

課題番号 20

LC-MS/MS によるプラズマローゲンの新規定量法の開発: アルツハイマー病患者血液のプラズマローゲンの精密定量

[1] 組織

代表者：山下慎司

(帯広畜産大学食品科学研究部門)

対応者：荒井啓行 (東北大学加齢医学研究所)

古川勝敏 (東北大学加齢医学研究所)

分担者：木下幹朗 (帯広畜産大学食品科学)

仲川清隆 (東北大学大学院農学研究科)

宮澤陽夫 (東北大学未来科学技術共同
研究センター)

研究費：物件費 45 万円，旅費 0 万円

[2] 研究経過

高齢化社会の現代、アルツハイマー病 (AD) の急増に伴い、AD の早期発見が急務となっている。AD の新規バイオマーカーの最も有力な候補としてプラズマローゲン (Pls) が注目されている。Pls とは神経細胞膜を構成する主要なリン脂質であり、*sn-1* 位に特徴的なビニルエーテル結合を有する。Pls には、極性基にエタノールアミンもしくはコリンを有するエタノールアミン型 Pls (PlsEtn) とコリン型 Pls

(PlsCho) がある。さらに *sn-1* と *sn-2* 位にはそれぞれ異なる脂肪酸を持つため、その分子種は極めて多様である。これまで Pls には神経保護作用や抗酸化作用、細胞膜の流動性に重要であることが報告されている。さらに AD を初めとする神経疾患患者の脳や血液においてこれらの低値が示唆されている (図 1)。

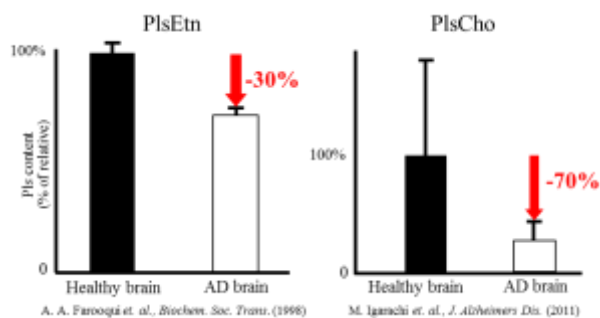


図 1) AD 患者脳における Pls の減少

こういった背景から、Pls を分子種レベルで精密分析することにより、詳細な AD 情報が得られることが期待される。しかしながら、生体内の Pls は分子種が多様かつ微量で分析が困難であるため、臨床へのバイオマーカーとしての応用はほとんどなされていない。我々はこれまで、Pls を分子種レベルで分析できる方法の開発に取り組み、高速液体クロマトグラフィー-蒸発光散乱検出 (HPLC-ELSD) や HPLC-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) による方法を考案してきた。また、最近 MS/MS において PlsEtn と PlsCho がアルカリ金属存在下で特異なプロダクトイオンを生じることを見いだした (図 2)。そこで、我々は本法を応用することで、生体サンプル中の PlsEtn と PlsCho を精密に定量する方法を確立できると考えた。本研究では、血漿中 Pls を分子種レベルで精密定量する方法を確立し、Pls のバイオマーカーへの応用性を評価することを目指した。まず Pls の分析法および血漿からの抽出法の確立を行い、次に、臨床サンプルへと応用するために、加齢研の荒井教授、古川准教授とメールおよび以下の日程で打ち合わせを行い、分析対象とする AD 患者の年齢・性別・ステージを決定した。

2015 年 11 月 28 日 荒井・宮澤・山下 (出雲)

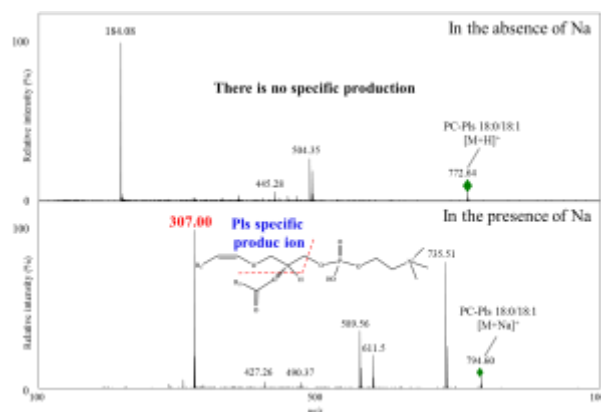


図 2) Pls の MS スペクトル (プロダクトイオンスキャン)

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。第1に、PlsEtn (PE-18:0p/18:1, 18:0p/20:4, 18:0p/22:6) と PlsCho (PC-18:0p/18:1, 18:0p/20:4, 18:0p/22:6) を精密に定量する LC-MS/MS 分析法を確立した。LC-MS/MS の条件にはアルカリ金属としてナトリウムを用いることで、Pls を特異的かつ高精度に分析することができた。第2に、人の血漿からの Pls 抽出方法を確立した。本法は従来の方法と比較して非常に簡便かつ安定して Pls をほぼ100%抽出できる画期的な方法である。最後に、これらの方法を用いて今まで知り得なかった AD 患者の血漿中 Pls 分子種とその絶対量を明らかにすることに成功した。

(3-2) 波及効果と発展性など

PlsEtn と PlsCho を分子種レベルで精密に定量できる方法は、世界の多くの研究者が取り組んでいるものの、達成されていなかった。今年度確立した PlsEtn と PlsCho の精密定量法は、Pls の生理学的な機能を明らかにする最も有力な方法であると申請者らは確信している。引続き加齢研の荒井教授、古川准教授にご協力いただき、対象とする AD ステージと血漿サンプル数の規模を拡大させ、Pls 定量値を明らかにすることで、バイオマーカーとしての応用性を精査する。本研究を遂行することで、AD 患者の血液中 Pls 量の増減を明らかにすることができる。いずれかの Pls 分子種が AD のバイオマーカーになり得れば、早期発見と予防法解明の進展につながる。そのため、本研究の社会的意義は極めて大きいと言える。

また、現在 Pls は神経系疾患のみならず、様々な疾病への関与が示唆されている。その注目度は極めて高く、本年度開発した Pls 分子種分析法を基盤とした共同研究へと発展している。具体的には鬱病患者、動脈硬化症患者、急性膵炎患者、small vessel disease 患者の血漿を分析することとなっている。これらの発展により、Pls の生理学的な機能を明らかにするだけでなく、そのバイオマーカーとしての可能性が広がることとなる。

[4] 成果資料

[原著論文]

1. 山下慎司, 木下幹朗, 仲川清隆, アルツハイマー型認知症におけるプラズマローゲンの意義、プラズマローゲン分子種のバイオマーカーとしての可能性。化学と生物, in press (2016)
2. S. Yamashita, S. Kanno, A. Honjo, Y. Otoki, K. Nakagawa, M. Kinoshita and T. Miyazawa, Analysis of plasmalogen species in foodstuffs, *Lipids*, 51, 199-210 (2016)
3. S. Yamashita, T. Kiko, H. Fujiwara, M. Hashimoto,

K. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Furukawa, H. Arai, and T. Miyazawa, Alterations in the levels of amyloid-beta, phospholipid hydroperoxide, and plasmalogen in the blood of patients with Alzheimer's disease: possible interactions between amyloid-beta and these lipids, *J. Alzheimers Dis.*, 50, 527-537 (2015)

4. Y. Otoki, K. Nakagawa, S. Kato, T. Miyazawa, MS/MS and LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation, *J. Chromatogr. B*, 1004, 85-92 (2015)
5. S. Yamashita, S. Kanno, K. Nakagawa, M. Kinoshita and T. Miyazawa, Extrinsic plasmalogens suppress neuronal apoptosis in mouse neuroblastoma Neuro-2A cells: importance of plasmalogen molecular species. *RSC Adv.*, 5, 61012-61020 (2015)

[学会発表]

1. 乙木百合香, 仲川清隆, 加藤俊治, 荒井敬行, 古川勝敏, 宮澤陽夫, LC-MS/MS によるコリン型及びエタノールアミン型プラズマローゲンの精密定量。日本農芸化学会東北支部第150回大会 (2015年10月、仙台)
2. 山下慎司, 菅野範, 本庄亜矢子, 仲川清隆, 木下幹朗, 宮澤陽夫, 食品中に含まれるプラズマローゲン分子種の定量とその神経保護効果。日本油化学会第54回年会 (2015年9月、名古屋)
3. 乙木百合香, 仲川清隆, 加藤俊治, 木村ふみ子, 宮澤陽夫, LC-MS/MS によるコリン型及びエタノールアミン型プラズマローゲンの精密定量。日本油化学会第54回年会 (2015年9月、名古屋)
4. 山下慎司, 喜古健敬, 仲川清隆, 古川勝敏, 荒井敬行, 宮澤陽夫, アルツハイマー型認知症患者の血液中でのリン脂質量の変化-アミロイドβとリン脂質の相互作用。日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第23回年会 (2015年8月、仙台)
5. 山下慎司, 山田有紗, 乙木百合香, 仲川清隆, 木下幹朗, 宮澤陽夫, 畜産物由来プラズマローゲンの詳細分析。平成27年度日本農芸化学会北海道支部講演会 (2015年8月、帯広)
6. 乙木百合香, 加藤俊治, 仲川清隆, 宮澤陽夫, LC-MS/MS によるエタノールアミン型、コリン型プラズマローゲンの精密定量法の確立。第57回日本脂質生化学会 (2015年5月、東京)
7. Y. Otoki, S. Kato, K. Nakagawa, T. Miyazawa, LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metals adduct. 12th Asian Congress of Nutrition (May, 2015, Yokohama)
8. Y. Otoki, S. Kato, K. Nakagawa, T. Miyazawa, LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation. 106th AOCS Annual Meeting & Industry Showcases (May, 2015, Orlando, Florida, USA)