

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460043

研究課題名(和文) 独自試薬によるESI増強重水素標識を鍵とする新世代神経活性ステロイドの脳内解析

研究課題名(英文) Analysis of new-generation neurosteroids in brain by LC/MS/MS coupled to derivatization with ESI-enhancing and deuterium-labeling reagents

研究代表者

東 達也 (HIGASHI, TATSUYA)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：90272963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲンや胆汁酸をはじめとする新世代神経活性ステロイド(NS)の生合成・代謝系を標的とする精神・神経疾患の創薬や治療法開発を究極の目標に、独自のESI増強重水素標識試薬とLC/MS/MSを組み合わせた新規手法を確立し、新世代NSの脳内存否、レベル変動などを解析した。まず、ミアンセリンやミルタザピンが脳内アロプレグナノロン(GABA作動性NS)量を増加させ、抗不安作用を発揮する可能性を見出した。また、ラット脳内胆汁酸(ケノデオキシコール酸など)のレベル、これらの大部分が末梢由来であること、脳内への輸送はその脂溶性に依存した単純拡散である可能性が高いことなどを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Qualitative and quantitative analyses of new-generation neurosteroids (NSs), such as androgens and bile acids, can contribute to the discovery and development of new antipsychotic agents and therapy for psychiatric disorders targeting neurosteroidogenesis. In this study, novel LC/MS/MS assays coupled to derivatization with the ESI-enhancing and deuterium-labeling reagents were developed. Using the developed method, we demonstrated the possibility that mianserin and mirtazapine elevate the brain allopregnanolone concentration and have anxiolytic effects. Three unconjugated bile acids (BAs), including chenodeoxycholic acid, were identified and quantified as the major BAs in the rat brain. Based on the comparison with their serum levels, we found that most BAs in the brain are derived from the periphery and the major mechanism for the transportation of the unconjugated BAs to the brain is the passive diffusion.

研究分野：臨床分析科学

キーワード：神経活性ステロイド ESI増強重水素標識試薬 LC/MS/MS 精神・神経疾患 アンドロゲン ビタミンD  
代謝物 胆汁酸 創薬

### 1. 研究開始当初の背景

複雑かつ高度なストレス社会である現代日本では、生涯を通じて5人に1人が何らかの精神・神経疾患に罹患すると言われている。そして、これら疾患の原因の一つがステロイド欠乏・バランスの崩れとも言われ、ステロイドの補充や生合成・代謝の制御が精神・神経疾患に対する新規治療法になるものと期待されている。これまでもアロプレグナロン (AP) をはじめとするプレグナン系ステロイドが、脳内のGABA<sub>A</sub>受容体を介して抗ストレス・抗不安作用を示すことから神経活性ステロイド (NS) と称され、そのアナログの医薬としての開発が進められてきた。最近これとは別に、新世代NSと呼ぶべき、非プレグナン系ステロイド、すなわちアンドロゲン、ビタミンD、胆汁酸などの中枢作用に注目が集まっている。このため、これら新世代NS自身あるいはその生合成・代謝制御物質が新規精神・神経疾患治療薬の有力候補として期待される。

創薬を指向した新世代NS研究の第一歩は、脳内におけるその質的・量的変動を的確に把握することであるが、研究開始当初はそれに適した方法がなかった。すなわち、新世代NS分析の方法論として高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析 (LC/ESI-MS/MS) が最適であると考えられるが、脳はコレステロールをはじめとする脂質の塊であり、超微量の新世代NSのイオンシグナルを、脳内に共存する多量の脂質のそれと弁別して検出する技術が確立されていなかった。さらに量的解析に必須の安定同位体標識アナログ (内標準物質) が入手・合成困難な新世代NSが多く、脳内レベルの情報を得ることも極めて難しかった。

### 2. 研究の目的

1) アンドロゲン, 2) ビタミンD代謝物, 3) 遊離型胆汁酸を対象新世代NSとし、LC/ESI-MS/MSの感度を飛躍的に向上させるとともに量的解析も実現するESI増強重水素標識試薬 (EDR) の開発を出発点とし、新世代NSを標的とする創薬・治療法開発に寄与する生体情報の獲得、最終的には創薬研究に新しい道をつけることを目的とした。

まず、各NSに特異的なEDRを開発し、高感度で量的情報も獲得できるLC/ESI-MS/MS脳分析システムを構築する。これらを用いてラット脳内存在否、量的変動を解析し、創薬・治療法開発の足掛かりとなる情報を獲得する。このように、創薬・治療法開発という目標を強く意識し、単に分析方法論開発に留まらず、動物実験による生体データ獲得までを期間内の達成目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) アンドロゲン [テストステロン (T) 及びその活性代謝物 (5 $\beta$ -ジヒドロテストステ

ロン, DHT)], ビタミンD代謝物や遊離型胆汁酸のEDRとそれを利用したLC/ESI-MS/MS分析法の開発を行った。すなわち、各NSの有する官能基 (それぞれ、ケト基、共役ジエン、カルボキシ基) と特異的、迅速かつ定量的に反応し、対象NSにESI活性原子団と重水素標識部位を導入可能なEDRをデザイン・合成した。このとき、誘導体化試薬への重水素の導入法を種々試みた。誘導体化条件を最適化し、得られた各誘導体についてLC/ESI-MS/MS挙動を精査した。さらに各NSについて、脳試料の前処理法を確立した。すなわち、ホモジナイズ、除タンパク、固相抽出など各工程について系統的検討を行った。

(2) 代表的な身体的ストレスである拘束ストレスを負荷したときの脳内アンドロゲンレベル変動を解析した。すなわち、コントロールラット及びストレス負荷ラットから採取した脳内アンドロゲンを(1)で開発したEDRのペアで処理し、含量の差解析を行った。次いで、ストレスに伴うAPとアンドロゲン系新世代NSのレベル変動挙動の違いを明らかにした。

(3) (1)で開発したEDRを用いて、ラット脳から25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>, 循環型代謝物] の検出を試みた。また、さらなる高感度化を目指し、計算科学的手法も駆使してビタミンD代謝物分析用の新規誘導体化試薬の開発を企てた。

(4) (1)で開発したEDRを用いて、ラット脳内胆汁酸、すなわちコール酸 (CA), ケノデオキシコール酸 (CDCA), デオキシコール酸 (DCA) の定量法を開発するとともに、その脳内レベル、由来に関する情報を収集した。

### 4. 研究成果

(1) アンドロゲン用EDRとして、HMP及び<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-HMP、ビタミンD代謝物用のそれとして、DAPTAD及び<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>-DAPTAD、胆汁酸用のそれとしてDAPPZ及び<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-DAPPZの開発に成功した。重水素導入法については、アミノ基にハロゲン化アルキルを作用させる手法とともに、アルデヒドを作用させた後、還元する、還元的アミノ化に基づく手法を確立した。各EDRによりNSのESI-MS/MS応答性は2桁~3桁向上し、検出限界はサブfmol~pmolに達した。さらに誘導体化によりLC挙動、すなわち、夾雑物質との分離も改善され、前処理の最適化も加わって、特異性にも優れた分析系が確立できた。

(2) HMPと<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-HMPによる誘導体化をLC/ESI-MS/MSに組み合わせ、脳内アンドロゲン (T及びDHT) の新規差解析法及び定量法を開発した。これらの方法を用いて拘束ストレスによる脳内アンドロゲンレベル変動を精査したところ、AP代表されるプレグナン系神経活性ステロイドとは大きく異なり、ストレスによる増減がほとんどないことが明らかとなった。アンドロゲンの中枢作用 (抗不安・抗ストレス作用) の解明に役立つ情報

は得られなかったが、NSを標的とした創薬は、プレグナン系ステロイドに焦点を絞るべきであることが確認できた。

(3) (2)で開発した方法は脳内APの差解析及び定量にも適用可能であった。そこで、selective brain steroidogenic stimulant (SBSS: APの合成促進を介して抗不安・抗うつ作用発現し、抗精神病薬の候補となりうる化合物)探索における本法の実用性を試験した。ポジティブコントロールとしてフルオキセチン (FLX, 選択的セロトニン再取り込み阻害薬)、クロザピン (CLZ, 非定型抗精神病薬) を、ネガティブコントロールとしてハロペリドール (HLP, 統合失調症治療薬)、スルピリド (SLP, 統合失調症治療薬) を選択し、これらと生理食塩水 (コントロール) をWistar系雄性ラットに腹腔内投与し (各 $n=3$ )、60分後に脳を採取した。FLX又はCLZを投与したラットでは、脳内APレベルの上昇を容易にかつ正確に検出できる一方で、HLP、SLP投与群の脳内APレベルは生理食塩水投与群のそれと同等であった。このように開発した方法がSBSS探索に十分な実用性を有することが示された。

(4) (3)の結果を踏まえてSBSSの探索を行ったところ、オランザピン (OLZ, 非定型抗精神病薬)、ミアンセリン (MAS)、ミルタザピン (MRT) (ともに四環系抗うつ薬) がSBSS候補として見出された。特に後2者は、SBSSとしての作用がCLZ、OLZに比べて弱いものの、これまでSBSSとして働くことは報告されておらず、新規知見が得られた。本研究でSBSSと確認したCLZ、OLZ、MAS及びMRTは類似の化学構造 (ジベンゾアゼピン) を有しており、構造活性相関の点からも興味深い知見を得た。

(5) 脳内ビタミンD代謝物分析に先立ち、DAPTADと $^2\text{H}_4$ -DAPTADを尿分析に適用し、新たなビタミンD供給状態評価法を開発した。一方最近、他研究者によりマウス脳内に25(OH) $\text{D}_3$ が存在することが報告されたが、夾雑物との分離、検出感度とも十分ではなく、結果はかなり疑わしいものである。そこで、DAPTADを利用して十分な感度と精度を有する脳内ビタミンD代謝物分析法を開発し、これによりラット脳内25(OH) $\text{D}_3$ の存否を明らかにせんと検討したが、それを検出することができなかった。このようにビタミンD代謝物については、当初の予測とは異なり、ほとんど脳には存在しないものと考えられる結果が得られた。その一方で、DAPTAD、 $^2\text{H}_3$ -DAPTAD、 $^2\text{H}_6$ -DAPTADの3種EDRを用いる血中25(OH) $\text{D}_3$ のハイスループット定量法を開発し、ビタミンD代謝物濃度と精神疾患の関係を解明するためのツールを提供できた。さらにプロトン親和性の計算結果からDAPTADに勝る感度が得られる新規試薬、DEAPTADの開発にも成功した。

(6) 上述のように、脳内胆汁酸用EDRとしてDAPPZと $^2\text{H}_4$ -DAPPZを開発し、これらを

LC/ESI-MS/MSに組み込み、分析法を開発した。その結果、ラット脳から遊離型CA、CDCA、DCAを検出することに成功した。胆汁酸の脳組織からの抽出が大きな課題であったが、加熱エタノールを用いることで良好な結果が得られた。さらに、開発した分析法を用いて、上記胆汁酸の脳内レベル、これらの大部分が末梢由来であること、脳内への輸送はその脂溶性に依存した単純拡散である可能性が高いことなどを明らかとした。脳髄黄色腫症 (知能低下や言語障害が現れる) の治療にCDCAが有効であることが知られており、胆汁酸のNSとして役割を論じる上で重要な知見が得られた。

(7) その他の成果として、中長期のアンドロゲン産生状態評価法として、爪中T定量を開発した。本法はアンドロゲン産生量と精神疾患との解明に役立つものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

S. Ogawa, S. Ooki, K. Shinoda, T. Higashi: Analysis of urinary vitamin  $\text{D}_3$  metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with ESI-enhancing and stable isotope-coded derivatization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読あり, 406, 2014, 6647–6654, doi: 10.1007/s00216-014-8095-y.

T. Higashi, N. Aiba, T. Tanaka, K. Yoshizawa, S. Ogawa: Methods for differential and quantitative analyses of brain neurosteroid levels by LC/MS/MS with ESI-enhancing and isotope-coded derivatization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読あり, 117, 2016, 155–162, doi: 10.1016/j.jpba.2015.08.040.

T. Higashi, K. Yamagata, Y. Kato, Y. Ogawa, K. Takano, Y. Nakaaze, T. Iriyama, J. Z. Min, S. Ogawa: Methods for determination of fingernail steroids by LC/MS/MS and differences in their contents between right and left hands, *Steroids*, 査読あり, 109, 2016, 60–65, doi: 10.1016/j.steroids.2016.02.013.

S. Ogawa, H. Kittaka, K. Shinoda, S. Ooki, A. Nakata, T. Higashi: Comparative evaluation of new Cookson-type reagents for LC/ESI-MS/MS assay of 25-hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  in neonatal blood samples, *Biomedical Chromatography*, 査読あり, 30, 2016, 938–945, doi: 10.1002/bmc.3633.

T. Higashi, M. Yokota, A. Goto, S. Ogawa, K. Komatsu, T. Sugiura, M. Satoh, F. Nomura: A method for simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  and its 3-sulfate in newborn plasma by LC/ESI-MS/MS after derivatization with proton-affinitive Cookson-type reagent, *Mass Spectrometry*

(Tokyo), 査読あり, 5, 2016, S0051, doi: 10.5702/massspectrometry.S0051.

M. Satoh, T. Ishige, S. Ogawa, M. Nishimura, K. Matsushita, T. Higashi, F. Nomura: Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC/MS/MS for clinical laboratory applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読あり, 408, 2016, 7617-7627, doi:10.1007/s00216-016-9821-4.

T. Higashi, S. Ogawa: Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI-MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 査読あり, 162, 2016, 57-69, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.10.003.

T. Higashi, S. Ogawa: Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: a review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読あり, 130, 2016, 181-193, doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.033.

S. Ogawa, H. Kittaka, A. Nakata, M. Satoh, F. Nomura, T. Higashi: Enhancing analysis throughput, sensitivity and specificity in LC/ESI-MS/MS assay of plasma 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by derivatization with triplex DAPTAD isotopologues, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読あり, 136, 2017, 126-133, doi: 10.1016/j.jpba.2016.11.030.

T. Higashi, K. Shimada: Application of Cookson-type reagents for biomedical HPLC and LC/MS analyses: a brief overview, *Biomedical Chromatography*, 査読あり, 31, 2017, e3808, doi: 10.1002/bmc.3808.

[学会発表](計16件)

東 達也: 低分子化合物のLC/ESI-MS/MS用誘導体化: 検出感度の向上と構造微小差の弁別, 第39回日本医用マススペクトル学会年会, 2014年10月16日, 三井ガーデンホテル千葉 (千葉県・千葉市).

大木 智, 篠田健太, 小川祥二郎, 東 達也: ESI増強重水素標識試薬を用いた尿中ビタミンD<sub>3</sub>代謝物のLC/MS/MS分析法の開発, 第39回日本医用マススペクトル学会年会, 2014年10月17日, 三井ガーデンホテル千葉 (千葉県・千葉市).

相葉尚人, 田中智哉, 小川祥二郎, 東 達也: ESI活性重水素標識試薬を用いるラット脳内神経活性ステロイド分析法の開発, 日本薬学会第135年会, 2015年3月27日, 神戸サンボーホール (兵庫県・神戸市).

小川祥二郎, 高藤季里子, 堀江裕紀子, 池川繁男, 東 達也: カルボン酸用新規ESI増強重水素標識試薬の合成とLCにおける同位体効果の評価, 日本薬学会第135年会, 2015年3月27日, 神戸サンボーホール (兵庫県・神戸市).

小川祥二郎, 加藤由那, 高野 香, 中畔勇太郎, 山形憲一郎, 関 俊哲, 東 達也: ステロイド検査試料としての爪の評価: 左右の手の爪中ステロイドの含量差, 第40回日本医用マススペクトル学会年会, 2015年9月18日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市).

都丸晃輝, 小川祥二郎, 渡辺趣衣, 眞野成康, 東 達也: カルボン酸用ESI活性誘導体化試薬の開発と生体試料分析への応用, 第26回クロマトグラフィー科学会議, 2015年11月11日, 九州大学医系キャンパス コラボレーション (福岡県・福岡市).

相葉尚人, 田中智哉, 大和 遼, 吉澤一巳, 小川祥二郎, 東 達也: ESI増強重水素試薬を用いる脳内神経活性ステロイドのレベル変動解析, 第26回クロマトグラフィー科学会議, 2015年11月11日, 九州大学医系キャンパス コラボレーション (福岡県・福岡市).

小川祥二郎, 都丸晃輝, 渡辺趣衣, 眞野成康, 東 達也: ESI増強誘導体化試薬を用いるラット脳内胆汁酸のLC/MS/MS定量, 日本薬学会第136年会, 2016年3月28日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

東 達也: 誘導体化 - LC/ESI-MS/MSによる新生児ビタミンD欠乏症の精密診断法の開発, 第64回質量分析総合討論会, 2016年5月19日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府・吹田市).

橋高宏貴, 中田彬穂, 小川祥二郎, 東 達也: DAPTADアイソトポログを用いた血漿中25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>の高感度・ハイスルーブットLC/ESI-MS/MS分析法の開発, 第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2016年9月2日, 京都大学桂キャンパス (京都府・京都市).

小川祥二郎, 高野 香, 中畔勇太郎, 関 俊哲, 東 達也: 非侵襲ステロイド検査試料としての爪の有用性, 第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2016年9月2日, 京都大学桂キャンパス (京都府・京都市). 横田麻衣, 後藤彩佳, 小川祥二郎, 小松賢司, 杉浦崇浩, 東 達也: LC/ESI-MS/MSを用いた新生児血漿中25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>及びその硫酸抱合体の同時定量, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月14日, 北海道大学工学部 (北海道・札幌市).

小川祥二郎, 渡部ひとみ, 茶谷 仁, 島田洋輔, 恒岡弥生, 後藤 了, 東 達也:

Cookson型誘導体化試薬のESI-MS/MS分析における感度向上能と量子計算に基づくプロトン親和力との関係,日本分析化学会第65年会,2016年9月16日,北海道大学工学部(北海道・札幌市).

松本孝彬,山崎 航,小川祥二郎,三田村邦子,池川繁男,東 達也:ICD-LC/ESI-MS/MSによる尿中テトラヒドロコルチコステロイドグルクロニドの定量法の開発:日本薬学会第137年会,2017年3月27日,仙台国際センター(宮城県・仙台市).

小川祥二郎,渡部ひとみ,茶谷 仁,島田洋輔,坪郷 哲,後藤 了,東 達也:種々のCookson型試薬による7-dehydrocholesterol誘導体のプロトン親和力とESI-MS感度との関係,日本薬学会第137年会,2017年3月27日,仙台国際センター(宮城県・仙台市).

河俣圭太,前川正充,三枝大輔,小川祥二郎,東 達也,山口浩明,眞野成康:誘導体化LC/ESI-MS/MSを用いるコレステロール代謝物の網羅的分析系の構築,2017年3月27日,日本薬学会第137年会,仙台国際センター(宮城県・仙台市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
なし

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

東 達也(HIGASHI TATSUYA)  
東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号:90272963

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし