

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590051

研究課題名(和文) 病理組織標本を用いた生体ステロイドのメタボライト・プロファイリング技術の開発

研究課題名(英文) Metabolite profiling of biological steroids in pathological tissue specimen

研究代表者

本多 彰 (Honda, Akira)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10468639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織標本を含む生体サンプルからステロイドを抽出し、高感度・高精度に一斉分析する方法を開発した。内部標準ステロイドを添加して水酸化カリウム/エタノール中で加水分解し、n-ヘキサンと酢酸エチルによる抽出を行った。ピコリン酸エステルに誘導体化後、高速液体クロマトグラフィー・陽イオンエレクトロスプレーイオン化・タンデムマススペクトロメトリー(HPLC-PESI-MS/MS)に導入し、ステロール、酸化ステロール、副腎ステロイド、神経ステロイドなどを同時定量することが可能になった。ホルマリン固定とマイヤーヘマトキシリンによる染色は、病理組織標本でのステロイド分析結果に有意な影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：We have developed a highly sensitive and specific method for the analysis of steroid profiles in biological samples including pathological tissue specimens. After the addition of deuterium-labeled internal standards, biological samples were saponified with 1N ethanolic KOH, extracted with n-hexane followed by n-hexane:ethylacetate (1:1), and derivatized into picolinyl esters before analysis by high performance liquid chromatography-positive electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-PESI-MS/MS). Cholesterol related sterols, oxysterols, adrenal steroids and neurosteroids were quantified simultaneously. The effects of formaldehyde fixation and Mayer's hematoxylin staining on the steroid analysis of pathological tissue specimen were examined. These procedures did not affect significantly the results of the present analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ステロイド LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年のステロイド生化学の発展により、コレステロールを中心とする生体ステロイド類には、古典的なステロイドホルモンのほかに、様々な生理活性を有する中間代謝物やその誘導体の存在が明らかになってきた。これらの生理活性ステロイドは、代謝、炎症、免疫などを制御し、動脈硬化、アルツハイマー病、加齢黄斑変性、炎症性腸疾患、がんなどの生活習慣病の発症や進展にも深く関係している可能性が示唆されている。

(2) しかし、*in vitro*で生理活性があっても、実際の生体中の合成量や存在量が有効濃度より低ければ、生理活性物質としての意義は低いと考えられる。すなわち、生体(特にヒト)での意義や役割はいまだ明らかにされていないものも多い。

2. 研究の目的

これまで我々が開発してきた HPLC-MS/MS によるステロイドの高感度分析法を進展させ、代謝マップ上のステロイドを一斉定量する「メタボライト・プロファイリング」法を開発することを目的とした。さらに血清や凍結組織のみならず、ホルマリン固定した病理組織標本を用いてステロイドを一斉定量する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ステロイド標準品を用いた一斉分析方法の確立

ステロイドに 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (10 mg)、4-ジメチルアミノピリジン (3 mg)、ピコリン酸 (8 mg)、ピリジン (150  $\mu$ L)、トリエチルアミン (20  $\mu$ L)の混合物を添加して 80  $^{\circ}$ C で 60 分間加温し、ステロイドの水酸基をピコリン酸エステルに誘導体化した。1 mL の n-ヘキサンを添加して、不溶物を沈殿除去し、上清を蒸発乾燥後アセトニトリルに再溶解して、Positive ESI モードの HPLC-MS/MS で分析した。

カラムはサーモフィッシャーサイエンティフィック社の Hypersil GOLD (150 mm x 2.1 mm I.D., 3  $\mu$ m)を使用し、移動相として酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水系を用い、各ステロイドの分離と分析時間から最適なグラジエント条件を検討した。

(2) ステロイドの一斉抽出方法の確立

各種ステロイドを添加した0.5 mLのアルカリ加水分解溶液(1N 水酸化カリウム/エタノール, BHT入り)に蒸留水0.25 mLを加え、1 mL x 複数回の有機溶媒でステロイドの抽出を行った。内部標準として重水素標識されたステロイドを添加した後誘導体化し、HPLC-MS/MSで定量することによって各種有機溶媒によるステロイドの回収率を求めた。

(3) ホルマリン固定と染色が分析に与える

影響の検討

薄切された肝組織に 10%中性緩衝ホルマリン液を添加し、1~17 時間の固定を行った。固定後組織を回収して乾燥し、内部標準ステロイドと前記のアルカリ加水分解溶液を加えて加水分解を行った。その後、3(2)で検討した最適な有機溶媒でステロイドの抽出を行い、誘導体化して HPLC-MS/MS で定量した。

また、固定後回収、乾燥された組織の一部にはマイヤーヘマトキシリン液を添加して、5 分間の染色を行った。染色後蒸留水にて 1 回洗浄して乾燥し、同様にアルカリ加水分解、抽出、誘導体化、HPLC-MS/MS 定量を行った。

4. 研究成果

(1) ステロイド標準品を用いた一斉分析方法の確立

Hypersil GOLD (150 mm x 2.1 mm ID, 3  $\mu$ m)カラムを使用した場合の HPLC の最適条件は、移動相の流量 0.3 mL/分で、A : 0.1%酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水 (30:30:40)、B : 0.1%酢酸を含むアセトニトリル:メタノール(1:1)を B (0%) B (75%)までの 15 分間のグラジエントとし、B (75%)を 20 分間保持することによって得られた。ピコリン酸で誘導体化した主なステロイドの HPLC-positive ESI-SRM データを表 1 に示す。ほとんどの重要ステロールは相互に分離可能であったが、一部のステロール間に不十分な分離があり、その部分を特に分離させるためには、Hypersil GOLD-aQ (150 mm x 2.1 mm ID, 3  $\mu$ m)カラムの使用が有効であった。

表 1. 主なステロイドピコリン酸エステル誘導体の HPLC-positive ESI-SRM データ

Picolinyl Ester Derivatives	m/z	CE	RRT
Dehydroepiandrosterone	457 $\rightarrow$ 416	12	0.24
Androsterone	459 $\rightarrow$ 418	12	0.26
Epiandrosterone	459 $\rightarrow$ 418	12	0.27
Etiocolanolone	459 $\rightarrow$ 418	12	0.28
7-Ketodehydroepiandrosterone	471 $\rightarrow$ 430	12	0.10
Pregnenolone	485 $\rightarrow$ 444	12	0.35
Epitetrahydroprogesterone	487 $\rightarrow$ 446	12	0.36
Allotetrahydroprogesterone	487 $\rightarrow$ 446	12	0.37
Epiallotetrahydroprogesterone	487 $\rightarrow$ 446	12	0.38
Tetrahydroprogesterone	528 $\rightarrow$ 146	24	0.38
7 $\alpha$ -Hydroxydehydroepiandrosterone	537 $\rightarrow$ 146	22	0.14
7 $\beta$ -Hydroxydehydroepiandrosterone	537 $\rightarrow$ 146	22	0.14
Zymosterol	553 $\rightarrow$ 512	12	0.85
Desmosterol	553 $\rightarrow$ 512	12	0.86
7-Dehydrocholesterol	553 $\rightarrow$ 512	12	0.89
8-Dehydrocholesterol	553 $\rightarrow$ 512	12	0.90
Lathosterol	555 $\rightarrow$ 514	15	0.97
8-Lathosterol	555 $\rightarrow$ 514	15	0.98
Cholesterol	555 $\rightarrow$ 514	15	1.00
Coprostanol	557 $\rightarrow$ 516	14	1.04
Cholestanol	557 $\rightarrow$ 516	14	1.08
Allotetrahydrodeoxycorticosterone	567 $\rightarrow$ 444	27	0.32
Tetrahydrodeoxycorticosterone	567 $\rightarrow$ 444	27	0.34
24S,25-Epoxycholesterol	569 $\rightarrow$ 528	12	0.62
7-Ketocholesterol	569 $\rightarrow$ 528	12	0.68
Campesterol	569 $\rightarrow$ 528	12	1.08
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxycholestanol	571 $\rightarrow$ 530	14	0.76
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxycholestanol	571 $\rightarrow$ 530	14	0.77

4,4'-Dimethyl-5 $\alpha$ -cholesta-8(9),24-dien-3 $\beta$ -ol	581 → 540	14	0.97
Sitosterol	583 → 542	14	1.18
Sitostanol	585 → 544	14	1.30
Lanosterol	595 → 554	12	1.00
Dihyrolanosterol	597 → 556	15	1.20
7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	0.71
7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	0.72
4 $\beta$ -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	0.82
22R-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	0.64
24R-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	0.66
24S-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	0.66
25-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	0.67
27-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	0.69
5 $\beta$ -Cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol	637 → 514	22	0.73
Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triof	653 → 146	28	0.71
7 $\alpha$ ,27-Dihydroxycholesterol	756 → 510	20	0.57
5 $\beta$ -Cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triof	758 → 635	28	0.57
5 $\beta$ -Cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25-tetrol	879 → 756	20	0.40

CE : Collision Energy (V)

RRT: relative retention time (コレステロールピコリン酸誘導体の retention time を 1.00 とした時の相対値)

## (2) ステロイドの一斉抽出方法の確立

各種ステロイドの標準品を含んだアルカリ加水分解後の溶液 0.75 mL (エタノール: 蒸留水 2:1 の組成) を 1 mL の n-ヘキサン × 1 回, 1 mL の n-ヘキサン: 酢酸エチル(1:1) × 2 回, 1 mL の酢酸エチル × 1 回で順に抽出し, 添加したステロイドの回収率を求めた。その結果, mono-, di-, tri-hydroxycholesterol などの側鎖を持ったステロイドは, n-ヘキサン: 酢酸エチル(1:1) × 1 回目までの抽出で 90%以上の回収率が得られた。それに対して, 側鎖が切断された dehydroepiandrosterone (DHEA) や tetrahydroprogesterone (THP) などの副腎ステロイドやニューロステロイド, およびそれらの水酸化体(7 $\alpha$ -DHEA など)は, n-ヘキサン: 酢酸エチル(1:1) × 1 回目までの抽出では回収が不十分であり, n-ヘキサン: 酢酸エチル(1:1) × 2 回目までで, 90%以上の回収率が達成された。

## (3) ホルマリン固定と染色が分析に与える影響の検討

ホルマリン未固定, ホルマリン固定 1 時間または 17 時間, さらにホルマリン固定 17 時間後にマイヤーヘマトキシリン液での染色を行った肝組織サンプルを用いて, ステロイドの定量値を比較した。その結果, 17 時間までのホルマリン固定やマイヤーヘマトキシリン液での染色は, ステロイドの定量値に有意な変化を与えなかった。

## (4) 臨床検体への応用

上記の一斉分析方法を, ヒトの臨床検体および実験動物由来の検体(血清, 組織)に応用し, メタボライト・プロファイリングを行った。

## 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 9 件)

Korematsu S, Uchiyama S, Honda A, Izumi T. A new cholesterol biosynthesis and absorption disorder with epilepsy, hypogonadism and cerebro-cerebello-bulbar degeneration. 査読有, *Pediatr. Neurol.* 2014;50:601-604.

DOI:10.1016/j.pediatrneurol.2014.01.050.

Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Kohjima M, Nakamuta M, Matsuzaki Y. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. 査読有, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;446:736-740.

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.01.176.

Sugizaki T, Watanabe M, Horai Y, Kaneko-Iwasaki N, Arita E, Miyazaki T, Morimoto K, Honda A, Irie J, Itoh H. The Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) inhibitor Ezetimibe improves metabolic disease via decreased Liver X Receptor (LXR) activity in liver of obese male mice. 査読有, *Endocrinology* 2014 [Epub ahead of print]

Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga JI, Ishibashi S. Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages. 査読有, *J. Lipid Res.* 2014 [Epub ahead of print]

Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Saito Y, Takikawa H, Imawari M, Matsuzaki Y. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. 査読有, *Hepatology* 2013;57:1931-1941.

DOI:10.1002/hep.26018.

Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Matsuzaki Y. Bile acid malabsorption deactivates pregnane X receptor in patients with Crohn's disease. 査読有, *Inflamm. Bowel Dis.* 2013;19:1278-1284.

DOI:10.1097/MIB.0b013e318281f423.

Shang Q, Guo GL, Honda A, Saumoy M, Salen G, Xu G. FGF15/19 protein levels in the portal blood do not reflect changes in the ileal FGF15/19 or hepatic CYP7A1 mRNA levels. 査読有, *J. Lipid Res.* 2013;54:2606-2614.

DOI:10.1097/MIB.0b013e318281f423.  
Endo-Umeda K, Yasuda K, Sugita K,  
Honda A, Ohta M, Ishikawa M, Hashimoto  
Y, Sakaki T, Makishima M.  
7-Dehydrocholesterol metabolites  
produced by sterol 27-hydroxylase  
(CYP27A1) modulate liver X receptor  
activity. 査読有, J. Steroid Biochem.  
Mol. Biol. 2013;140:7-16.  
DOI:10.1016/j.jsbmb.2013.11.010.  
Ikegami T, Hyogo H, Honda A, Miyazaki  
T, Tokushige K, Hashimoto E, Inui K,  
Matsuzaki Y, Tazuma S. Increased serum  
liver X receptor ligand oxysterols in  
patients with non-alcoholic fatty  
liver disease. 査読有, J.  
Gastroenterol. 2012;47:1257-1266.  
DOI:10.1007/s00535-012-0585-0.

〔学会発表〕(計7件)

池上 正, 本多 彰, 松崎靖司. 慢性C  
型肝炎患者に見られる血清コレステロ  
ール値低下のメカニズム. 第21回日本消  
化器関連学会週間(ワークショップ), 東  
京 10/10, 2013.

本多 彰, 池上 正, 宮崎照雄, 松崎靖  
司. 加齢と生活習慣病によるコレステロ  
ール(CHOL)代謝の変化. 第13回日本抗  
加齢医学会総会(シンポジウム), 横浜  
6/29, 2013.

池上 正, 本多 彰, 松崎靖司. NAFLD  
患者血清における酸化ステロール上昇と  
その意義. 第16回日本肝臓学会大会(ワ  
ークショップ), 神戸 10/10, 2012.

岩本淳一, 本多 彰, 松崎靖司. クロー  
ン病における低コレステロール血症の発  
症機序と栄養指標としての意義について.  
第20回日本消化器関連学会週間(パネル  
ディスカッション), 神戸 10/10, 2012.

本多 彰, 松崎靖司. アルコール性脂肪  
肝患者の血清脂質メタボローム解析. 第  
12回日本抗加齢医学会総会(シンポジウ  
ム), 横浜 6/23, 2012.

Honda A, Ikegami T, Miyazaki T,  
Nakamuta M, Takikawa H, Matsuzaki Y.  
Combination therapy of primary biliary  
cirrhosis with ursodeoxycholic acid  
and a dual PPAR /PXR agonist,  
bezafibrate. 第22回 International  
Bile Acid Meeting (Falk Symposium),  
Vienna, Austria. 6/14-15, 2012.

Ikegami T, Honda A, Miyazaki T,  
Matsuzaki Y, Hyogo H, Tazuma S,  
Tokushige K, Hashimoto E, Inui K.  
Increased serum liver X receptor  
ligand oxysterols in patients with  
non-alcoholic fatty liver disease. 第  
22回 International Bile Acid Meeting  
(Falk Symposium), Vienna, Austria.  
6/14-15, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 彰 (HONDA, Akira)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10468639

(2) 研究分担者

宮崎照雄 (MIYAZAKI, Teruo)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60532687

(3) 連携研究者

山下幸和 (YAMASHITA, Kouwa)  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80382670