



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	リゾホスファチジルエタノールアミンの質量分析法の確立と応用に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山本, 祐輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第14423号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81576
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Yamamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名： 山本 祐輔

学位論文題名

リゾホスファチジルエタノールアミンの質量分析法の確立と応用に関する研究

リゾリン脂質は、ホスホリパーゼ A1/A2 によるリン脂質の加水分解によって生成される脱アシル化産物である。したがって、リゾリン脂質は *sn*-1 あるいは *sn*-2 に一本のアシル基を有する構造を持つ。リゾリン脂質には、親水基側の構造の違いにより様々な種類のリゾリン脂質が存在する。例えば、リゾホスファチジルコリン (LysoPC) やリゾホスファチジン酸 (LysoPA)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LysoPE)、リゾホスファチジルセリン (LysoPS)、リゾホスファチジイルノシトール (LysoPI) がある。それらのリゾリン脂質の生理活性は、その化学的性質に応じて異なると考えられる。このうち、LysoPE に関する報告はほとんどない。*in vitro* における LysoPE の研究では、LysoPE がミトジェン活性化プロテインキナーゼのシグナル伝達の活性化を介した神経栄養活性化因子であることを示唆する報告や細胞内カルシウムレベルを上昇させ、がんにおいて走化性遊走と細胞浸潤を促すなどの報告がある。また、臨床研究においても、片頭痛患者血清中の LysoPE 濃度が低下したことを示す報告がある。このように、LysoPE には明らかな生理学的意義があることが示唆された。しかし、LysoPE は *in vitro* での生理活性を持ち合わせるが、臨床サンプル中の LysoPE の各分子種を決定づけるための高感度な定量分析方法がないために、血清における LysoPE の病態生理学的な役割に関する報告は限られており、*in vivo* での LysoPE の役割と病態生理学的な役割は十分に解明されていないのが現状である。

LysoPE に関する研究では、LysoPE レベルは半定量的分析法による相対濃度によって測定されてきた。半定量的分析法は網羅的な分析手法としては非常に有用であるが、正確な濃度を得ることが出来ない。また、その手法は測定感度が低いという根本的な欠点もある。これまで、LC-MS/MS を用いた定量法において、最適な内部標準物質 (IS) が市販されていないために LysoPE 測定における絶対的な定量法には限界があった。

そこで本研究では、第 1 章では当研究室で開発した合成法を用いて、適切な IS として LysoPE 15:0 を新規に合成し、さらに、市販されていない 4 種類の LysoPE スタンダード LysoPE 18:2 (リノール酸型)、LysoPE 20:4 (アラキドン酸型)、LysoPE 20:5 (EPA:エイコサペンタエン酸型)、LysoPE 22:6 (DHA:ドコサヘキサエン酸型) の有機合成を既報に基づき行った。

第 2 章では、合成した LysoPE 分子種と市販の分子種とを合わせた全 7 分子種の LysoPE を対象とした LC-MS/MS を用いた定量法の開発を行った。今回対象とした LysoPE 分子種は、過去の LysoPE に関する報告における主要な分子種である。LC-MS/MS での分析条件の最適化を行い、各 LysoPE 標準品に関して、良好なクロマトグラムを確認でき、定量法の確立に成功した。

第 3 章では、開発した定量法の臨床応用として、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者と健常者の血清中 LysoPE 濃度のプロファイルを明らかにした。NAFLD は肝臓にトリグリセリド (TG) が蓄積する進行性の肝疾患であり、単純性脂肪肝 (SS) や非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) な

どが含まれる。NAFLD 患者血清中総 LysoPE が健常者と比較して低値であると報告されてきたが、その分子種毎の濃度変化の詳細は明らかにされていない。そこで、脂肪酸がそれぞれ異なる役割を果たすことと同様に、異なるアシル基を持つ LysoPE はそれぞれの役割も異なると考え、NAFLD における分子種毎の血清中 LysoPE の濃度変化に焦点を当てた。今回対象としたのは、健常者 (n = 8) 並びに単純性脂肪肝 (SS、n = 9) および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH、n = 27) を含む非アルコール性脂肪性肝疾患患者の血清中 LysoPE である。7 分子種の LysoPE の合計濃度は健常者、SS、NASH の各群においてそれぞれ 18.030 ± 3.832 nmol/mL、 4.867 ± 1.852 nmol/mL、および 5.497 ± 2.495 nmol/mL であった。分子種毎の LysoPE 定量結果では LysoPE 18:0 を除き、NAFLD 群で健常者群と比較して有意に減少した。しかし、SS 及び NASH 群間に有意差は観察されなかった。今回開発した LC-MS/MS を用いた LysoPE 定量系を臨床検体に応用した結果、ごく少量の血清量 (10 μ L) で全 7 分子種の同時定量が可能であることが分かった。

第 4 章では、血清 LysoPE 低下の原因の一つと考えられる細胞への LysoPE の取り込みを検証した。ヒト肝由来株化細胞 (C3A) を用いて、血清中で最も減少量の大きかった LysoPE 18:2 の添加実験を行い、0.2 μ M - 200 μ M の LysoPE による細胞毒性の確認や Oil Red O 染色による LysoPE 誘導肝細胞内脂肪滴の観察、real-time PCR による脂質代謝関連遺伝子 (*ATGL*、*DGAT1*、*SREBP1*、*SCD1*) の発現量を確認した。その結果、LysoPE が肝細胞に濃度依存的に脂肪滴を形成させた。特に、脂肪滴の脂肪分解に関与する遺伝子 *ATGL* の発現量の低下が関連した可能性があると考えられる。また、LysoPE は脂肪酸生合成に関わる遺伝子 (*SREBP1*、*SCD1*) の発現を低下させた。肝細胞内に流入した LysoPE が脂肪酸にまで分解されたことで、脂肪酸の生合成を抑制した可能性があると考えられた。

本研究で確立した LysoPE 定量系は強力なツールであり、臨床検体だけでなく、細胞や動物実験などの様々な研究への応用が期待され、LysoPE の未だ明らかでない病態生理学的役割の解明に大きく貢献すると考えられる。