

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591009
 研究課題名（和文） 新規 LC-MS/MS イソプロスタン測定法の開発と陰性荷電変性 LDL 産生機序の解明
 研究課題名（英文） Novel methods for measuring urine F2-isoprostanes using LC-MS/MS and the origin of electronegative LDL
 研究代表者
 瀬川 波子（SEGAWA NAMIKO, ZHANG BO）
 福岡大学・医学部・助教
 研究者番号：80352251

研究成果の概要：酸化ストレスのマーカーとして確立されている尿中 F2-イソプロスタンはプロスタグランジンの立体異性体であり、多数の立体異性体と位置異性体が存在する。F2-イソプロスタンを高感度・高特異的に測定するために、新規多次元固相抽出法と新規バッファフリー LC-MS/MS 法を開発した。酸化 LDL に代表される陰性荷電変性 LDL は、マクロファージが好んで貪食することが知られている。高コレステロール血症患者において、キャピラリー等速電気泳動（cITP）法により分析した陰性荷電 LDL 亜分画は、炎症マーカー、動脈硬化性リポ蛋白と関係することを示した。高コレステロール血症患者の血漿中に、中性脂肪リッチリポ蛋白（TRL）と同じ電気泳動泳動度（pre-beta）を有する新たな陰性荷電変性 LDL 亜分画（very-fast migrating LDL, vfLDL）の存在を発見した。また、vfLDL 亜分画は、fast-migrating LDL（fLDL）亜分画と強く相関したが、正常荷電 LDL 亜分画と相関しなかった。vfLDL 亜分画は、fLDL と同様にスタチン薬 Rosuvastatin によって低下した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：動脈硬化学

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレス及び酸化 LDL は動脈硬化病変形成と密接に関連することが知られている。従って、酸化ストレスマーカー測定と酸化 LDL 測定は動脈硬化症リスク評価に有用と考える。

(1) アラキドン酸が活性酸素種（ROS）の攻撃を受けて生成される尿中 F2-isoprostane は酸化ストレスのマーカーとして確立されている。しかし、尿中 F2-isoprostane は低濃度で存在し、多数の立体異性体と位置異性体が存在するために、高感度・高特異的分析法が求められる。

(2) 陰性荷電になるように処理した LDL はマクロファージが好んで貪食する。私達は、LDL を酸化させると、キャピラリー等速電気移動法により分析した陰性荷電 LDL 亜分画が増加することを観察した。しかし、陰性荷電 LDL は動脈硬化の新しいマーカーになり得るかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 尿中 F2-isoprostane を高感度・高特異的に測定するための、新規サンプル抽出法と新規 HPLC 分離法を開発する。

(2) 高コレステロール患者において陰性荷電変性 LDL の臨床意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 多次元尿中 F2-イソプロスタノール固相抽出法の開発

固相の選択 : [³H]-iso-prostaglandin (iP) F2 α -III (iPF2 α -III) を尿サンプルに添加し、HLB, MAX などの固相カトリッジの保持容量を検討し、保持容量の大きいものを選択した。

抽出溶媒の選択 : Methanol (MeOH), acetonitril (ACN), hexane, acetyl acetate などの有機溶媒の [³H]- iPF2 α -III に対する順相・逆相保持・溶出特性を検討することにより、洗浄と溶出溶媒を選択した。

(2) バッファーフリー-HPLC 分離法の開発

pH の iPF2 α -III 異性体分離に対する影響はギ酸及び酢酸を使って検討した。

分離カラムの選択 : 異なるメーカーの C8, C18 カラム (3 μ m, 10 cm) の iPF2 α -III 異性体と prostaglandin (PG) F2 α 異性体の分離特性を検討することにより、分離能が高く、ピークの対称性がよく、再現性のよいカラムを選択した。

移動相の選択 : Methanol と ACN の混合溶媒比率を変化し、iPF2 α -III、PGF2 α の分離特性を検討することにより、移動相組成を決定する。

(3) LC-MS/MS 分析条件の検討

ES-モードで PGF2 α を syringe infusion によりタンデム MS 機器の検出条件を最適化した。MS スキャンにより、市販されている iPF2 α -III と PGF2 α 異性体の precursor イオンを確

認後、イオン感度が最大になるように SIR でコーンエネルギーを決めた。Daughter scan により各分析化合物の daughter イオンを確認後、MRM で collision エネルギーを決めた。

(4) パーファー添加物の iPF2 α -III 異性体に対するイオン抑制効果の検討

NH₄OH, AcOH などのパーファーの iPF2 α -III 異性体に対するイオン抑制効果は、post-column infusion により検討した。

(5) キャピラリー等速電気泳動 (cITP) 法による陰性荷電 LDL 亜分画の分析

キャピラリー等速電気泳動は Beckman の P/ACE MDQ システムで行った。

血漿サンプルの調整 : 血漿サンプル中のリポ蛋白を NBD-ceramide で染色し、内部マーカーと 9 種類のアミノ酸スペーサーミックスを加えて混和することによって調整した。

分析バッファー調整 : Leading buffer 1 (LB1) は ammediol と HCl で調整した。Leading buffer 2 (LB2) は ammediol, HCl と、HPMC (0.35%) で調整した。Terminating buffer 1 (TB1) は ammediol と alanine で調整し、terminating buffer 2 (TB2) は、TB1 に飽和 Ba(OH)₂ を加えて調整した。

LDL 分画、小型 LDL 分画での LDL 亜分画分析は、血漿 d>1.006 g/ml 分画と血漿 d>1.040 g/ml 分画で行った。

(6) 陰性荷電 LDL 亜分画と炎症マーカーの関係

心臓病危険因子を有する高コレステロール血症患者より採血し、血漿を分離した。LDL 亜分画は cITP 法により測定し、炎症マーカーとして、血清 CRP 濃度、LDL 結合血小板活性化因子分解酵素 (PAF-AH) の活性を測定し、動脈硬化性リポ蛋白としては remnant-like particle cholesterol (RLP-C) 及び小型化 LDL コレステロール (sdLDL-C) を測定した。陰性荷電 LDL 亜分画と炎症マーカー及び血漿脂質、アポリポ蛋白値の関係は Spearman 相関にて検討した。

(7) スタチン薬の陰性荷電 LDL に対する効果

心臓病危険因子を有する高コレステロール血症患者に低用量の Rosuvastatin を 3 ヶ月間投与した。投与前後に採血し、超遠心により LDL 分画と小型化 LDL 分画を分離した。

cITP LDL 亜分画と小型化 LDL 亜分画を測定し、LDL 分画と小型化 LDL 分画の脂質(コレステロール、中性脂肪、リン脂質)、リポ蛋白結合酵素 PAF-AH、アポリポ蛋白(アポ A-I, B, C-II, E)の組成を測定した。

(8) データの統計解析

データ統計解析は SAS (Statistical Analysis System, Version 9.13) にて行った。連続変量間の関係は Spearman 相関によって検定した。スタチンの脂質パラメーターに対する効果は Wilcoxon-signed rank test にて検討した。

4. 研究成果

(1) ESI-MS/MS による iPF_{2α}位置異性体の分離

図 1 に示すように、iPF_{2α}-III と iPF_{2α}-VI の precursor イオンの m/z 比は 353 で同じであるが、iPF_{2α}-III の daughter イオンの m/z 比は 193 で、iPF_{2α}-VI の daughter イオンの m/z 比は 115 であるので、iPF_{2α}位置異性体は ESI タンデム MS により分離される。

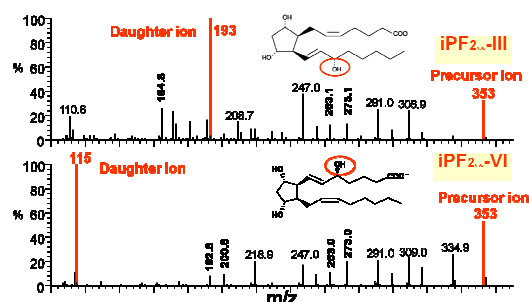


図 1. Separation of iPF_{2α} regioisomers by ESI-MS/MS

(2) 新規 iPF_{2α}異性体分離 HPLC 法の開発

1) HPLC バッファー添加物の iPF_{2α}検出感度に対する影響

酢酸アンモニウムを HPLC 移動相バッファーに添加した場合、イオン抑制効果により iPF_{2α}検出感度が低下した。

2) iPF_{2α}立体異性体分離に対する HPLC 移動相バッファーの pH の影響

HPLC 移動相バッファーの pH は低くなると iPF_{2α}立体異性体の保持時間が長くなるが、iPF_{2α}立体異性体の分離に対して影響がなかった。

以上の結果により、バッファー添加物を使用せず、iPF_{2α}立体異性体の分離は中性条件で行うことにした。

3) HPLC 分離カラムの選択

中性条件で分析できる逆相 HPLC カラムの中から、iPF_{2α}立体異性体を分離するカラムとして Hypersil BDS 3μm C8, C18 カラムを選択した。

Hypersil BDS 3μm C8, C18 の何れも iPF_{2α} 立体異性体の標準品に対して良好な分離を示した。しかし、図 2 に示すように、ヒト尿サンプル中の iPF_{2α}立体異性体分離の場合に、Hypersil BDS 3μm C8 カラムは iPF_{2α}-III より未知の異性体を分離していることが分かった。従来 iPF_{2α}-III として測定されているピークに未知の iPF_{2α}-III の異性体が存在することを初めて見出した。

4) HPLC 混合溶媒の組成が iPF_{2α}-III 異性体分離に対する影響の検討

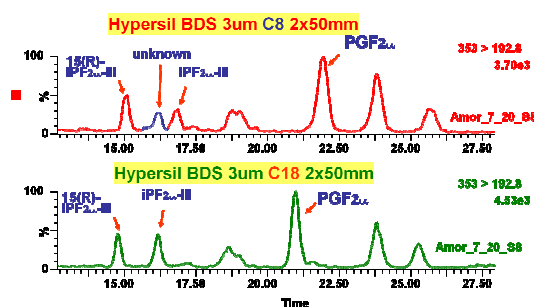


図 2. Hypersil BDS C8, C18 column selectivity towards iPF_{2α} isomers in urine

(3) 尿中 iPF_{2α}異性体抽出法の開発

クリーンなサンプル抽出とサンプル濃縮は LC-MS/MS による尿中 F₂-イソプロスタンの高感度分析に不可欠である。

1) 固相のスクリーニング

HLB 固相カトリッジが尿サンプル中の [³H]-8-iso-PGF_{2α}に対して最大保持容量を示したため、HLB 固相カトリッジを尿サンプル抽出法の開発に用いた。

2) 夾雑物を除去するための洗浄溶媒の検討

図 3 に示すように、HLB 固相カトリッジでは、MeOH は [³H]-8-iso-PGF_{2α}に対する保持特性が pH によって異なっていた。この特

性を利用して二次元洗浄法を開発した。

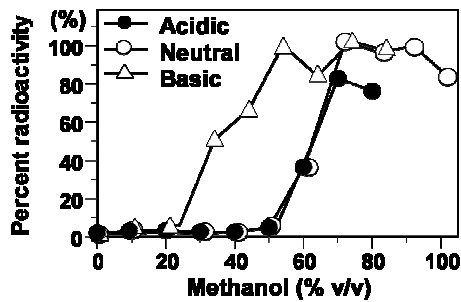


図 3. Development of two-dimensional (pH, organic solvent conc.) wash procedure using $[^3\text{H}]\text{-8-iso-PGF}_2\alpha$

3) 尿中 $\text{F}_2\text{-}$ イソプロスタン抽出法

図 4 に尿中 $\text{F}_2\text{-}$ イソプロスタン抽出法を示す。サンプルの濃縮は固相容量の少ない $\mu\text{Elution}$ プレートで行うため、抽出したサンプルを水で希釈してそのまま分析に使える。

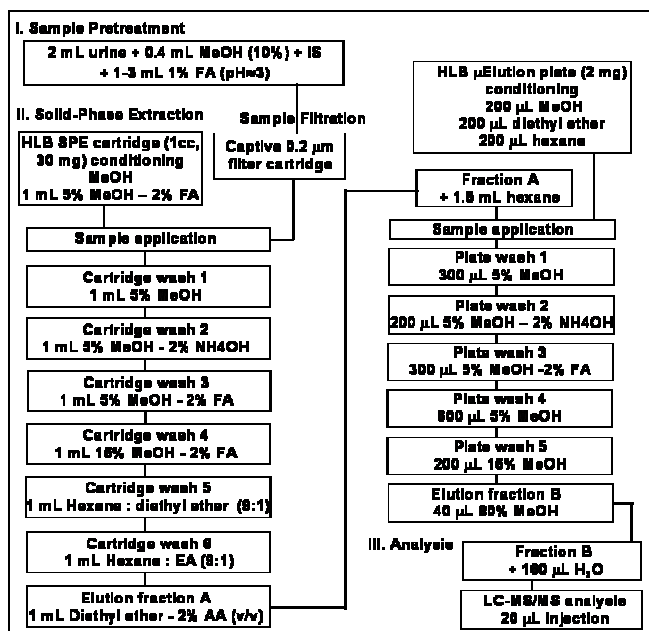


図 4. MD-SPE protocol for sample preparation

以上により開発した新規高感度・高特異度尿中 $\text{F}_2\text{-}$ イソプロスタン分析法：多次元固相抽出(MD-SPE)・バッファーフリーLC-MS/MS分析法は、夾雑物を最大限に取り除くことと、サンプルマトリックスによるイオン抑制を最小限に抑制することにより、高感度分析を実現した。バッファー添加物を使用せず、中性条件で分析することと、C8 HPLC カラム選択することによって高特異度分析を実現した。

(4) キャピラリー等速電気泳動 (cITP) 法

により分析される陰性荷電 LDL 亜分画 (fast-migrating LDL, fLDL) と炎症マーカー、動脈硬化性リポ蛋白との関連 (SPECIAL Study)

図 5 に健常者と高コレステロール血症患者の cITP 法により分析された血漿リポ蛋白のプロフィールを示す。健常者に比して、高コレステロール患者では、陰性荷電変性 LDL 亜分画 (fLDL) と正常電気泳動移動度を有する LDL 亜分画 (slow-migrating LDL, sLDL) が両方増加していた。

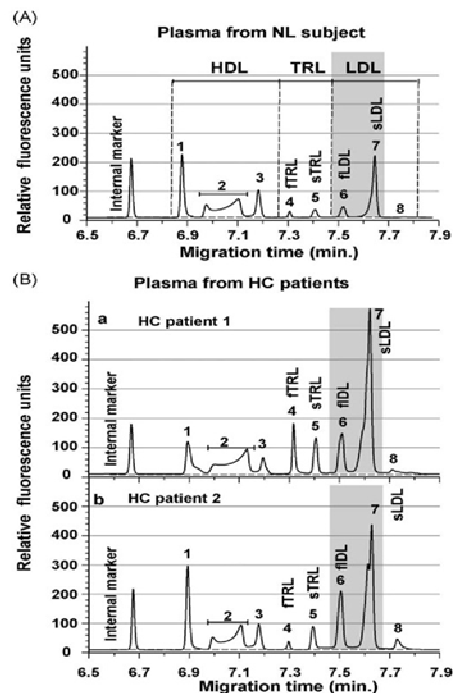


図 5. Plasma lipoprotein subfractions as characterized by capillary isotachopheresis in a normolipidemic (NL) subject (A) and two hypercholesterolemic (HC) patients (B). Peaks 1-3, fast-, intermediate-, and slow-migrating HDL (fHDL, iHDL, and sHDL) subfractions; peaks 4 and 5, fast- and slow-migrating TRL (fTRL and sTRL) subfractions; peaks 6 and 7, fast- and slow-migrating LDL (fLDL and sLDL) subfractions; peak 8, a minor LDL subfraction

表 1 に冠動脈疾患 (CHD) 危険因子を有する高コレステロール患者において cITP LDL 亜分画 (fLDL, sLDL) と動脈硬化性リポ蛋白、炎症マーカーとの相関を示す。Simvastatin, Pravastatin 投与前後に、fLDL は中性脂肪 (TG) 値、RLP-C 濃度、高感度 CRP (hsCRP) と有意に相関したが、sLDL は LDL-C 値と相関した。陰性荷電変性 LDL は動脈硬化性リポ蛋白と炎症マーカーと相関したことは、陰性荷電

変性 LDL は動脈硬化の新規マーカーになり得ることを示唆するものでした。

表 1. Spearman correlation between cITP LDL subfractions, plasma lipid parameters, and inflammatory markers

	cITP fLDL			cITP sLDL		
	0 Mo.	3 Mo.	6 Mo.	0 Mo.	3 Mo.	6 Mo.
HDL-C	-0.31 *	-0.34 *	-0.42 *	-0.04	-0.05	-0.17
TG	0.59 *	0.67 *	0.72 *	-0.15	0.18	0.00
LDL-C	0.17	0.37 *	0.22	0.39 *	0.43 *	0.36 *
hsCRP	0.36 *	0.36 *	0.40 *	-0.06	0.29	0.13
LDL-PAF-AH	0.37 *	0.39 *	0.25	-0.01	0.32	0.25 *
RLP-C	0.44 *	0.49 *	0.30 *	-0.03	0.31	-0.20 *
sdLDL	0.50 *	0.56 *	0.57 *	0.13	0.29	-0.09

(5) 高コレステロール血症患者における LDL 亜分画の分布とスタチンの vLDL 亜分画に対する効果 (ROSARY STUDY)

図 6 に示すように、同じ LDL-C 値を有する HC 患者と HC-HTG 患者では、LDL の亜分画の分布

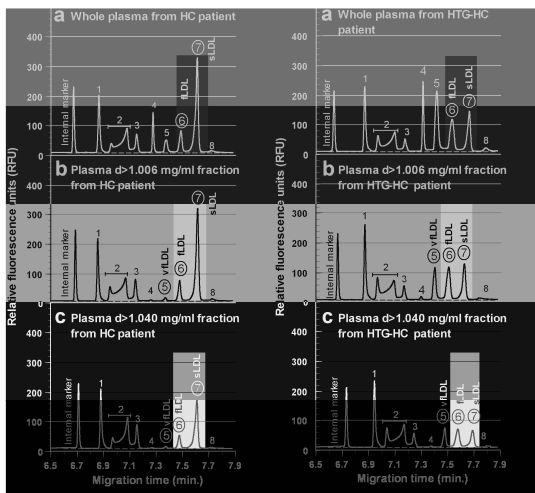


図 6. Typical plasma lipoprotein subfractions as characterized by cITP in a patient with hypercholesterolemia (HC) (TG, HDL-C, and LDL-C: 139, 51, and 146 mg/dl, respectively) and a patient with both hypertriglyceridemia (HTG) and HC (TG, HDL-C, and LDL-C: 355, 54, and 147 mg/dl, respectively) in whole plasma (a) and plasma d>1.006 g/ml (b) and d>1.040 g/ml (c) fractions. Peaks 1-3, fast-, intermediate-, and slow-migrating HDL (fHDL, iHDL, and sHDL) subfractions; peaks 4 and 5, fast- and slow-migrating TRL (fTRL and sTRL) subfractions; peak 5 in b and c, very-fast-migrating LDL (vLDL); peaks 6 and 7, fLDL and sLDL subfractions.

が異なっていた。図 6 の右のパネルに示す HC-HTG 患者では、TRL の電気泳動移動度の遅い亜分画 (sTRL) と同じ電気泳動移動度を有し、fLDL より電気泳動移動度の早い LDL 亜分画 vLDL が明らかに増加していた。また、vLDL 亜分画は、小型 LDL 分画においても増加していた。ヒト血漿では、vLDL と sTRL が同じ電気泳動移動度を有するために、vLDL の分析は超遠心法により分離される TRL 除去後血漿で行う必要があった。

Mildly に酸化した LDL では、fLDL だけ増加するが、moderately に酸化した LDL では、vLDL も増加することから、以上の結果は、中程度に変性した LDL はヒト血漿に存在することを示す。

表 2 に示すように vLDL 亜分画は fLDL (陰性荷電 LDL) と sLDL (正常荷電 LDL) とともに、Rosuvastatin の投与 (2.5 mg/day, 3 ヶ月間) により有意に低下した。また、小型 LDL 分画に存在する sd-vLDL も Rosuvastatin の投与により有意に低下した。

表 2. Changes in cITP LDL subfractions measured in whole plasma and plasma d>1.006 g/ml fractions and cITP sdLDL subfractions measured in d>1.040 g/ml fraction

	Period of treatment	Overall	
		Mean ± SE	Median % Δ
Whole plasma			
cITP sTRL/sLDL	Baseline	0.52 ± 0.04	
	3 Mo.	0.44 ± 0.03	-11 % *
cITP fLDL	Baseline	0.80 ± 0.04	
	3 Mo.	0.67 ± 0.03	-17 % *
cITP sLDL	Baseline	1.85 ± 0.06	
	3 Mo.	1.53 ± 0.05	-16 % *
Plasma d>1.006 g/ml fraction			
cITP vLDL	Baseline	0.25 ± 0.02	
	3 Mo.	0.18 ± 0.01	-18 % *
cITP fLDL	Baseline	0.72 ± 0.03	
	3 Mo.	0.56 ± 0.03	-22 % *
cITP sLDL	Baseline	1.87 ± 0.06	
	3 Mo.	1.53 ± 0.05	-17 % *
Plasma d>1.040 g/ml fraction			
cITP sd-vLDL	Baseline	0.17 ± 0.02	
	3 Mo.	0.12 ± 0.01	-24 % *
cITP sd-fLDL	Baseline	0.47 ± 0.03	
	3 Mo.	0.36 ± 0.02	-20 % *
cITP sd-sLDL	Baseline	1.13 ± 0.04	
	3 Mo.	0.90 ± 0.04	-20 % *

vLDL 亜分画及び sd-vLDL 亜分画は、それぞれ fLDL と sd-fLDL と強く相関したが、sLDL 及び sd-sLDL と相関しなかった。また、LDL 及び sdLDL 分画中に存在する vLDL は、fLDL と同様に中性脂肪、アポリポ蛋白 CII, E, RLP-C と有意に相関したが、sLDL と相関しな

かった。以上の結果から、vLDLとfLDLはsLDLと組成の異なるLDL亜分画であることが示唆された。

マクロファージが陰性荷電LDLを好んで貪食することからも、ヒト血漿中に存在する陰性荷電LDLは、虚血心疾患の有用なマーカーになり得ることが考えられる。さらなる臨床試験によってこの課題を明らかにする必要がある。

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 3 件)

① Zhang B., Matsunaga A., Rainwater D.L., Miura S, Noda K., Nishikawa H., Uehara, Y., Shirai K., Saku K. Effects of ROSuvastatin on electronegative LDL as characterized by Capillary isotachopheresis: The ROSARY study. Journal of Lipid Research. 2009. (in press). 査読あり

② Zhang B., Miura S., Yanagi D, Noda K., Nishikawa H., Matsunaga A., Shirai K., Iwata A., Yoshinaga K., Adachi H., Imaizumi T., Saku K. Reduction of charge-modified LDL by statin therapy in patients with CHD or CHD risk factors and elevated LDL-C levels: The SPECIAL Study. Atherosclerosis. 201. 2008. 353-9. 査読あり

③ Zhang B. and Saku K. Control of matrix effects in the analysis of urinary F2-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. Journal of Lipid Research. 48. 2007. 733-44. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

① Zhang B., Matsunaga A., Miura S, Noda K., Nishikawa H., Uehara, Y., Shirai K., Saku K. HDL-Raising Efficacy and the Effects of ROSuvastatin on Small, Dense Electronegative LDL as Characterized by Capillary Isotachopheresis: The ROSARY Study. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009年3月22日. 大阪

② Zhang B., Miura S., Noda K., Nishikawa H., Matsunaga A., Shirai K., Iwata A.,

Yoshinaga K., Saku K. Fast-migrating low-density lipoprotein as analyzed by capillary isotachopheresis is related to inflammatory markers and reduced by pravastatin and simvastatin: the SPECIAL study. 57th Annual Scientific Meeting of American College of Cardiology (ACC 2008). 2008年3月31日. シカゴ、米国

③ Zhang B. and Saku K. Novel Technology for Comprehensive Analyses of Oxidative Stress Biomarkers. The 5th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST). 2007.05.16, Shanghai, P.R. China

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: F2-イソプロスタノ異性体測定方法
発明者: 張 波 (瀬川 波子)、朔 啓二郎
権利者: 張 波 (瀬川 波子)、朔 啓二郎
種類: 特許
番号: PCT/JP2007/072146
出願年月日: 2007.8.11
国内・外国の別: 国際出願

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者

瀬川 波子 (SEGAWA NAMIKO, ZHANG BO)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号: 80352251

(2) 研究分担者

朔 啓二郎 (SAKU KEIJIRO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 40183371

吉永 一彦 (YOSHINAGA KAZUHIKO)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号: 80122761

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号: 20412603

(3) 連携研究者