

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15435

研究課題名(和文) ESI増強重水素標識をキーとする脂質代謝異常症SLOSの新規診断マーカー解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel diagnostic marker for SLOS based on LC/ESI-MS/MS by ESI-enhanced deuterium labeling

研究代表者

小川 祥二郎(Ogawa, Shoujiro)

東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：30546271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性脂質代謝異常症のSLOSの新規診断マーカーの探索，及びマーカーのLC/ESI-MS/MS分析用誘導体化試薬の開発も行った．安価な胆汁酸から十数工程で24S-ヒドロキシ-7-デヒドロコレストロールを合成し，コレストロールから数工程で4-及び4-ヒドロキシ-7-デヒドロコレストロールを得た．別に，7-デヒドロコレストロール還元酵素阻害剤AY9944摂取により作成したSLOSモデルラットの血清も得た．LC/ESI-MS/MSで測定した所，モデルラット血清から4-及び4-ヒドロキシ-7-デヒドロコレストロール由来のピークが明瞭に観察され，これらはSLOSの診断マーカーとして期待される．

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAを指標とした誘導体化試薬のデザインを基に，より高い検出感度向上能を有する試薬を開発できたことで，少量の生体試料で臨床診断が可能となった．また4-及び4-OH-7-DHCがSLOSの新規な診断マーカー候補化合物として見出されたことから，我々の誘導体化試薬とLC/ESI-MS/MSを組み合わせたモノヒドロキシ-7-DHCの分析を新生児血清(あるいはより少量の乾燥露紙血など)分析に応用すれば，早期の診断法開発への道が開かれるものと期待される．

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to find a novel diagnostic marker for SLOS in cholesterol disorder. Furthermore, I have also developed a novel derivatization reagent for increasing assay sensitivity based on LC/ESI-MS/MS analysis. 24S-Hydroxy-7-dehydrocholesterol was synthesized from inexpensive bile acid analogue in more than 10 steps, and 4- and 4-hydroxy-7-dehydrocholesterol was obtained from cholesterol in several synthesis steps. Separately, serum of SLOS model rats prepared by ingestion of 7-dehydrocholesterol reductase inhibitor AY9944 was also obtained. Peaks derived from 4- and 4-hydroxy-7-dehydrocholesterol were clearly observed in the model rat serum as measured by LC/ESI-MS/MS, and these are expected as diagnostic markers for SLOS.

研究分野：分析科学

キーワード：誘導体化 LC/ESI-MS/MS モノヒドロキシ-7-デヒドロコレストロール ステロール

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Smith-Lemli-Opitz症候群 (SLOS) はコレステロール生合成における最終段階の酵素7-デヒドロコレステロールレダクターゼ (DHCR7) の活性低下・欠損に伴う体内でのコレステロール不足を主因として、胎内あるいは生後の発育不全、重度-中度の精神発達障害、肝障害などが引き起こされる。加えて本症は予後も非常に悪く、コレステロール・胆汁酸補充療法などの早期対症療法が必須だが、現状、本症の確定診断は結果を得るのに比較的長期 (数週間) の時間を要する遺伝子検査のみであり、迅速な診断法が切望される。SLOS患児は健常児と比べて体内で7-デヒドロコレステロール (7-DHC) 及びその代謝物 (7-DHCの酸化成績体) やそこから派生される不飽和胆汁酸 (C<sub>24</sub>-あるいはC<sub>27</sub>-胆汁酸) などの異常蓄積が強く示唆される。これらの体内レベルを指標としたSLOSの新規診断法が有効であることに加え、その体内動態や細胞毒性がSLOS疾患と大きく関わるものと期待されるため、現在、活発に本症に特徴的なステロイド代謝物が探索されている。生体中の7-DHCは診断マーカーとして第一候補ではあるが、SLOS疾患の10-25%は体内の7-DHCレベルが高値を示さず、正常範囲であるという報告もあり、生体試料中の7-DHCレベルでのSLOS診断は十分ではない [Am. J. Med. Genet. 68, 263-269, (1997)]。さらに、SLOS疾患患者生体試料は極めて得難い問題がある。そこで申請者はその代替として、DHCR7阻害薬投与ラットを作成し、これをSLOSモデルとしてその生体試料 (血液、肝臓及び脳内) 中で特異的に増加する7-DHC以外のステロイド (ステロールや胆汁酸) を精査し、これを新規SLOS診断マーカーとした精密定量法の開発を企てた。DHCR7活性の欠損というSLOSの特徴から、新規診断マーカー候補化合物も7-DHCと同様に*s-cis*-ジエンを有すると考えられる。最近、Griffithsらは酵素酸化により生体内ステロイドをケト基へと酸化し、ケトステロイド誘導体化 (Girald's試薬 P)-LC/ESI-MS/MS分析によるフラグメントパターンから、SLOSモデルラット脳中に7-DHCの4位あるいは24位に水酸基を有する新規ステロールの存在する可能性を報告したが、これらは合成された標品との直接比較もされていない。これに加えて、酵素酸化によりステロイド中の水酸基をケト基へ変換しているため、極めて重要な水酸基の立体配置に関する情報も喪失している [Biochem. Pharmacol., 86, 43-55 (2013)]。このため、水酸基などの立体配置の情報を保存しつつ、SLOS診断マーカー候補化合物が有する*s-cis*-ジエンに特異的に反応するESI増強誘導体化試薬の開発がSLOS新規診断マーカーの網羅的な解析には必須であると考えられた。現在、生体中の微量ステロイドの分析には特異性と選択性、複数のステロイドが同時に分析可能という点でLC/ESI-MS/MSが第一選択と言える。しかし、本法も万能ではなく、有機合成化学的手法を駆使して得られた合成標品との直接対比は必須である。さらに生体試料中の微量SLOS診断マーカー候補化合物のイオンシグナルを、夾雑物質や生体内マトリクスと弁別して高シグナル/ノイズ比で検出する技術は確立できていない。さらに精密定量に必須の安定同位体標識アナログ (内標準物質) が入手困難な場合、量的な情報を得ることも難しい。

### 2. 研究の目的

先天性ステロール代謝異常症の乳児・新生児では、コレステロール生合成に関与する酵素の欠損あるいは活性低下のため、健常人には見られないステロイド異常代謝産物が肝内に蓄積すると共に、多量のそれが尿中に排泄または血中を循環する。このような、異常代謝産物は疾患の特異的診断マーカーとなりうるため、疾患の早期診断・相互鑑別に有効であると期待される。以上を背景とし、申請者は先天性代謝異常症の中でもSmith-Lemli-Opitz症候群 (SLOS) に着目し、i) SLOSの生体試料 (血液、肝臓あるいは脳) 中に**特異的に増加する新規診断マーカーの化学合成**、ii) それの超高感度・高選択的分析を目指し、**診断マーカーの有する特異的な構造を補足し、さらにLC/MS/MSにおける応答性も大幅に増強する多機能な誘導体化試薬の開発**を行い、SLOSモデルマウスを用いて開発した診断法の実用性の評価を検討する。このように本研究はi) とii) を組み合わせ、**SLOSの精密診断に寄与**することを究極の目的とした。本申請課題を進行するにあたり、申請者はSLOSの特徴を吟味した結果、SLOS診断マーカー候補化合物もステロイド母核構造中に5,7-ジエンを有しているものと推定した。そこで、診断マーカー候補化合物の効率的な合成法の開発をすすめることとした。さらに、5,7-ジエンに特異的に反応する種々のプロトン親和性原子団を導入した新規Cookson型試薬の開発も企てた。

### 3. 研究の方法

5,7-ジエンに特異的に結合する誘導体化試薬にはCookson型試薬が好適であると予想した。先に、4-(4-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD)のジメチルアミノフェニル基よりも、高いプロトン親和性 (PA) を有するジエチルアミノフェニル基を導入した4-(4-diethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DEAPTAD) を用いることでビタミンD代謝物の検出感度向上が達成された。したがって、既存のESI活性なCookson型試薬 (DAPTAD, DEAPTAD) よりも高い検出感度向上能を有する試薬を開発するにはよりPAの高い構造を導入することが有用であると考えられる。本研究では、DEAPTADのジエチルアミノフェニル基をさらに高いPAの原子団に置換したアナログの開発を企てた。次いで、合成した試薬による7-DHC誘導体のLC/ESI-MS挙動を精査し、その性能をDAPTADおよびDEAPTADと比較し、評価した。また、SLOSは7-DHCの7位の還元酵素の欠損からくるコレステロール合成

不全の疾患であることから、7-DHCのモノヒドロキシ体が有効なマーカーとなると推察された。そこで、マーカー候補化合物の標品の合成も企てた。SLOSに特異的なバイオマーカーとして期待される25-ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロール、24S-ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロールあるいは4 $\xi$ -ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロール [25-OH-7-DHC, 24S-OH-7DHC, 4 $\alpha$ -OH-7-DHC, 4 $\beta$ -OH-7-DH]の5種にターゲットを絞り、安価な市販品からこれらを得ることとした。これに並行して、7-デヒドロコレステロール還元酵素阻害剤AY9944を妊娠ラットに投与して、得られた仔ラットに継続してAY9944を投与することでSLOSのモデルラットを得ることとした。仔ラット、コントロールラットから血清、肝臓、脳を採取して生体試料を調製した。

#### 4. 研究成果

まず、コレステロールを原料に4 $\alpha$ -ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロール (4 $\alpha$ -OH-7-DHC) 4 $\beta$ -ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロール (4 $\beta$ -OH-7-DHC) を合成した。さらに、ヒオデオキシコール酸を原料として、24S-ヒドロキシ-7-デヒドロコレステロール (24S-OH-7-DHC) の合成も達成した。

購入した妊娠ラットの妊娠4日でDHCr7阻害薬AY9944 (75mg/kg) 経口投与出産後は仔ラットに対し、生後2日から隔日AY9944 (30mg/kg) 皮下投与に付した。生後およそ16~31日に血液サンプル・組織 (脳, 肝臓) を採取した。先ず、得られたSLOSモデルラット血中で増加するSLOSの新規診断マーカーの探索を行うために、LC/ESI-MS/MSを用いてコントロール及びSLOSモデルマウス血中の7-デヒドロコレステロール (7-DHC) 及びその酸化成績体の含量を分析した。すなわち、各血清サンプル (10  $\mu$ L) を除タンパク後、液-液にて前処理し、我々の研究室で開発した高プロトン親和性 Cookson 型試薬である 4-(4-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) でコントロール血清を誘導体化し、これと<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-DAPTADで誘導体化したSLOSモデルラット血清を混合してLC/ESI-MS/MSによる同時測定を行う、ICDに基づく差解析を行った。その結果、SLOSモデルマウスとコントロールの血中7-DHCに由来するピーク面積を比較すると、モデルラット血中では**7-DHC含量が10-1000倍程度増加**していることが判明した。さらにモデルラット血中にものみ7-DHCの水酸化体と思われるトランジションに**新たなピークが2つ観察**された (図)。これらを先に合成した標品群を用いてSLOSモデルラット血清中から**新たに観察されたピークを比較したところ、それぞれ4 $\alpha$ -、4 $\beta$ -OH-7-DHCであることが判明した。**

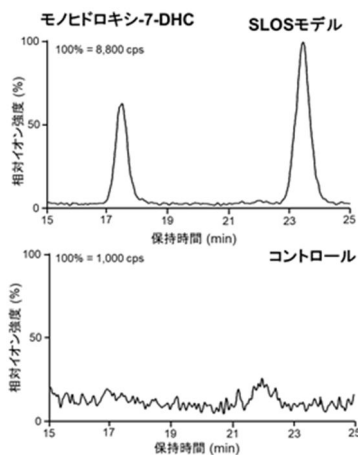


図. SLOSモデル、コントロールラット血清中モノヒドロキシ-7-DHCのクロマトグラム

現在、これらの2化合物の定量法の開発を行っている。一方で、24S-7-DHCは血清中からは観測されなかったが、その類縁化合物である24S-ヒドロキシコレステロールは脳神経細胞毒性を有し、例えばアルツハイマー患者の脳内に存在することも知られていることから、脳神経系の異常も観察されるSLOS患者脳中には24S-OH-7-DHCの存在が示唆されることから、本化合物も重要な診断マーカーの一つとして期待されるため、今後は脳内24S-OH-7-DHC分析も試み、例えば脳脊髄液中に24S-OH-7-DHCが存在すれば、これらの生理学的作用も非常に興味深いものになると考えている。

先ずより高感度なCookson型の誘導体化試薬をデザインするにあたり、その部分構造のプロトン親和力 (PA) が決め手となると予想し、比較することにした。*N,N*-ジメチルアニリン (941 kJ/mol) に対して、*N,N*-ジメチルベンジルアミン (968.4 kJ/mol) は高いPAを示すことから、DEAPTADが有する*N,N*-ジエチルアニリンに対して、*N,N*-ジエチルベンジルアミンがより高いPAを示すと予測した。従って、*N,N*-ジエチルベンジルアミンをトリアゾリンの4位に導入した4-(4-diethylaminomethylphenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DEMPTAD)を合成した。DEAPTADは先に構築した手法すなわち4-ジエチルアミノメチル安息香酸を出発原料と

して、その酸アジド体を經由する5段階で導いた。ここで3試薬のPAをGaussian09による振動計算にて算出したところ、DAPTAD: 990, DEAPTAD: 1007, およびDEMPTAD: 1035 (kJ/mol) であり、期待通りDEAMPTADが高いPAを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 51.K. Namegawa, K. Iida, K. Omura, S. Ogawa, A.F. Hofmann, T. Iida	4. 巻 53
2. 論文標題 Chemical synthesis of rare natural bile acids: 11 -Hydroxy derivatives of lithocholic and chenodeoxycholic Acids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 403-411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lipd.12013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 S. Ogawa, K. Takafuji, S. Tsubuku, Y. Horie, S. Ikegawa T. Higashi	4. 巻 142
2. 論文標題 Isotope-coded derivatization based LC/ESI-MS/MS methods using apair of novel reagents for quantification of hydroxycinnamic acids andhydroxybenzoic acids in fermented brown rice product	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Pharm. Biomed. Anal.	6. 最初と最後の頁 162-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2017.04.035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Ishige, M. Satoh, S. Ogawa, M. Nishimura, K. Matsushita, T. Higashi, F. Nomura	4. 巻 473
2. 論文標題 Improved sensitivity of serum/plasma 1,25-dihydroxyvitamin D quantification by DAPTAD derivatization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin. Chim. Acta	6. 最初と最後の頁 173-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2017.08.033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Matsumoto, W. Yamazaki, A. Jo, S. Ogawa, K. Mitamura. S. Ikegawa, T. Higashi	4. 巻 34
2. 論文標題 A method for quantification of tetrahydroglucocorticoid glucuronides in human urine by LC/MS/MS with isotope-coded derivatization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 1003-1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18SCP02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Matsumoto, M. Sato, W. Yamazaki, S. Ogawa, T. Higashi	4. 巻 146
2. 論文標題 (S)-1-(1-Methylpyridin-2-yl)-3-aminopiperidine as a novel derivatization reagent capable of enantiomeric separation and enhanced ESI-MS/MS detection for chiral carboxylic acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microchem. J.	6. 最初と最後の頁 23-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.microc.2018.12.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Yoshimura, R. Hibi, A. Nakata, M. Togashi, S. Ogawa, T. Ishige, M. Satoh, F. Nomura T. Higashi	4. 巻 33
2. 論文標題 Identification of conjugation positions of urinary glucuronidated vitamin D3 metabolites by LC/ESI-MS/MS after conversion to MS/MS-fragmentable derivatives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed. Chromatogr.	6. 最初と最後の頁 e4538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.4538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小川 祥二郎, 渡部 ひとみ, 高橋 花乃子, 坪郷 哲, 恒岡 弥生, 東 達也
2. 発表標題 DAPTAD 誘導体化-LC/ESI-MS/MS による7- デヒドロコレステロール酸化成績体の分析
3. 学会等名 日本薬学会 139 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Ogawa
2. 発表標題 Design and syntheses of ESI enhancing and deuterium labeling reagents and their applications of LC/ESI-MS/MS analyses for trace bioactive compounds
3. 学会等名 5th International postgraduate conference on pharmaceutical science 2017 (iPoPS2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 中田 彬穂, 日比 隆一郎, 吉村 友佑, 橘高 宏貴, 東 達也
2. 発表標題 DAPTAD誘導体化-LC/ESI-MS/MSによる尿中グルクロン酸抱合型ビタミンD3代謝物の分析
3. 学会等名 第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川 祥二郎
2. 発表標題 ESI増強重水素標識試薬のデザイン・合成と微量生理活性物質分析への応用
3. 学会等名 日本薬学会第137回年会 (物理系薬学部会シンポジウム)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 渡部 ひとみ, 茶谷 仁, 島田 洋輔, 坪郷 哲, 後藤 了, 東 達也
2. 発表標題 種々のCookson型試薬による7-dehydrocholesterol誘導体のプロトン親和力とESI-MS感度との関係
3. 学会等名 日本薬学会第137回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川祥二郎, 中田彬穂, 日比隆一郎, 吉村友佑, 橘高宏貴, 東 達也
2. 発表標題 誘導体化-LC/ESI-MS/MSによる尿中グルクロン酸抱合型ビタミンD3代謝物の測定
3. 学会等名 第42回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 板垣 美咲, 麻生 早希, 東 達也
2. 発表標題 臨床検査試料としての爪の有用性評価: 性差、年齢及び指ごとの爪中テストステロン含量差の解析
3. 学会等名 第44回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村 友佑, 富樫 萌香, 小川 祥二郎, 東 達也
2. 発表標題 化学的手法とLC/ESI-MS/MSを組み合わせた, 尿中グルクロン酸抱合型ビタミンD3代謝物の同定
3. 学会等名 第59回臨床化学学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Method for derivatizing an s-cis - compound, derivatization reagent kit, and method for analyzing an s-cis-diene compound	発明者 2017	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、20180088137	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----