

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460647

研究課題名(和文) 質量分析によるヒト脂質プロファイル検査法の構築と臨床応用

研究課題名(英文) Developing human lipid profiling methods using mass spectrometry and their applications in clinical laboratory tests

研究代表者

日高 宏哉 (HIDAKA, Hiroya)

信州大学・学術研究院保健学系・准教授

研究者番号：10362138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質とそれらの代謝物は脂質代謝の制御因子として機能して、さまざまな疾患と関係している。ヒト血液と気管支肺胞洗浄液などの脂質分子種を、クロマトグラフィによる脂質精製と質量分析との組合せ方法により分析した。また、健康被験者の脂質分子種プロファイルを作成して、視覚化を行った。これらの結果、これらの脂質種分析法が臨床検査に応用可能であることを示した。現在、我々は臨床データを蓄積しており、臨床症状を伴う特異的な脂質分子種の検索を目指している。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids and their metabolites function as regulators of lipid metabolism and are associated with various diseases. Lipid molecular species in human biomedical materials, such as blood and bronchoalveolar lavage fluid, were analyzed using the methods of gel chromatography and Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), Liquid chromatography MS, and Gas chromatography MS. Furthermore, we generated lipid species profiles of healthy subjects and then visualized these molecular species. We also showed that these methods for lipid molecular species analysis can be used in clinical laboratory tests. We are currently accumulating clinical data to identify specific lipid molecular species associated with pathological conditions.

研究分野：脂質分析学

キーワード：質量分析 ヒト血液 脂質分子種

1. 研究開始当初の背景

リン脂質(PL)とその代謝産物は、脂質代謝、糖代謝、蛋白代謝、細胞内シグナルなどあらゆる生体内代謝の調節物質として機能する。また、メタボリック症候群、アレルギー疾患、炎症疾患、動脈硬化症、神経疾患、癌など多くの疾患に影響を及ぼしている。

リン脂質は、グリセロール骨格を有するグリセロリン脂質(GP)と、セラミド骨格をもつスフィンゴリン脂質(SL)がある。GP や SL は塩基の違いだけでなく、各種の誘導体や代謝産物が機能性脂質として存在し、脂質分子の脂肪酸側鎖の違いにより多種多様な分子種として存在する。

最近、脂質代謝受容体の脂肪酸分子種選択性が報告されており、脂肪酸側鎖が肺線維症の発症など様々な疾患に関わっている事が報告されている。さらに脂肪酸側鎖の変化は、摂取する栄養素の影響を受けるため、生体内の脂肪酸分子種の分析が必要とされている。

これまで、細胞や動物を用いた先進的な研究は進められているが、臨床分野における疾患との関連性の研究は少ないのが現状である。その理由として、機器の初期設置コストが高額であるため、ほとんどが研究用として利用されており、また臨床分野で利用できる基礎的分析法が確立されていないことである。

2. 研究の目的

我々は、これまでマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MS)を用いて、血清中の主要なリン脂質組成の分析定量法を構築してきた。本研究ではこれまでの研究を基盤に、ヒト血液(血清、血漿)、気管支肺胞洗浄液(BAL-F)などの試料を用いて、リン脂質分子の詳細な分子種および微量なリン脂質代謝産物を高感度に測定する簡便な測定系を構築する。また、ヒト健常者及び呼吸器疾患の脂質プロフ

ファイル分析を行う。次いで、統計解析とプロファイルデータの視覚化を統合させ、簡便・迅速・高感度・高分解度な生体試料リン脂質分子種およびその代謝産物の臨床検査法を構築することである。

3. 研究の方法

1) スクリーニング質量分析では、幅広い範囲で m/z (質量電荷数比)を計測し、ヒト血液中の主要脂質プロファイルの全体像を捉え、次いで脂質の分子構造群別の脂質プロファイルを定量的に捉えた。

2) ターゲット質量分析では、微量または疾患特異的な PL、SL 分子および代謝産物に焦点をあて、脂質分子をカラムクロマトグラフィーで部分精製したのち、 m/z を幅狭い範囲で分析した。

3) プロダクトイオン質量分析は、MS/MS 分析によるプロダクトイオン情報から PL、SL 分子種及びその代謝産物を検索し、脂質プロファイル検査法を検討した。

4) ヒト血液、BAL-F などの脂質プロファイル、健常者の統計解析(多変量解析)および時系列的解析をし、疾患に特徴的な分子の高感度検査法を検討した。

5) 生体試料の網羅的および目的分子群の脂質プロファイルをわかりやすく視覚化することで、臨床分野での多彩な脂質代謝異常を容易に理解できるようにした。

6) 質量分析機は、MALDI-TOF-TOF MS、液体クロマトグラフィー(LC) MS/MS、ガスクロマトグラフィー(GC)/MS を用いた。

7) 検体材料は、ヒト血清および呼吸器疾患検査に提出された BALF を用いた。いずれの臨床検体も信州大学医学部の医倫理委員会の承認を得て使用した。

8) プロファイルデータの統計解析、グラフなどの視覚化は専用ソフト(MarkerView 等)および汎用ソフト(EXCEL)を用いた。

4. 研究成果

1) 脂質分子種の測定

(1) 脂質分子の部分精製

分子種の m/z が重複する分子および代謝産物などの微量成分においては、脂質の部分精製を行った。今回、ミニカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、イオン交換ゲル）および薄層クロマトグラフィーにより、血清または血漿 50-200 μ L から目的分子（コレステロールエステル、アシルグリセロール、脂肪酸、ホスファチジルコリン(PC)、リゾ PC、ホスファチルエタノールアミン(PE)、リゾ PE、ホスファチジン酸(PA)、リゾ PA、スフィンゴミエリン、スルファチド、リゾスルファチド、糖脂質、ガングリオシド(GM3)など)を部分精製及び濃縮調製できた。

(2) 血清・血漿、BAL-F 分子種の分析

精製試料を用いた質量分析により、血清・血漿脂質濃度の 99%以上の分子種を分析できた。分子種は、全て MS/MS プロダクトイオン分析により同定することができた。また、血清・血漿ではほとんど検出されない脂質成分を標準物質として用いることで定量的分析が可能であった。また、適当な標準物質がない場合は、分子組成の近似した標準物質を用いて濃度を概算した。また、BAL-F についても、上記と同様にグリセロリン脂質（PC, リゾ PC、ホスファチジルイノシトール）およびスフィンゴリンミエリンの分子種を同定できた。

2) ヒト脂質プロファイルの作成

若年成人（22-25 歳の何らかの治療を行っていない健康人）の血清または血漿を用いて、グリセロリン脂質及びその代謝産物、スフィンゴ脂質および糖脂質のプロファイルを作成し、基本的なプロファイルとした。いずれの脂質分子も、健康者間の組成変動は小さく、これらの組成濃度（比率）を基に病態とのプロファイルの比較が可能となった。

また、BAL-F では、健康者の試料を得ることは困難であるため、比較的病態が穏和なサルコシド疾患患者の分子種プロファイルを作成して、基本的なプロファイルとして、病態との関連を検討した。

(1) グリセロリン脂質プロファイル

PC, リゾ PC, PE, リゾ PE（プラズマローゲン型とアシル型）の分子種プロファイルを作成できた。

(2) スフィンゴ脂質分子種プロファイル

血清及び血漿を用いてのスフィンゴミエリン分子種の同定は、MALDI-TOF MS (Positive ion modes 法と negative ion modes 法の 2 法)及び LC MS により行った。さらに、スルファチド分子種では、数十種の分子種を同定することができた。また、糖脂質（糖鎖 1、2、3 個を結合した分子）は 3 つの分子について、それぞれ分子種を同定する事ができた。さらに糖鎖にシアル酸を結合したガングリオシド(GM3)の分子種も同定する事ができた。いずれも、良好な分子種プロファイルを作成できた。

(3) BAL-F のリン脂質プロファイル

BAL-F の健康者検体を得る困難であったため、比較的病態が温和なサルコイドーシス患者の検体を用いて、PC, リゾ PC、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリンミエリンの分子種プロファイルを作成できた。また、血清分子種プロファイルとの比較もできた。現在、他の呼吸器疾患患者のリン脂質プロファイルを作成中であり、サルコイドーシス患者と異なるプロファイルを示す事がみだされている。

(4) 他の脂質のプロファイル

今回の脂質分子の精製の際に得られたコレステロールエステル、アシルグリセロール、脂肪酸もリン脂質と同様に部分精製試料を用いて、健康者のプロファイルを作成する事ができた。

3) プロファイルの視覚化

これまで、リン脂質, スフィンゴ脂質, 糖脂質, コレステロールエステル, アシルグリセロールの分子種は、健常者血清、血漿で約 300 分子種以上を同定できた。プロファイルデータは、棒グラフ、レーダーチャート、マッピングなど、様々なグラフ化により、分析データの概要について視覚化を図った。これまで、呼吸器疾患のスフィミエリン、高トリグリセライド血症でのアシルグリセロールおよび代謝産物、BAL-Fでのグリセロリン脂質で、健常者と比較することで特徴的なプロファイルを示すことを確認した。また、主成分分析および多変量解析により分子間での特徴付けを行っている。

4) まとめ

本研究結果から、健常者の血清、血漿およびサルコイドーシス患者の BAL-F からグリセロリン脂質、それらのリゾ体、スフィンゴ脂質、糖脂質、コレステロールエステル、アシルグリセロールの分子種、および脂肪酸組成など主な脂質分子と生理活性を持つ微量なリン脂質の同定ができ、健常者のプロファイルを作成できた。さらにグラフなどを用いて、臨床的に利用しやすい視覚化によるスクリーニング法と、統計的解析の基盤を整備する事ができた。現在、各種疾患における分子種データを蓄積中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Atsushi Hori, Mine Yamashita, Makoto Yamaura, Minoru Hongo, Takayuki Honda, Hiroya Hidaka. Rapid quantitative analysis of human serum sphingomyelin species using MALDI-TOF mass spectrometry with lipid hydrolase treatment. Clin Chim Acta. 453: 95-99, 2016. (査読有り)
2. 堀 敦詞, 山浦 洵, 本郷 実, 本田 孝行, 日高 宏哉. MALDI-TOF 質量分析による血清中

スルファチド分子種の分析. 臨床化学 45(1)号: 46-51, 2016. (査読有り)

3. Mikiko Harada, Atsushi Izawa, Hiroya Hidaka, Keisuke Nakanishi, Fumiko Terasawa, Hirohiko Motoki, Yoshikazu Yazaki, Uichi Ikeda, Minoru Hongo, on behalf of the Study Project on Prevention of Metabolic Syndrome among Children, Adolescents, and Young Adults in Shinshu. Importance of cystatin C and uric acid levels in the association of cardiometabolic risk factors in Japanese junior high school students. J Cardiol. 69: 222-227, 2016. (査読有り)

4. 二木 亜希子, 日高恵以子, 久保田紀子, 西島史恵, 好沢 克, 石嶺南生, 菅野光俊, 堀 敦詞, 日高宏哉. リポ蛋白-X を認めた胆道閉鎖症乳児における血清総蛋白測定の異常反応. 臨床病理 63(11): 1271-193, 2015. (査読有り)

5. 西島史恵, 日高恵以子, 久保田紀子, 小野貴子, 中村友彦, 本田孝行, 本郷実, 日高宏哉. 新生児, 乳幼児, 青少年の迅速なガスクロマトグラフィ質量分析法による血清中脂肪酸組成測定の検討. 臨床病理 63(2): 187 -193, 2015. (査読有り)

6. 木戸口周平, 堀敦詞, 山本洋, 菅野光俊, 本郷実, 本田孝行, 日高宏哉. 質量分析によるサルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液中ホスファチジルコリン・リゾホスファチジルコリンの分析. 臨床化学 43(4): 313-319, 2014. (査読有り)

7. 日高宏哉. 小児気管支喘息の発症機序とスフィンゴ脂質, 臨床化学 43(2): 154-155, 2014. (査読無し)

8. 日高宏哉, 本田孝行. 質量分析を用いた血清脂質の臨床検査, (2013 年臨床検査医学会シンポジウム総説), 臨床病理 62(12): 1236-1242, 2014. (査読無し)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 山浦 洵, 森田 温, 堀 敦詞, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. 血漿中のジアシル型リゾホスファチジルエタノールアミンの MALDI-TOF 質量分析. 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2016 年 12 月 2 日, 熊本. (日本臨床化学学会 学会賞 YIA [若手研究者賞] 受賞演題)
2. 森田 温, 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉. GC-MS を用いたグリセロール及びアシルグリセロール測定法の構築. 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2016 年 12 月 2 日, 熊本.
3. Atsushi Hori, Makoto Yamaura, Sunao Morita, Kenji Kawasaki, Mitsutoshi Sugano, Takayuki Honda, Hiroya Hidaka. Simple and sensitive identification of molecular species of human serum sulfatide using MALDI-TOF mass spectrometry. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016, 9. 1. Kobe.
4. Makoto Yamaura, Sunao Morita, Atsushi Hori, Hiroya Hidaka. Serum and plasma lysophosphatidic acid analysis using column chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry. The 32nd World Congress of Bio- medical Laboratory Science. 2016, 9. 1. Kobe.
5. Sunao Morita, Makoto Yamaura, Atsushi Hori, Hiroya Hidaka. Analysis of human serum sphingomyelin species by MALDI-TOF mass spectrometry in negative ion mode. - The 32nd World Congress of Bio- medical Laboratory Science. 2016, 9. 1. Kobe.
6. 堀 敦詞, 山浦 洵, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉. MALDI-TOF MS を用いた血清中ヘキサシルセラミド分子種分析. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会, 2015 年 11 月 22 日, 岐阜.
7. 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉. 血清, 血漿中のリゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジン酸の質量分析. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会, 2015 年 11 月 22 日, 岐阜.
8. 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. ヒト気管支肺胞洗浄液中リゾリン脂質の質量分析. 第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2015 年 10 月 31 日, 大阪.
9. 堀 敦詞, 山浦 洵, 川崎健治, 本田孝行, 日高宏哉. MALDI-TOF MS 質量分析による血清中スルファチドのプロファイリングと定量法の検討. 第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2015 年 10 月 31 日, 大阪, 日本臨床化学学会 学会賞 YIA [若手研究者賞] 受賞演題
10. 堀 敦詞, 山浦 洵, 本郷 実, 本田 孝行, 日高 宏哉. 脂質水解酵素, カラムクロマトグラフィーと MALDI-TOF MS を組み合わせた糖脂質分析. 第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会, 2015 年 8 月 20 日, 松本.
11. 山浦 洵, 堀 敦詞, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. ヒト試料中ホスファチジルコリン代謝産物の質量分析. 第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会, 2015 年 8 月 20 日, 松本.
12. 堀 敦詞, 山浦 洵, 本郷 実, 本田孝行, 日高宏哉. 血清中ガラクトシルスルファチド分子種の同定と定量法の構築. 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 23 日, 東京.
13. Atsushi Hori, Mine Yamashita, Shuhei Kidoguchi, Minoru Hongo, Takayuki Honda, Hiroya Hidaka. Analysis of human serum sphingomyelin molecular species using MALDI-TOF mass spectrometry. ACN2015 12th Asian Congress of Nutrition, 2015, 5.16 Yokohama.
14. Fumie Nishijima, Eiko Hidaka, Noriko Kubota, Takako Ono, Tomohiko Nakamura, Takayuki Honda, Minoru Hongo, Hiroya Hidaka. Serum fatty acid compositions of

neonates, infants and young people measured by gas chromatography mass spectrometry. ACN2015 12th Asian Congress of Nutrition, 2015, 5.16 Yokohama.

15. 西島史恵, 日高恵以子, 中村友彦, 本田孝行, 日高宏哉. ガスクロマトグラフィ質量分析による血清脂質分画中の脂肪酸組成の検討, 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014 年 11 月 25 日, 福岡.

16. 堀 敦詞, 木戸口周平, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. 質量分析による血清中主要スフィンゴ脂質のプロファイル, 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014 年 11 月 25 日, 福岡.

17. 堀敦詞, 木戸口周平, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. 血清中主要スフィンゴ脂質の質量分析, 第 54 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2014 年 9 月 4 日, 東京.

18. 西島史恵, 日高恵以子, 中村友彦, 本田孝行, 日高宏哉: ガスクロマトグラフィ-質量分析による血清中脂質分画および遊離脂肪酸組成の分析, 第 54 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2014 年 9 月 4 日, 東京.

19. 木戸口周平, 堀敦詞, 川崎健治, 菅野光俊, 本田孝行, 日高宏哉. MALDI-TOF 質量分析によるヒト気管支肺胞洗浄液中リン脂質の分析, 第 54 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2014 年 9 月 4 日, 東京. (日本臨床化学学会学会賞 YIA 受賞演題)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日高 宏哉 (HIDAKA, Hiroya)

信州大学・学術研究院保健学系・准教授

研究者番号 : 1 0 3 6 2 1 3 8

(2)研究分担者

本田 孝行 (HONDA, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号 : 8 0 2 3 8 8 1 5

本郷 実 (HONGO, Minoru)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号 : 4 0 2 0 9 3 1 7

(平成 26-27 年度. 平成 28 年度は削除)

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

山本 洋 (YAMAMOTO, Hiroshi)

中村 友彦 (NAKAMURA, Tomohiko)

日高 恵以子 (HIDAKA, Eiko)

菅野 光俊 (SUGANO, Mitsutoshi)

川崎 健治 (KAWASAKI, Kenji)

石嶺 南生 (ISHIMINE Nau)

木戸口 周平 (KIDOKUCHI Shuhei)

西島 史恵 (NISHIJIMA Fumie)

堀 敦詞 (HORI Atsushi)