

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460669

研究課題名(和文) プラズマローゲンの網羅的解析と免疫測定法の開発

研究課題名(英文) Comprehensive analyses and development of immunometric assay for plasmalogen

研究代表者

惠 淑萍 (Hui, Shu-Ping)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：90337030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： プラズマローゲンは抗酸化作用を有するリン脂質で、動脈硬化症やアルツハイマー病を予防すると考えられている。本研究ではコリン型の化学合成法を改善した。またエタノールアミン型の化学合成法を日本国内で初めて確立した。

化学合成で得られたプラズマローゲンを用いてヒト血中プラズマローゲンを網羅的な分析ができた。液体クロマトグラフィー質量定量法を用いてエタノールアミン型(PlsEtn)およびコリン型プラズマローゲン(PlsCho)の定量を行った。血中PlsEtn18:0/20:4濃度が同じ組成のPlsCho18:0/20:4より高かった。なお、プラズマローゲンとBSAの化合物を調製しマウスに免疫を行った。

研究成果の概要(英文)： Plasmalogens (Pls) are glycerophospholipids owning antioxidative effect, so it is conceivable that Pls may prevent arteriosclerosis and Alzheimer's disease. In our study, chemical synthesis method for choline Pls (PlsCho) has been improved; chemical synthesis method for ethanolamine Pls (PlsEtn) has been established.

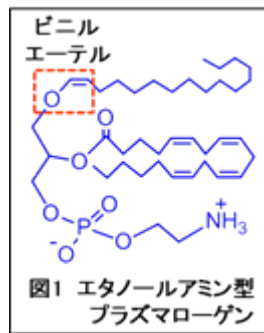
Comprehensively qualitative and quantitative analyses of Pls in human serum have been carried out by LC-MS/MS using the synthetic Pls standards. The concentration of PlsEtn18:0/20:4 shows higher than that of PlsCho18:0/20:4 in human serum. Some mice were immunized with BSA-plasmalogens obtained from chemical synthesis.

研究分野：臨床化学

キーワード：プラズマローゲン plasmalogen エタノールアミン型 コリン型

1. 研究開始当初の背景

プラズマローゲンは、脳・心臓・肝臓・血漿リポ蛋白等に存在するリン脂質の一種である。グリセロール骨格の1位にビニルエーテルと2位に多価不飽和脂肪酸を含み、最も酸化を受けやすいリン脂質である。プラズマローゲンは生体内に広く分布し、生体中のリン脂質の18%、血清中リン脂質の3-5%を占める。ヘッドグループの構造から、コリン型とエタノールアミン型(図1)の2種類に分類される。コリン型は心臓に多く、エタノールアミン型は脳に多く存在している。プラズマローゲンの機能として、細胞膜の流動性の調節や生体における脂質メディエーターの前駆物質であるアラキドン酸(20:4)の貯蔵体としての役割、細胞内あるいは細胞トリポ蛋白間でのコレステロールの搬送にも重要な役割を果たしている可能性が報告されている。近年、プラズマローゲンがリポ蛋白質中で著明なコレステロール酸化抑制作用をもち、脳のアルツハイマー病変部で特異的にその含量が低下すること【Ginsberg ら、Brain Res、1995】、またアルツハイマー病発症に先立ち、血清プラズマローゲン濃度が低下することが報告され【Goodenowe ら、J Lipid Res、2007】、病因論的に注目されている。しかし、プラズマローゲンの標品が入手できないため分析法が確立していないことが研究の足かせとなっている。



プラズマローゲンの測定法については、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)、液体クロマトグラフィー質量分析法(liquid chromatography/mass spectrometry: LC/MS)を用いた測定法などが開発されてきた。HPLC法は、エタノールアミン型プラズマローゲン(PlsEtn)とコリン型プラズマローゲン(PlsCho)の分離は可能なものの、sn-1ポジションやsn-2ポジションの脂肪酸の組成を知ることはできない。一部疾患においては、特定のプラズマローゲン分子種濃度が低下すると報告されている。このことから、分子種毎の定量を行うことが必要と考えられる。そこで分子種別の分析が可能でLC/MS法がプラズマローゲン測定においても用いられ始めた。しかし、従来のLC/MSを用いたプラズマローゲン測定法は、内部標準物質にプラズマローゲンと物理化学的性質の異なるコール酸や、内因性リン脂質などを用いており、分析化学的に改善の余地が残されている。以上のように、プラズマローゲンの測定法はいまだ確立されたとは言えず、そのこ

とがプラズマローゲンの生物作用や疾患との関連性の研究の障害となっている。

2. 研究の目的

LC/MSを用いたプラズマローゲンの新規定量法を開発し、ヒト血中に多く存在するプラズマローゲン分子種についてLC/MSにより網羅的定性または定量的に解析する。合成プラズマローゲンからハプテンを合成し、蛋白と結合させて免疫することによりイムノアッセイの開発が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

血中プラズマローゲンの測定では、血液からのプラズマローゲン抽出やLC/MS測定の段階で回収率が不安定になることを避けられない。また、超高感度が必要とされる。以下の手順で行った。

- 1) 網羅的、包括的定性質量分析法でプラズマローゲン分子種を同定する；
- 2) 同定した分子種の定量的質量分析を行う；さらに、学生ボランティア(男5名、女6名、平均年齢23±3歳)から血清を採取し、プラズマローゲンの分子種及び濃度を測定した。
- 3) 濃度の高い分子種や臨床的意義が期待される分子種にフォーカスし、ハプテン合成する；合成ハプテンを用いてマウスを免疫抗原及び抗体の作製を試みる。

4. 研究成果

1) PlsCho合成法の改良およびPlsEtn合成法の確立

今まで当ラボでは確立したPlsCho合成法を踏まえ、無水脂肪酸及び縮合剤を用いて、PlsChoの回収率を上げることができた。また、独自の化学合成法を開発し日本国内で初めてPlsEtnを化学合成した。PlsEtn 16:0/18:1及びPlsEtn 16:0/20:4の構造を高分解能Orbitrap LC/MSおよびNMRにより確認することができた。

2) ヒト血清中各プラズマローゲン分子種

高分解能質量分析LC/MSにより、ヒト血中プラズマローゲン分子種を定性的分析した。グリセロール骨格1位にパルミンチン酸及びステアリン酸のプラズマローゲン(PlsCho 16:0/18:1、16:0/18:2、16:0/20:4、16:0/20:5、16:0/22:6、PlsCho 16:0/18:1、16:0/18:2、16:0/20:4、16:0/20:5、16:0/22:6)は同定された。同様にエタノールアミン型の分子種も同じく検出された。

3) エタノールアミン型プラズマローゲンのLC/MSクロマトグラム

図2に示したとおり、検討したLC/MS測定条件でPlsEtn18:0/20:4、内標準物質(IS)とともに標準品と同等な保持時間に血清サンプルにおいてもピークを得ることができた。

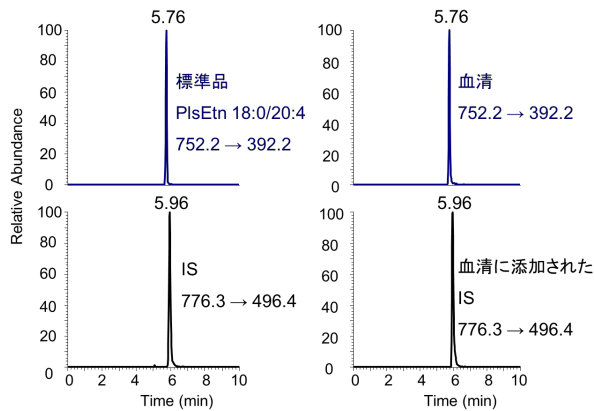


図2. 血清中プラズマローゲンの測定 (エタノールアミン型)

#### 4) コリン型プラズマローゲンの LC/MS クロマトグラム

エタノールアミン型と同様にコリン型プラズマローゲン、IS ともに標準品と同等な保持時間に血清サンプルにおいてもピークを得ることができた (図3)。

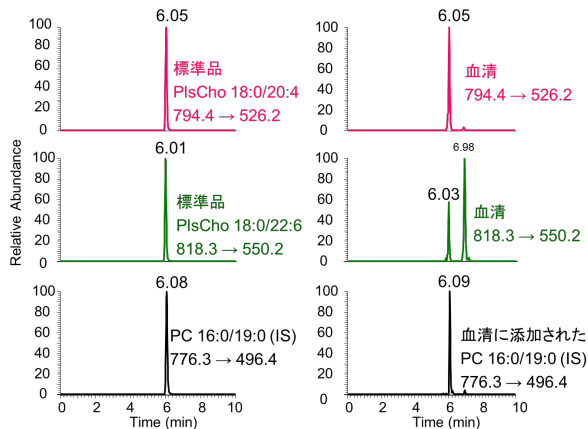


図3. 血清中プラズマローゲンの測定 (コリン型)

#### 5) 検量線、検出限界および定量限界

各種プラズマローゲンの定量性を観るために相対検量線を作成した。縦軸は、それぞれの標準品と IS との面積比、横軸はプラズマローゲン量を示す。いずれの分子種においても 0.4 から 20 pmol の間で良好な直線性が示された。また検出限界、定量限界について検討したところ、図4 の下段に示した結果となった。検量線の幅が広く感度が高いことから、作製した定量法は血清の定量に適すると

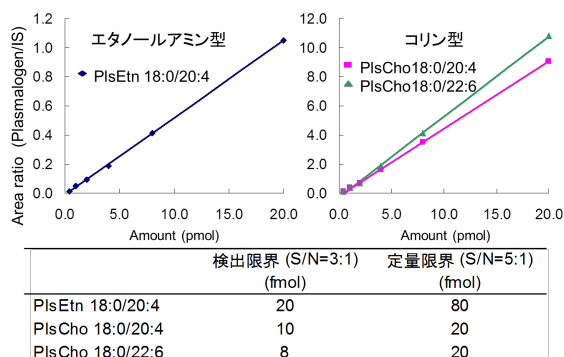


図4. 検量線とび検出限界及び定量限界

考えられる。

#### 6) ヒト血中プラズマローゲンの濃度

若年健常者 11 名についてプラズマローゲンの定量を行った。血清中プラズマローゲン量は、PlsEtn18:0/20:4 が  $57.0 \pm 17.2 \mu\text{M}$ 、PlsCho18:0/20:4 が  $0.43 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 、PlsCho18:0/22:6 が  $0.10 \pm 0.04 \mu\text{M}$  であった。また、男女間での比較では各プラズマローゲン分子種に有意な差はみられず、これらの物質の性差はないと考えられる。

#### 7) プラズマローゲン-ハプテン作成及びマウスへの免疫

グリセロール骨格の 1 位にビニルエーテル含有のリゾリン脂質にカルボン酸無水物と反応させた。得られた化合物に更に BSA あるいは KLH を反応させた結果、BSA-プラズマローゲン或いは KLH-プラズマローゲンを取得した。それらを用いてマウスに免疫し、hybridoma を作製した。Hybridoma 培養液のうち、BSA や KLH と反応しないが、BSA-plasmalogen や KLH-plasmalogen と反応するものがあつた。プラズマローゲンと反応する抗体を産生する hybridoma が得られた可能性が示唆された。

#### 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 11 件)

Yagi A, Miyanaga S, Shrestha R, Takeda S, Kobayashi S, Chiba H, Kamiya H, Hui SP\*. (\*CA) A fatty acid profiling method using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for improvement of assisted reproductive technology. Clin Chim Acta. 456: 100-6. 2016. 査読有

Miura Y, Hui SP\*, Shrestha R, Hiruma T, Takeda S, Fuda H, Ikegawa S, Hirano K, Chiba H. (\*CA) Synthesis of (2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,6- $^2\text{H}_3$ )cholesteryl linoleate and cholesteryl oleate as internal standards for mass spectrometry. Steroids 107: 1-9. 2016. 査読有

Takahashi Y, Ito Y, Wada N, Nagasaka A, Fujikawa M, Sakurai T, Shrestha R, Hui SP, Chiba H. Development of homogeneous assay for simultaneous measurement of apoE-deficient, apoE-containing, and total HDL-cholesterol. Clin Chim Acta 454: 135-42. 2016. 査読有

Okabe H, Hui SP\*, Fuda H, Furukawa T, Takeda S, Shrestha R, Miura Y, Watanabe M, Chiba H. (\*CA) Mass Spectrometric Quantification of

Amphipathic, Polyphenolic Antioxidant of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Anal Sci* 31: 1341-44. 2015. 査読有

Takeda S, Subagyo A, Hui SP\*, Fuda H, Shrestha R, Sueoka K, Chiba H. (\*CA) Elastic modulus of low-density lipoprotein as potential indicator of its oxidation. *Ann Clin Biochem* 52: 647-53. 2015. 査読有

Shrestha R, Hui SP\*, Miura Y, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Fuda H, Chiba H. (\*CA) Identification of molecular species of oxidized triglyceride in plasma and its distribution in lipoproteins. *Clin Chem Lab Med* 53: 1859-69. 2015. 査読有

Shrestha R, Hui SP\*, Imai H, Hashimoto S, Uemura N, Takeda S, Fuda H, Suzuki A, Yamaguchi S, Hirano KI and Chiba H. (\*CA) Plasma capric acid concentrations in healthy subjects determined by UV-labeled HPLC. *Ann Clin Biochem* 52: 588-96 2015. 査読有

Fuda H, Watanabe M, Hui SP, Joko S, Okabe H, Jin S, Takeda S, Miki E, Watanabe T, Chiba H. Anti-apoptotic effects of novel phenolic antioxidant isolated from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) on cultured human hepatocytes under oxidative stress. *Food Chemistry* 176: 226-33. 2015. 査読有

Nishimukai M, Maeba R, Ikuta A, Asakawa N, Kamiya K, Yamada S, Yokota T, Sakakibara M, Tsutsui H, Sakurai T, Takahashi Y, Hui SP, Chiba H, Okazaki T, Hara H. Serum choline plasmalogens-those with oleic acid in sn-2-are biomarkers for coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta* 437:147-54. 2014. 査読有

Shrestha R, Hui SP\*, Sakurai T, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Jin S, Fuda H, Chiba H. (\*CA) Identification of molecular species of cholesteryl ester hydroperoxides in very-low-density and intermediate-density lipoproteins. *Ann Clin Biochem* 51: 662-71. 2014. 査読有

Nishimukai M, Maeba R, Yamazaki Y, Nezu T, Sakurai T, Takahashi Y, Hui SP, Chiba H, Okazaki T, Hara H. Serum choline plasmalogens, particularly those with oleic acid in sn-2, are associated with

proatherogenic state. *J Lipid Res* 55: 956-65. 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 布田博敏, 上甲紗愛, 渡邊 貢, 惠 淑萍, 武田晴治, 渡邊孝之, 千葉仁志: マガキ由来抗酸化物質による抗酸化酵素群の遺伝子発現. 日本農芸学会 2016 年度大会, 札幌, 2016.3.29
2. 惠 淑萍: 質量分析法による種々の脂質分子の定性及び定量分析. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 (シンポジウム), 岐阜, 2015.11.20
3. 高橋遼地, 古川貴之, 惠 淑萍, 千葉仁志: 内部標準物質として用いる非天然型カルジオリピンの合成研究と定量分析へ向けた基礎的検討. 第 55 回日本臨床化学会年次学術集会, 大阪, 2015.10.31
4. 惠 淑萍: 脂肪滴の分析技術. 第 22 回日本未病システム学会学術総会 (シンポジウム), 札幌, 2015.10.11
5. Shrestha Rojeet, 惠 淑萍, 武田晴治, 布田博敏, 千葉仁志: Analysis of phosphatidylcholine hydroperoxides in plasma and triglyceride-rich lipoproteins by LC/MS. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
6. 大谷晋太郎, 惠 淑萍, 岡部浩昭, 布田博敏, 渡辺 貢, 千葉仁志: LC-MS/MS によるマガキ由来フェノール性抗酸化物質の測定法の開発とその応用. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
7. 上甲紗愛, 布田博敏, 渡邊 貢, 惠 淑萍, 武田晴治, 渡邊孝之, 千葉仁志: マガキ由来抗酸化物質の Keap1-Nrf2 経路活性化による肝保護作用. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
8. 橋本咲月, 武田晴治, 寺嶋 駿, 布田博敏, 惠 淑萍, 千葉仁志: システインは LDL を安定化させて酸化を抑制する. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
9. 山本祐輔, 古川貴之, 惠 淑萍, 比能 洋, 西村紳一郎, 千葉仁志: Glycoblotting 法を用いた牛乳中遊離オリゴ糖の網羅的定量解析. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
10. 古川貴之, 惠 淑萍, 比能 洋, 西村紳一郎, 千葉仁志: プロテオミクス技術に基づく脂質アルデヒド類の網羅的定量解析. 第 22 回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
11. 中藪拓哉, 岡部浩昭, 古川貴之, 惠 淑

- 萍, 千葉仁志: 牛乳ビタミンD類の定量に向けた新規ラベル化試薬の合成と応用. 第22回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
12. 三浦佑介, 惠 淑萍, 小林美穂, 清水 力, 千葉仁志: 尿中コレステリルエステル腎脂質代謝を反映する. 第22回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
  13. 寺嶋 駿, 武田晴治, 宮永 賢, 吉田 繁, 惠 淑萍, 千葉仁志: 酸化LDL由来の酸化分解物質の組成と性質. 第22回日本未病システム学会学術総会, 札幌, 2015.10.11
  14. 惠 淑萍, 繁富(栗林)香織, 小林 悠, 千葉仁志: 脂肪細胞の脂肪滴における過酸化トリグリセリドの分析. 第40回日本医用マススペクトル学会年会, 浜松, 2015.9.18
  15. Umetsu S, Miyanaga S, Fuda H, Hui SP, Chiba H: Analyses of hydroperoxide triglycerides in lipid droplets of oxidized HepG2 cell. The second FHS international conference: Gazing into the future of health sciences in Asia, 札幌, 2015.7.3
  16. Joko S, Fuda H, Watanabe M, Hui SP, Takeda S, Watanabe T, Chiba H: Hepatoprotective effect of antioxidant from the Pacific oyster via Keap1-Nrf2 pathway. The second FHS international conference: Gazing into the future of health sciences in Asia, 札幌, 2015.7.3
  17. Hayasaka T, Fuda H, Chiba H, Hui SP: Imaging Mass Spectrometry Reveals the Decrease of Cardiolipin on Kidney of NASH model Mous. 63rd Conference on Mass Spectrometry and allied topics. (St.Louis, Missouri, USA) 2015.6.2
  18. 八木亜希子, 惠 淑萍, 小林清一, 千葉仁志, 神谷博文: ミネラルオイルへの培養液溶出現象に関する検討. 第59回日本生殖医学会学術講演会, 東京, 2014.12.4
  19. 惠 淑萍, Shrestha Rojeet, 平野賢一, 鈴木 朗, 千葉仁志: 中鎖脂肪酸のHPLC法による定量分析. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡, 2014.11.25
  20. 鈴木朗, 和田淳, 長坂博範, 越智康浩, 千葉仁志, 惠 淑萍, 平野賢一: 中性脂肪蓄積心筋血管症における Jordans' anomaly を自動血球分析装置で検出する. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡, 2014.11.23
  21. 和田 淳, 鈴木 朗, 山本志緒里, 越智 康浩, 惠 淑萍, 千葉 仁志, 平野 賢一: 他項目自動血球分析装置 XE-5000 WBC/BASO チャンネルによる、中性脂肪蓄積心筋血管症判別原理の検証. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡, 2014.11.23
  22. 惠 淑萍, Shrestha Rojeet, 平野賢一, 鈴木朗, 千葉仁志: 機能性脂肪酸に関する分析. 第21回日本未病システム学会学術総会, 大阪, 2014.11.2
  23. 岡部浩昭, 惠 淑萍, 布田博敏, 大谷晋太郎, 渡辺孝之, 渡辺貢, 千葉仁志: マガキ抽出液中のフェノール性抗酸化物質の定量. 第21回日本未病システム学会学術総会, 大阪, 2014.11.2
  24. 岡部浩昭, 惠 淑萍, 池川繁男, 比留間貴久, 布田博敏, 渡辺貢, 千葉仁志: LC-MS/MS によるマガキ由来フェノール性抗酸化物質の定量. 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2014.9.7
  25. 三浦佑介, 惠 淑萍, 池川繁男, 千葉仁志: 多重重水素標識コレステロールの合成. 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2014.9.6
  26. 惠 淑萍. シンポジウム「医用マススペクトル学会との共催シンポジウム - 質量分析技術の社会実装 - 」: 「地域・産業振興のための高度脂質分析ラボの立ち上げから将来構想まで». 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 東京 2014.9.6
  27. 惠 淑萍. 「北海道大学健康イノベーションセンターにおける研究マネジメントと研究成果について」, 2014年度 三重大学イノベーション創出セミナー, 三重, 2014.9.4
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 3 件)
- 1) 名称: 抗酸化能測定用リポソーム, 抗酸化能測定方法及びリポソーム  
 発明者: 武田晴治, 千葉仁志, 惠 淑萍  
 権利者: 国立北海道大学  
 出願年月日: 2015年12月22日  
 番号: 特願 2015-249328  
 国内外の別: 国内
  - 2) 名称: 低密度リポタンパク質酸化抑制剤  
 発明者: 惠 淑萍, 武田清治, 佐藤 浩志  
 権利者: 国立北海道大学, 日生バイオ株式会社, 株式会社エル・エスコープレーション  
 番号: 特願 2015-091804  
 出願年月日: 2015年4月28日  
 国内外の別: 国内

3) 名称：サケ白子加水分解物を有効成分とする LDL 酸化抑制剤の発明

発明者：惠 淑萍, 武田清治, 佐藤 浩志

権利者：国立大学法人北海道大学 日生バイオ株式会社

番号：特願 P2014-102

出願年月日：2014 年 12 月 18 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

惠 淑萍 (HUI, Shu-Ping)

北海道大学

保健科学研究所・教授

研究者番号：90337030