

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790175

研究課題名(和文) 血漿中イソプレノイド高感度定量の開発と新規抗がん剤ターゲットとしての有用性

研究課題名(英文) Analytical development for determination of isoprenoid compounds in human plasma and usefulness as a new target of anti-cancer drugs

研究代表者

中川 沙織 (Nakagawa, Saori)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30410228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イソプレノイド化合物のファルネシルピロリン酸(FPP)は、細胞増殖に関与し新しい抗がん剤のターゲットとして注目されている。そこで、LC-MS/MSおよびヘッドスペースGC-FIDを用いた高感度定量法を開発し、細胞培養系によるイソプレノイドの代謝に関係する化合物の作用評価に応用した。また、ヒト血漿中の濃度測定を行い、健常人とがん患者の濃度を比較した。

確立した本定量法は、化合物のビスホスホネート薬およびザラゴジン酸、ポリフェノール化合物のヘスペレチンおよびナリンゲニンの機能評価に有用であった。また、肺がん患者の血漿中FPP濃度が健常人より低値であることを認め、がんとの関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Isoprenoids are intermediates of cholesterol biosynthesis, and also the precursors of Ras proteins related to cell proliferations. Recently, an inhibitory effect of bisphosphonate or statins on the biosynthesis of isoprenoid (especially, farnesyl pyrophosphate, FPP) has been noted as a target of an anti-cancer drug. In this study, we have developed a highly sensitive determination method of isoprenoids by LC-MS/MS and headspace GC-FID, and then applied to human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells and human plasma samples.

Established analytical method was useful for functional estimation of bisphosphonate, zaragozic acid and polyphenols of hesperetin and naringenin by HepG2 cell culture. Furthermore, FPP concentration levels of lung cancer patients' plasma were inclined to be lower than those of healthy volunteers' plasma. Therefore, it was suggested that plasma FPP might be utilized as tumor marker.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：ファルネシルピロリン酸 LC-MS/MS がん イソプレノイド化合物 ザラゴジン酸 ヘッドスペースGC-FID ポリフェノール

## 1. 研究開始当初の背景

コレステロール合成経路中のイソプレノイド化合物 (IPP、DMAPP、FPP、GPP および GGPP) は細胞増殖に関係するタンパク質の修飾に関与しており、新しい抗がん剤のターゲットとして注目されている。ところが、これらイソプレノイド化合物は血漿中にごく微量しか存在せず、MS 測定で妨害となるリン脂質と同じリン酸基を持つため、血漿への応用は難しく、血漿中濃度は殆ど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

### (1)イソプレノイド化合物の定量方法

固相抽出法でリン脂質のみを除去することで高感度測定可能なイソプレノイド化合物の LC-MS/MS 法を確立する。イソプレノイド化合物の中でも DMAPP および IPP は異性体の関係にあり、LC では分離が難しいため、DMAPP を酸加水分解して生成されるイソプレンをヘッドスペース GC-FID 法で定量することで DMAPP を選択的に定量する。このヘッドスペース GC-FID 法および LC-MS/MS 法と組み合わせることでイソプレノイド化合物の定量を行う。

### (2)細胞培養系への応用

細胞培養系を用いてこの定量法を抗がん剤の評価に応用し、新規抗がん剤として提案する。

### (3)ヒト血漿検体への応用

この定量法を血液検体に応用し、これまで明らかにされていなかった血漿中イソプレノイド濃度を明らかにし、がんバイオマーカーとしての可能性を探る。

## 3. 研究方法

### (1)イソプレノイド化合物の定量方法

#### LC-MS/MS 定量法

LC-MS/MS を用いたイソプレノイド化合物の定量法を確立した。まず、アセトニトリルによる除タンパクを行った後、リン酸基を認識する Hybrid SPE-Phospholipid を用いて固相抽出を行った。洗浄後、イソプレノイド化合物のみを溶出させ、この溶出液を LC-MS/MS で定量した。LC-MS/MS は MRM モードで行うことで感度良く測定できた。

#### ヘッドスペース GC-FID 法

イソプレノイド化合物の DMAPP に 1 mol/L 硫酸を添加し、70、60 分加温することで加水分解させ、生成されるイソプレンを、ヘッドスペース GC-FID 法を用いて定量する。本法を選択的に DMAPP を定量する方法として確立した。

### (2)細胞培養系への応用

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて、脂質含有量の少ない LPDS を用いて培養した。こ

のコレステロール合成系を亢進させる実験系を用いることで、イソプレノイド化合物の合成を促進させた。この実験条件下で、FPP 合成酵素阻害作用のあるビスホスホネート薬 (パミドロネートリセドロネート、クロドロネートおよびエチドロネート)、クロロゲン酸、ザラゴジン酸、ポリフェノール (ナリンゲニン、ヘスペレチン、エピガロカテキンおよびダイゼイン) を共に培養し、細胞培養上清あるいは細胞内のイソプレノイド化合物濃度を、LC-MS/MS 法およびヘッドスペース GC-FID 法を用いて定量し、作用評価した。なお、評価物質はあらかじめ細胞毒性を検討し、細胞毒性が認められない濃度で評価を行った。

### (3)ヒト血漿検体への応用

アセトニトリルで除タンパクのみを行う簡便な前処理法を用いて、ヒト血漿中イソプレノイド化合物濃度の測定を行った。血漿マトリックスによる感度変化が認められたことから標準添加法を用いて定量を行った。測定法の検証には、市販されている健康人血漿を用いて行った。検体測定には、研究協力者の佐賀大学木村晋也博士から供与された健康人血漿検体 7 名、肺がん患者血漿検体 106 名について検討を行った。なお、臨床検体は、新潟薬科大学倫理委員会の承認を経てから行った (承認番号 004、平成 24 年 12 月 7 日)。

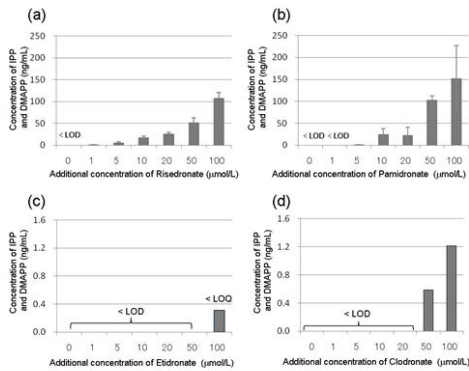
## 4. 研究成果

### (1)イソプレノイド化合物の定量方法

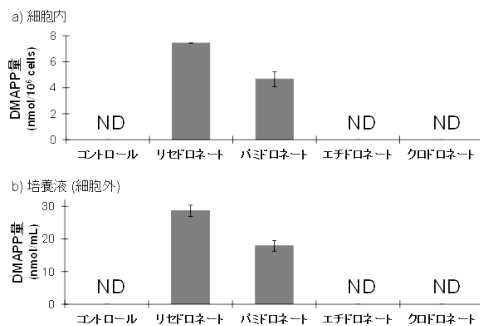
LC-MS/MS を用いて、IPP、DMAPP、FPP、GPP および GGPP の 5 成分の定量法を検討したところ、IPP と DMAPP の混合物、FPP、GPP および GGPP が分離定量できた。分離できない IPP および DMAPP については、ヘッドスペース GC-FID 法を用いて DMAPP のみを酸加水分解し、生成したイソプレンを定量することで DMAPP を定量した。また、LC-MS/MS 法においては、リン酸基を特異的に認識する固相抽出カラム (HybridSPE-Phospholipid) を用いてリン酸基を持つイソプレノイド化合物および血漿中や細胞内のマトリックスであるリン脂質をトラップさせ、溶出液にアンモニア水を用いることでイソプレノイド化合物の中でも極性の高い IPP および DMAPP のみを溶出させる前処理法を確立した。

### (2)細胞培養系への応用

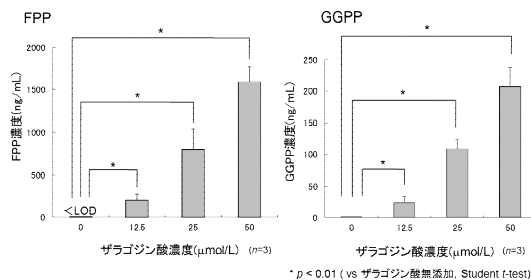
LC-MS/MS 法を用いて細胞培養系に応用し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に FPP 合成酵素阻害薬であるビスホスホネート薬を添加すると、細胞培養液上清中に濃度依存的に IPP および DMAPP の蓄積を確認することができた。さらに FPP 合成酵素阻害作用の強さについても評価でき、パミドロネート、リセドロネート、クロドロネート、エチドロネートの順であった。



次に、ヘッドスペース GC-FID 法を用いて細胞培養系に応用し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に FPP 合成酵素阻害薬であるビスホスホネート薬を評価したところ、ビスホスホネート薬の中でも FPP 合成酵素阻害作用が強いと言われているリセドロネートおよびパミドロネートについて細胞内外において DMAPP の蓄積が確認できた。この結果は、LC-MS/MS 法の測定結果とほぼ同様の結果であった。



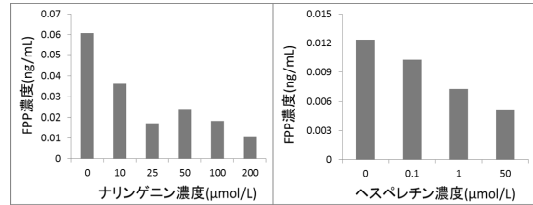
また、イソプレノイド化合物に作用する物質として、コレステロール合成阻害作用をもつクロゲン酸を評価したところ、FPP および GGPP の増加は認められなかった (data not shown) が、スクワレン合成阻害作用のあるザラゴジン酸では、濃度依存的に FPP および GGPP の増加が認められた ( $p < 0.05$ , student  $t$ -test)。



次に、ポリフェノールについても同様に検討を行ったところ、茶カテキンであるエピガロカテキンおよび大豆由来ダイゼインについては大きな変化が認められなかったが、柑橘由来のナリンゲニンおよびヘスペレチンにおいて FPP の減少が認められた。

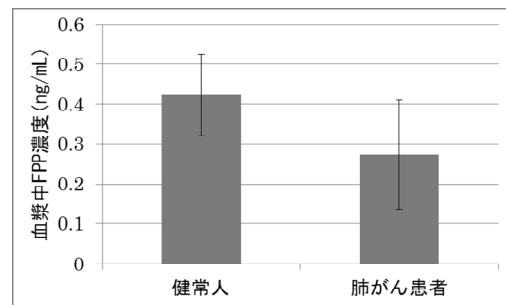
以上より、ザラゴジン酸および柑橘由来ポリフェノール (ナリンゲニンおよびヘスペレチン) が、細胞増殖に關与するイソプレノイド化合物に対する新しい作用を持つことが

示唆された。



### (3) ヒト血漿検体への応用

ヒト血漿中イソプレノイド化合物の定量においては、有機溶媒による簡便な除タンパクのみの前処理を行う LC-MS/MS 法を用いて測定を行った。IPP および DMAPP 混合物、GPP および GGPP は検出限界以下であったが、FPP は定量可能であった。FPP の検量線は良好な直線性を示したが、血漿マトリックスの存在に伴う MS 感度の相違が認められた。そのため、標準添加法を用いて血漿試料を測定したところ、比較的安定して測定することができた。本定量法をがん患者試料中の FPP 濃度測定に応用したところ、約  $0.273 \pm 0.137$  ng/mL,  $n=106$  と得られ、健常人 ( $0.423 \pm 0.101$  ng/mL,  $n=7$ ) よりも低値を示した。健常人の検体数を増やして確認する必要があるが、FPP 定量とがんとの関連性が示唆された。



以上をまとめると、LC-MS/MS 法およびヘッドスペース GC-FID 法を用いてイソプレノイド化合物の定量法を確立し、培養細胞系を用いてイソプレノイド化合物に対して作用する化合物の評価を行った。FPP 合成酵素阻害作用のあるビスホスホネート薬においては、IPP および DMAPP の増加が認められた。また、ザラゴジン酸においては、FPP の増加が認められた。一方、ポリフェノールのナリンゲニンおよびヘスペレチンにおいては、FPP の減少が示唆され、イソプレノイド化合物に作用する新規の物質として見出すことができた。

さらに、ヒト血漿中のイソプレノイド化合物の定量を行ったところ、健常人に比べ、肺がん患者において、FPP 濃度が若干低下していることが認められ、FPP とがんとの関連性が示唆された。

### 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 18 件)

- Ashihara E, Munaka T, Kimura S, Nakagawa S, Nakagawa Y, Kanai M, Hirai H, Abe H, Miida T, Yamato S, Shoji S, Maekawa T: Isopenentenyl Pyrophosphate Secreted from Zoledronate-Stimulated Myeloma Cells, Activates the Chemotaxis of  $\gamma\delta$ T Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 463:650-655, 2015. (査読有)
- 森川 剛、岡澤 香津子、清水 貴裕、小田切 佐代子、不破 史子、中川 沙織、大和 進: 急性メタノール中毒の1例とギ酸の血中濃度分析法の検討, 日本中毒学会誌 28(3):243-246, 2015. (査読有)
- Nakagawa S, Kuwabara N, Takamatsu Y, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Detection of CYP2C19 gene polymorphism from noninvasive samples by cycling probe technology. *Ann Clin Biochem*. 51(Pt 2):298-300, 2014 (査読有).
- Nakagawa S, Kojima Y, Sekino K, Yamato S: Effect of polyphenols on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase activity in human hepatoma HepG2 cell extracts. *Biol Pharm Bull*. 36(12):1902-1906, 2013. (査読有)
- Hirayama S, Nakagawa S, Soda S, Kamimura Y, Nishioka E, Ueno T, Fukushima Y, Higuchi K, Inoue M, Seino U, Ohmura H, Yamato S, Miida T: Ezetimibe decreases serum oxidized cholesterol without impairing bile acid synthesis in Japanese hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 230(1):48-51, 2013. (査読有)
- 佐藤 友美, 桑原直子, 中川 沙織, 大和 進: 選択的固相抽出前処理法を用いるイソペンテニルピロリン酸とジメチルアリルピロリン酸との含量の LC-MS/MS 定量, 分析化学 62(8):731-735, 2013. (査読有)
- Nakagawa S, Watanabe M, Tanaka T, Yamato S: Measurement of cholesterol precursors and cholesterol in human hepatoma cells and effects of flavanones and isoflavones on cholesterol biosynthetic pathway. *Biochimica Clinica*, 37:S594, 2013. (査読有)
- Yamato S, Nakagawa S, Kojima Y, Sekino K: Measurement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase Activity in human hepatoma HepG2 cell extracts and effects of polyphenols on its activity. *Biochimica Clinica*, 37:S607, 2013. (査読有)
- Nakagawa S, Kuwabara N, Kobayashi H, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Simple column-switching HPLC method for determining levels of the antifungal agent micafungin in human plasma and application to patient samples. *Biomed. Chromatogr*. 27 (5):551-555, 2013. (査読有)
- Hasegawa E, Nakagawa S, Miyate Y, Takahashi K, Ohta S, Tachikawa E, Yamato S: Inhibitory effect of protopanaxatriol ginseng metabolite M4 on the production of corticosteroids in ACTH-stimulated bovine adrenal fasciculata cells. *Life Sci*. 92(12):687-693, 2013. (査読有)
- Hasegawa E, Nakagawa S, Sato M, Tachikawa E, Yamato S: Effect of polyphenols on production of steroid hormones from human adrenocortical NCI-H295R cells. *Biol Pharm Bull*. 36(2):228-237, 2013. (査読有)
- Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano KI, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T: Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416:54-59, 2013. (査読有)
- 中川 沙織, 星 尚寛、久保 敦史、大和 進: 緑茶飲料中に含まれるポリフェノールの定量と茶葉の種類によるポリフェノール含量の違い, 分析化学 62(1):51-55, 2013. (査読有)
- Nishiyama A, Isobe H, Iwao Y, Takano T, Hung WC Taneike I Nakagawa S, Dohmae S, Iwakura N, Yamamoto T: Accumulation of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin (PVL) in the detergent-resistant membrane microdomains (DRMs) on the target cells is essential for its cytotoxicity. *FEMS Immunol. Med Microbiol*. 66(3):343-352, 2012. (査読有)
- Isobe H, Nishiyama A, Takano T, Higuchi W, Nakagawa S, Taneike I, Fukushima Y, Yamamoto T: Reduction of overall *Helicobacter pylori* colonization levels in the stomach of mongolian gerbil by *Lactobacillus johnsonii* La1 (LC1) and Its in vitro activities against *H. pylori* motility and adherence. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76(4):850-852, 2012. (査読有)
- 長谷川 絵梨、中川 沙織、高橋 香織、大和 進: 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性に対するポリフェノールの保護効果, 日本補完代替医療学会誌 9 (1):65-68, 2012. (査読有)
- Reva I, Takano T, Higuchi W, Iwao Y, Taneike I, Nakagawa S, Ike M, Pererva OV, Tarankov AS, Agapov M, Rizhkov E, Singur O, Reva G, Potapov V, Yamamoto T: Virulence genotypes and drug resistance

of *Helicobacter pylori* from Vladivostok, Russia: another feature in the Far East. *Microbiol Immunol*. 56(3):198-202, 2012. (査読有)

中川 沙織、大和 進：「特集：脂質研究のトピックス」4. ヒト血中オキシステロールの高感度分析法、生物試料分析, 35(2):119-126, 2012.(査読有)

〔学会発表〕(計 25 件)

中川 沙織、不破 史子、荒金 尚子、佐藤 明美、木村 晋也、平山 哲、三井田 孝、大和 進：LC-MS/MS を用いた血漿中ファルネシルピロリン酸の定量とガン患者検体への応用。日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月

大和 進、中川 沙織、不破 史子：コレステロールの異化代謝に対するダイゼインの影響-細胞培養系/GC-MS 法を用いた解析-。日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月

不破 史子、中川 沙織、大和 進：ダイゼインの新規コレステロール合成抑制作用-細胞培養系/GC-MS 法による解析-。日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月

中川 沙織、桑原 直子、下枝 貞彦、太田 伸、立川 英一、大和 進：サイクリングプローブ法を用いた薬物代謝酵素 CYP2C19 の一塩基多型測定法の開発。第 26 回生物試料分析科学学会年次学術集会 2016 年 2 月 21 日(沖縄) **優秀発表賞受賞**

大和 進、中川 沙織、不破 史子、木村 晋也、平山 哲、三井田 孝：LC-MS/MS を用いた血漿中ファルネシルピロリン酸の高感度定量。第 26 回生物試料分析科学学会年次学術集会 2016 年 2 月 21 日(沖縄)

中川 沙織、大和 進：24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性に対するヘスペレチンの保護効果。糖転移ヘスペリジン・ビタミン P 研究会 第 7 回研究発表会 2015 年 12 月 4 日(東京) **招待講演**  
酒井 優花、下枝 貞彦、金子 明日美、中田 彩花、大塚 沙穂里、田所 弘子、中川 沙織、大和 進、太田 伸：唾液 IgA を指標とした  $\gamma$ -アミノ酪酸によるストレス抑制効果と免疫力増強効果の検討。日本医療薬学会第 25 回年会 2015 年 11 月

中田 彩花、下枝 貞彦、金子 明日美、酒井 優花、坂口 佐穂子、田所 弘子、中川 沙織、大和 進、太田 伸：唾液 IgA を指標としたアロマセラピーによるストレス抑制効果と免疫力増強効果の検討。日本医療薬学会第 25 回年会

2015 年 11 月

中川 沙織：教育講演 薬物代謝からみた個別化医療。第 90 回新潟県臨床検査学会(新潟)。2015 年 10 月 **招待講演**  
不破 史子、中川 沙織、大和 進：細胞培養系/GC-MS 法を用いたコレステロールの合成経路を抑制する物質の探索。日本分析化学会関東支部第 29 回新潟地区部会発表会(新潟) 2015 年 9 月

中川 沙織、不破 史子、大和 進：イソプレノイド化合物定量のための前処理法と細胞培養系への応用。第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2015) (長崎) 2015 年 8 月

中川 沙織、不破 史子、大和 進：様々な作用をもつ茶カテキン類の緑茶飲料中および茶葉中の含有量の比較。日本薬学会第 135 年会(神戸)、2015 年 3 月

S. Nakagawa, S Yamato. New inhibitory effect of citrus flavonoids on sterol-delta7-reductase (DHCR7). The 7th International Niigata Symposium on Diet and Health (Niigata, Japan), 2014(October)

森川 剛、岡澤 香津子、清水 貴裕、渡辺 徳、南 聡、小田切 佐代子、不破 史子、中川 沙織、大和 進：急性メタノール中毒の 1 例とメタノール及びギ酸の血中濃度分析法の検討。第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(東京)、2014 年 7 月

中川 沙織、駒沢 圭祐、大和 進：コレステロール合成酵素 7-dehydrocholesterol reductase mRNA の発現量のフラバノン類による抑制作用。日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月

立川 英一、中川 沙織、大和 進、武井 正夫：神経・内分泌・免疫系に影響を与える生薬成分 - In vitro で解析した薬用人蔘ジンセノシドの効き方 -。第 87 回日本薬理学会年会(仙台)、2014 年 3 月

中川 沙織、佐藤 友美、桑原 直子、大和 進：リン脂質除去用の固相抽出前処理法を用いるイソペンテニルピロリン酸およびジメチルアリルピロリン酸含量の LC-MS/MS 定量とその応用。日本分析化学会 第 62 年会(大阪)、2013 年 9 月

中川 沙織、平山 哲、木村 晋也、三井田 孝、大和 進：血漿中イソプレノイドの LC-MS/MS 高感度定量。第 53 回日本臨床化学学会年次学術集会(徳島)、2013 年 8 月

Saori Nakagawa, Mayuri Watanabe,

Tomoko Tanaka, Susumu Yamato.  
Measurement of cholesterol precursors and cholesterol in human hepatoma cells and effects of flavanones and isoflavones on cholesterol biosynthetic pathway. 20<sup>th</sup> IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Milano, Italy), 2013(May)

**Selected poster.**

Susumu Yamato, Saori Nakagawa, Yuko Kojima, Koichi Sekino. Measurement of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase activity in human hepatoma HepG2 Cell extracts and effects of polyphenols on its activity. 20<sup>th</sup> IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Milano, Italy), 2013(May)

- ⑳ 中川 沙織、倉田 遥、大和 進：神経芽細胞腫由来脳細胞から産生されるアミロイドベータタンパク質(Aβ42)に対するケトン体の影響。日本薬学会第133年会(横浜)、2013年3月
- ㉑ 三浦 睦美、佐藤 友美、桑原 直子、中川 沙織、大和 進：リン酸基を認識する固相抽出前処理法を用いたヒト血漿中イソプレノイド化合物の定量。日本薬学会第133年会(横浜)、2013年3月
- ㉒ 本間 智也、長谷川 絵梨、中川 沙織、大和 進：GC-MS法を用いた血漿中エステル型および遊離型オキシステロールの定量。日本薬学会第133年会(横浜)、2013年3月
- ㉓ Saori Nakagawa, Mayuri Watanabe, Tomoko Tanaka, Susumu Yamato. New inhibitory effect of flavanones and isoflavones on cholesterol synthesis. The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health (Niigata, Japan), 2012(October)
- ㉔ 中川 沙織、高松 結、下枝 貞彦、太田 伸、大和 進：サイクリングプローブ法を用いる非侵襲的な薬物代謝酵素CYP2C19の一塩基多型測定法。第52回日本臨床化学会年次学術集会(岩手)、2012年9月

〔図書〕(計1件)

中川 沙織、大和 進：第4章 抗ストレス食品の培養細胞による機能評価。抗ストレス食品の開発と展望、横越英彦監修、株式会社シーエムシー出版、48-60、2012.

〔その他〕

受賞

第26回生物試料分析科学会年次学術集会

優秀発表賞受賞 (2016年2月21-22日)  
「サイクリングプローブ法を用いた薬物代謝酵素CYP2C19の一塩基多型測定法の開発」

ホームページ

<http://www.nupals.ac.jp/labo/ph/analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 沙織 (NAKAGAWA, Saori)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30410228

(2) 研究協力者

大和 進 (YAMATO, Susumu)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60057370

木村 晋也 (KIMURA, Shinya)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359794