

# 疫学手法と脂質メタボローム解析技術の融合による メタボリック症候群予防のためのバイオマーカー探索研究

理化学研究所 統合生命医科学研究センター メタボローム研究チーム  
上級研究員 池田 和貴

(共同研究者)

慶應義塾大学 先端生命科学研究所 研究員 太田 匡俊  
慶應義塾大学 先端生命科学研究所 研究員 石川 貴正

## はじめに

メタボリック症候群は、糖尿病のみならず、がんあるいは認知機能低下など幅広い疾患との関連が明らかになりつつあり、高齢社会を迎えたわが国の健康寿命延伸のためにも、効果的な予防手法の確立が急がれている。これまでに、肥満あるいは運動習慣、食事習慣といった要因との関連性は疫学的に一部明らかになっているものの、より正確かつ早期な予防のためには、その発症機序の基づいたバイオマーカーの活用が欠かせない。しかしながら、従来の疫学研究の多くは、一部の脂質代謝物だけに注目しているために変動探索の範囲が狭く、有効な予防マーカーの発見は困難であった。本研究では、これらの問題点を改善するために、網羅的かつ安定的な探索が可能な高感度な脂質メタボローム解析の基盤技術の構築を進めた。

## 結 果

### ① LC-MSによるヒト血漿中の脂質の網羅的探索

生体内には様々な炭素数や不飽和度の異なる脂肪酸が存在しており、リン脂質などには脂肪酸の種類や結合様式の違いによってバリエーションに富んだ分子種が存在する。このような多様な脂質分子種およびその代謝物を解析するには、いかに網羅的に探索ができるかが、その生物学的意義の理解においても重要である。しかしながら、従来のメタボローム解析の多くが、一部の脂質代謝物だけにフォーカスしているために、分析上で想定される範囲内の脂質しか捉えられず、網羅的な変動情報を十分に得ることが難しい。このため、想定外の新しい代謝変化の発見や、未知の化合物の同定に至るのも困難である。これらの課題を解決する手法として、現在我々が取り組んでいる高分解能な四重極飛行時間型 (Q-TOF) MS/MSを用いた高速のData dependent スキャンによるターゲットディスカバリー型のメタボローム解析法は、網羅的に脂質の変動探索を行うアプローチとして有効であると考えられる<sup>1,2)</sup> (図1)。

本研究では、ヒト血漿を用いて、Folch 改変法から総脂質を抽出し、逆相液体クロマトグ

ラフィー (RPLC) で分離後に Q-TOF MS/MS 分析を行った<sup>3)</sup> (0.1  $\mu$ L 相当)。その結果、約 6,000 個の MS/MS データ (同位体やノイズなどを含む) を取得でき、リポタンパク質及び胆汁酸の構成成分であるリン脂質や中性脂質が数多く検出された (図 2)。

図 1

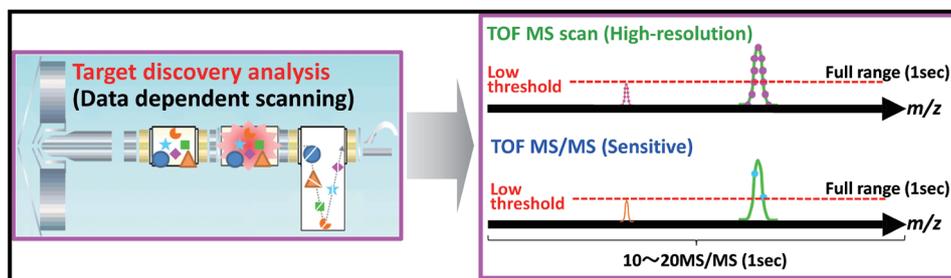
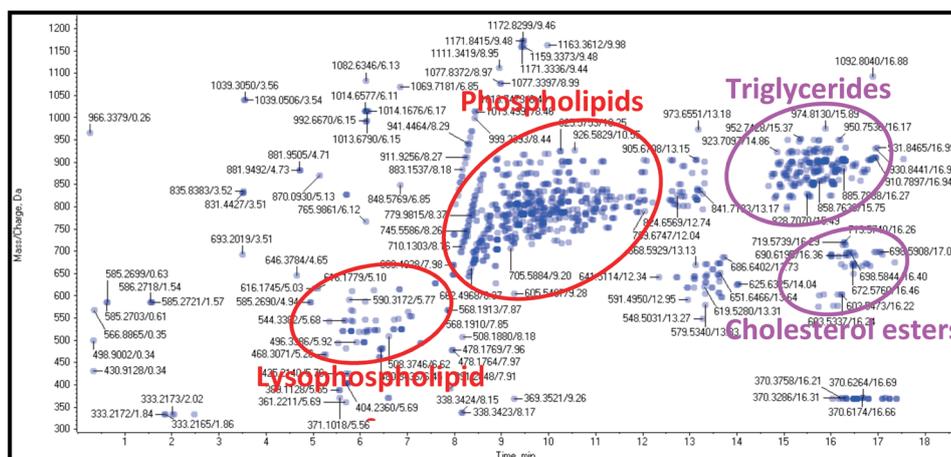


図 2



## ② 新たなアルゴリズムによるリン脂質の高精度な自動同定システム開発

リン脂質は、グリセロール-3-リン酸にコリン、エタノールアミン、セリン、イノシトールなどの水酸基を有する極性基とのリン酸ジエステルに 2 分子の脂肪酸がエステル結合したものであり、それぞれホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジン酸 (PA) などと呼ばれる。また、リン脂質は、肥満増悪や心血管病リスクとなる飽和脂肪酸や炎症のメディエーターとして知られるエイコサノイド (プロスタグランジン、ロイコトリエンなど) 生成の基質供与体となるために、その構成脂肪酸の詳細な解析は重要である。しかしながら、様々な分子種が存在するリン脂質の標準物質をすべて入手することは困難であるために、取得データ中からいかに効率的に構造解析を進めるかが鍵となるが、これまで高精度かつハイスループットな脂質同定システムは、十分に確立されていないのが現状である。

本研究では、取得した網羅的な Data dependent スキャンデータに関して、従来よりも同定精度の高い MS/MS 解析技術に取り組んだ。実データから各クラスのリン脂質を同定に必要な MS/MS フラグメントピークを選定し、新たに “Knockout selection” というアルゴリズムを考案して、各フラグメントピークのグループ化 (Stage 分類) や重み付け (Stage 優先度)

をして同定精度の向上を試みた(実装するためのソフトウェアのプログラミングに関しては、三井情報株式会社に委託)(図3)。その結果、正答率がほぼ100%に到達するレベルまでに達し、高精度でハイスループットなリン脂質同定が可能となった(図4 ※PCの同定結果を一例として掲載)。

図3

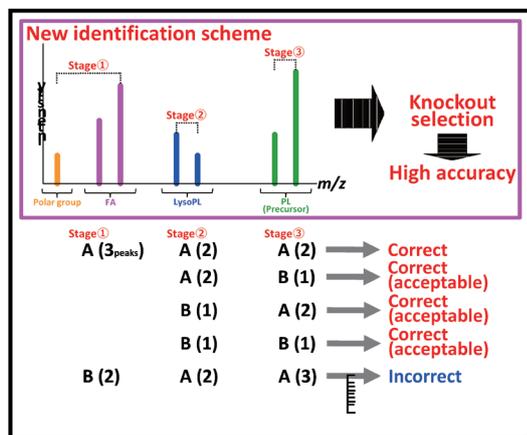


図4

PC (Diacyl type)	
28:0	PC(14:0/14:0)
32:0	PC(16:0/16:0)
33:1	PC(16:0/17:1)
34:0	PC(16:0/18:0)
35:1	PC(17:1/18:0)
36:1	PC(18:0/18:1)
37:2	PC(19:0/18:2)
38:2	PC(20:2/20:2)
39:3	PC(20:3/20:3)
40:4	PC(20:4/20:4)
42:8	PC(20:2/22:6)

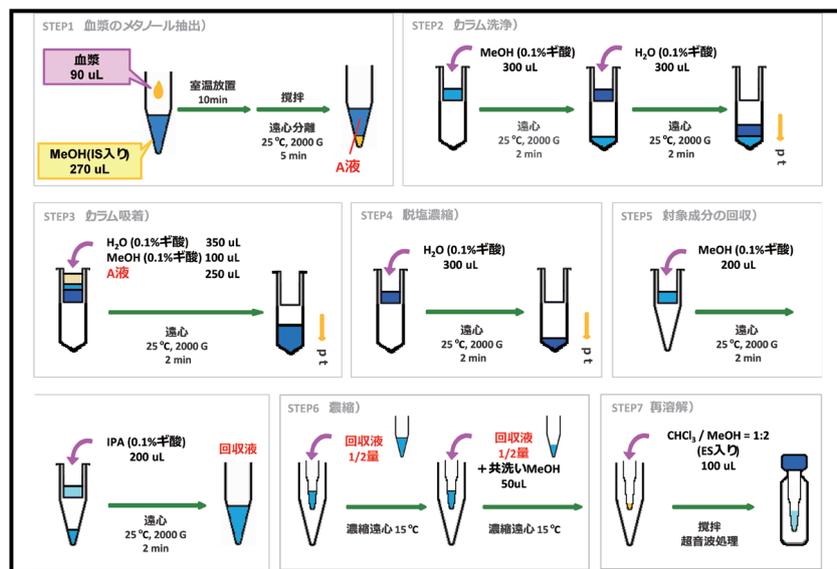
37:2	PC(19:0/18:2)
38:2	PC(18:0/20:2, 18:2/20:0)
39:3	PC(18:0/20:3, 18:1/20:2, 18:2/20:1)
40:4	PC(18:0/20:4, 18:1/20:3, 18:2/20:2)
41:5	PC(16:0/22:5, 18:1/20:4)
42:6	PC(16:0/22:5, 18:0/20:5, 18:1/20:4)
43:7	PC(16:0/22:6)
44:8	PC(18:1/20:5, 18:2/20:4)
45:9	PC(18:2/20:5, 18:3/20:4)
46:10	PC(18:0/22:6)
47:11	PC(20:2/20:4)
48:12	PC(20:2/22:6)

Classification: AAA, ABA, AAB, ABB

### ③ 脂質メディエーターの包括的な探索法の開発

LC/Q-TOF MS/MSによるヒト血漿のターゲットディスカバリー型のメタボローム解析では、リン脂質や中性脂質といったメジャーな代謝物の探索は可能であるが、微量で生理活性の高い脂質メディエーターをより安定的に解析するには、前処理法や分析法のさらなる検討が必要であった。

図5



本研究では、前処理法に関して、従来よりも簡便かつ迅速に行うために、スピンフィルターを用いた手法に取り組んだ(図5)。また、LC-MS分析では、より高感度な三連四重極型MSを用いたワイドターゲット型のメタボローム解析を進めた。その結果、リン脂質や中性脂質といったメジャーな脂質をスピンフィ

ルターで除いて、各種の脂質メディエーターを抽出・回収することが可能になった。これらの脂質メディエーターの中から、リストに挙げた各種の脂肪酸代謝物・リゾリン脂質・スフィンゴ脂質・ステロール類などについて、安定的に解析が可能となった(図6)。

図6

赤字各グループのS  
解析対象 約150成分

- ◎ : ピーク形状良好
- : ベースラインは高いが、ピーク形状は良好
- △ : ピークの重なりや形状がやや悪い
- ▲ : ピークが極小、または信頼度が低い

Fatty acids

Stearic Acid-d3 (18:0)				
FA(10:0)				▲
FA(11:0)				X
FA(11:1)		○		
FA(12:0)	◎			
FA(12:1)		○		
FA(13:0)		○		
FA(13:1)		○		
FA(14:0)	◎			
FA(14:1)	◎			
FA(15:0)	◎			
FA(15:1)		○		
FA(16:0)	◎			
FA(16:1)	◎			
FA(16:2)		○		
FA(17:0)	◎			
FA(17:1)	◎			
FA(18:0)	◎			
FA(18:1)	◎			
FA(18:2)	◎			
FA(18:3)	◎			
FA(19:0)				▲
FA(19:1)	◎			
FA(19:2)		○		
FA(20:0)	◎			
FA(20:1)	◎			
FA(20:2)	◎			
FA(20:3)	◎			
FA(20:4)	◎			
FA(20:5)	◎			
FA(21:0)				▲
FA(21:1)				▲
FA(22:0)		○		
FA(22:1)	◎			
FA(22:2)				▲
FA(22:3)		○		
FA(22:4)	◎			
FA(22:5)	◎			
FA(22:6)				△
FA(23:0)				▲
FA(23:1)				▲
FA(24:0)	◎			
FA(24:1)	◎			

Acylcarnitines

Acylcarnitine-d3 (18:0)				
Acylcarnitine(10:0)	◎			
Acylcarnitine(11:0)			△	
Acylcarnitine(11:1)				▲
Acylcarnitine(12:0)	◎			
Acylcarnitine(12:1)			△	
Acylcarnitine(13:0)	◎			
Acylcarnitine(13:1)	◎			
Acylcarnitine(14:0)	◎			
Acylcarnitine(14:1)	◎			
Acylcarnitine(15:0)			△	
Acylcarnitine(15:1)	◎			
Acylcarnitine(16:0)	◎			
Acylcarnitine(16:1)	◎			
Acylcarnitine(17:0)	◎			
Acylcarnitine(17:1)			△	
Acylcarnitine(18:0)	◎			
Acylcarnitine(18:1)	◎			
Acylcarnitine(18:2)	◎			
Acylcarnitine(18:3)			△	
Acylcarnitine(19:0)				X
Acylcarnitine(19:1)				▲
Acylcarnitine(20:0)	◎			
Acylcarnitine(20:1)	◎			
Acylcarnitine(20:2)		○		
Acylcarnitine(20:3)	◎			
Acylcarnitine(20:4)	◎			
Acylcarnitine(20:5)	◎			▲
Acylcarnitine(22:1)				▲
Acylcarnitine(22:2)				▲
Acylcarnitine(22:3)				X
Acylcarnitine(22:4)	◎			
Acylcarnitine(22:5)				▲
Acylcarnitine(22:6)		○		
Acylcarnitine(24:0)	◎			
Acylcarnitine(24:1)				▲
Acylcarnitine(24:2)				X
Acylcarnitine(24:3)				X
Acylcarnitine(24:4)				X
Acylcarnitine(24:5)				X
Acylcarnitine(24:6)				X

Lysophosphatidylcholines

LPC-d3 (16:0)				
LPC(12:0)				X
LPC(14:0)	◎			
LPC(15:0)	◎			
LPC(16:0)	◎			
LPC(16:1)	◎			
LPC(17:0)	◎			
LPC(18:0)	◎			
LPC(18:1)	◎			
LPC(18:2)	◎			
LPC(18:3)	◎			
LPC(19:0)	◎			▲
LPC(20:0)	◎			▲
LPC(20:1)	◎			
LPC(20:2)	◎			▲
LPC(20:3)	◎			
LPC(20:4)	◎			
LPC(20:5)	◎			
LPC(22:0)	◎			X
LPC(22:1)	◎			X
LPC(22:2)	◎			X
LPC(22:3)				X
LPC(22:4)	◎			▲
LPC(22:5)			△	
LPC(22:6)	◎			▲
LPC(24:0)	◎			▲
LPC(24:1)	◎			X

Lysophosphatidylethanolamines

LPC-d3 (16:0)				
LPE(12:0)				X
LPE(14:0)				X
LPE(15:0)				X
LPE(16:0)	◎			
LPE(16:1)	◎			
LPE(17:0)				▲
LPE(18:0)	◎			
LPE(18:1)	◎			
LPE(18:2)	◎			
LPE(18:3)	◎			
LPE(19:0)				▲
LPE(20:0)				▲
LPE(20:1)	◎			
LPE(20:2)				▲
LPE(20:3)	◎			
LPE(20:4)	◎			
LPE(20:5)	◎			
LPE(22:0)				X
LPE(22:1)				X
LPE(22:2)				X
LPE(22:3)				X
LPE(22:4)				▲
LPE(22:5)				▲
LPE(22:6)	◎			▲
LPE(24:0)				▲
LPE(24:1)				X

Lysophosphatidylinositols

LPC-d3 (16:0)				
LPI(12:0)				X
LPI(14:0)				X
LPI(15:0)				X
LPI(16:0)				X
LPI(16:1)				X
LPI(17:0)				X
LPI(18:0)	◎			
LPI(18:1)	◎			▲
LPI(18:2)	◎			X
LPI(18:3)				X
LPI(19:0)				X
LPI(20:0)				X
LPI(20:1)				X
LPI(20:2)				X
LPI(20:3)				X
LPI(20:4)	◎			▲
LPI(20:5)				X
LPI(22:0)				X
LPI(22:1)				X
LPI(22:2)				X
LPI(22:3)				X
LPI(22:4)				X
LPI(22:5)				X
LPI(22:6)				X
LPI(24:0)				X
LPI(24:1)				X

Lysophosphatidylserines

LPC-d3 (16:0)				
LPS(12:0)				X
LPS(14:0)				X
LPS(15:0)				X
LPS(16:0)				X
LPS(16:1)				X
LPS(17:0)				X
LPS(18:0)	◎			
LPS(18:1)				▲
LPS(18:2)				X
LPS(18:3)				X
LPS(19:0)				X
LPS(20:0)				X
LPS(20:1)				X
LPS(20:2)				X
LPS(20:3)				X
LPS(20:4)				X
LPS(20:5)				X
LPS(22:0)				X
LPS(22:1)				X
LPS(22:2)				X
LPS(22:3)				X
LPS(22:4)				X
LPS(22:5)				X
LPS(22:6)				X
LPS(24:0)				X
LPS(24:1)				X

Lysophosphatidylglycerols

LPC-d3 (16:0)				
LPG(12:0)				X
LPG(14:0)				▲
LPG(15:0)				X
LPG(16:0)	◎			▲
LPG(16:1)				X
LPG(17:0)				X
LPG(18:0)	◎			
LPG(18:1)	◎			
LPG(18:2)				▲
LPG(18:3)				X
LPG(19:0)				X
LPG(20:0)				X
LPG(20:1)				X
LPG(20:2)				▲
LPG(20:3)				▲
LPG(20:4)				X
LPG(20:5)				X
LPG(22:0)				X
LPG(22:1)				X
LPG(22:2)				X
LPG(22:3)				X
LPG(22:4)				X
LPG(22:5)				X
LPG(22:6)				▲
LPG(24:0)				▲
LPG(24:1)				X

Steroids

Cholic Acid-d5				
Squalene				X
Lanosterol				▲
Desmosterol				▲
20_Hydroxycholesterol				X
22_Hydroxycholesterol				X
7_Dehydrocholesterol				X
Cholesterol	◎			
Progesterone		○		
Aldosterone				X
Corticosterone				△
DHEAS				X
Estrone				X
Testosterone	◎			
Estradiol				X
Estriol				X
Cortisol		○		
Corticosterone				X
17_Hydroxyprogesterone				X
Pregnenolone				X
Chenodeoxycholic acid				△
Ursodeoxycholic acid				△
Cholic acid	◎			
Deoxycholic acid				△
Lithocholic acid	◎			
LysoPAF(16:0)				X
LysoPAF(18:0)				X
Thyroxine				▲
Triiodothyronine				X

Sphingolipids

Sphinganine(d17:0)				
Sphinganine(d16:0)				X
Sphinganine(d18:0)		○		
Sphinganine(d20:0)				X
Sphinganine(d22:0)		○		
Sphinganine(d24:0)				X

Sphingosine(d17:1)				
Sphingosine(d16:1)				▲
Sphingosine(d18:1)		○		
Sphingosine(d20:1)				X
Sphingosine(d22:1)				△
Sphingosine(d24:1)				X

Sphinganine-1-P(d17:0)				
Sphinganine-1-P(d16:0)				X
Sphinganine-1-P(d18:0)	◎			
Sphinganine-1-P(d20:0)				X
Sphinganine-1-P(d22:0)				X

Sphingosine-1-P(d17:1)				
Sphingosine-1-P(d16:1)				△
Sphingosine-1-P(d18:1)	◎			
Sphingosine-1-P(d20:1)				X
Sphingosine-1-P(d22:1)				X

Glucosylceramide(d18:1/12:0)				
Glucosylceramide(d18:1/14:0)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/16:0)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/16:1)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/18:0)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/18:1)				△
Glucosylceramide(d18:1/20:0)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/22:0)				△
Glucosylceramide(d18:1/22:1)	◎			△
Glucosylceramide(d18:1/22:2)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/24:0)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/24:1)	◎			
Glucosylceramide(d18:1/24:2)	◎			

Lactosylceramide(d18:1/12:0)				
Lactosylceramide(d18:1/14:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/16:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/16:1)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/18:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/18:1)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/20:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/22:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/22:1)				△
Lactosylceramide(d18:1/22:2)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/24:0)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/24:1)	◎			
Lactosylceramide(d18:1/24:2)	◎			

Ceramide-1-P(d18:1/12:0)				
Ceramide-1-P(d18:1/16:0)	◎			
Ceramide-1-P(d18:1/16:1)	◎			
Ceramide-1-P(d18:1/18:0)	◎			
Ceramide-1-P(d18:1/18:1)				X
Ceramide-1-P(d18:1/20:1)				X
Ceramide-1-P(d18:1/22:0)				△
Ceramide-1-P(d18:1/22:1)				X
Ceramide-1-P(d18:1/24:0)	◎			
Ceramide-1-P(d18:1/24:1)				X

Lysophosphatidic acids

LPC-d3 (16:0)				
LPA(12:0)				▲
LPA(14:0)				▲
LPA(15:0)				X
LPA(16:0)				X
LPA(16:1)				X
LPA(17:0)				X
LPA(18:0)				X
LPA(18:1)				X
LPA(18:2)	◎			

## 考 察

我々のプレリミナリーな研究結果において、肥満患者の減量過程では、血中の遊離脂肪酸が量的のみならず質的にも大きく変動することが分かってきており、「質の違い」という観点からも脂質代謝の重要性が高まっている。このようなバリエーションに富んだ脂質分子種の探索性の向上のために、ハイスループットかつ高精度な自動同定システムの確立が不可欠になってきた。このため、本研究で確立した探索システムは、脂質メタボロームの有用な基盤技術の1つとなると考えられ、他の脂質代謝物への応用も現在試みており、将来的には簡便かつ迅速な血中脂質のスクリーニングが可能になると考えられる。一方、微量で生理活性の高い脂質メディエーターに関しては、現状の検出感度面からワイドターゲット解析法が最適なアプローチと考えられ、「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究(山形県鶴岡市)」では、ヒト血漿の凍結保存安定性試験や抽出・測定安定性試験などに取り組み、解析対象を各種の脂肪酸代謝物・リゾリン脂質・スフィンゴ脂質・ステロール類などに絞り込んだ。これらのメタボローム解析を用いたベースライン調査は、2014年12月時点で約1,000検体まで終了しており、臨床検査値などの情報との相関解析を今後進める予定である。

## 要 約

肥満・糖尿病・心血管病などは、食の欧米化（動物性脂質の摂取増加）とよばれる近年の食生活の変化と関連することが明らかになってきている。これらの正確かつ早期の予防に繋げるためには、その発症機序の基づいたバイオマーカーの活用が欠かせないが、脂質代謝物は数多くの分子種が存在し、様々な濃度領域で血中に存在しているために、網羅的な探索・同定がこれまで困難であった。

本研究では、これらの問題点を改善するために、脂質の網羅的なターゲットディスカバリー型のメタボローム解析法と新規のアルゴリズムによるハイスループットな一斉自動同定システムとの組み合わせを試みた。その結果、従来の手法に比べて各種リン脂質などをより高精度かつ網羅的に探索解析が可能となった。一方、微量で生理活性の強い脂質メディエーターに関しては、ワイドターゲット解析による高感度かつ定量的なアプローチを試みた。「鶴岡市民を対象とした地域コホート研究（山形県鶴岡市）」では、各種の安定性試験の結果、ヒト血漿中の解析の対象を各種の脂肪酸代謝物・リゾリン脂質・スフィンゴ脂質・ステロール類などに絞り込んだ。将来的には、これら脂質メタボローム解析データとコホート集団の健康状態変化とを相関解析することで、メタボリック症候群をはじめとする幅広い疾患の予防に有効なバイオマーカーを同定し、一次予防あるいは臨床診断に応用することによって、健康寿命 Health expectancy の延伸に繋がる予防医療の確立を目指す計画である。

## 文 献

1. 池田和貴、「最新生理活性脂質研究」(メディカルドゥ)：39－43、2013
2. 池田和貴、田口良、曾我朋義、「脂質マーカー発見に向けたリポドミクスの基盤技術の構築」(分析化学)：501－512、2012
3. 池田和貴、有田誠、「医用質量分析ガイドブック」(診断と治療社)：180－185、2013