

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590041

研究課題名（和文） エストロゲンオルトキノンの定量法開発と乳がんの発がん機構解析への応用

研究課題名（英文） Development of the analytical method for estrogen-o-quinones and its application to the study on the initiation mechanism of human breast cancer

研究代表者

山下 幸和 (YAMASHITA KOUWA)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80382670

研究成果の概要（和文）：カテコールエストロゲンが酵素的あるいは非酵素的に酸化されて生成するオルトキノンを、フェナジン誘導体とすることにより、LC-MS により選択的に高感度で定量できることを見出した。この手法を活用して、カテコールエストロゲンからオルトキノン生成を触媒するタンパクや金属イオンを作用を確認することができた。さらに、乳がんのイニシエーションに重要と考えられる、オルトキノンの生体内タンパクとの付加体分析のモデル実験として、オルトキノンのグルタチオンや L-システインとの付加体の定量法を確立した。

研究成果の概要（英文）： Selective and sensitive analytical method for estrogen- σ -quinones derived from catechol estrogen with enzymatic or non-enzymatic manner was developed based on the use of phenazine derivatization and LC-MS. The present method enabled to determine the catalytic activity of protein and some metal ions on the process of oxidation of catechol estrogens to the corresponding σ -quinones. Furthermore, analytical method for the glutathione and L-cysteine conjugates of these σ -quinones was established as one of the model for determining protein adducts of σ -quinones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学、分析化学

キーワード：乳がん、エストロゲン、オルトキノン、フェナジン誘導体、質量分析、分析化学

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン代謝物のうち、カテコールエストロゲンは、オルトキノンやセミキノンに酸化されやすく、特にオルトキノン体は生体内の求核分子種と反応して共有結合付加体が生成し、この共有結合体と乳がんなどの発がんとの関連が指摘されている。カテコールエストロゲンから生じるオルトキノンは化

学的安定性に乏しいため、直接定量することは困難であり、エストロゲンオルトキノンの生体内における挙動は明らかにされていない。また、化学的に不安定なエストロゲンオルトキノンを安定化する方法としてオルトフェニレンジアミンによるフェナジン誘導体化が知られているが、極微量のレベルにおける誘導体化は殆んど検討されていない。

2. 研究の目的

エストラジオール(E2)は重要な女性ホルモンであると同時に、乳がんなどホルモン依存性の疾患において、E2 自身の受容体レベルのイニシエーション作用を有する。また、代謝物であるカテコールエストロゲンの酸化物であるオルトキノン体が生体内のチオール基を有する成分と反応し、共有結合による付加体形成により、発がんを誘発するとされる。オルトキノンのような活性分子種の体内動態を把握することは重要と考えられるため、本研究では、オルトキノン体の正確な定量法確立、生体内で起こりうる酵素的・非酵素的オルトキノンの生成を定量的に捕らえることに加え、オルトキノン生成とこれらによる乳がん発がんのイニシエーション機構解明することを目的とする。(図 1)

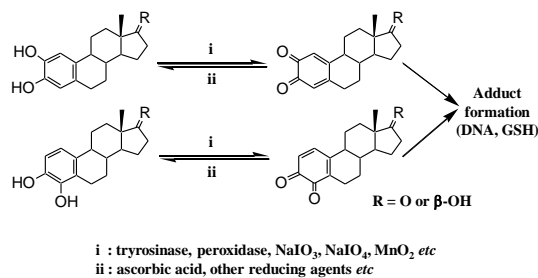


図 1

3. 研究の方法

カテコールエストロゲンとそれらの酸化活性体であるオルトキノン類の定量を LC-ESI-MS/MS で行うため、各々の分子構造に対して特異性の高い誘導体化法を検討した。LC-ESI-MS/MS に高感度で応答させるため、カテコールエストロゲン類は水酸基をプロトン親和性のあるピリジンカルボン酸エステルとし、オルトキノンにはオルトフェニレンジアミンによるフェナジン誘導体とした。これらの誘導体化による各分子の分離条件や選択性を確認した後、カテコールエストロゲンのオルトキノンへの酸化過程を触媒する、酵素、タンパク、金属イオンなど影響を精査し、生体内におけるオルトキノンの安定性を調べた。また、オルトキノンの SH 基を有する化合物との反応性についても検討した。

4. 研究成果

(1) エストロゲンオルトキノンのフェナジン誘導体の標準品並びに内標準物質の調製を行った。すなわち、2-hydroxyestrone (2-OHE1)、4-hydroxyestrone (4-OHE1)、2-hydroxyestradiol (2-OHE2) 及び 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) を用い、酸化剤として MnO₂、NaIO₄ を用いてオルトキノンとし、次いで DMF 中オルトフェニレンジアミンと反応させ、目的とするフェナジン誘導体とした。

(図 2) 一方、[16, 16, -17β-2H₃]-estradiol 17-monoacetate を iodoxybenzoic acid-polystyrene beads (IBX-resin) と反応させ、生成する 2,3-quinone 及び 3,4-quinone をフェナジン誘導体としたのち、加水分解して内標準物質を得た。(図 3) この内標準物質を用いて、微量レベルでのオルトキノンのフェナジン誘導体化を検討し、分析法の妥当性を検証した。その結果、カテコールエストロゲン存在化でも、オルトキノンが選択的にフェナジン誘導体化を行うことに成功し、誘導体生成における再現性も優れていた。オルトキノンのフェナジン誘導体は LC-ESI-MS/MS (positive mode) において、高感度で検出でき、定量限界はいずれのオルトキノンについても同じで概ね 5 ng/mL であった。

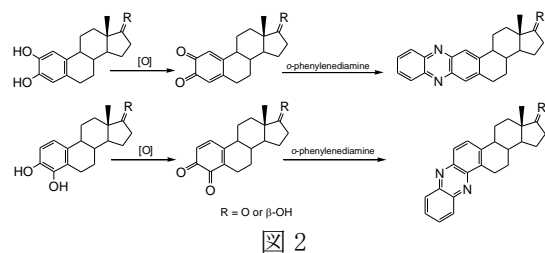


図 2

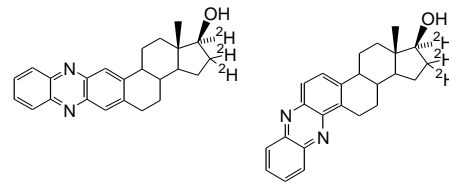


図 3

(2) 前年度の研究成果をもとに、HPLC-ESI-MS/MS 法を基盤とし、この手法を用いて生体内においてカテコールエストロゲンからエストロゲンオルトキノンへの酸化が、どのような分子によって触媒されるか検討を行った。その結果、チロシナーゼ、ペルオキシダーゼ、ヘモグロビンあるいはミオグロビンのような金属をコアに持つタンパク存在により、カテコールエストロゲンからエストロゲンオルトキノンへの変換が触媒されることがわかった。特にチロシナーゼとペルオキシダーゼでは、酸化の活性において水酸基の位置特異性が認められた。(図 4) また、カタラーゼではその変換は認められず、触媒作用の異なることが示唆された。さらに、これらのタンパクのコアとなっている金属イオンの影響については、上記タンパクを用いた実験に対応する同等レベルの濃度では、カテコールエストロゲンからエストロゲンオルトキノン生成は認められなかった。また、高濃度

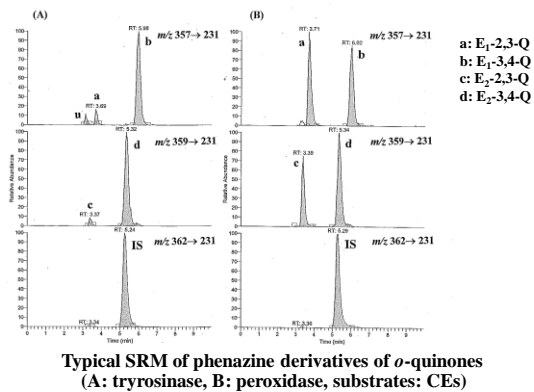


図 4

の Cu^{2+} (0.1 mg/mL) の存在のみ、エストロゲンオルトキノンへの変換を促進し、 Fe^{3+} (0.1 mg/mL) では促進されなかった。これらの金属イオンの酸化メカニズムの差異についても、今後検討を行う。さらに、カテコールエストロゲンからエストロゲンオルトキノンへの変換は、これらのタンパクや金属イオンの非存在化においても起こり得ることが判明しており、これらの金属イオンあるいは金属イオンをコアに持つタンパクや酵素の作用を特異的に検出、定量化するためには、非特異的酸化反応を最小限に抑える工夫が必須であることも判明した。

(3) オルトキノンとタンパクなどの生体高分子との反応のモデル実験として、オルトキノンのグルタチオン (GSH)、L-システイン (Cys) あるいはN-アセチル-L-システイン (N-Ac-L-Cys) などのSH化合物の付加体の調製法を検討し、これら付加体のHPLCあるいはHPLC-MS法による定量法について検討した。オルトキノンを50%酢酸中、GSHと室温で反応させると、2,3-キノン体からは1-GSH付加体および4-GSH付加体の2本のピークが、また3,4-キノン体からは2-GSH付加体が単一ピークとして得られ、これらのピークはODS系カラムを用いることにより完全に分離できた。L-Cys及びN-Ac-L-Cysについても、GSHの場合と同様な付加体を得ることができ、それぞれの構造はHPLC-エレクトロスプレーイオン化 (ESI) -MSを用いて確認した。さらにこれらの付加体のHPLC-ESI-MSによる定量分析を行うため、 $[\text{13C}_4]$ -エストロンあるいは $[\text{13C}_4]$ -エストラジオールを直接、IBX-resinで酸化し2,3-キノンおよび3,4-キノンとした後、対応するSH化合物の付加体に導き内標準物質を得た。調製した内標準物質を用いた各付加体の検量線はいずれも $r = 0.98$ 以上で良好な直性が得られ、エストロゲンキノンとGSH、L-Cys及びN-Ac-L-Cys付加体の定量法を確立することができた。

4種のオルトキノンのGSH-付加体のプロフィールを一例として図5に示した。

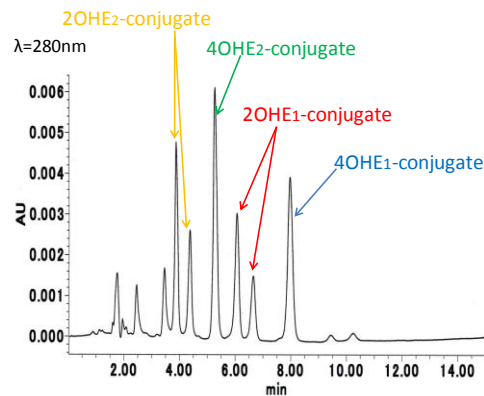


図 5

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 3 件)

- ① K. Yamashita, A. Masuda, Y. Hoshino, S. Komatsu, M. Numazawa, Assay of labile estrogen σ -quinones, a potent carcinogenic molecular species, by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry with phenazine derivatization, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **119**, 2010, 141-148. Doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.016
- ② Y. Nakamura, F. Satoh, R. Morimoto, M. Kudo, K. Takase, C E. Gometz-Sanchez, S. Honma, M. Okuyama, K. Yamashita, W E. Rainey, H. Sasano, S. Ito, 18-Oxocortisol measurement in adrenal vein sampling as a biomarker for subclassifying primary aldosteroidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, 2011, E1272-1278. Doi:10.1210/jc.2010-2785
- ③ T. Asai, D. Luo, K. Yamashita, Y. Oshima, Structures and biomimetic synthesis of a Novel α -pyrone polyketide of an endophytic *Penicillium sp. Catharanthus roseus*, *Org. Lett.*, **15**, 2013, 1021-1023. Doi:10.1021/o1303506t

[学会発表] (計 7 件)

- ① K. Yamashita, S. Komatsu, A. Masuda, M. Numazawa, An approach to the micro-determination of labile estrogen σ -quinones by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, 58th ASMS Conference, Salt Lake City, USA, May 25, 2010.
- ② 白取未希、加藤創、山下幸和、沼澤光輝、エストロゲンオルトキノンによるタンパク修飾(I)-L-Cys, N-Ac-L-Cys 及び GSH-共有

結合体の調製とカテコール/キノン平衡、第50回日本薬学会東北支部大会、仙台、10月30日、2011.

③山下幸和、小松祥子、加藤創、大野賢一、沼澤光輝、本間誠次郎、LC-ESI-MS/MSによる水酸化ステロイドのメタボローム解析(IV)27ステロイドの一斉分析、日本薬学会第132年会、札幌、3月30日、2012.

④H. Kato, S. Mitsuzuka, K. Yamashita, M. Numazawa, Use of proton-affinitive derivatization in HPLC-ESI-MS analysis of biologically important carboxylic acids, 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto, Sep. 20, 2012.

⑤小松祥子、鈴木直樹、高橋透、山下幸和、沼澤光輝、LC-ESI-MS/MSによるアロマターゼ活性測定法の開発および従来法との比較、第51回日本薬学会東北支部大会、青森、10月7日、2012.

⑥K. Yamashita, S. Komatsu, H. Kato, K. -I. Ohno, Pyridine-carboxylates as proton-affinitive derivatives in HPLC-ESI-MS/MS analysis of hydroxysteroids, 29th LC/MS Montreux Symposium, Montreux, Nov. 9, 2012.

⑦山下幸和、近藤恵美、白取未希、小松祥子、加藤創、大野賢一、沼澤光輝、LC-ESI-MS/MS法による水酸化ステロイドのメタボローム解析(V)安定同位体標識カテコールエストロゲン-GSH付加体の合成、日本薬学会第133年会、横浜、3月28日、2013.

[図書] (計 1件)

① K. Yamashita (ed. by Konstantin Chichinadze), Testosterone: Biochemistry, Therapeutic Uses and Physiological Effects, *Nova Scientific Publishers Inc.*, 2012, 193.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/rinsyob/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 幸和 (YAMASHITA KOUWA)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80382670

(2) 研究分担者

大野 賢一 (Ohno Ken-ichi)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20347272

加藤 創 (Kato Hajime)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80584458

小松 祥子 (Komatsu Sachiko)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：00438566