

## メタボローム測定技術の開発とその臨床・行政施策への応用 - 血液バイオマーカーの臨床適用に関する評価要件に関して -

国立医薬品食品衛生研究所 疾患メタボロームプロジェクト 石川将己

### 【要旨】

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。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）が十分に確立されていない状況にある。

本研究では最初に、主要なリン脂質について、液体クロマトグラフィー-質量分析計（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）。

第一章においては、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で、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な手法を確立することができた。第二章においては、脂質バイオマーカー探索には血液凝固に伴うエイコサノイド類等の濃度の変化を避けるため血漿が有用なこと、血中のスフィンゴミエリンやトリアシルグリセロールなどの性差・年齢差がバイオマーカー探索において交絡因子となりうること、多くの脂質分子種が複数回の凍結融解により分解されることが示唆され、特に分注後の凍結が必要であることが明らかとなった。これらの結果は、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のガイドライン作成に大きく貢献するものである。

## 【研究概要】

### 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

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。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 MS<sub>n</sub> 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。

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

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)

## 【参考論文】

### 第一章

- (1) Ryo Taguchi and Masaki Ishikawa: *J. Chromatogr. A.* **1217**: 4229-4239. (2010)

### 第二章

- (2) Masaki Ishikawa, *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.* **36**(4): 682-685. (2014)
- (3) Masaki Ishikawa, *et al.*: *Plos One* **9**(3): e91806. (2014)