

200500229A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 奥田 晴宏

平成18年(2006)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

- 非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発 1
奥田晴宏

II. 分担研究報告書

1. NMR を用いたメタボミクス解析, 高感度化技術の開発 9
奥田晴宏
2. メタボミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした
毒性マーカーの3次元解析手法の確立
- 2-1 ー トキシコゲノミクスとメタボミクスの融合を指向した肝障害の機序解明ー 20
- 2-2 ー ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明ー 32
宮田昌明
3. LC/MS/MS を用いた低分子内因性物質のメタボミクス技術の開発
4. メタボミクスと病理の関連性についての解析
ー 質量分析計を用いたメタボミクス手法による毒性マーカー検索法の開発ー 44
堀 弥、矢本 敬、宮田昌明
5. メタボミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発ならびに毒性軽減
構造修飾法の開発 88
宮田直樹
6. LC/MS/MS を用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに
解析 102
鈴木孝昌
7. 細胞レベルでのメタボミクス技術の開発 124
小原有弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 129

IV. 研究成果の刊行物・別刷 131

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発

主任研究者：奥田 晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし実際には種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することは難しく、その予測にはトキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系が関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が必須である。そこで本研究事業では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とする。

本目的を達成するため以下の観点から本年度は研究を遂行した。1) NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発、2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立、3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発、4) メタボロミクスと病理の関連性についての解析、5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発、6) LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析、7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発。なお、研究3)および4)は一連の実験プロトコールのもとで共同研究として実施されたことから、一括として報告する。

これらの研究を通じて、毒性予測に有用な動物実験モデルの作成と毒性発現機序の解明、メタボロミクス・プロテオミクス研究を遂行するための解析手法に関する基盤的技術、プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発に成功した。

分担研究者

奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・部長）
宮田 昌明（東北大学大学院・薬学研究科・助手）
堀 弥（杏林製薬株式会社・創薬研究所薬理研究部動態安全性研究室・研究員）
矢本 敬（三共株式会社・安全性研究所研究第六グループ・主席研究員）
宮田 直樹（名古屋市立大学・薬学研究科・教授）
鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長）
小原 有弘（独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部細胞バンク・研究員）

A. 研究目的

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし、一方、未解決の課題が複数存在する。一つは、トキシコゲノム情報と病理学的情報との連関に伴う問題である。即ち、トキシコゲノミクス研究においては機能タンパクmRNAレベルの変動を網羅的に測定し、毒性予測を試みているが、細胞内機能の変化は、必ずしもmRNAレベルに反映されない。しかも機能タンパクレベルが変化しなくても、GSHや補酵素のような機能維持やβ酸化系等のエネルギー産出に関わる分子の変動によって、細胞内オルガネラの障害

が起り、毒性を現すことがある。従って機能タンパクの変動と共に機能小分子の変化を経時的に捉えることが出来る手法が毒性発現の機序を知るには必要である。もう一つは実験動物で得られたトキシコゲノム情報をヒトの毒性予測に用いる際に、ヒトでは有効に利用できるサンプルが血液、尿等に限定されることから、その予測には限界が存在することである。これらのことから、トキシコゲノム情報のみから種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することには大きな困難が存在する。

この困難を克服するためには、トキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が、必須である。加えて、ヒト毒性予測を目的とするためには、非侵襲的試料からそれら情報を得る必要がある。

そこで本研究事業では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現することを目的とした。

本目的を達成するため以下の観点から本年度は研究を遂行した。なお、研究3)および4)は一連の実験プロトコールのもとで共同研究として実施されたことから、一括として報告する

- 1) NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発
- 2) メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立
- 3) LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発
- 4) メタボロミクスと病理の関連性についての解析
- 5) メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発
- 6) LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析
- 7) 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

B 研究方法

B-I NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発

尿試料は研究課題3),4)の研究で調製されたラット尿サンプルを用いた。¹H-NMRの測定はラットに蒸留水を投与後、8-24時間にドライアイス冷却下で採取した尿について行い、¹H-NMR専用コールドプローブを装着した500 MHz NMR装置を用いて実施した。本スペクトルデータについてNMR SUITEで主要成分の定性を行い、本スペクトルデータがメタボロミクス解析に利用可能であるか検討した。測定データはNMR SUITEにエクスポートし、付属の尿中代謝物のデータベースを利用してフィッティングによって解析を試みた。

B-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

B-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序説明：

動物と薬物処理： 10週齢のC57BL/6雌性マウスに、0.6% lithocholic acid (LCA)を含有させた粉末飼料 (CE-2) を3日 (LCA3群) , 5日 (LCA5群) , 9日 (LCA9群) 間自由に摂取させた。また併用群として投与開始5日目から2日 (LCA7/ pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN)2群)あるいは4日間 (LCA9/PCN4群) 、100mg/kg のPCNをcorn oilに懸濁させたものを腹腔内に投与した。コントロール群、LCA9群には、同量のcorn oilを腹腔内に投与した。

網羅的遺伝子発現解析： 20-30mg肝ホモジネートよりし、標識cRNAを調製した。ピオチン標識 cRNA は Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリし、データを取得した。スキャナーはGeneChipR Scanner 3000 (Affymetrix) を用いた。遺伝子発現データの取得はAffymetrix社のマニュアルに基づいて行った。データ解析には統計解析ソフト avadis(Strand Genomics社)を用いた。

B-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序説明：

動物と薬物処置： 9-10週齢のC57BL/6雄性マウスに、 carboxymethylcellulose sodium(CMC-Na)に懸濁させたflutamideあるいは 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1)を200 mg/kg、5日間強制経口投与した。対照群にはCMC-Naを5日間強制経口投与した。1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP)はcorn oilに懸濁させ、3 mg/kgを前半3日間腹腔内投与した。対照群にはcorn

oilを3日間腹腔内投与した。また、前半3日間は固形試料(CE-2)を摂取させ後半2日間は肝内グルタチオン濃度を減少させる目的で固形試料を取り除き絶食を行った。

Flutamide esterase 活性: 1 mg/mlに希釈した肝ミクロゾーム100 μ lに基質としてmethanolに溶解した10 mM fluamideを1 μ l、酸化防止剤として精製水に溶解した10 mM ascorbic acidを1 μ lそれぞれ加え、よく攪拌した後37°Cで5分間ブレインキュベーションした。反応開始液としてNADPH generating systemを20 μ l加え、正確に37°Cで30分間インキュベーションした。後処理後HPLCにて生成物を定量した。

FLU-1 N-hydroxylase 活性: 1 mg/mlに希釈した肝ミクロゾーム100 μ lに基質としてmethanolに溶解した10 mM FLU-1を2 μ l、酸化防止剤として精製水に溶解した10 mM ascorbic acidを1 μ lそれぞれ加え、よく攪拌した後37°Cで5分間ブレインキュベーションした。反応開始液としてNADPH generating systemを20 μ l加え、正確に37°Cで30分間インキュベーションした。後処理後HPLCにて生成物を定量した。

B-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

B-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発:

フェノバルビタール(PB)・アセトアミノフェン(APAP)併用試験: PBの投与用量は0および100 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり0.5 mLとした。APAPの投与用量は0, 500および800 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質は強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてPBを4日間投与し、PB投与4日目にAPAPを単回投与した。

クロフィブレート(CPIB)・アセトアミノフェン併用試験: CPIBの投与用量は200 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。APAPの投与用量は0, 100, 500および800 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質は強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてCPIBを4日間投与し、CPIB投与4日目にAPAPを単回投与した。

L-ブチオニン-(S, R)-スルホキシイミン・アセトアミノフェン(BSO)併用試験: BSOの投与用量は0および20 mMとし、給水瓶を用いて飲水投与した。APAPの投与用量は0および500 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。各個体へのAPAP投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出し、強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてBSOを4日間投与し、BSO投与4日目にAPAPを単回投与した。

群構成: 投与1~3日前に体重の平均値および分散に大きな差が出ないように群分けを行った。各群は雄5例で構成した。

B-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

C60をペプチドのアミノ基に緩和な条件で効率良く導入することのできる誘導体化試薬のため、アミノ基修飾官能基としてはカルボン酸を、また、カルボン酸の活性化はヒドロキシコハク酸(NHS)エステルおよびペンタフルオロフェニル(PFP)エステル化を選択した。

NHSエステルとして5化合物(1, 2a, 2a-d5, 2b, 2c)を、また、PFPエステルとして3化合物(4a, 4a-d, 4b)を合成した。

合成したフラーレン構造を有する活性カルボン酸を用いて、アミノ酸やペプチドの誘導体化反応を行った。

B-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

サンプル: LC-MSの条件検討のため以下のサンプルを使用した。a. BSA消化ペプチド; b. ヒト肝サイトゾル; c. ラット尿; d. ICAT定量用タンパク混合液。b-dについては、試料を、還元アルキル化後、トリプシンにて消化し、LC-MS分析を行った。ラット尿については、アセトンによる沈殿処理の検討を加えた。Dに関しては既知タンパクを以下の量比で混合した。BSA(1)、LDH(0.66)、SOD(0.5)、RNaseA(1.5)。これをICAT試薬でラベル化後、LC-MS/MS解析によりそれぞれの量比を解析した。

ナノLC: 本研究にはナノLCとしてSplitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を使用しC-18逆相カラム(KYA, W-3)およびトラップカラムを使用した。移動相はA(2%アセトニトリル、0.1%ギ酸)、B(80%アセトニトリル、0.1%ギ酸)の2種類のグラジエントをかけてペプチドを溶出させた。

質量分析装置： 使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF型LC-MS/MS QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) であり、前述のナノLCとオンライン接続し、LC-MSとしての測定を行った。ESI ナノスプレー用チップとして、PicoTip™ (New Objective社) を使用し、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと挿入した。分析パラメーターは、測定を行いながら最適化した。

データ処理： Rawデータの解析のため、Analystにて作成されるWiff形式ファイルの加工のため、mzXMLへの変換ツールのソフトウェアとして、mzStar (Systems Biology Institute) を利用した。さらに、mzXML形式ファイルを、Pep3Dというソフトウェアを利用することで、LC-MSデータとしての3Dグラフによる可視化を行った。

B-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

細胞レベルでのメタボノミクス技術確立の前段階として、てんかん、心筋症、ネフローゼなど以下の病態モデル動物の尿試料を用いて、NMRによる高感度かつ簡便解析技術の検討を行った。

- ① ELマウス
- ② ICGN/Mネフローゼマウス
- ③ GM1ガングリオシドーシスモデルマウス (β -galactosidase knockout mouse, BK0)
- ④ 4C30
- ⑤ C57BL/6J bg

超音波破碎細胞を試料としてNMR解析を行い、細胞からの測定サンプル作製技術開発を行った。

ブルカーバイオスピン社の協力を得て、UltraShield Plus 500MHz NMR により¹H-NMRを測定した。

(倫理面の配慮)

本研究の実施に際しては、動物愛護の問題はもちろんのこと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等に従って行った。その他各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行した。あらかじめ当該研究機関の長等の承認等が必要な研究については研究開始前に所定の手続きを行った。

C. 研究結果及び考察

C-1 NMRを用いたメタボノミクス解析, 高感

度化技術の開発

本研究で利用するラットの尿について¹H-NMR スペクトルを測定した。測定データはNMR SUITE にエクスポートし、付属の尿中代謝物のデータベースを利用してフィッティングによって解析を試みたところ、クレアチニンや馬尿酸、2-オキシグルタル酸、クエン酸、コハク酸などの少なくとも18個ピークの定性・定量が可能であることがわかった。

ラット尿の¹H-NMR スペクトルへの採取温度および採取時間の影響について検討した。ドライアイス冷却下および室温で採取した尿のスペクトルは同様のパターンを示し、採取温度によって尿中成分は変化しないことがわかった。また、蒸留水投与後0~8時間採取尿と8~24時間採取尿でも同様のスペクトルパターンを示したことから、蒸留水投与の場合、尿中の代謝成分は常に同様の代謝パターンを示すことがわかった。

C-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

C-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明:

モデル化合物として遅延性の胆汁鬱滞型肝障害を誘発するlithocholic acid (LCA)を用い、LCA処理の経時的変化や障害を軽減する薬物 (pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN), probucol) の併用の影響から多面的に解析した。C57BL/6雌性マウスにLCA0.6%を混餌で経時的 (3日、5日、9日) に処理し、またPCN (100 mg/kg, 2日、4日) を併用して各群間の毒性パラメーターの変動と網羅的遺伝子発現変動を解析した。

LCA群で3日目から経時的な血清ALT活性の上昇が認められた。ALP活性はLCA5日群では有意に増加せず、LCA9日群ではじめて有意な上昇が認められた。PCN併用によりこれらの活性は有意に減少した。

内在性代謝物の代謝や輸送に関連する遺伝子に注目して遺伝子発現解析を実施するとLCA9日群でトリグリセリド、遊離脂肪酸の肝内利用のシフトやリン脂質の代謝中間体生成酵素、リン脂質結合タンパクや膜移動に関与する遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。特に脂肪酸についてはエネルギー産生に関わる β 酸化、TCAサイクルに関与する遺伝子の発現低下が認められ、一方アシル転移および脱アシル化系の亢進が認められた。また肝/血漿間の脂質移行に関わる遺伝子の変動が認められた。上記の遺

伝子発現変動の多くはLCA3日群、LCA5日群、PCN併用群、単独投与群では認められないか、あるいは軽度の変動だった。

これらの結果よりLCAの毒性誘発の機序、特に後期に起こるALP活性の増加を伴う、胆道側の障害の発生が肝内脂質、特にリン脂質の欠乏と密接に関連している可能性が示された。

そこで実際の肝内脂質（トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質）レベルを測定するとLCA9日群ではコントロール群に比べて有意な減少が認められ、PCN併用群、単独投与群では逆に有意な増加が認められた。さらに肝臓からの脂質の排泄を検討するため、コントロール群とLCA9日群で胆管カニュレーションにより胆汁を採取して脂質の排泄速度を解析した。LCA9日群の胆汁流量はコントロール群に比べ41%まで減少し、さらに胆汁酸排泄速度は55%まで、コレステロールで68%まで減少したが、リン脂質の排泄速度はコントロール群の17%まで減少し、胆汁中の濃度自体も有意に減少した。LCAと高脂血症治療薬のプロブコールを併用した場合も肝障害がPCNと同様に軽減された。プロブコールは胆汁中へのコレステロール、リン脂質の排泄速度を増加させる作用が認められているが、LCAとの併用により肝内リン脂質濃度と胆汁中へのリン脂質排泄速度はLCA単独群より大きく増加した。

C-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明:

核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) のアゴニストである 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) は併用することで cocaine や acetaminophen の肝障害を増強させることが知られている。そこで C57BL/6 雄性マウスに flutamide あるいは flutamide の主代謝物である 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1) を 5 日間 200 mg/kg で経口投与し TCPOBOP を 1 日目から 3 日間 3 mg/kg 腹腔内投与し、後半の 2 日間絶食をさせる実験モデルで肝障害について検討した。FLU-1 と TCPOBOP 併用群において高い ALT 活性が認められ肝障害が認められた。Flutamide と TCPOBOP の併用群を含む他の群では有意な ALT 活性の上昇は認められなかった。

FLU-1 と TCPOBOP 併用によりマウス肝障害モデルが作製されたので、これを用いて flutamide による肝障害の機序の解析を flutamide の代謝の面から解析した。まず HPLC

による flutamide 代謝物を分離定量出来る分析系を確立した。さらに flutamide の代謝物である FLU-1-N-OH に細胞毒性があることが見出されているため、ヒトとマウスの肝臓マイクロゾームを用いて、flutamide からの FLU-1, あるいは FLU-1 から FLU-1-N-OH 体への代謝活性を比較した。Flutamide から FLU-1 への代謝活性には両者で差異は認められなかったが、FLU-1 の代謝において違いが認められた。ヒト肝臓マイクロゾームでは FLU-1 N-OH 化活性が認められた (0.2-0.6 nmol/mg protein/min) のに対し、マウス肝臓マイクロゾームではこの活性は検出限界 (0.055 nmol/mg protein/min) 以下だった。さらに肝障害が認められたマウス FLU-1/TCPOBOP 併用群と肝障害が認められなかった FLU-1 投与群から肝臓マイクロゾームを調製し、FLU-1 N-水酸化活性を比較した。コントロール群では検出限界以下だった FLU-1 N-水酸化活性が、両者で認められ (FLU-1 群 : 0.031 ± 0.003 nmol/mg protein/min, FLU-1/TCPOBOP 群 : 0.040 ± 0.004 nmol/mg protein/min) 、さらに両者で有意な差異は認められなかった。

以上の結果よりヒトとマウスの肝臓の FLU-1 N-水酸化活性の差異が flutamide 誘発肝障害のヒトとマウスの種差に關与する可能性が考えられた。さらに FLU-1 N-水酸化だけではなく N-水酸化に続く更なる代謝活性化や肝内グルタチオン濃度の枯渇など、予想以上に複雑な機序を介して flutamide は肝障害を誘発している可能性が考えられた。

C-III LC/MS/MS を用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

C-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発 :

1) メタボロミクス手法の開発 : フェノバルビタール (PB) 前処置あるいは未処置のアセトアミノフェン (APAP) 誘発肝障害モデルから得られた尿、血清および肝臓について、簡単な前処理後 MS スペクトルデータを測定し、主成分分析 (PCA) による試料間および群間の分類の可能性について検討した。

PCA の固有ベクトルによりコントロール試料 (5 例) の尿、血清および肝臓の異なる成分を明確に分離することが可能となった。

PB 前処置あるいは未処置の APAP 誘発肝障害モデル 6 群 (Control 群、APAP 500mg/kg 群、800mg/kg 群、PB + Control 処置群、PB + APAP

500mg/kg群, PB+APAP 800mg/kg群)各5例の尿、血清および肝臓から得られたMSデータを用いてPCAを実施し、尿のnegative ion mode (NIM) およびpositive ion mode (PIM) で群間の分離が可能であった。

2) 新規バイオマーカーの探索: 血清ALT活性を基準として、新規バイオマーカー探索法の検討を試みた。すなわち、個体毎の血清ALT活性と尿のMSスペクトル毎のピーク強度との相関性を利用して、バイオマーカー候補の抽出法を検討した。

指標としてALT活性値の対数値を用いることで相関性の向上が認められた。

APAP誘発肝障害モデルにおける肝障害マーカーとの相関性 ($r=0.7781\sim0.8723$) から、NIMではm/z 196、409および424を、PIMではm/z 313、345および388をバイオマーカー候補の抽出できた。

PB処置したラットのAPAP誘発肝障害モデルを用いて、肝障害マーカーと先に抽出されたバイオマーカー候補の相関性について検討し、いずれの質量数においても有意な正の相関性 ($r=0.7402\sim0.8985$) を確認できた。

C-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

フラーレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラーレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラーレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体(アミノ基修飾試薬)を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラーレンを導入したペプチド類のTOF-MS分析を行い、誘導体化が効率良く検出できることを確認した。

更に、重水素化により、互いに分子量が5異なる誘導体化試薬2aと2a-d5を用いてこの混合物をTOF-MS測定における定量性を調べた。その結果、濃度が2倍異なる混合物溶液をそれぞれ誘導体化試薬2aと2a-d5で誘導体化した後、両液を混合してそれぞれの化合物の誘導体化体の比率を調べた結果、5化合物すべてにおいて、期待値0.5にほぼ一致する値が得られた。この結果は、混合物において

も定量的測定が可能であることを示すものである。

また、化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響を解析し、メタボロミクス・プロテオミクス研究に役立つ知見を得る目的で、毒性が報告されている化合物としてエグラボン(脳梗塞急性期治療薬、腎毒性)をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成を開始した。

C-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

1) LC-MSの測定条件の検討: 標準サンプルとして、BSA消化物100 fmolを用いてLCを含めた条件検討を行い、MASCOTサーチによる同定ペプチドのカバー率60-80%が得られた。LCの流速に関しては、200-300 $\mu\text{l}/\text{min}$ を標準的に用いることとした。また、グラジエントに関しては、60-90分程度とするのが最も効率が良いと考えた。

2) 質量分析装置の限界: 複雑性の高いヒトサイトゾルを使った解析から、同定されるタンパク数はある程度信頼性の低いものを含めて最高で142個であった。この際、通常の測定条件では、最高で一分間に40回のMS/MS測定が可能であり、2-300程度のタンパク質の同定が上限であると予想される。

3) 検出ペプチド数を増やすための方針: TOFマスでのペプチドイオンピークの変化を比較することにより、発現の変動したペプチドのみに着目し、次の測定時にそれらのみをMS/MS測定して同定することにより、より効率的な解析ができると期待できる。mzStarとPep3Dというソフトウェアによりrawデータからの三次元グラフ化が可能となった。

4) ラット尿中のタンパク、ペプチド検出: コントロールのラット尿サンプルを用いた解析により、微量のサンプルより多数のタンパクを同定することができた。MASCOT検索により同定されたタンパク数はアセトン沈殿の有無では75および79と同程度であった。しかし、重複して検出されたタンパクは22種類にとどまった。

5) 安定同位体(ICAT)を使った定量比較に関する基礎検討: 既知タンパク質を一定の量比で混合した2種類のテストサンプルの測定により、理論値に比較的近い存在比の値が得られ、本手法の妥当性が確認できた。ヒト肝サイトゾルの個人由来の4ロットに関して、プールド肝サイトゾルとタンパクの存在比を比較し、それ

それ50前後のタンパク質を同定かつ定量することができた。

6) 考察: 四重極/飛行時間(Q-TOF)型のQstarの特性である高分解能な測定を生かし、多検体の解析に対応するため、MS/MS測定による同定をいったんあきらめ、TOFマスのみを効率的に測定し、その中で発現の違いが見られたピークのみに着目して、もう一度同じサンプルを流し直して、それらのみを同定するというアプローチが有効であると考えられる。定量的解析に向けては、安定同位体ラベル法を用いた検討が必要と考えられる。また、データ解析においては、独自の手法によるデータ処理の必要性から、生データの取り出し、加工が重要であると考えられる。

C-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

NMR解析の結果、動物種の違いはもちろんのこと、病態時における尿試料ではNMRシグナルに明らかな違いを検出した。今後病態特異的なマーカーを検出できると考えられた。また、主成分分析などの手法を用いることにより、病態と健常の違いを容易に検出することが出来、有用な解析手段となることがわかった。細胞試料によるNMR解析からは、十分な解析感度が確認された。

実験動物は非常に厳密に制御された環境下で維持・管理されている動物であり、薬剤投与による毒性などの検出には非常に有用であると考えられるが、ヒト試料を考えた場合、生活環境・飲食物・体質など様々な要因によってスペクトラム変化が起り、解析を困難にすることが容易に予測でき、どのようにして克服するかが今後の課題となる。また、細胞レベルでのメタボロミクス解析においては、毒性のある薬剤をタイプ別に選択し、その毒性のタイプを詳細解析できる手法あるいはマーカーを如何に見出すかが重要になると考えられる。

D. 結論

D-1 NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発

ラット尿の¹H-NMRは特別な前処理は必要とせず、約3分間の測定で十分なSNのスペクトルが得られることがわかった。次に、このデータをNMR SUITEで解析したところ、殆どのシグナルは代謝成分のデータベースを利用してフィッティングすることができた。

同一条件下で飼育したラットの尿は採尿条件や採尿温度が異なってもほぼ同様のスペクトルが得られることから、尿採取から測定までの一連の操作に技術的な問題はないことがわかった。以上の結果より、¹H-NMRを利用したラット尿成分からの網羅的な代謝物の解析は十分可能であることが明らかとなった。

D-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元解析手法の確立

D-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序説明:

本研究では肝障害の機序あるいは防御の機序の説明、あるいは毒性マーカーの検索のため、網羅的遺伝子発現解析のデータと実際の生体内物質の変動を結び付ける解析手法の開発を試みた。内在性代謝物質に関連する遺伝子発現変動と生体内代謝物質のレベルを解析することでLCA誘発肝障害に密接に関連する生体内代謝変動について理解することが可能となった。

D-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序説明:

ヒト特異的に肝障害を誘発させるモデル化合物として前立腺癌治療薬のflutamide (FLU)を用い、実験動物モデルを作製し、flutamideの肝障害誘発の機序を代謝の面から解析した。

ヒトとマウスの肝のFLU-1 N-水酸化活性の差異がflutamide誘発肝障害のヒトとマウスの種差に関与する可能性が考えられた。さらにFLU-1 N-水酸化だけではなくN-水酸化に続く更なる代謝活性化や肝内グルタチオン濃度の枯渇など、予想以上に複雑な機序を介してflutamideは肝障害を誘発している可能性が考えられた。

D-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

D-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発:

肝障害モデルにおける尿および生体成分の質量分析計による解析を実施した。その結果、尿の質量スペクトルから統計的手法により解析することで、前処理並びに投与条件の異なる肝障害誘発モデル群を尿などの非侵襲試料を用いて分離することが可能となった。さらに、既存の肝障害マーカーと質量スペクトルの相

関性を利用して、薬物性代謝物の影響を除き、バイオマーカーを探索する手法を開発した。

なし

D-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

LC/MS/MSやMALDI TOF/TOF-MS/MSなどのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行った。フラレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラレンを導入したペプチド類のTOF-MS分析を行い、誘導体化体が効率良く検出できることを確認した。

D-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

オンライン nanoLC-MS/MS を用いることにより、尿中のペプチドおよびタンパクを網羅的に解析する手法の確立を行なった。

データ解析においては、raw data から、TOFマスに関する3次元プロットを作成することができた。

D-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

病態時における尿試料ではNMRシグナルに明らかな違いを検出した。主成分分析が病態と健常の違いを検出する有用な解析手段となることがわかった。超音波破碎細胞を用いたNMR解析技術が細胞における毒性解析に有用であることがわかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

各分担研究報告書に記載した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

NMR を用いたメタボミクス解析、高感度化技術の開発

分担研究者：奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

医薬品開発研究において毒性の早期予測とメカニズムの解明を行うためには遺伝子発現情報や機能タンパク質の発現情報が細胞環境変化(内因性物質の代謝変動)にどのように反映されているかを詳細に検討することが必要である。本研究では尿など非侵襲試料を利用したメタボミクス解析手法の開発と薬効に基づく代謝変動に関する知見を得ること目的として、今年度は NMR によるラット尿成分の解析手法を確立し、NMR データのメタボミクス高感度安全予測系への利用について検討を行った。ラット尿の¹H-NMR は特別な前処理は必要とせず、イミダゾールと D₂O を添加して、¹H-NMR 専用コールドプローブを装備した 500MHz NMR で測定を行った。その結果、尿中の主要成分は 32 回の積算(約 3 分間の測定)で十分な SN のスペクトルを得られることがわかった。次に、このデータの解析を代謝物の同定と定量解析用のソフト(NMR SUITE)を利用して行ったところ、主要成分のシグナルは代謝成分のデータベースとフィッティングさせることができた。なお、同一条件下で飼育したラットの尿は本方法によってほぼ同様のスペクトルが得られることから、尿採取から測定までの一連の操作に技術的な問題はないことがわかった。以上の結果より、¹H-NMR を利用したラット尿成分からの網羅的な代謝物の解析は十分可能であることが明らかとなった。

研究協力者

福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 室長

とを目的としている。主任研究者の奥田は血液および尿サンプルを用いた NMR によるメタボミクス高感度安全予測系を確立し、薬剤暴露時の特性および薬効に基づく内因性物質の代謝変動情報との相関に関する知見を得る。

A. 研究目的

本研究事業では、医薬品の開発ならびに安全性研究におけるトキシコゲノミクス手法の開発の一環として、ヒトへの応用が簡便な尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボミクス・プロテオミクス高感度安全性予測系を確立することで、既存手法および実験動物データからでは予測不可能であった毒性マーカーを新たに見出し、毒性の早期予測ならびに詳細なメカニズム予測を実現するこ

メタボミクス解析を NMR で行う場合、通常は¹H-NMR で測定したスペクトルを細かく積分を区切って棒グラフにしてデータの縮約(bin)をおこなう。そして、これを代謝物プロファイルとして、主成分分析(PCA)などの多変量統計解析を実施し、スコアプロットを比較することにより毒性を特徴づける軸をさがす。次いでローディングプロットから変化してい

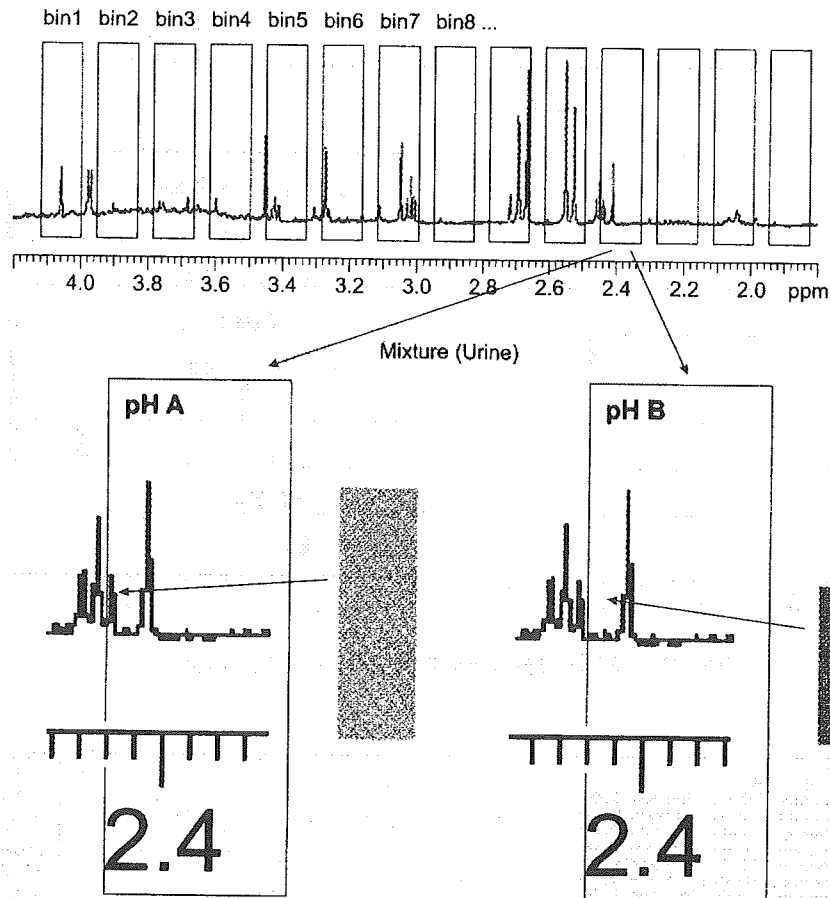


図1. binningの違いによる積分強度の変化

るシグナルを抽出し、そこから代謝物の帰属を行う。この場合、対象とする尿サンプルの binning の精度がメタボミクス解析に大きく影響する。すなわち尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは pH によってケミカルシフトが微妙に変化する場合が多く、binning の段階でしばしば間違っただけの情報を与えてしまう可能性がある。たとえば図1に示すように、2.4ppm 付近の拡大を見ると、pH A の状態と pH B の状態ではスペクトルの強度が変化しないにもかかわらず、シグナルの pH の変化でわずかに移動したために同じ位置の積分値が大きく変化してしまう。この問題を解決すべく、我々は Chenomx 社のソフトウェア(NMR SUITE)を利用してメタボミクス解析を行うことを検討した。これは混合物の成

分について直接定性定量を可能にするソフトウェアである。このソフトウェアは尿中代謝物のケミカルシフトとその pH 依存性に関するデータベースが付属されており、pH の影響でシフトする尿中成分を解析することができる。すなわち、pH を酸性側は尿中のクレアチニンのシフトで、アルカリ側は添加したイミダゾールのシフトで決定し、pH 情報とリンクしたデータベースを利用することによって、複数の代謝物の重なりによる複雑なスペクトルから個々の化合物を抽出することが可能となり、シグナルの強度から定量も同時に行うことが可能となる。図2にその画面を示す。本研究ではこのソフトウェアを利用した尿中代謝物の網羅的解析法を導入して、薬物暴露時の内因性代

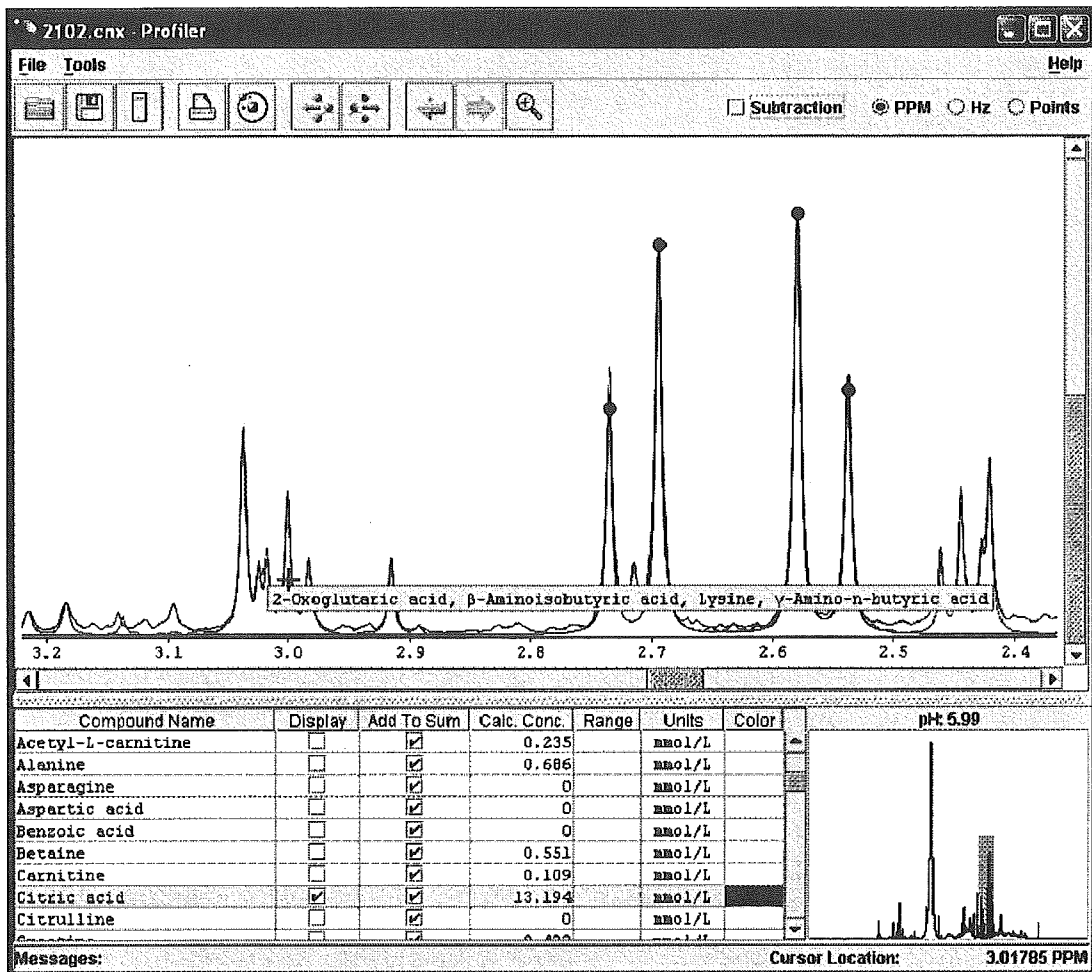


図 2. NMR SUITE による尿中代謝物解析の例

代謝物質の変動を明らかにする。そして薬効と毒性との相関に関する知見を得ることによって NMR によるメタボロミクス高感度安全予測系を確立する。今年度はラットの尿について ¹H-NMR 測定を行い、スペクトルデータの再現性、NMR SUITE を利用したメタボローム解析への有効性について検討を行った。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)本研究で使用した尿は(株)三共安全性研究所で実施された動物実験で採取されたものを用い、動物実験は当該研究所の指針に従って行った。

1. ¹H-NMR 測定に供する尿サンプル

動物の尿は、三共製薬安全性研究所より供与していただいたラットの尿を用いた。蒸留水を投与したラットから採尿し、種類、投与、採尿条件等は以下の通りである。

動物：F344/DuCriCrlj ラット、雄、9 週齢

投与検体：蒸留水

投与用量：10ml/kg

投与方法：強制経口投与

代謝ケージ：ステンレス製代謝ケージ

飼料：Lab Diet 5002 (PMI Nutrition International Inc.)

採尿方法：蒸留水投与後 0-8 時間および 8 時間-24 時間の尿を室温およびドライアイス下で採取。なお、採尿管には防腐

剤として再尿開始時に 1%アジ化ナトリウム水溶液 1ml を添加
保存方法：-80°C

2. $^1\text{H-NMR}$ 測定

装置：500MHz Varian NMR システムに $^1\text{H-NMR}$ 専用コールドプローブを装備
サンプル調整：内部標準物質として 5mMTSP および pH インジケータとして 30mM イミダゾールを含む D_2O 溶液を尿サンプル 500 μl に添加して $^1\text{H-NMR}$ 用サンプルとした。

測定モード: Presat NOESY 1st Increment, 100ms mixing time, 32 transients

3. NMR の解析

Chemomx 社製 NMR スペクトラムからの代謝物の同定と定量解析ソフト(NMR SUITE)により解析を行った。

C. 研究結果

1. 尿の $^1\text{H-NMR}$ 測定とスペクトル解析

本研究で利用するラットの尿について $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。そして本スペクトルデータについて NMR SUITE で主要成分の定性を行い、本スペクトルデータがメタボロミクス解析に利用可能であるか検討した。 $^1\text{H-NMR}$ の測定はラットに蒸留水を投与後、8~24 時間にドライアイス冷却下で採取した尿について行った。測定データは NMR SUITE にエクスポートし、付属の尿中代謝物のデータベースを利用してフィッティングによって解析を試みたところ、図 3 に示すようにクレアチニンや馬尿酸、2-オキソグルタル酸、クエン酸、コハク酸などのピークの定性・定量が可能であることがわかった。

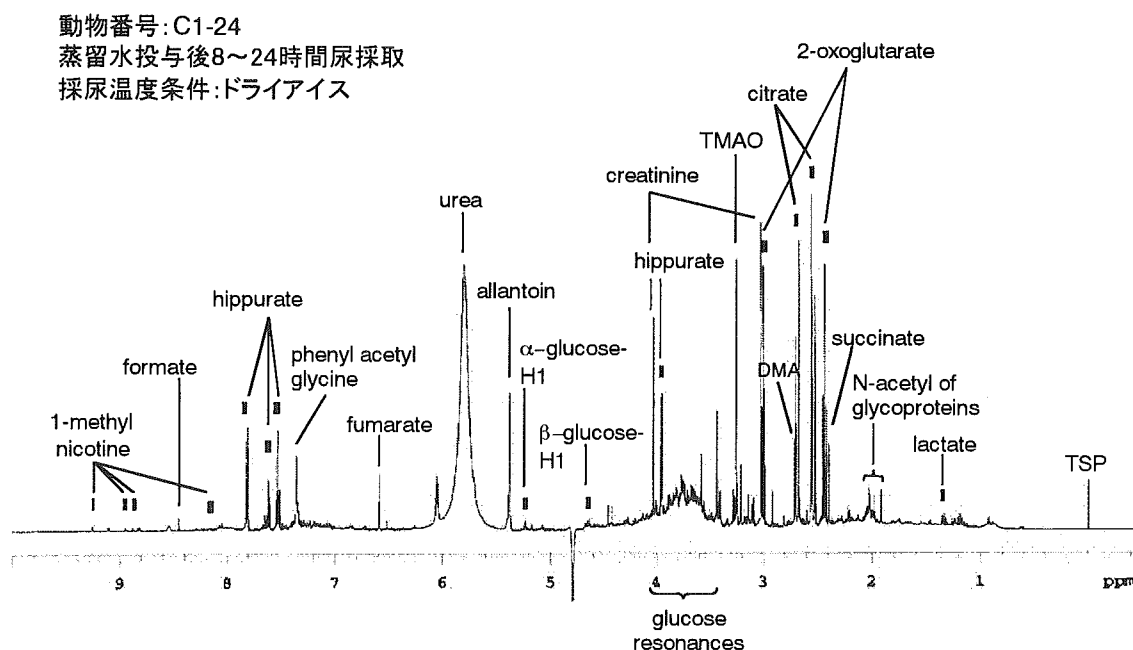


図 3. ラット尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ・ 尿中代謝成分の解析 ・

2.採取条件の検討

ラット尿の¹H-NMR スペクトルへの採取温度および採取時間の影響について検討するため、ドライアイス冷却下と室温で採取した尿、および蒸留水投与後0-8時間採取尿と8-24時間採取尿の¹H-NMRを測定して比較を行った。その結果、図4に示すようにドライアイス冷却下および室温で採取した尿のスペクトルは同様のパターンを示し、採取温度によって尿中成分は変化しないことがわかった。また、蒸留水投与後0-8時間採取尿と8-24時間採取尿でも同様のスペクトルパターンを示したことから、蒸留水投与の場合、尿中の代謝成分は常に同様の代謝パターンを示すことがわかった。

D. 考察

メタボロミクスの分析手法としてはLC/MSを用いた研究が主流であるが、近年、¹H-NMRを利用した解析が注目されるようになってきた。LC/MSは¹H-NMRと比べて感度・情報量では有利である。しかしLC/MSはイオン化の条件やカラムに依存することが多く、特に水溶性化合物は検出困難なことが多い。一方、¹H-NMRでは¹H核を含むほぼすべての化合物のシグナルが検出されるため網羅性に関しては¹H-NMRの手法の方が高いと考えられる。また、再現性に関してはLC/MSはカラムの劣化、イオン源の汚れ等の変動要因が考えられ、これらを考慮すると¹H-NMRの方が再現性に優れていると考えられる。さらに、感度に関しても、近年、¹H専用コールドプローブの開発によって従来のNMRと比べて数倍の感度が得られるようになり、微量成分の測定に対応できるようになった。また、高磁場NMRの出現に

より高分解能スペクトルによって複雑なピークの解析も可能となった。従って、尿や血液中の成分の網羅的解析に¹H-NMRが利用できればメタボロミクス研究が飛躍的に発展することが予測される。しかしながら、尿や血液中に含まれている膨大な種類の内因性代謝物のスペクトルから個々の代謝物のピークの抽出と構造決定には二次元NMR測定等を駆使しなければならず、熟練した技術とデータの蓄積が必要とされる。従って、¹H-NMRによるメタボロミクスはスペクトルパターンによる主成分分析が主流であり、主成分軸によるスコアプロットから毒性を特徴付ける軸が明らかになっても、そこから変化しているシグナルに由来する代謝物の同定までは殆ど行われていない。また、¹H-NMRスペクトルはpHによって代謝成分のケミカルシフトに変化が生じるため、binningによって作成した代謝物プロファイルの信頼性に欠ける場合も多い。しかし近年、Chenomx社が開発したソフトウェア(NMR SUITE)によってpHの影響を考慮した尿中代謝成分の定性定量が可能となり、メタボロミクス研究に大変有用なツールであることが期待された。このソフトウェアは表1に示した約230の代謝物のデータベースと独自の技術によって、尿中の膨大な代謝成分の同定と定性を一度に行うことが可能である。このデータベースはpH4-9の範囲でのケミカルシフトの変化に対応しているため、尿中成分のクレアチニンと測定時に添加したイミダゾールのケミカルシフトから尿のpHを算出し、pHによるケミカルシフトの動きを考慮した定性が行える。従って、pH調整等の前処理を必要とせず、簡便かつ効率的な定性・定量が可能である。今回、このNMR SUITEを利用したメタボ

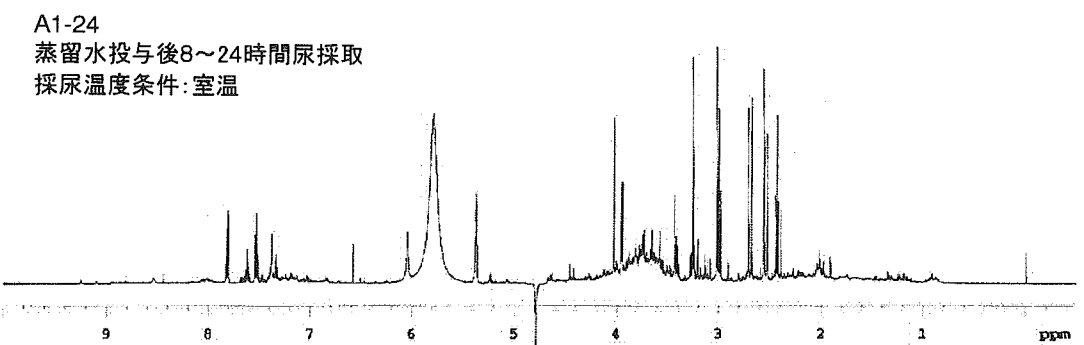
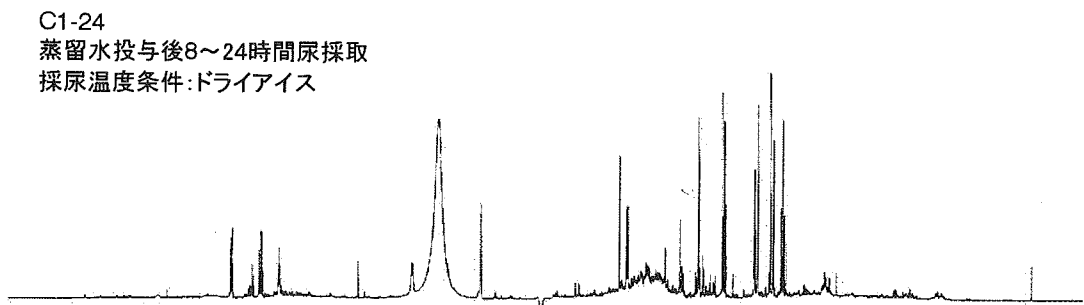
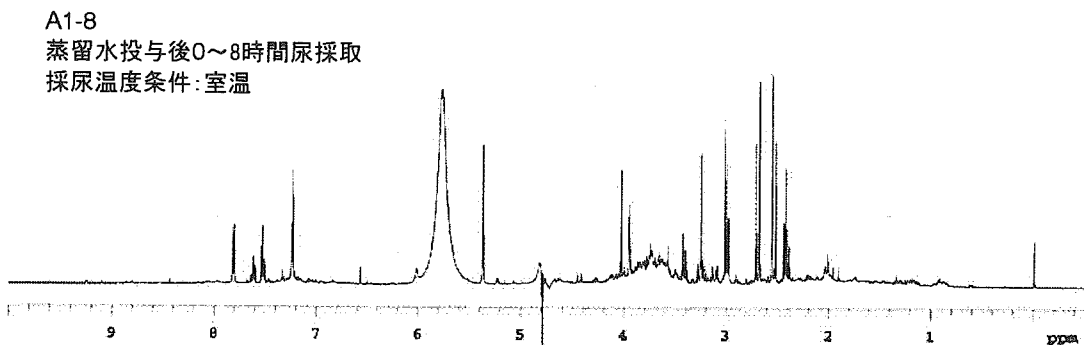
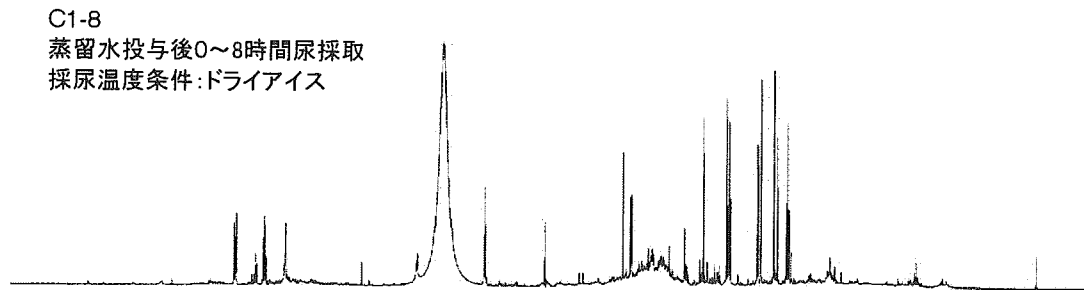


図4. ラット尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル - 採取温度と採取条件の検討 -

表1. NMR SUITE で利用可能な尿中代謝物データベース (随時更新中)

1,3-Dimethylurate	4-Hydroxybutyrate	Cystine	Isocitrate	Pimelate
1,6-Anhydro-β-D-glucose	4-Hydroxyphenylacetate	Cytidine	Isoleucine	Proline
1,7-Dimethylxanthine	4-Hydroxyphenyllactate	Cytosine	Isopropanol	Propionate
1-Methylhistidine	4-Pyridoxate	Dimethylamine	Isovalerate	Propylene glycol
1-Methylnicotinamide	5-Aminolevulinate	DSS	Isovalerylglycine	Protocatechuate
2-Amino adipate	5-Hydroxyindole-3-acetate	Epicatechin	Kynurenine	Pyroglutamate
2-Aminobutyrate	5-Hydroxylysine	Ethanol	Lactate	Pyruvate
2'-Deoxyadenosine	5-Methoxysalicylate	Ethanolamine	Lactose	Quinolate
2-Ethylacrylate	Acetaldehyde	Ethylmalonate	Leucine	Riboflavin
2-Hydroxy-3-methylvalerate	Acetamide	Formate	Levulinate	Ribose
2-Hydroxybutyrate	Acetaminophen	Fructose	Lysine	Salicylate
2-Hydroxyglutarate	Acetate	Fucose	Malate	Salicylurate
2-Hydroxyisobutyrate	Acetoacetate	Fumarate	Maleate	Sarcosine
2-Hydroxyisocaproate	Acetone	Galactarate	Malonate	Serine
2-Hydroxyisovalerate	Acetylsalicylate	Galactitol	Mannitol	S-Sulfocysteine
2-Hydroxyvalerate	Adenine	Galactonate	Mannose	Suberate
2-Octenoate	Adenosine	Galactose	Methanol	Succinate
2-Oxobutyrate	Adipate	Gentisate	Methionine	Succinylacetone
2-Oxocaproate	Alanine	Glucarate	Methylamine	Sucrose
2-Oxoglutarate	Allantoin	Glucose	Methylguanidine	Tartrate
2-Oxoisocaproate	Alloisoleucine	Glucuronate	Methylmalonate	Taurine
2-Oxovalerate	Anserine	Glutamate	Methylsuccinate	Threonate
2-Phosphoglycerate	Arginine	Glutamine	myo-Inositol	Threonine
3,4-Dihydroxymandelate	Asparagine	Glutarate	N,N-Dimethylglycine	Thymine
3-Aminoisobutyrate	Aspartate	Glycerate	N-Acetylaspartate	Thymol
3-Hydroxy-3-methylglutarate	β-Alanine	Glycerol	N-Acetylglutamate	Tiglylglycine
3-Hydroxybutyrate	Benzoate	Glycine	N-Acetylglycine	trans-4-Hydroxyproline
3-Hydroxyisovalerate	Betaine	Glycolate	n-Butyrate	trans-Aconitate
3-Hydroxymandelate	Biotin	Glycylproline	N-Carbamoylaspartate	Trimethylamine
3-Hydroxyphenylacetate	Butanone	Guanidoacetate	N-Carbamoylalanine	Trimethylamine-N-oxide
3-Indoxylsulfate	Caffeine	Hippurate	Niacinamide	Tryptophan
3-Methyl-2-oxovalerate	Caprate	Histidine	Nicotinate	Tyramine
3-Methyladipate	Caprylate	Homocitrulline	O-Acetylcarnitine	Tyrosine
3-Methylhistidine	Carnitine	Homocystine	Ornithine	Uracil
3-Phenyllactate	Carnosine	Homoserine	Oxalacetate	Urea
3-Phenylpropionate	Cinnamate	Homovanillate	Pantothenate	Uridine
4-Aminobutyrate	cis-Aconitate	Hypoxanthine	p-Cresol	Urocanate
4-Aminohippurate	Citrate	Ibuprofen	Phenol	Valerate
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate	Citrulline	Imidazole	Phenylacetate	Valine
4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	Creatine	Indole-3-acetate	Phenylacetylglycine	Valproate
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	Creatinine	Isobutyrate	Phenylalanine	Xanthine
4-Hydroxybenzoate	Cysteine	Isocaproate	Phosphoserine	Xylose

ロミクス解析を行うにあたり、このソフトウェアに利用可能なラット尿の $^1\text{H-NMR}$ 測定が簡便に行えるか検討を行った。また測定したスペクトルで NMR SUITE による解析を行い実際のメタボロミクス研究への有効性についても検討を行った。

尿サンプルの $^1\text{H-NMR}$ 測定の為には磁場強度の変化を補正するために D_2O を添加してロックをかけるが、サンプルの 90% は尿由来の軽水である為、測定には軽水のプロトンを消去することが必要である。今回は NOESY のパルスシーケンスを用い、Presaturation 法による水の消去を行ったところスペクトル上の水のピークは非常に効率良く消去できることがわかった。また、この消去法は水のピーク周辺の代謝物シグナルには全く影響を与えないこともわかった。測定は短時間で高感度な測定を行うために ^1H 専用のコールドプローブを利用しところ、尿中の主な成分に関しては積算回数 32 回、約 3 分間の測定で十分な SN が得られた。分解能の調整に関してはグラジェントシムによる自動調整を行ったが、得られたスペクトルはピーク間の分離も良く、重なっている複数のピークの定性・定量が十分可能であることがわかった。以上、ラット尿の $^1\text{H-NMR}$ の測定はコールドプローブを利用することによって十分可能であり、また水の消去、分解能に関しても、メタボロミクス解析に利用できるスペクトルが簡便に測定できることがわかった。

次にこのスペクトルを利用して、NMR SUITE による代謝物の解析法について検討を行った。NMR SUITE は、Processor、Profiler、Library Manager、Signature Builder の四つのモジュールによって構成されており、Processor では $^1\text{H-NMR}$ データを NMR SUITE のフォーマットに変換し、基準物質からケミカルシフトと pH を

決定した。そして Profiler でデータベースに登録されている代謝物を選び出して測定データにフィッティングさせることによって、定性と定量を行った。今回は主な代謝物について定性を試みた。フィッティングはそれぞれのピークに合う候補化合物を選択する必要があり、最初は時間がかかるが、二次元 NMR 等の手法を駆使して化合物の定性を行う手間を考えれば非常に簡便な操作であり、また、一度すべての尿中成分について定性を行っておけば、次回からはフィッティングに手間取らずに定性・定量が可能であることがわかった。なお、Library Manager と Signature Builder はデータベースに新しい化合物を登録するソフトであり、これを利用することによって内因性代謝物のみならず、薬物の代謝物などについても定性・定量が可能である。以上、NMR SUITE は尿中成分の網羅的な定性・定量には非常に有用なソフトであり、これを利用したメタボロミクス解析を行って生体応答を分析することにより、薬物の毒性予測やバイオマーカーの探索が可能であることが明らかとなった。

尿中の代謝成分パターンは餌の種類や尿の採取方法、また動物の種差や個体差によって大きく変動することが考えられる。従って、代謝パターンの変化が薬物由来か、それとも他の要因によるものの判断がメタボロミクス解析には大変重要であり、そのためには薬物非投与群の代謝パターンが常に一定になるような動物管理と尿採取を行う必要がある。今回、図 3 に示すように室温とドライアイス冷却下で測定した尿のスペクトルパターンがほぼ同様であったことから、尿は室温でも十分安定に採取できることがわかった。また、動物の個体差に関しては今回測定した 4 匹のラットの尿スペク

トルがほぼ同様であることから、同一系統のラットを同じ餌で管理していれば尿中パターンに変化がないことが明らかとなった。さらにラットに蒸留水を投与後、0-8 時間に採取した尿と 8-24 時間で採取した尿ではほぼ同様のスペクトルが得られたことは、薬物投与対照群としての尿の代謝パターンは常に一定であることを示唆するものであり、もし薬物投与群のスペクトルに変化がみられれば、それは薬物由来の代謝パターンの変化として検討可能であることがわかった。

E. 結論

¹H-NMR によるメタボロミクスは LC/MS と比べてスペクトルの再現性 (pH によるケミカルシフトの変化) や感度に問題があり、または複雑な混合成分からの代謝物質解析が困難であることから実用性に乏しかった。しなしながら近年、¹H 専用コールドプローブによる感度の飛躍的な向上および、Chenomx 社が開発した NMR スペクトラムによる代謝物の同定と定量解析ソフト (NMR SUITE) によって、¹H-NMR による大量の尿サンプルからの代謝物の定性・定量が可能となってきた。本研究では ¹H-NMR による網羅的メタボロミクス解析手法の確立と薬物の毒性予測やバイオマーカーの探索への利用を目的として、今年度は実際のラットの尿を用いて ¹H-NMR を測定と NMR SUITE による解析を行って、メタボロミクス高感度安全予測系への ¹H-NMR の利用について検討してみた。ラット尿の ¹H-NMR は特別な前処理は必要とせず、イミダゾールと D₂O を添加し、水消去 (presaturation 法) を行って測定したところ、尿中主要成分は 32 回の積算 (約 3 分間の測定) で十分な SN のスペクトルが得られることがわかった。次に、このデータを NMR SUITE で解析したところ、

殆どのシグナルは代謝成分のデータベースを利用してフィッティングすることができた。また、同一条件下で飼育したラットの尿は採尿条件や採尿温度が異なってもほぼ同様のスペクトルが得られることから、尿採取から測定までの一連の操作に技術的な問題はないことがわかった。以上の結果より、¹H-NMR を利用したラット尿成分からの網羅的な代謝物の解析は十分可能であることが明らかとなった。来年度以降は本方法を用いることによって薬物暴露時の特性および薬効に基づく内因性物質の代謝変動情報との相関について検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, Structural Basis for DNA Cleaving-Activity of Resveratrol on the Presence of Cu(II), *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1437 - 1443 (2006).
- 2) I. Nakanishi, C. Nishizawa, K. Ohkubo, K. Takeshita, K. Suzuki, T. Ozawa, S. M. Hecht, M. Tanno, S. Sueyoshi, N. Miyata, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, K. Fukuhara, Hydroxyl Radical Generation via Photoreduction of a Simple Pyridine *N*-Oxide by an NADH Analogue, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 3263 - 3265 (2005).
- 3) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota, Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 626 - 629 (2005).

2. 学会発表

- 1) 福原潔, 箱田奈南, 及川伸二, 平工雄介, 境保統, 斎藤慎一, 宮田直樹, 川西正祐, 奥田晴宏, 光線力学療法剤の開発:9-ニトロ

- アントラセン誘導体からのアントラキノン生成とDNA切断反応、日本薬学会第126年会、仙台(2006,3)
- 2) 川島知憲, 中西郁夫, 薬丸晴子, 乳井美奈子, 大久保敬, 金澤秀子, 福原潔, 奥田晴宏, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 分子内に塩基性部位を有するビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性、日本薬学会第126年会、仙台(2006,3)
- 3) 中西郁夫, 川島知憲, 川口久美子, 大久保敬, 乳井美奈子, 田草川光子, 末延知義, 福原潔, 伊藤攻, 奥田晴宏, 金澤秀子, 宮田直樹, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 水溶性C70-シクロデキストリン錯体による光DNA切断、日本薬学会第126年会、仙台(2006,3)
- 4) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, 鈴木桂子, 川口久美子, 金澤秀子, 福原潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀均, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 4-プロペニルフェノール構造を有する抗酸化物質のラジカル消去活性の評価、日本薬学会第126年会、仙台(2006,3)
- 5) 袴田航, 室井誠, 長田裕之, 福原潔, 奥田晴宏, 栗原正明, 新興ウイルス感染症に対する新規抗ウイルス剤の開発ー糖鎖プロセッシング酵素を分子標的としてー、日本薬学会第126年会、仙台(2006,3)
- 6) T. Kawashima, I. Nakanishi, S. Manda, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Nagasawa, H. Hori, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi, and N. Ikota, □Radical-Scavenging Activity of Natural Antioxidants Having 4-Propenylphenol Structures, □XXth Annual Meeting of the Oxygen Club of California, Santa Barbara, California, USA, (2006, 3)
- 7) I. Nakanishi, T. Kawashima, A. Tada, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara□, Synthesis and Radical-Scavenging Activity of Planar Catechin Derivatives Having Alkyl Side Chains, □XXth Annual Meeting of the Oxygen Club of California, Santa Barbara, California, USA, (2006, 3)
- 8) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Kawashima, H. Yakumaru, H. Kanazawa, H. Okuda, K. Ohkubo, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, Enhanced radical-scavenging activities of planar catechin derivatives having alkyl side chains, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, USA, (2005, 12)
- 9) Nakanishi, C. Nishizawa, K. Ohkubo, K. Takeshita, K. T. Suzuki, T. Ozawa, S. M. Hecht, M. Tanno, S. Sueyoshi, M. Takusagawa, N. Miyata, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, □Hydroxyl Radical Generation via One-Electron Reduction of Pyridine N-Oxides as a Key Structure of Antitumor Agents for Hypoxic Solid Tumours□PACIFICHEM 2005, Honolulu, Hawaii, USA, (2005, 12)
- 10) 福原 潔、中西郁夫、浦野四郎、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、奥田晴宏、カテキンをテンプレートとした新規化学予防物質の開発、第24回メディシナルケミストリーシンポジウム、大阪(2005,11)
- 11) 福原 潔、中西郁夫、川村義彦、川島知憲、金澤秀子、浦野四郎、小澤俊彦、伊古田暢夫、石井明子、川崎ナナ、川西徹、宮田直樹、奥田晴、Enhanced radical-scavenging activities and cell growth inhibitions of planar catechin analogues having alkyl side chains、第34回日本環境変異原学会、東京(2005, 11)
- 12) Nakanishi, T. Kawashima, M. Nyui, K. Kawaguchi, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota, □Solvent Effect on the Radical-Scavenging Mechanism of Phenolic Antioxidants□PACIFICHEM 2005, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2005.
- 13) T. Kawashima, I. Nakanishi, M. Nyui, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, K. Fukuhara, and N. Ikota□, Base-Catalyzed Radical-Scavenging Reactions by Phenolic Antioxidants□12th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Austin, Texas, USA, November 16-20, 2005.
- 14) 福原 潔、中西郁夫、石井明子、川崎ナナ、川西 徹、浦野四郎、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、カテキンの立体構造固定による抗酸化効果の増強と生物作用、第20回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005,9)
- 15) 川島知憲、中西郁夫、宇都義浩、大久保敬、川口久美子、金澤秀子、福原 潔、奥田晴宏、永沢秀子、堀均、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、4-プロペニルフェノ