

昭 和 薬 科 大 学

博 士 学 位 論 文

生体試料中の脂質メタボローム解析と
その臨床適応に関する研究

2014 年

石川 将己

目次	頁
論文目録.....	5
緒論.....	6
第一章 C30 逆相クロマトグラフィーおよび LTQ Orbitrap を用いたリン脂質の網羅的測定手法の確立に関する研究.....	8
第一節 序文	
第二節 実験材料および実験方法	
(1) 実験材料	
(2) マウス臓器からの Bligh & Dyer 法によるリン脂質抽出	
(3) alkenylacyl 分子種の酸加水分解	
(4) C30 RPLC	
(5) LTQ Orbitrap による LC-MS ⁿ	
第三節 結果	
(1) LTQ Orbitrap によるマウス肝臓および脳のリン脂質網羅的解析	
(2) PC 分子種の同定	
(3) PE 分子種の同定	
(4) PS 分子種の同定	
(5) SM 分子種の同定	
(6) PG 分子種の同定	
(7) PI 分子種の同定	
第四節 考察および小括	
参考文献	
第二章 バイオマーカー探索・検証のための、健常ヒト血液中代謝物レベルの基盤的情報の解明.....	32

第一節 健常ヒト血液中脂質代謝物レベルの血漿・血清差、男女差、年齢差に関する網羅的検。.....	32
--	----

第一項 序文

第二項 検体および実験方法

- (1) 検体情報
- (2) 実験材料
- (3) 脂質抽出
- (4) LC-MS(/MS)
- (5) 凍結融解
- (6) データ解析

第三項 結果

- (1) 健常ヒト血液中の脂質代謝物の同定
- (2) 血漿と血清間の代謝物レベルの相違（血漿・血清差）
- (3) ヒト男女間の代謝物レベルの相違（男女差）
- (4) ヒト年齢差が代謝物レベルに与える影響（年齢差）
- (5) 血液試料の凍結融解が代謝物の安定性に及ぼす影響

第四項 考察および小括

第二節 非絶食ヒト血液試料のリピドミクス解析による脂質プロファイルの解明.....	43
---	----

第一項 序文

第二項 検体および実験方法

- (1) 検体情報
- (2) 脂質抽出
- (3) LC-MS(/MS)
- (4) データ解析

第四項 考察および小括

第一節 健常ヒト血液中親水性代謝物レベルの血漿・血清差、男女差、年齢差に関する網羅的検討.....	48
第一項 序文	
第二項 検体および実験方法	
(1) 検体情報	
(2) 代謝物抽出および GC-MS および LC-MS(/MS)	
(3) 凍結融解	
(4) データ解析	
第三項 結果	
(1) 全検体間の親水性代謝物レベルの包括的比較	
(2) 血漿・血清差	
(3) 男女差および年齢差	
(4) 血液試料の凍結融解が代謝物の安定性に及ぼす影響	
第四項 考察および小括	
総括.....	61
謝辞	
.....	63
引用文献.....	64

論文目録

本学位論文は、学術雑誌に掲載された以下の報文を基礎とするものである。

第一章

1. Ryo Taguchi and **Masaki Ishikawa** (2010) Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search.
Journal of Chromatography A **1217**: 4229-4239

第二章

1. **Masaki Ishikawa**, Yoko Tajima, Mayumi Murayama, Yuya Senoo, Keiko Maekawa, Yoshiro Saito (2013) Plasma and serum from nonfasting men and women differ in their lipidomic profiles.
Biological & Pharmaceutical Bulletin **36**(4): 682-685
2. **Masaki Ishikawa**, Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yuya Senoo, Masayo Urata, Mayumi Murayama, Yoko Tajima, Yuji Kumagai, Yoshiro Saito (2014) Plasma and Serum Lipidomics of Healthy Adults Shows characteristic profiles by Subjects' Gender and Age.
PLoS ONE **9**(3): e91806
3. Kosuke Saito, Keiko Maekawa, Kirk L. Pappan, Masayo Urata, **Masaki Ishikawa**, Yuji Kumagai, Yoshiro Saito (2014) Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations.
Metabolomics **10**: 402-413

参考論文

1. Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, **Ishikawa M**, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y (2013) Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology **59**: 76-85.

緒論

バイオマーカーは、「正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と定義されている (1)。近年、バイオマーカーが医薬品開発・適正使用および疾患診断に有用であると注目されており、臨床的な最終評価指標を反映するサロゲート（代替え）マーカーとしてその探索が行われている (2-9)。バイオマーカー探索に用いられる試料には、組織および髄液と比較して低侵襲的に採取でき、得られる情報量の多い血液試料が汎用されている。血液中には数千種類に及ぶ代謝物が含まれており (10)、全身の生物学的プロセスを反映していることから、バイオマーカー探索に適した試料であると考えられる。バイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、実データを反映した評価要件を明確化する必要性がある。しかし、現在のところ、血中代謝物の血漿・血清差、性差、年齢差、保管条件などの基盤的な情報が乏しく、科学的根拠に基づくバイオマーカー探索・検証のガイドラインは存在しない状況にある。不適格バイオマーカーの利用は医薬品開発の遅延・臨床現場の混乱を招く恐れがあることから、早期に血中代謝物の基盤的情報を明らかにし、バイオマーカー評価要件の指針を提示する必要性がある。

近年、血中代謝物バイオマーカーを探索する上で、メタボローム解析が注目されている。メタボローム解析（メタボロミクス、metabolomics）とは、代謝物（metabolite）を包括的に測定し得る解析手法で、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスに続くオミクス解析の一つである (Fig. 1)。代謝物は、生物学的プロセスが実行されたときに産生されることから、表現型に最も近い。そのため、メタボローム解析は表現型での変化を直接観察し得ることから、バイオマーカー探索に適した手法と考えられる。メタボローム解析における代謝物の測定手法として、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS)、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)、超臨界流体クロマトグラフィー-質量分析計 (SFC-MS)、核磁気共鳴装置 (NMR) が用いられている (11-13)。しかしながら、代謝物は膨大な種類が存在し、それらの極性が大きく異なるため、単一の測定手法で全ての代謝物を網羅的に測定することは極めて困難である。中でも脂質代謝物は、構造異性体を含めて分子種の多様性が非常に富んでいることから、網羅的測定手法（脂質メタボローム）が十分に確立されていない状況にある。また、脂質代謝物は様々な生理活性を有することから (14-16)、有望なバイオマーカー候補として期待されており、高網羅的な脂質メタボローム解析手法の構築が特に必要とされている。

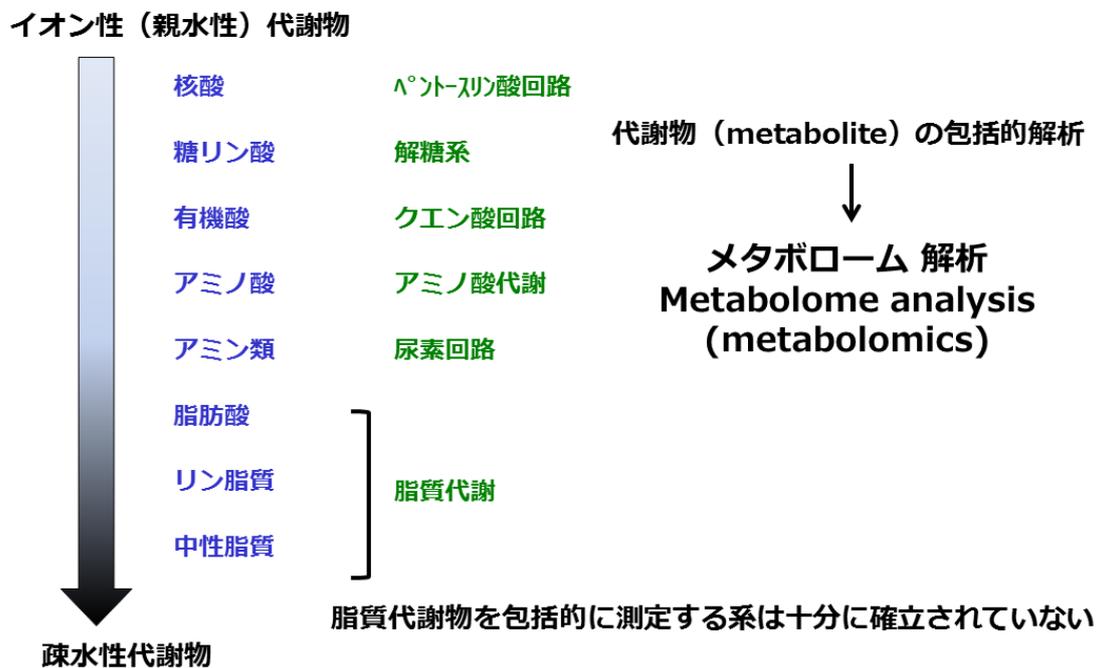


Fig. 1. Overview of metabolome analysis.

本研究では最初に、主要なリン脂質について LC-MS を用いて、構造異性体を含めた分子種レベルでの一斉分析システムの構築を試みた（第一章）。さらに、確立した測定系を応用して、リン脂質以外の脂質代謝物であるスフィンゴ脂質、中性脂質なども網羅的に測定可能な高網羅性の脂質メタボローム解析手法を構築した。次いで、血中代謝物バイオマーカーを探索する際の留意事項を明らかにするため、異なる年齢・性別の健常人血液試料の脂質メタボローム解析を行った（第二章）。また、脂質代謝物のみならず、親水性代謝物についてもメタボローム解析を行い、それらの血中における基盤的情報の解明を試みた。これらのデータを基に、代謝物バイオマーカー探索および分子選択における指針を示した。

第一章 C30 逆相クロマトグラフィーおよび LTQ Orbitrap を用いたリン脂質の網羅的測定手法の確立に関する研究

第一節 序文

リン脂質は細胞膜の構成成分としてのみならず、オートファジー (17)、膜輸送 (18)、シグナル伝達 (19, 20) などの種々の生物学的プロセスにおいても重要な役割を果たす物質である。また、膜リン脂質は、プロスタグランジン、ロイコトリエン (21)、エンドカンナビノイド (22)、血小板活性化因子 (23)、ジアシルグリセロール (24) などの脂質メディエーターの産生源でもある。そのため、疾患バイオマーカーや創薬標的としてのこれら脂質や代謝酵素の機能を明らかにするためには、リン脂質の網羅的解析 (脂質メタボローム解析) (25) が必要となる。しかし、リン脂質は複数の脂肪酸鎖および極性基から構成されることから分子種の多様性が非常に富んでおり、その網羅的解析は困難であった。そのため、リン脂質メタボローム解析を行うためには、個々の分子種を分離し、その精密質量および構造情報を取得する必要がある。これまでにリン脂質メタボローム解析手法の構築に関しての報告が幾つかあるが、用いられている質量分析計の質量精度が低いことから、サブクラスレベルでの正確な同定には至っていない (26-28)。炭素数が奇数長の diacyl 型の分子種と ether 型 (alkylacyl および alkenylacyl) の分子種とでは、質量値の整数が同じものが互いに存在し、これらを区別するためにはプレカーサーイオンの精密質量を取得する必要がある。

近年、電場型フーリエ変換質量分析計 (Fourier-Transform Mass Spectrometer: FT MS) LTQ Orbitrap (ThermoElectron, CA, USA) がリン脂質網羅的解析に使用されつつある (29, 30)。LTQ Orbitrap は、高電場 Orbitrap とリニアイオントラップ (Ion Trap Mass Spectrometer: IT MS) のハイブリット質量分析計であり、FT mode によるプレカーサーイオンの精密質量情報と、IT mode における多段階の MSⁿ により構造情報を取得可能であり、構造異性体が多く存在するリン脂質の網羅的解析に非常に有用な質量分析計であると考えられる。本研究では、C18 逆相カラムよりも分離能の高い C30 逆相カラムと、LTQ Orbitrap を組み合わせた、リン脂質一斉分析系の構築を試みた。

略称

PLs, phospholipids; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PG, phosphatidylglycerol; SM, sphingomyelin; RPLC, Reverse-Phase Liquid Chromatography; MS, Spectrometry; ESI, electrospray ionization; CID, Collision-induced dissociation; NL, neutral loss.

第二節 実験材料および実験方法

(1) 実験材料

有機溶媒（MS-grade アセトニトリル、MS-grade メタノール、HPLC-grade イソプロパノール、クロロホルム）および試薬（HPLC-grade 酢酸、28% アンモニア水溶液、12M 塩酸）は和光純薬から購入した。脂質標準品である dimyristeoyl PC、myristeoyl lysoPC、dipalmytoyl PC、palmytoyl lysoPC、dimyristeoyl PG、dioleoyl PS は日本油脂から、Lauroyl dihydro SM は Avanti Polar Lipids からそれぞれ購入した。

(2) マウス臓器からの Bligh & Dyer 法によるリン脂質抽出

2 月齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本 SLC 株式会社より購入した。3 匹のマウスから摘出した肝臓（総量 4.1 g）および脳（総量 1.3 g）を、クロロホルム：メタノール（1：2）でホモジナイズした後、組織中に含まれるリン脂質を Bligh & Dyer 法により抽出した（31）。得られた抽出溶液は窒素ガスで乾固し、10 mL のクロロホルム：メタノール（1：1）に溶解して、-20 °C で保存した。

(3) alkenylacyl 分子種の酸加水分解

同一質量値の alkylacyl 分子種（e）と alkenylacyl 分子種（p）を区別するため、アルケニアシル分子種の酸加水分解を行った。総脂質抽出画分 300 μ L（クロロホルム：メタノール = 1：1）に、メタノール 150 μ L および 1M HCL 150 μ L を添加し、2 h 攪拌した。次いで、クロロホルム 150 μ L および H₂O 150 μ L を添加し、3000 rpm で 5 min 遠心分離した後、下層の有機層を回収した。

(4) C30 RPLC

リン脂質の分離は、LC-10AD VP μ （島津製作所、京都）および Develosil C30 逆相カラム（野村化学、愛知: 150 mm \times 1.0 mm i.d., 3 μ m）を用いた RPLC により行った。移動相には、A 液（アセトニトリル：メタノール：H₂O = 19：19：2、0.1 % 酢酸、0.028 % アンモニア水溶液）および B 液（イソプロパノール、0.1 % 酢酸、0.028 % アンモニア水溶液）を用いた。流速 100 μ L/min において、0 \rightarrow 5 min (holding) : A/B (95/5)、5 \rightarrow 40 min (linearly converting) : A/B (70/30)、40 \rightarrow 90 min (holding) : A/B (50/50) の条件でグラジエント溶出を行った。

(5) LTQ Orbitrap による LC-MSⁿ

質量分析は、LTQ Orbitrap (ThermoElectron) 質量分析計を用いて、negative ion mode にて行った。イオン化法に ESI を用い、resolution: 100,000 at m/z 400、ion spray voltage: -3500 V、scan range: m/z 200-1200、trap fill time: 200 ms に設定した。窒素をカーテンガスに用いた。また、ヘリウムを、CID における コリジョンガスとして用い、コリジョンエネルギーを 30 % に設定した。IT mode における、イオン強度に応じて自動的に MS² or MS³ を行う data-dependent MS² or MS³ のイオン強度の設定は、100 counts 以上とした。また、強度の高いイオンのみが MS² or MS³ されるのを防ぐため、2 cycle の MS² or MS³ が行われた後、30 sec の間、MS² or MS³ の対象から除外する dynamic exclusion の設定を行った。FT mode によりプレカーサーイオンの精密質量情報を取得し、IT mode における data-dependent MS/MS (MS²) もしくは MS³ によりフラグメントイオン情報を取得することで、各クラスのリン脂質分子種の同定を行った。Negative ion mode において、PE、PS、PI、PG は [M-H]⁻ で検出される。極性基にコリンを有する PC および SM は、[M+CH₃COO]⁻ で検出される。PC、SM、PS は MS/MS により、極性基特異的 neutral loss (NL) (PC および SM: 74 Da、PS: 87 Da) が生じる (32, 33)。そのため、これらのクラスの脂質に関しては、MS² の NL をトリガーとして更なる CID (MS³) を行い、分子種を同定した。

各クラスのプレカーサーイオンの情報および構造解析に要する CID の回数を改めて Table 1 に示した。

Table 1. Summary of precursor ion and structural analysis for each phospholipids.

class	PC	PE	PG	PI	PS	SM
precursor ion	[M+CH ₃ COO] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M+CH ₃ COO] ⁻
value of m/z	even	even	odd	odd	even	odd
cycle of CID	MS ³	MS ²	MS ²	MS ²	MS ³	MS ³

第三節 結果

(1) LTQ Orbitrap によるマウス肝臓および脳のリン脂質網羅的解析

マウス肝臓および脳組織を対象にし、C30-RPLC および LTQ Orbitrap を組み合わせた脂質メタボローム解析を行った。本研究では、data-dependent MS² or MS³ により各クラスのリン脂質から脂肪酸イオン [FA]⁻ を検出させるために、negative ion mode を選択した (SM の場合は、[lysoSM-CH₃]⁻ が検出される)。各臓器における個々のリン脂質分子種の分離パターンを、2D map に示した (Fig. 2)。その結果、各臓器のリン脂質分子種が、一斉分離されていることが確認された。また、マウス肝臓および脳組織より同定されたリン脂質の分子種数を Table 2 に示した。マウス肝臓においては 291 分子種が、脳においては 246 分子種がそれぞれ同定され、リン脂質プロファイルが臓器によって異なることが観察された。個々の分子種の相対量は、各分子種のピーク面積値を、各クラスにおけるピーク面積の合計値で除することにより算出した。

RPLC における極性基の影響を調査するため、各クラスの 18:0-20:4 分子のマスキロマトグラムを Fig. 3 に示した。その結果、PG、PI、PS、PC、PE の順に溶出されることが確認された。この結果は、酸性リン脂質 (PG、PI、PS) が RPLC において、中性リン脂質 (PC、PE) よりも早く溶出することを示している。但し、今回用いた移動相において PS は、なだらかに溶出されることに注意が必要である。

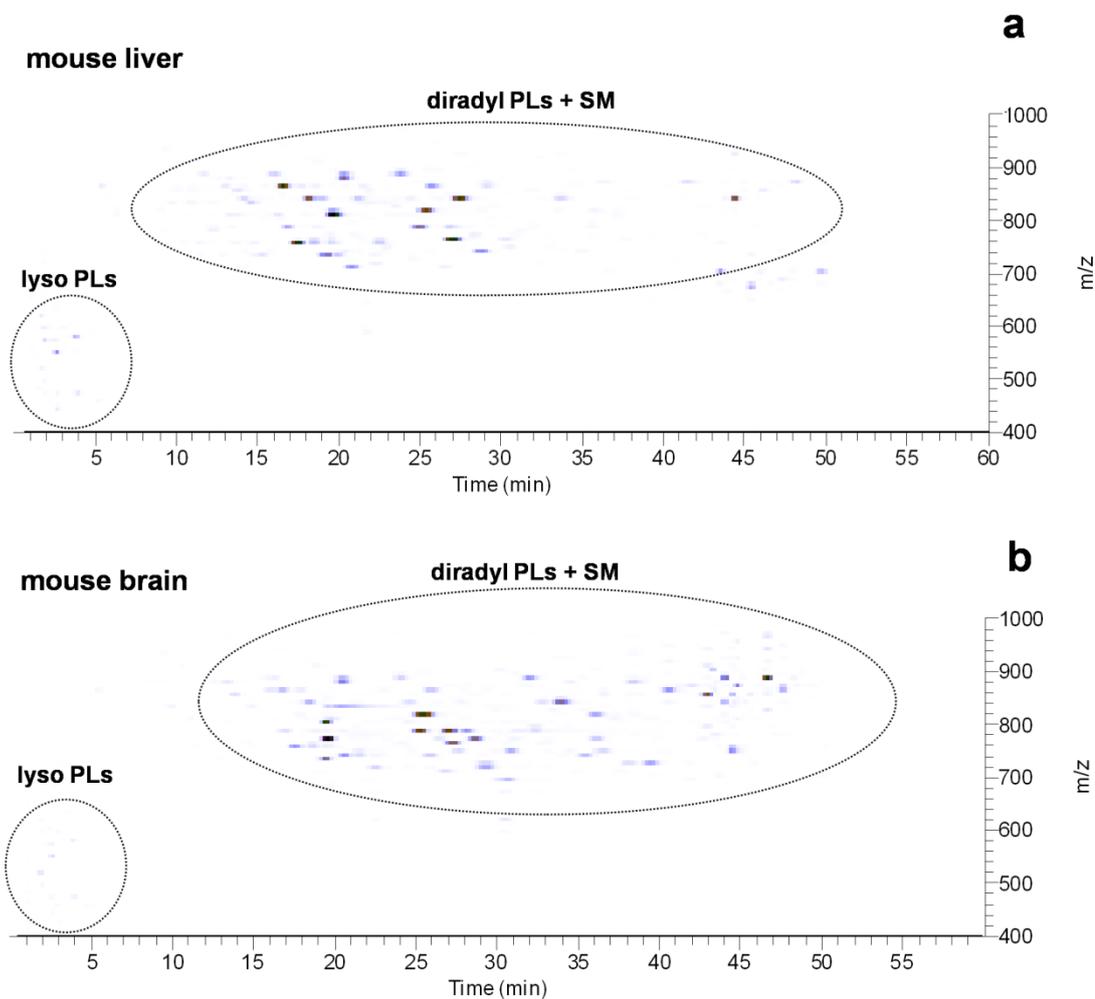


Fig. 2. Two-dimensional (2D) map of PLs from mouse liver and brain, obtained by RPLC/ESI-MS in the negative ion mode. The 2D map has the m/z value of $[M-H]^-$ or $[M+CH_3COO]^-$ ions along the vertical axis and the retention time along the horizontal axis. When using a reverse-phase column, PLs elute in order from the hydrophilic to the more hydrophobic molecules. (a) mouse liver, (b) mouse brain. Dyradyl PLs indicate general term of diacyl species and ether (alkyl or alkenyl) acyl species.

Table 2. Numbers of identified molecular species peaks for each class of phospholipids in liver and brain tissues.

	PC	PE	PG	PI	PS	SM	Sum
Liver	104	110	19	25	11	22	291
Brain	75	115	10	19	20	9	248
Common	42	60	7	12	7	8	136

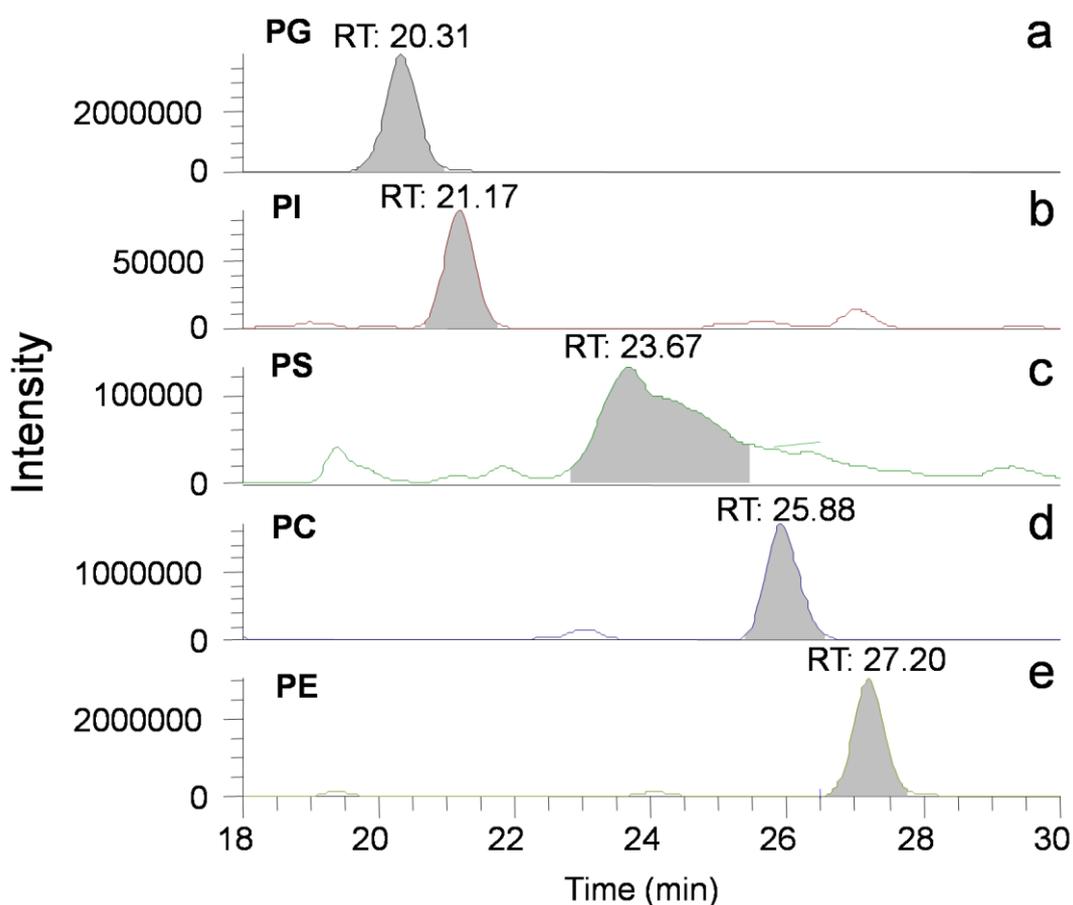


Fig. 3. The influence of a polar head group in the phospholipids with same 18:0-20:4 fatty acids on C30 reverse-phase separation. (a) 18:0-20:4 PG, (b) 18:0-20:4 PI, (c) 18:0-20:4 PS, (d) 18:0-20:4 PC, (e) 18:0-20:4 PE.

(2) PC 分子種の同定

マウス肝臓 PC の主要な分子種は、diacyl 16:0-18:2、16:0-18:1、16:0-20:4、18:0-18:2、16:0-22:6、18:0-20:4、18:0-22:6 PC であった (Fig. 4)。一方、脳では、飽和脂肪酸-飽和脂肪酸、もしくは、飽和脂肪酸-モノ不飽和脂肪酸の組合せである、16:0-16:0、16:0-18:1、18:0-18:1 PC が主要な分子種であった (Fig. 4)。また、ether 型の分子種においては、いずれの臓器においても、alkenylacyl 型よりも alkylacyl 型の方が多くの分子種が同定された。

脂肪酸鎖の炭素数が奇数である、15:0-16:1、17:0-20:4、19:0-18:2 PC が肝臓および脳において同定された。これら炭素数が奇数長の PC と alkylacyl 型を明瞭に区別することができた (Fig. 5)。Fig. 5a に m/z 854.6 のマスクロマトグラムを示した。その結果、diacyl 型 17:0-20:4 PC、ether 型の 18:0e-20:4 の順にそれぞれ溶出することが観察された。FT mode により測定された、diacyl 型 17:0-20:4 PC の プレカーサーイオンの質量値は m/z 854.5904 であり、その理論値との差は -0.8 ppm 程度と、高質量精度で測定されていることが確認された (Fig. 5b)。プレカーサーイオンの MS^2 により生じた、 m/z 780.1 の脱メチル体 $[M-CH_3]$ のスペクトルを Fig. 5c に示した。 MS^2 により生じる 74 Da の NL をトリガーとして MS^3 を行った結果、脂肪酸イオンと lysoPC 関連イオンのフラグメントイオンがそれぞれ検出された (Fig. 5d)。20:4 脂肪酸イオンとして m/z 303.1 が、17:0 脂肪酸イオンとして m/z 269.1 が、lyso acyl 17:0 イオン $[M-R1=C=O]$ (loss of ketene) として m/z 494.1 が、lyso acyl 20:4 イオンとして m/z 528.0 がそれぞれ検出された。LTQ Orbitrap における、PC の MS^2 および MS^3 の開裂パターンを Fig. 5e に示した。

一方、alkylacyl 型 18:0e-20:4 PC の プレカーサーイオンの質量値は m/z 854.6275 であり、その理論値との差は -0 ppm であった (Fig. 5f)。ジアシル型と同様に、プレカーサーイオンの MS^2 により 74 Da の NL が生じて、 m/z 780.2 の脱メチル体 $[M-CH_3]$ が検出 (Fig. 5g)。次いで、 m/z 780.2 の MS^3 を行った結果、脂肪酸イオンと lysoPC 関連イオンのフラグメントイオンがそれぞれ検出された (Fig. 5h)。20:4 脂肪酸イオンとして m/z 303.1 が、lyso alkyl 18:0 イオン (loss of ketene) として m/z 494.2 がそれぞれ検出された (Fig. 5h)。ちなみに、 m/z 259 のイオンは、20:4 脂肪酸イオンから二次的に生じる脱炭酸イオンであると推定される (Fig. 5d, h)。

これらの結果より、LTQ Orbitrap の FT mode による精密質量情報および IT mode による構造情報を取得することにより、サブクラスレベルでリン脂質分子種を同定できることが示された。

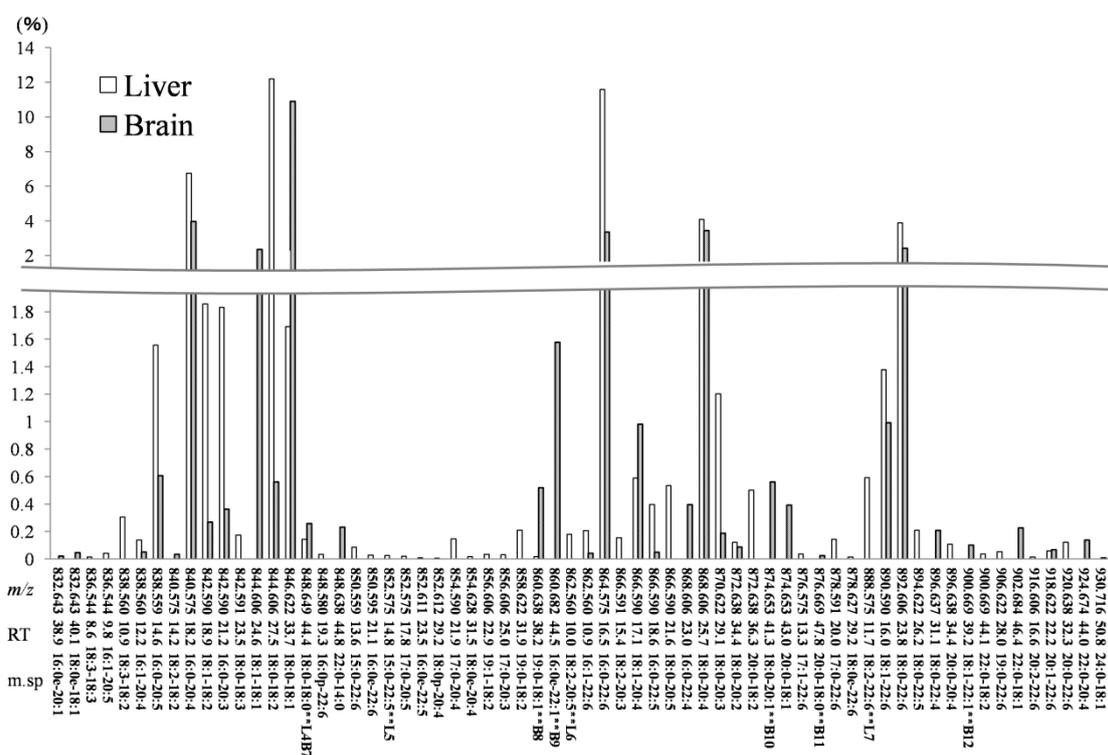


Fig. 4. Molecular species of PC from mouse liver and brain, identified by constructed RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold change (%) in peak area of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS² and MS³ spectra.

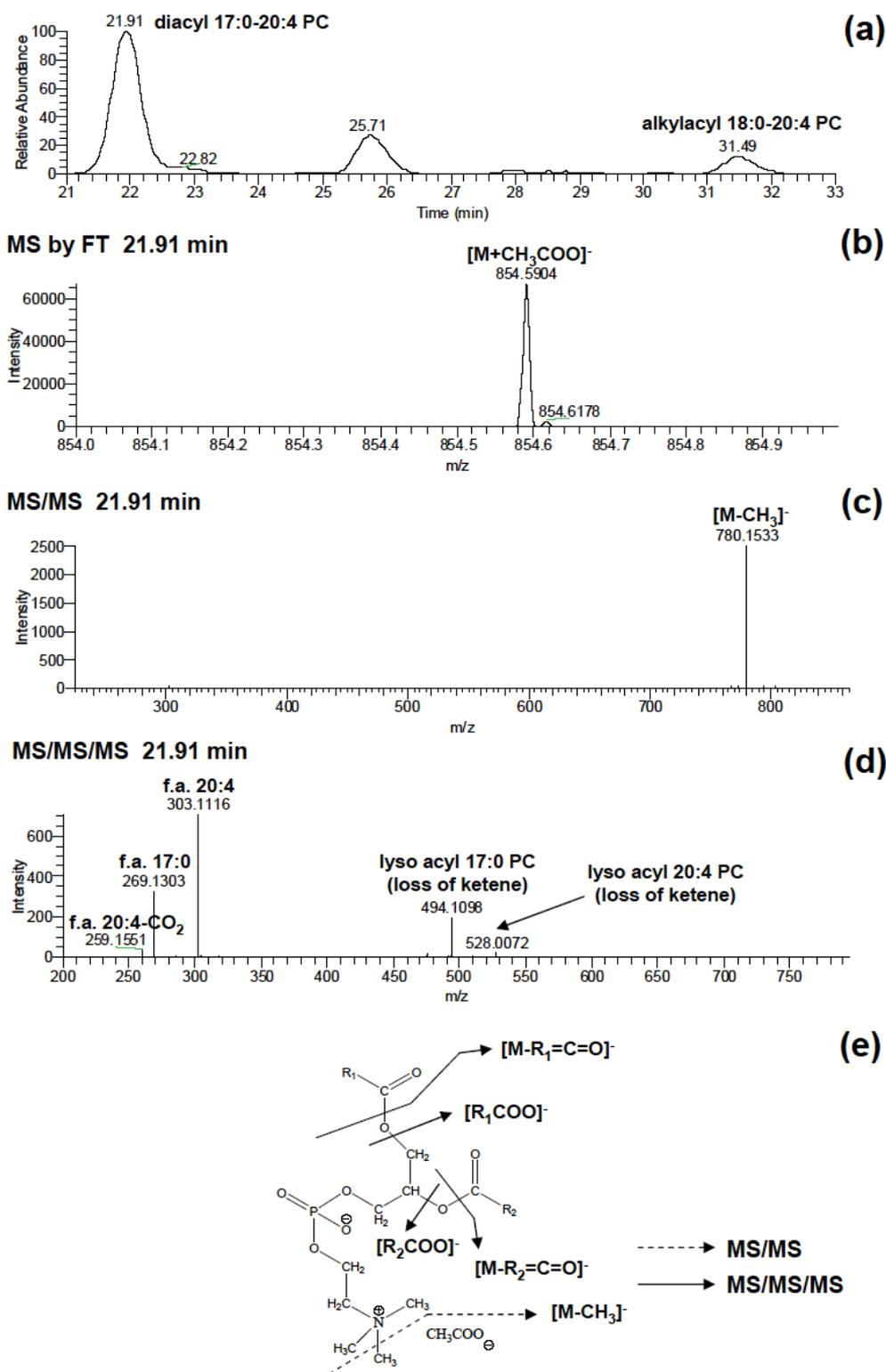


Fig. 5. Discrimination of diacyl or ether PC using both the high mass accuracy in the mass spectrometric data obtained from FT mode, and structural data obtained from fragments in IT mode. Diacyl 17.0-20:4 PC (21.91 min) and alkylacyl 18:0-20:4

PC (31.49 min) were eluted in that order. (a) extracted mass chromatogram of m/z 854.6, (b) MS spectrum obtained by FT mode (21.91 min), (c) MS/MS spectra obtained by IT mode (21.91 min), (d) MS/MS/MS spectrum obtained by IT mode (21.91 min), (e) fragmentation patterns for diacyl PCs, (f) MS spectrum obtained by FT mode (31.49 min), (g) MS/MS spectrum obtained by IT mode (31.49 min), and (h) MS/MS/MS spectrum obtained by IT mode (31.49 min).

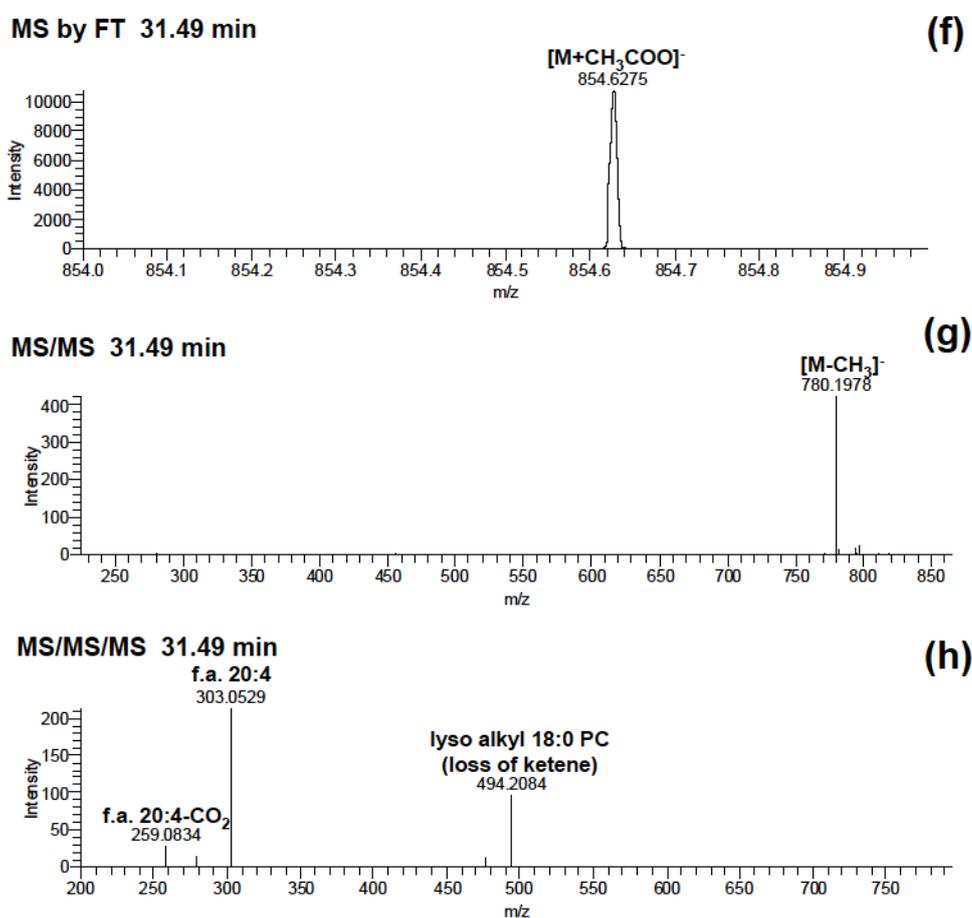


Fig. 5 (continued).

(3) PE 分子種の同定

肝臓および脳共に、18:0-22:6、18:0-20:4、16:0-22:6、16:0-20:4 PE などの poly-unsaturated fatty acids (PUFA) を含む分子種が、豊富であった (Fig. 6)。また、脳組織では alkenylacyl 分子種も豊富に存在し、18:0p-22:6 PE の存在量は、total PE の約 1/4 を占めた。

alkylacyl 型と alkenylacyl 型は同一の質量かつフラグメントイオンを生じる分子種が互いに存在する場合がある。そこでこれらの分子種を区別するため、酸加水分解反応 (酸性 Bligh & Dyer 法) を行った。Fig. 7 に、 m/z 776.5 のマスクロマトグラムを表示した。最初に、酸加水分解反応を行っていない試料 (-HCL) を測定した結果、diacyl 17:0-22:6 PE, alkenylacyl 18:2e-22:4 もしくは alkenylacyl 18:1p-22:4 PE、 m/z 774.6 の同位体イオン (alkenylacyl 18:1e-22:6 もしくは alkenylacyl 18:0p-22:6 PE)、alkylacyl 18:0e-22:6 PE の順に溶出されることが確認された (Fig. 7a)。次いで、酸加水分解反応を行った試料 (+HCL) の測定を行ったところ、2、3 番目に溶出されていたピークの消失が確認された (Fig. 7b)。それ故、これらは、alkenylacyl 18:1p-22:4 PE および alkenylacyl 18:0p-22:6 PE 同位体であることが判明した。

更には C30 RPLC により、構造異性体である、炭素数と不飽和度の合計値が同じであるが脂肪酸側鎖の組合せの異なる分子種の分離パターンの結果を Fig. 8 に示した。38:5 PC に相当する、 m/z 866.6 のマスクロマトグラムを表示した結果、18:2-20:3、18:1-20:4、16:0-22:5、18:0-20:5 PC の順に単一のピークで分離されていることが確認された (Fig. 8a)。38:5 PE も同様に、18:1-20:4、16:0-22:5、18:0-20:5 PE の順に単一のピークで分離されていることが確認された (Fig. 8b)。このように、C30 RPLC は構造異性体を明瞭に分離することが可能であることが明らかとなった。

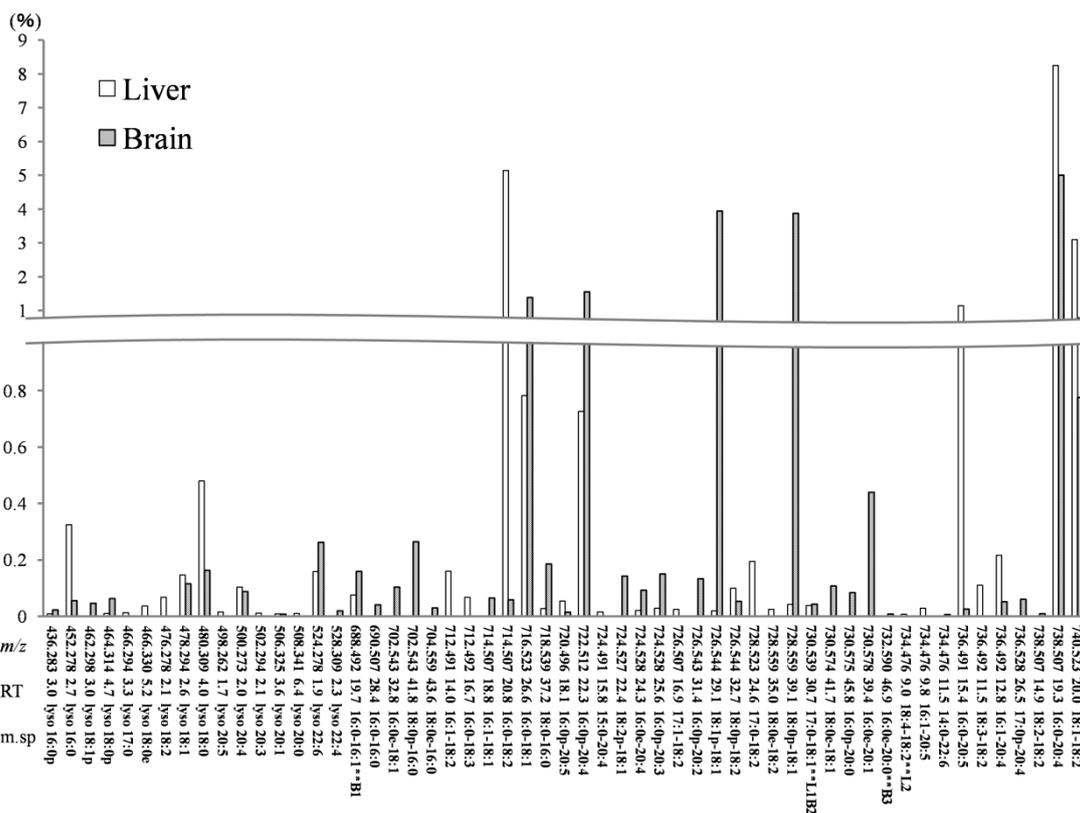
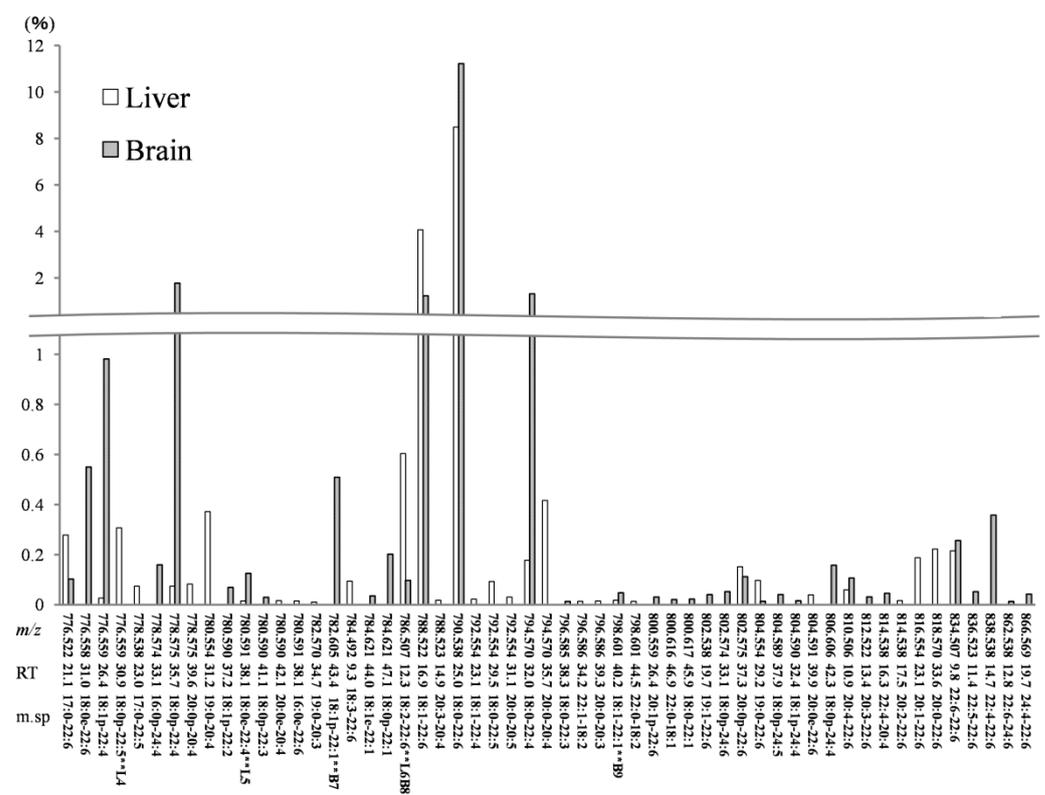
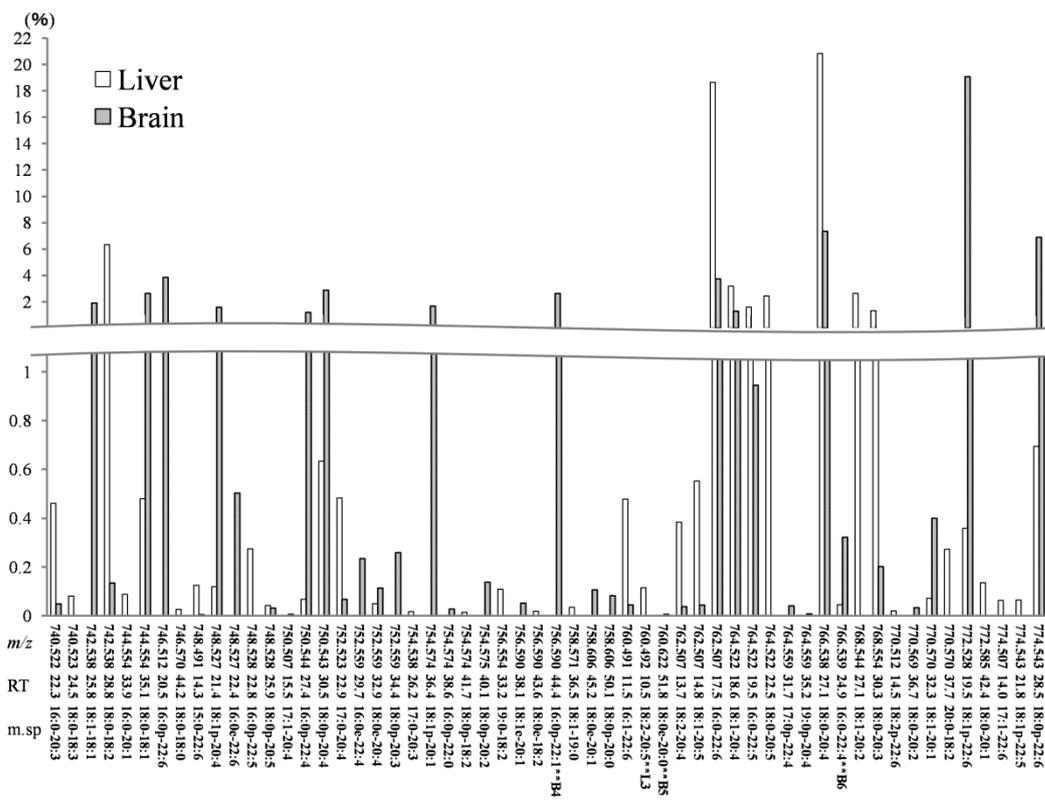


Fig. 6. Molecular species of PE from mouse liver and brain, identified by RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold change (%) in peak areas of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS² and MS³ spectra.



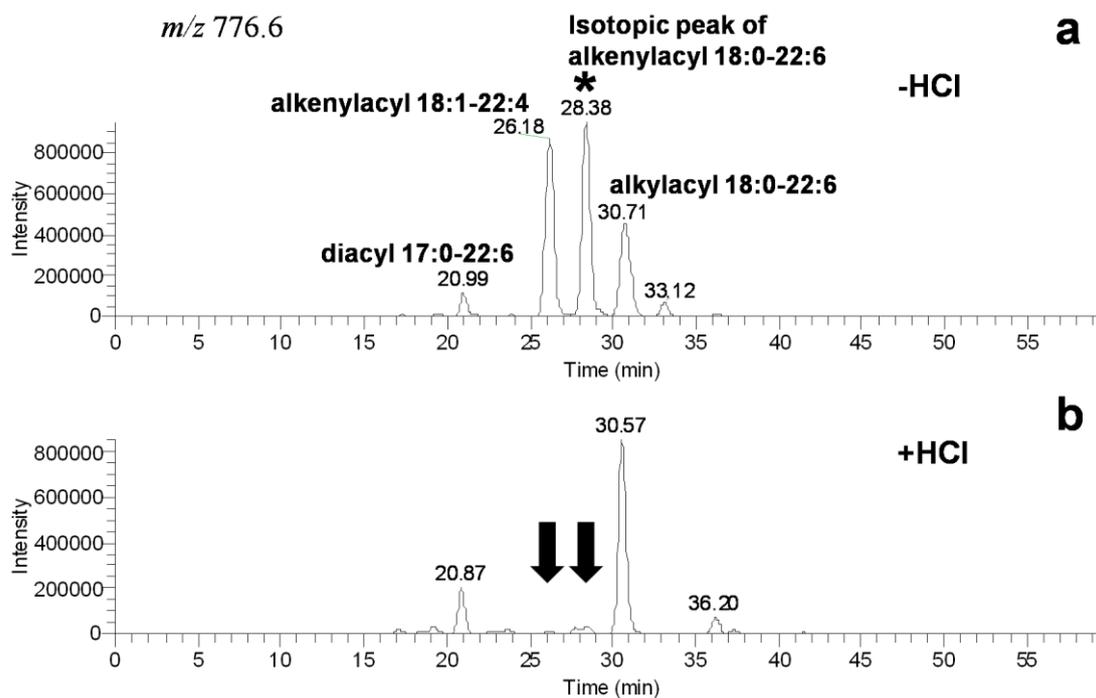


Fig. 7. Acid hydrolysis analysis of alkenylacyl species. The addition of 1 N HCl (+HCl) eliminated the peak of alkenylacyl species. (a) extracted mass chromatogram of m/z 776.6 without HCl treatment, (b) extracted mass chromatogram of m/z 776.6 with HCl treatment.

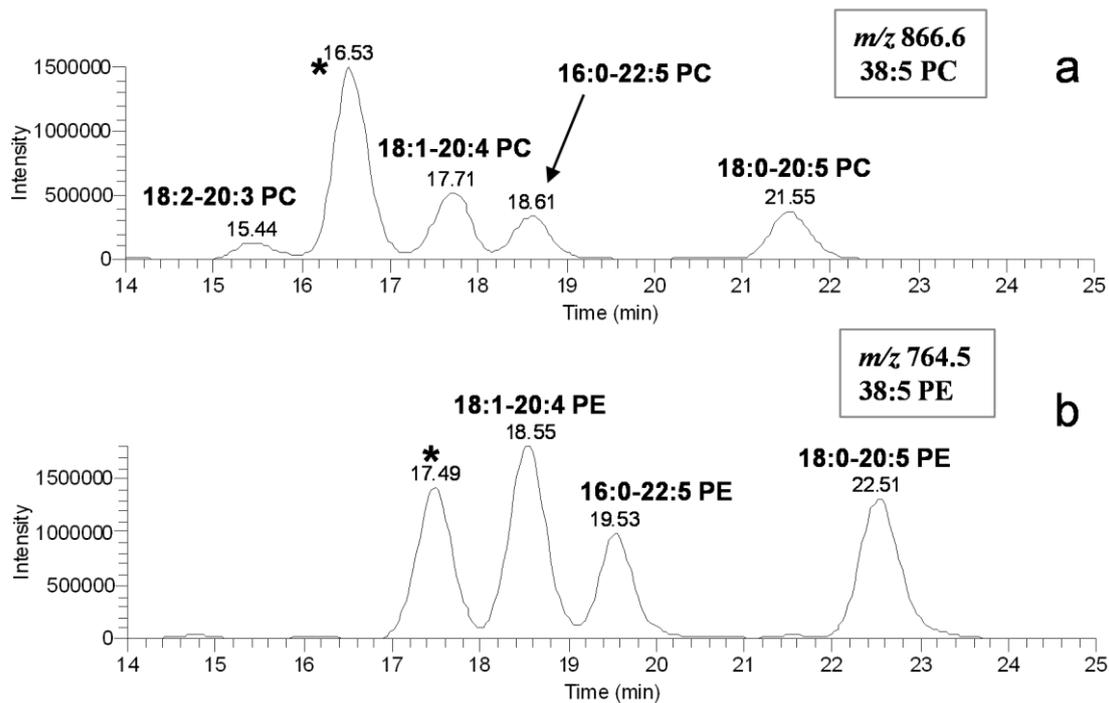


Fig. 8. C30 RPLC/ESI-MS extracted mass chromatograms. Phospholipid species with the same molecular mass but with different pairs of fatty acyl chains were detected separately. (a) m/z 866.6 38:5 PC, (b) m/z 764.5 38:5 PE. The isotopic peaks of other molecular species are indicated by an asterisk (*).

(4) PS 分子種の同定

マウス肝臓および脳の PS 分子種プロファイルを Fig. 9 に示した。その結果、肝臓では 11 種、脳では 20 種同定され、肝臓より脳の方が分子種の多様性が富んでいることが明らかとなった。

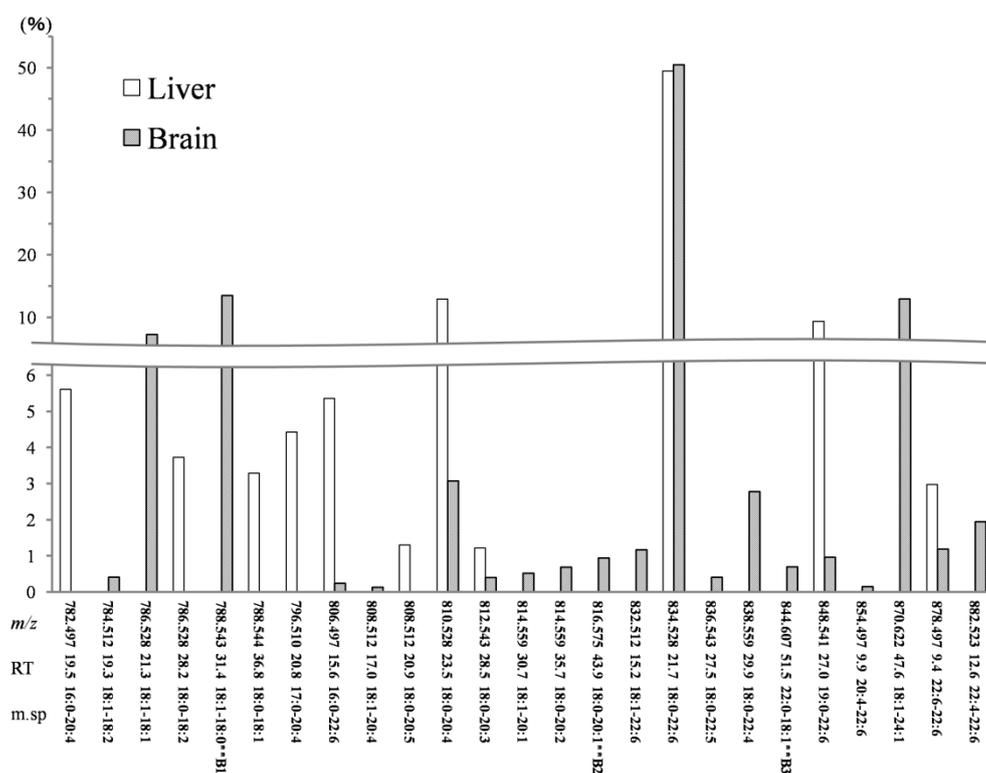


Fig. 9. Molecular species of PS from mouse liver and brain, identified by RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold changes (%) in peak areas of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS² and MS³ spectra.

(5) SM 分子種の同定

脳と比較して肝臓において、多くの SM 分子種が同定され、その大半は飽和脂肪酸鎖を有するものであった (Fig. 10)。奇数長の脂肪酸鎖 (*N*-acyl C21:0, 23:0) を有するものが、肝臓において同定された。生体サンプル中の SMs における sphingoid 骨格の多様性を決定するため、data-dependent MS³ による構造解析を行った。その結果、3 種の骨格が存在することが判明した。主要な骨格として、sphingosine (d18:1) が、その他に sphiganine (d18:0) 骨格および

sphingadienine 骨格 (d18:2) の存在が認められた (Fig. 11)。Sphingadienine 骨格を有する SM からは m/z 447 のプロダクトイオンが (Fig. 11a)、sphingosine 骨格を有するものからは m/z 449 のプロダクトイオンが (Fig. 11b)、sphinganine 骨格を有するものから m/z 451 のプロダクトイオンが (Fig. 11c)、それぞれ検出された。各 sphingoid 骨格は、 MS^3 により生じた $[M-CH_3-R=C=O]$ の m/z 値により同定した。LTQ Orbitrap における、sphingosine 骨格を有する SM の MS^2 および MS^3 の開裂パターンを Fig. 11d に示した。

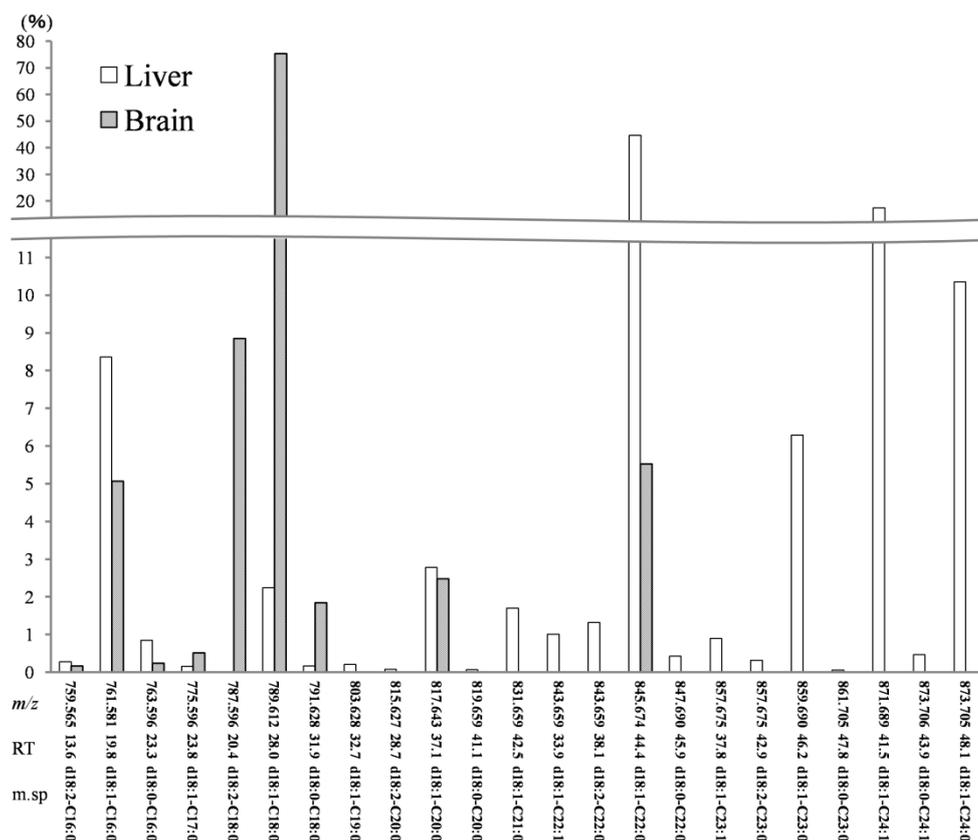


Fig. 10. Molecular species of SM from mouse liver and brain, identified RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold changes (%) in peak areas of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS^2 and MS^3 spectra.

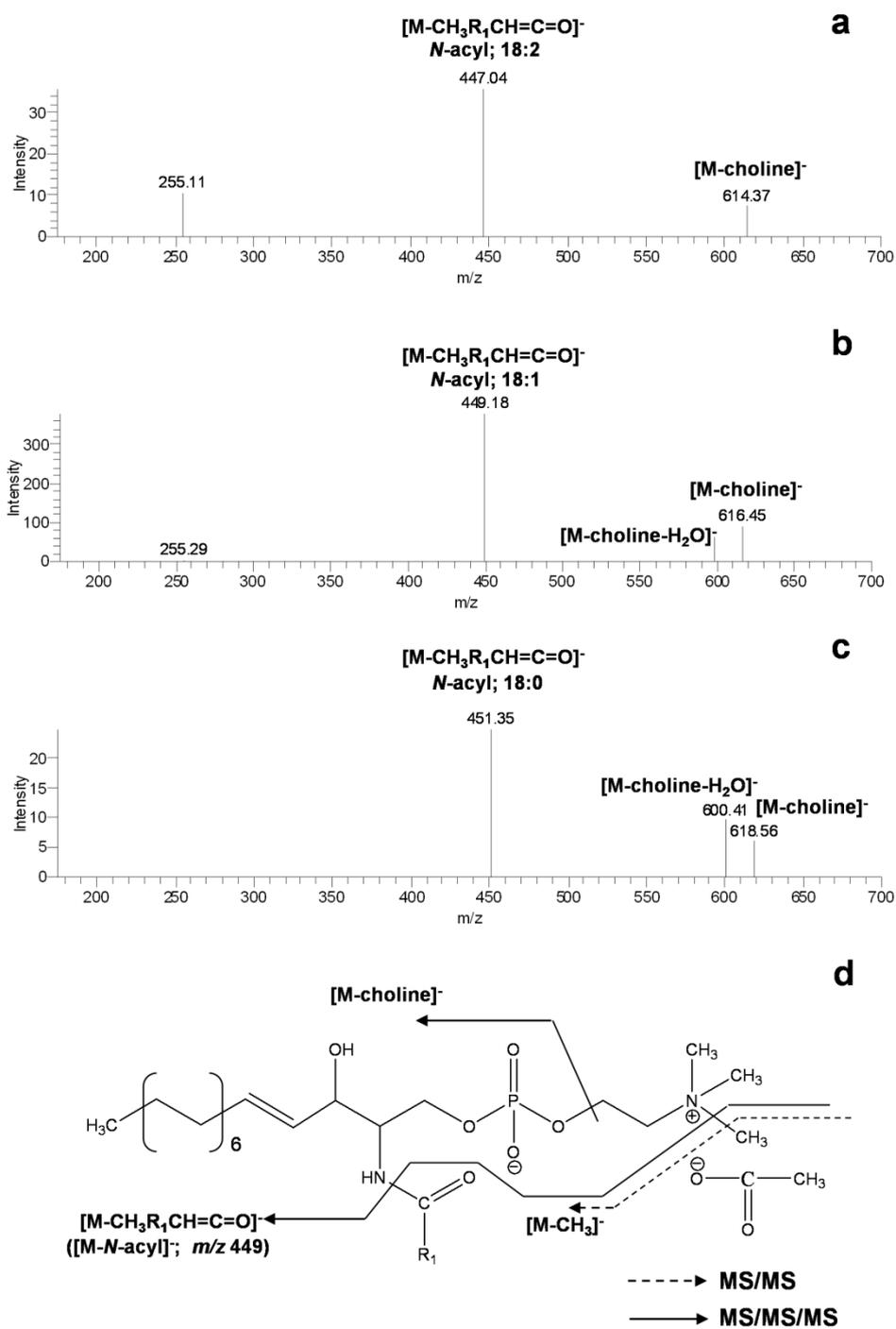


Fig.11. MS/MS/MS spectra of SMs in the negative ion mode. (a) d18:2-C16:0 SM, (b) d18:1-C16:0 SM, (c) 18:0-C16:0 SM, (d) fragmentation patterns for d18:1-C16:0 SM.

(6) PG 分子種の同定

PG の分子種の多様性は肝臓の方が富んでおり、脳においては 20:4、22:5、22:6 など PUFA を有する分子種が主に同定された (Fig. 12)。

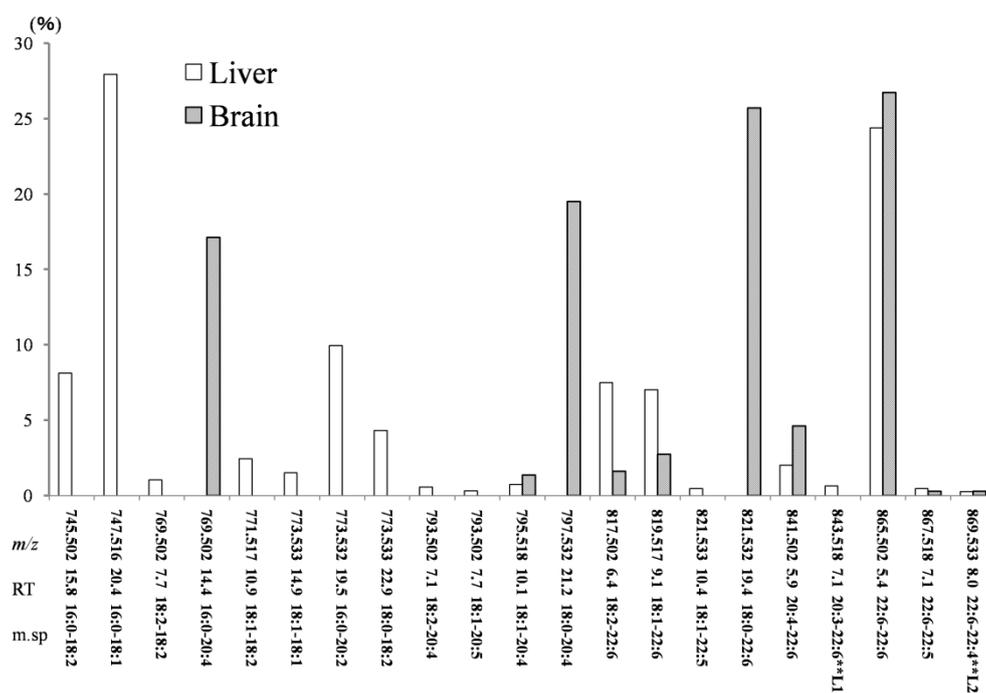


Fig. 12 Molecular species of PG from mouse liver and brain, identified RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold changes (%) in peak areas of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS² and MS³ spectra.

(7) PI 分子種の同定

同定された PI 分子種数は、脳よりも肝臓の方が多く、それぞれ 25 種および 19 種であった。肝臓および脳共に、主要な分子種は 18:0-20:4 PI であった (Fig. 13)。

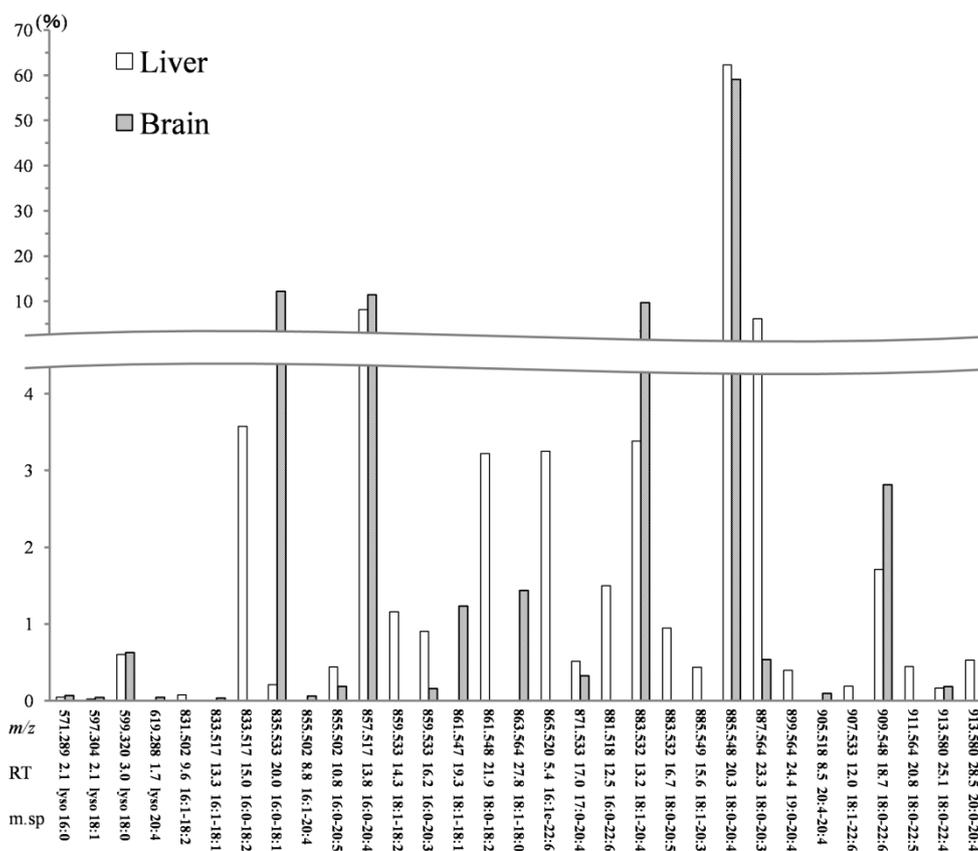


Fig. 13. Molecular species of PI from mouse liver and brain, identified RPLC-LTQ Orbitrap method. Fold changes (%) in peak areas of individual species within the same class was calculated and show in average from three different LC/MS data. Molecular species were confirmed by MS² and MS³ spectra.

第四節 考察および小活

本章において、C30 RPLC と LTQ Orbitrap を用いたリン脂質メタボローム解析手法を確立した。マウス肝臓で 291 分子種を、マウス脳で 246 分子種を同定することに成功し (Table 1)、臓器によりリン脂質プロファイルが大きく異なることを明らかにした (Fig. 4, 6, 9, 10, 12, 13)。LTQ Orbitrap による精密質量と構造情報の取得によりサブクラスレベルでの正確な分子種同定が可能となり (Fig. 5)、更には C30 RPLC により構造異性体が明瞭に分離することを実証した (Fig. 8)。また、酸性 Bligh & Dyer 法により、alkylacyl 分子種と alkenylacyl 分子種の区別が可能となり (Fig. 7) (参考論文 P57)、脳などの alkenylacyl 分子種を豊富に含む組織のリン脂質プロファイルの解明において非常に有用な手法であることを示した。本研究で構築した手法により同定した生体組織由来のリン脂質分子種数を、過去の報告 (33) と比較した結果、同定数は 2 倍以上であった。このように本手法は、生体サンプルのリン脂質プロファイル解明に非常に有用であり、新たな生理的な脂質代謝の変動や疾患機序の解明に寄与することが今後期待される。

臓器によってリン脂質プロファイルが異なる理由として、リン脂質分子に多様性をもたらすとされる、脂肪酸リモデリング (Lands cycle) (34, 35) に関わる Acyl-CoA:Lysophospholipid Acyltransferase (LPALT) の発現の差異が大きく寄与しているものと考えられる。LPALTs は、Acyl-CoA 認識特異性および極性基特異性の異なるものがそれぞれ存在し (36-39)、その発現が臓器によって異なることが報告されている (37)。また、本研究において、奇数長脂肪酸鎖を有する分子種が多数同定された。奇数長脂肪酸の起源は現在のところ明確にされていないが、プロピオン酸血症患者において症状の重症化に伴い、奇数長脂肪酸が増加することが報告されていることから (40)、プロピオニル CoA が脂肪酸生合成のプライマーとなり、奇数長脂肪酸が生合成されている可能性がある。

脂質メタボローム解析手法の一つに、direct in-fusion および順相クロマトグラフィー (Normal-Phase Liquid Chromatography: NPLC) を用いた手法 (26-28, 41) が報告されているが、構造異性体および微量に存在する分子種の定量情報を適切に取得するためには、RPLC による分離を行うことが望ましいと考えられる。NPLC によりリン脂質の分離を行った場合、クラス毎の分離は可能であるが、各クラス内の分子種は十分に分離されない (27)。そのため、NPLC を用いたリン脂質メタボローム解析手法では、微量な分子種は主要分子種からのイオンサブプレッションにより、検出および同定され難くなる可能性がある。実際に、NPLC と RPLC をそれぞれ用いたリン脂質メタボローム解析を行い、リン脂質分子種の同定数を比較した研究によると、RPLC による手法の方が NPLC による手法よりも多くの分子種が同定されている (33)。この知見は、NPLC よりもイオン

サプレッションが起き難い RPLC を用いた手法がリン脂質の一斉分析において有効であることを示している。また、このイオンサプレッションの問題は、**direct in-fusion** による手法についても言えることである。

近年、超高性能液体クロマトグラフ (**Ultra High Performance Liquid chromatograph: UPLC or UHPLC**) が開発されたことから、カラム粒子径の微細化が進められ、本研究でその必要性を示した高分離能を有する分析が、C18 逆相カラムにおいても可能となった。即ち、C18 逆相カラムにおいても本研究で用いた C30 逆相カラムと同等の分離が見込めることから、今後は **UPLC-MS** による脂質メタボローム解析が主流になると考えられ、本研究の第二章でも使用している。しかし、**UPLC** は高価なことから、旧来の **LC** を用いたリン脂質メタボローム解析を構築する際には **C30** 逆相カラムが有用である。また、近年、**positive ion mode** と **negative ion mode** を同時に測定可能な質量分析計も開発されており、リン脂質のみならず中性脂質なども測定対象とした脂質メタボローム解析手法の構築が発展していくものと考えられる。

小括

本研究により、生体サンプル中のリン脂質分子種の網羅的測定に非常に有用な手法を確立した。

1. **LTQ Orbitrap** 質量分析計による精密質量値と構造情報の取得、および、酸性 **Bligh & Dyer** 法における酸加水分解反応により、サブクラスレベルでの分子種の正確な同定が可能となった。
2. **C30** 逆相クロマトグラフィーおよび **LTQ Orbitrap** を組み合わせることにより、構造異性体である、炭素数と不飽和度の合計値が同じであるが脂肪酸側鎖の組合せの異なる分子種をそれぞれ分離・同定することが可能となり、各々の定量値を得ることができた。
3. 本手法により、過去に報告されていた手法よりも 2 倍以上の分子種数を同定することが可能となった。

参考論文

第一章 第二節 (3) alkenylacyl 分子種の酸加水分解 にて構築した手法を用いて、心筋症モデルハムスター心筋に含まれる alkenylacyl 体リン脂質の同定を行い、心筋リン脂質プロファイルの解明に寄与した。

1. Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, **Ishikawa M**, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y (2013) Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **59**: 76-85.

第二章 バイオマーカー探索・検証のための、健常ヒト血液中代謝物レベルの基盤的情報の解明

第一節 健常ヒト血液中脂質代謝物レベルの血漿・血清差、男女差、年齢差に等に関する網羅的検討

第一項 序文

血液試料は、得られる情報量が多いこと（10）に加え、低侵襲的に採取できることからバイオマーカー探索に多用されている（2-9, 42, 43）。しかし、バイオマーカーの利用はまだ緒についたばかりであり、実データを反映した明確な評価要件が無いため、その探索・検証・利用は個別に模索している状況にある。特に、血中脂質代謝物に関する基盤的情報は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、第一章で構築した、逆相クロマトグラフィーによる脂質メタボローム解析手法を応用した高網羅性の解析系を新たに構築し、血中脂質バイオマーカー探索において必要とされる下記の三つの要件を明らかにすることを目的として、健常ヒト血液試料を対象に脂質メタボローム解析を行った。

- (1) 脂質代謝物バイオマーカー探索に適した血液マトリクスの検討、
- (2) 性差・年齢差を明らかにし、検体背景による脂質代謝物レベルへの影響（バイオマーカー探索における交絡因子）の解明、
- (3) 血液試料の凍結融解が代謝物の安定性に及ぼす影響の解明（試料保管条件の検討）

略称

oxFA, oxidative Fatty acid; UPLC, Ultra Performance Liquid chromatograph; TOF, Time-of-flight; MRM, Multiple Reaction Monitoring; PUFA, poly-unsaturated fatty acid; Cer, ceramide; CB, cerebroside; Ch, cholesterol; ChE, cholesteryl ester; DG, diacylglycerol; TG, triacylglycerol; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; TXB₂, Thromboxane B₂; HHT, hydroxyheptadecatrienoic acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic; diHETE, dihydroxyeicosatetraenoic; HDoHE hydroxydocosahexaenoic acid; diHETrE, dihydroxyeicosatrienoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acid.

第二項 検体および実験方法

(1) 検体情報

年齢・性別の異なる健常白人 60 名の血液試料を PromedDX 社から購入した。PromedDX から購入した血液試料の使用については、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認、または確認を得ている。血液試料は、全ての被験者からインフォームドコンセントを書面で得た後に採取した。各被験者の採血は、前日の午後 20 時より 14 h 以上の絶食を経た後の翌日午前 10 時に行った。採血後 2 h 以内に血清・血漿を調製し、直ちに -80°C で保存した。被験者を、各群 15 名から成る、若齢男性（中央値 29 歳、YM: young male）、若齢女性（中央値 28 歳、YF: young female）、老齢男性（中央値 59 歳、EM: elderly male）、老齢女性（中央値 59 歳、EF: elderly female）の 4 群に分類した（Table 3）。PromedDX 社から送付された試料は、氷上で融解した後に分注し、脂質抽出を行うまでの間 -80°C にて凍結保存した（計 2 回の凍結融解）。

Table 3. Subject information (fasted whites, n = 15 each group)

Group	Young male (YM)	Young female (YF)	Elderly male (EM)	Elderly female (EF)
Age range (yr)	25–33 (median 29)	25–34 (median 28)	55–64 (median 59)	55–63 (median 59)
Height (cm)	154.9–185.4 (median 172.7)	149.9–182.9 (median 162.6) [†]	165.1–190.5 (median 177.8) ^{††}	152.4–175.3 (median 162.6) [†]
Weight (kg)	52.2–113.9 (median 78.0)	59.9–147.4 (median 93.4)	63.5–116.1 (median 75.8)	62.6–114.3 (median 90.7)
BMI [kg/m ²]	18.0–36.6 (median 26.2)	24.9–49.7 (median 35.4) [†]	19.5–34.9 (median 24.5)	26.1–43.3 (median 32.7) [†]

(BMI, body mass index).

[†]Heights and BMIs are significantly different between males and females of corresponding age groups ($p < 0.05$ by Man-Whitney *U*-test).

^{††}Heights of elderly males are significantly higher than those of young males ($p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test).

doi:10.1371/journal.pone.0091806.t001

(2) 実験材料

使用した有機溶媒は、第一章 第二節 (3) に準じた。MS-grade ギ酸は和光純薬から、LC/MS-grade 蒸留水は関東化学から購入した。脂質標準品である、1,2-dipalmitoyl d6-3-sn glycerophosphatidylcholine および 1,2-dioctanoyl-3-linoleoyl-sn-glycerol は Larodan から、deuterated leukotriene B4 は Cayman Chemical からそれぞれ購入した。固層抽出カラム Oasis HLB Vac RC cartridges は、Waters より購入した。

(3) 脂質抽出

血清および血漿からの脂質抽出は、Bligh & Dyer 法の変法により行った。血清・血漿 100 μL をメタノールで希釈し、内部標準 mix (1,2-dipalmitoyl d6-3-sn glycerophosphatidylcholine、1,2-dioctanoyl-3-linoleoyl-sn-glycerol、deuterated leukotriene B4) を添加した。次いで、クロロホルム：メタノール：20 mM リ

ン酸カリウム緩衝液 (Kpi) の組成比が 1 : 2 : 0.8 となるように各液を添加した後、5 min の攪拌を行った。混合液を二層に分離させるため、各 1 容量のクロロホルムと Kpi を添加し、1000 × g で 10 min の遠心分離を行った。上層の水層を回収し、下層の有機層は 100 mM 塩化カリウム : メタノール : クロロホルム (組成比 48 : 47 : 3) から構成される水溶液の添加による再抽出により回収した。得られた抽出溶液は窒素ガスで乾固し、1 mL のクロロホルム : メタノール (1 : 1) に溶解して、-90 °C で保存した (BD 画分)。アルケニル分子種の同定のための酸加水分解反応は、第一章 第二節 (3) に準じた。

上層の水層中に含まれるエイコサノイド等の酸化脂肪酸 (oxFA) を Oasis HLB Vac RC cartridge を用いた固層抽出により精製、回収した。メタノールおよび水により平衡化したカラムに、10 倍量の H₂O (pH 3.0) で希釈したサンプルをアプライした。サンプル溶出後、3 mL の H₂O およびヘキサンによるカラムの洗浄を行い、3 mL ギ酸アンモニウムによる溶出画分を得た。得られた抽出溶液は窒素ガスで乾固し、1 mL のクロロホルム : メタノール (1 : 1) に溶解して、-90 °C で保存した (MF 画分)。

(4) LC-MS/MS

グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、中性脂質などの疎水性の高い脂質代謝物を含む BD 画分の測定は、超高性能液体クロマトグラフ - 飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOF MS、UPLC: ACQUITY UPLC、TOF MS: LCT Premier XE、Waters) を用いた両極性 (positive/negative ion mode) での non-target の網羅的手法により測定した。カラムは、ACQUITY UPLC BEH C18 逆相カラム (150 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm) を用いた。移動層の組成は基本的には第一章の組成を踏襲し、A 液 (アセトニトリル : メタノール : H₂O = 9 : 9 : 2, 0.1 % ギ酸、0.028 % アンモニア水溶液) および B 液 (イソプロパノール、0.1 % ギ酸、0.028 % アンモニア水溶液) を用いた。流速 70 μL/min、initial: A/B (100/0) において、0 → 5 min (linearly converting) : A/B (85/15)、5 → 25 min (linearly converting) : A/B (70/30)、25 → 40 min (linearly converting) : A/B (55/45)、40 → 50 min (linearly converting) : A/B (40/60)、50 → 55 min (linearly converting) : A/B (20/80)、55.1 → 67 min (holding) : A/B (15/85) の条件でグラジエント溶出を行った。質量分析は、positive ion mode および negative ion mode の両 mode の同時測定を行い、capillary voltage: 3000 V/-2800 V (positive/negative)、cone voltage: 40 V/-40 V (positive/negative) に設定した。また、negative ion mode における in-source fragmentation を行うため、aperture voltage を -60 V に設定した。Positive ion mode において中性脂質の定量値を、negative ion mode においてグリセロリン脂質およびスフィンゴ脂質の定量値

を得た。また、UPLC-TOF MS により検出されたリン脂質の構造解析（脂肪鎖鎖長決定およびサブクラスの判別）は、第一章 第二節 (3) (4) (5) に準じた。

oxFA を含む MF 画分の測定は、超高性能液体クロマトグラフ - 三連四重極型質量分析計（5500QTRAP: ABsciex、MA、USA）を用いた選択的手法（UPLC-MS/MS: MRM）により測定した。MRM におけるプレカーサーイオンとプロダクトイオンの transition を Table 4 に示した。カラムは、ACQUITY UPLC BEH C18 逆相カラム（150 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm）を用いた。移動相には、A 液（H₂O / 酢酸 100:0.1 (v/v)）および B 液（アセトニトリル/メタノール 4:1 (v/v)）を用いた。LC は、initial: A/B (73/27) において、0 → 5 min (linearly converting) : A/B (50/50)、5 → 35 min (linearly converting) : A/B (20/80)、35 → 40 min (linearly converting) : A/B (0/100)、40 → 50 min (holding) : A/B (0/100) のグラジエント溶出を行った。流速は、50 μL/min (0 - 35 min)、50 → 100 μL/min (35 - 40 min)、100 μL/min (40 - 48 min) とした。

(5) 凍結融解

若年男性の血清・血漿の凍結融解 (-80°C にて 30 min 凍結後、氷上で融解) を 10 回行った。この 10 回の反復凍結融解を行ったサンプルも測定試料とし、通常試料（2 回凍結融解）との脂質代謝物レベルの差異を比較した。

(6) データ解析

UPLC-TOF MS により得られたデータは、2DICAL（三井情報株式会社）を用いてピークの検出を行い (44)、ピーク保持時間、精密質量値、マススペクトル、LTQ Orbitrap による構造解析の結果に基づき、代謝物の同定を行った。相対定量は、内部標準による補正を行ったピーク height 値を用いて行い、Wilcoxon matched-pairs signed-rank test（血漿・血清差および凍結融解の回数による比較）、または、Mann-Whitney U-test（男女差および年齢差）による統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。UPLC-MS/MS により得られたデータは、MultiQuant（AB Sciex）を用いてピーク面積値を算出し、内部標準による補正を行ったピーク area 値を用いて相対定量を行った。統計解析は、UPLC-TOF MS のデータと同様に行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。統計解析には、R statistical environment (<http://r-project.org/>) software を用いた。

Table 4. MRM transitions for detection of PUFA and oxFA.

metabolite	Q1/Q3
Linolenic acid (18:3 FA) derivatives	
9-HOTrE(alpha)	293.2/171.1
13-HOTrE(alpha)	293.2/195.1
Arachidonic acids (20:4 FA) derivatives	
Arachidonic acid	303.2/259.2
12-HHT	279.2/179.2
5-HETE	319.2/115.1
8-HETE	319.2/155.1
12-HETE	319.2/179.1
15-HETE	319.2/219.1
16-HETE	319.2/233.2
18-HETE	319.2/261.2
5,15-diHETE	335.2/201.2
5,6-diHETrE	337.2/145.0
11,12-diHETrE	337.2/167.2
14,15-diHETrE	337.2/207.2
Thromboxane B2	369.2/195.1
Eicosapentaenoic acid (20:5 FA) derivatives	
Eicosapentaenoic acid	301.2/257.2
5-HEPE	317.2/115.1
12-HEPE	317.2/179.1
17,18-diHETE	335.2/247.2
Docosahexaenoic acid (22:6 FA) derivatives	
Docosahexaenoic acid	327.2/283.2
4-HDoHE	343.2/101.1
10-HDoHE	343.2/153.1
14-HDoHE	343.2/205.1
20-HDoHE	343.2/241.1
19,20-diHDoPE	361.2/273.2

第三項 結果

(1) 健常ヒト血液中の脂質代謝物の同定

食事制限を行った年齢および性別が異なる健常人 60 名の血液試料の脂質メタボローム解析を行い、同定された脂質代謝物クラスと分子種数を Table 5 に示した。BD 画分からは、13 クラス、計 228 分子種の脂質代謝物が同定された。MF 画分からは、PUFA および oxFA が 25 分子種が同定された。PUFA は、AA、EPA、DHA の 3 分子種が、oxFA は、AA 酸代謝物が 12 分子種、EPA 代謝物が 3 分子種、DHA 代謝物が 5 分子種、リノレン酸代謝物 2 分子種がそれぞれ同定された。

Table 5. Numbers of identified lipid species in human blood by UPLC-MS(/MS).

Class	number of molecular species	representative molecular species
phosphatidylcholine (PC)	54	16:0-18:2 PC
lysoPC	9	18:0 lysoPC
phosphatidylethanolamine (PE)	18	18:0-20:4 PE
lysoPE	2	20:4 lysoPE
phosphatidylinositol (PI)	8	18:0-20:4 PI
sphingomyelin (SM)	22	d18:1-16:0 SM
ceramide (Cer)	7	d18:1-24:0 Cer
cerebroside (CB)	8	monohexosyl d18:1-24:0 CB
sterol	1	cholesterol (Ch)
cholesteryl ester (ChE)	12	18:2 ChE
ubiquinone	1	coenzyme Q10 (CoQ10)
diacylglycerol (DG)	7	36:2 DG
triacylglycerol (TG)	79	52:3 TG
free poly-unsaturated fatty acids (PUFA)	3	arachidonic acid
eicosanoids and docosanoids (oxFA)	22	5-HETE
total	253	

(2) 血漿と血清間の代謝物レベルの相違（血漿・血清差）

同定された 253 脂質代謝物の内、有意な血漿・血清差 ($p < 0.05$) を示した代謝物は、若年男性において 34 分子、若年女性において 82 分子、老齡男性において 107 分子、老齡女性において 74 分子であった。リン脂質および中性脂質においては、性別および年齢を問わず、lysoPCs および DGs が血漿よりも血清において顕著に (serum/plasma fold change > 1.5 -fold および $p < 0.01$) を高いレベルを示した (Fig. 14)。PUFA および oxFA に関しては、アラキドン酸、TXB₂、12-HHT、12-HETE などが顕著な血漿・血清差を示した (Table 6)。これらの知見は、血液凝固の結果を反映しているものと考えられる。

(3) ヒト男女間の代謝物レベルの相違 (男女差)

性別が、脂質バイオマーカー探索の交絡因子となり得るか明らかにするため、脂質代謝物レベルの性差を調査した。同定された 253 脂質代謝物の内、有意な性差 ($p < 0.05$) を示した代謝物は、若年血漿において 16 分子、若年血清において 20 分子、老齡血漿において 61 分子、老齡女性において 33 分子であった。顕著な性差 (female/male fold change > 1.5 -fold or < 0.67 -fold および $p < 0.01$) が認められた代謝物を Fig. 15 に示した。若齡群においては、多くの SM 分子種が男性よりも女性の方が顕著に高いレベルを示した (Fig. 15A)。一方、老齡群においては、SM のみならず、様々なクラス (PCs、PE、Cers、ChE、TGs、oxFA) の性差も認められた (Fig. 15B)。特徴的なことに、18:0-22:6 PC、18:0-22:6 PE、22:6 ChE などの DHA を含有する脂質が、男性よりも女性において顕著に高いレベルを示した。

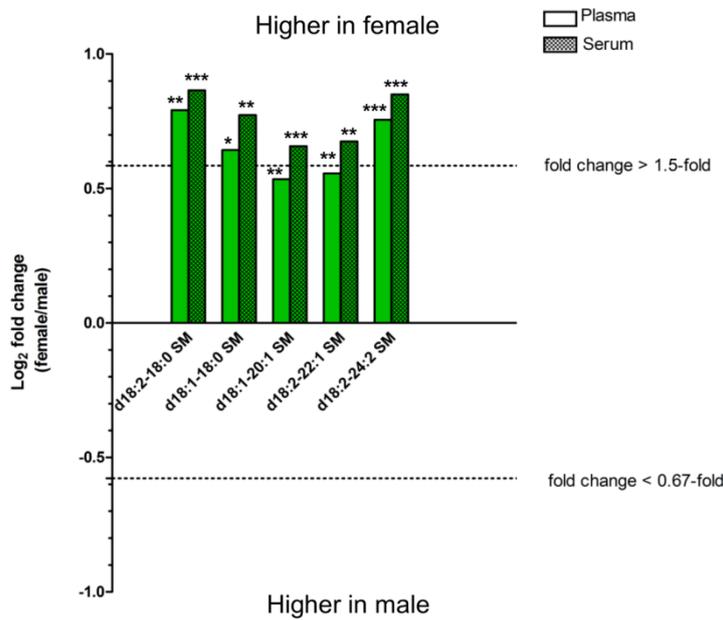
oxFA に関しては、老齡群において 18-HETE および 17,18-diHETE が男性よりも女性において顕著に低いレベルを示した。

(4) ヒト年齢差が代謝物レベルに与える影響 (年齢差)

性別と同様に、加齡が脂質バイオマーカー探索の交絡因子となり得るか明らかにするため、脂質代謝物レベルの年齢差を調査した。同定された 253 脂質代謝物の内、有意な性差 ($p < 0.05$) を示した代謝物は、男性血漿において 8 分子、男性血清において 29 分子、女性血漿において 81 分子、女性血清において 59 分子であった。顕著な性差 (elderly/young fold change > 1.5 -fold or < 0.67 -fold および $p < 0.01$) が認められた代謝物を Fig. 16 に示した。男性において、若齡群と老齡群の脂質代謝物レベルは、5 分子 (5-HEPE、16:0-20:5 PC、d18:1-22:0 Cer、20:5 ChE、60:1 TG) を除き、ほぼ同等であり (Fig. 16A)、これらは全て若齡よりも老齡において高いレベルを示した。一方、女性においては男性と異なり、TG を中心として多くの分子種が顕著な年齢差が認められた (Fig. 16B)。これらの代謝物は、cytochrome P450 代謝物である 18-HETE を除き、若齡よりも老齡において高いレベルを示した。また、18:0-22:6 PC などの DHA を含有する代謝物は、老齡において性差を示していたが (Fig. 15B)、女性において年齢差も示すことが明らかとなった (Fig. 16B)。

留意すべき点として、lysoPC の顕著な年齢差が血漿でのみ観察されたことが挙げられる (Fig. 16B)。このことは、血清においては血液凝固の影響により lysoPC のレベルが上昇したため、本来存在していた lysoPC の年齢差が埋まれている可能性を示唆している。

A Young



B Elderly

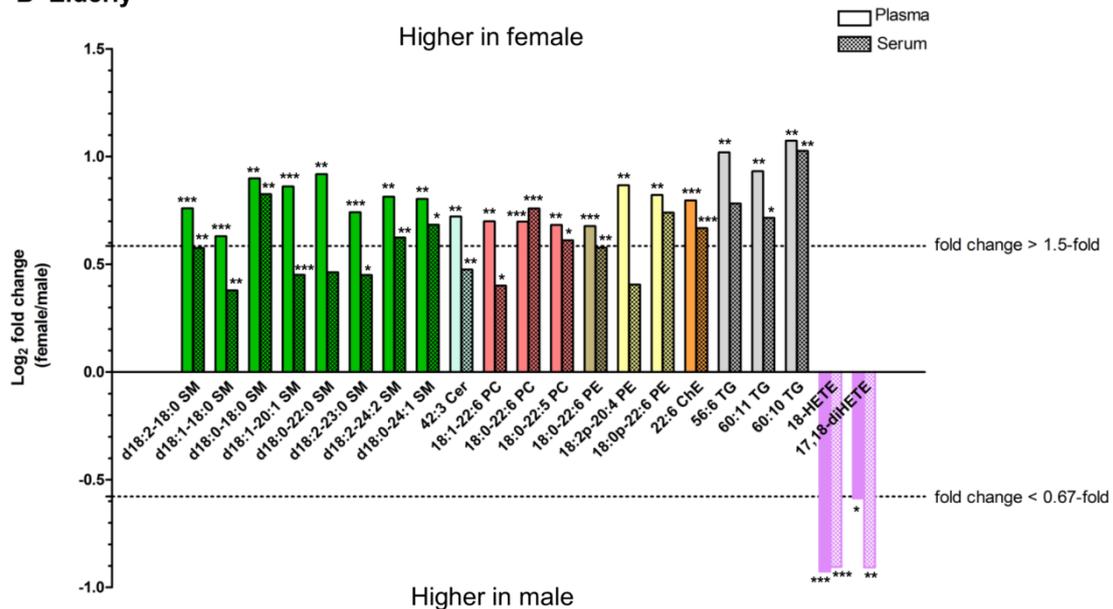
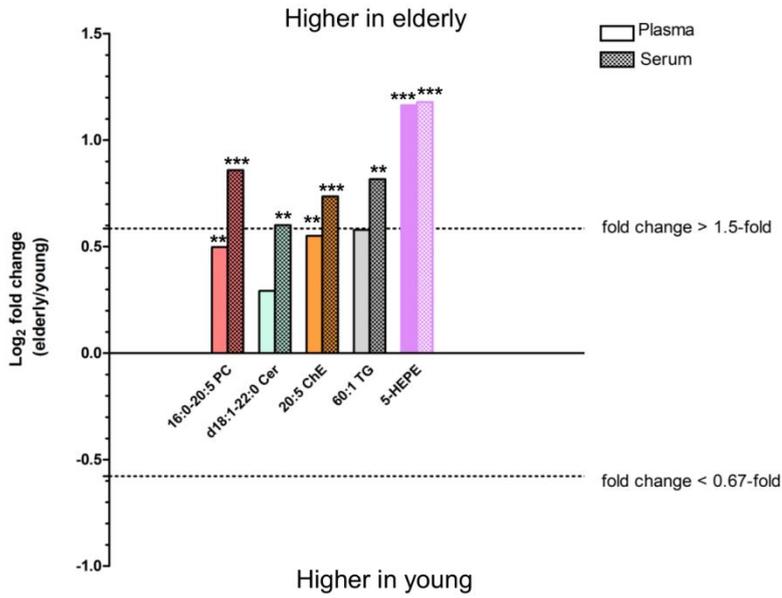


Fig 15. Differences in lipid metabolite levels in human blood samples between males and females. Lipid metabolites with marked fold changes (female/male >1.5 or <0.67 and $p < 0.01$ values) between males and females in either plasma or serum are plotted for young (A) and elderly (B) aged groups. Statistical significance was estimated by Mann-Whitney U-test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

A Male



B Female

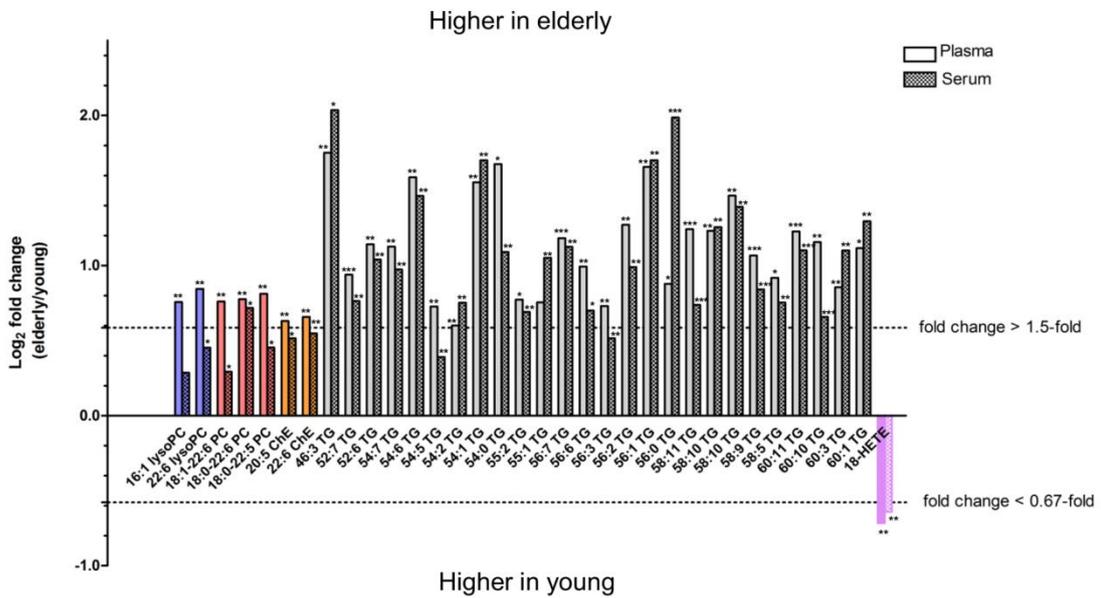


Fig 16. Differences in lipid metabolite levels in human blood samples between young and elderly age groups. Lipid metabolites with marked fold changes (elderly/young subjects fold change >1.5 or <0.67 and $p < 0.01$ values) between young- and elderly-aged groups in either plasma or serum are plotted for male (A) and female (B) groups. Statistical significance was estimated by Mann-Whitney U-test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

(5) 血液試料の凍結融解が代謝物の安定性に及ぼす影響

血漿試料の凍結融解による各クラスの脂質代謝物レベルの変動の比（10 cycles/2 cycles）の平均値を Table 7 に示した。10 回の凍結融解により、ChE を除く全ての代謝物レベルが減少し、中でも PUFA および oxFA のレベルの減少が顕著（< 0.70-fold）であった。一方、ChE は 10 回の凍結融解により、レベルが増大した。

Table 7. Effects of repeated freeze-thawing on lipid metabolite stability in plasma of young males.

Class	10 cycles/2 cycles (mean)	SD
phosphatidylcholine (PC)	0.85-fold	0.02
lysoPC	0.82-fold	0.06
phosphatidylethanolamine (PE)	0.82-fold	0.06
lysoPE	0.81-fold	0.11
phosphatidylinositol (PI)	0.81-fold	0.17
sphingomyelin (SM)	0.88-fold	0.08
ceramide (Cer)	0.95-fold	0.15
cerebroside (CB)	0.79-fold	0.05
cholesterol (Ch)	0.70-fold	-
cholesteryl ester (ChE)	1.12-fold	0.17
coenzyme Q10 (CoQ10)	1.05-fold	-
diacylglycerol (DG)	0.70-fold	0.09
triacylglycerol (TG)	0.85-fold	0.15
free poly-unsaturated fatty acids (PUFA)	0.45-fold	0.10
eicosanoids and docosanoids (oxFA)	0.69-fold	0.11

第四項 考察および小括

第二章 第二節の結果と併せて、第二章 第二節 第四項にて後述する。

第二節 非絶食ヒト血液試料の脂質メタボローム解析による脂質プロファイルの解明

第一項 序文

食事が血中脂質代謝物レベルに及ぼす影響を検討するために、非絶食健常人由来の血液試料の脂質メタボローム解析を行った。

第二項 検体および実験方法

(1) 検体情報

絶食を行っていない健常白人 10 名の血液試料を PromedDX 社から購入した。PromedDX からの血液試料の購入は、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得ている。検体は、男性 5 名 (27-33 歳、中央値 32 歳) および女性 5 名 (26-33 歳、中央値 32 歳) から構成される。血液試料は、全ての被験者からインフォームドコンセントを書面で得た後、採取した。PromedDX 社から送付された試料は、氷上で融解した後に分注し、脂質抽出を行うまでの間 -80°C にて凍結保存した。

(2) 脂質抽出

第二章 第一節 第三項 (3) に準じた。

(3) LC-MS(/MS)

第二章 第一節 第三項 (4) に準じた。

(4) データ解析

第二章 第一節 第三項 (6) に準じた。

第三項 結果

(1) 血漿・血清差

グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ジおよびトリアシルグリセロール分子種に顕著な血漿・血清差は男女のいずれにおいても見られなかった。一方、PUFA および oxFA においては、有意では無いが同個人の血漿血清間で 10 倍以上変動を示した代謝物として、TXB₂、12-HHT、12-HETE が存在し、い

ずれも血漿よりも血清において高いレベルを示した (Table 8)。また、12-HEPE、14-HDoHE、20-hydroxy leukotriene B4 は血清でのみ検出された。

(2) 男女差

血漿・血清間のいずれかで有意な性差を示した代謝物として、11,12-diHETrE、14,15-diHETrE、17,18-diHETE、20-hydroxy leukotriene B4 が検出された (Table 8)。また、16-HETE および 18-HETE は男性の試料でのみ検出された。

Table 8. Oxidative fatty acid metabolites showing different levels between plasmas and sera or in genders.

Metabolites with higher levels in serum than in plasma (more than 10-fold depending on the individual)			
TXB ₂		12-HHT	12-HETE
Metabolites detected only in serum (plasma levels were below the detection limit)			
12-HEPE		14-HDoHE	20-hydroxy leukotriene B4
Metabolites with different levels between males and females			
11,12-diHETrE	14,15-diHETrE	17,18-diHETE	20-hydroxy leukotriene B4
Metabolites detected only in males (female levels were below the detection limit)			
16-HETE		18-HETE	

第四項 考察および小括

第二章 第一節では、脂質バイオマーカー探索において留意すべきことを明らかにするため、年齢・性別の異なる健常白色人種 60 名の脂質メタボローム解析を行った。ここで行った脂質メタボローム解析手法は、リン脂質、スフィンゴ脂質、中性脂質を主に対象とした non-target の手法と、PUFA および エイコサノイドを対象とした MRM の手法の二つを用いている。前者の non-target の手法の LC の溶媒組成は、第一章の組成を基本としており、グラジェント条件を中性脂質も測定可能な条件に改良した。また、使用している LC および MS (UPLC-TOF MS) であり、第一章の LTQ Orbitrap と異なるが、分子種の決定において LTQ Orbitrap および酸性 Bligh & Dyer 法を用いており、第一章の手法の有用性が活かされている。

最初に脂質バイオマーカー探索に適したマトリクスを検討するため、脂質代謝物レベルの血漿・血清差を明らかにした。その結果、血清において血漿と比較して lysoPC、DG、PUFA、oxFA などの多くの脂質代謝物のレベルが増加することが明らかとなった (Fig. 14、Table 6)。これは、血清においては、血液凝固に伴って Phospholipase C が活性化され、アラキドン酸カスケードが亢進

した結果、これらの代謝物のレベルが増加したものと考えられる (24, 45)。このことより、血清では生体内の脂質代謝変動を正確に反映しない可能性が示唆された。この可能性を裏付ける知見として、女性における lysoPC の年齢差が血漿でのみ認められたことが挙げられる (Fig. 16B)。これは、血清では血液凝固の影響により lysoPC のレベルが増大し、本来存在する年齢差が検出できないことを示唆しているものと考えられる。

また、本研究では新規知見として、血漿よりも血清において 5,6-diHETrE のレベルが顕著に高いこと (serum/plasma fold change: > 3.2-fold)、および 8-HETE のレベルが顕著に低いこと (serum/plasma fold change: < 0.41-fold) を明らかにした (Table 6)。血液凝固においてこれらの脂質代謝物レベルが変動する機序は現在のところ不明であるが、5,6-diHETrE に関してはその前駆体である 5,6-EET が血小板において容量性カルシウム流入 (capacitative calcium entry) を引き起こすという仮説が提唱されており (46)、5,6-diHETrE が血液凝固に関与している可能性が示唆された。

更には、非絶食検体の脂質プロファイルを、第二章 第二節 おいて明らかにした (Table 8)。その結果、TXB₂ や 18-HETE など幾つかの代謝物に関して、血漿・血清差、もしくは性差が認められたものの、絶食した検体と比較すると、本来存在する差を十分に検出できていないことが明らかとなった。絶食条件と比較して、検体数が少ないことも理由に考えられるが、その各脂質レベルのプロファイルは大きく異なることから、非絶食検体は、食事の影響により生体内の脂質代謝変化を正確に反映しておらず、バイオマーカー探索には不適切であることが示唆された。以上の知見より、脂質バイオマーカー探索には、絶食検体の血漿を用いることが望ましいことが示された。

次に、血中脂質代謝物レベルの性差・年齢差を調査した (Fig. 15, 16)。その中で、脂質バイオマーカー探索における交絡因子となり得る脂質代謝物を Table 9 に示した。これらの代謝物の疾患等による変動 (fold change) が Table 9 に示す範囲内でバイオマーカー候補となった際には、性差や年齢差が交絡因子となり得るので注意を要することが示唆された。近年、SM がアルツハイマー病の疾患診断マーカー候補として報告されていることから (42)、その適格性を判断する上で、本知見は非常に有用と考えられる。また、TGs は 2 倍以上の年齢差を示す分子種が多数存在することからバイオマーカー候補としては不適切であると考えられる。

Table 9. Potential confounding factors for lipid biomarker exploration.

metabolite	gender- or age-associated difference	maximum value of fold change
SMs	female > male (both ages)	1.89-fold
TGs	elderly > young (female)	3.60-fold
18-HETE	male > female (elderly) and young > elderly (female)	0.53-fold
DHA-esterified PLs	female > male (elderly) and elderly > young (female)	1.71-fold
DHA-esterified ChE	female > male (elderly) and elderly > young (female)	1.74-fold
5-HEPE	elderly > young (male)	2.24-fold

本研究により、年齢を問わずに SMs のレベルが男性よりも女性において高いことが明らかとなった (Fig. 15)。過去の報告により、SM 代謝制御にエストロゲンが関与している可能性が示唆されているが (47)、SMs の性差がエストロゲンに起因しているかについては未だ議論の余地がある。その理由として、エストロゲンレベルが著しく低下している閉経後の高齢女性 (48) においても SMs のレベルが男性よりも高いこと (Fig. 15B)、また、性ホルモンのレベルが低い幼児においても SMs の性差が報告されている (49) ことが挙げられる。それ故、SMs の性差はエストロゲン以外の何らかの因子により制御されている可能性が高いと考えられる。また、顕著な性差を示した脂質代謝物として、18:0-22:6 PC および 22:6 ChE などの DHA 含有脂質が挙げられる (Fig. 15B)。近年、ラットにおいて、DHA 合成に関与する酵素の活性の制御に、エストロゲンが関与している可能性があることが報告された (50)。しかしながら、これらの代謝物は女性において年齢差も示していることから (Fig. 16B)、エストロゲンのみならず、他の因子も DHA 代謝制御に関与している可能性が示唆された。今後、SMs および DHA 含有代謝物の性差・年齢差の機序解明についての更なる研究が期待される。

女性における TGs の年齢差もエストロゲンが関与している可能性がある。過去の報告により、エストロゲンが、low-density lipoprotein などの代謝制御に関与している可能性が示唆されている (51)。そのため、高齢女性においては、閉経後のエストロゲン分泌の低下が lipoprotein の代謝制御に影響を及ぼし、その結果として TGs のレベルを増大させているものと考えられる。

男性における 5-HEPE の年齢差に関する詳細な機序は不明であるが、Schuchardt らにより、血清における 5-HEPE などの EPA 由来エイコサノイドのレベルと赤血球膜中の EPA 存在量が強く相関しているということが報告されている (52)。更には、高齢男性は、若齢男性よりも食事由来 EPA を血漿リン脂質および細胞に取り込みやすいという報告 (53, 54) もあり、これらの現象が 5-HEPE の年齢差に影響を及ぼしている可能性がある。

血液試料の凍結融解が代謝物の安定性に及ぼす影響を調査した結果、ChEを除く全てのクラスの代謝物のレベルが凍結融解により減少することが明らかとなった (Table 7)。特に PUFA および oxFA のレベルの低下が顕著であった。そのため、脂質バイオマーカー探索を行う際には、試料の保管には予め分注を行うなど、一層の注意を要することが示された。一方、ChE のレベルは凍結融解を繰り返すことにより増加することも明らかとなった。このことより、凍結融解の過程で、自然分解のみならず、Lecitin-cholesterol acyl transferase などの種々の酵素反応が進行していることが示唆された (55)。今後、試料保管要件の更なる検討として、試料の長期保存における脂質代謝物の安定性を評価する必要があると考えられる。

小括

本章 第一節および第二節において脂質バイオマーカー探索における留意点およびバイオマーカー候補選択に関する知見を得た。

1. 脂質バイオマーカー探索には絶食検体の血漿が望ましいことを明らかにした。
2. スフィンゴミエリン等のバイオマーカー探索の交絡因子となり得る、複数の代謝物を明らかにした。
3. 反復凍結融解により大半の脂質レベルが減少することを明らかにし、予め試料の分注を行うなど、試料の凍結融解を避ける必要性を示した。

第三節 健常ヒト血液中親水性代謝物レベルの血漿・血清差、男女差、年齢差に関する網羅的検討

第一項 序文

第二章 第一項 第一節と同様に、親水性代謝物バイオマーカー探索における留意点を明らかにするため、血中親水性代謝物に関してメタボローム解析を行った。

略称

GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; UPLC, Ultra Performance Liquid chromatograph; IT, ion trap; OPLS-DA, Orthogonal Partial least squares Discriminant Analysis

第二項 検体および実験方法.

(1) 検体

第二章 第二項 (1) と同様の検体を用いた。PromedDX から送付された試料は、氷上で融解した後に分注し、脂質抽出を行うまでの間 -80°C にて凍結保存した (計 2 回の凍結融解)。各血液試料は、抽出・測定の実験先である Metabolon に送付した。

(2) 代謝物抽出および GC-MS および LC-MS(/MS)

各血液試料中の代謝物は、Metabolon 社における標準法 (56) により抽出した。各血漿・血清試料からの徐タンパクを、抽出効率を補正するための内部標準物質を添加したメタノールに希釈して遠心することで行った。その後、上清を分取し、UPLC-IT MS (LTQ, Thermo Fisher Scientific, MA)、GC-MS 測定 (57, 58) にそれぞれ供した。UPLC-IT MS の測定は、酸性代謝物、塩基性代謝物、それぞれに最適化された二つの系によって行われているため、上清は三本に分注されている。UPLC-IT MS 用の各測定試料は、 $50\ \mu\text{L}$ の上清を窒素ガスで乾固した後、それぞれ、 0.1% ギ酸 $50\ \mu\text{L}$ (UPLC-IT MS 酸性条件)、 $6.5\ \text{mM}$ 炭酸水素アンモニウム $50\ \mu\text{L}$ (UPLC-IT MS 塩基性条件) に再溶解させることで調製した。GC-MS 用の測定試料は、 $50\ \mu\text{L}$ の上清を窒素ガスで乾固した後、 $25\ \mu\text{L}$ トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドおよびアセトニトリル：ジクロロメタン：シクロヘキサン (5:4:1, 5% トリエチルアミン) $25\ \mu\text{L}$ で再溶解した後、 60°C で 1 h 処理することで誘導体化した。

(3) 凍結融解

第二章 第二項 (5) に準じた。

(4) データ解析

血漿・血清差、性差、年齢差の比較は、Welch's t-test を用いて有意差検定を行った。Orthogonal Partial least squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) は、SIMCA-P+12 (Umetrics) を用いて行った。

(5) 変化が認められた代謝物のパスウェイ占有率解析

代謝物を、アミノ酸代謝 (AA)、ペプチド代謝 (P)、炭水化物代謝 (CH) エネルギー代謝 (E)、小分子脂質代謝 (Lip)、核酸代謝 (N)、コファクターおよびビタミン代謝 (CoFV) に分類し、各代謝パスウェイにおいて有意 ($p < 0.05$) な変動を示した代謝物を 1 としてスコア化し、集計した。次いで、得られたスコアを各パスウェイにおける代謝物の総数で除し、その比を各パスウェイにおける占有率とした。

第三項 結果

(1) 全検体間の親水性代謝物レベルの包括的比較

OPLS-DA によって、全検体の代謝物レベルの包括的解析を行った (Fig. 17)。その結果、血漿・血清差が最も群の分離に寄与しており、次いで性差・年齢差であった。同定された 297 代謝物の分類と分子数を Table 10 に示した。

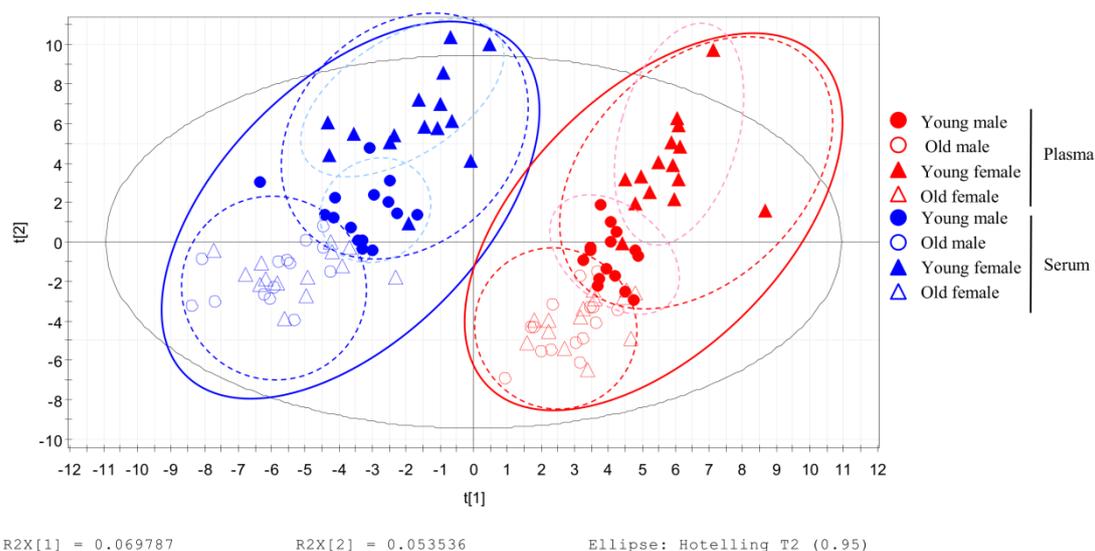


Fig. 17. OPLS-DA model of overall metabolic profiles. Data obtained from human plasma (red) and serum (blue) samples of young males (closed circle), old males (open circle), young females (close triangle), and old females (open triangle) were analyzed. The goodness-of-fit parameter R2 and the predictive ability parameter Q2 were 0.448 and 0.297, respectively.

Table 10. Classification of identified metabolites

class	number of metabolite	respctive metabolites
amino acids	73	glycine, serine, threonine
peptides	29	bradykinin, glycylvaline
carbohydrates	21	fructose, galactose, glucose
energy metabolite	5	citric acid, lactic acid
small lipids	144	palmitic acid, 2-arachidonylglycerol
nuclotides	11	inosine, uracil, xanthine
cofactors and vitamins	14	bilirubin, heme
total	297	

(2) 親水性代謝物レベルの血漿・血清差

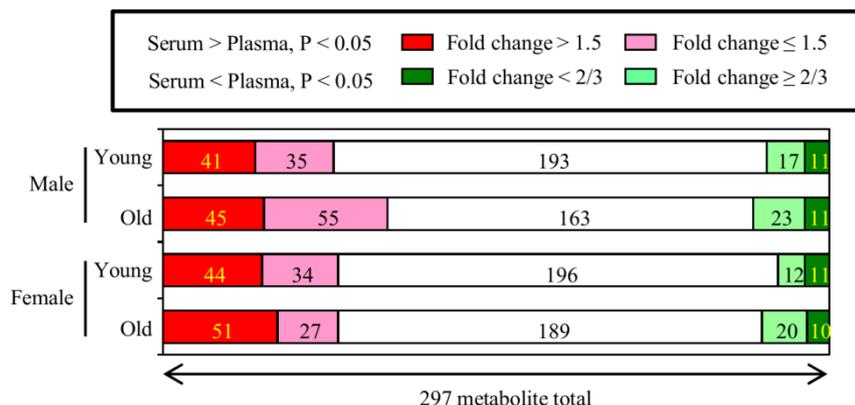
血漿・血清間の親水性代謝物レベルの変動は、男女および年齢間においてほぼ同様の結果を示した (Fig. 18A)。血液凝固に伴うタンパク質の分解産物であるペプチド類は (glycylphenylalanine、glycylvaline など) および血液凝固反応産物である 2-arachidonylglycerol などの小分子脂質は血漿よりも血清において有意に高いレベルを示した (Fig. 18B)。一方、血液凝固により分解されるポリペプチドである bradykinin は、血清よりも血漿において有意に高いレベルを示した (Fig. 18B)。同定された 297 分子の内、2 倍以上の血漿・血清差を示した代謝物は、若齢男性において 24 分子、老齢男性において 28 分子、若齢女性において 31 分子、老齢女性において 21 分子であった。

(3) 親水性代謝物レベルの年齢差および性差

バイオマーカー探索において交絡因子となり得る代謝物を明らかにするため、年齢間の親水性代謝物レベルの差を検討したところ、血漿および血清においてほぼ同様であった (Fig. 19A)。有意な年齢差を示した代謝物は、男性よりも女性において多く認められた。男性では、TCA cycle に関与する代謝物のレベルが若齢よりも老齢において有意に高いレベルを示した (Fig. 19B)。一方、女性においては、長鎖脂肪酸および 5 α -pregnane-3 β , 20 α -diol disulfate、pregnenolone sulfate などの黄体ホルモン類 (progesteron 代謝物) を含めたステロール・ステロイド代謝物の年齢差が顕著であり、老齢よりも若齢において有意に高いレベルを示した (Fig. 19B)。一方、アミノ酸代謝物は若齢よりも老齢において有意に高いレベルを示した。2 倍以上の年齢差を示した代謝物は、男性血漿において 4 分子、男性血清において 4 分子、女性血漿において 23 分子、女性血清において 19 分子であった (Table 11)。

男女間の親水性代謝物レベルの差も、血漿および血清においてほぼ同様であった (Fig. 19C)。有意な性差を示した代謝物は老齢よりも若齢において多く認められた。若年では、主にアミノ酸代謝物が男性において、脂肪酸代謝物および黄体ホルモン類が女性において有意に高いレベルを示した (Fig. 19D)。老齢では、有意な性差を示した代謝物は認められたが、各代謝経路に特異的な変動は観察されなかった。Table 12 に 2 倍以上の性差が認められた代謝物を示した。若齢血漿において 4 分子、若齢血清において 3 分子、老齢血漿において 7 分子、老齢血清において 8 分子であった。

A



B

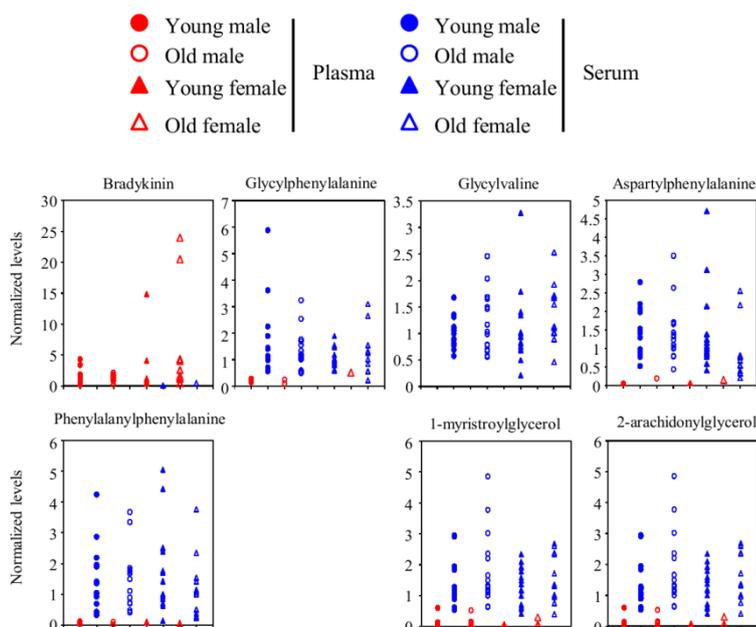
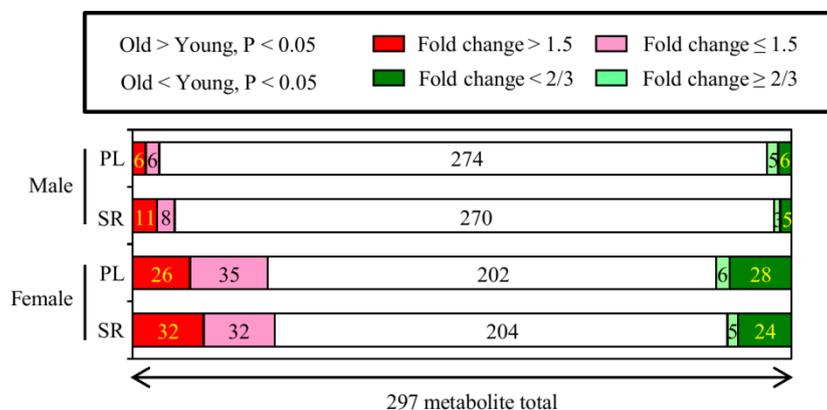


Fig. 18. Differences in the metabolite levels between plasma and serum. A. The number of metabolites with statistically significant differences and with at least 50% changes in their levels between plasma and serum. Values within boxes indicate the number of metabolites. B. Example of metabolites showing significantly different levels between plasma and serum. Each dot represents the data of an individual subject. Data shown are human plasma (red) and serum (blue) samples from young males (closed circle), old males (open circle), young females (close triangle), and old females (open triangle).

A



B

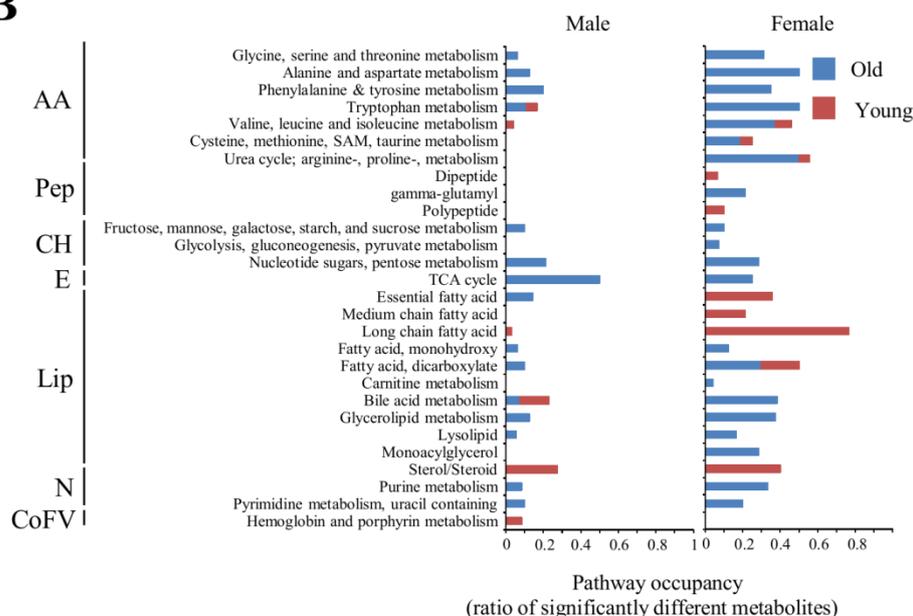
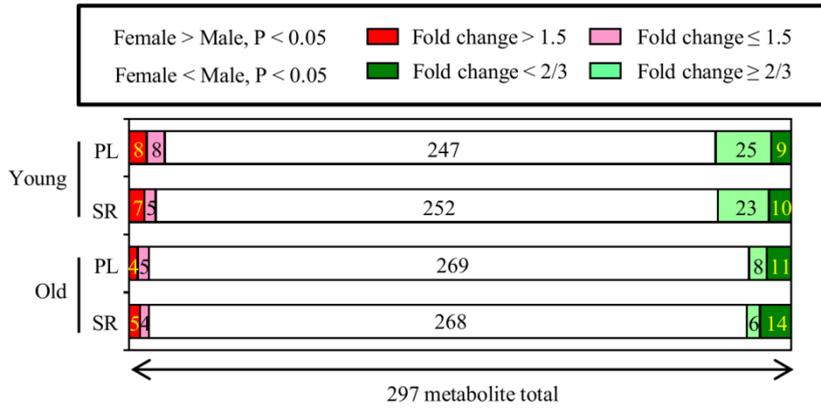


Fig. 19. Differences in the metabolite levels between ages and sexes. A, C. The number of metabolites with statistically significant differences and with at least 50% changes of the levels between young and old (A) or male and female (C) subjects. Values within boxes indicate the number of metabolites. PL, plasma; SR, serum. B, D. Pathway occupancy rates of statistically different metabolites between young and old populations (B) or males and females (D). AA, amino acids; P, peptides; CH, carbohydrates; E, energy metabolites; Lip, lipids; N, nucleotides; CoFV, cofactors and vitamins. Blue, the ratio of metabolites higher in old subjects (B) or females (D) than young subjects (B) or males (D), respectively; red, vice versa.

C



D

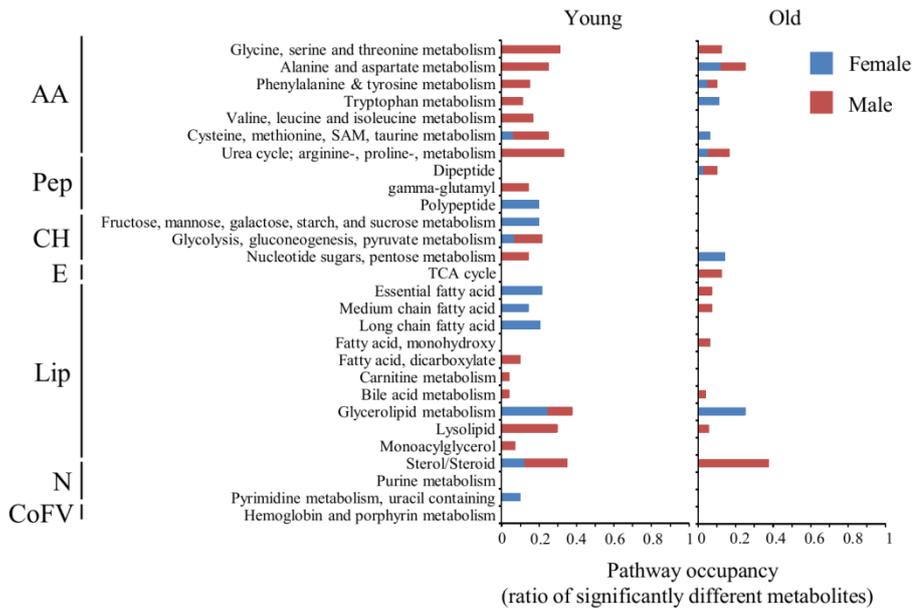


Fig. 19 (continued).

Table 11. Marked age-associated differences in the metabolite levels of human blood samples. Each fold change of age-associated differences indicate old/young metabolite level ratio in both matrices. *1: CMPF, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoate, *2: BHBA, 3-hydroxybutyrate.

metabolite	age-associated difference	maximum value of fold change
phenylacetylglutamine	elderly > young (male serum)	2.02-fold
mannitol	elderly > young (male and female serum)	2.74-fold
tauroolithocholate 3-sulfate	elderly > young (both plasma and serum)	2.25-fold
hyocholate	young > elderly (both male plasma and serum)	0.39-fold
pregnenolone sulfate	young > elderly (both plasma and serum in both sexes)	0.42-fold
urobilinogen	young > elderly (male plasma)	0.44-fold
3-methylhistidine	elderly > young (both female plasma and serum)	2.22-fold
p-cresol sulfate	elderly > young (both female plasma and serum)	2.34-fold
cystine	elderly > young (female serum)	3.86-fold
leucylphenylalanine	young > elderly (female plasma)	0.43-fold
xylonate	elderly > young (female serum)	2.07-fold
5-dodecenoate (12:1n7)	young > elderly (both female plasma and serum)	0.38-fold
myristate (14:0)	young > elderly (female plasma)	0.34-fold
palmitoleate (16:1n7)	young > elderly (female plasma)	0.43-fold
10-heptadecenoate (17:1n7)	young > elderly (female plasma)	0.39-fold
10-nonadecenoate (19:1n9)	young > elderly (both female plasma and serum)	0.37-fold
dihomo-linoleate (20:2n6)	young > elderly (female plasma)	0.48-fold
CMPF ^{*1}	elderly > young (both female plasma and serum)	4.52-fold
15-methylpalmitate	young > elderly (female plasma)	0.41-fold
taurocholate	elderly > young (both female plasma and serum)	2.89-fold
taurodeoxycholate	elderly > young (both female plasma and serum)	2.83-fold
glycolithocholate sulfate	elderly > young (both female plasma and serum)	2.18-fold
tauroolithocholate 3-sulfate	elderly > young (both female plasma and serum)	2.24-fold
scyllo-inositol	elderly > young (female plasma)	2.49-fold
BHBA ^{*2}	young > elderly (both female plasma and serum)	0.27-fold
dehydroisoandrosterone sulfate	young > elderly (both female plasma and serum)	0.46-fold
5alpha-pregnan-3beta,20alpha-diol disulfate	young > elderly (both female plasma and serum)	0.12-fold
pregn steroid monosulfate	young > elderly (both female plasma and serum)	0.39-fold
pregnanediol-3-glucuronide	young > elderly (female plasma)	0.22-fold
arabonate	elderly > young (female serum)	2.01-fold

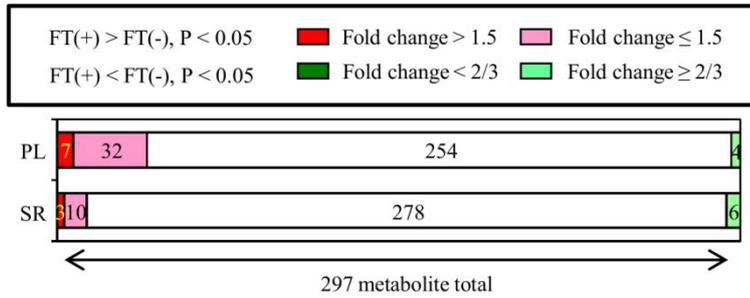
Table 12. Marked sex-associated differences in the metabolite levels of human blood samples. Each fold change of sex-associated differences indicate female/male metabolite level ratio in both matrices.

metabolite	gender-associated difference	maximum value of fold change
pyroglutamine	male > female (both plasma and serum in both aging)	0.28-fold
cystine	female > male (old serum)	3.0-fold
alpha-ketobutyrate	female > male (young serum)	2.07-fold
N-methyl proline	male > female (both old plasma and serum)	0.17-fold
methionylalanine	female > male (old plasma)	2.55-fold
HWESASXX*	female > male (young plasma)	3.35-fold
2-aminooctanoate	male > female (both old plasma and serum)	0.38-fold
glycochenodeoxycholate	male > female (old serum)	0.48-fold
chiro-inositol	male > female (old plasma)	0.23-fold
BHBA	male > female (old serum)	0.41-fold
4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate	male > female (both old plasma and serum)	0.43-fold
5alpha-androstan-3beta,17beta-diol disulfate	male > female (both old plasma and serum)	0.42-fold
5alpha-pregnan-3beta,20alpha-diol disulfate	female > male (both young plasma and serum)	7.58-fold
pregnanediol-3-glucuronide	female > male (young plasma)	3.91-fold

(4) 試料の凍結融解が親水性代謝物の安定に及ぼす影響

血液試料の凍結融解処理を 10 回行い、通常試料（凍結融解 2 回）と親水性代謝物レベルを比較した。その結果、反復凍結融解による代謝物レベルの変動は、血清よりも血漿に多く認められた (Fig. 20A)。ポリペプチドの減少およびプリン代謝物の変動は血漿においてのみ認められた (Fig. 20B)。また、ヘモグロビンおよびポルフィリン代謝物の変動は、血漿・血清のいずれにおいても認められた。反復凍結融解処理により、2 倍以上の差を示した代謝物は、血漿において 4 分子、血清において 2 分子であった。以上の結果より、血清よりも血漿の方が凍結融解の影響を若干受けやすいことが明らかとなった。

A



B

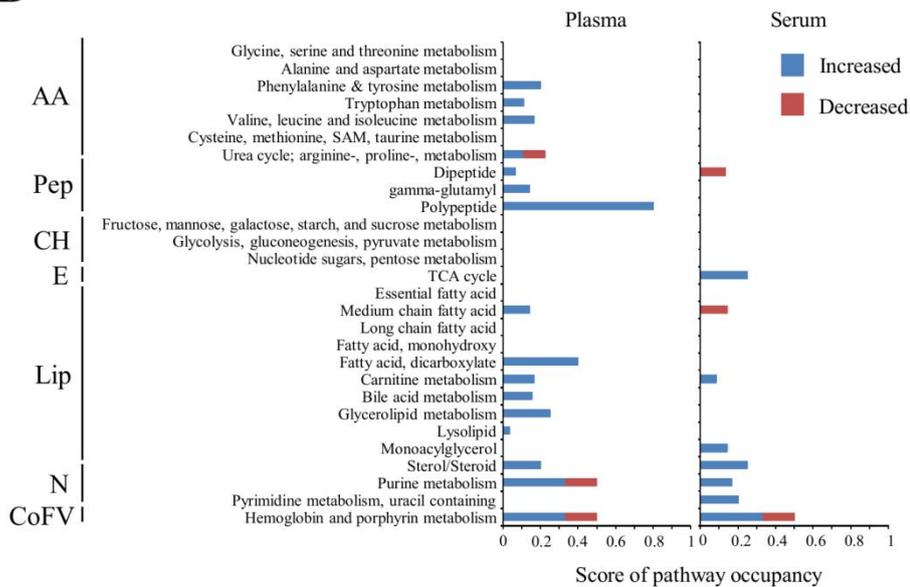


Fig. 20. Effect of freeze-thaw cycles on the metabolite levels. A. The number of metabolites with statistically significant differences and with at least 50% changes of the levels between 2 (FT(-)) and 10 (FT(+)) freeze-thaw cycles. Values within boxes indicate the number of metabolites. PL, plasma; SR, serum. B. Pathway occupancy rates of statistically different metabolites either with or without freeze-thaw cycles. AA, amino acids; P, peptides; CH, carbohydrates; E, energy metabolites; Lip, lipids; N, nucleotides; CoFV, cofactors and vitamins. Blue, the ratio of metabolites higher after 10 freeze-thaw cycles than 2 cycles; red, vice versa..

(5) 同一試料背景内における差異

同一試料背景内における代謝物レベルの個体差を解析した結果、血漿と血清に大きな差異は認められなかった (Fig. 21)。また、Relative Standard Division (RSD) が 0.5 以下の代謝物は、血漿・血清共に 50% 程度存在することが明らかとなった。

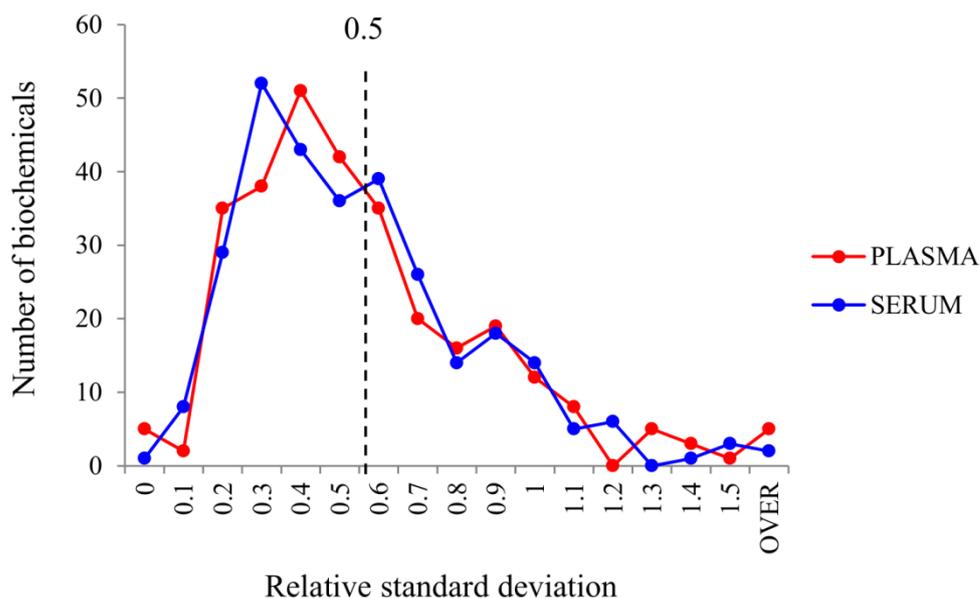


Fig. 21. Inter-individual variations of metabolites in subjects with the same background. Calculated relative standard deviation (RSD) values were rounded to 1 decimal place, and the number of metabolites listed at each RSD value was shown in sum. Dotted lines represent RSD values of 0.5 (arbitrary thresholds).

第四項 考察および小括

親水性代謝物バイオマーカー探索における留意点を明らかにするため、健康ヒト 60 名の血液試料を対象とした、メタボローム解析を行った。

その結果、血漿および共に同等の性差および年齢差を示し (Fig. 19)、同一試料内における個体差 (RSD) は血漿および血清共に同等であった (Fig. 21)。これらの知見は、両マトリクスがバイオマーカー探索可能な試料であることを示している。しかしながら、反復凍結融解による代謝物レベルの変動は、血清よりも血漿に多く認められた (Fig. 20)。それ故、バイオマーカー探索には、血漿・血清のいずれも使用できるが、血清の方が凍結融解による代謝物

レベルの影響が小さいことから、血清の方が望ましいという結論が導かれた。

Table 11 および 12 に、2 倍以上かつ有意な年齢差および性差が認められた代謝物を示した。これらの代謝物は、親水性代謝物バイオマーカー探索において交絡因子となり得る代謝物である。特に顕著な性差・年齢差を共に示した代謝物として、5alpha-pregnan-3beta,20alpha-diol disulfate、pregnenolone sulfate などの黄体ホルモン類が存在し、これらの代謝物は可能な限りバイオマーカー候補として選択するべきではないことが示唆された。これら黄体ホルモン類の性差・年齢差は、女性における脂肪酸の年齢差や若齢におけるアミノ酸の性差に強く関与している可能性がある。

女性における年齢差では、若齢において遊離脂肪酸のレベルが、老齢においてはアミノ酸のレベルが高いことが認められた (Fig. 19B)。過去に、妊娠中のラット肝臓を progesterone 処理することにより、グルコース、ピルビン酸、乳酸などの糖類からの脂質生合成が増大することが報告されている (59)。また、本研究により、progesterone 代謝物が老齢女性よりも若齢女性において顕著に高いレベルを示していることが認められたが (Table 11)、このことは加齢により progesterone レベルが低下することを示唆している。これらの知見より、progesterone レベルが高い若齢において、長鎖脂肪酸が高いレベルを示したものと考えられる。一方、progesterone レベルが低い老齢女性においては、脂肪酸代謝が若年女性よりも低下していることから、結果としてアミノ酸が合成される割合が高まっているものと推察される。また、progesterone 代謝物レベルは若齢において顕著な性差を示すことから (Table 12)、若齢におけるアミノ酸の性差 (Fig. 19D) も progesterone による糖類代謝制御の影響が反映されているものと考えられる。

また、同一試料背景内における代謝物レベルの RSD が 0.5 以下の代謝物は、血漿・血清共に 50 % 程度存在することが明らかとなった (Fig. 21)。バイオマーカー候補を選択する際には、代謝物レベルの検体背景による差異のみならず、個体差が小さいことも考慮すべきであることが示された。

以上の知見より、親水性代謝物におけるバイオマーカー探索には血清試料が推奨され、可能な限り性差・年齢差および個体差が小さい代謝物をバイオマーカー候補として選択することが望ましいことが示唆された。

小括

本章 第三節において親水性代謝物バイオマーカー探索における留意点およびバイオマーカー候補選択に関する知見を得た。

1. 親水性代謝物バイオマーカー探索においては、血清・血漿試料の何れも用いることは可能であるが、反復凍結融解の影響を考慮すると血清の方が望ましいことを示した。
2. 2 倍以上の性差・年齢差を示した代謝物として黄体ホルモン類等が存在し、これらの代謝物がバイオマーカー探索における交絡因子となり得ることを明らかにした。
3. 同一試料背景内の **RSD** が **0.5** 以下の代謝物が **50 %** 程度存在し、これら個体間変動小さい代謝物は、バイオマーカー候補として選択されることが望ましいと示唆された。

総括

バイオマーカー（客観的生物指標）は、臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑強に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。バイオマーカー測定用試料には、比較的low侵襲的に採取でき、情報量の多い血液試料が多用されている。しかし、バイオマーカーの利用はまだ緒についたばかりであり、その探索・検証・利用は各者が試行錯誤をしている状況である。血漿・血清差、性差、年齢差、保管条件など基盤的な情報も乏しく、実データを反映した明確な評価要件を確立できていない。上記の要因により、最終評価指標を適切に反映できないバイオマーカーの利用は、医薬品開発の遅延・臨床現場の混乱を招く恐れがあることから、早期に血中代謝物の基盤的情報を明らかにし、バイオマーカー評価要件の指針を提示する必要がある。近年、血中代謝物バイオマーカーを探索する上で、メタボローム解析が注目されている。メタボローム解析とは、代謝物を包括的に測定し得る解析手法で、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスに続くオミクス解析の一つである。しかしながら、代謝物は膨大な種類が存在し、それらの極性が大きく異なるため、単一の測定手法で全ての代謝物を網羅的に測定することは極めて困難である。中でも脂質代謝物は、構造異性体を含めて分子種の多様性が非常に富んでいることから、網羅的測定手法（脂質メタボローム解析手法）が十分に確立されていない状況にあった。

第一章において、LTQ Orbitrap および C30 RPLC を用いたリン脂質網羅的測定系を構築した。LTQ Orbitrap による精密質量と構造情報の取得によりサブクラスレベルでの正確な分子種同定が可能となり、更には C30 RPLC により構造異性体を明瞭に分離することで各分子種の定量情報を得ることを可能とした。このように、本法はサブクラスレベルでのリン脂質一斉分析が可能であり、生体サンプル中のリン脂質プロファイルの解明に極めて有効な手法と言える。今後、本手法を様々な疾患試料に適用することで、それらの機序の解明やバイオマーカー探索に寄与することが期待される。

第二章においては、上述の脂質メタボローム解析手法を応用して、高網羅的脂質メタボローム解析手法を構築し、健常ヒト血中脂質代謝物に関する基盤的情報を得ると共にその機序を考察した。得られた知見より、脂質バイオマーカー探索における留意点、およびバイオマーカー候補選択に関する指針を示した。脂質バイオマーカー探索において、絶食検体の血漿が望ましいことを明らかにし、SMs および TGs などの代謝物が、脂質バイオマーカー探索における検体

背景に基づく交絡因子となり得ることを示した。更に、血液試料の反復凍結融解により、大半の脂質代謝物レベルが減少することを明らかにし、試料の保管の際には予め試料を分注するなど、凍結融解を避ける必要性があることを示した。

また、脂質代謝物のみならず、血中親水性代謝物に関してもメタボローム解析を行った。親水性代謝物バイオマーカー探索には、血清・血漿試料の何れも用いることは可能であるが、反復凍結融解における安定性の影響を考慮すると血清が望ましいことが示唆された。また、 5α -pregnane- 3β , 20α -diol disulfate などの黄体ホルモン類が、バイオマーカー探索時における交絡因子となり得ることを示した。更に、同一試料背景内の代謝物レベルの個体差を明らかにし、性差・年齢差のみならず、個体差も小さい代謝物がバイオマーカー候補として望ましいと考えられた。

本研究において、これまで十分に確立されていなかったリン脂質網羅的解析手法の構築を行い、生体サンプル中のリン脂質プロファイルの解明に有用な手法を確立した。更には、上述の手法を応用し、高網羅的脂質メタボローム解析手法を構築した。本脂質メタボローム解析および親水性代謝物を対象としたメタボローム解析を行うことにより、健常ヒト血中代謝物に関する基盤的情報を解明し、血中代謝物バイオマーカーの臨床適用に関する評価要件の指針を提示した。これらの知見は、バイオマーカーとしての分子選択や試料の取り扱いにおいて有益な知見であり、将来のバイオマーカー探索・検証のガイドライン案の作成に大いに資するものと考えられる。

謝辞

本論文は筆者が、東京大学医学系研究科 メタボローム寄付講座において、リン脂質の網羅的測定に関する研究成果と、国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部において、血中脂質バイオマーカーの臨床適用に関する評価要件の確立研究の成果をまとめたものです。

昭和薬科大学 学長 西島 正弘 先生には、論文作成にあたってご指導を頂くとともに、成果発表の機会を与えて頂きました。ここに謹んで感謝の意を表します。

稿を終えるにあたり、本論文の主査としてご審査賜りました昭和薬科大学 衛生化学研究室 教授 小椋 康光 先生に深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬物動態研究室 山崎 浩史先生および同大学 医薬品分子化学研究室 山本 恵子 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導およびご支援をいただいた、東京大学医学系研究科 メタボローム寄付講座 教授 田口 良 先生（現 中部大学）、並びに国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長 斎藤嘉朗 先生に感謝の意を表します。

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子 氏、齊藤 公亮 氏には、研究遂行にあたって日頃よりご討論およびご助言をいただき、厚くお礼申し上げます。また、実験遂行に際し多くのご協力、ご支援をいただきました国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 疾患メタボロームプロジェクトの諸氏に心よりお礼申し上げます。

最後に、日頃より研究の遂行を支えてくれた家族、友人に心より感謝します。

引用文献

1. Atkinson AJ Jr, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, et al. Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* **69**(3): 89-95.
2. Liu JY, Li N, Yang J, Li N, Qiu H, et al. (2010) Metabolic profiling of murine plasma reveals an unexpected biomarker in rofecoxib-mediated cardiovascular events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17017-17022.
3. Vouk K, Hevir N, Ribić-Pucelj M, Haarpaintner G, Scherb H, et al. (2012) Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod* **27**: 2955-2965.
4. Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, et al. (2012) Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res* **53**: 567-576.
5. Seijo S, Lozano JJ, Alonso C, Reverter E, Miquel R, et al. (2013) Metabolomics discloses potential biomarkers for the noninvasive diagnosis of idiopathic portal hypertension. *Am J Gastroenterol* **108**: 926-932.
6. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, et al (2006). Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* **281**: 16768-16776.
7. Begeer RD, Sun J, Schnackenberg LK (2010) Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **243**: 154-166.
8. Parman T, Bunin DI, Ng HH, McDunn JE, Wulff JE, et al. (2011) Toxicogenomics and metabolomics of pentamethylchromanol (PMCol)-induced hepatotoxicity. *Toxicol Sci* **124**: 487-501.

9. McClay JL, Adkins DE, Vunck SA, Batman AM, Vann RE, et al. (2013) Large-scale neurochemical metabolomics analysis identifies multiple compounds associated with methamphetamine exposure. *Metabolomics* **9**: 392-402.
10. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al (2013) HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acid Res* **41** (Database issue): D801-7.
11. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R et al. (2011) The human serum metabolome. *PLoS One* **6**(2): e16957.
12. Uchikata T, Matsubara A, Fukusaki E, Bamba T (2012) High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis. *J. Chromatogr. A* **10**:1250: 69-75.
13. Lodi A, Tiziani S, Khanim FL, Günther UL, Viant MR, et al. (2013) Proton NMR-based metabolite analyses of archived serial paired serum and urine samples from myeloma patients at different stages of disease activity identifies acetylcarnitine as a novel marker of active disease. *PLoS One* **8**(2): e56422.
14. Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 397-407.
15. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**: 349-361.
16. Shimizu T (2009) Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**:123-150.
17. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, et al. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**(6811): 488-492.

18. Di Paolo G, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, et al. (2004) Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* **431**(7007): 415-422 (2004)
19. Brown DA, London E: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**(23): 17221-17224
20. Mills GB, Moolenaar WH (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev. Cancer* **3**(8):582-591
21. Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**(5548): 1871-1875.
22. Kozak KR, Marnett LJ (2002) Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**(2-3): 211-20.
23. Honda Z, Ishii S, Shimizu T (2002) Platelet-activating factor receptor. *J. Biochem.* **131**(6): 773-779.
24. Taylor CW (2000) Controlling calcium entry. *Cell* **111**(6):767-9.
25. Taguchi R, Nishijima M, Shimizu T (2007) Basic analytical systems for lipidomics by mass spectrometry in Japan. *Methods Enzymol.* **432**: 185-211.
26. Han X, Yang K, Cheng H, Fikes KN, Gross RW (2005) Shotgun lipidomics of phosphoethanolamine-containing lipids in biological samples after one-step in situ derivatization. *J. Lipid Res.* **46**(7): 1548-1560.
27. Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M (2000) Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**(8): 953-66.
28. Ekroos K, Chernushevich IV, Simons K, Shevchenko A (2002) Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **74**(5):941-9.

29. Ejsing CS, Moehring T, Bahr U, Duchoslav E, Karas M, et al (2006) Collision-induced dissociation pathways of yeast sphingolipids and their molecular profiling in total lipid extracts: a study by quadrupole TOF and linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **41**(3): 372-389 (2006)
30. Koulman A, Woffendin G, Narayana VK, Welchman H, Crone C, et al (2009) High-resolution extracted ion chromatography, a new tool for metabolomics and lipidomics using a second-generation ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**(10):1411-1418 (2009)
31. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917
32. Ekroos K, Ejsing CS, Bahr U, Karas M, Simons K, Shevchenko A (2003) Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. *J. Lipid Res.* **44**(11): 2181-92.
33. Houjou T, Yamatani K, Imagawa M, Shimizu T, Taguchi R (2004) A shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**(5): 654-66.
34. Lands WE (1958) Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J. Biol. Chem.* **231**(2): 883-888.
35. Shindou H, Shimizu T (2009) Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **284**(1): 1-5.
36. Cao J, Liu Y, Lockwood J, Burn P, Shi Y (2004) A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J. Biol. Chem.* **279**(30): 31727-31734.
37. Nakanishi H, Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Ogasawara R, et al. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**(29): 20140-20147

38. Chen X, Hyatt BA, Mucenski ML, Mason RJ, Shannon JM (2009) Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(31): 11724-11729.
39. Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, Nakanishi H, Taguchi R, et al. (2008) Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(8): 2830-2835.
40. Sperl W, Murr C, Skladal D, Sass JO, Suormala T, et al. (2000) Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidaemia. *Eur. J. Pediatr*. **159**(1-2): 54-58.
41. Brügger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F. T. Wieland, and W. D. Lehmann (1997.) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 2339–2344.
42. Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, et al. (2011) Metabolomics in Early Alzheimer's Disease: Identification of Altered Plasma Sphingolipidome Using Shotgun Lipidomics. *PLoS One* **6**: e21643.
43. Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, Messias AC, Floegel A, et al. (2012) Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol. Syst. Biol.* **8**: 615.
44. Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, et al. (2006) Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **5**: 1338-1347.
45. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB (2011) Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenet Genomics* **21**: 516-521.
46. Ben-Amor N, Redondo PC, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM, et al. (2005) A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *J. Physiol.* **570**: 309-323.
47. Merrill AH Jr, Wang E, Innis WS, Mullins R (1985) Increases in serum sphingomyelin by 17 beta-estradiol. *Lipids* **20**: 252-254.

48. Bjørnerem A, Straume B, Midtby M, Fønnebø V, Sundsfjord J, et al. (2004) Endogenous sex hormones in relation to age, sex, lifestyle factors, and chronic diseases in a general population: the Tromsø Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**: 6039-6047.
49. Nikkilä J, Sysi-Aho M, Ermolov A, Seppänen-Laakso T, Simell O, et al. (2008) Gender-dependent progression of systemic metabolic states in early childhood. *Mol. Syst. Biol.* **4**: 197.
50. Alessandri JM, Extier A, Al-Gubory KH, Harbeby E, Lallemand MS, et al. (2012) Influence of gender on DHA synthesis: the response of rat liver to low dietary α -linolenic acid evidences higher ω 3 Δ 4-desaturase index in females. *Eur. J. Nutr.* **51**: 199-209.
51. Knopp RH, Zhu X, Bonet B (1994) Effects of estrogens on lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. *Atherosclerosis Suppl*: S83-91.
52. Schuchardt JP, Schmidt S, Kressel G, Dong H, Willenberg I, et al. (2013) Comparison of free serum oxylipin concentration changes in hyper- vs. normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **89**: 19-29.
53. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, et al. (2006) Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**: 331-342.
54. Walker CG, Browning LM, Mander AP, Madden J, West AL, et al. (2013) Age and sex differences in the incorporation of EPA and DHA into plasma fractions, cells and adipose tissue in humans. *Br. J. Nutr.* **111**(4): 679-689.
55. Subbaiah PV, Jiang XC, Belikova NA, Aizezi B, Huang ZH, et al. (2012) Regulation of plasma cholesterol esterification by sphingomyelin: effect of physiological variations of plasma sphingomyelin on lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**: 908-913.

56. Lawton KA, Berger A, Mitchell M, Milgram KE, Evans AM, et al. (2008) Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics* **9**(4): 383-97.
57. Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E (2009) Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal. Chem.* **81**(16): 6656-67.
58. Boudonck KJ, Mitchell MW, Német L, Keresztes L, Nyska A, et al. (2009) Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity. *Toxicol. Pathol.* **37**(3): 280-92.
59. Lorenzo M, Roncero C, Benito M (1986) The role of prolactin and progesterone in the regulation of lipogenesis in maternal and foetal rat liver in vivo and in isolated hepatocytes during the last day of gestation. *Biochem. J.* **239**(1): 135-139.