃度はリンゴの実よりも果皮の方が高く、果皮が黄色のリンゴでは、赤いリンゴよりもR-シトラマル酸濃度が高い結果が得られた（引用文献 ）。今後、リンゴやそのほかの果物、さらに品種の違いによる有機酸濃度の変化を調べる実験にも活用できると考えられた。

(3) 次にヒト血清中の有機酸を分析するにあたり、はじめに健常人の血清 30 μ L を使用して、メタノールとアセトニトリルの混液で除タンパクした後、遠心分離した。この上清を血清試料として CIM-C₂-NH₂ で誘導体化し、ODS カラムを装着した LC-MS/MS で分析を行った。その結果、ヒト血清から D-3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、馬尿酸、コハク酸、グルタル酸、L-乳酸が検出された。

次に、この LC-MS/MS の分析条件下で、健常対象群 ($n=22$) と ARMS 群 ($n=22$) で血清から検出された有機酸濃度の比較解析を行ったところ、D-3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、馬尿酸、コハク酸、グルタル酸では有意差が認められなかったが、L-乳酸濃度において、有意な減少が認められた。L-乳酸濃度の減少が見られたことから、解糖系に着目し、酵素法でグルコースおよびピルビン酸濃度を測定した結果、グルコースの濃度は ARMS 群の方が健常人群よりも有意に高かった。

そこで、これらの定量結果を照らし合わせ、グルコースまたはピルビン酸濃度を分母に、L-乳酸濃度を分子にして比を算出したところ、L-乳酸とグルコースおよびピルビン酸の比率で、健常対象群と ARMS 群に顕著な有意差が認められた（図4）。血清中ピルビン酸濃度のみの比較では有意差が付かなかったが、L-乳酸との比率では、図4の左図に示すように顕著な差が見られた。これらの結果により、ARMS 群では解糖系に異常がある可能性が示唆された。

このように、本研究期間において開発した誘導体化試薬 CIM-C₂-NH₂ ならびに LC-MS/MS を用いる有機酸の分離検出法により、ARMS 群における解糖系異常の可能性が見出された。

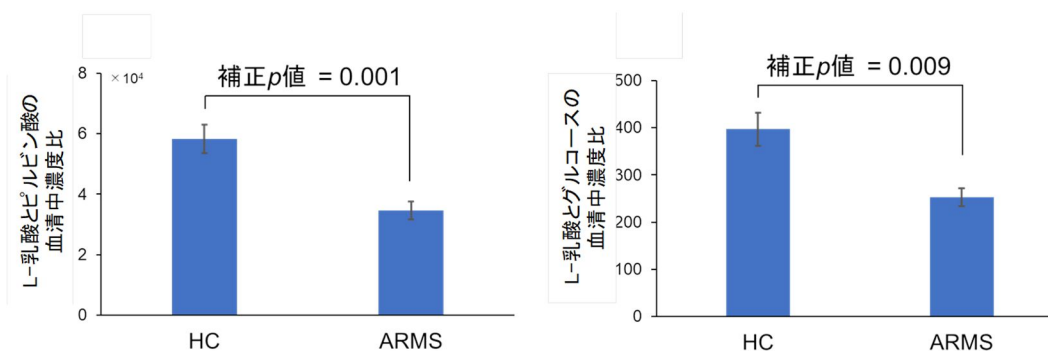


図4 健常対象群 (HC) および ARMS 群の血清中 L-乳酸とピルビン酸の濃度比 (左) ならびに血清中 L-乳酸とグルコースの濃度比 (右)

(4) 本研究で開発した分析法は、ヒト血清中の有機酸定量が可能であったことから、ARMS 以外の様々な他の疾患の臨床診断等に役立つことが今後、期待される。

今後の課題として、近年、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸が、精神疾患においても注目されるようになった。そこで、本研究においても腸内細菌で産生される短鎖脂肪酸(プロピオン酸、イソ酪酸)の分離分析について検討したが、本分析法ではこれらの短鎖脂肪酸の検出ができなかった。分析に使用する1回の血清量を、本研究で用いた30 µL から200~300 µL 程度まで増やすなどの検討により、血清に含まれるより多くの有機酸分析へ活用できると考えられる。

また、精神病を初発した患者(FEP)では、本研究期間内での血清数がARMS に比べて未だ少なかったため、今後、FEP 患者の血清数が増えた段階で、有機酸分析を検討していきたい。

<引用文献>

Umino M, Sakamoto T, Onozato M, Fukushima T: Preparation of imidazolidinone compounds as derivatization reagent for diastereomerization and chromatographic separation of chiral organic acids. *J Chromatogr A*. 1675, 463159, 2022.

Umino M, Onozato M, Sakamoto T, Koishi M, Fukushima T: Analyzing citramalic acid enantiomers in apples and commercial fruit juice by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pre-column derivatization. *Molecules*. 28(4): 1556, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umino Maho, Sakamoto Tatsuya, Onozato Mayu, Fukushima Takeshi	4. 巻 1675
2. 論文標題 Preparation of imidazolidinone compounds as derivatization reagent for diastereomerization and chromatographic separation of chiral organic acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 463159 ~ 463159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2022.463159	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 -

1. 著者名 Umino Maho, Onozato Mayu, Sakamoto Tatsuya, Koishi Mikoto, Fukushima Takeshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Analyzing Citramalic Acid Enantiomers in Apples and Commercial Fruit Juice by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Pre-Column Derivatization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1556 ~ 1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules28041556	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海野真帆、坂本達弥、小野里磨優、福島 健
2. 発表標題 キラリイミダゾリジノン環を有する LC-MS/MS 用カルボン酸誘導体化試薬による飲料中有機酸の分析
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海野 真帆, 坂本 達弥, 小野里 磨優, 小石 海琴, 福島 健
2. 発表標題 キラリイミダゾリジノン環を有するLC-MS/MS用カルボン酸誘導体化試薬によるリンゴ中シトラマル酸の定量
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小石 海琴、海野 真帆、小野里 磨優、坂本 達弥、福島 健
2. 発表標題 LC-MS/MS用カルボン酸誘導体化試薬を用いた飲料中シトラマル酸の定量
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小石 海琴、海野 真帆、小野里 磨優、坂本 達弥、福島 健
2. 発表標題 LC-MS/MS用カルボン酸誘導体化試薬を用いた有機酸の分析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
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
研究分担者	辻野 尚久 (Tsujino Naohisa) (00459778)	東邦大学・医学部・客員准教授 (32661)	
研究分担者	田形 弘実 (Tagata Hiromi) (50888542)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	

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