

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590848

研究課題名(和文) 虚血・再灌流障害で産生される過酸化カルジオリピンの法医診断への応用

研究課題名(英文) Analysis of cardiolipin peroxides produced by ischemic-reoxygenation injury; application to postmortem diagnosis of ischemic heart disease.

研究代表者

矢島 大介 (Yajima, Daisuke)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60451754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素状況下で細胞が死ぬ時に産生される過酸化カルジオリピンを蛍光試薬を用いて定量する研究、及び産生される過酸化カルジオリピンの本体を液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS/MS)を用いて解明する研究を試みた。低酸素に曝露された試料は対照試料と比較して、過酸化カルジオリピンの量が多い傾向を示したが、統計的な差を認めるまでには至らなかった。今回検討したメタノール系移動相とODSカラムを用いたいくつかのLC-MS/MS条件ではカルジオリピンの分離は困難であった。今後はカルジオリピンを構成している脂肪酸を検出対象に絞り、これらをLC-MS/MSで分析する方法を検討していく。

研究成果の概要(英文)：I tried to quantify cardiolipin peroxides produced under hypoxic condition using fluorescent reagent and to analyze what kinds of peroxidized cardiolipins were produced using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS). Although ischemic samples tended to be higher in cardiolipin peroxide content than that of controls, there were no significant difference statistically because number of samples was small. It was difficult to analyze cardiolipin peroxides by LC-MS/MS under some conditions that I tried in this studies; methanol mobile phase and an ODS column. After this, I have to focus on fatty acids which make up cardiolipines and try to analyze fatty acid peroxides using LC-MS/MS.

研究分野：法医学

キーワード：虚血・再灌流 細胞死 脂質過酸化

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞さらには梗塞後の再灌流によって、各臓器の細胞が障害を受ける。この細胞障害を起こす原因の一つに活性酸素種による酸化ストレスの発生やそれによる脂質過酸化の関与が言われている。そして、その細胞障害の機序として、酸化ストレスを引き起こす何らかの酸化性物質が細胞内で産生され、これらがミトコンドリアなどの膜脂質を酸化し、その機能を障害し、細胞死を引き起こすとされている。これらの活性酸素種の発生部位として、呼吸で取り入れた酸素を利用するミトコンドリア内の電子伝達系などがあるとされており、これが脂質の過酸化を生じさせていると考えられている。今まで我々は、臓器の血流の停止・再開という現象を、細胞を使った虚血・再灌流という実験で擬似させて、細胞死の機序の解明を行ってきた。それらの結果は、細胞内の脂質過酸化と細胞死が関連していることを示唆しており、細胞死と脂質過酸化は虚血の間に発生していることを示していた。さらに各種の電子伝達系阻害剤を用いて実験を行い、電子伝達系と脂質過酸化が関連していることも明らかにした。

しかし、過酸化されている脂質に関しては、細胞中のどの部位のどの脂質がどの程度過酸化を受けているかは、ほとんど未解明である。

そこで今回、我々はミトコンドリアに多く含まれるカルジオリピンに注目して、その過酸化物を検出および定量し、虚血・再灌流の発生の指標とあるかどうかを検討した。

細胞傷害時にカルジオリピンが過酸化を受けるかを解明し、実際に検出することは、心筋梗塞・脳梗塞などの梗塞発症直後で顕微鏡所見では著変を認めない場合などの診断根拠になるものと考えられ、梗塞病態の分子レベルでの解明に役立つとともに、さらには予防法や治療法の開発にも貢献できるものと考えられる。生命現象の理解という観点からしても、生物の死の発生過程を解明することは、生命現象の基本的な原理を理解するために必須のことであると考えられる。

2. 研究の目的

法医診断において組織所見に著変を認めない心筋虚血の診断は、血栓が認められる場合以外には現時点では確実に根拠となるものではなく、既往や血管の狭窄程度など間接的所見を参考としたり除外診断をしたりして、困難を極めている。この難題を解決すべく、細胞死と脂質過酸化の関心に注目し、虚血の際に発生する脂質過酸化物を検出して、これを虚血発生の根拠として法医診断に応用しようと試みている。現在でも血中の過酸化脂質

を測定して種々の疾患の診断に用いているが、測定法が非特異的であり、真の過酸化脂質を測定できているとは限らない。そこで我々は、ミトコンドリアに多く含まれる磷脂質カルジオリピンに注目して、この過酸化物を検出が臓器虚血の診断に有用であるかどうか調べることを大きな目的としている。現在まで、我々は臓器の血流の停止・再開という現象を、細胞を使った虚血・再灌流という実験で擬似させて、細胞死と脂質過酸化の機序の解明を行ってきたが、今回の研究では、同一の実験系を用いてカルジオリピンに注目し、虚血時に発生する過酸化カルジオリピンの分析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)培養細胞(マウス線維芽細胞 MEFs)からのカルジオリピンの分離・定量
MEFs から脂質を抽出し、1次元薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いてカルジオリピンを分離し、定量するとともに、LC-MS/MSでの分析も試みた。

リン脂質の抽出

Bligh-Dyer 法により抽出を行った。直径25mmのカバーガラス(Fisher® Microscope Cover Glass)上に培養したMEFs細胞の全量を採取し、精製水800 μ Lを加え水中でホモジナイズした。一部をタンパク定量用に保存し、残りをガラス試験管に移し、クロロホルム/メタノール=1:2を3mL加えスターラーで1時間以上遮光しながら攪拌した。精製水1mL、クロロホルム1mLを加え2500rpmで5分遠心した後、下層のクロロホルム層を回収し、抽出脂質試料とした。

リン脂質の分離

Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出後、クロロホルムをN₂で蒸発させ、クロロホルム/メタノール=1:2を2-3滴加え、全量をTLC plate Silica gel 60 (MERCK)にスポットした。展開溶媒1(クロロホルム/メタノール/酢酸=65:25:13)を予め飽和させておいた展開槽で展開した。展開終了後冷風で1時間以上乾燥させ、展開溶媒2(クロロホルム/メタノール/蟻酸=65:25:13)を予め飽和させておいた展開槽で2度目の展開を行った。0.001%プリムリン噴霧後、UV(253.7nm)照射下で中性脂肪・カルジオリピン CL・フォスファチジン酸 PA・フォスファチジルグリセロール PG・フォスファチジルエタノールアミン PE・フォスファチジルセリン PS・イノシトール PI・フォスファチジルコリン PC・スフィンゴミエリン SMの分離を確認した。各スポットをシリカゲルごと削り取り、前述のBligh-Dyer法により再度抽出を行い、クロロホルム抽出液とし - 20 で保存した。

リン脂質の定量
分離した脂質のクロロホルムを蒸発させ、70%HClO₄を加え2時間200℃で灰化した。その後2.5%モリブデン酸アンモニウム、10%アスコルビン酸を加え沸騰水浴中で5分加熱した。820nmの吸光度を測定し、検量線に従って定量した。

LC-MS/MSによるカルジオリピンの定量
実際の試料の分析の前に標準品を用いて、カルジオリピンの分析が可能かどうか検討を行った。カルジオリピンの標準物質としてCardiolipin Internal Standard Mixture I / Avanti Polar Lipids, Inc.を用いた。この全量を一定量のエタノールに溶解し、その10μLをLC-MS/MSを用いて分析を行った。分析機器と条件は、アプライド・バイオシステムズ社製液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)3200 Q TRAP LC/MS/MS Systemを用い、HPLCとしてShimadzu HPLCシステム(CBM-20A, LC-20AD×2, SPD-M20A, CTO-20A)、カラム L column ODS 5μm 150×1.5mm(一般財団法人化学物質評価研究機構製)を用い、移動相 A; 10mM HCOONH₄ / 5%MeOH / H₂O、B; 10mM HCOONH₄ / 5%H₂O / MeOH、流速 1mL/minとした。カルジオリピンの標準品に含有される数種のカルジオリピンを参考に検索目標とするプリカーサイオンおよびフラグメントイオンを推定し、イオンクロマトグラムの解析を行った。

(2)虚血・再灌流条件曝露後の過酸化脂質の分離・解析
MEFs細胞を本研究室で用いている虚血・再還流装置を用いて虚血・再還流状態に暴露し、MEFs細胞から直接脂質を抽出し分析を行った。数多くの脂質が含まれるが、特にミトコンドリアに多く含まれ、ミトコンドリア膜機能の主要な部分を担っていると考えられるカルジオリピンに注目し、これに含まれる脂肪酸および脂質酸化物の分離・解析を行った。

虚血・再還流暴露
通常酸素状態のガス(酸素 20%、窒素 75%、二酸化炭素 5%)で平衡させた生理的緩衝液で直径 25mmのカバーガラス上に培養した細胞を還流して30分間安定させた。次に虚血ガス(酸素 0%、窒素 80%、二酸化炭素 20%)で平衡させた緩衝液で1時間還流を行い、さらにもとの通常酸素状態のガスで平衡させたものにもどし2時間反応させた。

過酸化カルジオリピンの分析
通常培養細胞と同様に虚血・再灌流条件曝露細胞からカルジオリピンを分離した後、クロロホルムを蒸発させ、過酸化物と反応して蛍光を発する 0.1mg/mL DPPF を加え、遮光下

で60分、60分間反応させた。3分間水中で冷却しメタノールを加え、352/380nmの蛍光を測定し、過酸化脂質を算出した。

4. 研究成果

(1)培養細胞(マウス線維芽細胞 MEFs)からのカルジオリピンの分離・定量

カバーガラス上4枚分に培養した細胞を合わせて、そこからカルジオリピンを抽出し、それを2回おこなったところ、抽出できたカルジオリピン量はそれぞれ0.030nmolおよび1.586nmolであった(表1)。カバーガラス4枚では十分量のカルジオリピンが抽出でき、実際の実験では1枚分でも十分と考えられた。

表1

samples	吸光度	リン量(μg)	リン量(nmol)	カルジオリピン量(nmol)
1	0.048	0.07	2.261	1.131
2	0.064	0.098	3.171	1.586

(2)LC-MS/MSによるカルジオリピンの定量

分析条件にて、まず標品が分析できるかどうか検討した結果、検討した条件ではカルジオリピンは検出できなかった。LC-MS/MSシステムにおいてトータルスキャンモードで行うも、クロマト上に多数の同位体を含む脂肪鎖特有の集合したピークが検出できず、標品の構造および分子量から推定されるイオン化体の分子量をターゲットとして分析を行っても、推測されるイオンは検出できなかった。その原因は解決できていないが、イオン化の条件が適切でない可能性が推測された。標品の検出条件が明確にならない限りは、実際の検体の分析は困難であるため、カラムおよび移動相のさらなる検討が必要と考えられた。

(3)虚血・再灌流条件曝露後の過酸化脂質の分離・解析

虚血・再灌流条件(IS-RE)と対照として通常酸素条件(Normoxia)の試料をそれぞれ5検体作製し、カルジオリピンを抽出した後、DPPPで過酸化脂質の生成量の分析を行った。過酸化脂質量はカルジオリピン1mol中のモル数として表した。対照の過酸化脂質量の平均は0.2142nmolに対して、虚血条件に曝露されたものでは0.5062nmolで、虚血条件下では過酸化脂質が多くなる傾向を示したが、統計的な有意差は認められなかった。(表2、3、図1)

この原因として、カルジオリピンの抽出の際

は多段階の抽出操作があり、手技が熟達していないと抽出量がばらつく可能性が高いことが推測された。実際、ほぼ同量の細胞量から抽出しても約 10 倍以上の抽出量の差が認められたものもあった。

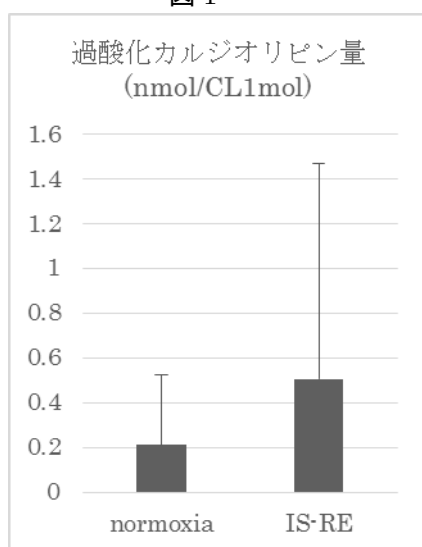
表 2

DPPP(nmol/CL1mol)		
samples	normoxia	IS-RE
	0.076	0.108
	0.772	2.23
	0.032	0.022
	0.089	0.026
	0.102	0.145
Average	0.2142	0.5062

表 3

基本統計量					
Samples	n	平均	不偏分散	標準偏差	標準誤差
normoxia	5	0.214	0.098	0.313	0.140
IS-RE	5	0.506	0.931	0.965	0.432

図 1



(4)結論

本研究では虚血条件下で曝露し細胞死に陥らせた細胞では脂質過酸化が発生していることが示唆された。しかし、対照と比較してその発生量は増加傾向を示したものの、統計的に有意な差ではなかった。カルジオリピンの抽出操作にばらつきが少なくなれば、有意差を得ることは可能であると推測された。

LC-MS/MS を用いた過酸化カルジオリピンの分析は非常に困難であり、分析条件のさらなる検討が必要であった。最近の新しい論文を参照すると、脂質分析に適するカラムも製品化され、それらを用いた分析方法を試みる

ことも可能である。一方でカルジオリピンを分解して構成脂肪酸の過酸化物を分析するという方向性も今後検討していく必要があると考えられた。

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)

[学会発表](計2件)

Daisuke Yajima. Legal Medicine Service and Research in Chiba University. Seminar for forensic doctors, forensic experts, health care professionals, medical doctors. NEW TECHNOLOGY IN FORENSIC MEDICINE PRACTICE. 20 November 2014 in Vilnius (Lithuania).

Daisuke Yajima. Death Investigation system in Japan and Reseach at Chiba University. INTERNATIONAL VILNIUS MEETING. 14-15 June 2012 in Vilnius (Lithuania).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢島 大介 (YAJIMA DAISUKE)
千葉大学・大学院医学研究院 特任准教授
研究者番号：60451754

(2)研究分担者

齋藤 久子 (SAITO HISAKO)
千葉大学・大学院医学研究院 准教授
研究者番号：10292674