

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591309

研究課題名(和文) LC-MS/MS による先天性ステロール代謝異常症の簡易スクリーニングに関する検討

研究課題名(英文) Screening of inherited diseases with abnormal sterol metabolism by LC-MS/MS

研究代表者

本多 彰 (HONDA AKIRA)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10468639

研究成果の概要 (和文) : 本研究はコレステロール関連ステロイドの高感度・高精度一斉分析法を開発し、本邦における先天性ステロール代謝異常症診断システムの確立を目指すことを目的とした。10 μ l 以下の極少量の乾燥血清中ステロールをピコリン酸で誘導体化し、エレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いた高速液体クロマトグラフィータンデムマスペクトロメトリー(HPLC-MS/MS)によって分析を行った。コレステロールのほか 50 種類以上のコレステロール関連ステロールを、1 回の分析で 50 分以内に同時分析することを可能にした。20 種類の代表的ステロールを用いて行った定量的評価では、最小検出感度は 1 pg 未満であり、再現性、添加回収に関しても満足のいく結果が得られた。本方法は極少量の血清でコレステロール関連ステロールの一斉分析が可能であり、まだ本邦において系統的な診断システムが確立されていない、先天性ステロール代謝異常症の血清診断に寄与できると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : We have developed a highly sensitive and specific method for the analysis of sterol profiles in biological samples. Sterols in less than 10 μ l of dried serum were derivatized into picolinyl esters and analyzed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using the electrospray ionization (ESI) mode. In addition to cholesterol, more than 50 cholesterol related sterols were simultaneously identified within 50 minutes. Quantitative analyses for the picolinyl esters of 20 available sterols were performed. Detection limits were found to be less than 1 pg on-column, and sufficient reproducibilities and recoveries of these sterols were observed. The present method provides reliable and reproducible results for the identification and quantification of neutral sterols, especially in small volumes of blood samples, which is useful for serological diagnosis of inherited diseases with abnormal sterol metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：先天異常学，ステロール代謝，生化学的診断，血清診断，高速液体クロマトグラフィー，タンデムマスペクトロメトリー

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性コレステロール代謝異常症には、レセプターの異常による家族性高コレステロール血症やリポ蛋白の異常による低コレステロール血症などがよく知られているが、近年、コレステロール自体の代謝異常による新しい先天性ステロイド代謝異常症が次々と発見されている。

(2) 罹患時に血清中に上昇または減少するステロイドは、どれも構造が非常に類似しているため、一度の分析ですべてを一斉に定量するシステムはいまだ世界的にも開発されていないばかりか、わが国ではこのうちの1つのステロイドでさえも、常時分析依頼を受けられる施設がほとんど無い。

2. 研究の目的

HPLC-MS/MSを用いて、微量の血清からコレステロール関連ステロイドを一斉分析する方法を世界に先駆けて開発し、わが国において先天性ステロイド代謝異常症診断システムを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高感度誘導体化法の検討

エレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いたタンデムマススペクトロメトリー(MS/MS)によって中性ステロイドを高感度分析するために、山下らのステロイドホルモンの誘導体化法に従ってステロイドの水酸基をピコリン酸で誘導体化した。具体的には、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 μ L)、トリエチルアミン (20 μ L)の混合物をステロイドに添加し、80度で60分間加温した後、1 mLのn-ヘキサンを添加して、不溶物を沈殿除去した。上清を蒸発乾固後100 μ Lのアセトニトリルに溶解し、一部をPositive ESIモードのHPLC-MS/MSで分析した。

(2) HPLCによる分離方法の検討

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とHypersil GOLD aQ (いずれも150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μ m)を使用し、移動相はA: 0.1%酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水 (40:40:20)、B: 0.1%酢酸を含むアセトニトリル:メタノール(1:1)を流量0.3 mL/分で用いた。前者のカラムではB(0%) \rightarrow B(50%)までの20分間のグラジエントとし、さらに20分間B(50%)で継続、後者のカラムではB(0%) \rightarrow B(100%)までの40分間のグラジエントとした。

(3) 患者血清の分析

患者および正常対照血清1-10 μ Lに内部標準とする重水素標識ステロイドを添加し、蒸発乾固後、前記の方法にてピコリン酸誘導体化を行った。また比較のために、1NのKOHを含む0.5 mLのエタノール中で37度60分間アルカリ加水分解を行い、n-ヘキサン抽出した分画も前記と同様の方法にてピコリン酸誘導体化を行った。最終的に100 μ Lのアセトニトリルに溶解した誘導体化サンプルのうち、1-5 μ LをHPLC-MS/MSに注入して分析を行った。

4. 研究成果

(1) 高感度誘導体化法の検討

ステロイドのピコリン酸誘導体とそのPositive ESI-MS/MSによるフラグメンテーションパターンを図1に示す。コレステロールなどの3 β -モノヒドロキシステロイドはベースピークとして[M+Na+CH₃CN]⁺が認められたのに対して、水酸基を2-4個有するステロイドでは[M+Na]⁺が認められた。しかし、このベースピークは移動相の組成によって異なり、ここで示したものは我々が最終的に採用した0.1%酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水系を用いたときのものである。

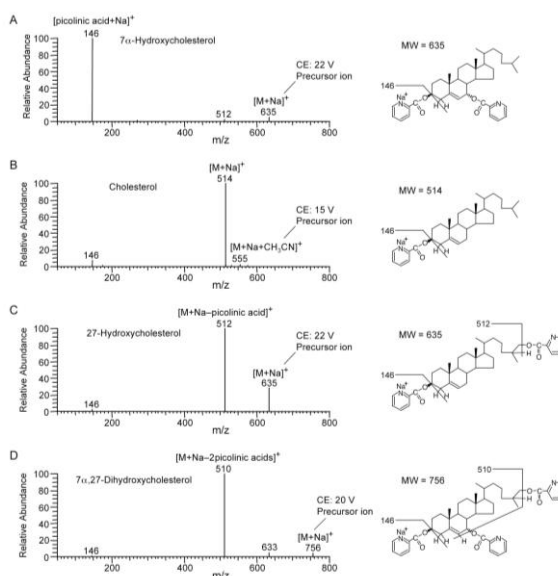


図1 Positive ESI-MS/MSによるピコリン酸誘導体化ステロイドのフラグメンテーションパターン

ESIモードは汎用性が高いイオン化法であるが、コレステロールのような中性、非イオン性ステロイドのイオン化には不向きと考えられてきた。しかし、誘導体化によってそのイオン化効率を向上させることによって、極めて高感度な分析が可能になった。Selected reaction monitoring (SRM)法による最小検出感度は、コレステロールのピコリン酸エステルが260 amol, 7 α -ヒドロキシシ

レステロールのピコリン酸エステルが 10 amol であった。

(2) HPLC による分離方法の検討

ピコリン酸で誘導体化した各ステロールの Positive ESI-SRM および HPLC データを表 1 に示す。C18 カラムによって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の不十分な分離は、C18aQ カラムの使用によって解決された。

表 1. ピコリン酸誘導体化ステロールの Positive ESI-SRM および HPLC データ (発表論文⑤より)

Picolinyl Ester Derivatives	SRM Condition			HPLC Data (RRT)	
	Precursor to Product (m/z)	Collision Energy (V)	Pattern	C18	C18 aQ
24S-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.34	0.30
25-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.36	0.37
27-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.40	0.42
7α-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.42	0.33
7β-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.44	0.36
5α-Cholesta-8(9),14,24-trien-3-ol	551 → 510	12	B	0.71	0.71
Cholesta-5,7,24-trien-3-ol	551 → 510	12	B	0.73	0.79
Cholesta-5,8,24-trien-3-ol	551 → 510	12	B	0.75	0.78
5α-Cholesta-7,24-dien-3-ol	553 → 512	12	B	0.81	0.87
Zymosterol	553 → 512	12	B	0.82	0.86
Desmosterol	553 → 512	12	B	0.83	0.88
5α-Cholesta-8(9),14-dien-3-ol	553 → 512	12	B	0.84	0.87
5α-Cholesta-6,8(9)-dien-3-ol	553 → 512	12	B	0.85	0.83
7-Dehydrocholesterol	553 → 512	12	B	0.87	0.92
-Dehydrocholesterol	553 → 512	12	B	0.89	0.91
Lathosterol	555 → 514	15	B	0.97	0.98
-Lathosterol	555 → 514	15	B	0.98	0.98
Cholestanol	555 → 514	15	B	1.00	1.00
Coprostanol	557 → 516	14	B	1.05	0.91
Cholestanol	557 → 516	14	B	1.10	1.04
4-Methyl-5α-cholesta-8(9),14-dien-3-ol	567 → 526	12	B	0.89	0.89
4-Methyl-5α-cholesta-8(9),14-dien-3-ol	567 → 526	12	B	0.90	0.92
24S,25-Epoxycholesterol	569 → 528	12	B	0.41	0.53
7-β-Epoxycholestanol	569 → 528	12	B	0.53	0.48
4-Methyl-5α-cholest-8(9)en-3-ol	569 → 528	12	B	1.07	1.01
Campesterol	569 → 528	12	B	1.10	1.03
20α-Hydroxycholesterol	571 → 530	14	B	0.40	0.43
5β-β-Epoxycholestanol	571 → 530	14	B	0.66	0.64
5α,6α-Epoxycholestanol	571 → 530	14	B	0.70	0.68
4,4-Dimethyl-5α-cholesta-8(9),14,24-trien-3-ol	579 → 538	14	B	0.84	0.78
4,4-Dimethyl-5α-cholesta-8(9),24-dien-3-ol	581 → 540	14	B	0.97	0.93
4,4-Dimethyl-5α-cholesta-8(9),14-dien-3-ol	581 → 540	14	B	1.01	0.99
4,4-Dimethyl-5α-cholest-8(9)en-3-ol	583 → 542	14	B	1.19	1.04
Sitosterol	583 → 542	14	B	1.22	1.07
Sitostanol	585 → 544	14	B	1.36	1.11
Lanosterol	595 → 554	12	B	1.01	0.90
Dihydrolanosterol	597 → 556	15	B	1.24	1.01
27-Hydroxy-7-dehydrocholesterol	633 → 510	20	C	0.49	0.62
7β-Hydroxycholesterol	635 → 146	20	A	0.61	0.53
7α-Hydroxycholesterol	635 → 146	20	A	0.62	0.51
6-Hydroxycholesterol	635 → 146	20	A	0.69	0.63
4β-Hydroxycholesterol	635 → 146	20	A	0.78	0.76
22R-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.47	0.56
22S-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.50	0.48
24R-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.50	0.56
24S-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.50	0.57
25-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.53	0.66
27-Hydroxycholesterol	635 → 512	20	C	0.58	0.71
5β-Cholestane-3α,7α-diol	637 → 514	20	C	0.64	0.49
7α,27-Dihydroxy-4-cholesten-3-one	649 → 146	28	A	0.18	0.17
7α,17α-Dihydroxy-4-cholesten-3-one	649 → 146	28	A	0.19	0.14
Cholestan-3β,5α,β-triol	653 → 146	28	A	0.60	0.50
7α,27-Dihydroxycholesterol	756 → 510	20	D	0.33	0.31
5β-Cholestane-3α,7α,17α-triol	758 → 635	28	C	0.32	0.24
5β-Cholestane-3α,7α,17α,25-tetrol	879 → 756	20	C	0.15	0.12

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

Pattern: 最適 precursor/product イオンのパターン。A, B, C, D は図 1 の A, B, C, D に対応。

(3) 患者血清の分析

先天性ステロール代謝異常症として、Smith-Lemli-Opitz 症候群、脳腱黄色腫症 (Cerebrotendinous xanthomatosis, CTX)、Conradi-Hünemann syndrome、シトステロール血症 (Sitosterolemia) の血清サンプルが入手できたため、これらの血清分析を行った。その結果、各 1 μL の血清があれば、アルカリ加水分解をしなくても、乾燥後直接誘導体化して HPLC-MS/MS 分析することにより、各疾患の診断マーカー 7-dehydrocholesterol, cholestanol, 8-lathosterol, sitosterol の異常増加を迅速診断できることが確認された。またクロマト上は、5-10 μL の血清をアルカリ加水分解してから誘導体化したほうが、バックグラウンドのノイズが低くなり、定量性は優れていることも明らかにした。

(4) 応用研究

本研究の応用として、後天性のステロール代謝異常を起こす疾患患者 (原発性胆汁性肝硬変、非アルコール性脂肪性肝炎、慢性 C 型肝炎) の血清、各種薬剤を投与した培養肝細胞やマウスの肝組織などを用いたステロールの一斉分析を行った。その結果、先天性ステロール代謝異常症の血清と全く同じ抽出・誘導体化・分析方法で、これらのサンプル中のステロール分析も可能であることが明らかになった。

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 8 件)

- Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, Numazawa M, Hara T, Matsuzaki Y. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. 査読有, J. Lipid Res. 2008;49:2063-2073.
- Yoshida T, Honda A, Miyazaki H, Matsuzaki Y. Determination of key intermediates in cholesterol and bile acid biosynthesis by stable isotope dilution mass spectrometry. 査読有, Anal. Chem. Insights 2008;3:45-60.
- Honda A, Yamashita K, Hara T, Ikegami T, Miyazaki T, Shirai M, Xu G, Numazawa M, Matsuzaki Y. Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS. 査読有, J. Lipid Res. 2009;50:350-357.
- Honda A, Yamashita K, Ikegami T, Hara T, Miyazaki T, Hirayama T, Numazawa M, Matsuzaki Y. Highly-sensitive quantification of serum malonate, a

possible marker for *de novo* lipogenesis, by LC-ESI-MS/MS. 査読有, J. Lipid Res. 2009;50:2124-2130.

- ⑤ Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Iwamoto J, Yamashita K, Numazawa M, Matsuzaki Y. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. 査読有, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2010;121:556-564.
- ⑥ Maeda T, Honda A, Ishikawa T, Kinoshita M, Mashimo Y, Takeoka Y, Yasuda D, Kusano J, Tsukamoto K, Matsuzaki Y, Teramoto T. A SNP of NPC1L1 affects cholesterol absorption in Japanese. 査読有, J. Atheroscler. Thromb. 2010;17:356-360.
- ⑦ Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Iwamoto J, Maeda T, Hirayama T, Saito Y, Teramoto T, Matsuzaki Y. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. 査読有, J. Lipid Res. 2011; Epub ahead of print.
- ⑧ Honda A, Matsuzaki Y. Cholesterol and chronic hepatitis C infection. 査読有, Hepatol. Res. 2011; In press.

[学会発表] (計5件)

- ① 本多 彰, 池上 正, 宮崎照雄, 松崎靖司. コレステロール・胆汁酸代謝系に関するメタボローム解析方法の開発. 第12回日本肝臓学会大会, 東京 10/1-10/3, 2008.
- ② 本多 彰, 中牟田 誠, 松崎靖司. 原発性胆汁性肝硬変におけるコレステロール代謝の解析. 第51回日本消化器病学会大会, 京都 10/16, 2009.
- ③ Ikegami T, Honda A, Nakamuta M, Miyazaki T, Hirayama T, Saitoh Y, Matsuzaki Y. Non-invasive measurement of cholesterol metabolism in patients with HCV infection by using serum marker sterols. 第60回米国肝臓病学会. Boston 11/2, 2009.
- ④ 本多 彰, 宮崎照雄, 池上 正, 原 孝, 松崎靖司. HPLC-MS/MSを用いた先天性ステロール代謝異常症一斉診断システムの確立. 第51回日本先天代謝異常学会総会. 東京 11/7, 2009.
- ⑤ 本多 彰, 池上 正, 中牟田誠, 宮崎照雄, 齋藤吉史, 平山 剛, 松崎靖司. 原発性胆汁性肝硬変に対するUDCAおよびベザフィブラートによる治療効果発現メカニズムの比較. 第46回日本肝臓学会総会(ワークショップ). 山形 5/27, 2010.

[図書] (計1件)

- ① Honda A. Cerebrotendinous Xanthomatosis. Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease. (F. Lang ed.), Springer 2009;310-311.

[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・准教授
研究者番号: 10468639

(2) 研究分担者

松崎靖司 (MATSUZAKI YASUSHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50209532
池上 正 (IKEGAMI TADASHI)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40439740