

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06512

研究課題名（和文）ダブルスタンダードリピドーム解析法による網羅的脂質定量法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Comprehensive Lipid Quantification Method Using Double Standard Lipidome Analysis

研究代表者

中尾 素直（Nakao, Motonao）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主任技術員

研究者番号：60457306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）は脂肪肝に炎症を伴うとともに病態進行により不可逆的な線維化が惹起される。さらに肝臓の線維化は肝硬変・肝癌へ進展するため、早期の段階で脂肪肝とNASHの違いを明確に判別する診断技術の開発が望まれている。メタボローム解析は、体外診断で疾患を同定できる簡便かつ有用な技術であるが、質量分析装置には絶対定量を行う事はできない。位置異性体の多い脂質を臨床診断に資する定量値を算出するための手法を開発してここに報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボローム解析は体外診断で疾患を同定できる有用な技術ですが、測定に使用する質量分析装置は絶対定量ができない。特に位置異性体が多い脂質は、その標準品を用意することすら難しいため、相対定量も困難な状況である。そこで、標準品の存在しない脂質の定量方法を開発すると同時に、未だに体外診断のできないNASHの診断方法に寄与できるのではないかと考えた。メタボローム定量は、今後すべての診断や創薬においてエビデンスを提供する重要な技術に発展します。

研究成果の概要（英文）：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is characterized by inflammation associated with fatty liver and progresses to irreversible fibrosis as the disease advances. Furthermore, liver fibrosis can progress to cirrhosis and liver cancer, making it essential to develop diagnostic techniques that can clearly distinguish between fatty liver and NASH at an early stage. Metabolome analysis is a simple and useful technique for identifying diseases through in vitro diagnostics; however, mass spectrometry (MS) cannot perform absolute quantification. We report here the development of a method for calculating quantitative values for lipids, which often have many positional isomers, to aid in clinical diagnosis.

研究分野：情報科学

キーワード：lipidomics

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

質量分析装置は化合物の分析において、最も高感度な分析方法と言える。しかしながら、一般的に測定対象物質をイオン化する必要があるため、絶対定量ができない。臨床診断等に質量分析装置 (MS) 導入するためには定量値を付与する必要がある。定量値を付与するため、具体的には測定対象の化合物の標準品が必要であるが、脂質の場合は、そのすべての標準品を用意することが不可能である。脂質の定量を困難にしている要因にその化合物の種類が多さが挙げられるが、下記図 1 に示すようにグリセロール骨格に脂肪酸側鎖が 2 本~4 本結合しているため、位置異性体の数が脂肪酸側鎖の種類に対して指数的に増加する。

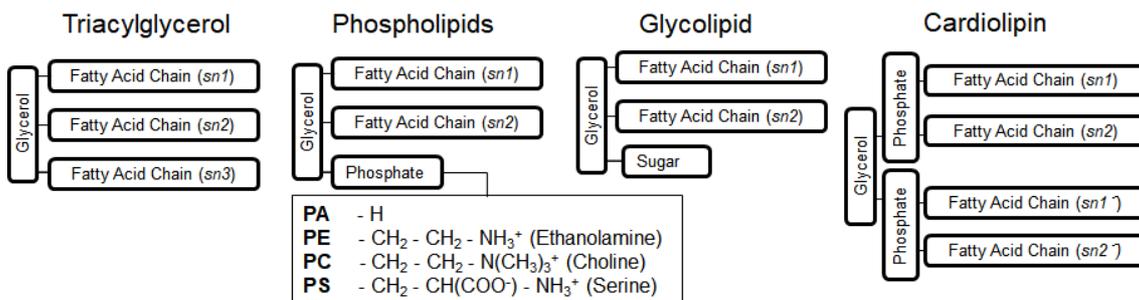


図 1 グリセロール骨格を持った脂質 (中性脂質、リン脂質等)

人の生体内には脂肪酸の種類は異性体も含めると 20 種類以上存在する。また脂質と呼ばれるもののクラスのうち脂肪酸側鎖が 2 本存在するものにはフォスファチジルコリン (PC) やフォスファチジン酸 (PA)、フォスファチジルセリン (PS)、フォスファチジルイノシトール (PI)、フォスファチジルエタノールアミン (PE)、ジアシルグリセロール (DG) 脂肪酸側鎖が 3 本のはトリアシルグリセロール (TG)、さらに 4 本のカルジオリピン (CL) などが存在する。これら脂肪酸側鎖が複数になると、化合物の種類が指数的に増えるため、すべての標準品を揃えることは事実上不可能であり、これが脂質の定性・定量を困難にしている。

このような状況を鑑みて、最も感度の高い質量分析装置で Multiple Reaction Monitoring (MRM) を組み、定性と定量を同時に行った。

2. 研究の目的

臨床分野において現在のところ非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の診断には肝生検が必要で、肝硬変や肝癌に移行する可能性もあることから、採取血液から診断できる方法の開発が強く望まれている。その為には微量成分も測定できる高感度質量分析装置での測定を欠かすことができないが、残念ながら質量分析装置の測定では絶対定量ができない。

そこで定量を行うために脂肪酸側鎖毎の検量線を脂質クラス毎に作成し、脂肪酸側鎖の濃度を算出することで、元の化合物の定量を正確に行った。

3. 研究の方法

通常食で飼育した Male C57BL/6 mice 5 匹と MCD 食 (メチオニン/コリン欠乏食) で飼育したサンプル 5 匹の肝臓抽出物と大脳抽出物について、脂質の定量を行った。

具体的には脂質成分の抽出と定量は、Bligh-Dyer 抽出法 (クロロフォルム/メタノール/水) による二相分離を行った後のクロロフォルム層を用いて脂質のクラス毎に脂肪酸側鎖の定性と定量を行う。

脂肪酸側鎖の強度 (クロマトグラムの面積値) から回帰的に誤差が 5 % 以内となる検量線を作成することで、脂肪酸側鎖毎に異なるイオン化補正係数が算出される。このイオン化補正係数を定量 MRM の強度にかけることで、正確な定量を行うことが可能となった。

4. 研究成果

脂質クラスのうち PC についての脂肪酸側鎖 Oleic acid (18:1) の相対的なイオン強度の補正係数を図 2 に示す。これは元の化合物である例えば PC18:1/20:4 が存在した場合の MS 2 のプロダクトイオン強度 18:1 と 20:4 の存在量は同じであるということに基づいている。(特願 2019-33302, 特開 2020-139755, 特許第 7306676 号より)

MRM トランジションに使用した脂肪酸側鎖は Palmitic acid (16:0), Palmitoleic acid (16:1), Stearic acid (18:0), Oleic acid (18:1), Linoleic acid (18:2), Arachidonic acid (20:4), Docosahexaenoic acid (22:6) の 7 種類の組み合わせで、脂肪酸側鎖を 2 本もつ PC の場合は、28 種類となる。(sn1 と sn2 の一異性体は区別できないため、₇₊₁C₂)

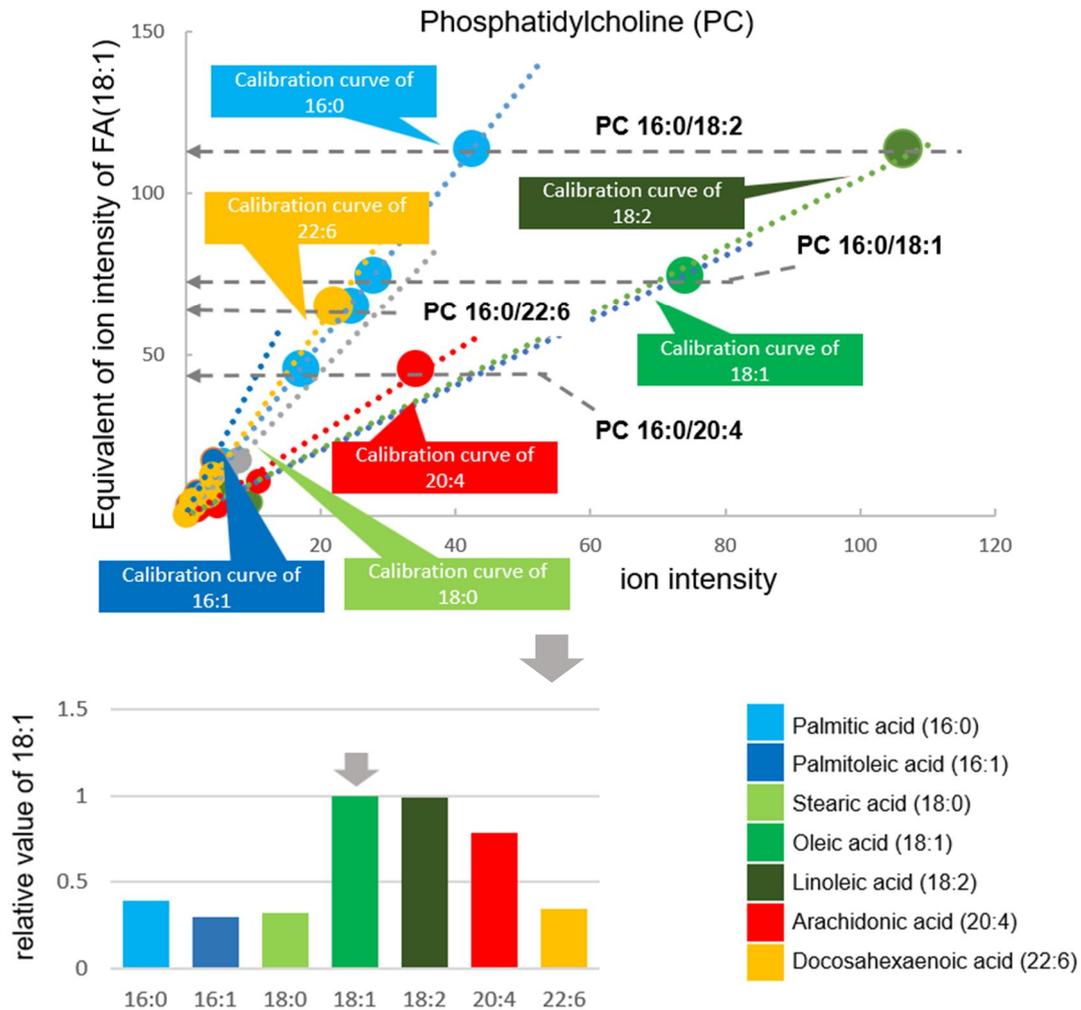


図2 プロダクトイオン強度（脂肪酸側鎖、MS2）の回帰式からのイオン補正係数の算出

なお、脂質クラスそれぞれのコリジョンエネルギー(eV)と補正係数は図3の通りとなった。コリジョンエネルギー(eV)は島津製作所 LC-MS8060 において、それぞれ-15 eV positive (DG), 39 eV negative (PC), 37 eV negative (PE), 44 eV negative (PS), 46 eV negative (PI), 40 eV negative (PG)である。

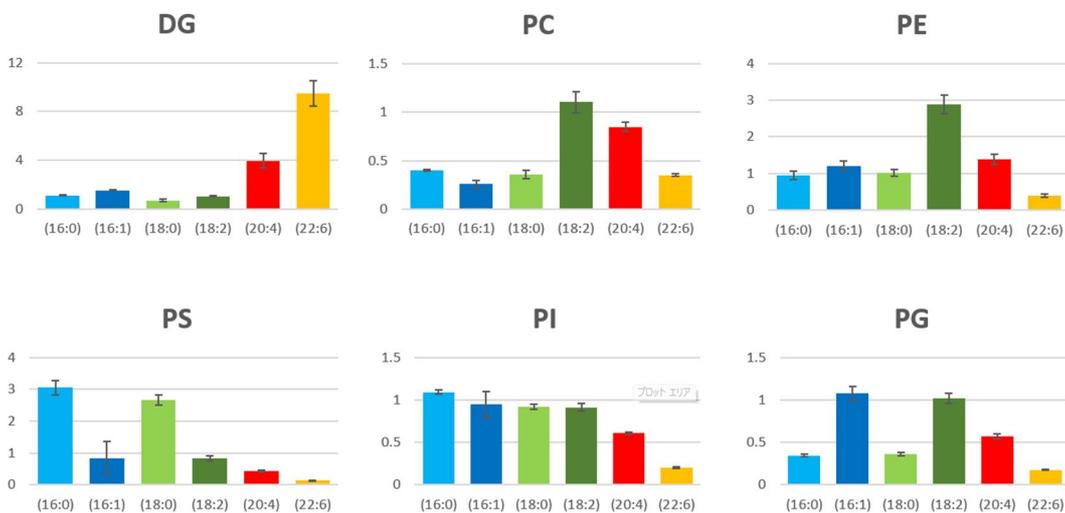


図3 脂質クラス毎のイオン化補正係数

DGのみ positive でコリジョンエネルギーが低いことから、脂肪酸側鎖の解離が他のリン脂質と比較すると大きく違うことがわかる。

これらの補正係数を元に、脂質クラス毎の定量を行い、脂肪酸側鎖の割合の算出を行った結果は図4 (A)の通りである。また、定量値が算出されたことで、割合も計算可能となり、各サンプルの脂質クラスの脂肪酸割合も算出して円グラフとして表現した。図4 (B)

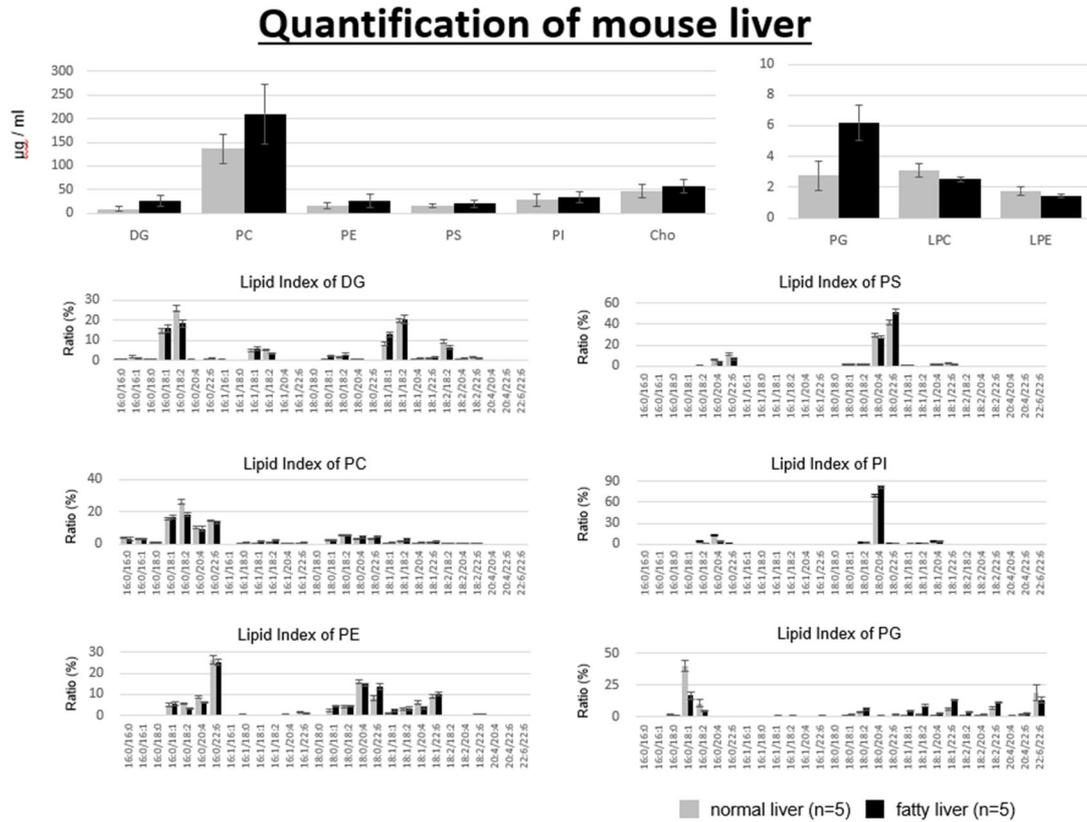


図4 (A) NASH 肝臓の脂質定量

Lipid Index of mouse liver

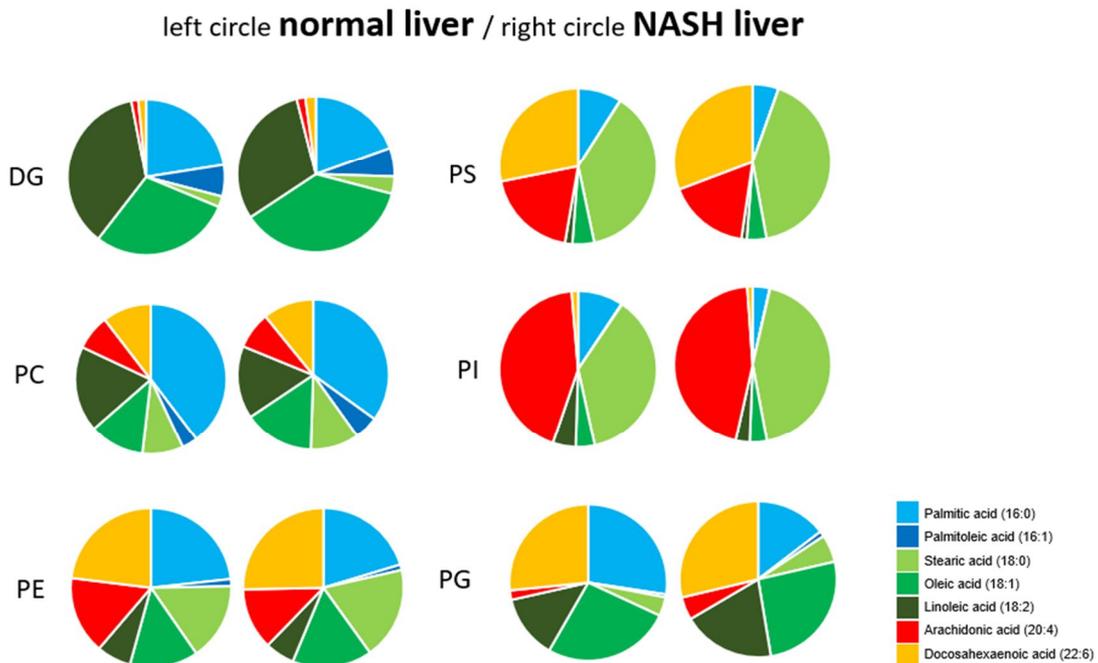


図4 (B) NASH 肝臓の脂質クラスの脂肪酸側鎖割合

NASH 肝臓サンプルと同様に、NASH 大脳サンプルについても同様に定量を行った。図 5 (A) (B)

Quantification of mouse brain

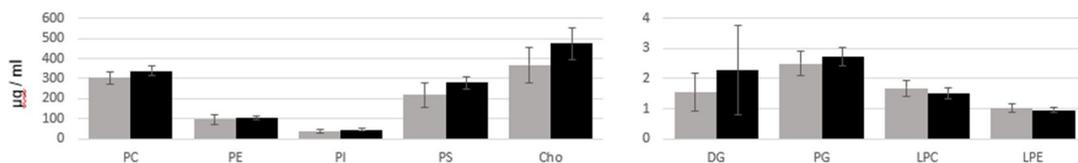


図 5 (A) NASH 大脳の脂質定量

Lipid Index of mouse Brain

left circle normal brain / right circle NASH brain

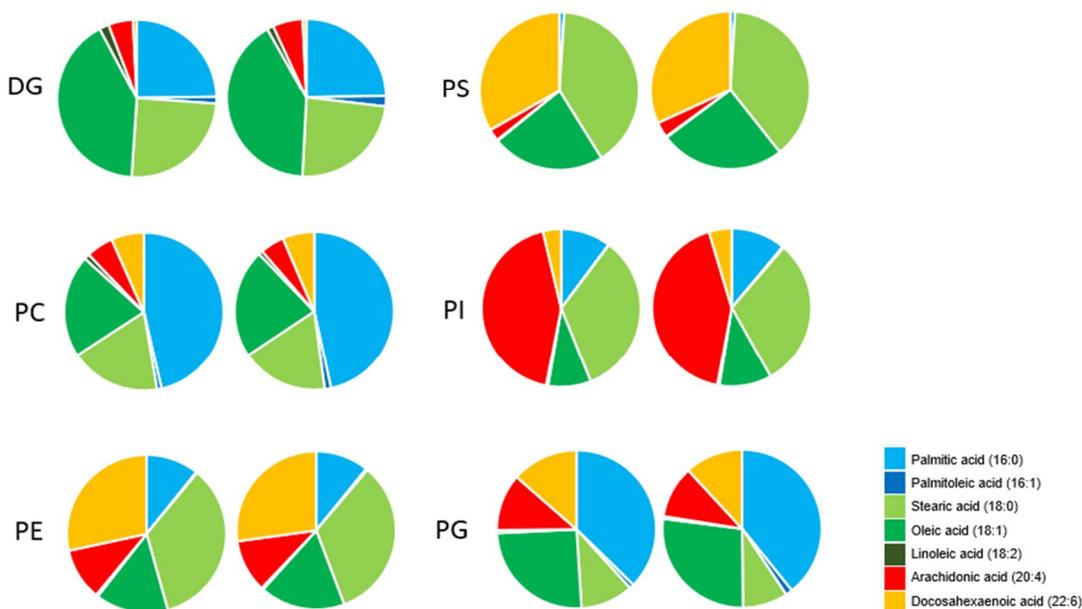


図 5 (B) NASH 大脳の脂質クラスの脂肪酸側鎖割合

以上の結果からマウス肝臓と大脳の抽出物を比較すると、MCD 食 (NASH 発症食事, メチオニン / コリン欠乏) により肝臓, 大脳ともに 6 種類の脂質クラス (DG, PC, PE, PS, PI, PG) は増加したが、LPC, LPE は減少した。各臓器で脂質自体は増加するが、脂肪酸側鎖の割合についてはあまり変化を見出すことはできなかった。中でもかなり微量な PG に関しては脂肪酸側鎖の割合が変化しており (リノレン酸増加) バイオマーカーとなる可能性は示唆された。大脳の脂質抽出物質についても同様で、他の臓器とことなりリン脂質中にリノレン酸 (18:2) がほとんど存在しない。大脳抽出物の脂肪酸組成に変化は肝臓よりも低い、NASH 大脳にはリノレン酸 (18:2) が若干増加しているのが見て分かる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Si-Hung Le, Izumi Yoshihiro, Nakao Motonao, Takahashi Masatomo, Bamba Takeshi	4. 巻 1197
2. 論文標題 Investigation of supercritical fluid chromatography retention behaviors using quantitative structure-retention relationships	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aca.2022.339463	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 Mizuno Rin, Hojo Hiroaki, Takahashi Masatomo, Kashio Soshiro, Enya Sora, Nakao Motonao, Konishi Riyo, Yoda Mayuko, Harata Ayano, Hamanishi Junzo, Kawamoto Hiroshi, Mandai Masaki, Suzuki Yutaka, Miura Masayuki, Bamba Takeshi, Izumi Yoshihiro, Kawaoka Shinpei	4. 巻 13
2. 論文標題 Remote solid cancers rewired hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30926-z	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 Nishiumi S, Izumi Y, Hirayama A, Takahashi M, Nakao M, Hata K, Saigusa D, Hishinuma E, Matsukawa N, Tokuoka S M., Kita Y, Hamano F, Okahashi N, Ikeda K, Nakanishi H, Saito K, Hirai M Y, Yoshida M, Oda Y, Matsuda F, Bamba T	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative Evaluation of Plasma Metabolomic Data from Multiple Laboratories	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12020135	査読の有無 無
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 Taya Naohiro, Katakami Naoto, Omori Kazuo, Hosoe Shigero, Watanabe Hirotaka, Takahara Mitsuyoshi, Miyashita Kazuyuki, Nishizawa Hitoshi, Konya Yutaka, Obara Sachiko, Hidaka Ayako, Nakao Motonao, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Shimomura Iichiro, Bamba Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Change in fatty acid composition of plasma triglyceride caused by a 2 week comprehensive risk management for diabetes: A prospective observational study of type 2 diabetes patients with supercritical fluid chromatography/mass spectrometry based semi target lipidomic analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 102 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13924	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------