

課題番号 22

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)
 分担者：古川 勝敏 (東北医科薬科大学医学部)
 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)
 乙木百合香 (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 40 万円、旅費 0 万円

[2] 研究経過

高齢化の進展により、健康寿命延伸に向けた病気の早期発見・予防に寄与する血中バイオマーカーの研究・開発が求められている。リン脂質の一つであるプラズマローゲン (Pls) は、アルツハイマー病 (AD) を初めとする神経疾患患者の脳や血中において低値となることが示唆されてきた (図 1 A)。先に、我々は Pls の持つ神経細胞保護作用が Pls 分子種により異なることを認めた (図 1 B)。これらのことから、血中の Pls の分子種レベルでの解析により、神経疾患のバイオマーカー候補の発見につながる可能性が考えられる。しかしながら、Pls は多様な分子種が存在しており、その分子種分析は極めて困難でいまだ不明な点が多い。

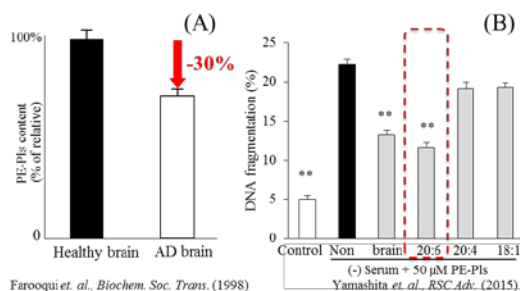


図 1 A) AD 者脳中の Pls 減少と B) Pls の神経死抑制

そこで我々は、前報において (平成 27 年度 課題番号 20)、血漿中 Pls を分子種レベルで精密定量できる方法の開発に取り組み、この方法を確立した。本年度は、本法を駆使して、種々の神経疾患の血液サンプルを分析し、AD をはじめとする神経疾患における Pls の役割や、バイオマーカーとしての可能性を明らかにしようとした。

具体的には、はじめに、ヒト血漿の Pls 分子種に加え、一般的なリン脂質であるジアシル型のリン脂質の分子種分析も行えるように、方法の改良を行った。次いで、AD 者血漿中の Pls およびジアシル型リン脂質の各分子種を定量した。

さらに、種々の神経疾患患者 (季節性情動性障害者および多発性硬化症者) の血漿中 Pls の分析を行った。季節性情動性障害では、うつ状態と Pls の関連を評価するため、うつが悪化する冬および健常時の血漿 Pls を測定した。多発性硬化症では、健常者および多発性硬化症者、認知症を併発している多発性硬化症者の血漿 Pls を定量した。

なお、本研究の実施にあたっては、加齢医学研究所の荒井教授と下記日程で測定項目や論文化などについて打ち合わせつつ、研究を進めた。

- 2016 年 6 月 1 日 荒井・宮澤・仲川 (メール)
- 2016 年 7 月 20 日 荒井・宮澤・仲川 (メール)
- 2016 年 11 月 10 日 荒井・古川・宮澤・仲川・乙木・山下 (メール)
- 2016 年 11 月 18 日 荒井・山下 (出雲)

[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。
 第一に、ヒト血漿中 Pls 分子種 (PE-Pls: PE-18:0p/18:1, 18:0p/20:4, 18:0p/22:6 と PC-Pls: PC-18:0p/18:1, 18:0p/20:4, 18:0p/22:6) およびジアシル型リン脂質分子種を精密に定量する LC-MS/MS 分析法を確立し (図 2)、AD 者の血漿中 Pls 分子種お

よびジアシル型リン脂質濃度を明らかにし、その成果を論文化した（原著論文1）。

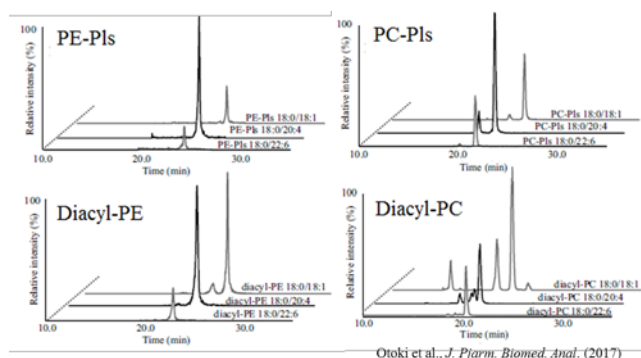


図2 血漿各種リン脂質のMRM クロマトグラム

第二に、AD 以外の神経疾患（季節性情動性障害者、多発性硬化症）の血漿中 Pls 濃度を明らかにした。季節性情動性障害者の血漿では、DHA を有する Pls 分子種レベルがうつ病の亢進度合いと負の相関を示すことが明らかになった。

また、多発性硬化症者と認知症の関連を明らかにした。多発性硬化症者を併発している患者の血漿のみでDHA を有するPE-Pls 量が有意に低値であった。

（3-2）波及効果と発展性など

生体試料における Pls 分子種レベルでの精密定量法は、世界の多くの研究者が取り組んでいるものの、十分には達成されていなかった。我々が確立した生体中 Pls 分子種の精密定量法は *J. Pharm. Biomed. Anal.* に掲載され、国際会議での発表や海外の研究機関との共同研究へと発展した（学会発表 1, 3, 7, 8）。成果に記した季節性情動性障害と多発性硬化症の分析は、カリフォルニア大学デービス校およびトロント大学との共同研究である。このように、本研究で確立した方法は、世界で注目され、今後もさらに発展することと期待される。

[4] 成果資料

[原著論文]

1. Otoki Y., Kato S., Kimura F., Furukawa K., Yamashita S., Arai H., Miyazawa T., Nakagawa K., Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 134, 77-85 (2017)

[学会発表]

1. 乙木 百合香、加藤 俊治、Hennebelle M.、Taha A.Y.、Swardfager W.、宮澤 陽夫、仲川 清隆、

プラズマローゲン分解物や関連化合物の定量法確立と臨床サンプル測定. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月、京都)

2. 上吉原 怜奈、乙木 百合香、伊藤 隼哉、加藤 俊治、山下 慎司、池田 郁男、宮澤 陽夫、仲川 清隆、エタノールアミン型プラズマローゲンの吸収評価：とくにコリン型への変換について. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月、京都)
3. 乙木 百合香、加藤 俊治、Taha A.Y.、Hennebelle M.、Swardfager W.、宮澤 陽夫、仲川 清隆、血漿プラズマローゲン定量法の確立と臨床サンプル測定への応用. 2016 年度日本農芸化学会東北支部大会 (2016 年 10 月、仙台)
4. 乙木 百合香、加藤 俊治、古川 勝敏、荒井 啓行、木村 ふみ子、Swardfager W.、Hennebelle M.、Taha A.Y.、宮澤 陽夫、仲川 清隆、血漿プラズマローゲン定量法の確立と臨床サンプル測定への応用. 日本油化学会第 55 回年会 (2016 年 9 月、奈良)
5. 仲川 清隆、LC-MS/MS 解析による「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」と「プラズマローゲン含有素材の有用性」の評価. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年 5 月、神戸)
6. 山下 慎司、橋本 道男、仲川 清隆、木下 幹朗、紫藤 治、宮澤 陽夫、ホヤ内臓由来エタノールアミングリセロリン脂質投与によるアルツハイマーモデルラットの認知行動改善. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年 5 月、神戸)
7. Otoki Y., Kato S., Kimura F., Furukawa K., Arai H., Swardfager W., Taha A.Y., Nakagawa K., Miyazawa T., Selective and accurate LC-MS/MS method for determination of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma. 107th AOCS Annual Meeting and Short Courses (May, 2016, Salt Lake City, Utah, USA)
8. Otoki Y., Kato S., Kimura F., Furukawa K., Arai H., Nakagawa K., Miyazawa T., Accurate quantification of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Experimental Biology 2016 (EB2016) (April, 2016, San Diego, California, USA)