

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16513

研究課題名（和文）質量分析によるビタミンD関連マーカーの高精度分析およびGC遺伝子多型との関連解析

研究課題名（英文）Accurate determination of vitamin D related markers by LC/MS/MS and its relationship to GC genotypes

研究代表者

石毛 崇之（Ishige, Takayuki）

千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：30757315

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）：ビタミンDは骨代謝や免疫調節に関連した様々な作用を持つ。ビタミンD代謝の理解の為に、その代謝物の精確な定量方法が必要である。血液中では、ビタミンDおよびその代謝物はGC遺伝子によってコードされるビタミンD結合蛋白質に結合している。本研究では、LC/MS/MSを用いたビタミンD代謝物の精確な定量を行うと共に、PCR-融解曲線分析によりGC遺伝子型を決定した。それらの結果を併せ、ビタミンD代謝物およびGC遺伝子型との関係を解析した。その結果、血清ビタミンD代謝物濃度はGC遺伝子型によって影響を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健常者におけるビタミンD代謝物の血清濃度とGC遺伝子多型の詳細な関連が明らかになり、各種疾患とビタミンDの関連を理解するのに有用になることと思われる。臨床検査の視点からは、LC/MS/MSの利用により、これまでの免疫学的測定法では不可能であった多項目同時分析が可能である事や、得られた知見を他の臨床検査項目へ応用できる可能性がある。分析感度の向上により検体量を減らすことができ、ビタミンD動態の把握が重要であるにも関わらず、検体量不足により分析が困難であった乳幼児のステータスでも評価できるようになると思われる。

研究成果の概要（英文）：Vitamin D has various roles related to bone metabolism and immune regulation. To elucidation of vitamin D metabolism, the accurate quantification method of its metabolites is required. In the circulating blood, vitamin D and its metabolites bind to vitamin D-binding protein (DBP), encoded by GC gene. In this study, we quantified vitamin D metabolites by LC/MS/MS and determined GC genotypes by PCR-melting analysis. The relationship between vitamin D metabolites and GC genotypes was analyzed. As a result, serum vitamin D metabolite levels were affected by GC genotypes.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：質量分析 ビタミンD GC遺伝子 多型解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D はホルモンとして多様な作用を持ち、その不足は乳幼児の骨疾患だけでなく、成人の免疫性疾患、悪性腫瘍 などのリスクとも関連することが注目されている。ビタミン D 代謝物は分子構造によってその生物学的活性が大きく異なるため、ビタミン D 代謝動態を把握する上で、それぞれの代謝物の精確な定量は必須である。従来の抗体のみを用いた免疫学的測定法では、微細な分子構造の差異を弁別することは難しい。一方、分子量の微細な違いを測り分けることは質量分析技術の最も得意とするところであり、ビタミン D 代謝物のような低分子化合物の分析には特に有用である。さらに近年、血清 25(OH)D 濃度 に人種差が存在することが報告されており、この理由の一つとして、ビタミン D 代謝物のキャリア蛋白質であるビタミン D 結合蛋白質 (GC 遺伝子によってコードされている) の遺伝子多型の関与が考えられており、人種差の影響が少なくビタミン D の充足状態を反映する新たなマーカーとして、Free 25(OH)D [f25(OH)D、DBP およびアルブミンに結合していない遊離の分画] が提案されている。

2. 研究の目的

本研究では、ビタミン D 代謝物の精密定量とビタミン D 関連マーカーの算出、GC 遺伝子多型の解析を行う。健康者血清の 25(OH)D、24,25(OH)2D、1,25(OH)2D、DBP、f25(OH)D、ビタミン D 代謝物比 (VMR) を分析し、各項目間の関連や GC 遺伝子多型との関係を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS によるビタミン D 代謝物の精密定量

試料前処理法として、血清 25(OH)D₃、-D₂、3-epi-25(OH)D₃、24,25(OH)2D₃ の分析には supported liquid extraction (SLE) を、血清 1,25(OH)2D₃、-D₂ の分析には immunoextraction を用いた。LC/MS/MS におけるイオン化効率の上昇に、4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を使用して誘導体化を行った。HPLC の移動相にはアセトニトリル/0.1% 蟻酸と水/0.1% 蟻酸を使用し、HPLC カラムには C18 coreshell column を用いた。MS/MS のイオン化法には ESI positive ion モード、定量分析には 選択反応モニタリング (SRM) モードを使用した。

(2) ビタミン D 結合蛋白質の定量

LC/MS/MS によるビタミン D 結合蛋白質定量法では、血清 1 μ L を ABC 緩衝液で 20 倍希釈し、加熱後にトリプシン消化を行った。その上清を LC/MS/MS により分析した。使用したトランジションを表 1 に示す。また、LC/MS/MS とは別に ELISA も使用した。

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)
DBP-Common_VLEPTLK	400.2	587.3	14
DBP-GC1f_LP DATPTELAK	578.3	830.5	22
DBP-GC1s_LPEATPTELAK	585.3	830.5	22
DBP-GC2_LP DATPK	371.2	628.3	14
ALB_AEFAEVSK	440.7	680.4	16

表 1. 質量分析による DBP 定量のトランジション

(3) ビタミン D 関連マーカーの算出

f25(OH)D は Vermeulen の式より算出した。解離定数にはアルブミン が $6.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、DBP が $7.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ を使用した。ビタミン D 代謝物比 (VMR) は、1,25(OH)2D/25(OH)D (VMR-A) および 24,25(OH)2D/25(OH)D (VMR-C) を算出した。

(4) GC 遺伝子多型の解析

GC 遺伝子には近接した 2 つの一塩基多型 (rs7041 および rs4588) の組み合わせにより 3 つの遺伝子型 (GC1F, GC1S, GC2) が存在する。それらについて LNA プローブを用いた、PCR-融解曲線分析により解析した。

(5) ビタミン D 関連マーカーと GC 遺伝子多型、PTH との関連解析

得られたデータを比較し統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) ビタミン D 代謝物と GC 遺伝子多型の関連

健常者 232 例のビタミン D 代謝物の値と GC 遺伝子多型の関連を調べた。GC 遺伝子多型は GC1/1 群(GC1F/1F, GC1F/1S, GC1S/1S)、GC1/2 群(GC1F/2, GC1S/2)、GC2/2 群(GC2/2)の 3 つに分けて解析した。その結果、血清 25(OH)D3 および 1,25(OH)2D3 は GC 遺伝子多型群毎に有意な差を認めた(表 2)。一方、24,25(OH)2D は有意な差はみられなかった。すなわち、血清 25(OH)D3 および 1,25(OH)2D3 は GC 遺伝子多型による影響を受けることが示唆された。

Marker	Statistics	GC1/1	GC1/2	GC2/2	p-value
25(OH)D (ng/mL)	Median	15.7	13.9	12.3	0.00162
	IQR	12.8-20.5	10.8-18.2	9.3-14.6	
1,25(OH)2D (pg/mL)	Median	35.6	36	30.5	0.00953
	IQR	30.3-42.9	28.5-40.6	26.4-34.3	
24,25(OH)2D3 (ng/mL)	Median	1.1	1.1	0.95	0.452
	IQR	0.79-1.7	0.65-1.5	0.74-1.3	

表 2. ビタミン D 代謝物と GC 遺伝子多型の関連。p-value は Kruskal-Wallis test により算出。IQR, interquartile range

(2) ビタミン D 結合蛋白質の定量

健常者 232 例のビタミン D 結合蛋白質の定量にはモノクローナル抗体を用いた ELISA (mELISA)、ポリクローナル抗体を用いた ELISA (pELISA)、および LC/MS/MS を使用した。LC/MS/MS での分析は内部標準として用いる安定同位体標識蛋白質を入手することが困難であったため、ビタミン D 結合蛋白質の定量には pELISA の値を使用した。mELISA では GC 遺伝子型毎に血清濃度が大きく異なることが確認された(図 1)。

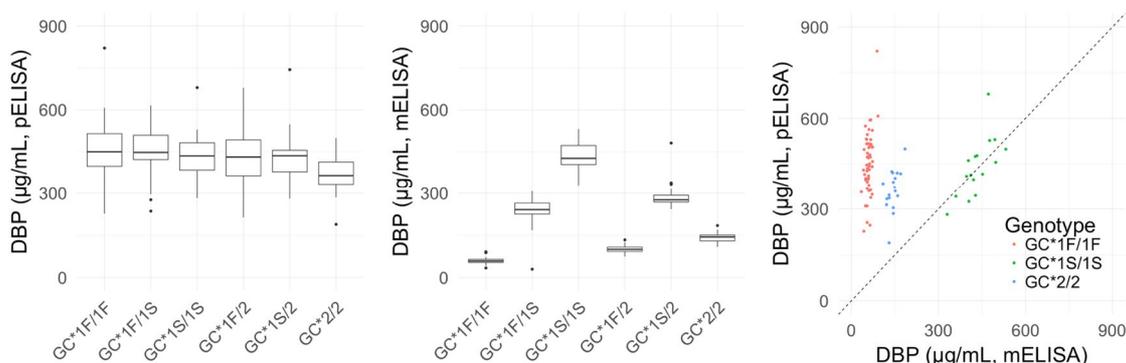


図 1. ビタミン D 結合蛋白質の定量値の比較

(3) f25(OH)D、VMR と GC 遺伝子多型の関連

ビタミン D 代謝物とビタミン D 結合蛋白質の結果より、f25(OH)D、VMR-A/C を算出し、その結果を GC 遺伝子多型毎に比較した。f25(OH)D、VMR-A/C のいずれもが有意な差を認めず、GC 遺伝子多型による影響を受けないことが示唆された(表 3)。

Marker	Statistics	GC1/1	GC1/2	GC2/2	p-value
f25(OH)D (pg/mL)	Median	2.8	2.5	2.4	0.0752
	IQR	2.3-3.7	2.0-3.2	1.9-3.0	
VMR-A (%)	Median	0.23	0.24	0.24	0.122
	IQR	0.17-0.30	0.20-0.34	0.19-0.32	
VMR-C (%)	Median	7.3	8.0	8.4	0.0727
	IQR	6.0-8.5	6.0-9.1	7.1-9.6	

表 3. f25(OH)D、VMR と GC 遺伝子多型の関連。p-value は Kruskal-Wallis test により算出。IQR, interquartile range

今後、これらの内容を論文化していくことを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kobayashi Sohei, Hiwasa Takaki, Ishige Takayuki, Kano Masayuki, Hoshino Tyuji, Rahmutulla Bahityar, Seimiya Masanori, Shimada Hideaki, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Anti FIR exon2 autoantibody as a novel indicator for better overall survival in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 847 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14767	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 Sogawa Kazuyuki, Takano Shigetsugu, Ishige Takayuki, Yoshitomi Hideyuki, Kagawa Shingo, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Nomura Fumio, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Usefulness of the MALDI-TOF MS technology with membrane filter protocol for the rapid identification of microorganisms in perioperative drainage fluids of hepatobiliary pancreatic surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246002	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 Suda Ryuichiro, Sakai Nozomu, Matsushita Kazuyuki, Ishige Takayuki, Kawasaki Yohei, Shiko Yuki, Furukawa Katsunori, Mishima Takashi, Nakadai Eri, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Prediction of mismatch repair deficient biliary tract cancer: Role of morphological features and host immune response detected by routine hematoxylin eosin staining	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 680 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.988	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 Maekawa Masato, Taniguchi Terumi, Nishio Kazuto, Sakai Kazuko, Matsushita Kazuyuki, Nakatani Kaname, Ishige Takayuki, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Precision cancer genome testing needs proficiency testing involving all stakeholders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05589-x	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 FUJIMURA Shunsuke, ITO Takenori, OGAWA Shoujiro, ISHIGE Takayuki, NISHIMOTO-KUSUNOSE Shoichi, HIGASHI Tatsuya	4. 巻 38
2. 論文標題 An LC/MS/MS Method for Quantifying Testosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Four Different Serum Samples during a Single Run	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21P268	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 Matsubara Mirai, Imaizumi Yuri, Fujikawa Tatsuki, Ishige Takayuki, Nishimura Motoi, Miyabe Akiko, Murata Shota, Kawasaki Kenji, Taniguchi Toshibumi, Igari Hidetoshi, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 530
2. 論文標題 Tracking SARS-CoV-2 variants by entire S-gene analysis using long-range RT-PCR and Sanger sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 94 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2022.03.014	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 Ishige Takayuki, Murata Shota, Taniguchi Toshibumi, Miyabe Akiko, Kitamura Kouichi, Kawasaki Kenji, Nishimura Motoi, Igari Hidetoshi, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 507
2. 論文標題 Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 139 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.04.023	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 Kakinuma Shoko, Beppu Minako, Sawai Setsu, Nakayama Akitoshi, Hirano Shigeki, Yamanaka Yoshitaka, Yamamoto Tatsuya, Masafumi Chigusa, Aisihær Xiamuxiya, Aersilan Alimasi, Gao Yue, Sato Kenichi, Sakae Itoga, Ishige Takayuki, et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Monoamine oxidase B rs1799836 G allele polymorphism is a risk factor for early development of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 100239 ~ 100239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enisci.2020.100239	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 Aso Saki, Ogawa Shoujiro, Nishimoto Kusunose Shoichi, Satoh Mamoru, Ishige Takayuki, Nomura Fumio, Higashi Tatsuya	4. 巻 35
2. 論文標題 Derivatization based quadruplex LC/ESI-MS/MS method for high throughput quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Chromatography	6. 最初と最後の頁 e5027:1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.5027	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 Kobayashi Sohei, Hiwasa Takaki, Ishige Takayuki, Kano Masayuki, Hoshino Tyuji, Rahmutulla Bahityar, Seimiya Masanori, Shimada Hideaki, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Anti FIR exon2 autoantibody as a novel indicator for better overall survival in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 847 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14767	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 Sogawa Kazuyuki, Takano Shigetugu, Ishige Takayuki, Yoshitomi Hideyuki, Kagawa Shingo, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Nomura Fumio, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Usefulness of the MALDI-TOF MS technology with membrane filter protocol for the rapid identification of microorganisms in perioperative drainage fluids of hepatobiliary pancreatic surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246002:1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246002	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石毛崇之、西村基、佐藤守、川崎健治、野村文夫、松下一之
2. 発表標題 LNA導入ハイブリダイゼーションプローブを用いた融解曲線分析によるGC遺伝子型決定
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石毛崇之、村田正太、松下一之
2. 発表標題 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2) RNA検査の実際
3. 学会等名 日本医療検査科学会第52回大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石毛崇之、川崎健治、宇津野恵美、澤井瑛、西村基、野村文夫、松下一之
2. 発表標題 良性家族性高アルカリフォスファターゼ血症の遺伝学的検査
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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

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