

図2. 代謝物の物理化学的性質による分類と各分析法の適用可能範囲

## I メタボロミクスとその測定手法

生命活動は代謝と呼ばれる種々の酵素反応の連鎖によって営まれており、代謝によって産生された代謝中間体や代謝産物の総体をメタボロームと呼ぶ。メタボロームの総数は種によって異なるが、大腸菌などの微生物では約800～1,600種類、ヒトなどの哺乳類では2,500～8,000種類、植物では2万～10万種類程度存在すると見積もられている。

メタボロミクス(メタボローム解析)は対象とするサンプル中に存在するこれらの代謝産物を包括的に扱う学問分野の1つであるが、現在のところこれらの代謝物を一斉に測定する決定的な分析法は存在しない。対象とする代謝物の物理的・化学的性質が多岐に渡っているため、単独の測定法ですべての代謝物を網羅するのは不可能である。したがって、比較的性質の似ている化合物群に対し、ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)、液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析法(CE-MS)などのメタボローム測定法を使い分けているのが現状である(図2)。

## II CE-MSによるメタボローム測定法

メタボローム測定を始めるにあたり、どの測定手法を用いるかは重要な問題である。前述のように、単独ですべての代謝物を網羅する分析法はないので複数の分析手法を組み合わせるのが最も良い方法ではあるが、装置の導入に多額の資金が必要になってくる。筆者らはほとんどの生物が共通に有している、解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やその周辺のアミノ酸、核酸などの生合成経路に存在する代謝中間体の多くが、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、リン酸基などを有する低分子のイオン性の物質であることを見出した。実際に、生物学の分野でよく用いられており、代謝物の多くがわかっている大腸菌の代謝物データベースを詳細に調べてみたところ、主要な代謝物のうち、実に88%がイオン性の代謝物であることがわかった<sup>2)</sup>。そこで筆者らは、イオン性代謝物の一斉分析に威力を発揮するCE-MSを用いたメタボローム解析法を微生物<sup>3)</sup>や植物<sup>4)</sup>、動物<sup>5)6)</sup>などのサンプルに適用してきた。

### 1 陽イオン性代謝物測定法<sup>7)</sup>

陽イオン性の代謝物質の測定は、内径50 $\mu$ m、全長1m

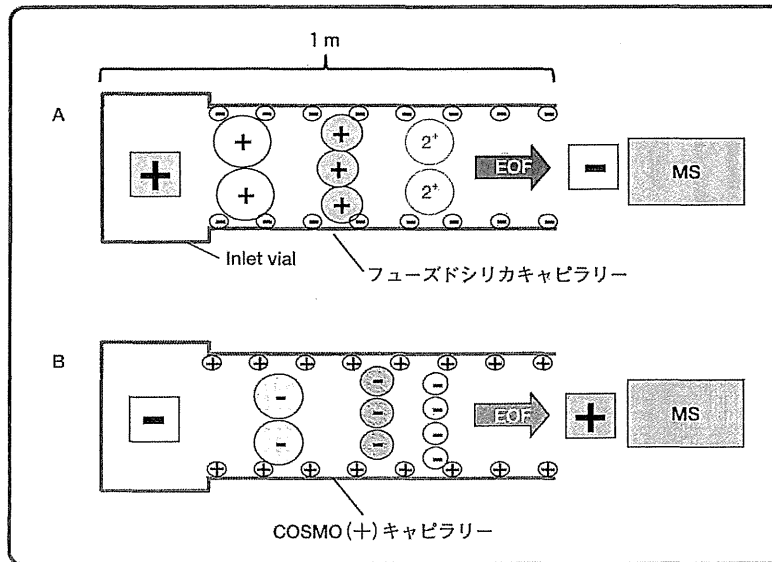


図3. CE-MSによるメタボローム測定法

A：陽イオン性代謝物質測定法，B：陰イオン性代謝物質測定法

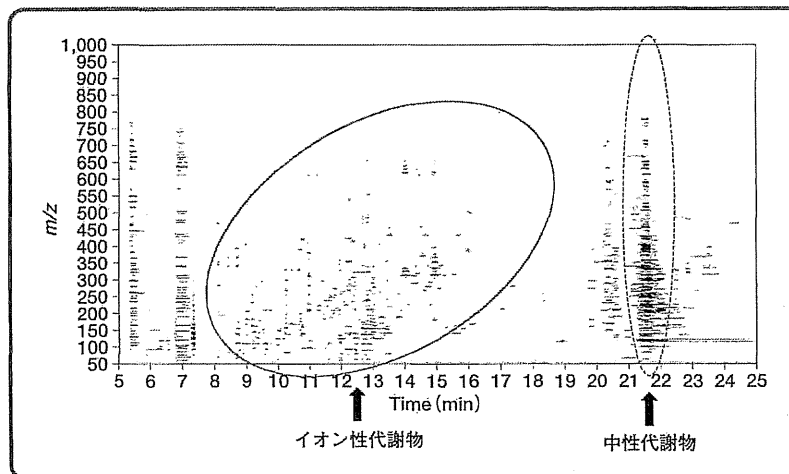


図4. CE-TOFMSによる大腸癌組織の陽イオン測定の場合

イオン性の代謝物はその水和イオン半径と電荷の比に基づいてキャピラリー内で分離され、検出される。中性物質においても、キャピラリー内に発生する電気浸透流(EOF)と呼ばれる液流によってMSまで運ばれ検出されるが、キャピラリー内で分離されないため同じ時間に検出される。

のフューズドシリカキャピラリーを用いて行っている(図3 A)。キャピラリー内を泳動液である1 Mのギ酸溶液で満たした後に、キャピラリーの出口(MS側)が陰極となるように両端に30kVの電圧を印加する。

キャピラリー内に導入されたサンプル中の各代謝物質は、

その電荷と水和イオン半径の比に基づいた速度によってキャピラリー内で電気泳動し分離された後、キャピラリーの出口に接続されたMSによって、高感度かつ選択的に検出される。図4にCE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置)を用いて得られた、大腸癌組織の陽イオ

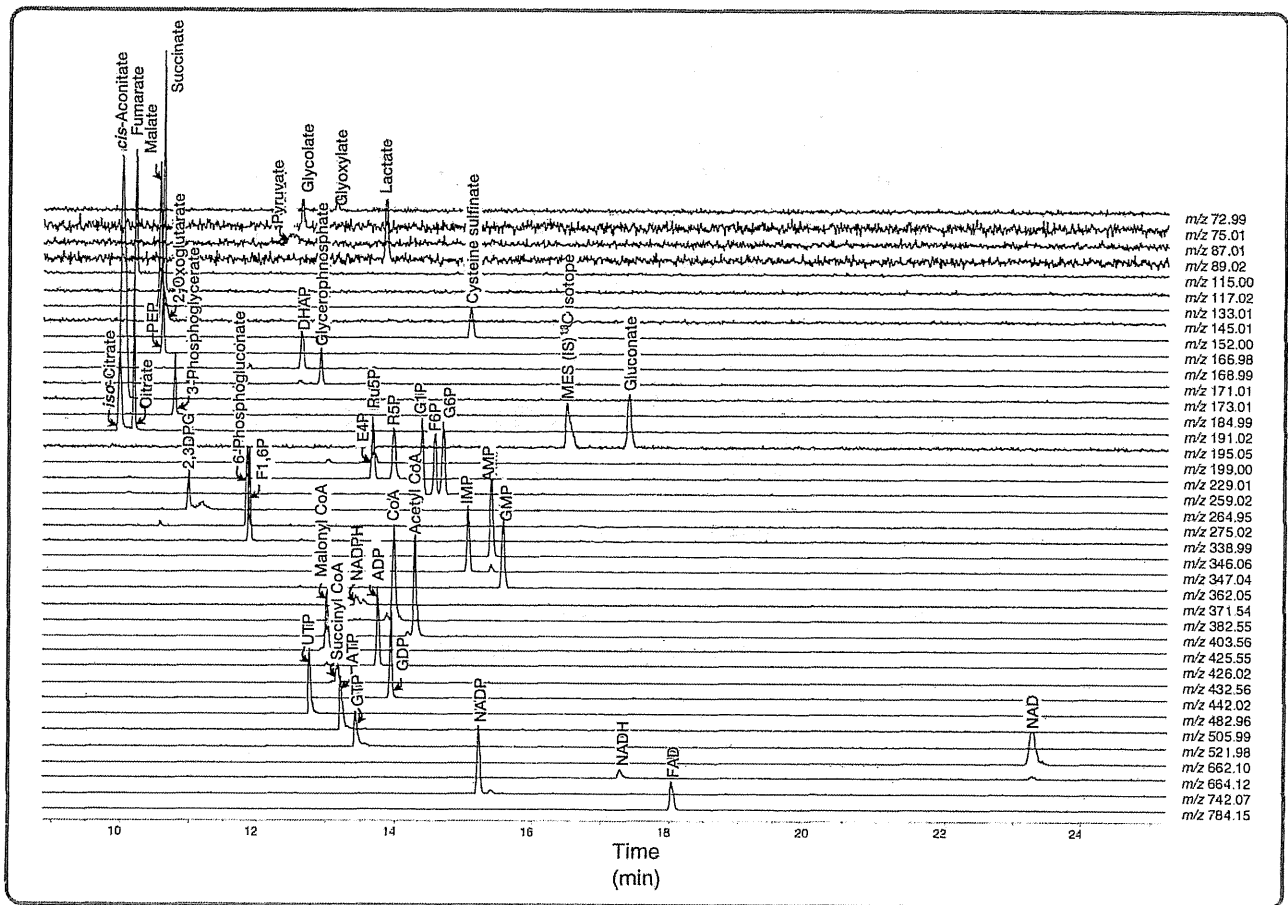


図 5. CE-TOFMS による陰イオン性代謝物の測定例

ン測定結果の 1 例を示す。

## 2 陰イオン性代謝物測定法<sup>8)9)</sup>

陰イオン性の代謝物質の測定は、塩基性化合物をキャピラリー内壁表面に化学修飾した COSMO(+) キャピラリー (ナカライテスク株式会社より市販されている) を用いて行っている。泳動液には pH8.5 の 50mM 酢酸アンモニウム溶液を用い、陽イオン測定とは極性を反転させて電圧を印加する。COSMO(+) キャピラリーを用いることにより、電気浸透流と呼ばれる液流を反転することが可能になり、結果として陰イオン性の代謝物質を安定に測定することができるようになった (図 3 B)。図 5 に解糖系、ペントースリン酸回路、TCA 回路の代謝中間体と、ヌクレオチド類を一斉

分析した例を示す。本法では、異性体である Ru5P と R5P, iso-Citrate と Citrate, G1P, F6P および G6P など分離することが可能である。

## III CE-MS における試料の前処理

サンプル中の代謝物量を正確に定量するためには代謝を瞬時に停止させることが不可欠である。また、CE-MS を用いたメタボローム測定においては、蛋白質や脂質などの夾雑物質の影響を受けやすいため、特に注意が必要である。

ここでは、血液試料の場合を例にとり述べる。50  $\mu$ L の血清、または血漿をあらかじめ内部標準の入った 10 倍量のメタノール溶液に混合する。次いでクロロホルム、Milli-

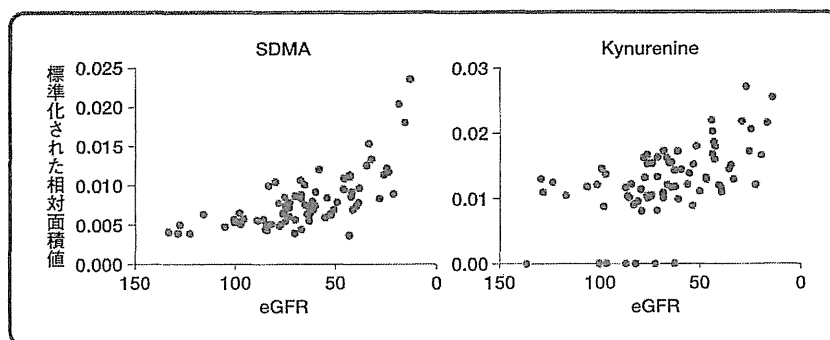


図6. SDMA, キヌレニン (Kynurenine) と eGFR (推算糸球体濾過量) との相関

両代謝物の濃度は eGFR の減少 (=腎機能の低下) と正の相関がみられた。

Q水を追加して分液操作を行うことにより、疎水性の蛋白質や脂肪酸、リン脂質などを除去する。さらに、分液後の水層を分画分子量 5,000 の限外ろ過フィルターに通すことによって、水溶性の蛋白質を完全に除去する。ろ液は減圧乾固した後、50  $\mu$ L の Milli-Q 水に再溶解して測定に用いている。

#### IV データ解析

CE-MSに限らず、対象を絞らないメタボローム解析によって得られたデータには、1サンプルあたり数千から数万のピークが含まれている。これらの膨大なピークを手作業で解析するのは不可能であるので、市販のソフトウェアなどを用いて、自動的に処理を行うのが普通である。

しかしながら、CE-MS測定で得られたデータを解析する際に問題となるのが、試料間の各物質の泳動時間のずれが生じることである。筆者らの研究グループではこの問題を解決するため、CE-MS解析に特化したソフトウェア (Keio MasterHands) の開発も行っている<sup>10)-12)</sup>。このソフトウェアは、ピークの積分、検出時間のずれの補正、同定や定量までを自動で行うことも可能になっており、データ解析にかかる時間を飛躍的に短縮することが可能になった。

#### V 糖尿病性腎症のバイオマーカー探索への応用

糖尿病性腎症は糖尿病における主要な合併症の1つであり、末期腎不全に移行する最大の原因である。最近の研究で、糖尿病性腎症のできるだけ早期に治療介入した場合、腎症の進行を有意に遅らせることができることがわかってきており、早期診断の重要性が高まっている。一般的に糖尿病性腎症の確定診断は腎生検による組織診断によって行われているが、患者が高齢である場合が多く、すべての症例に組織診断を行うことは不可能である。したがって、採血などの比較的簡便な方法によって糖尿病性腎症を早期に診断するバイオマーカーの開発は非常に重要である。

今回筆者らは CE-TOFMS を用いて、糖尿病性腎症病期を診断する血清バイオマーカーの探索を試みた。78名の糖尿病性腎症患者はその腎症の進行により、ステージ I (腎症前期)、ステージ II (早期腎症期)、ステージ III (顕性腎症期) およびステージ IV (腎不全期) の4つのグループに分類した。CE-TOFMSを用いたメタボローム測定の結果、陽イオン測定と陰イオン測定の2回の測定によって1サンプルあたり平均4,400のピークを検出した。そこから、フラグメントイオン、アダクトイオンといった1つの代謝物から派生する関連ピークやノイズを除去した結果、最終的に糖尿病性腎症患者血清中から1サンプルあたり平均約300種類の代謝物ピークを得ることができた。

これらすべてのピークに対して統計解析を行った結果、

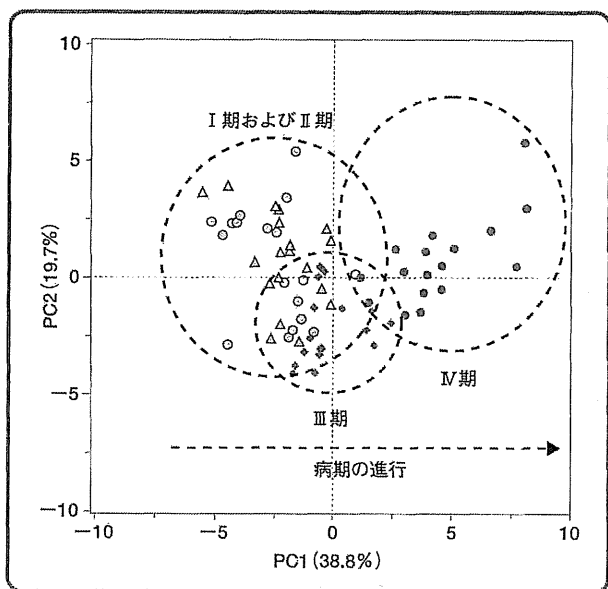


図7. 糖尿病性腎症血清サンプルの主成分分析 (PCA) 結果

○：糖尿病性腎症Ⅰ期（腎症前期）、△：糖尿病性腎症Ⅱ期（早期腎症期）、◆：糖尿病性腎症Ⅲ期（顕性腎症期）、■：糖尿病性腎症Ⅳ期（腎不全期）

Symmetric dimethylarginine (SDMA) やキヌレニンといった、これまで腎障害と相関があると知られているいくつかの既知のマーカーを検出することができた(図6)。また、有意差のみられたすべてのピークを用いて主成分分析を行った結果(図7)、Ⅰ期とⅡ期の分離は不明瞭であったが、病期の進行に伴い各サンプルのプロットが第一主成分に対して正方向へシフトすることがわかり、メタボロームデータからも病期の推測が可能であることが示唆された。

## おわりに

筆者らはこれまでに、CE-MS法をさまざまなサンプルに適用し、興味深い知見を得ることができた。しかしながら、CE-MSに限らずメタボローム測定で得られる膨大なピークのうち、同定できるのはせいぜい3割程度であり、残りの

ピークについては手つかずになっているのが現状である。分析化学的な側面から、これらのピークの同定を進めてさらなるメタボロミクスの発展に寄与できれば幸いである。

## 謝辞

本研究は、名古屋大学医学部腎臓内科 丸山彰一先生、秋山真一先生、藤田保健衛生大学医学部腎内科学 湯澤由紀夫先生、ならびに中部ろうさい病院 中島英太郎先生との共同研究の一部である。

また本研究は、山形県および鶴岡市の支援によるものである。

## ◎文献

1. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, et al : Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2 : 488-494, 2003
2. Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, et al : Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol Biosyst* 4 : 135-147, 2008
3. Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, et al : Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science* 316 : 593-597, 2007
4. Sato S, Soga T, Nishioka T, et al : Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J* 40 : 151-163, 2004
5. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, et al : Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69 : 4918-4925, 2009
6. Soga T, Baran R, Suematsu M, et al : Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 281 : 16768-16776, 2006
7. Soga T, Heiger DN : Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72 : 1236-1241, 2000
8. Soga T, Igarashi K, Ito C, et al : Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* 81 : 6165-6174, 2009
9. Soga T, Ueno Y, Naraoka H, et al : Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 74 : 2233-2239, 2002
10. Baran R, Kochi H, Saito N, et al : MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. *BMC Bioinformatics* 7 : 530, 2006
11. Baran R, Robert M, Suematsu M, et al : Visualization of three-way comparisons of omics data. *BMC Bioinformatics* 8 : 72, 2007
12. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, et al : Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 6 : 78-95, 2010

## 一般演題12

# 新規酸化ストレスマーカー $\gamma$ -グルタミルジペプチド類による肝疾患スクリーニング

曾我 朋義\*・杉本 昌弘\*・本間 雅\*\*・斎藤 貴史\*\*\*・末松 誠\*\*\*\*

### はじめに

各種の肝疾患患者から採取した血清中のメタボローム(低分子代謝物の総称)を網羅的に測定することによって、肝内のグルタチオン(GSH)の生合成量を示す $\gamma$ -グルタミルジペプチド類を発見した。この新規の酸化ストレスに関するマーカーを1個から数個組み合わせることにより、薬剤性肝炎(DI)、B型肝炎持続感染(AHB)、B型慢性肝炎(CHB)、C型肝炎持続感染(CNALT)、C型慢性肝炎(CHC)、肝硬変(CIR)、肝細胞がん(HCC)患者を高い精度で診断できることがわかった。またこのマーカーにより単純性脂肪肝(SS)や非アルコール性肝炎(NASH)の区別も可能であることが示唆された。各種の肝臓疾患のスクリーニング法および $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の生合成の機序について報告したい。

### メタボローム測定によるマウスの薬剤性肝炎マーカーの発見

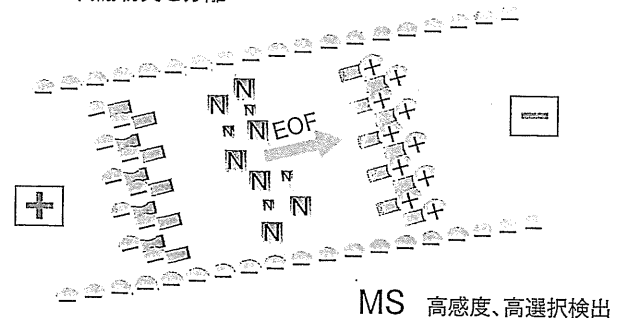
メタボローム解析は、細胞や生体試料に存在する低分子代謝物を網羅的に測定する方法論であり、代謝調節機構の解明、遺伝子やタンパク質の機能解明から疾患やがんの機序の解明、

病態の診断、各種バイオマーカーの探索などに有効な解決策を与えるのではないかと期待されている。

筆者らは、イオン性の低分子代謝物に対して、高分離能、高感度測定を可能にしたキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)法(図1)を開発し<sup>1)2)</sup>、細胞や組織に存在する1,000種類以上の代謝物の一斉分析を実現した。本法により、これまでに解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(APAP)で惹起される急性肝炎の血中バイオマーカー( $\gamma$ -glutamyl-2-aminobutyryl glycine; オフタルミン酸)を発見している(図2)<sup>2)</sup>。APAPをマウスに過剰投与し、肝と血中の代謝物質の変動をメタボローム測定したところ、急性肝炎発症時に、APAPの代謝で生じた毒性の高い

図1 キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるイオン性代謝物の測定法

CE 代謝物質を分離



$\gamma$ -Glutamyl dipeptides as new oxidative stress biomarkers for discrimination among different forms of liver disease

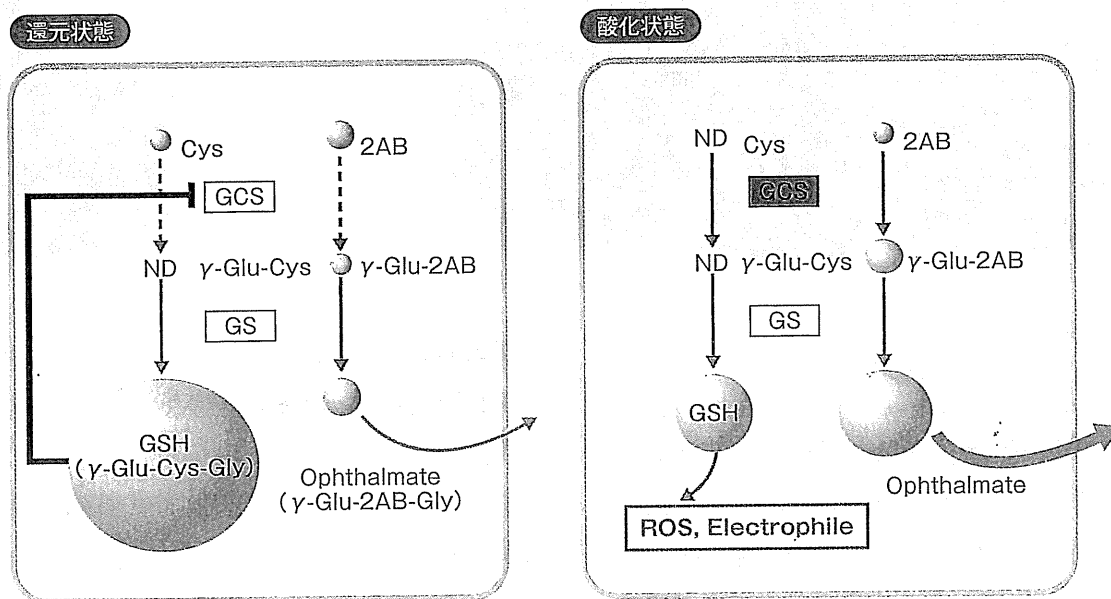
\*SOGA Tomoyoshi et al 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 [〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺水上246-2]

\*\*HONMA Masashi 東京大学 病院薬剤部

\*\*\*SAITO Takafumi 山形大学医学部 消化器内科学

\*\*\*\*SUEMATSU Makoto 慶應義塾大学医学部 医化学教室

図2 ROSや親電子物質でオフタルミン酸が生成される機序(マウス)



GSHはCysを、オフタルミン酸は2-アミノ酪酸(2AB)を基質にしてGCSとGSの触媒によって生合成される。通常(還元状態)では、GSHが豊富に存在するため、GCSがフィードバック阻害されており、GSHもオフタルミン酸もほとんど産生されない。酸化ストレス状態では、ROSや親電子物質の除去のためにGSHが消費されるとフィードバック阻害が解除されGCSの活性が亢進し、GSHとオフタルミン酸が生合成される。蓄積されたオフタルミン酸は肝から血中に輸送される。

親電子物質(N-acetyl-p-benzoquinone imine; NAPQI) に対して解毒作用を持つGSHの枯渇に伴い、GSHアナログであるオフタルミン酸が肝および血清で急増することを見出し(図2)、その生合成経路および機序を解明した<sup>2)</sup>。

GSHは、γ-グルタミルシステインシンセターゼ(GCS)とグルタチオンシンセターゼ(GS)の二つの酵素によって、Cysから生合成されるトリペプチドである(図2)。筆者らは、生化学的な実験によって、オフタルミン酸もGSHと同じ二つの酵素(GCSとGS)によって、2-アミノ酪酸(2AB)から生合成されるトリペプチドであることを明らかにした。また薬剤性肝炎でオフタルミン酸が急増する機序も解明した。通常(図2還元状態)では、肝細胞内にGSHが大量に存在し、これがGSH合成の最初の酵素であるGCSをフィードバック制御するためGSHやオフタルミン酸の生合成は抑制されている。しかし、NAPQIなどの親電子物質や活性酸素(ROS)の解毒のためにGSHが消費されると(図2酸化状態)、フィードバック阻害が解除されること

によってGCSが活性化し、GSHおよびオフタルミン酸が生合成される。しかし、オフタルミン酸はGSHのようにSH基を有していないため、親電子物質や活性酸素とは反応せず肝細胞内に蓄積し最終的に血中に輸送される(図2)<sup>2)</sup>。血中のオフタルミン酸は、肝のGSHがどれだけ生合成されているかを示す新規マーカーであり、生合成の機序からも酸化ストレスに深く関与する物質である<sup>2)</sup>。

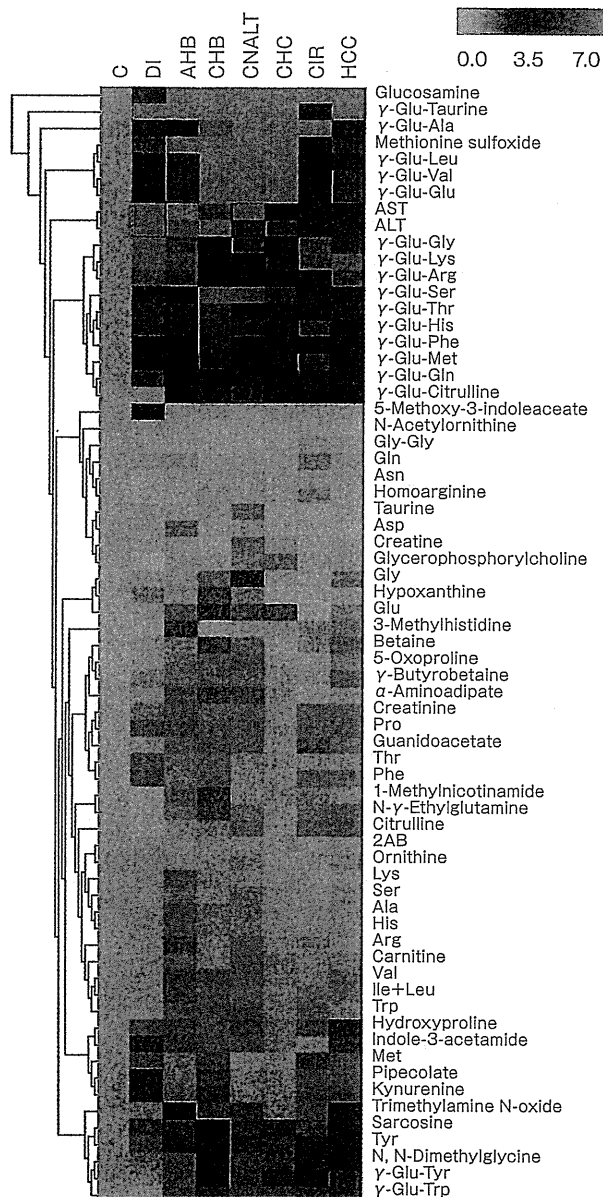
### γ-グルタミルジペプチドの発見

多くの肝疾患で肝内のGSHの低下が認められており、マウスでは、オフタルミン酸は肝のGSHの生合成量を示すマーカーであった。そこでオフタルミン酸がヒトでも有用か確認するため、山形大病院(試験コホート)および東大病院(検証コホート)で得られた各種の肝疾患患者237例(DI 27例、AHB 16例、CHB 14例、CNALT 18例、CHC 35例、CIR 18例、HCC 32例、SS 9例、NASH 11例および健康成人(C) 57例)の血清中の

低分子代謝物をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)によって網羅的に測定した<sup>3)</sup>。ヒートマップからわかるように、検出された代謝物のうち、健康成人に対し各種の肝疾患で10数種類の代謝物が高値を示した(図3)。高値を示した物質を得られた質量数情報および標準物質との比較から同定した結果、ほとんどが $\gamma$ -グルタミルジペプチドであることが判明した。またグルコサミン<sup>4)</sup>、メチオニンスルフォキシド<sup>5)</sup>といった酸化ストレスに関与する物質

やAST、ALTも肝疾患で高値を示した。マウスではAPAPによる薬剤性肝炎でオフタルミン酸が有意に増加したが、ヒトの血清からはオフタルミン酸はほとんど検出されなかった。図4に試験コホートとして用いた各肝疾患のAST、ALT値と $\gamma$ -グルタミルジペプチド、メチオニンスルフォキシド、グルコサミンの濃度の箱髭図を示した<sup>3)</sup>。AST、ALTは、DI、CHB、CHCなどで高値を示したが、B型、C型肝炎持続感染(AHB、CNALT)では、健康成人と有意な差はなかった。一方、 $\gamma$ -グルタミルジペプチドのほとんどは、健康成人よりも肝疾患で有意に高い値を示した。メチオニンスルフォキシド、グルコサミンは、CHB、CNALT、CHCなどで高値を示した。

図3 各肝疾患患者の血清中の代謝物の濃度



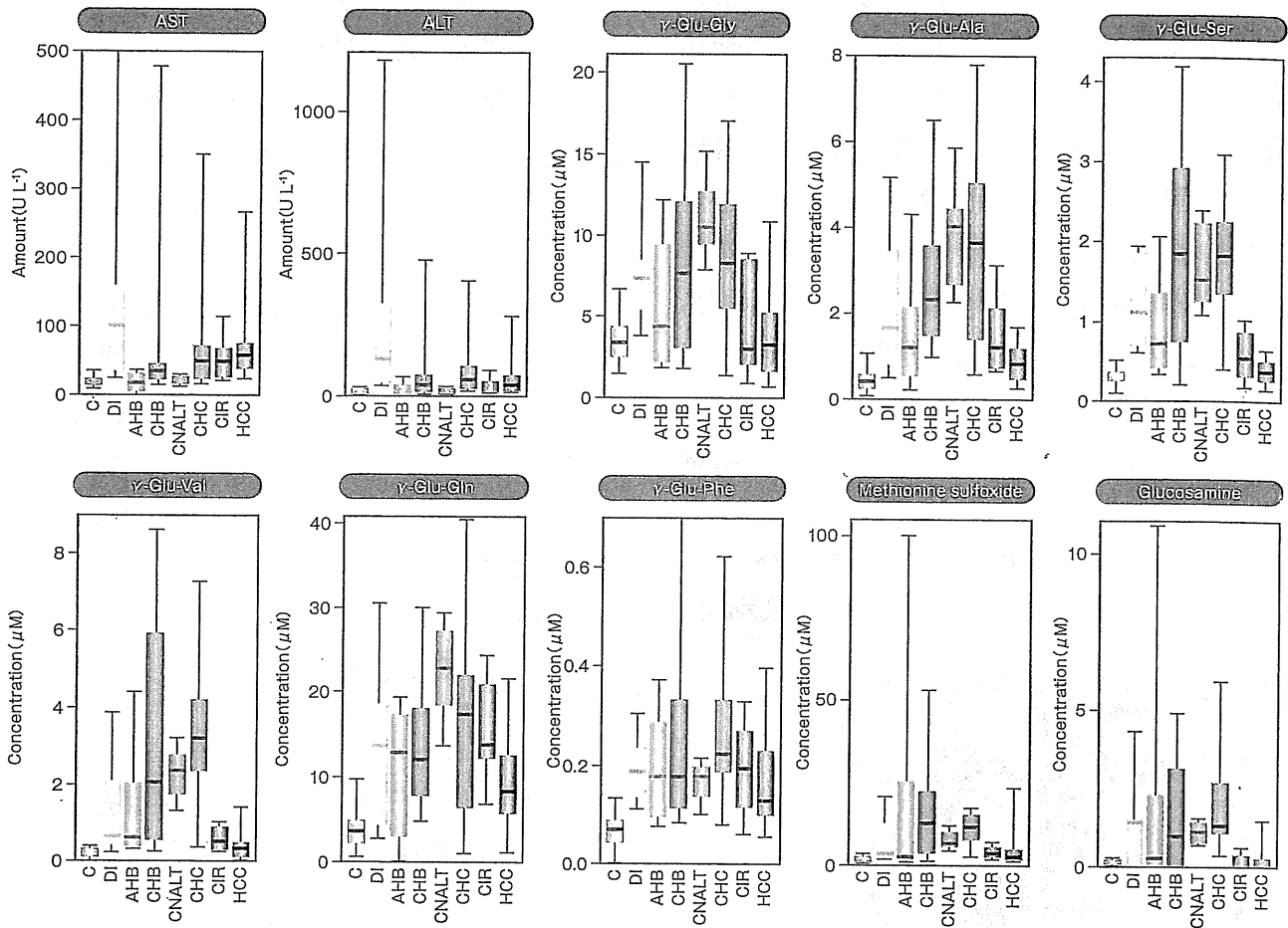
ほとんどの肝疾患で $\gamma$ -グルタミルジペプチド類が高値を示した。

### $\gamma$ -グルタミルジペプチド類による肝疾患スクリーニング

AST、ALTを含めた前述の物質は、肝疾患の種類に応じてそれぞれ特徴的な濃度を示した(図4)。そこで、筆者らは、幾つかの物質を組み合わせることにより、各肝疾患を判別できるのではないかと考えた。多変量解析の一つである多重ロジスティック回帰によって複数の物質を用いてある肝疾患を他の肝疾患と見分ける数理モデルを作成した(図5)。試験コホートを実線、検証コホートを点線で示した。例えば、健康成人を7種類の肝疾患患者から見分ける場合は、 $\gamma$ -Glu-Pheの値を用いると受信者動作特性曲線以下の面積(AUC)は試験コホートで0.952、検証コホートで0.967であった。C型の肝細胞がん患者をそれ以外の6種類の肝疾患患者および健康成人から見分ける場合は、4種類の $\gamma$ -グルタミルジペプチド( $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Citrulline、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Phe)の値を用いると試験コホートで0.762、検証コホートで0.803の精度で

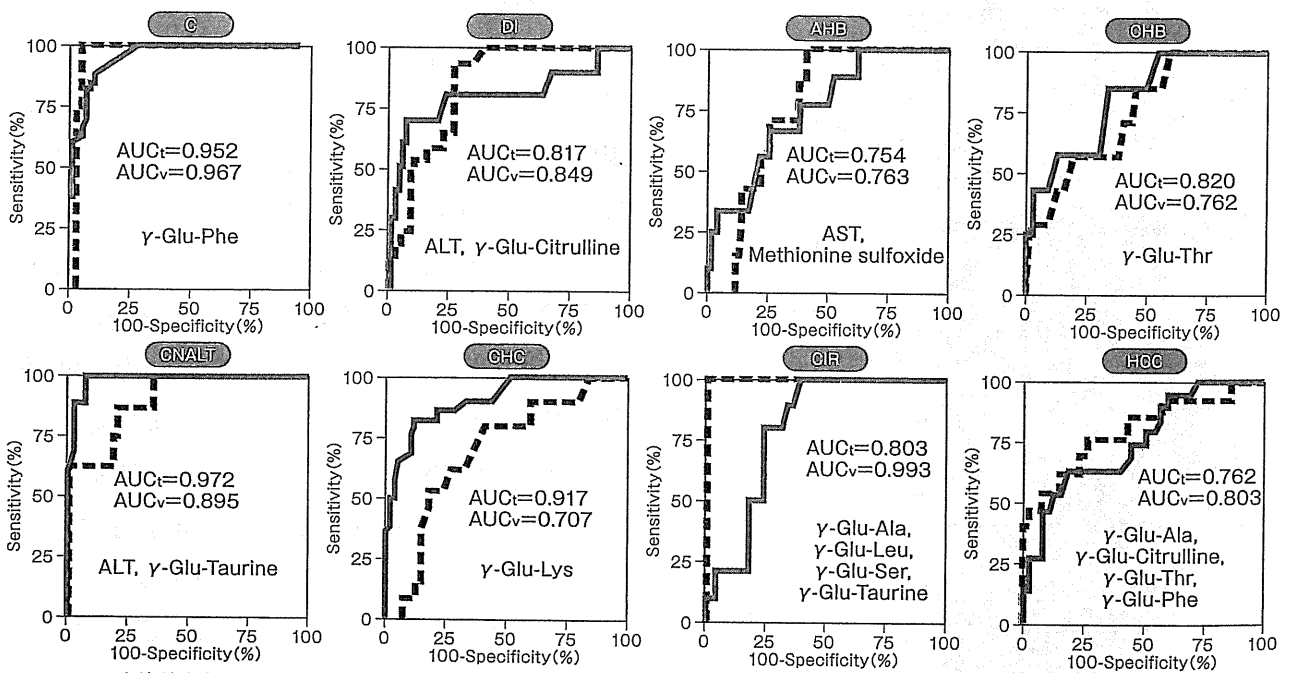


図4 各肝疾患患者の血中の肝機能マーカーとγ-グルタミルジペプチド類などの濃度



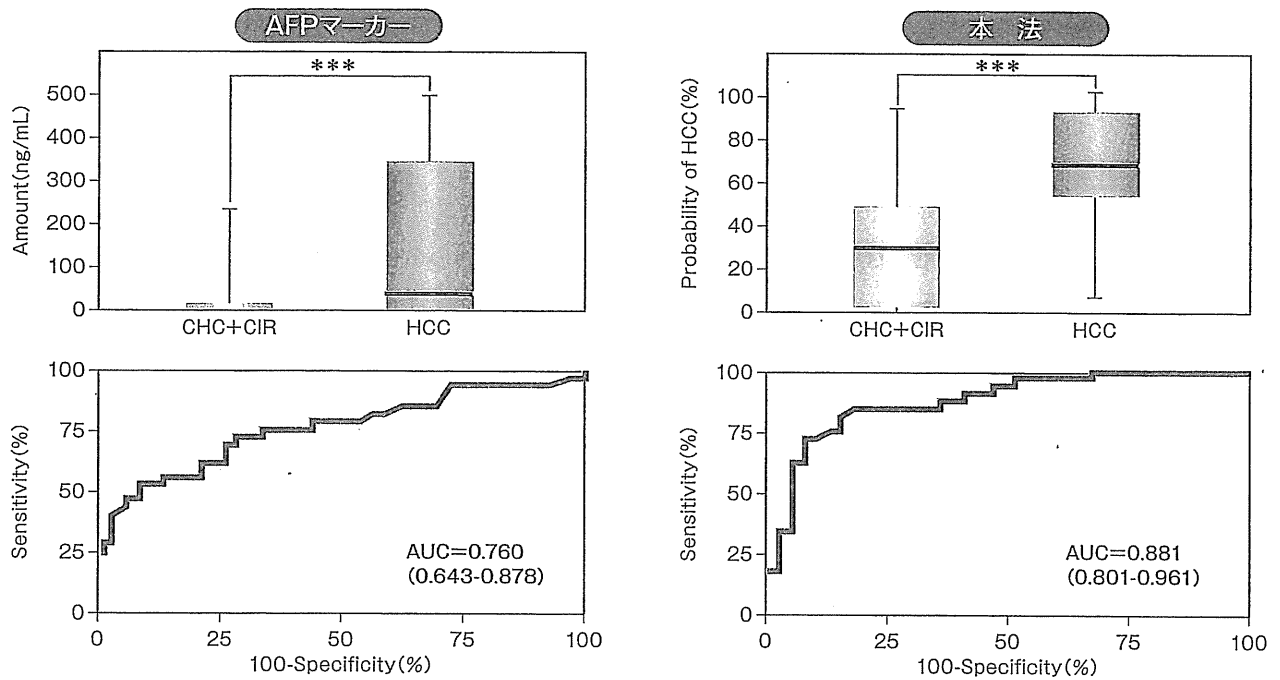
肝疾患によって、血中のγ-グルタミルジペプチド類の濃度が異なった。またγ-グルタミルジペプチド類の種類によって肝疾患に対する変動パターンが異なった。

図5 各肝疾患患者の受信者動作特性(ROC) 曲線



実線が試験コホート、点線が検証コホートのROC曲線を示した。AUC<sub>t</sub>、AUC<sub>v</sub>は、試験コホート、検証コホートの結果を示した。診断に用いたマーカーを各疾患のグラフに示した。

図6 肝細胞がんの診断精度の比較



CHC、CIRからHCCを診断する精度をAFPマーカーと比較した。本マーカー法の方が高いAUC値を示した。

あった。他の肝疾患もDI(試験コホート0.817、試験コホート0.849)、AHB(0.754、0.763)、CHBI(0.820、0.762)、CNALT(0.972、0.895)、CHC(0.917、0.707)、CIR(0.803、0.993)と高い精度で他の疾患と区別することができた<sup>3)</sup>。

次に、HCCをCHCとCIRからどのくらいの精度で見分けることができるか従来の肝がんマーカーである $\alpha$ -fetoprotein(AFP)と比較した(図6)<sup>3)</sup>。AFPではAUC値は、0.760であるのに対して、本法で見出した4種類の $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Citrulline、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Pheの値を用いると0.881の精度であり、本マーカーによる方法は、AFPよりも高い精度でHCCをCHCとCIRから見分けることができた。

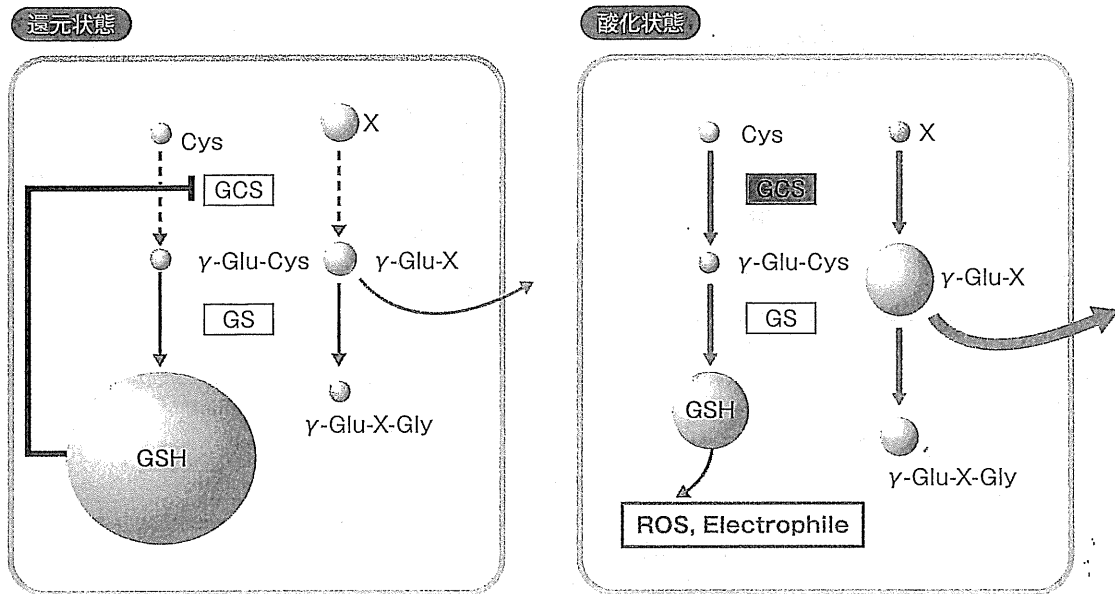
さらに $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の変動が肝疾患特異的かを検証するために胃がん患者から採取した血清を測定した。その結果、胃がん患者の $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の血中濃度は健康成人の値と同程度であることがわかった<sup>3)</sup>。GSHの生合成は肝が最も活発であるため、血中の $\gamma$ -

グルタミルジペプチドは主に肝の変化を反映していると考えられる。

### $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の生合成の機序の解明

前述のようにマウスでは、薬剤の代謝で生じた親電子物質によって消費されたGSHが新規に生合成される際に副産物として $\gamma$ -グルタミルトリペプチドであるオフタルミン酸が産生された(図2)<sup>2)</sup>。筆者らは、図7のように $\gamma$ -グルタミルジペプチド類も各種のアミノ酸やアミン(X)からGCSの触媒によって生合成されているのではないかと考えた。そこで、マウスを用いてGCSの働きを促進したり抑制したりする実験を行い $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の変動を測定し仮説を検証した。GCSの活性を阻害することが知られているブチオニンスルフォキシミン(BSO)<sup>6)</sup>をマウスに腹腔内投与し、肝の $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の濃度を測定したところ、多くの $\gamma$ -グルタミルジペ

図7 酸化ストレスでγ-グルタミルジペプチド類が生合成される機序(ヒト)



ヒトの場合は酸化ストレス下で、肝でGCSの触媒によって各種のアミノ酸やアミン(X)からγ-グルタミルジペプチド類(γ-Glu-X)が生合成され、血中に輸送されることが分かった。

チド類が著しく減少した。一方、GCSの活性を促進することが知られているジエチルマレイン酸 (DEM)<sup>7)</sup>を投与すると、多くのγ-グルタミルジペプチド類は対象群に対して数倍から10数倍増加した。これらの結果は、γ-グルタミルジペプチド類がGCSによって触媒されていることを示唆した。さらに同位体ラベル標識されたスレオニン(Thr)をマウスに腹腔内投与し、同時にAPAP投与による酸化ストレスを与えGCSの活性を亢進させたところ、スレオニン(Thr)が同位体ラベル標識されたγ-Glu-Thrが高濃度に検出された<sup>3)</sup>。以上の結果より、γ-グルタミルジペプチド類は、各種のアミノ酸やアミンを基質としてGCSの触媒によってグルタミン酸と結合してできたペプチドであることがわかった。γ-グルタミルジペプチド類は、親電子物質やROSなどの除去のためにGSHが生産されるとき副産物であり、その濃度はGSHの合成量を示唆することが明らかになった。GSHが生合成される際の副産物は、ヒトの場合はγ-グルタミルジペプチド類が多く、マウスはγ-グルタミルトリ

ペプチドのオフタルミン酸であった。この生物種間の副産物の違いの理由は不明であるが、代謝酵素やトランスポーターの濃度や活性がヒトとマウスでは異なっているのではないかと推測される。

### NASH、SS診断の可能性

γ-グルタミルジペプチド類によってSSとNASHが区別できるか可能性を検討した<sup>3)</sup>。図8に示すようにNASHに比べSSでほとんどの血清中のγ-グルタミルジペプチド類は高値を示した。γ-グルタミルジペプチド類の濃度は、SS>NASH>CIR>Cであり、γ-Glu-Val、γ-Glu-Pheなど6種類のペプチドでNASHとSS間で有意な差が見られた(図9)。試験コホートのみのデータであるが、SSに関しては、γ-Glu-Leuの値を用いるとAUC0.957の精度で、SSをNASHや健康成人を含む他の肝疾患と見分けることができた。NASHは、γ-Glu-Thr、AST、ALTの値を用いると0.971の精度で、SSや健康成人を含む他の

図8 SSとNASH患者の血清中の $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の濃度の比較

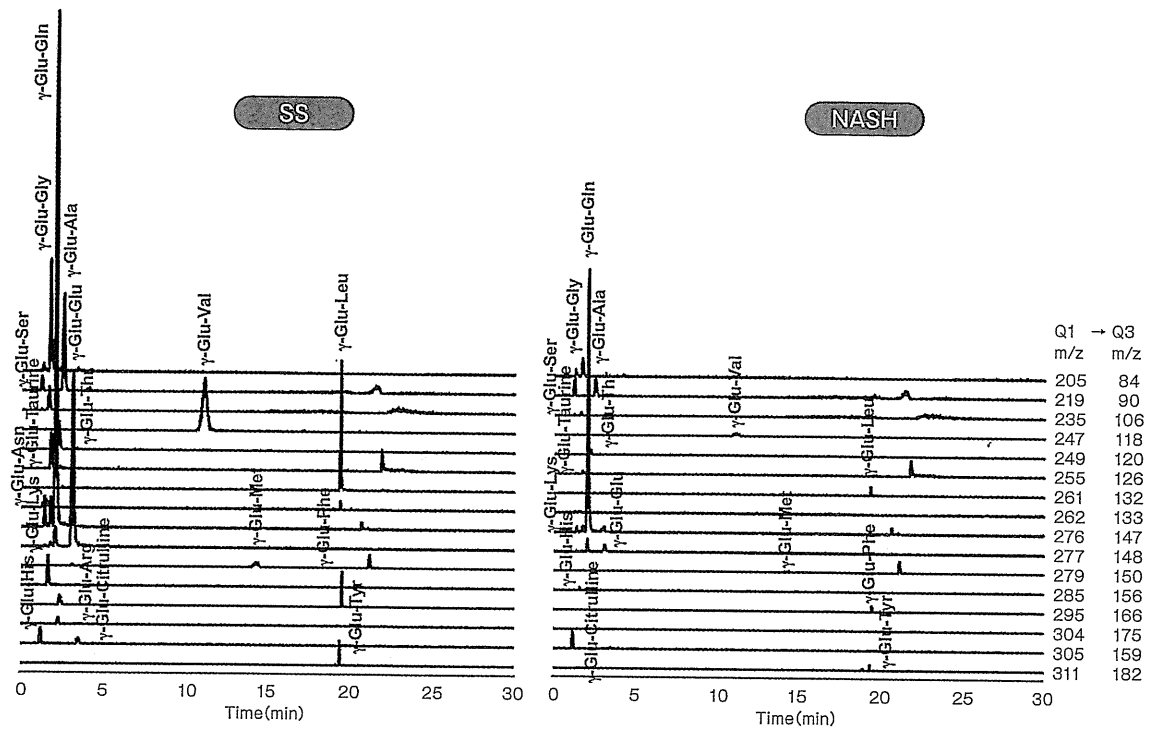
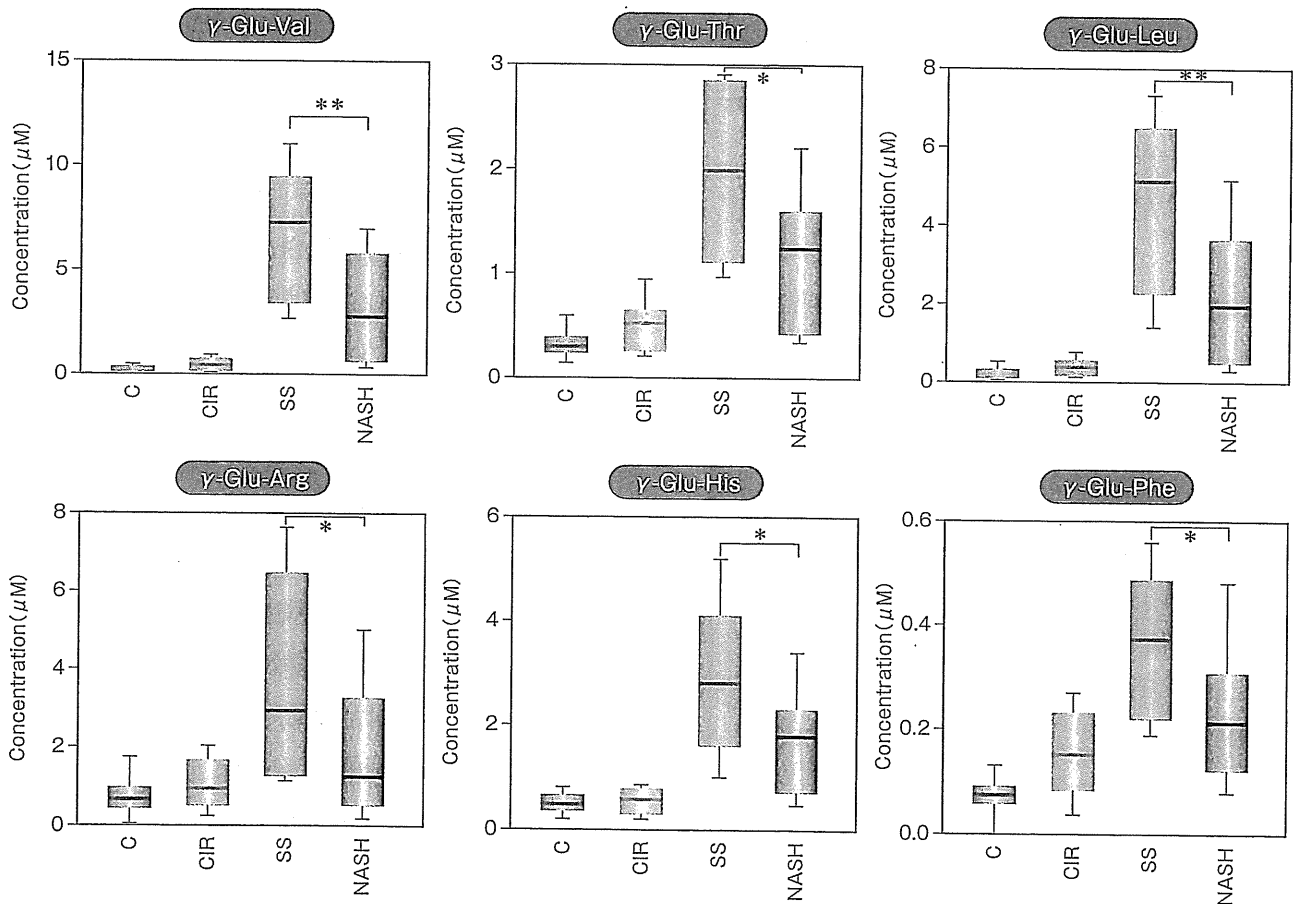


図9 健康成人とCIR、SS、NASH患者の血清中の $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の濃度の比較



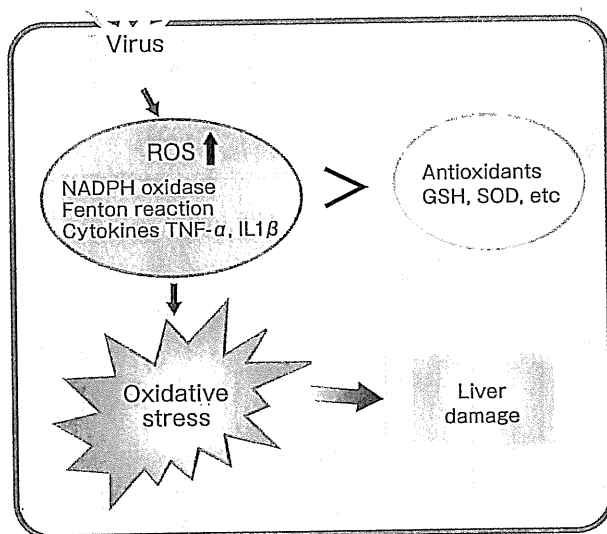
肝疾患と見分けることができた。しかしSS9例、NASH11例と症例が少ないため、今後さらに多くの検体の測定を行い、このマーカーによる診断法の精度を検証することが必要である。

### GSH生合成と肝疾患

酸化ストレスが肝疾患に密接に関与していることは広く知られている。酸化ストレスに対する生体の抗酸化物質としては、GSH、チオレドキシン、ビタミンC、ビタミンEなど、ROSの消去系酵素としては、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)などがある。GSHは肝に高濃度(mMレベル)で存在する物質であり、親電子物質に電子を与えて安定化する。また、GPxは、GSHを用いて過酸化水素を水と酸素に分解したり、過酸化脂質を還元したりして無毒化する。このようにGSHは、抗酸化物質として様々な役割を担っており、実際にウイルス性の肝疾患などでは炎症や線維化の進行、発がんなどに伴い、肝臓内および血中のGSHが減少することが報告されている<sup>8)</sup>。

今回筆者らが見出した $\gamma$ -グルタミルジペプチド

図10 ウイルス性肝疾患の発症機序



類は、グルタチオンの生合成量を示すマーカーであった。図4で示したように、肝機能マーカーであるASTとALTは、B型とC型肝炎ウイルス持続感染者であるAHBとCNALTでは健康成人と同等の値を示すが、 $\gamma$ -グルタミルジペプチド類は高値を示した。HCV感染者で $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の値を比較するとCNALT>CHC>CIR>HCCであり、疾患の進行に伴い $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の値は減少した。このことはGSHの生合成量が疾患の進行とともに減少していることを示唆する。

ウイルス感染によって好中球やマクロファージのNADPHオキシダーゼやキサンチンオキシダーゼなどによってROSが産生されることが知られている。しかしCNALTでは $\gamma$ -グルタミルジペプチド類は高地であり、GSHが十分に生合成されてROSを消去しているため明らかな症状が出ないのではないかと思われる。しかしCHC、CIR、HCCとGSHの生合成量が減少するにつれ、生体の抗酸化システムでは消去できないROSが産生され、酸化ストレスが増幅して疾患が進行するのかもしれない(図10)。非アルコール性脂肪肝疾患でも $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の値は、SS>NASHであり、CIRの値はNASHよりもさらに低値を示した(図9)。この結果はC型肝炎ウイルスの肝疾患と同様に、疾患の進行に伴ってGSHの合成量が減少していることを示唆した。

疾患の進行とともに $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の値が減少する傾向は、GSHの生合成量が減少することを示す。GSHの生合成量が減少したことが原因で酸化ストレスが増大することによって疾患が進行していると解釈するか、あるいは反対に、肝機能が低下することによってGSHの合成量が低下した結果を $\gamma$ -グルタミルジペプチド類の値が反映したものであるかは明らかではない。今度の検討課題である。

## おわりに

筆者らが発見した $\gamma$ -グルタミルジペプチド類は、GSHの生合成を示すマーカーであり血中の1個から数個の $\gamma$ -グルタミルジペプチドあるいはメチオニンスルフォキシドやAST、ALTの値と組み合わせることで、ウイルス性、薬剤性、非アルコール性などの肝疾患患者の種類と進行度を高い精度でスクリーニングできることがわかった。またGSHの生合成量がそれぞれの疾患によって異なっており、GSHの生合成量が肝疾患の発症、進行などに重要な影響を与えている可能性を示した。今後さらに多くの検体を測定して、本法による肝疾患スクリーニング法の有用性を検証したい。

## 〈文献〉

- 1) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y et al : Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *J Proteome Res* 2 : 488-494, 2003.
- 2) Soga T, Baran R, Suematsu M et al : Differential Metabolomics Reveals Ophthalmic Acid As An Oxidative Stress Biomarker Indicating Hepatic Glutathione Consumption. *J Biol Chem* 281 : 16768-16776, 2006.
- 3) Soga T, Sugimoto M, Honma M et al : Serum Metabolomics Reveals  $\gamma$ -glutamyl Dipeptides as Biomarkers for Differentiation among Different Forms of Liver Disease. *J Hepatol*, in press.
- 4) Kaneto H, Xu G, Song KH et al : Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 276 : 31099-31104, 2001.
- 5) Babior BM : Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109 : 33-44, 2000.
- 6) Griffith OW, Meister A : Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine(S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 : 7558-7560, 1979.
- 7) Zalups RK, Lash LH : Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury. *Drug Metab Dispos* 25 : 516-523, 1997.
- 8) Tanyalcin T, Taskiran D, Topalak O et al : The effects of chronic hepatitis C and B virus infections on liver reduced and oxidized glutathione concentrations. *Hepatol Res* 18 : 104-109, 2000.

\* \* \*

