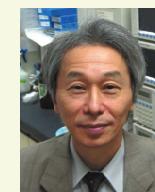




生活習慣病関連バイオマーカー探索研究 Studies on biomarker discovery of lifestyle-related disorders

豊岡 利正 Toshimasa TOYO'OKA 薬学研究科薬学専攻生体機能分子分析学教室 教授
Professor, Laboratory of Analytical and Bio-analytical Chemistry, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka



Profile

2011- 静岡県立大学大学院薬学研究科長
1994年 静岡県立大学薬学部教授
1990- カンザス大学CBAR博士研究員
1991年 Post-doctoral Fellow, Center for Bio-analytical Research, University of Kansas, U.S.A.
1986- 厚生省国立衛生研究所室長
1994年 Research Associate, National Institute of Health Sciences
1986-1990年 Research Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo
1985年 Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo
1985年 東京大学薬学部助手
1985年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了

2011- Deen, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
1994 Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
1990-1994 Post-doctoral Fellow, Center for Bio-analytical Research, University of Kansas, U.S.A.
1985-1994 Research Associate, National Institute of Health Sciences
1985 Research Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo
1985 Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Contact

T E L 054-264-5656
+81-54-264-5656
e-mail toyooka@u-shizuoka-ken.ac.jp
U R L <http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analchem/>

序論

生活習慣の変化や食生活の欧米化に伴い、糖尿病、高血圧症、心疾患等の成人病患者が年々増加している。中でも、II型糖尿病は初期症状がほとんどなく、時間をかけて徐々に形成されてくる疾患である。そのため、早期に兆候を把握し食生活を中心とする生活習慣を改善することで発症を予防し健康状態を維持することが可能となる疾患である。しかし現在、II型糖尿病の診断に利用されている血糖値やヘモグロビンA1c値などは食事や運動、ヘモグロビン異常などの影響を受けやすく数値が変動するためバイオマーカーとして必ずしも十分な役割を果たせていない。また、これらの数値の異常は糖尿病がある程度進行してから顕在化することが多い、疾患予防への応用は困難であると考えられる。それ故に、II型糖尿病は新規バイオマーカーの発見が期待されている疾患の一つである。このような背景から、本研究では、近年バイオマーカー探索法として注目されているメタボローム解析技術を用い、早期発見・予防に直接つながるような未病状態で変化が起きる糖尿病新規バイオマーカーの探索研究を進めている。

成果

糖尿病予備群のバイオマーカー探索を最終目的としているが、ヒトでは生活習慣等の個人差が大きく、条件を揃えることが困難であったため、研究の前段階として疾患モデルマウスを用いたバイオマーカー候補化合物のスクリーニングを実施した。20週齢以降に糖尿病を自然発症するマウス(ddY-H)と健常マウス(ddY-L)10検体ずつ用い、5, 9, 13, 20週齢における血漿、体毛、肝臓、腎臓を採取し、それぞれ除タンパク等の前処理を行ったものをサンプルとした。サンプルをUPLC-ESI-TOF-MSにより質量分析し、解析ソフトを用いてPCA(主成分分析)(Fig.1)やOPLS-DA(判別分析)などの多変量解析を行った。なお、Fig.2に示すS-plotでは各プロットがそれぞれ1化合物を示し、総軸が信頼性(検体毎のバラツキの無さ)、横軸がマーカー候補性(糖尿病群と健常群のピーク強度の差)を示している。従ってグラフの右上、左下に位置する化合物が糖尿病により増加あるいは減少傾向を表すマーカー候補化合物となる。この結果よりバイオマーカー候補リストを作成し、ChemSpider、KEGGなどのデータベースと照合することでさらに候補化合物を絞り込んだ。

糖尿病群バイオマーカー候補化合物として、増加傾向を示す化合物16種、減少傾向を示す化合物35種が抽出された。それらの中でも特に有力な候補化合物については、標準品を用いて同定を行った結果、*m/z*174.11の化合物が*N*-Acetyl-leucine(NAL)の溶出時間と一致し、さらにLC-MS/MS分析により構造確認を行った結果、MS/MSスペクトルも一致し*m/z*174.11の化合物はNALであると同定できた(Fig.3)。他の候補化合物の構造については、現在検討中である。

展望

現在メタボラームプロファイリング法を用いた疾患バイオマーカー探索研究の多くは疾患を発症後生体変化を解析したものであり、本研究のように疾患による代謝物変化を経時に解析し、発症前つまり未病状態におけるバイオマーカーを標的とした研究は極めて少ない。特に今回の対象疾患であるII型糖尿病には予備群といわれる早期治療により発症が抑えられる患者が数多く存在する。そのため、糖尿病発症前に変動する糖尿病予備群バイオマーカーが発見され、臨床に応用された場合には、未病状態を明確に把握することができ、早期に治療を施すことが可能となる。これにより、予備群患者の発症が予防され、糖尿病患者の大幅な減少につながるものと期待される。また、本法は、他の疾病における未病状態のバイオマーカー探索にも応用できるため、様々な成人病疾患の早期診断が期待できる。

Introduction

Because of changes in lifestyle, the number of patients with geriatric disorders has recently been increasing in Japan. The causes of diabetes are multifactorial and include environmental factors and genetic background. In many cases, because diabetes is asymptomatic for a long time, the patient is not aware of the disease. Therefore, biomarkers that would lead to early detection and/or prevention of diabetes mellitus are very much required. However, the diagnosis of the pre-diabetic state in humans is very difficult, because lifestyles vary from person to person. Although the development of a diagnostic method in humans is the eventual goal of our research, we performed a metabolite profiling study that involved extraction and structural identification of biomarker candidates from several biological specimens (i.e., plasma, hair, liver and kidney) from ddY strain mice, in which diabetes naturally develops with aging.

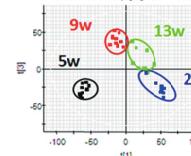
Results

We globally separated low-molecular-mass compounds, including metabolites, from biological specimens of diabetic (ddY-H) and normal mice (ddY-L) by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) using different reversed-phase columns and detected by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS). We extracted candidates for biomarkers for diabetes mellitus by multivariate statistical analysis (orthogonal partial least-squares-discriminant analysis) (Figs. 1 and 2), followed by database searches using ChemSpider, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and the Human Metabolome Database. We detected many metabolites and unknown compounds in each biological specimen as candidates for biomarkers for diabetic mellitus. Among them, we elucidated the chemical structures of several possible metabolites, including more than two biological specimens, along with comparison by tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses using authentic compounds. We clearly identified one metabolite as *N*-acetyl-L-leucine based upon the MS/MS spectra and retention time on chromatograms (Fig. 3).

Perspectives

N-acetyl-L-leucine is an endogenous compound that is present in all biological specimens (plasma, hair, liver and kidney). Therefore, this metabolite appears to be a potential biomarker candidate for diabetes. Although the structures of other biomarker candidates are yet to be determined, the present approach based upon a metabolite profiling study using UPLC-ESI-TOF-MS could be helpful for understanding abnormal metabolism in various diseases.

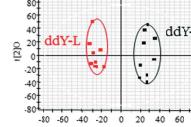
Scores Comp[1] vs. Comp[3]



[Fig.1]
糖尿病群(ddY-H)および非糖尿病群(ddY-L)の5-20週齢マウス群におけるPCAスコアープロット
(左図) ddY-L 体毛、(右図) ddY-H 体毛、週齢、5 (■), 9 (■), 13 (■), and 20 (■)。

[Figure 1]
Principal component analysis score plots of ddY-H and ddY-L groups at 5-20 weeks.
(Left) ddY-L hair; (Right) ddY-H hair. Weeks, 5 (■), 9 (■), 13 (■), and 20 (■).

Scores Comp[1] vs. Comp[2] 13w L vs H (hair T3)

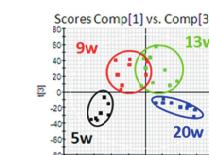
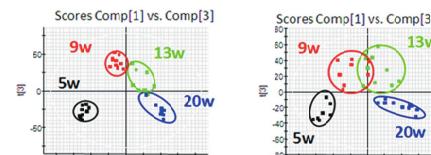
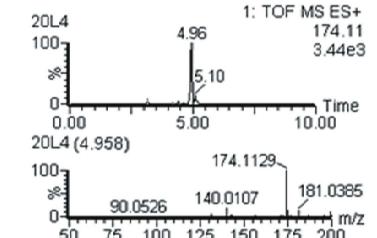
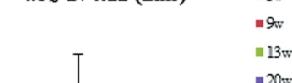


[Fig.2]
糖尿病群(ddY-H) (■)および非糖尿病群(ddY-L) (■)の13週齢体毛のOPLS-DA スコアープロットおよび S-プロット。
(左図) S-プロット。 (右図) S-プロット。 (□) で示す代謝物がバイオマーカー候補化合物として抽出された。

[Figure 2]
Orthogonal projections to latent structures discriminant analysis score plot and S-plot of ddY-H (■) and ddY-L (■) in hair at 13 weeks.
(Left) Score plot; (Right) S-plot. Metabolites in the (□) were selected as biomarker candidates.

代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- I. H. Tsutsui, T. Maeda, J. Z. Min, S. Inagaki, T. Higashi, Y. Kagawa, T. Toyooka: Biomarker discovery in biological specimens (plasma, hair, liver and kidney) of diabetic mice based upon metabolite profiling using ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 412, 861-872 (2011).
2. J. Z. Min, S. Hatanaka, H. Yu, T. Higashi, S. Inagaki, T. Toyooka: Determination of DL-amino acids, derivatized with R(-)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, in nail of diabetic patients by UPLC-ESI-TOF-MS. *J. Chromatogr. B*, 879, 3220-3228 (2011).
3. H. Tsutsui, T. Maeda, T. Toyooka, J. Z. Min, S. Inagaki, T. Higashi, Y. Kagawa. Practical analytical approach for the identification of biomarker candidates in prediabetic state based upon metabolomic study by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 9, 3912-3922 (2010).
4. M. Kato, Y. Onda, M. Sekimoto, M. Degawa, T. Toyooka, A capillary chromatography-electron spray ionization-mass spectrometry method for simultaneous analysis of charged and neutral constituents of a hepatocarcinoma cell metabolome. *J. Chromatogr. A*, 1216, 8277-8282 (2009).
5. S. Inagaki, T. Noda, J. Z. Min, T. Toyooka, Metabolic profiling of rat hair and screening biomarkers using ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1176, 94-99 (2007).

*m/z* 174.11 (hair)

[Fig.3]
糖尿病における一つのバイオマーカー候補化合物
m/z 174.11 (*N*-アセチルロイシン)。

[Figure 3]
A biomarker candidate for diabetes mellitus,
m/z 174.11 (*N*-acetyl-leucine).