

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19590165

研究課題名（和文） 質量分析法を基盤とする臨床化学の新展開

研究課題名（英文） New evolution of clinical chemistry by mass spectrometry

研究代表者

池川 繁男（IKEGAWA SHIGEO）

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90111301

研究成果の概要：

病因・病態を化学の目で把握・理解し、適切な薬物療法を設定する上で、組織の変化や血液、尿などの体液中に含まれる成分の信頼度の高い測定法の確立が強く求められる。本研究では、最新の質量分析法を基盤とする胆汁酸、ステロイドホルモン、オキシステロールなどの硫酸、グルクロン酸との抱合体の体内動態解析法を構築し、本法によって新規代謝排泄経路の存在を世界に先駆けて実証するとともに、内分泌・代謝疾患の診断のみならず病態解析にも有用なことを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：臨床化学

科研費の分科・細目：薬学・臨床化学

キーワード：マスマスプレクトロメトリー、エレクトロスプレーイオン化、オキシステロール、テトラヒドロコルチコステロイド、胆汁酸、グルタチオン、グルクロニド、サルフェート

## 1. 研究開始当初の背景

疾病の診断・治療に臨床化学が果たす役割はまことに大きく、病因・病態を化学の目で把握・理解し、適切な薬物療法の設定に正確で的確な情報を提供することが強く求められる。このため、生化学的手法によって病因・病態を追求する病態化学と、生体試料中の目的成分の測定法の開発に関わる臨床化学（生体成分分析化学）を2本の柱とし、組織の変化や、血液、尿などの体液中に含まれる成分を指標として患者個々の状態を的確に把握する方法論の開発がその基盤となる。

一方、今日における「ゲノム情報から生命科学的研究」においては、遺伝病の病因遺伝子を同定する研究基盤が整い、疾患に関わる遺伝子の同定も可能となっている。しかし、それらは疾患を理解するための情報の一部にしかすぎず、疾患と関連して組織・細胞内で変動するタンパク質群を詳細に解析する必要がある。とりわけ、特定の遺伝的支配を受けない老化、成人病、感染症や癌、神経疾患などについてはゲノム情報に加えてタンパク質の翻訳後修飾を含めた構造と機能の多面的な解析が不可欠とされる。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果と実績を基に、最新の質量分析法と免疫化学的手法を基盤として臨床化学的研究を推進することを目的とした。すなわち、従来困難とされてきた 1) 下垂体 副腎系疾患と関連して重要視される尿中の抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの高感度一斉分析法の開発 (日本大学文理学部飯田隆教授、北海道大学医学部附属病院検査部清水力講師との共同研究)、2) 粥状動脈硬化症の病変組織中 7-ketocholesterol sulfate とその同属体を対象とする超微量分析法の構築と免疫組織染色法による局在様式の追跡 (米国 NIH: Charles Strott 教授との協同研究) さらには申請者らがこれまで進めてきた胆汁酸と異常タンパク質に関する研究成果を踏まえた 3) 胆汁酸のアシルアデニレートや CoA チオエステルを前駆体とするグルタチオン抱合体への変換とチオエステル結合型タンパク質付加体の追跡 (本学理工学部若宮健昭教授との協同研究) を取り上げ、内分泌疾患、循環器疾患、さらには胆汁うっ滞などの肝疾患や大腸癌の病因・病態解析を指向した臨床化学的研究を推進することを目的とした

## 3. 研究の方法

下垂体 副腎系疾患では、古くより血中のコルチゾールとともに、尿中の17-ヒドロキシコルチコステロイド(17-OHCS)が診断指標とされ、前者はイムノアッセイ、一方後者は、porter silver 反応によるステロイドの総量として測定されてきた。しかしながら、porter silver 反応は、ジヒドロキシアセトン側鎖を利用する呈色反応であり、薬物による干渉を受けやすいばかりか、グルクロニドやサルフェートなどの抱合体に関する情報が得られないなど多くの問題点が指摘されてきた。このため、これら抱合体の質的・量的変動を解析することが、下垂体 副腎系疾患の病因・病態を解析する上で重要な課題となっていた。しかしながら、抱合型テトラヒドロコルチコステロイドは、標品が得難いばかりか、信頼度の高い測定法が隘路となって、未だ十分検討が加えられていない。そこで、先に東北大学薬学部南原利夫名誉教授らによって化学合成されたテトラヒドロコルチコステロイドの3-及び21-モノグルクロニドの5位立体異性体12種を用い、これらのリニアイオントラップ型LC/ESI-MS<sup>®</sup>による高感度一斉分析法を構築する。引き続き、人尿中にはテトラヒドロコルチコステロイドの硫酸抱合体も存在することが指摘されていることから、3-及び21-モノサルフェートの5位立体異性体12種を化学合成し、これらを標品に用いてMSによる高感度一斉分析法を構築し、本法

を臨床に適用して下垂体 副腎系疾患の病因・病態解析の一助に資する。

一方最近、7-ketocholesterol、7-hydroxycholesterol、5,6-epoxycholesterolなどのオキシステロールが細胞毒性を示す一方、核内受容体のリガンドとして重要な役割を果たしていることが明らかにされ、これらオキシステロールが細胞の増殖・分化に果たす役割に多くの注目が寄せられている。とりわけ、アテローム性動脈硬化症の粥腫形成にオキシステロールが深く関わることを示されたことから (Atherosclerosis, 142 (1999) 1-28)、これらオキシステロールの体内動態を明らかにすることが強く望まれている。我々は、Charles Strott 教授 (米国 NIH) との協同研究によって7-KCがSULT2B1bによって硫酸抱合を受けることを見出し、オキシステロールの硫酸抱合による解毒機構の存在を提唱した。このため、アテローム性動脈硬化症と関連して病変組織中の硫酸抱合型オキシステロールの存在を実証することが重要な課題となる。そこで、LC/ESI-MSによってアテローム性動脈硬化症の粥腫に存在する硫酸抱合型オキシステロールを測定するとともに、7-ketocholesterol sulfateの特異抗体を作成し、免疫組織化学染色によって組織・臓器における局在を明らかにする。

また、これまで進めてきた胆汁酸代謝と異常タンパク質に関する研究成果を踏まえ、胆汁酸のアシルアデニレートや CoA チオエステルによるグルタチオン抱合体の *in vitro* 並びに *in vivo* 代謝経路、尿中グルタチオン抱合体の存在、チオエステル結合型タンパク質付加体の生成を実証し、胆汁酸のグルタチオン抱合に関わる胆汁酸代謝と異常タンパク質を追跡し、肝胆道疾患の病因・病態解析の一助に資する

## 4. 研究成果

初めに、胆汁酸の代謝活性中間体であるアシルアデニレートや CoA チオエステルがグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)の作用を受けてグルタチオン(GSH)抱合体に変換されるばかりか、肝機能改善薬として用いられるウルソデオキシコール酸や大腸癌のプロモーターとして知られるリトコール酸が GSH 抱合体として胆汁中に排泄されることを世界に先駆けて明らかにし、胆汁酸の GSH 抱合が胆汁酸 蛋白質付加体形成による毒性の発現を抑止する生体防御機構として重要な役割を担っている可能性を示した。また、胆汁酸のグルタチオン(GSH)抱合体に特徴的なトランジションイオンをモニタリングするメタボローム解析法によって、ラットの胆汁中に胆汁酸が GSH 抱合体として排泄されることを明らかにし、胆汁酸の新規代謝経路の存在を示した。さらには、アシルアデニレ

ートやCoAチオエステルがGSTの作用を受けてN-アセチルシステイン(NAC)抱合体にも変換されるばかりか、肝毒性や大腸癌のプロモーターとして知られるリトコール酸(LCA)とNACをラットに投与すると、LCAがNAC抱合体として尿中に解毒排泄されることを明らかにし、NACがLCAによる毒性の発現を抑止する上で重要な役割を果たす可能性のあることを示した。

一方、下垂体 副腎皮質系疾患では尿中に排泄される抱合型テトラヒドロコルチコステロイドが診断指標として重要視される。そこで初めに、テトラヒドロコルチコステロイド・グルクロニド 12 種の LC/ESI-MS/MS と Oasis HLB カートリッジを用いる尿試料の簡便な前処理法とを組み合わせた高感度直接一斉分析法を開発し、本法によってクッシング症候群並びに健常人の尿中テトラヒドロコルチコステロイド・グルクロニドの質的・量的変動が病態と深く関わることを示した。引き続き、サルフェート標品 18 種を合成するとともに、それらの LC/ESI-MS/MS による高感度直接一斉分析法を開発し、本法が内分泌・代謝疾患の病態解析に有用なことを示した。

動脈硬化症と関連して重要視される硫酸抱合型 7-ケトコレステロールとその同属体の LC/ESI-MS/MS による高感度測定法を開発すべく、内標準物質に用いる重水素標識体を合成するとともに、本標識体を内標準物質として用いる硫酸抱合型オキシステロールの LC/ESI-MS/MS による高感度直接一斉分析法を開発し、本法が脂質代謝異常症の病因の解明、病態の解析に有用なことを示した。また、コレステロールサルフェートのイムノアッセイのみならず免疫組織化学染色による局在様式の追跡に不可欠な特異抗体を作成すべく、ハプテンのデザインに工夫を加え、期待するポリクローナル抗体の調製に成功した。

#### 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 10 件)

1. Formation and biliary excretion of glutathione conjugates of bile acids in the rat as shown by liquid chromatography/ electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. Kuniko Mitamura, Saai Watanabe, Yutaka Mitsumoto, Toshihiro Sakai, Mitsuru Sogabe, Tateaki Wakamiya, Shigeo Ikegawa, *Anal. Biochem.*, **384**, 224-230 (2009). 査読有

2. A facile Synthesis of C-24 and C-25 oxysterols by in situ generated ethyl(trifluoromethyl)dioxirane. Shoujiro Ogawa, Genta Kakiyama, Akina Muto, Atsuko Hosoda, Kuniko Mitamura, Shigeo Ikegawa, Alan F. Hofmann, Takashi Iida, *Steroids*, **74**, 81-87 (2009). 査読有
3. Production and characterization of monoclonal antibody for capture of proteins tagged with lithocholic acid. Shigeo Ikegawa, Testushi Yamamoto, Takahiro Miyashita, Rika Okihara, Shunji Ishiwata, Toshihiro Sakai, Chong Rung Hwa, Masako Maeda, Alan F. Hofmann, Kuniko Mitamura. *Anal. Sci.*, **24**, 1475-1480 (2008). 査読有
4. Immunoprecipitation and MALDI-MS identification of lithocholic acid-tagged proteins in liver of bile duct-ligated rats. Shigeo Ikegawa, Tesushi Yamamoto, Hiromi Ito, Shunji Ishiwata, Toshihiro Sakai, Kuniko Mitamura, Masako Maeda. *J. Lipid Res.*, **49**, 2463-2473 (2008). 査読有
5. コレステロール硫酸転位酵素とコレステロール代謝  
布田博敏、三田村邦子、池川繁男  
*臨床化学*, **37**, 148-160 (2008).  
査読有
6. Isolation and chemical synthesis of a major, novel biliary bile acid in the common wombat (*Vombatus ursinus*): 15 $\alpha$ -hydroxylithocholic acid. Genta Kakiyama, Hideyuki Tamegai, Takashi Iida, Kuniko Mitamura, Shigeo Ikegawa, Takaaki Goto, Nariyasu Mano, Junichi Goto, Peter Holz, Lee R. Hagey, Alan F. Hofmann. *J. Lipid Res.*, **48**, 2682-2692 (2007). 査読有
7. リトコール酸固定化担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーによるラット肝細胞内タンパク質の捕捉と液体クロマトグラフィー質量分析法による同定。  
堺 俊博、三田村邦子、多賀 淳、本田進、池川繁男. *分析化学*, **56**, 713-720 (2007). 査読有
8. 胆汁酸の代謝活性中間体を経るグルタチオン抱合体の生成。三田村邦子、池川繁男、若宮建昭. *臨床化学*, **36**, 181-188 (2007). 査読有
9. Oxysterols are substrates for

cholesterol sulfotransferase.

Hirotohi Fuda, Normal B. Javitt, Kuniko Mitamura, Shigeo Ikegawa, Charles A. Strott, *J. Lipid Res.*, **48**, 1343-1352 (2007). 査読有

10. Analysis of bile acid glutathione thioesters by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Kuniko Mitamura, Mitsuru Sogabe, Hironori Sakanashi, Saai Watanabe, Toshihiro Sakai, Yoshihiro Yamaguchi, Tateaki Wakamiya, Shigeo Ikegawa, *J. Chromatogr. B*, **855**, 88-97 (2007). 査読有

[学会発表](計 32 件)

1. 三田村邦子、LC/MSによる臨床化学へのアプローチ、日本薬学会第129年会、2009年3月26日-28日、京都
2. 三田村邦子、LC/MSによる硫酸抱合型オキシステロールの高感度定量法の開発、日本薬学会第129年会、2009年3月26日-28日、京都
3. 沖原梨香、A/B-trans構造を有するテトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの合成とESI-MSにおける挙動、日本薬学会第129年会、2009年3月26日-28日、京都
4. 堺 俊博、ラット胆汁中アミノ酸並びにグルタチオン抱合型胆汁酸の解析、第18回日本小児胆汁酸研究会、2009年2月21日、東京
5. 三田村邦子、テトラヒドロコルチコステロイドのグルクロン酸抱合に関する基礎的検討、第19回日本臨床化学会近畿支部総会、2009年1月24日、大阪、
6. Shigeo Ikegawa, A new insight in the formation of N-acetylcysteine conjugates of bile acids. 日本薬物動態学会第23回年会、2008年10月30日-11月1日、熊本
7. 三田村邦子、胆汁酸のN-アセチルシステイン抱合に関する基礎的研究、第30回胆汁酸研究会、2008年10月18日、広島、
8. 柿山玄太、In situ発生ジオキシランを用いるコレスタン側鎖C-25位の直接水酸化とオキシステロール類の単段階合成、第30回胆汁酸研究会、2008年10月18日、広島
9. 三田村邦子、LC/MSによる胆汁酸のグルタチオン抱合に関する研究、第33回日本医用マスペクトル学会年会、2008年9月25日-26日、東京
10. 堺 俊博、N-アセチルシステイン抱合型胆汁酸3-サルフェートの負イオン検出エレクトロスプレーイオン化-タンデムマスペクトロメトリーにおける挙動、第33回日本医用マスペクトル学会年会、2008年9月25日-26日、東京
11. 三田村邦子、液体クロマトグラフィー/質量分析法による内分泌代謝疾患の科学的診断へのアプローチ、第48回日本臨床化学会年次学術集会、2008年8月29日-31日、浜松
12. 沖原梨香、LC/ESI-MS<sup>n</sup>による尿中硫酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの直接一斉分析、第48回日本臨床化学会年次学術集会、2008年8月29日-31日、浜松
13. 三田村邦子、LC/MSによる胆汁酸の体内動態解析に基づくプロドラッグの開発、第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2008年8月6日-8日、札幌
14. Kuniko Mitamura, Mechanistic studies on the formation of acyl glutathione conjugate of bile acid in rat liver and its biliary excretion. Falk Symposium 165. XX International Bile Acid Meeting, Bile Acid Biology and Therapeutic Actions, 2008.6.13-14, Amsterdam, The Netherlands
15. Shigeo Ikegawa, Analysis of lithocholic acid-tagged proteins in the rat liver by using immunoaffinity capture and MALDI-TOF. Falk Symposium 165. XX International Bile Acid Meeting, Bile Acid Biology and Therapeutic Actions, 2008.6.13-14, Amsterdam, The Netherlands
16. 三田村邦子、(S)-ナプロキセン投与ラット胆汁中グルタチオン抱合体のLC/ESI-MSによる解析、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜
17. 渡辺彩愛、胆汁酸の代謝活性中間体によるN-アセチルシステイン抱合体への変換、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜
18. 堺 俊博、N-アセチルシステイン抱合型胆汁酸-3-サルフェートの合成とESI-MS<sup>n</sup>における挙動、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜
19. 沖原梨香、硫酸抱合型テトラヒドロコルチゾール並びにテトラヒドロ-11-デオキシコルチゾールの合成とESI-MS<sup>n</sup>における挙動、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜

20. 長谷川真紀、クッシング患者尿中テトラヒドロコルチコステロイド・グルクロニドの一斉分析、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜
21. 柿山玄太、in situ発生ジオキシランによるコレスタン側鎖C-25位の一段階水酸化とオキシステロール類合成への利用、日本薬学会第128年会、2008.3.26-28、横浜
22. 堺 俊博、LC-ESI-MSによる胆汁酸のN-アセチルシステイン抱合体並びにN-アセチルシステイン抱合型胆汁酸-3-サルフェートの解析、フィジカル・ファーマ・フォーラム2008、2008.3.24-25、東京
23. 池川繁男、グルタチオンS-トランスフェラーゼによるN-アセチルシステイン抱合型胆汁酸の生成、第17回小児胆汁酸研究会、2008.3.22、東京
24. 三田村邦子、LC/ESI-MSによるラット胆汁中グルタチオン抱合型ナプロキセン光学対掌体の解析、第18回日本臨床化学会近畿支部総会、2008.2.23、京都
25. 長谷川真紀、LC/ESI-MS<sup>2</sup>によるクッシング病患者尿中テトラヒドロコルチコステロイド・グルクロニドの測定、第47回日本臨床化学会年次学術集会、2007.11.22-25、大阪
26. 三田村邦子、胆汁酸のグルタチオン抱合による新規代謝排泄経路の解明、第32回日本医用マススペクトル学会年会、2007.9.27-28、京都
27. 渡辺彩愛、N-アセチルシステイン抱合型胆汁酸のESI-MS<sup>n</sup>における挙動、第32回日本医用マススペクトル学会年会、2007.9.27-28、京都
28. 三田村邦子、ラット肝におけるグルタチオン抱合型胆汁酸の生成、第18回西日本臨床胆汁酸研究会、2007.7.21、大阪
29. 沖原梨香、コルチコステロイド並びにテトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートのESI-MS<sup>n</sup>における挙動、第20回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2007)、2007.7.2-4、八王子
30. 渡辺彩愛、LC/ESI-MS<sup>n</sup>によるヒト尿中N-アセチルシステイン抱合型胆汁酸のトレースアナリシス、第20回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2007)、2007.7.2-4、八王子
31. Kuniko Mitamura, A potential and novel mechanism for inactivating cytosolic oxysterols by cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b)、第20回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2007)、2007.7.2-4、八王子

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：プロドラッグ及びその製造方法

発明者：池川繁男

特願：2008-9808号

出願年月日：2008年1月18日

国内特許

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池川 繁男 (IKEGAWA SHIGEO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90111301

### (2) 研究分担者

三田村 邦子 (MITAMURA KUNIKO)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70242526