

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07895

研究課題名(和文)非侵襲的生体試料(唾液、爪、毛髪)を用いた疾病早期診断法の開発

研究課題名(英文)Diagnostic approach of diseases using non-invasive biosamples (saliva, hair and nail)

研究代表者

豊岡 利正 (Toyo'oka, Toshimasa)

静岡県立大学・薬学部・特任教授

研究者番号：40183496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非侵襲的な試料である唾液、爪、毛髪を試料とし、疾病の診断に関連したマーカー分子を特定し、早期診断に繋げることを目的とした。

唾液を用いた検討から、糖尿病では、D-乳酸の割合が健常者に比較し優位に高いことを、また乳がん患者では、ポリアミン類の比率が健常者と異なることを明らかとし、統計解析から導きだした判別式から乳がんの進行度を予測できることを示した。一方、痛風患者の爪では、尿酸値が高いことを示した。更に糖尿病患者の毛髪からは、数種のN-アセチルアミノ酸が優位に高いことを見出した。このように本研究により、診断試料としての唾液、毛髪、爪の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diagnostic approach of several diseases using non-invasive biological samples (saliva, hair and nail) was performed in this study. The determination of biomarker(s) related to diseases was based on targeted and non-targeted metabolomics by UPLC-MS. The chiral derivatization reagents, DMT-3(S)-Apy and DMT-L-Pro-OSu, were first synthesized for the determination of carboxylic acids and amines, respectively. The opposite enantiomer reagents and the isotopic variants were also synthesized.

The ratio of D/L-lactic acids in the saliva of diabetic patients was higher than that of healthy persons. The ratio of polyamines in saliva was also different between breast cancer patients and healthy persons. Several N-acetyl amino acids in hairs of diabetes were significantly different from healthy subjects. Furthermore, the concentration of uric acid was obviously higher in gout patients. The efficiency of saliva, hair and nail as diagnostic sample was shown in this study.

研究分野：分析化学

キーワード：疾病診断 光学活性誘導体化試薬 非侵襲的試料 バイオマーカー探索 液体クロマトグラフィー 質
量分析

1. 研究開始当初の背景

細胞の働きを包括的に理解しようとするとき、ゲノム解析やプロテオーム解析に加えて、代謝物の網羅的解析(メタボローム解析)は極めて重要である。近年、メタボローム情報を利用し、健常者群と患者群の全代謝物のパターン(メタボライトプロファイリング)から、患者に特有な物質(バイオマーカー)を検出し、疾病の診断や治療法の評価等に利用しようと試みられている。一方で特定の化合物群(例えば、脂質や糖鎖)に的を絞った選択的メタボロミクス研究が実施されており、バイオマーカー探索に利用されている。

我々の体内には、アミノ酸や糖のように多種多様な光学異性体分子が存在しているが、長い間、一方のエナンチオマー(異性体)のみが活性を有すると信じられていた。しかし、D-アラニンや D-セリンのようにある種の D-アミノ酸が、何らかの生理作用を有することが確認されており、疾病との関連も注目され始めている。しかし、光学異性体をメタボライトプロファイリングの対象に加えて議論している例は、アミノ酸を除いては報告されておらず、光学活性分子と光学不活性分子の両面から、疾病との関連性を包括的な解析によって考察した報告は皆無である。その最大の理由は、メタボローム解析に通常使用される ODS カラムを用いた HPLC-MS 等では、光学異性体を分離検出することができないためと考えられる。もちろん、光学異性体を認識する樹脂を充填したキラルカラムを用いれば、数種類の光学異性体の測定は可能であるが、極端に濃度の異なる数千種の光学不活性分子が多量混在する試料を対象とする場合、多種類の光学異性体の識別は事実上不可能である。従って、光学不活性分子が混在する試料からの光学活性分子の網羅的なプロファイリング解析は、ほとんど行われておらず、正確な光学異性体の把握は、今後のメタボローム研究や疾患マーカーの解析においては、必要不可欠と考えられる。

一方、バイオマーカー探索のための生体試料としては、血液や尿が一般的に用いられているが、血液では、採取者の限定、採取回数制限、痛み等の問題や、尿においては衛生上の問題等が懸念される。また、試料の保存や輸送の問題も発生する。そこで、本研究では、メタボライトプロファイリングの対象生体試料として、非侵襲的な唾液、爪、毛髪を用い、各官能基別光学活性標識試薬およびそれらの安定同位体含有試薬と組み合わせ、疾病関連バイオマーカー分子の探索を行い、各種疾病の早期診断法の開発に繋げる。

2. 研究の目的

これまでのメタボライトプロファイリングによる疾患バイオマーカー探索研究では、光学異性体に関する情報は全く得られていない。しかし、疾病関連バイオマーカーの探索研究を展開するには、従来行われている光

学不活性分子群に加えて、光学異性体含有代謝物の全体像(キラルメタボロミクス)を把握することは避けて通れないと考え研究を実施した。

本研究では、光学不活性化合物のみならず光学異性体を識別でき、且つ高感度選択的検出が可能な官能基別標識試薬を開発する。更にそれらと同一構造を有する反転試薬や安定同位体含有標識試薬の創製を行い、UPLC-Q-TOF-MS/MSやUPLC-TQ-MS/MS等多変量解析を組合せ光学活性分子および光学不活性分子の同時プロファイリング解析を行い、データベース検索等から、疾病に関連したバイオマーカー分子(群)の探索を行う。測定対象試料には非侵襲的である唾液、爪、毛髪を用い、生活習慣病等の各種疾病のリスク評価および簡易検査法の開発を目指す。

3. 研究の方法

血液や尿の中には、数千を超える代謝物を含めた低分子化合物が、多種多様に混在し、その濃度も極端に異なっている。これら代謝物の多くは、アミノ基、カルボキシル基等の官能基を有している。これらの官能基を有する光学異性体を識別するには、光学活性部位(不斉炭素)の導入が不可欠である。そこで、光学異性体を識別でき、高感度、高選択的な官能基別光学活性標識試薬の開発を実施した。我々のこれまでの研究から、分析対象化合物と試薬の2つの不斉炭素の距離が近く反応後のアミド形成が分離に有利である。また、反応部位としては、目的の光学異性体を緩和な条件で標識でき、生成する一对のジアステレオマーを完全に分離できるものとして、アミノ基に対しては、サクシニルイミド基を、カルボキシル基に対してはアミノ基を導入した。さらにメタボロミクス解析のためには、一斉分析が基本であるので、光学異性体のみならず光学不活性分子を含めた全ての測定対象化合物に対して共通するイオンが生成することが求められる。これらの条件を満たすものとして、トリアジン構造を選択した。

定量精度の高いメタボライトプロファイリングには、MS 検出における正確さが重要である。一般に MS 測定では、生体試料由来のマトリックスによる妨害が観察され、異なる試料間(例えば、健常者と患者)の比較をする場合には、結果を読み間違える可能性が生じる。しかし混合試料を1回のクロマトグラフィー分析で行えば、この影響を避けることができる。そこで、標識試薬(light 試薬)と同一構造を有する安定同位体含有標識試薬(heavy 試薬)を使いそれぞれの試料を別々の試薬にて標識後混合し分析し、マトリックスの影響を解消することとした。

誘導体化した試料の測定は、UPLC-Q-TOF-MS/MSやUPLC-TQ-MS/MSを利用して、多変量解析により統計処理し、患

者および未病者におけるバイオマーカー候補(群)を抽出した。次いでデータベース検索により化合物を予測し、有用なマーカー分子が検出されれば、標品等によりそれらの同定を行った。

これまでのメタボローム研究では、対象試料として血液と尿がほとんどであるが、これまでの我々の研究から唾液、爪、毛髪においても濃度は低いものの血液と類似の物質が存在していることを見出している。そこで、本研究では、測定対象として非侵襲的な試料である唾液、爪、毛髪を試料としたメタボライトプロファイリング解析を実施し、測定対象生体試料としての有用性を検証した。

唾液は、空腹時に、直接チューブに採取した。採取後ただちに有機溶媒を添加し、除タンパク、次いで遠心分離後、試料溶液とし、分析開始時まで-80℃で保存した。更に被験者の利便性に点から、ろ紙に浸み込ませた唾液を試料として用いる方法も検討した。毛髪は、後頭頂部より、根元部分から切断し、洗髪、乾燥、粉碎して用いた。毛髪からの低分子物質の抽出は、分析直前に酸、塩基、有機溶媒等により行った。指の先端部から採取した爪は、洗浄および微粉末に粉碎後、毛髪の場合と同様に抽出を行い測定用試料とした。

4. 研究成果

本研究は、光学異性体を識別でき、且つ高感度選択的検出が可能な官能基別標識試薬の創製と、これら開発した試薬群を用いた疾病に関連する不斉炭素含有光学異性体を含めたバイオマーカーの探索を目的とし実施した。測定対象試料としては、非侵襲的な唾液、毛髪、爪を用いて生活習慣病等の各種の疾病に対する診断法の開発を試みた。

はじめに、LC-MS/MSに最適なカルボキシル基およびアミノ基に特異的な光学活性標識試薬の合成と評価を行った。その結果として、光学活性カルボン酸測定用の光学活性誘導体化試薬として、DMT-3(S)-Apyを創製した。一方、光学活性アミン分析用として、DMT-L-Pro-OSuを新規合成した。更にこれらのエナンチオマー(反転試薬)であるDMT-3(R)-ApyおよびDMT-D-Pro-OSuを合成した。加えてDMT-3(S)-Apyに安定同位体の重水素(d)を導入した試薬や¹³Cや¹⁸Oの置換体も合わせて合成した。これらの同位体試薬を併用することで、MS/MS測定においてマトリックスに影響を受けることなく精度の高い光学異性体比の測定が可能となり、カルボン酸類の検出限界はamolレベルであった。一方DMT-L-Pro-OSuは、コハク酸イミド型試薬であり反応性が高く、少量の塩基を加えるのみでアミン類と定量的に反応が進行し検出感度も満足できるものであった。

次に、唾液、爪、毛髪を試料とし、疾病(糖尿病、慢性腎不全、乳がん、痛風等)との関連性を検討した。唾液を用いた検討から、糖尿病では、D-乳酸の割合が健常者に比較し優

位に高いことを見出し、その割合は病気の進行度に比例していることを確認した。更に被験者の利便性を考慮し、Dried Saliva Spot法を開発した。慢性腎不全患者の検討では、透析前後の比較から透析後にクレアチニンの濃度が劇的に減少することを明らかとし、容易に透析の評価が可能となるものと考えられる。また乳がん患者では、数種のポリアミン類の比率が健常者と異なることを明らかとし、統計解析から導きだした判別式から乳がんの進行度を予測できることを示した。一方、痛風患者の爪では、尿酸値が高いことを見出した。更に糖尿病患者毛髪では、アミノ酸であるN-アセチルロイシンとN-アセチルイソロイシンに優位な変動があることを明らかにした。

このように診断試料としての唾液、爪、毛髪の有用性が示唆され、本研究の方向性が正しいことを証明した。本法は、患者に負担の少ない診断法となりうるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)全て査読有

Toshimasa Toyo'oka, Derivatization-based high-throughput bioanalysis by LC-MS, *Anal. Sci.*, 33, 555-564 (2017).
DOI: 10.2116/analsci.33.555

Hajime Mizuno, Kazuki Ueda, Yuta Kobayashi, Naohiro Tsuyama, Kenichiro Todoroki, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka, The great importance of normalization of LC-MS data for highly accurate non-targeted metabolomics. *Biomed. Chromatogr.*, 31, e3864 (pp1-7) (2017).
DOI 10.1002/bmc.3864

Toshimasa Toyo'oka, Diagnostic approach to disease using non-invasive samples based on derivatization and LC-ESI-MS/MS. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 1397-1414 (2016).
DOI: 10.1248/bpb.b16-00453

Masahiro Numako, Takahiro Takayama, Ichiro Noge, Yutaka Kitagawa, Kenichiro Todoroki, Hajime Mizuno, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka, Dried saliva spot (DSS) as a convenient and reliable sampling for bioanalysis: An application for the diagnosis of diabetes mellitus. *Anal. Chem.*, 88, 635-639 (2016).
DOI: 10.1016/j.aca.2016.01.032

Takahiro Takayama, Haruhito Tsutsui, Tatsuya Toyama, Nobuyasu Yoshimoto, Yumi Endo, Koichi Inoue, Kenichiro Todoroki, Jun Zhe Min, Hajime Mizuno, Toshimasa Toyo'oka, Diagnostic approach to breast cancer patients based on target

metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 452, 18-26 (2016).

DOI: 10.1016/j.cca.2015.10.032

Xi-Ling Li, Qing Shi, Wenlong Jin, Gao Li, Kenichiro Todoroki, Hajime Mizuno, Toshimasa Toyo'oka, Jun Zhe Min, Uric acid quantification in fingernail of gout patients and healthy volunteers using HPLC-UV. *Biomed. Chromatogr.*, 30, 1338-1342 (2016). DOI: 10.1002/bmc.3687

Toshiki Mochizuki, Takahiro Takayama, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka, Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based DL-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers. *Anal. Chim. Acta*, 875, 73-82 (2015).

DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.054

Takahiro Takayama, Toshiki Mochizuki, Kenichiro Todoroki, Jun Zhe Min, Hajime Mizuno, Koichi Inoue, Hiroyasu Akatsu, Ichiro Noge, Toshimasa Toyo'oka, A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. *Anal. Chim. Acta*, 898, 73-84 (2015).

DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.010

Jun Zhe Min, Yuki Tomiyasu, Takashi Morotomi, Ying-Zi Jiang, Gao Li, Qing Shi, Hai-fu Yu, Koichi Inoue, Kenichiro Todoroki, Toshimasa Toyo'oka, First observation of N-acetyl leucine and N-acetyl isoleucine in diabetic patient hair and quantitative analysis by UPLC-ESI-MS/MS. *Clin. Chim. Acta*, 444, 143-148 (2015).

DOI: 10.1016/j.cca.2015.02.006

Xi-Ling Li, Gao Li, Ying-Zi Jiang, Dongzhou Kang, Cheng Hua Jin, Qing Shi, Toufeng Jin, Koichi Inoue, Kenichiro Todoroki, Toshimasa Toyo'oka, Jun Zhe Min, Human nails metabolite analysis: A rapid and simple method for quantification of uric acid in human fingernail by high-performance liquid chromatography with UV-detection. *J. Chromatogr. B*, 1002, 394-398 (2015).

DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.08.044

[学会発表](計16件)

福井 芹菜、高野 大貴、高山 卓大、水野 初、豊岡 利正、轟木 堅一郎：3種同位体標識誘導体化試薬を組み合わせた迅速かつ高精度なキラルメタボロミクスの開発，第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム（東京）要旨集 p98，2017年8月29日。

高山 卓大、柳澤 拓摩、水野 初、豊岡 利正、轟木 堅一郎：誘導体化法によるアミノ酸の光学異性体一斉分離法の開発，第24回クロマトグラフィーシンポジウム（仙台）要旨集 p15，2017年6月15日。

鈴木 安希子、高山 卓大、清水 逸平、轟木 堅一郎、水野 初、関 俊哲、豊岡 利正：唾液中ポリアミン安定化法の開発と乳がん診断法への応用，日本薬学会第137年会（仙台）要旨集 2，p286，2017年3月27日。

沼子 将大、高山 卓大、轟木 堅一郎、水野 初、関 俊哲、豊岡 利正：簡易糖尿病診断を目的とした蛍光検出法による唾液中 DL-乳酸の測定，日本薬学会第137年会（仙台）要旨集 2，p290，2017年3月27日。

高山 卓大、轟木 堅一郎、水野 初、関 俊哲、豊岡 利正：12C/13C キラル誘導体化試薬を併用した高精度キラルメタボロミクスの開発，日本薬学会第137年会（仙台）要旨集 2，p286，2017年3月27日。

柳澤 拓摩、高山 卓大、轟木 堅一郎、水野 初、関 俊哲、豊岡 利正：アミノ酸キラル分析を指向した新規キラル誘導体化試薬の開発とその分離挙動解析，日本薬学会第137年会（仙台）要旨集 2，p285，2017年3月27日。

Yuta Nishio, Jun Zhe Min, Kenichiro Todoroki, Hajime Mizuno, Toshimasa Toyo'oka: Determination of chiral metabolites in fingernails from colorectal cancer patients. 27th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2016) (Guangzhou, China) 2016年11月13-16日。

Toshimasa Toyo'oka, Masahiro Numako, Takahiro Takayama, Kenichiro Todoroki, Hajime Mizuno, Jun Zhe Min: Diagnostic approach for diabetes mellitus using Dried Saliva Spot (DSS) by UPLCMS/MS. 31st Internal Symposium on Chromatography (ISC 2016) (Cork, Ireland) 2016年8月28

日-9月1日。

豊岡 利正:誘導体化法を基盤とするバイオアナリシス研究 アミノ酸の光学異性体分析を中心に ,新アミノ酸分析研究会第6回学術講演会(東京)要旨集, p10-11, 2016年11月4日。

豊岡 利正:生体機能性分子の高感度・特異的分析法の開発とバイオアナリシスへの展開,日本分析化学会第65年会(札幌)要旨集, p9, 2016年9月15日。

豊岡 利正:非侵襲的試料を用いた疾病診断,第76回分析化学討論会(岐阜)要旨集, p1, 2016年5月28日。

豊岡 利正:生体機能性分子の高性能分析法の開発と薬学的応用研究,日本薬学会第136年会(横浜)要旨集1, p46, 2016年3月27日。

宇野 馨、高山 卓大、轟木 堅一郎、水野 初、関俊哲、豊岡 利正:カルボン酸分離分析用の安定同位体含有光学活性誘導体化試薬の合成と評価,第26回クロマトグラフィー科学会議(福岡)要旨集, p48, 2015年11月12日。

高山 卓大、遠山 竜也、吉本 信保、遠藤 友美、水野 初、井之上 浩一、轟木 堅一郎、関 俊哲、豊岡 利正:唾液を用いた簡便な乳がん診断法の開発,第26回クロマトグラフィー科学会議(福岡)要旨集, p34, 2015年11月12日。

高山 卓大、井之上 浩一、轟木 堅一郎、水野 初、関 俊哲、豊岡 利正:誘導体化 LC MS/MS 測定法による光学活性代謝物の網羅的エナンチオマー分別分析法の開発と応用,第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム(長崎)要旨集, p126-127, 2015年8月21日。

豊岡 利正:LC-MS/MS用光学活性誘導体化試薬の創製とキラルメタボロミクスへの適用,第22回クロマトグラフィーシンポジウム(大阪)要旨集, p1, 2015年5月29日。

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analychem/achievement.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊岡 利正 (TOYO'OKA Toshimasa)

静岡県立大学・薬学部・特任教授

研究者番号: 40183496