

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15240

研究課題名（和文）生体内酸化リン脂質の包括的解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of comprehensive analysis techniques for endogenous oxidized phospholipids

研究代表者

松岡 悠太（Matsuoka, Yuta）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：20783509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究にて我々は、LC/HRMS/MSシステムを用いたノンターゲット分析を活用し、未知の酸化脂質探索へと応用することで、酸化脂質構造情報を含むライブラリーの構築に成功した。これらを活用し、APAP誘発肝障害やNASHモデルマウス肝組織中にて生じる酸化脂質の包括的解析および質量分析イメージングに成功した。その結果、疾患発症時期において、特定の酸化脂質（APAP：PC PUFA;O2、NASH：酸化トリグリセリド）が特に顕著に生成することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化脂質は疾患発症イベントを制御する重要分子として認識されてきた一方、これまでに同定された生理活性酸化脂質の数は極めて少ないのが現状である。この要因として、酸化脂質の分析手法が大きく制限されていることが挙げられる。そこで今後、本研究にて開発した分析技術を応用することで、新たな生理活性脂質の発見や酸化ストレス性疾患の発症機序解明、バイオマーカー探索が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we employed non-targeted analysis using the LC/HRMS/MS system to explore unknown oxidized lipids, leading to the construction of a library containing structural information of oxidized lipids. Using developed library, we achieved comprehensive analysis and mass spectrometry imaging of oxidized lipids in APAP-induced liver injury and NASH model mouse liver tissues. As a result, we discovered that specific oxidized lipids (APAP: PC PUFA; O2 and NASH: oxidized triglycerides) are prominently generated during the disease development stage.

研究分野：分析化学

キーワード：脂質過酸化反応 酸化リン脂質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は、生体膜構成やシグナル伝達など、様々な生理学的機能を担った分子である。一方で、これらの多くは分子内に多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) を有するため、生体内にて発生した活性酸素種などにより容易に酸化される。この結果、多種多様な「酸化リン脂質」が生成する。近年、こうした各々の酸化物が、様々な生命現象・疾患発症イベントにおいて、重要な役割を担っていることが明らかとされてきた。例として、酸化リン脂質が各生体組織における免疫反応を制御していることや、その過酸化物がこれまでに報告されたアポトーシスやネクローシスとは全く異なる細胞死機構「フェロトーシス」を誘発することなどが挙げられる。こうした生理学的重要性から、酸化リン脂質は、肝・腎疾患、循環器系疾患や神経変性疾患など様々な疾患の発症に寄与していることが報告されており、新たなバイオマーカー候補分子としても、注目を集めている。

酸化リン脂質は、複雑かつ連鎖的な脂質過酸化反応により生成し、過酸化物、アルコール、ケトン、エポキシド、アルデヒドまたカルボン酸など様々な化学構造を呈する。このため、疾患発症時においては、実に膨大な種類の酸化リン脂質が生体内にて生じていることが推察される。ところが、多くの酸化脂質研究では、過酸化物やアルコールなど数種の限られた酸化リン脂質のみが評価されてきた。この要因として、酸化リン脂質データベースの不足、つまり新規酸化リン脂質の探索・構造同定が十分に行われていない点が挙げられる。事実、国際的に著名な脂質関連化合物データベースである LipidMaps (<https://www.lipidmaps.org/>) 上に掲載されている酸化リン脂質 (酸化ホスファチジルコリン) の数はわずか 53 種であり、基質となるリン脂質の種類 (ホスファチジルコリン: 1784 種) および脂質過酸化反応の多様性を考慮すると極めて少ない。このため、疾患発症時において、実際にどのような酸化リン脂質が増減しているか、その全貌については未だ全く不明であると言える。

それでは何故、これまでに構造同定された酸化脂質の種類は、これほどに少ないのか? 従来、新規酸化リン脂質の探索には、多くの場合、目的とする疾患関連シグナル因子への活性評価をもとに実施されてきた。しかしながら、こうして発見・同定される酸化脂質の数・種類は、用いる脂質及び活性評価系に大きく依存するため、本手法はあくまで特定の生理活性脂質を標的とした極めて限定的な探索法であると言える。つまり、従来法では複雑な脂質過酸化反応により生じる多種多様な酸化脂質を体系的に解析することは不可能であり、その実現のためには、これまでとは異なる全く新しい探索技術の開発が必須であった。

2. 研究の目的

高分解能質量分析計 (high-resolution tandem mass spectrometry: HRMS/MS) を用いた「ノンターゲット分析」は、構造未知の化合物に対し、定性・定量評価を行うことができる、探索性に優れた手法である。本手法は、分析対象を限定する「ターゲット分析」と比較して、得られる情報量が極めて多く、代謝物を網羅的に解析する際などには有効な分析手段である。加えて、近年の質量分析計およびインフォマティクス技術の発達により、オミクス研究分野で広く応用されている。そこで、これら LC/HRMS/MS システムを用いたノンターゲット分析を、未知の酸化脂質探索へと応用することができれば、これまでその全体像が不明瞭であった酸化リン脂質の体系的解析が可能になると考えた。

そこで我々は包括的酸化リン脂質解析技術の開発に向け、まずノンターゲット分析による酸化リン脂質の構造ライブラリー構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、具体的に、下記 3 点を達成目標とする。

- (1). LC/HRMS/MS による酸化リン脂質のノンターゲット分析
- (2). 酸化リン脂質データベース構築
- (3). 培養細胞および疾患モデル動物を用いた検証

(目的-1,2) では、種々のリン脂質由来酸化物のノンターゲット分析およびデータベース化を行う。リン脂質としてホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどの様々な脂質クラスの化学種を反応基質に用いた際に生じる酸化物解析を進め、データベースの拡大を目指す。

(目的-3) では、(目的-1, 2) にて、確立した酸化脂質データベースを用い、培養細胞および疾患モデル動物中にて生成する酸化リン脂質の包括的解析を行う。疾患モデル動物としては、脂質過酸化反応の関与が疑われている肝疾患モデル動物を用いた。さらに観測された酸化リン脂質に関しては、MALDI/MS による MS イメージングを行い、局在評価を行う。そして、得られた知見より、酸化ストレス疾患発症時における各酸化リン脂質の役割について議論する。

4. 研究成果

PCは、分子内に2つの脂肪酸アシル基を有する。哺乳類細胞の場合、sn-1位に palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0)や oleic acid (18:1)等の飽和脂肪酸・モノ不飽和脂肪酸を、sn-2位に linoleic acid (18:2), arachidonic acid (20:4)や docosahexaenoic acid (22:6)などのPUFAを多く含む。ここで、脂質分子への酸化修飾は一般的にPUFAでのみ生じる。そこで、本研究ではまずsn-1位に palmitic acid、sn-2位に上記3種のPUFAを有するPCより生じる酸化物のノンターゲット分析を行った。続いて、上記にて明らかにした酸化PC sn-2位(酸化修飾部位)の構造をもとにsn-1位が stearic acidや oleic acidの分子を *in silico*にて算出し、ライブラリーを拡張した。

試験管中にて、各PCを酸化させた。続いて、それらをLC/HRMS解析し、観測されたピークの中から未酸化(コントロール)試料に比べ強度が上昇しているピークをピックアップした。さらに、選定したピークのMSMS解析を行い、その構造同定を実施した。この結果、3種のPCから生じる計155種酸化PCの構造情報を明らかとした。なお、これらのうち、103種の化学種はこれまでに報告例のない分子種であった。また、これらの構造情報をもとに、ライブラリーを拡張させ、最終的に計465種の酸化PCから成る構造ライブラリーを構築した。

構築した構造ライブラリーを用い、疾患モデル動物中において生じる内在性酸化PCの包括的解析を実施し、本ライブラリーの有用性を検証した。疾患モデルマウスとしては、アセトアミノフェン(acetaminophen: APAP)誘発急性肝障害モデルマウスを用いた。APAPは臨床において頻用される解熱鎮痛薬である。しかしながら、過剰摂取した場合、肝組織中の glutathione (GSH)が枯渇させ、副作用として急性肝障害が生じる。欧米諸国においては、急性肝不全の原因として最多であり、社会的にも問題視されている。この肝障害には近年、酸化ストレス、脂質過酸化反応の関与が指摘されている。一方、具体的にどのような酸化リン脂質種が生成しているかは全く不明であった。

C57BL/6Jマウス(8週齢、雄)にAPAP(300 mg/kg)を腹腔内投与し、投与24時間後までの肝障害を評価した。その結果、投与後4時間以降においてから劇的な肝障害が観測された。なお、これらの肝障害はグルタチオン合成基質であるN-acetyl cysteineおよびミトコンドリア移行性抗酸化物質であるMito-TEMPOの処置により顕著に抑制された。そこで同投与時間後において生成する酸化PCの包括的解析を実施した。すると、肝障害が発生する際に計70種の酸化PCが増加することを見出した。さらに、一部の酸化PCは肝障害に先行してAPAP投与2時間後より増加した。そこで、肝障害発生最初期に生成する酸化PCの半定量分析した結果、特にPCに酸素原子が2つ付加した酸化物(PC PUFA;02)が顕著に増加することを見出した。また、これらは分子内にエポキシ基/水酸基を有する化学種であることも明らかとした。

続いて、観測されたPC PUFA;02が肝組織中のどの部位で生成しているかを調べるため、matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI/MS)を用いた質量分析イメージングを試みた。本手法は、生体組織切片など平面状の試料に含まれる化合物の分布を可視化する手法である。試料中の微小領域における化合物をイオン化し、質量分析を行うことで、マススペクトルデータを空間情報と合わせて取得する。その後、特定のm/zにおけるイオン強度と空間情報をマッピングし、各々の化合物マップ情報を得ることができる。

加えて、本研究では測定感度を向上させるため、従来のMALDI/MS質量分析イメージング法に重酸素(18O)標識法を組み合わせた新たな酸化PC質量分析イメージング法を開発した。18Oとは、酸素原子の安定同位体、18O、2つからなる酸素分子である。通常の酸素分子(16O₂)と分子量が異なるため、質量分析法を用いることで、各々区別して解析することができる。

本手法では、マウスに18Oを吸入させることで生体内酸化PCを18O標識し、これら標識体の質量分析イメージングを行った。その結果、PC PUFA;02の肝組織局在を鮮明に可視化することに成功した。ここで、APAPはCYP2E1により、N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)へと代謝され、これらがGSHを枯渇させることで疾患発症に至る。そこで、肝組織中におけるCYP2E1発現部位を免疫染色により可視化し、PC PUFA;02の生成部位と比較したところ、両者の局在は一致した。以上より、PC PUFA;02は、肝組織中の後に障害が生じる部位に顕著に蓄積することを明らかとした。

さらに最終年度では、構築したホスファチジルコリン(PC)由来酸化物構造データベースをさらに拡大し、他の脂質クラスの酸化脂質の解析手法を開発した。本手法を用いることで、マウス初代肝細胞中にて生成した酸化脂質の解析が可能であった。さらに、本手法は実験動物由来生体試料への応用も可能であり、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルマウスへと応用したところ、NASH疾患発症時において特にトリグリセリド由来酸化物が顕著に増加することを見出した。

本研究にて我々は、酸化脂質構造情報を含むライブラリーの構築に成功した。これらを応用し、APAP誘発肝障害やNASHモデルマウス肝組織中にて生じる酸化脂質の包括的解析および質量分析イメージングに成功した。その結果、疾患発症時期において、特定の酸化脂質(APAP: PC PUFA;02、NASH: 酸化トリグリセリド)が特に顕著に生成することを見出した。

酸化脂質は疾患発症イベントを制御する重要分子として認識されてきた一方、これまでに同定された生理活性酸化脂質の数は極めて少ないのが現状である。この要因として、酸化脂質の解析手法が大きく制限されていることが挙げられる。そこで今後、本研究にて開発した分析技術を

応用することで、新たな生理活性脂質の発見や酸化ストレス性疾患の発症機序解明、バイオマーカー探索が期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Anegawa Daisuke, Sugiura Yuki, Matsuoka Yuta, Sone Masamitsu, Shichiri Mototada, Otsuka Reo, Ishida Noriko, Yamada Ken-ichi, Suematsu Makoto, Miura Masayuki, Yamaguchi Yoshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α -tocopherol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02297-6	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 Matsuoka Yuta, Takahashi Masatomo, Sugiura Yuki, Izumi Yoshihiro, Nishiyama Kazuhiro, Nishida Motohiro, Suematsu Makoto, Bamba Takeshi, Yamada Ken-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural library and visualization of endogenously oxidized phosphatidylcholines using mass spectrometry-based techniques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26633-w	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 Yamauchi Kosho, Matsuoka Yuta, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Naka Hideto, Taniguchi Yosuke, Kawai Kazuaki, Bamba Takeshi, Yamada Ken-ichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Detection and structural analysis of pyrimidine-derived radicals generated on DNA using a profluorescent nitroxide probe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 56 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc04998d	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 Matsuoka Yuta	4. 巻 141
2. 論文標題 Developments of Profluorescent Nitroxide Probes for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological Redox Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.21-00149	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 Saito Kota, Matsuoka Yuta, Abe Masami, Kato Nao, Morimoto Kazushi, Yamada Ken-ichi	4. 巻 2023
2. 論文標題 Triglyceride peroxidation progression in lipid droplets of hepatocytes in nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Redox Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e220024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REM-22-0024	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 Udo Takumi, Matsuoka Yuta, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Saito Kota, Tazoe Kaho, Tanaka Moe, Naka Hideto, Bamba Takeshi, Yamada Ken-ichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Structural Analysis of Intracellular Lipid Radicals by LC/MS/MS Using a BODIPY-Based Profluorescent Nitroxide Probe	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4585 ~ 4591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c04950	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松岡 悠太
2. 発表標題 酸化ホスファチジルコリンの包括的解析および可視化技術の開発
3. 学会等名 第74回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 悠太、高橋 政友、杉浦 悠毅、和泉 自泰、末松 誠、馬場 健史、山田 健一
2. 発表標題 酸化 ホスファチジルコリンの包括的分析および可視化法
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 松岡 悠太
2. 発表標題 脂質過酸化反応およびフェロトキシシ誘導時に生じる揮発性分子の構造同定
3. 学会等名 第13回 日本安定同位体・生体ガス医学応用学会 大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 悠太
2. 発表標題 脂質由来揮発性分子の網羅的構造同定および生成機序の解明
3. 学会等名 第16回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 悠太
2. 発表標題 酸化リン脂質の包括的解析および可視化技術
3. 学会等名 第47回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------