



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：山本 祐輔

審査委員	主査 特任教授	齋藤 健
	副査 教授	恵 淑萍
	副査 教授	千葉 仁志（札幌保健医療大学）

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

当審査は令和3年1月27日実施の公開発表にて行われた。（出席者67名）

近年、リゾリン脂質に関する研究が盛んにおこなわれている。しかし、その多くは LysoPA や LysoPC、LysoPS など、メジャーな分子種に関するものが多く、LysoPE に関してはよく理解されておらず、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような状況にある LysoPE に関して、LC-MS/MS を用いた定量法を開発し、NAFLD 患者血清中の LysoPE プロファイルを明らかにし、細胞実験により LysoPE の代謝メカニズムを明らかにすることを試みたものであった。

はじめに、本論文では、先行研究に基づいた有機合成法を用いて、適切な IS として LysoPE 15:0 を新規に合成した。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）の有機合成も既報に基づき行った。内部標準物質を新たに合成したことにより、各分子種の標準品と併せて定量系の開発を試みることが出来た。

続いて、有機合成した 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。今回対象になった 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った。この対象分子種には、先行研究において、NASH モデルマウス肝組織中で減少した分子種も含まれていた。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。この定量系の開発により、LysoPE の分子種毎の正確な濃度を得ることができ、分子種間の濃度比較やプロファイルの変化などを具体的に見出すことが可能となった。

そして、開発した LC-MS/MS による LysoPE 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 濃度の測定を行い、そのプロファイルを明らかにした。NAFLD は肝臓にトリアシルグリセロール（TAG）が蓄積する進行性の肝疾患であり、単純性脂肪肝（SS）と非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に大別される。これまでに、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、その詳細な分子種毎

の濃度変化は明らかにされておらず、NAFLD 患者血清中の LysoPE プロファイルも不明であった。そこで、開発した定量法を用いて、NAFLD 患者における分子種毎の血清中 LysoPE の濃度変化に焦点を当て、そのプロファイルを新規に見出した。今回対象となったのは、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 NAFLD 患者の血清中 LysoPE であった。定量の結果、分子種毎の LysoPE 濃度は 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。NAFLD における LysoPE 分子種毎の代謝の違いが示され、これは、LysoPE 定量系を開発できたからこそ成し得た結果であるといえる。さらに、この結果に関する論理的な考察がなされ、その内容は LysoPE と NAFLD の関連性を解明するうえで、今後のさらなる発展が期待されるものであった。

さらに、本論文では血清中 LysoPE 濃度低下の原因の一つと考えられる肝細胞への 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、血清中で最も顕著な減少を示した LysoPE 18:2 の添加実験を行い、0.2 μ M - 200 μ M の LysoPE 18:2 刺激による細胞毒性の確認や Oil Red O 染色による LysoPE 18:2 誘導肝細胞内脂肪滴の観察、20 μ M LysoPE 18:2 刺激時の Orbitrap 質量分析計を用いた細胞内脂質の網羅的解析及び real-time PCR による脂肪滴形成関連遺伝子 (*ATGL*、*DGAT1*、*SREBP1*、*SCD1*) の発現量の確認を行った。その結果、LysoPE 18:2 が肝細胞に添加濃度依存的に脂肪滴を形成させることが明らかとなり、細胞内では TAG や CE において増加した分子種が確認された。特に、TAG に関しては、脂肪滴の脂肪分解に関与する遺伝子 *ATGL* の発現量が低下しており、その影響で増加した分子種があったことが示唆された。また、LysoPE 18:2 の添加により、不飽和脂肪酸の生合成に関わる遺伝子 (*SREBP1*、*SCD1*) の発現が低下した。これらの結果から、論理的な考察がなされ、添加した LysoPE 18:2 が肝細胞内に取り込まれたことが示唆された。この成果は、将来的な LysoPE と脂肪滴との関連性や LysoPE の代謝メカニズムの解明につながることで期待される成果であった。

これを要するに、著者は LC-MS/MS による LysoPE の定量法を開発し、ヒト血清中 LysoPE プロファイルに関する研究を行った。その成果として NAFLD 患者血清中の分子種毎の LysoPE プロファイルについて新たな知見を得られた。さらに、LysoPE 18:2 が細胞に取り込まれ代謝されることで脂肪滴が形成されることが新たに示され、今後の LysoPE の機能や代謝解明に関する研究の発展に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (保健科学) の学位を授与される資格あるものと認める。