

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24700838
研究課題名(和文)酸化ストレス関連疾患早期診断マーカー探索を指向した網羅的アルデヒド解析法の開発

研究課題名(英文)Global analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS

研究代表者
伴野 勸 (Tomono, Susumu)
静岡県立大学・食品栄養科学部・客員共同研究員

研究者番号：60554011
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン基やアルデヒド基を有する活性カルボニル化合物は心血管疾患や神経変性疾患などの酸化ストレス関連疾患の発症や進行に關与する危険因子であることが最近明らかとなってきた。本研究では、任意の細胞・組織中のアルデヒド化合物を未知のものも含めて網羅的に解析する三連四重極型質量分析計(LC/ESI/MS/MS)を用いた新規解析法の開発を試みた。その結果、回収率、正確度、精度ともに良好な結果が得られ、生体試料中のアルデヒド化合物を網羅的に定量可能であることが認められた。また、本解析法を用いることは酸化ストレス関連疾患の早期診断マーカー・治療ターゲットの探索に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Toxic aldehydes and ketones (that is, reactive carbonyl species; RCs) have been suspected of causing cardiovascular disease, neurodegenerative disease and other chronic diseases. In the present study, we have developed a highly sensitive and selective method that allowed us to detect numerous lipophilic RCs simultaneously. A new analytical method has been developed for profiling lipophilic RCs in biological samples using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) with selected reaction monitoring (SRM). The method was found to be sensitive, reproducible, accurate and specific for RCs. Our novel approach could be very useful for establishing the RCs profiles of biological and environmental samples, as well as studying the roles of lipid peroxidation in oxidative stress related-disorders and discovering new biomarkers for the early diagnosis of these diseases.

研究分野：分析化学

キーワード：アルデヒド カルボニル LC/MS 脂質過酸化 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の変化等により、糖尿病や心血管疾患などの生活習慣病を患う国民が増加している。生活習慣病は日常の乱れた生活習慣（食事、運動習慣など）の積み重ねで引き起こされ、特に食生活の乱れや欧米化が密接に関係していると言われている。その生活習慣病の発症や進行の重要な要因の一つに酸化ストレスがあると考えられている。酸化ストレスとは生体内において酸化と抗酸化のバランスが崩れ、酸化に傾いた状態と定義されており、生活習慣の乱れによる慢性的な炎症などによって惹起される。高濃度に産生された活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）は脂質、核酸、タンパク質、糖など様々な生体成分と反応し、酸化修飾物が生成される。これによって身体の恒常性破綻、機能低下が引き起こされ、疾患の発症リスクを増加させていくと考えられている。この疾患を罹患する前の発症リスク増加期を診断するバイオマーカーが確立されれば、これまで疾病の診断が困難であった病態の早期診断・治療が出来ると考えられる。そのため、多くの研究者たちが疾患の早期診断マーカー・治療ターゲット探索のために酸化ストレスにより生成される様々な酸化修飾物について研究している。

酸化ストレス下で生成・増加するアルデヒド化合物は、ROS や RNS により、脂質やアミノ酸、糖質などが酸化修飾されることによって生成される。最近、4-hydroxy-2-nonenal や acrolein などのアルデヒド化合物が心血管疾患や神経変性疾患などの酸化ストレス関連疾患の発症や進行に関与することが分かってきた。しかし、アルデヒド化合物は化学構造が多種・多様であり、酸化ストレス関連疾患と他の大多数のアルデヒド化合物との関連についてはほとんど明らかとなっていない。

また、これまで大気中や食品、生体成分から多数のアルデヒド化合物を同定・定量する手段として、アルデヒド基やケトン基と特異的に反応する 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) と試料を反応させ、DNPH の UV 吸収波長 (360 nm) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検出する方法が用いられてきた。しかし、HPLC によって DNPH 修飾されたアルデヒド化合物を分離・検出したとしても検出感度の不足・同じ溶出時間の化合物ではピークが重なり、同定できないなどという問題点があった。

そこで本研究では化学構造が多岐にわたるアルデヒド化合物を高感度・網羅的に同定・定量する解析法を開発し、酸化ストレス関連疾患の発症や進行に関わる早期診断マーカー・治療ターゲット候補の探索ならびにリスク評価を行う。

2. 研究の目的

本研究では、三連四重極型質量分析計

(LC-ESI/MS/MS) を用いて任意の生体組織・細胞中などよりアルデヒド化合物を網羅的に同定および定量する新規解析法を開発し、酸化ストレス関連疾患、本研究では特に肥満・糖尿病に着目し、その発症や進行段階で増加するアルデヒド化合物の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アルデヒド化合物の LC/MS による網羅的解析法の開発

本研究では、DNPH と同様にアルデヒド基やケトン基と特異的に反応する dansyl hydrazine (DH) を誘導体化試薬として用いることとした。DH は化学構造上 dimethylamino 基を有することから強いプロトン化能を持ち、LC/MS において誘導体化物は非常に高感度に検出できる特徴を持つ。

まず、各種アルデヒド標品を DH とアセトニトリル溶液下で誘導体化し、LC-ESI-MS/MS (選択的反応モニタリングモード; SRM) で解析した。分析装置は HPLC; Agilent 1200 series、MS; Agilent6410B を用いた (Agilent technology 社)。

(2) 肥満・糖尿病モデルマウス血漿中アルデヒド化合物の網羅的解析

肥満・糖尿病モデルマウス (*ob/ob*) およびその対照群として C57BL/6J を日本 SLC 社より導入した。飼育条件は単独飼育、温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、照明時間は 8 時から 20 時、消灯時間は 20 時から 8 時とした。

31 週齢の野生型 (C57BL/6J, $n=5$)、肥満・糖尿病モデルマウス (*ob/ob*, $n=5$) より血漿を採取し、クロロホルム-メタノール (2:1) で脂溶性画分を抽出した。次に脂溶性画分を DH で誘導体化し、LC/ESI-MS/MS (SRM) により解析した。

4. 研究成果

(1) アルデヒド化合物の LC/MS による網羅的解析法の開発

アルデヒド化合物-DH 誘導体は、MS/MS 解析時に特徴的開裂パターン (m/z 236.1) を示すことが知られている (図 1)。

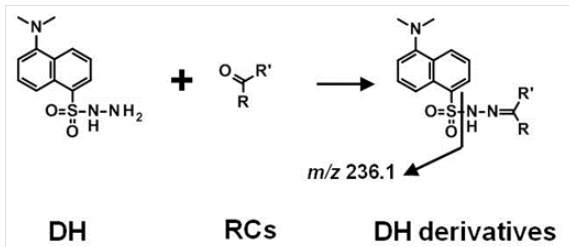


図 1 アルデヒド化合物 (RCs) の DH 誘導体化

そこで SRM を利用すると、アルデヒド化合物-DH 誘導体の質量を M としたとき、プリカーサーイオンを M+1、プロダクトイオンを 236.1 に固定して、プリカーサーイオンを 1 刻みに分析を行うと、種々のアルデヒド化合物を余す所無く高感度に測定することができる。

本解析法を用いてまず、種々のアルデヒド標品を DH 誘導体化した後、LC-ESI-MS/MS (SRM) で解析したところ、網羅的且つ高感度・特異的に検出することが可能であることを見出した (図 2)。

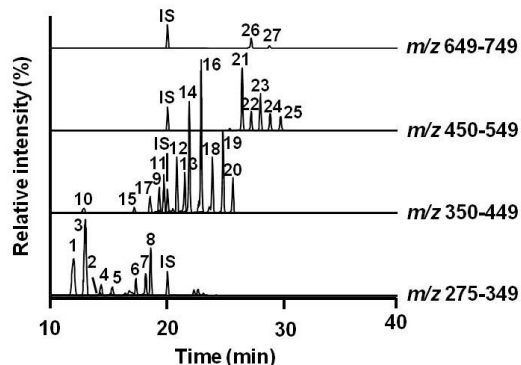


図 2 標品アルデヒド-DH 誘導体の LC/ESI-MS/MS 解析

(1) Acetaldehyde (t_R :12.9 min, m/z 292); (2) Acrolein (t_R :14.2 min, m/z 304); (3) Glyoxal (t_R :13.0 min, m/z 306); (4) Propanal (t_R :14.4 min, m/z 306); (5) Crotonaldehyde (t_R :15.3 min, m/z 318); (6) Pentanal (t_R :17.2 min, m/z 334); (7) 2-Hexenal (t_R :18.1 min, m/z 346); (8) Hexanal (t_R :18.5 min, m/z 348); (9) 2-Heptenal (t_R :19.2 min, m/z 360); (10) HHE (t_R :13.0 min, m/z 362); (11) Heptanal (t_R :19.6 min, m/z 362); (12) Octanal (t_R :20.7 min, m/z 376); (13) 2-Nonenal (t_R :21.3 min, m/z 388); (14) Nonanal (t_R :21.7 min, m/z 390); (15) HNE (t_R :17.1 min, m/z 404); (16) Decanal (t_R :22.7 min, m/z 404); (17) EDE (t_R :18.4 min, m/z 416); (18) Undecanal (t_R :23.6 min, m/z 418); (19) Dodecanal (t_R :24.5 min, m/z 432); (20) Tridecanal (t_R :25.3 min, m/z 446); (21) Tetradecanal (t_R :26.1 min, m/z 460); (22) Pntadecanal (t_R :26.9 min, m/z 474); (23) Hexadecanal (t_R :27.6 min, m/z 488); (24) Heptadecanal (t_R :28.4 min, m/z 502); (25) Octadecanal (t_R :29.3 min, m/z 516); (26) Secosterol-A (t_R :26.7 min, m/z 666); (27) Secosterol-B (t_R :28.3 min, m/z 666); (IS) *p*-BOBA (t_R :20.1 min, m/z 460).

(2) 肥満・糖尿病モデルマウス血漿中アルデヒド化合物の網羅的解析

(1) で開発した網羅的解析法を用いて C57BL/6J および *ob/ob* マウス血漿中のアルデヒド化合物の網羅的解析を行った。

その結果、既知、未知化合物を含めて C57BL/6J 群と *ob/ob* 群では DH 誘導体由来のピーク数としてそれぞれ 539 と 565 のピーク

を確認した (図 3)。また、*ob/ob* 群では C57BL/6J 群と比較して 460 のピークが増加し、そのうち、既知化合物では glyoxal, 4-HNE, 4-HHE, hexanal など脂質過酸化由来のアルデヒド化合物が有意に増加していることを確認した (図 4)。特に glyoxal は C57BL/6J 群 (0.47 μ M)、*ob/ob* 群 (3.32 μ M) と比較すると約 7 倍と顕著であった。これらのアルデヒド化合物は強い細胞傷害性を有する事から、肥満に伴う糖尿病など様々な疾病の発症や進行に關与している可能性が示唆された。

今後はさらに増加した未同定化合物の化学構造の解析および炎症誘導活性など生理活性の有無を詳細に検討し、疾患の発症や進行への影響を調べる必要がある。

また、これらの結果より、本解析法を用いることは酸化ストレス関連疾患の早期診断マーカー・治療ターゲットの探索に有用であることが明らかとなった。

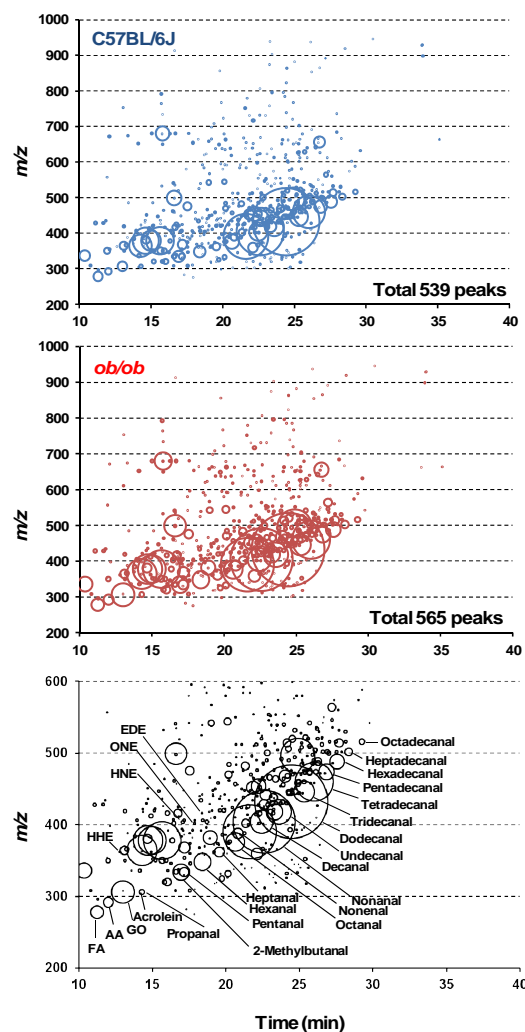


図 3 マウス血漿中のアルデヒドマップ (m/z 275-949)

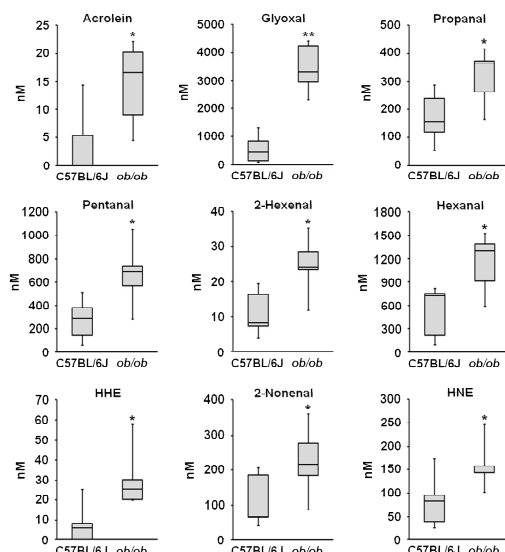


図4 マウス血漿中アルデヒド濃度

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 4 件)

Tomono S, Yasue Y, Miyoshi N, Ohshima H. Cytotoxic effects of secosterols and their derivatives on several cultured cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2013) **77** 651-653. (査読有)

Miyoshi N, Iwasaki N, Tomono S, Ohshima H. Occurrence of cytotoxic 9-oxononanoyl secosterol aldehydes in human low-density lipoprotein. *Free Radic Biol. Med.* (2013) **60** 73-79. (査読有)

Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014) **446** 702-708. (査読有)

Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H. Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. *Journal of chromatography B* (2015) **988** 149-156. (査読有)

[学会発表](計 9 件)

伴野勸、三好規之、大島寛史 疾患マーカー探索を指向したアルデヒド化合物の網羅的解析法の開発 第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 2012 年 6 月 7 日~8 日 徳島

伴野勸、村田晴美、大畑美幸、三好規之、大

島寛史 LC-ESI-MS/MS を用いた脂質過酸化物由来アルデヒド化合物の網羅的解析法の開発 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 12 日~14 日、福岡

伴野勸、長澤美沙、村田晴美、眞田峻介、三好規之、大島寛史 LC/ESI-MS/MS による肥満・糖尿病モデルマウス (ob/ob) 血漿中アルデヒドの網羅的解析 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日~13 日、横浜

長澤美沙、伴野勸、三好規之、大島寛史 神経細胞様分化 PC-12 への amyloid- β 曝露によって生成されるアルデヒド類の網羅的解析 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日~13 日、横浜

Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H. Development of a comprehensive analytical method for lipophilic reactive carbonyl compounds in biological samples. SFRR-Europe 2013 Conference 2013 年 9 月 23 日~25 日 Athens, Greece

Tomono S, Nagasawa M, Miyoshi N, Ohshima H. Global analysis of reactive carbonyls formed in neuronal PC-12 cells by exposed to amyloid-beta. SFRR1 2014 2014 年 3 月 23 日~26 日 Kyoto, Japan

伴野勸、三好規之、徐結苟、津田洋幸、大島寛史 多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物の網羅的解析 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 2014 年 9 月 4 日~5 日 京都

[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

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伴野 勸 (TOMONO, susumu)

静岡県立大学食品栄養科学部

客員共同研究員

研究者番号: 60554011