

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460042

研究課題名(和文) 副腎皮質病態解析のためのtargeted steroidomics研究

研究課題名(英文) Targeted steroidomics research for diagnosis of adrenocortical disease

研究代表者

山下 幸和 (Yamashita, Kouwa)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80382670

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)：染色体異常等による副腎の過形成/低形成に基づく原発性の副腎皮質ホルモン産生異常は難治性のものが多く、早期の診断と治療が必要となる。本研究では、このような疾患の早期診断を目的として、コルチゾールおよびその生合成前駆体/代謝関連化合物の微量定量を、少量の生体試料で行えるよう、プロトン親和性誘導体とLC-ESI-MS/MS法を用いて構築した。本研究では、定量用の重水素標識内標準物質の調整、18-オキシコルチゾールの合成をはじめ、各種プロトン親和性誘導体の有用性を精査し、ピコリン酸エステル誘導体が最も優れていることを見出し、誘導体の副腎皮質ホルモン産生異常疾患の診断への応用を展開した。

研究成果の概要(英文)：It is essentially pre-requisite for the prompt diagnosis and the treatment of diseases caused by congenital adrenocortical hyper-/hypoplasia originated from the chromosomal abnormality, because those disease are usually intractable. In this research, our purpose was directed for the development of the microdetermination of cortisol and its related precursors/metabolites in small amount of biological samples based on the use of proton-affinitive derivatization and LC-ESI-MS/MS. In addition, we investigated the syntheses of deuterated internal standards, 18-oxocortisol as an authentic sample and the preparation method of various kinds of proton-affinitive derivatives, and their utilities in LC-ESI-MS/MS. Of these derivatives, we revealed that the picolinate ester was the most useful, and the application of the present derivative for the diagnosis of diseases of the abnormality of adrenocortical hormone production was carried out.

研究分野：分析化学

キーワード：LC-ESI-MS/MS法 targeted steroidomics 副腎皮質ホルモン 微量定量法 プロトン親和性誘導体

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体異常による副腎の過形成/低形成に基づく原発性の副腎皮質ホルモン産生異常は、生合成酵素欠損や自己免疫性等を伴い重篤で難治性のものが多く、早期の確実な診断と治療が必要となる。

(2) コルチゾール、18-オキシコルチゾール及びアルドステロンならびにこれらの先駆体や代謝物を網羅的に定量することにより、これら原発性の副腎皮質ホルモン産生異常の病態を的確に鑑別し得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、質量分析法 (MS) を基盤とし、副腎皮質ホルモンならびにそれらの代謝関連物質をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法に高感度で応答する各種プロトン親和性誘導体 (ピコリン酸、3-メチルピコリン酸、6-メチルピコリン酸あるいはフザリン酸エステル) とすることによる副腎皮質ホルモンの targeted steroidomics の開発と副腎皮質ホルモン産生異常疾患の鑑別診断法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) コルチゾール及びアルドステロンなどの副腎皮質ホルモン並びにこれらの代謝関連物質のプロトン親和性誘導体 (ピコリン酸エステル、フザリン酸エステルなど: 図1) を混合酸無水物法により調製し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) - ESI - MS/MS における選択反応クロマトグラム並びに ESI-スペクトルを測定した。

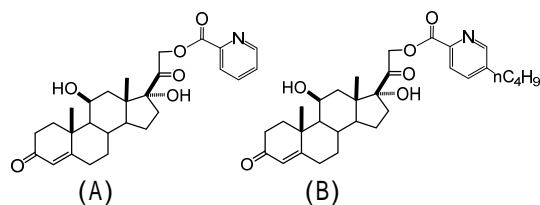


図1 コルチゾール-ピコリン酸エステル(A)及びフザリン酸エステル(B)

(2) 市販されていない 18-オキシコルチゾール (図2) 及びその重水素標識内標準物質は、コルチゾール及び重水素標識コルチゾールを出発原料として化学合成した。

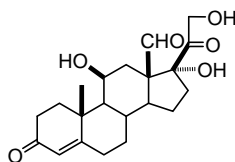


図2 18-オキシコルチゾール

(3) ヒト血清試料に含まれるコルチゾール、アルドステロンおよびこれらの生合成、代謝

関連物質を一斉定量するために、クリーンアップ法の検討ならびに最適なプロトン親和性誘導体を、感度ならびに特異性に重点をおき LC-ESI-MS/MS でスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) 極微量レベルにおけるコルチゾールおよびアルドステロン並びのこれらの関連物質の誘導体化は、すでに我々の基礎研究で確立された、混合酸無水物法で行った。すなわち、ピコリン酸 (メチルピコリン酸類およびフザリン酸) と 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物および 4-ジメチルアニリンの混合物をステロイドに加え、室温で 30 分から 1 時間放置することにより目的とする誘導体とした。アルドステロンや 18-オキシコルチゾールのよう、分子内にヘミアセタール構造を有す場合は、エステル化に先立ち、EtOH/塩化水素溶液でヘミアセタールを保護した。過剰の試薬は Oasis HLB による固相抽出法で除去できること見出した。

コルチゾールおよびアルドステロンを含む 15 種類のステロイドのピコリン酸エステル誘導体での選択反応 (SRM) クロマトグラムを図3に示した。

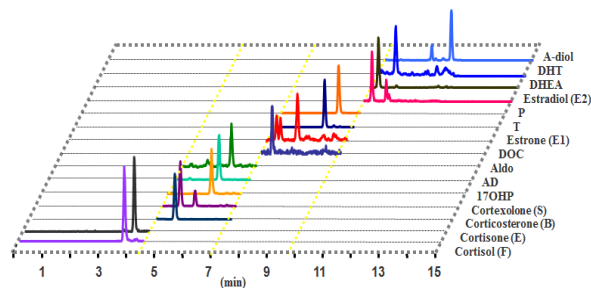


図3 15種のステロイドをピコリン酸エステルとした時の SRM-クロマトグラム

(2) 18-オキシコルチゾールにつき、さらなる高感度化を検討した結果、ピークの SN 比 (図4) を評価することにより、ピコリン酸エステルよりフザリン酸エステルが優れていることを見出し、この化合物の定量についてはエトキシ-フザリン酸エステルを適用した。

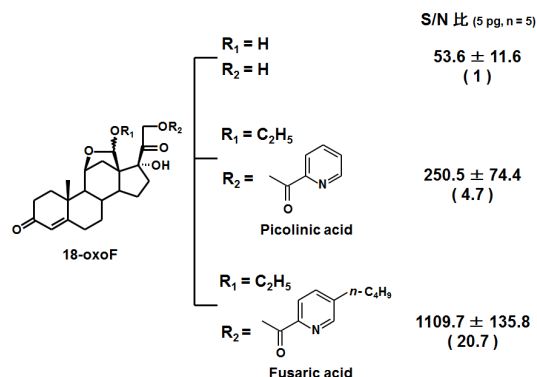


図4 18-オキシコルチゾールの誘導体と SRM-クロマトグラムから得られた SN 比

(3)コルチゾール、18-オキシコルチゾールおよびアルドステロンならびにこれらの生合成、代謝関連物質の targeted steroidomics を検討した結果、プロトン親和性誘導体を用いる LC-ESI-MS/MS 法が優れていることを見出した。プロトン親和性誘導体としてピコリン酸、3-メチルおよび6-メチルピコリン酸、フザリン酸などを検討したが、ピコリン酸が感度並びに反応収率など鑑みると、最も汎用性の高いことを見出した。また、3-OH-5の部分構造を持つプレグネノロンや(2)に示した18-オキシコルチゾールは、ピコリン酸よりフザリン酸が感度において優れていることを明らかにすることができた。

(4)本研究で開発された副腎皮質ホルモンの targeted steroidomics 研究はすでに、アルドステロンと18-オキシコルチゾールを指標とした原発性アルドステロン症の鑑別診断法の開発(東北大学医学部・腎・内分泌・高血圧グループ)および臍帯血中ヒトグルココルチコイドレセプターの発現とステロイド抵抗性の発現に関する研究(福島医科大学小児科グループ)に応用されている。

(5)今回の研究成果で得られたプロトン親和性誘導体の利用価値について検討した結果、これらの誘導体は副腎皮質ホルモンと病態を考える targeted steroidomics 研究のみならず、アンドロゲン、エストロゲン、コレステロールや胆汁酸の生合成・代謝異常と先天性疾患の解明、生体内の脂質代謝やアミノ酸代謝異常の指標となる有機酸類の一斉分析にも利用価値の高い手法であることを見出し、今後の展開が期待される。

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)

(1) T. Kinnoshita, S. Honma, Y. Shibata, K. Yamashita, Y. Watanabe, H. Maekubo, M. Okuyama, A. Takashima, N. Takeshima, An innovative LC-MS/MS-based method for determining CYP17 and CYP19 activity in the adipose tissue of pre- and postmenopausal women using ¹³C-labeled steroid substrates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 査読有, **99**, pp.1339-1347, 2014.

(2) F. Satoh, R. Morimoto, Y. Ono, Y. Iwakura, K. Omata, M. Kudo, K. Takase, K. Seiji, H. Sasamoto, S. Honma, M. Okuyama, K. Yamashita, CE. Gomez-Sanchez, WE. Rainey, Y. Arai, H. Sasano, Y. Nakamura, S. Ito, *Hypertension*, 査読有, **65**, pp.1096-1102, 2015.

(3) T. Miyazaki, A. Honda, T. Ikegami, J.

Iwamoto, T. Monma, T. Hirayama, Y. Sato, K. Yamashita, Y. Matsuzaki, Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as a possible marker of amino acid and fatty acid catabolism by LC-ESI-MS/MS, *SpringerPlus*, 査読有, **4**, pp.494-511, 2015.

(4) K. Ohno, K. Yamashita, Recent development of chemical derivatization in LC-MS for biomedical approaches, *Bioanalysis*, 査読有, **7**, pp.2489-2499, 2015.

〔学会発表〕(計 9 件)

小松祥子、都澤 優、千葉 淳、山崎敬子、山下幸和、沼澤光輝、LC-ESI-MS/MS法による水酸化ステロイドのメタボローム解析(VII), ステロイド類のピコリン酸及びメチルピペリジンカルボン酸誘導体の調製、第52回日本薬学会東北支部大会(仙台) 10月20日、2013年。

田村智美、長谷川智美、大野賢一、山下幸和、アンドロゲンの高感度分析法の開発と唾液試料への応用、第52回日本薬学会東北支部大会(仙台) 10月20日、2013年。

小松祥子、榊 教克、山下幸和、LC-ESI-MS/MS法による3- β -HSD活性評価を目的とした基礎検討、日本薬学会第134年会、熊本、3月29日、2014年。

大野賢一、山下幸和、質量分析法による生体試料中のアンドロゲンの高感度分析法の開発、第25回日本臨床化学会東北支部総会、盛岡(岩手医科大学) 8月9日、2014年。

小松祥子、大池裕貴、山下幸和、Aldosteroneのdimethylisopropylsilyl誘導体化とGC-MS分析、第53回日本薬学会東北支部大会、いわき(いわき明星大学) 10月5日、2014年。

加藤 創、三塚 進、阿邊満夕子、池田麻希、山下幸和、胆汁酸のピコリルエステル化による高感度分析、日本薬学会第135年会、神戸(兵庫医療大ほか) 3月26日~28日、2015年。

小松祥子、千葉 淳、都澤 優、宮本和明、山下幸和、コレステロールの前駆体および水酸化代謝物のLC-ESI-MS/MS分析、日本薬学会第135年会、神戸(兵庫医療大ほか) 3月26日~28日、2015年。

小松祥子、齋藤彩夏、榊 教克、今 華恵、藤村 務、山下幸和、LC-ESI-MS/MSによる血清グルココルチコイド及びその前駆体の一斉分析、第54回日本薬学会東北支部大会、盛岡(岩手医科大学) 9月26日、2015年。

小松祥子、榊 教克、今 華恵、藤村 務、山下幸和、LC-ESI-MS/MSによるコルチゾール生合成関連ステロイドの一斉分析、日本薬学会第136年会、横浜(パシフィコ横浜) 3月

28日、2016年。

〔その他〕
ホームページ等
横浜薬科大学

http://www.hamayaku.jp/teacher/te_159.html

東北医科薬科大学

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/rinsyob/ronbun.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下幸和 (YAMASHITA KOUWA)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80382670

(2) 研究分担者

大野賢一 (Ohno Ken-ichi)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20347272

加藤 創 (Kato Hajime)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80584458

小松 祥子 (Komatsu Sachiko)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：00438566