

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05531

研究課題名(和文) 副腎皮質ホルモン由来の生活習慣病の早期診断法の開発と疾患原理の追及

研究課題名(英文) Development of basic analytical technology for diagnosing lifestyle-related diseases derived from adrenocortical hormones

研究代表者

大坂 一生 (Osaka, Issey)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：90550244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドホルモンの分泌と受容体の発現は、生活習慣病、心血管疾患の発症に密接な関係がある。ステロイドホルモンの過剰産生によって呈する疾患は多く確認されているが、過剰産生が示されない場合にも代謝疾患の合併がみられることがある。この原因は代謝産物や未知のステロイドの生成であると推測されているが、詳細は不明である。このことを詳細に検証するために、MF-SALDI/MSによる微量ステロイドの高感度検出と動物組織切片上におけるそれら化合物の局在解析法を確立した。また、LC/IM/MSを応用して代謝物の網羅解析とステロイドホルモン定量分析を同時に行う技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ステロイドと疾患の関係を解明するための基盤技術を確立した。MF-SALDI/MSイメージング手法は、動物組織切片上のステロイド以外の様々な代謝物も検出して局在解析することも可能なため、様々な疾患の原理の解明に有効であると考えられる。上記のデータをより詳細に解析するために、ノンターゲット分析とターゲット定量分析を同時に行うことができるLC/IM/MS法も確立した。本手法は一度の分析で20種以上のステロイドの定量分析と同時に、脂質などの他の化合物を一斉検出できた。本手法は生体内の代謝物を網羅的に解析するために有効な分析手法となる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the relationship between steroids and diseases, a comprehensive and a quantitative analytical method for steroids on tissue sections are necessary. Steroids could be detected sensitively by MALDI/MS upon treatment with Girard's reagents. We detect the steroids using SALDI mass spectrometry with metal film. Various steroids on tissue section of animal adrenal glands could be detected directly by the SALDI/MS. The SALDI/MS is not suitable for quantitative analysis. In the quantitative analysis of steroids for the assessment, Target and non-target analysis for quantitative and comprehensive analysis, respectively, for serum sample have been achieved using LC/IM/MS. Using both LC/IM/MS and MF-SALDI/MSI enables quantitative analysis of steroids, localization analysis, and comprehensive analysis of various metabolites.

研究分野：質量分析学

キーワード：レーザー脱離イオン化 質量分析 イメージング イオンモビリティ ステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは、生体内の恒常性を制御するために副腎、精巣、卵巣から分泌されており、その分泌と受容体の発現は、生活習慣病、心血管疾患の発症に密接な関係がある。クッシング症候群 (CS) や原発性アルドステロン症 (PA) などは、ステロイドホルモンの過剰産生によって呈する疾患である。臨床的にステロイドホルモンの過剰産生が示されない副腎腺腫の非機能性副腎腺腫 (NFA) は、経過観察のみで対処されることがあるが、動脈硬化を進展させるメタボリックシンドローム、高血圧、糖代謝異常などの代謝疾患の合併が多いことが確認されている。この原因は代謝産物や未知のステロイドの生成であると推測されているが、詳細は不明である。このことを詳細に検証するためには、微量ステロイドの高感度検出と動物組織切片上におけるそれら化合物の局在解析を行う技術が必要である。

2. 研究の目的

本研究では微量ステロイドの高感度検出とそれら化合物の局在解析を行うための分析手法を確立し、動物組織切片上における様々なステロイド化合物を簡便に網羅的に検出し、その局在を確認する。従来、生体分子の分析とその局在解析を同時に行うための手法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法 (MALDI/MSI) が用いられてきたが、この手法ではステロイドの検出感度は低いため、ジラール試薬などを用いてステロイドのカルボニル基を誘導体化してから分析する必要があった。誘導体化することでステロイドを高感度に検出することができたが、試料切片やその部位によってはイオンサプレッション効果が大きく、高感度な検出が困難な場合もあった。本研究では、誘導体化を行わずに同様のことが可能な金属薄膜表面支援レーザー脱離イオン化法 (MF-SALDI) を確立し、質量分析イメージングを行う。従来の表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (SALDI/MS) は、ナノ粒子やカーボン材料表面を利用して行われていたが、本研究では金属薄膜を用いる。ステロイドホルモンを網羅的に分析するために金属薄膜を最適化する。また、そのデータを裏付けるデータを得る手法として、ステロイドを含む代謝物をノンターゲットで分析し、同時に既知のステロイドホルモンを高感度に定量分析する手法を確立する。

3. 研究の方法

本手法で用いるイオン化支援剤の金属薄膜は、迅速かつ簡便に調製することができ、また金属種 (Pt、Zr、Ag 等) を変更することで、様々なイオン化特性・効率が得られる。金属薄膜の調製は、スパッタリング法や自作ミスト化学気相成長法の技術を応用することで検証を進め、ステロイドの高感度検出に適した合金薄膜を作成し、ステロイドの高感度網羅局在解析法を確立する。

4. 研究成果

SALDI/MS の検出感度を検討して比較するために、はじめに、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC/MS/MS)による 9 種類のステロイドの定量分析を行った。その定量分析の分析条件を最適化した結果、それぞれ 10 ~ 500 pg/mL の試料を検出できた。次に、一般的なマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI/MS)でステロイドを分析したところ、検出することができないことを確認した。独自に開発した金属薄膜表面支援レーザー脱離イオン化(MF-SALDI)質量分析法で金属薄膜として Pt 薄膜を用いたところ、テストステロンやプレグネノロンなどのステロイドを誘導体化することなく、直接検出することができた。この MF-SALDI で MALDI マトリックスも同時に用いることで、脱離効率を向上させることができ、5 α -dihydro-11-keto Testosterone も検出することができた。その手法を最適化するために、マトリックスの塗布と金属薄膜のスパッタリングを行う順序、またその種類を検討した結果、ステロイドは金属薄膜を調製した後で MALDI マトリックスを塗布する方が検出感度が高いことがわかった。この理由は、成分をイオン化するために作用する金属薄膜を先に塗布することで、ステロイドと金属薄膜との間で効率的なエネルギー伝達を行うことでイオン化を促進し、MALDI のマトリックスによってその脱離を促進するためであると考えられる。本手法によって動物組織切片の Testosterone、5 α -Dihydro-11-keto Testosterone、Dehydroepiandrosterone、19-Hydroxy-4-androstene-3, 17-dione、4-Pregnen-3-20-dione、18-Hydroxycorticosterone、17 α -Hydroxyprogesterone を検出することに成功した。

質量分析イメージングでは詳細な定量分析を行うことは困難である。イメージングのデータを詳細に解析するためには、信頼性の高い定量分析法も必要である。本研究では、イオンモビリティを結合した液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/IM/MS)によるステロイドの分析法を確立した。通常、定量分析は三連四重極型質量分析計を用いた Multiple Reaction Monitoring(MRM)法を用いて行われている。この手法は MS/MS 法を応用した手法であるため、既知の化合物をターゲットとして分析する。しかし、代謝物の網羅解析などでは未知の化合物の検出も求められるため、将来的にはノンターゲットの分析手法も必要であると考えている。そこで、MS/MS を用いずに既知化合物を高い選択性で定量分析し、同時にノンターゲット分析が可能な LC イオンモビリティ質量分析法によって、ステロイドを含む代謝物の網羅解析を行う手法を確立した。本手法では LC で得られるリテンションタイム、イオンモビリティで得られるドリフトタイム、質量分析で得られる m/z 値とそのイオン強度によってイオンを解析する。MRM ではフラグメンテーションを利用したが、本手法ではその代わりにドリフトタイムを用いて化合物の選択性を向上させる。ドリフトタイムは気相中でイオンと不活性ガスの衝突による、サイズに依存した分離に関係する値である。実際に、定量分析を行ったところ、20 種以上のステロイドホルモンを検出し、定量分析することができ、さらにその定量限界は 10 pg/mL 程度であることが示された。また、血清のノンターゲットの分析により、ステロイドだけではなく、脂質も同時に検出され、そのドリフトタイムから脂質のサイ

ズ、また m/z 値からその質量情報が得られ、LC のリテンションタイムも確認することで、アルキル鎖の長さの異なる脂質のシリーズについても追跡することができた。本手法がステロイドの分析に有効であることを確認するために、健常者と原発性アルドステロン症、本態性高血圧症の患者の血清を分析し、そのデータを主成分解析した。その結果、それぞれグループに分類され、原発性アルドステロン症患者の血清にはアルドステロンが多く含まれており、さらにその代謝に関係するステロイドホルモンの量も多いことが示された。以上より、本手法はステロイドホルモンの定量分析のために十分な検出感度と信頼性があることがわかった。

本研究で確立した MF-SALDI/MS イメージング法と LC/IM/MS を合わせて用いることは、ステロイドの定量分析と、局在解析、また他の代謝物の網羅解析に有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shigehiro Karashima, Issey Osaka	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Rapidity and Precision of Steroid Hormone Measurement	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大坂一生	4. 巻 67
2. 論文標題 表面支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 大坂一生	4. 巻 95
2. 論文標題 レーザー照射によるイオン化の原理	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Plasma Fusion Res	6. 最初と最後の頁 258-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Mai Yamakawa, Shigehiro Karashima, Riko Takata, Taichi Haba, Keigo Kuroiwa, Hideaki Toyama, Atsushi Hashimoto, Daisuke Aono, Mitsuhiro Kometani, Hidetaka Nambo, Takashi Yoneda, Issey Osaka	4. 巻 23(22)
2. 論文標題 Comprehensive steroid assay with non-targeted analysis using liquid chromatography ion mobility mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular. Science	6. 最初と最後の頁 13858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kazuyoshi Nozaki, Yuji Nakabayashi, Tatsuya Murakami, Akio Miyazato, Issey Osaka	4. 巻 54
2. 論文標題 Novel approach to enhance sensitivity in surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging using deposited organic inorganic hybrid matrices	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mass Spectrom.	6. 最初と最後の頁 612-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山川舞・唐島成宙・大坂一生
2. 発表標題 ステロイドのノンターゲットイオンモビリティー 質量分析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島崎泰地・山川舞・唐島成宙・大坂一生
2. 発表標題 金属薄膜表面支援レーザー脱離イオン化 質量分析法によるステロイドの分析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川舞・唐島成宙・大坂一生
2. 発表標題 イオンモビリティ-質量分析による低分子量 生体分子の一斉分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 化学蒸着法による表面支援レーザー脱離イオン化のための金属薄膜の調製
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 Zr薄膜表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法による薬物の高感度検出のための前処理法の評価
3. 学会等名 日本分析化学会第68回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎海斗・唐島成宙・大坂一生
2. 発表標題 イオンモビリティ-LC/MSを用いた血漿中のアミノ酸とその他の代謝物の同時分析
3. 学会等名 日本質量分析学会 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山川舞・唐島成宙・大坂一生
2. 発表標題 イオンモビリティを用いたLC/MSによる血清中のステロイドホルモンの定量分析の可能性
3. 学会等名 日本質量分析学会 第70回質量分析総合討論会、2P-18
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Yamakawa, R Takata, S Karashima, I. Osaka
2. 発表標題 Novel approach to quantitative analysis of steroids using liquid chromatography mass spectrometry coupled with ion mobility spectrometry
3. 学会等名 Active Enzyme Molecule 2022, BRC-06 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村 洋企画・監修	4. 発行年 2020年
2. 出版社 オーム社	5. 総ページ数 280
3. 書名 LC/MS、LC/MS/MSにおけるスペクトル解析	

〔産業財産権〕

〔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
研究 分 担 者	唐島 成宙 (Karashima Shigehiro) (30801584)	金沢大学・国際基幹教育院 GS教育系・准教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------