

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860686

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおけるリポドミクス解析～高感度中性脂肪測定系の開発

研究課題名(英文)Lipidomic analysis of metabolic syndrome : Development of a sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for triacylglycerol

研究代表者

上野 紀子(Noriko, Ueno)

秋田大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：90546631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの評価指標の一つであるトリアシルグリセロール(TAG)は総量やサブクラスでの量的評価はあるが、TAG分子種の量的評価は困難であった。本研究では液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)を用い、高分離なLC系の構築と高感度で量的評価が可能なTAG分子種の測定方法を開発した。このTAG分子種測定系と既報のリン脂質などの測定系を合わせ脂質分子種の一斉測定系を確立した。本研究で開発された脂質の一斉測定系はTAG分子の質的变化、および脂質全体の質的变化を評価出来ることが示された。

研究成果の概要(英文)：High levels of triacylglycerols (TAG) in the blood are associated with risk of the metabolic syndrome. It is hard to do the quantitative analysis of TAG molecular species using currently available methods, although it can apply to the quantitative analysis of total TAG and/or its subclass. In this study, I developed a novel analysis method, which is a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for the high separative, high sensitive and qualitative TAG analysis. Furthermore, this method is able to also measure many lipid metabolites such as phospholipid and cholesteryl ester, diacylglycerol. In future, I aim at the elucidation of a biological phenomenon by global and/or specific comprehension of biological lipids using established method.

研究分野：脂質生化学 脂質分析学

キーワード：トリアシルグリセロール 質量分析 リポドミクス

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の2位心疾患、3位脳血管障害の危険率を上げるメタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常のうち2つ以上が合併した状態をさし、中高年男性の2人に1人はメタボかその予備軍とされる。メタボリックシンドロームの診断は腹囲周り、血中トリアシルグリセロール (TAG)・HDL コレステロール、血圧、空腹時血糖値を基準としている。临床上は総量として取り扱われる TAG は、個々の生理機能を持つ脂肪酸の3個の組み合わせにより構成される。哺乳類の脂肪酸は20種類以上あることから TAG の分子種は1000種以上あると推定されるが、現在までに報告のある生体内の TAG 分子種は約100種程度である。

これまでの TAG 分子種の液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いた生体試料の応用例は、分子種の同定のみ、サブクラスの混合物としての量的評価、もしくは一部の分子種の定量のみであった。これは、TAG 分子種が類似した脂肪酸3種から構成されており、LCでの分離が難しいこと、MSでは質量として分離できるものはグリセロール骨格に加えた3つの脂肪酸の合計値のサブクラスまでであり炭素数と不飽和度の合計値が同一のものとの区別が出来ないこと (サブクラスが炭素数 54、不飽和度 6 (54:6) の場合、18:2/18:2/18:2、16:0/18:2/20:4、16:0/16:0/22:6 などが同一質量) MS2 解析では3つのうち1つの脂肪酸の脱離のフラグメントで評価するため、1つのチャンネルでは TAG 分子種の1つの脂肪酸しか同定出来ず残りの2つの脂肪酸の組み合わせの評価が出来ないことが理由と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メタボリックシンドロームのような病態への生体応用が可能な高感度 TAG 分子種測定系の開発を目的とした。また、開発した TAG 分子種に加えコレステロールエステル、リン脂質の各分子種と合わせ一斉測定系を確立することで、今後メタボリックシンドロームの病態における脂質変動から、病因の解明および薬物治療への貢献、バイオマーカーの発見を目指すものである。

3. 研究の方法

LC の高分離系の確立  
LC-MS/MS を用いた TAG 分子種の高感度測定系の確立  
高感度 TAG 分子種測定系と既存のリ

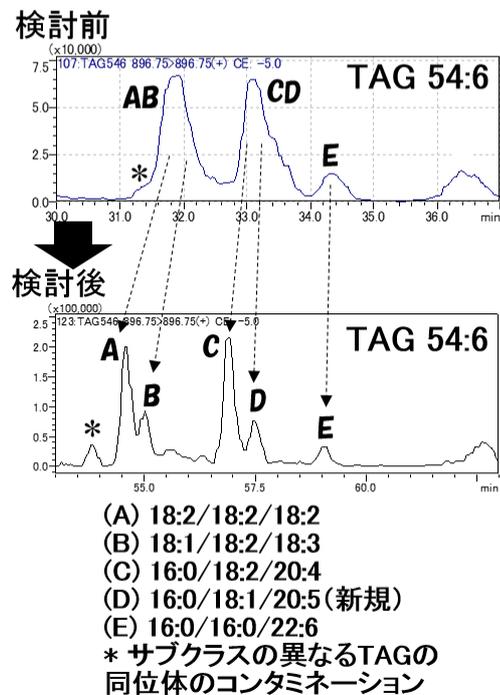
ン脂質、コレステロールエステル測定系を組み合わせた網羅的一斉測定法の確立

生体試料への応用

4. 研究成果

TAG 分子種の高分離 LC 測定系の確立を島津製作所の LCMS-8040 (三連四重極型 MS) を使用し試みた。様々なカラムや溶媒、グラジエント条件を試み TAG 分子種の分離度を0.6から1.0程度にまで向上させることが出来た (図1)。マウス肝臓脂質抽出物に適用した結果、TAG54:6 のサブクラスを例にするとこれまでの3本のピークを5本に分離することに成功した。またピーク A の直前にあった他の TAG サブクラスの同位体ピークのコンタミネーションを分離することができるようになった。

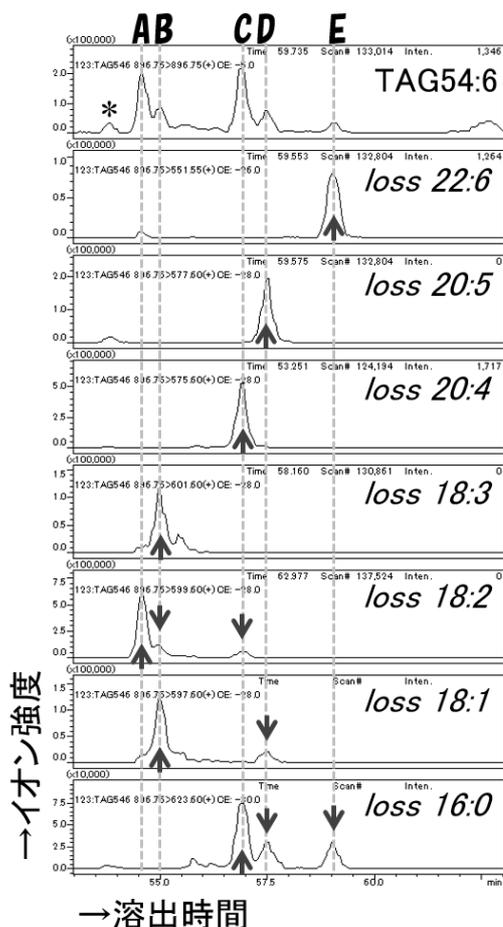
図1 LCによるマウス肝臓における TAG分子種の分離



LC-MS/MS を用いた TAG 分子種の高感度測定系の確立を試みた。感度が良く定量性の高い方法として用いられる多重反応モニタリング (MRM) 法は、イオン化した分子の質量電荷比であるプリカーサーイオンを Q1 に、そのフラグメントイオンを Q3 としその組み合わせでチャンネルを作成するが、分子種の1つの Q1 に対し Q3 は1つか2つ程度を設定することが一般的である。しかし TAG 分子種は1つ Q1 (サブクラス) に対しフラグメントとして検出が想定される脂肪酸脱離は多様である。TAG54:6 を例とすると生体試料中の含有脂肪酸種はの例と

して 16:0、18:1、18:2、18:3、20:4、20:5、22:6 が挙げられる。そこで TAG54:6 の Q1 に対し上記 7つの脂肪酸脱離フラグメントを Q3 とする MRM チャンネルを作成した。マウス肝臓組織脂質抽出物に適用した結果、図 2 に示すピークは A が 18:2/18:2/18:2、B が 18:1/18:2/18:3、C が 16:0/18:2/20:4、E が 16:0/16:0/22:6 であることが示された。それに加えこれまでマウス肝臓では報告のなかったピーク D 16:0/18:1/20:5 の同定に成功した。

図2 高感度TAG測定系への適応例  
マウス肝臓 (TAG54:6)



- 溶出時間
- (A) 18:2/18:2/18:2
  - (B) 18:1/18:2/18:3
  - (C) 16:0/18:2/20:4
  - (D) 16:0/18:1/20:5 (新規)
  - (E) 16:0/16:0/22:6
- \* サブクラスの異なるTAGの同位体のコンタミネーション

本測定系は、TAGの3つの脂肪酸のうち1つが決定できる(loss)MRMチャンネルを組み合わせ、溶出時間が一致するピークと組み合わせ分子種を同定する測定系である。Dのピークはこれまで報告のない分子種。

同様の考え方で各 TAG サブクラス Q1 に対し想定可能な脂肪酸脱離フラグメントを Q3 として設定した。常時これらの MRM チャンネルで測定することで、存在する TAG 分子種のポジティブリストのみ

ならず、ないこと(検出限界以下)の証明も容易になった。また、従来の定性法 MS2 の欠点であった量の多い分子種と溶出時間の近い少量の分子種の検出が困難な点も、本測定系では分子種が異なれば必ず量の多い分子種とは別な Q3 の脂肪酸脱離チャンネルで検出できるため測定上の感度の向上も可能とした。本手法はチャンネル数が膨大になり 1 ピークに対する測定速度が不足するため、スケジュールド MRM 法にて測定時間の調整を行った。これらの結果、TAG 分子種の測定上の高分離化と高感度化を可能にした。

高分離、高感度化した TAG 分子種の測定系に、既報のリン脂質、コレステロールエステル、ジアシルグリセロールなどの分子種の測定系のスケジュールド MRM チャンネルを追加し、多様な脂質の一斉測定系を確立した。本測定系は 2391MRM チャンネル 120 分の測定系とした。

生体試料への応用として構築した本測定系を TAG 総量が増加する刺激を行った肝臓由来細胞に適用した。その結果、22:6 (DHA) を含む多価不飽和脂肪酸含有 TAG 分子種の増加がみられた。飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸からなる TAG 分子種では変化なし、もしくはやや減少傾向にあった。これはコレステロールエステルでも同様であった。リン脂質中の脂肪酸組成は DHA 含有リン脂質の減少傾向、他の脂肪酸については分子種により増減がみられた。すなわち、DHA 含有脂質として増加した分子種は中性脂質 (TAG とコレステロールエステル) のみであることを見出し、TAG 分子の質的变化、および脂質全体の質的变化を見ることが出来る測定系の構築に成功した(投稿準備中)。

現在、ヒト非アルコール性脂肪肝炎や高脂肪食負荷マウスの試料について測定、検討を行っている最中である。

本測定系はこれまで困難であった TAG 分子種の脂肪酸の組み合わせの同定とそれらの量的評価を可能とし、同時に他の脂質分子種と併せることで、脂質全体の質的变化と量的変化の評価を可能とした。本研究により得られる結果はメタボリックシンドロームの病態の解明に寄与できるものと考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

森井 真也子, 上野 紀子, 中西 広樹,

蛇口 琢, 渡部 亮, 佐々木 雄彦, 妹尾 春樹, 吉野 裕顕

3系脂肪酸製剤の長期単独投与例、査読なし、小児外科 (0385-6313)48 巻 1号、2016、pp.55-62

Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T.

INPP4B Is a PtdIns(3,4,5)P3 Phosphatase That Can Act as a Tumor Suppressor. 査読有, Cancer Discov. 2015, Vol. 5, No. 7, pp. 730-739. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-1329.

〔学会発表〕(計1件)

Noriko Ueno, Yoshitaka Taketomi, Kei Yamamoto, Tetsuya Hirabayashi, Hiroki Nakanishi and Makoto Murakami  
Analysis of two major intracellular phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in mast cells reveals crucial contribution of cPLA<sub>2</sub>, not iPLA<sub>2</sub>, to lipid mobilization in proximal mast cells and distal fibroblasts., 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015), Tokyo, Japan, Feb 10-12, 2015. No. P-013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~arcb>

s/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 紀子 (UENO, Noriko)

秋田大学・生体情報研究センター・科研費研究員

研究者番号: 90546631

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: