

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

親水性代謝物マーカー探索・検証のための非臨床動物における試料背景および食餌条件等  
に関する要件の検討

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 斎藤 嘉朗  
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齊藤 公亮  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子

研究要旨：

血液試料に関し、バイオマーカーの評価要件案の作成を最終目的として、非臨床試験に用いられるラットを用いて、血清中における親水性内在性代謝物濃度への試料背景（年齢差、性差）及び食餌条件や採血時間（絶食の有無、採血時間、絶食時間）の影響を明らかにした。314 種の親水性内因性代謝物（アミノ酸・糖・小分子脂質・核酸・ビタミン・補因子等代謝物）をメタボローム解析を用いて定量した。試料背景間の差異に関しては、有意な性差を示す代謝物数が年齢差の場合より多く、特に老齢において性差を示す代謝物数は、測定可能代謝物数の約半数に及んだ。カルニチンとアシルカルニチンが年齢によらず共通して性差を示し、チロシンとウラシルが性別によらず共通して年齢差を示した。また、ラットにおける試料背景差を昨年度明らかにしたヒトにおける結果と比較したところ、測定可能代謝物の約 1/3 である 100 以上の代謝物がヒト・ラットのいずれかのみで検出され、共通して測定された代謝物数は 187 であった。一方、ヒト・ラット間で共通して性差または年齢差が認められた代謝物は、ほとんど存在しなかった。さらに、食餌条件・採血時間に関しては、食餌の有無により有意な差を示す代謝物数が最も多く、次いで採血時間による差異であり、絶食時間による差異はほとんど認められなかった。炎症性メディエーターは絶食によって増加し、糖類等の食餌由来代謝物は絶食によって減少した。また採血時間（午前・午後）では、アミノ酸類の有意なレベル相違が見られた。

以上の結果から、親水性内在性代謝物を非臨床試験においてバイオマーカーとして探索する際には、1) ヒトと同様に試料背景間差が交絡因子となりうること、2) ヒトにおいて検出可能な代謝物を選択すること、3) ラットにおける性差・年齢差はヒトへ外挿する場合に考慮する必要が低いこと、4) 食餌の有無（特に炎症性メディエーターを対象とする場合）や採血時間（特に、アミノ酸類の場合）を統一すべきこと、が示唆され、非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿性に関するガイドライン作成に有用な成果を得ることができた。また、ヒトとラット間で共通して測定された 187 代謝物の情報は、非臨床試験で見いだされたバイオマーカー候補を、ヒト臨床試験で外挿する場合の、非臨床段階における候補選定に活用できる。

A. 研究目的：

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標（エンドポイント）を、早期に、簡便に、かつ頑健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。医薬品の有効性および安全性の指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数はこの 10 年間で約 30 倍に増加している。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、その適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的にもない。

バイオマーカー測定用試料としては、低侵襲的

に採取でき、臨床現場に多用される血液及び尿が汎用される。実際、血中ビリルビン、AST、ALT、 $\gamma$ -GTP などは、薬物性肝障害の診断バイオマーカーとして、また、尿中 NAG、 $\beta_2$  ミクログロビン、L-FABP などは腎障害の診断バイオマーカーとして臨床で用いられている。

バイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。しかし、血液中からバイオマーカーを探索・検証する際に適用しうるガイドラインは存在しない。本研究は、バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、血中親水性代謝物に関し、特に問題となる測定用試料

の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿、に関する評価要件案の作成を最終目標とする。

平成 24 年度は、親水性代謝物についてヒト血液試料を用いて検討した。測定可能であった 297 代謝物のうち、血漿・血清間において 100 以上の代謝物が有意に異なること、血清よりも血漿の方が凍結融解による影響を受けやすいことを明らかにした。このことから、親水性代謝物測定には、マトリックスとして血清が適していることが示唆された。また、親水性代謝物における性差・年齢差、及び同一群内変動についても明らかにし、これらの試料間変動を受けにくい 124 代謝物を見出した。

一方、医薬品の有効性・安全性に関する非臨床試験では、ラット等の実験動物が用いられており、有効性・安全性に関するバイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、実験動物における親水性代謝物についての基礎データも求められている。また、一部の内在性代謝物レベルについて食事影響等が報告されている。そこで、本研究では、ラット血液試料(血清)に関し、1) 親水性代謝物の試料背景差(性差・年齢差)を明らかにすること、2) 親水性代謝物レベルにおける食事影響を明らかにすること、を目的とし、各検体群間における血中代謝物レベルの差異をメタボローム解析を用いて網羅的に明らかにした。

## B. 研究方法：

### (1) 血液の採取と血清の調製

Sprague-Dawley ラットは日本チャールズリバー(神奈川、日本)から 8 週齢の雄・雌を購入した。ラットは 10 匹ずつ雄 5 群、雌 2 群に分け、雄 4 群(群 1、群 5-7)、雌 1 群(群 2)は 10 週齢(若齢)、雄 1 群(群 3)、雌 1 群(群 4)は 30 週齢(老齢)まで飼育した。群 1-4 は午後 6 時より 16 時間の絶食(水のみ可)下、群 5 は非絶食下、群 6 は午後 0 時より 22 時間の絶食下、午前 10 時に採血し、群 7 は午後 6 時より 22 時間の絶食下、午後 4 時に採血した。血液試料は 2 時間以内に血清を分取して、直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。本研究に用いた検体の情報を表 1 に示した。試料は、委託先であるメタボロン社での親水性メタボローム解析に供した。

### (2) 抽出・測定

メタボロン社に受け取られた検体は抽出まで凍結して保存された。測定試料はメタボロン社標準手法によって抽出され、液体クロマトグラフィー・リニアイオントラップ型質量分析計及びガスクロマトグラフ・四重極リニアイオントラップ型質

量分析計によって解析された。アミノ酸及びその代謝物 86 化合物、ペプチド 17 化合物、糖及びその代謝物 15 化合物、エネルギー関連代謝物 8 化合物、小分子脂質及びその代謝物 158 化合物、核酸及びその代謝物 16 化合物、補因子・ビタミン及びその代謝物 14 化合物、計 314 化合物が測定可能であった(表 2)。

### (3) データ解析

液体クロマトグラフィー・リニアイオントラップ型質量分析計及びガスクロマトグラフ・四重極リニアイオントラップ型質量分析計により得られたデータは、メタボロン社ライブラリーに基づき、代謝物の同定を行った。同定した代謝物は性質により大分類(アミノ酸・脂質等)、及び細かい性質と代謝経路により小分類(アラニン・アスパラギン酸代謝等)により分類した。親水性代謝物のレベルはイオンピーク値により定量を行い、日間による測定値の変動を補正した。測定限界以下の代謝物のレベルは、全検体中で測定可能であった最低値を代入し統計解析を行った。各検体群間の親水性代謝物のレベル違いにつき、Welch's t-tests による統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意な差と判定した。全検体間における親水性代謝物の包括的比較は OPLS-DA モデル(SIMICA Pt, Umetrics, Umea, Sweden)を用いて行った。

### (倫理面での配慮)

本研究における動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚労省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会に研究計画書を申請し、承認を得ている。

## C. 研究結果：

### 1) 試料背景間(群 1-4)における親水性代謝物レベルの包括的比較

OPLS-DA モデルによって、試料背景間の親水性代謝物を包括的に比較したところ、性差(特に老齢)が第 1 主成分として分離され、次いで年齢差が第 2 主成分として分離された(図 1)。全 314 代謝物のうち、性別間において有意差を示したものは 10 (若齢) および 30 週齢(老齢)においてそれぞれ 119 及び 154 代謝物であった(表 3)。このうち 77 代謝物(65 及び 50%) が共通していた。一方、年齢間において有意差を示したものは雄および雌においてそれぞれ 109 及び 93 代謝物であった。このうち 38 代謝物(35 及び 41%) が共通していた。また、30 週齢における性差では、雌で高いレベルを示す代謝物が多く、雄における年齢差では、10 週齢で高いレベルを示す代謝物が多かった。

2) 親水性代謝物レベルの性差(群 1 vs 群 2、群 3 vs 群 4)

脂質代謝に関わるカルニチン及びアシルカルニチンについて 10 および 30 週齢共に性差が認められた。カルニチン及び短鎖脂肪酸-カルニチンは雄で有意に高いレベルを示し、長鎖脂肪酸-カルニチンは雌で有意に高いレベルを示した。一方、遊離脂肪酸(ステアリン酸、オレイン酸)は 30 週齢のみ雌で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は若齢で 10 種、老齢で 15 種であった。

3) 親水性代謝物レベルの年齢差(群 1 vs 群 3、群 2 vs 群 4)

ヒト老化マーカーとして報告されているアミノ酸(チロシン)及び核酸(5, 6-ジヒドロウラシル)とその関連代謝物が雄雌共に年齢差が認められた。チロシン及びN-アセチルチロシン、ウラシル、5, 6-ジヒドロウラシルは 10 週齢で有意に高いレベルを示した。一方、遊離脂肪酸(パルミチン酸、パルミトオレイン酸)は雌のみ 30 週齢で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は雄で 26 種、雌で 3 種であった。

4) ラットにおける試料背景差とヒトにおける試料背景差の比較

次に、非臨床動物からヒトへの外挿性に関する知見を得るために、今回明らかにしたラットにおける親水性代謝物レベルの性差・年齢差と平成 24 年度に行ったヒトにおける結果を比較した。測定代謝物はヒト及びラットにおいてそれぞれ 297 及び 314 代謝物であり、うち 187 代謝物が共通していた。共通して測定可能であった 187 代謝物のうち、ヒト・ラット間で共通して性差が認められた代謝物は 11 代謝物であった。一方、共通して年齢差が認められた代謝物は 2 代謝物のみであった。一方、ヒトとラットで、性差および年齢差の両方が認められなかった代謝物の中、共通する代謝物数は、20 であった。

5) 食餌条件(群 1、5-7)における親水性代謝物レベルの包括的比較

OPLS-DA モデルによって、異なる食餌条件下の親水性代謝物を包括的に比較したところ、食餌の有無が第 1 主成分として分離され、次いで採血時間差が第 2 主成分として分離された(図 2)。一方絶食時間差(16 時間及び 22 時間)は主成分として分離されなかった。全 314 代謝物のうち、食餌の有無において有意差を示したものは 156 代謝物であった(表 4)。これらのうち 90 代謝物は絶食に

よって有意に増加し、69 代謝物は絶食によって有意に減少した。一方、異なる採血時間において有意差を示したものは 47 代謝物であった。これらのうち 23 代謝物が午前採血で有意に高いレベルを示し、24 代謝物が午後採血で有意に高いレベルを示した。

6) 食餌の有無間における親水性代謝物レベルの比較(群 1 vs 群 5)

遊離脂肪酸(ステアリン酸)及び炎症性メディエーター(12, 13-ジヒドロキシオクタデセノイン酸(12, 13-DiHOME)、コルチコステロン等)が絶食によって高いレベルを示した。一方、食事由来代謝物(ブドウ糖、フルクトース等)が絶食によって低いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は 38 種であった。

7) 親水性代謝物レベルの採血時間差(群 6 vs 群 7)

異なる採血時間において有意差を示した 47 代謝物のうち 21 代謝物がアミノ酸及びその代謝物であった。これらのうち、ロイシン、ジメチルアルギニン等が午前採血で、セリン、スレオニン等が午後採血で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は 1 種であった。

#### D. 考察:

1) ラットにおける親水性代謝物の試料背景差(性差・年齢差)

今回の試料背景間の比較において、有意にレベルの異なる親水性代謝物数は、性差の場合の方が年齢差よりも多く、30 週齢における性差が最も顕著であった。ラットの系統及び飼育条件は同様であるにも関わらず、性差・年齢差が認められる代謝物は約 100 代謝物にわたり、親水性代謝物から非臨床試験におけるバイオマーカーを探索する場合において、性差・年齢差が交絡因子となることが考えられた。

カルニチン及びアシルカルニチンの性差については、10 週齢及び 30 週齢において共通して認められた。カルニチン及び短鎖脂肪酸-カルニチンは雄で高く、長鎖脂肪酸-カルニチンは雌で高いレベルを示した。これらの差異をもたらす生物学的背景として、カルニチンは脂肪酸のβ酸化に関与することから、脂質代謝における性差の関与が考えられた。

遊離脂肪酸に関しては、30 週齢のみで性差が認められ、雌において高いレベルを示した。また、遊離脂肪酸は雌のみで年齢差が認められ、30 週齢において高いレベルを示した。一方、10 週齢から

30 週齢における体重増加は、雄で大きく (65%増)、雌で小さかった (33%増)。遊離脂肪酸は脂肪組織に取り込まれて、中性脂質として蓄積することから、脂肪組織における脂肪酸の取り込みに性差が存在し、体重増加や血中遊離脂肪酸レベルに影響を与えていることが考えられた。

## 2) ラットにおける試料背景差とヒトにおける試料背景差の比較

今回測定した代謝物のうち、3 分の 1 の代謝物に関しては同様の測定系にも関わらず、ヒトでは測定できなかった代謝物であった。このことから、同様の系を用いた場合においても、ヒトと実験動物間において測定可能な親水性代謝物が一部異なることが考えられる。したがって、非臨床動物を用いたバイオマーカー探索においては、ヒトで測定可能な代謝物を選択する必要があると考えられた。また、今回明らかにしたラットにおける試料背景差のうち、ヒトにおいて試料背景差が共通して認められた親水性代謝物は非常に限られていた。このことから、少なくともラットにおける性差・年齢差はバイオマーカー探索時に考慮する必要性は低いと考えられた。

## 3) 親水性代謝物レベルにおける食餌の有無・採血時間・絶食時間の影響

今回の親水性代謝物に対する食事影響の検討において、食餌の有無による差異が最も大きく、次いで採血時間による差異であり、絶食時間の長さに関してはほとんど認められなかった。このことから、親水性代謝物から非臨床試験におけるバイオマーカーを探索する場合において、食餌の有無は大きな交絡因子となることが考えられた。次に、親水性代謝物を対象とする場合には、採血時間についても注意する必要があることが考えられた。一方、本研究から、一定期間以上 (本研究では 16 時間) の絶食については、絶食時間の長さを考慮する必要は低いと考えられた。ヒトにおいては肉食・菜食等、個人間において食事の趣向もあることから、食餌の有無による差異はさらに大きくなる可能性があり、今後はヒトにおける食餌の有無による差異を検討する必要があると考えられた。

絶食によって食事由来代謝物が低いレベルを示す一方で、遊離脂肪酸及び炎症性メディエーターが高いレベルを示した。このことから、絶食による脂肪酸  $\beta$  酸化の活性化やストレスが、それぞれ血中の遊離脂肪酸及び炎症性メディエーターのレベルを増加させていると考えられた。これまでに、コルチコステロンが鬱病のバイオマーカーとして報告されているように、炎症性メディエーターは疾患等のバイオマーカーとして有力視さ

れている。しかしながら、本研究から、これらの炎症性メディエーターをバイオマーカーとして用いる際には絶食による影響を考慮する必要があると考えられた。

今後は、

- 1) 親水性代謝物の人種差に関するデータ収集 (白人・黒人・日本人)
- 2) 肝障害ラットモデル試料を用いた副作用バイオマーカー探索
- 3) 肝障害ヒト試料を用いた副作用バイオマーカー探索
- 4) ガイドライン案の作成を行う予定である。

## E. 結論

バイオマーカー測定用試料 (血清) に関し、ラット試料を対象にメタボローム解析を行い、性差・年齢差及び食事影響下において、異なるレベルを示す内在性代謝物を明らかにした。非臨床における親水性代謝物からのバイオマーカー探索に際しては、ヒトと同様に試料背景差が交絡因子となりうることが示唆された。特に 2 倍以上の差を示す代謝物については注意を要する。また、非臨床試験における知見はヒトへの外挿性が重要となるが、注意すべき点として、1) ヒトにおいて測定可能な代謝物を選択すること、2) ラットにおける性差・年齢差は考慮する必要が低いこと、が示唆された。特に、ヒトとラット間で共通して測定された 187 代謝物の情報は、非臨床試験で見いだされたバイオマーカー候補を、ヒト臨床試験で外挿する場合に有用であり、さらに性差や年齢差をヒトとラットで共通して示さない 20 種の代謝物は特に有用な分子である。また、親水性代謝物に関しては食事の有無、次いで採血時間が血中代謝物レベルの変動に寄与することが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表：

### 1. 論文発表

- 1) 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 131, 20-24. 2013.
- 2) 斎藤嘉朗, 佐井君江, 鹿庭なほ子, 田島陽子, 石川将己, 最上 (西巻) 知子, 前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて. *薬学雑誌*, 133: 1373-1379, 2013.

- 3) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*, 10 : 402–413, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the metabolite profiles between plasma and serum, ages or sexes, and their inter-individual variations in human subjects. 10th international ISSX meeting (2013. 10、カナダ・トロント市)
- 2) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the hydrophilic metabolite profiles between plasma and serum in human subject. 28th JSSX meeting (2013. 10、東京)
- 3) 石川将己、前川京子、齊藤公亮、浦田政世、田島陽子、村山真由子、妹尾勇弥、熊谷雄治、斎藤嘉朗: ラット血清中の内因性代謝物レベルの雌雄差に関する網羅的検討。第134回日本薬学会年会 (2014. 03、熊本)

## H. 知的財産権の出願・登録状況:

### 1. 特許出願

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1 本研究に用いたラット情報と検体の種類

検体群	1	2	3	4	5	6	7
検体数	10	10	10	10	10	10	10
性	雄	雌	雄	雌	雄	雄	雄
週齢	10	10	30	30	10	10	10
体重	349±21 g	228±15 g	578±37 g	305±24 g	406±27 g	362±33 g	348±13 g
絶食	16時間	16時間	16時間	16時間	なし	22時間	22時間
採血	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午後4時

表2 測定した親水性代謝物の大分類と主な代謝物

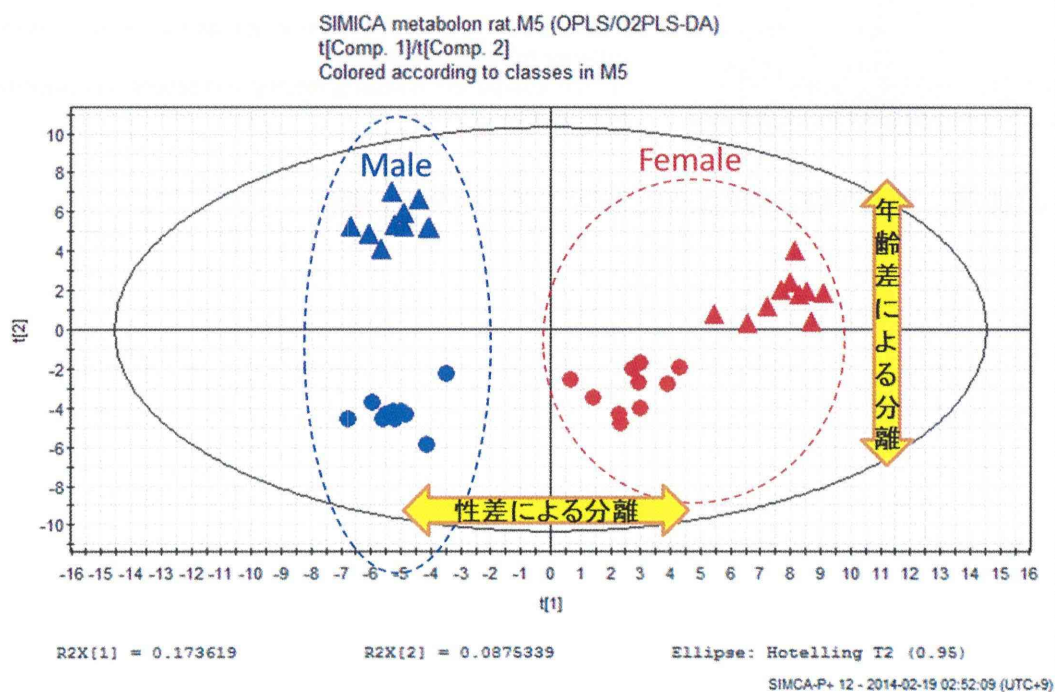
大分類	代謝物数	主な代謝物
アミノ酸	86	グリシン・セリン・スレオニン・グルタミン酸・アルギニン・3-メチルヒスチジン・ピログルタミン・シトルリン
ペプチド	17	ブラジキニン・フェニルアラニルフェニルアラニン
糖	15	ピルビン酸・乳酸・ブドウ糖
エネルギー	8	クエン酸・リン酸・マレイン酸
脂質	158	2-パルミトイルグリセロール・1-アラキドニルグリセロール・グリコール酸・デオキシコール酸・ミリストレイン酸・リノレン酸・ミリスチン酸・パルミトオレイン酸
核酸	16	イノシン・キサンチン・ウラシル
補因子・ビタミン	14	ビリルビン・ビリベジン・ヘム

表3 試料背景差（性差・年齢差）により異なるレベルを示した代謝物のまとめ

Statistical Comparisons				
	Gender comparison		Age comparison	
	Young	Old	Male	Female
Number of statistically different levels of metabolites P < 0.05	119	154	109	93
Direction of differences and metabolite numbers	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Young / ↑ in Old	↑ in Young / ↑ in Old
	73/46	48/106	93/16	36/57
Common	38・39 (Male・Female)		29・9 (Young・Old)	

表 4 食餌の有無、採血時間、絶食時間により異なるレベルを示した代謝物のまとめ

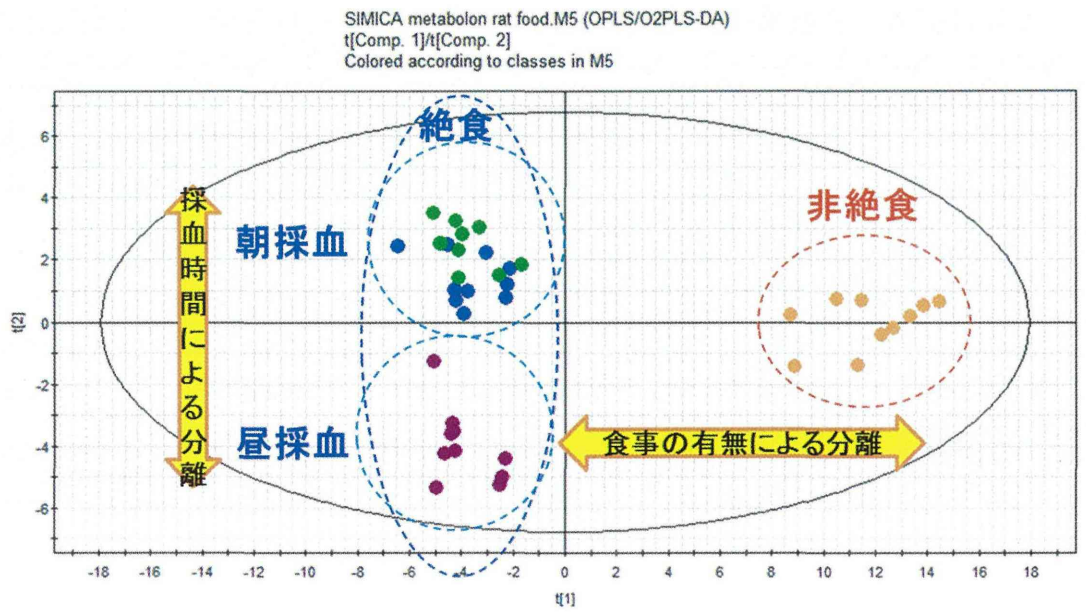
Statistical Comparisons				
	食事の有無 (vs fed)		採血時間 (22 hr AM vs 22 hr PM)	絶食時間 (16 hr AM vs 22 hr AM)
	16 hr AM	22 hr AM		
Number of statistically different levels of metabolites P < 0.05	156	163	47	4
Direction of differences and metabolite numbers	90 (↑ by fasting)	96 (↑ by fasting)	23 (AMで↑)	2 (16 hrで↑)
	69 (↓ by fasting)	73 (↓ by fasting)	24 (PMで↑)	2 (22 hrで↑)



	Male	Female
Young	●	●
Old	▲	▲

All data of 314 biochemicals from all groups were loaded into SIMCA-P+ software to create OPLS-DA plot.  
Primary component is gender difference, and secondary component is age difference.

図 1 試料背景差（性差・年齢差）に関する OPLS-DA 解析



R2X[1] = 0.249435

R2X[2] = 0.0378985

Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCA-P+ 12 - 2014-02-21 04:19:41 (UTC+9)

Group	symbol	Fasting	Sampling
1	●	16 hr	10 am
5	●	No	10 am
6	●	22 hr	10 am
7	●	22 hr	4 pm

All data of 314 biochemicals from all groups were loaded into SIMCA-P+ software to create OPLS-plot.  
 Primary component is fasting/feeding, and secondary component is time of sample collection.

図 2 食餌の有無、採血時間、絶食時間に関する OPLS-DA 解析



平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

疎水性代謝物マーカー探索・検証のための非臨床動物における試料背景および食餌条件等  
に関する要件の検討

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子  
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齊藤 公亮

研究要旨：

非臨床試験で多用されるラット血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化し、その成果をバイオマーカーの適格性確認ガイドライン等の一部として利用することを目的として、内在性代謝物濃度への試料採取条件（雌雄差、週齢差、食事の有無、採血時間）の影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。

10 週齢及び 30 週齢の Sprague-Dawley 雄性・雌性ラット（各群 10-13 匹）を非絶食下もしくは 16 時間または 22 時間絶食下で、午前 10 時もしくは午後 4 時に腹大動脈より採血し、常法に従って EDTA 血漿を採取した。血漿は採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80℃ に保存し、1 回融解して、分注操作を行った後、再度凍結し、2 回目に融解した検体を測定用試料とした。抽出操作の後、高速液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS/MS）を用いて網羅的に測定した。269 種の脂質代謝物を同定し、そのレベルを、雌雄間、および週齢（10 週齢・30 週齢）間、食事の有無（非絶食、16 時間絶食、22 時間絶食）、採血時間（午前採血・午後採血）で比較した。雌雄間、および若齢・老齢間では、比較 2 群間で総同定代謝物のそれぞれ 42% 及び 29% の代謝物が有意に異なるレベルを示した。絶食群と非絶食群間では総同定代謝物の 69% が有意に変動した。採血時間により、そのレベルが影響をうける分子種は 6% であった。昨年度実施したヒト血漿で性差・年齢差を示した代謝物との比較において、ラットからヒトへの外挿性が認められる代謝物が存在した。以上より、非臨床のバイオマーカー探索・検証時において、一部の代謝物に関し、雌雄・週齢差は考慮すべき要件であること、バイオマーカー候補としてはラットとヒトで外挿性が認められる代謝物が望ましいこと、が示唆された。

A. 研究目的：

バイオマーカー（BM）は、「客観的に測定され、評価される特性値であり、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（参考文献 1）、医薬品開発の効率化、及び医薬品の適正使用に資するとして、その非臨床・臨床試験での使用が注目されている。特に、非臨床試験段階で、予測性高く、医薬品候補化合物等の安全性等を適切に評価できる BM は、非臨床段階での「Stop or Go」決定を可能とするとともに、企業に莫大な損害をもたらす臨床試験における開発中止は阻止できることから、その開発が強く望まれる。一方で、BM の適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的にもない。BM の探索・検証・利用を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。

BM 測定用試料としては、低侵襲的に採取でき、臨床現場に多用される血液及び尿が汎用される。

実際、血中ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、 $\gamma$ -GTP などは、薬物性肝障害の診断 BM として、また、血清中クレアチニン・血中尿素窒素は腎障害の診断 BM として臨床・非臨床で用いられているが、特異度・感度は十分ではない。また、近年、FDA、EMA 及び PMDA において、非臨床試験でのラットの急性腎障害を検出するための BM として尿中腎障害分子（Kim-1）、尿中クラスタリン、尿中アルブミン、尿中 Trefoil factor-3（TFF3）、尿中シスタチン C、尿中  $\beta$ 2-マイクログロブリン、尿中総タンパクの適格性が確認され、既存の BM と併用した使用であることを前提とすれば、付加的な情報を与える BM として受け入れ可能であることが示された。これらは、蛋白質 BM であるが、ゲノムを出発点とするオミックスの視点に基づきプロテオームの下流にあるメタボローム（内在性代謝物の総体）は、より表現型の発現に寄与しており、内在性代謝物は有用な BM として今後の開発が期待される。

一方で、診断に多用される血液や尿では、マーカー候補となる蛋白質や内在性代謝物レベルの一部に性差、年齢差、食事影響、日内変動等が報告されており、測定結果への影響が懸念されている。これらの影響を網羅的に明らかにし、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化することは、BMの利用促進を通して、新薬の効果的創出につながると期待できる。本研究では、非臨床で多用されるラット血液試料の採取に関する必要要件を明確化することを目的として、内在性代謝物濃度への試料採取条件（雌雄差、週齢差、食事影響、採血時間）の影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。さらに、非臨床試験から臨床試験への外挿性を検討するため、昨年度実施したヒト血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件に関する知見から得られた結果と比較した。

## B. 研究方法：

### 1) ラット血液の採取と血漿の調製

8週齢及び10週齢の雄性・雌性Cr1:CD(SD)ラットは日本チャールス・リバー株式会社(Yokohama, Japan)より購入し、それぞれ10週齢及び30週齢まで、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験施設にて馴化した。実験日前日までは、飼料(CRF1)及び水は自由摂取とした。馴化したラットは実験日前日に、非絶食群、16時間、または22時間絶食群に振り分け、午前10時(午前採血群)もしくは午後4時(午後採血群)に、イソフルラン麻酔下で腹大動脈より全採血し、常法に従ってEDTA血漿を採取した。血漿は採血後2時間以内に分取し、直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。検体は、1回融解して、分注操作を行った後、再度凍結し、2回目に融解した検体を測定用試料とした。なお、検討した要因は、雌雄、年齢、食事の有無、採血時間(午前・午後)であり、それぞれの要因の比較に用いた、全7群のラットの検体情報を表1にまとめた。

### 2) 脂質抽出・メタボローム測定

ラット血漿(各100 $\mu\text{L}$ )から、内部標準物質(IS)存在下、中性条件でBligh & Dyer法により脂溶性代謝物を抽出し、下層(有機層)及び上層(水層)を分取した。グリセロリン脂質(Glycerophospholipids, GPL)・スフィンゴ脂質(Sphingolipids, SP)・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(UPLC-TOFMS、超高性能液体クロマトグラフはWaters社ACQUITY

UPLC、飛行時間型質量分析計はWaters社LCT Premier XE)を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。

酸化脂肪酸(oxidative fatty acids, oxFA)を含む上層は、さらにOasis HLB Vac RC cartridge(Waters社)を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフ-三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計(UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフはWaters社ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計はAB SCIEX社QTRAP5500)を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。

### 3) データ解析

UPLC-TOFMSにより得られたデータは、2DICAL(三井情報株式会社)を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMSの保持時間、精密質量及びマススペクトルのデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、内部標準物質(IS)により補正を行った全ピークのheight値を用い、種々の条件(雌雄差、週齢差、食事の有無、採血時間)間の脂質分子種レベルの違いにつき、Welch's t-test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より得られたデータは、MultiQuantソフトウェア(AB SCIEX社)を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、ISにより抽出操作の補正を行い、補正後のピークにつき、UPLC-TOFMSにより得られたデータと同様にWelch's t-testによる統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

さらにISにより補正を行った全ピークの値を用いて直交部分最小二乗法判別分析(OPLS-DA)を行い、群内サンプルばらつき、及び群間の類縁性の指標とした。

(倫理面での配慮)

動物実験は、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物実験委員会の承認のもと、実験を行った。

## C. 研究結果：

### 1) ラット血漿中の脂質代謝物の同定と多変量解析による群間の類縁性

ラット血漿サンプルから、Bligh & Dyer法の下層(有機層)において227種の脂質代謝物が同定された。一方、Bligh & Dyer法の上層のギ酸メチル画分から42種の脂肪酸代謝物が同定された。脂質クラスごとにラット血漿で同定された分子

種数を、昨年度実施したヒト血漿で同定された分子種数と共に表 2 に示した。ヒトとラットの血漿で同定された代謝物と比較すると、総代謝物数は、ヒト 251 種、ラット 269 種とほぼ同程度であったが、ヒトではエーテル型のホスファチジルコリン (PC) が 20 種同定されたのに対し、ラットでは 3 種の分子種のみ同定された。一方、コレステロールエステル (ChE) やトリアシルグリセロール (TAG) は、ラットの方がヒトより多くの分子種が検出された (表 2)。

性別 (雄と雌) 及び週齢 (10 週齢と 30 週齢) が異なる 4 群 (第 1 群～第 4 群) に関し、これら全 269 化合物による OPLS-DA の結果を図 1 に示した。OPLS-DA スコアプロットにおいて、ラットの性差による群間の判別が第一主成分に、週齢差による群間の判別が第二主成分に認められ、ラット血漿中には性別と週齢の違いにより濃度の異なる脂肪酸代謝物が含まれることが示唆された。

一方、10 週齢の雄性ラットにおいて、食事の有無、及び採血時間が異なる 4 群 (第 1 群と第 5 群～第 7 群) に関する OPLS-DA の結果では、食事の有無による群間の判別が第一主成分であり、絶食・非絶食の違いが、多くの脂肪酸代謝物の濃度に影響することが示唆された。しかしながら、採血時間の違いによる群間の判別は認められず、採血時間の違いによる脂肪酸代謝物の変動が食事の有無による脂肪酸代謝物の変動と比較して相対的に少ないことが示された (図 2)。

## 2) 性差による脂質代謝物レベルの変化、及びヒトとラットの外挿性について

総検出代謝物のうち、若齢 (10 週齢) で有意に性差を示した代謝物が 112 種 (42%)、老齢 (30 週齢) で性差を示した代謝物は 146 種 (54%) 見出され、うち 81 種 (30%) の代謝物が若齢・老齢に共通して性差を示した。数種の TG 分子種が週齢に関わらず、雄と比較して雌で有意に低いレベルを示し、スフィンゴミエリン (SM) 及び ChE 分子種が、週齢に関わらず、雄と比較して雌で有意に高いレベルを示した。雌雄で顕著にレベルが異なる具体的な分子種としては、58:8TG (若齢の雄に対する雌の変化率 0.36 倍、及び老齢の雄に対する雌の変化率 0.49 倍)、36:1SM (同上 2.4 倍、及び 2.6 倍)、20:4ChE (同上 1.6 倍、及び 1.6 倍) が挙げられた。昨年度実施したヒト血漿においても SM 及び ChE 分子種は、同様の性差が認められたが、TG 分子種に関してはヒトではラットと同様の性差は認められなかった。

また、老齢においてのみ雌雄差が認められる代謝物として、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びその代謝物が見出さ

れ、雌で高いレベルを示した。顕著にレベルが異なる具体的な分子種としては、EPA (老齢の雄に対する雌の変化率 3.3 倍)、及び 17,18-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸 (17,18-diHETE、同上 2.6 倍) が挙げられたが、ヒトとの外挿性は認められなかった。

## 3) 週齢差による脂質代謝物レベルの変化、及びヒトとラットの外挿性について

総検出代謝物のうち、有意に週齢差を示した代謝物は、雄性ラットで 79 種 (29%)、雌性ラットで 90 種 (33%) 見出され、雌雄に共通して週齢差を示した代謝物は 13 種 (5%) と少なかった。

雄のみで週齢差を示す代謝物として数種の EPA 及び DHA 代謝物が見出され、15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (15-HEPE、若齢の雄に対する老齢の雄の変化率 0.19 倍)、18-HEPE (同上、0.29 倍) 等、老齢では若齢と比較して有意に低いレベルを示した。ヒトとラットでこれらの代謝物の外挿性は認められなかった。

雌のみで週齢差を示す代謝物として数種の TG 及び ChE 分子種が見出され、昨年度実施したヒトにおいても同様の結果であり、ラットとヒト間で外挿性が示された。22:6ChE (若齢の雌に対する老齢の雌の変化率 1.7 倍) 及び 52:6TG (1.6 倍) が顕著な変化を示した。

## 4) 食事の有無による脂質代謝物レベルの変化

10 週齢の雄性ラットにおいて、16 時間絶食群と非絶食群間で有意に変動する代謝物は、186 種 (69%) であり、絶食により増加する代謝物は 37 種 (14%) であり、絶食により減少する代謝物が 149 種 (55%) であった。絶食により、一部を除くリン脂質・中性脂質全般が有意に減少した。特に、32:1PC (非絶食群に対する絶食群の変化率 0.19 倍)、36:2DG (同上 0.23 倍)、50:1TG (同上 0.04 倍) は、顕著に絶食により減少した。

絶食により有意に増加する代謝物として、アラキドン酸 (AA)、及びそのリポキシゲナーゼ (LOX) 系代謝物、高度不飽和 TG が見出された。具体的な代謝物として、AA (非絶食群に対する絶食群の変化率 2.4 倍)、8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (8-HETE、同上、2.4 倍)、60:12TG (同上、4.4 倍) が挙げられた。また 22 時間絶食群は、16 時間絶食群と同様の結果を示した。

絶食により変動しない代謝物として 83 種 (31%) が見出されたが、これらはエーテル型 PC (36:4ePC, 36:5ePC 等)、SM (34:0SM, 34:1SM 等)、コレステロール、DHA・DPA 含有コレステロールエステル (22:5ChE, 22:6ChE) であった。

#### 5) 採血時間の違いによる脂質代謝物レベルの変化

22時間絶食時の10週齢の雄性ラットにおいて、午前採血群と午後採血群で有意に変動する代謝物は、269種の総代謝物のうち17種(6%)であり、今回検討した条件のうち、最も変動の少ない要件であった。一部のホスファチジルイノシトール(PI)は、午前採血と比較して、午後採血で有意にレベルの減少が認められたが、変化率は小さかった。顕著な変化を示した代謝物として38:5PI(午前採血に対する午後採血の変化率0.74倍)が挙げられた。

#### D. 考察:

##### 1) ラット血漿中の脂質代謝物の同定と多変量解析による群間の類縁性

UPLC-TOFMS及びUPLC-MS/MSを用いた網羅的脂質メタボローム解析システムにより、ラット血漿から合計で269種の脂質代謝物を同定した。ラット血漿で同定された分子種を、昨年度実施したヒト血漿で同定された分子種と比較したところ、エステル型PCや中性脂質等、ラットとヒトで検出される分子数が大きく異なる脂質クラスが存在した。バイオマーカー探索時には、ヒト及びラットの両方で検出される分子種を選択することが望ましいと考えられた。

さらに、多変量解析により群間の類縁性を比較したところ、雌雄差と週齢差は共に、全体の分子種の変動に影響を及ぼすこと、採血時間に関わらず食事の有無により、多くの脂質代謝物に変動することが明らかになり、今後、非臨床のバイオマーカー探索・検証時には、一部の分子種に関しては、雌雄差・週齢差・食事の有無は考慮すべき試料要件と考えられた。

##### 2) 雌雄差による脂質代謝物レベルの変化、及びヒトとラットの外挿性について

ラット血漿で同定された代謝物の30%が、若齢・老齢に共通して雌雄差によりレベルが有意に変化した。SM及びChE分子種等はヒトとラットで同様の性差が認められたが、各代謝物の変化率は、概してラットの方がヒトより大きかった。一方、TG分子種やEPA・DHA代謝物に認められ雌雄差はヒトでは認められず、ラットの雌雄差に関してヒト性差と外挿が可能な分子種とそうでない分子が存在することが明らかになった。外挿が可能な分子種は、ヒトとラットで同様の合成調節を受けている可能性があり、バイオマーカーとして望ましいと考えられた。

##### 3) 週齢差による脂質代謝物レベルの変化、及びヒトとラットの外挿性について

ラット血漿には、週齢によりレベルが有意に変化する代謝物が雄性ラットで総同定代謝物の29%、雌性ラットで33%見出されたが、雌雄で共通して週齢差を示す代謝物は5%であり、雌雄で週齢差を考慮しなければならない代謝物が異なることが示唆された。また、TG及びChE分子種等の雌で認められた週齢差に関して、ヒトで外挿可能な分子種が存在した。一方、EPA及びDHA代謝物等の雄で認められた週齢差は、ヒトへの外挿性が認められず、代謝物生成に関わる酵素の制御様式がヒトとラットで異なることが示唆された。

##### 4) 食事の有無による脂質代謝物レベルの変化

ラット血漿中の代謝物の69%が食事の有無で有意に変動したことから、バイオマーカー探索・検証時には、食事制限は、最も考慮すべき要因と考えられた。さらに、絶食時には、非絶食時と比較してアラキドン酸のLOX代謝物のレベルが有意に高く、これらは炎症・抗炎症のマーカーでもある(参考文献2)ことから、探索するバイオマーカーの用途によっては、非絶食下での試験が望ましい場合があることが示唆された。

##### 5) 採血時間の違いによる脂質代謝物レベルの変化

ラット血漿で、採血時間の違いにより変動する代謝物は少なく、変化率も低いことから、今回検出された代謝物に関しては、試料要件として採血時間を考慮する必要性は低いと考えられた。

#### E. 結論

医薬品開発の非臨床段階で多用されるラットに関し、試料要件の違いが血液中の代謝物レベルに与える影響を脂質代謝物に関して網羅的に検討した。多くの代謝物のレベルが雌雄、及び週齢の違いにより有意に変動し、バイオマーカーの探索・検証時における試料選択の際には、ラットの雌雄及び週齢差を考慮すべき代謝物が存在することが明らかとなった。またラットとヒトで外挿性が認められる分子種とそうでない分子種が存在し、外挿性が認められる分子種をバイオマーカー候補として選択するほうが望ましいと考えられた。

また、摂餌により、ラット血漿中の脂質代謝物のレベルが大きく変動することから、絶食時の試料採取が一般的に望ましいこと、絶食時間は16時間以上長く行う必要はないことが示唆された。しかし、一部の代謝物は絶食によるストレスで変動することから、バイオマーカーの用途によって

は、非絶食時に試料採取が望ましいことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表：

##### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Tajima Y, Kumagai Y, Saito Y: Plasma and Serum Lipidomics of Healthy White Adults Shows Characteristic Profiles by Subjects' Gender and Age. *PLoS One* 2014; 9: e91806.
- 2) Saito Y, Sai K, Kaniwa N, Tajima Y, Ishikawa M, Nishimaki-Mogami T, Maekawa K: Biomarker exploration and its clinical use. *Yakugaku Zasshi*. 2013;133:1373-9.

##### 2. 学会発表

- 1) 齋藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 佐井君江, 花谷忠昭, 中村亮介, 前川京子: ゲノミクスおよびメタボロミクス解析によるバイオマーカー探索. 第16回日本医薬品情報学会学術大会. 2013.8 (名古屋)
- 2) 田島陽子, 前川京子, 妹尾勇弥, 浦田政世, 石川将己, 村山真由子, 頭金正博, 齋藤嘉朗: ヒト尿中脂質代謝物の基本的性質(性差および年齢差, 安定性)に関する網羅的検討. 第86回日本生化学会大会. 2013.9 (横浜)
- 3) 石川将己, 前川京子, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齋藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 脇坂真美, 熊谷雄治, 齋藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のための、ヒト血液中高度不飽和脂肪酸代謝物レベルに関する基盤的検討. 第86回日本生化学会大会. 2013.9 (横浜)
- 4) 前川京子, 石川将己, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齋藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 熊谷雄治, 齋藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のためのヒト血液中脂質代謝物レベルに関する網羅的検討. 日本薬物動態学会第28回年会. 2013.10 (東京)
- 5) 齋藤公亮, 前川京子, 浦田政世, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 田島陽子, 中津則之, 山田弘, 齋藤嘉朗: メタボロミクスを用いた肝臓性リン脂質症の血中バイオマーカー探索. 第34回日本臨床薬理学会学術総会. 2013.12 (東京)
- 6) Ishikawa M, Maekawa K, Senoo Y, Tajima Y, Saito K, Urata M, Murayama M, Kumaga Y, Saito

Y: Lipidomic profiles in blood from fasted healthy adults vary between plasma and serum and by subject's genders and ages. 10th international ISSX meeting 2013.10 (Toronto)

- 7) 齋藤公亮, 前川京子, 浦田政世, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 中津則之, 山田弘, 齋藤嘉朗: 脂質メタボロミクスを用いた薬剤性リン脂質症の肝バイオマーカー探索. 第134回日本薬学会年会 2014.3 (熊本)
- 8) 前川京子, 齋藤公亮, 山田弘, 齋藤嘉朗: 動物モデルを用いた医薬品化合物によるリン脂質症の脂質メタボローム解析. 第134回日本薬学会年会 2014.3 (熊本)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願  
なし。

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

#### (参考文献)

- 1) Biomarkers Definitions Working Group. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69, 89-95 (2001)
- 2) Arita M. Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution. *J Biochem*. 2012;152(4):313-9.

表1 本研究に用いた検体の種類と検体情報

Group	sex	age	weight	Number of samples	Fastin g	Sampling time
1	Male	10 weeks	349.22±20.65	11	16 hr	10:00 AM
2	Female	10 weeks	227.72±14.96 <sup>***</sup>	11	16 hr	10:00 AM
3	Male	30 weeks	577.76±37.27 <sup>†††</sup>	13	16 hr	10:00 AM
4	Female	30 weeks	305.42±24.18 <sup>***†††</sup>	12	16 hr	10:00 AM
5	Male	10 weeks	405.9±26.98 <sup>SSS</sup>	11	No	10:00 AM
6	Male	10 weeks	361.64±32.93	11	22 hr	10:00 AM
7	Male	10 weeks	347.57±13.37	11	22 hr	4:00 PM

<sup>\*\*\*</sup>, p < 0.005 for the comparison between male and female rats of same aged groups (Group 1 vs. Group 2, Group 3 vs. Group 4).

<sup>†††</sup>, p < 0.005 for the comparison between young and old rats of same sex groups (Group 1 vs. Group 3, Group 2 vs. Group 4).

<sup>SSS</sup>, p < 0.005 for the comparison between fasting and nonfasting rats of same age and sex groups (Group 1 vs. Group 5).

表2 ラット及びヒト血漿で検出された各脂質クラス別数の比較

脂質クラス	LPC	LPE	PC	PCe	PE	PEe	PI	PG	SM	Cer	HexCer
ヒト(白人)	9	2	34	20	9	9	8	0	22	7	8
ラット	9	1	41	3	4	3	7	1	14	5	1

NLs/oxFAs	Ch	CoQ	DG	TG	ChE	AAm	EPAm	DHAm	計
ヒト(白人)	1	1	7	79	12	13	4	6	251
ラット	1	1	10	101	25	22	9	11	269

LPC, リゾホスファチジルコリン; LPE, リゾホスファチジルエタノールアミン;

PC, ホスファチジルコリン; PCe, エーテル型ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PEe, エーテル型ホスファチジルエタノールアミン;

PI, ホスファチジルイノシトール; PG, ホスファチジルグリセロール; SM, スフィンゴミエリン; Cer, セラミド; HexCer, ヘキソシルセラミド;

Ch, コレステロール; CoQ, コエンザイムQ; DG, ジアシルグリセロール; TG, トリアシルグリセロール; ChE, コレステロールエステル;

AAm, アラキドン酸代謝物; EPAm, エイコサペンタエン酸代謝物; DHAm, ドコサヘキサエン酸代謝物

図1 多変量解析による群間の類縁性 (雌雄差・週齢差)

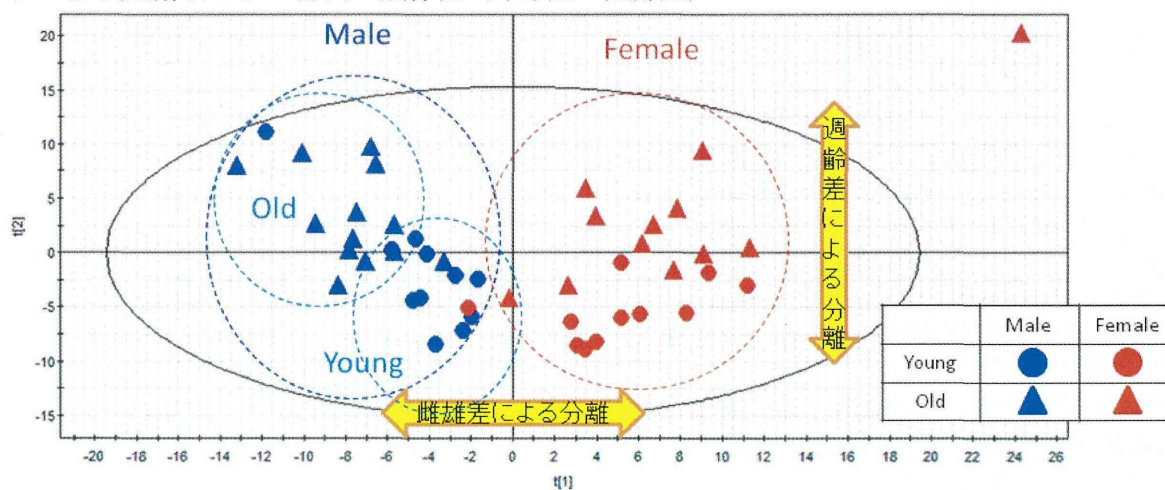
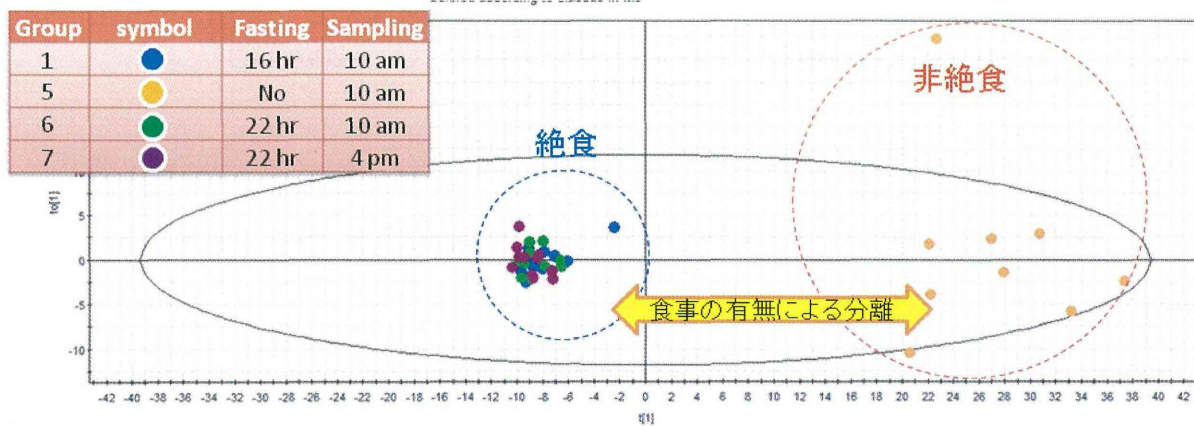


図2 多変量解析による群間の類縁性（食事の有無・採血時間）



平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの探索・検証要件、およびその評価法の確立

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長 鈴木 孝昌

**研究要旨：**

尿中バイオマーカーの検出のため、昨年度はラットを実験モデルとして、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスによる高感度分析法を確立した。そして、性差、絶食時間、採血時間、週齢差など基本的な実験条件がラット尿プロテオーム発現解析に与える影響を検討した。未報告であった週齢差の影響については、高週齢の雄ラットの一部において高発現量のタンパク質が大きなバラツキの要因となることがわかり、これらを同定したところ、精子形成に関わるタンパク質であることがわかった。

今年度はさらに同様の手法を用いてヒト尿を用いた解析を行い、プロテオーム解析によるバイオマーカー検索の際に重要なファクターとなる個体差によるばらつき、およびその要因に関して検討を行った。ヒト尿はラットに比べて尿中タンパク含量が低いいため必要とされる尿量が多いものの、高発現量のタンパク質の影響が小さく、結果としてラットよりも解析のパフォーマンスは高かった。通常の解析において、検出されるペプチドピークの数はいくつと数となり、MS/MS スペクトル測定によるデータベース検索との組み合わせによりこれまでに 3 千近くのタンパク質を同定した。

この手法を用いて、市販のコントロールヒト尿サンプルの解析を行い、基礎的条件として、性差、年齢差による影響を検討したところ、サンプル間でのタンパク質量のバラツキはラットに比べて大きく、主成分分析においては、性差、年齢差ともに明らかな傾向を示さなかった。即ち個体差によるバラツキが性差、年齢差による影響を超えて大きいということがわかった。このバラツキの要因を検討するため、ドナー情報として利用可能であった体重および身長より Body Mass Index (BMI) を計算し、BMI による肥満度との関連を検討したところ、肥満度により主成分分析プロットが群分けされる傾向を見出した。

さらに、新たなバイオマーカー探索の試みとして、タンパク質への各種付加体を検出するための「タンパクアダクトーム解析」を立ち上げ、まず既知の修飾として糖尿病におけるヘモグロビン A1c に代表されるタンパクの糖化アダクトに着目し、尿中でこれら糖化タンパク質を網羅的に解析する手法の確立を行った。

**A. 研究目的：**

個別化医療の推進、コンパニオン診断薬の利用、並びに予防的治療介入による先制医療の実現に向け、各種バイオマーカーの開発と診断への利用が課題となっている。近年、制癌剤の領域を中心として、分子標的薬の開発が盛んとなり、薬剤ターゲットとして同定された分子標的自体が治療薬選択のための診断バイオマーカーとなるケースも増えてきている。また、新薬開発における患者の感受性予測のための新規バイオマーカーの同定と、コンパニオン診断薬としての同時承認に向けた開発は今後一気に加速すると見られ、オミックスの手法を用いて開発されたいわゆる次世代型のバイオマーカーが今後ますます重要となる。これら、新規バイオマーカーの有効性は、薬剤の有効性に直接結びつき、治療の可否を左右する重要な役割を担うことになる。よって、これら

バイオマーカーの有効性を担保し、その品質を保証する上で、評価要件の確立が急務となっている。通常取りうるアプローチとして、動物実験等の非臨床試験で得られた知見およびヒトでの臨床試験データから個々のバイオマーカーの有用性を評価することになるが、今のところそれを目的とした評価要件は国内外を含め確立されていない。そこで、新規バイオマーカーの評価要件の作成を目的として、非臨床および臨床検体を用いたバイオマーカーの検出に関わる基本要件の検討のため、生体試料の採取方法および性差年齢等の因子が与える影響等に関して基礎的なデータを取得するとともに、実験動物でのバイオマーカーの開発とヒトへの外挿による臨床応用にむけたスキームの妥当性に関する評価要件についても検討を行った。

我々はこれまでに、バイオマーカーの開発手法



として尿中プロテオーム解析に注目し、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による網羅的定量プロテオーム解析に関する研究を行ってきた。この手法を応用し、尿中バイオマーカーに関する基礎的知見を得るために、昨年度はまず実験動物としてラットを用いて、性差、年齢、絶食、サンプリングタイムなどの試料採取条件が与える影響に関して基礎的な知見を得た。今年度は、同様の解析をヒト尿サンプルに関して行い、プロテオーム発現を規定する要因の解析を行うとともに、ラットデータとの比較による種差の検討を行い、実験動物からヒトへの外挿性に関して考察を行うことを目的とした。

さらに、糖尿病におけるヘモグロビン A1c に代表されるように、修飾を受けたタンパクがバイオマーカーとなる事例も考えられ、特に薬物に対する修飾タンパクは特異的な副作用発現のバイオマーカーとなることも期待できる。そこで、我々の確立した尿中プロテオーム解析の手法を応用し、修飾タンパクに的を絞ったバイオマーカーの網羅的検索法に関するアプローチを「プロテインアダクトーム解析」として新たに立ち上げた。

## B. 研究方法：

### 尿中プロテオーム解析法

#### 1) タンパク質の沈殿および消化条件

(タンパク質画分の調製)

尿からのタンパク質画分の抽出、精製の手法として、昨年度決定した有機溶媒（アセトン、アセトニトリル、エタノール）によるタンパク質の沈殿条件を用いた。

(タンパク質の沈殿)

尿を 2000xg、5 分間遠心分離を行い、不溶性物質を除去した後、Qubit™ spectrometer (Invitrogen) にてタンパク質濃度を測定した。タンパク 15 μg 相当量の尿をとり、所定量の有機溶媒を加え、タンパク質を沈殿させた。この際の、温度、時間についても検討を加えた。

その後 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 500 μl の同一溶媒で洗浄した。

(タンパク質の可溶化)

再び 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 15 μl の 0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。

(還元アルキル化)

タンパク質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μl に、30 μl の 10 mM DDT を加え、60℃で 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μl の 30 mM ヨードアセトアミド溶液

を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6 μl (0.25 μg/μl) 加え、37℃で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

#### 2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μm のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPOLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro) を使用した。移動相は A (水 0.1% ギ酸), B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) の 2 種類の組成の溶媒を用い、B:2%から B:98%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、ESI-四重極/FT 型タンデム質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Fisher) を用い、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。通常の測定は、ポジティブイオンモードを使用した。前記の逆相 C18 カラム (0.1 mm x 50 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray, AMR) にて質量分析装置へと導入した。質量分析装置の設定に関しては、検討に基づき、以下の通りの最適な MS 測定条件とした。

(MS 測定)

・MS 質量範囲	300-2000 m/z
・Total Analysis Time	110 min
・Resolution	70,000
・Accumulation time	250 ms
・Spray Voltage	400-1800 V
・Automatic Gain Control	5xe <sup>6</sup>
(MS/MS 測定)	
・Resolution	17,000
・Accumulation time	50 ms
・Automatic Gain Control	5xe <sup>5</sup>
・MS/MS 測定条件	上位 3 ペプチド (2 個以上) を自動選択。

(LC 測定)

・LC 流速	150-300 nl/min
・LC グラジエント A 溶媒 (2%アセトニトリル, 0.1%ギ酸) と B 溶媒 (80%アセトニトリル, 0.1%ギ酸) によりグラジエント。	

#### 3) データ解析ソフトウェアによるノンラベル定

## 量解析

Q-Exactive による質量分析データ (RAW 形式) は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして、Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) を採用し、比較プロテオーム解析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。Q-Exactive からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である (図 1)。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

### 4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT (Matrix Science) を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメーターとしてはデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$  を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

### 5) ラット尿サンプルの採取

メタボローム解析用の採血のためのラットを絶食期間中代謝ゲージにて飼育し、尿サンプルを採取した。今回解析したサンプルは以下の 4 および 5 群のサンプルであり、それぞれ週齢による影響を見る目的で、1 および 3 群のサンプルとの比較を行った。

Group No.	Sex	Age	Fasting duration	Blood collection	Animal code
1	Male	10 w	16 h	Morning	M1 to M10
2	Male	10 w	0 h	Morning	M11 to M20
3	Female	10 w	16 h	Morning	F21 to F30
4*	Male	30 w	16 h	Morning	M31 to M40
5*	Female	30 w	16 h	Morning	F41 to F50
6	Male	10 w	22 h	Morning	M51 to M60
7	Male	10 w	22 h	Afternoon	M61 to M70

### 6) ヒト尿サンプルのプロテオーム解析

正常ヒト由来の尿サンプル 30 検体を使用した。サンプルはいずれも Caucasian 由来で、PROMEDEX 社より市販されているインフォームドコンセント取得済みのサンプルを使用した、使用したサンプルのドナー情報は以下の通りである。

	Gender	Age	Weight - kg	Height - cm	BMI	Obesity
1	F	25	128.8	170.2	44.5	Obese
2	F	25	139.7	167.6	49.7	Obese
3	F	26	147.4	182.9	44.1	Obese
4	F	27	93.4	162.6	35.4	Obese
5	F	28	59.9	154.9	24.9	Normal weight
6	F	30	139.7	172.7	46.8	Obese
7	F	33	64.0	157.5	25.8	Overweight
8	F	34	86.2	167.6	30.7	Obese
9	F	55	90.7	162.6	34.3	Obese
10	F	56	114.3	162.6	43.3	Obese
11	F	58	96.2	162.6	36.4	Obese
12	F	59	106.6	172.7	35.7	Obese
13	F	60	82.6	162.6	31.2	Obese
14	F	62	65.8	152.4	28.3	Overweight
15	F	63	74.4	157.5	30.0	Obese
16	M	25	66.2	170.2	22.9	Normal weight
17	M	26	52.2	154.9	21.7	Normal weight
18	M	27	108.9	182.9	32.5	Obese
19	M	28	59.9	167.6	21.3	Normal weight
20	M	28	78.0	172.7	26.2	Overweight
21	M	30	80.3	172.7	26.9	Overweight
22	M	32	109.3	172.7	36.6	Obese
23	M	33	72.6	157.5	29.3	Overweight
24	M	55	69.9	167.6	24.9	Normal weight
25	M	57	73.9	177.8	23.4	Normal weight
26	M	57	67.1	185.4	19.5	Normal weight
27	M	59	91.2	175.3	29.7	Overweight
28	M	60	95.3	165.1	34.9	Obese
29	M	62	80.3	188	22.7	Normal weight
30	M	64	116.1	188	32.9	Obese

肥満度に関しては、BMI の値を元に、以下のよう

Obesity	BMI scale
Underweight	<18.5
Normal weight	18.5–24.9
Overweight	25–29.9
Obese	30+

### 7) Proteo Miner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化

これまでの検討により、ラットの尿中には比較的高発現量のタンパク質として Major Urinary Protein (MUP) 群があり、低発現量のタンパク質の検出に影響を与えていることがわかったため、さらなる系の高感度化を目指して、ProteoMiner Protein Enrichment Kit (BioRad) を用いた高発現タンパク (ペプチド) の除去を行った。

ProteoMiner はランダムペプチドが結合したビーズにより、一定量のターゲットタンパク質のみを吸着し高発現量のタンパク質を除去するこれまでとは逆の発想に基づく前処理法であり、低発現量のタンパク質の効率的な検出が期待される。ヒト血清およびラット尿サンプルを用いて一定量の ProteoMiner ビーズとマイクロチューブ内で反応させ、タンパクおよびペプチドを結合させた後、洗浄液にて非結合タンパク（ペプチド）を除いた後、溶出液にて結合したタンパク（ペプチド）を溶出させ、アセトン沈殿後、通常のプロトコールに従って LC-MS 解析を行った。

#### 8) プロテインアダクトーム解析

付加体の解析に関しては、タンパクの非酵素的糖付加であるメイラード反応生成物に注目し(図 2)、通常の LC-MS/MS 測定を行った後、MASCOT によるデータベース検索の際に、この糖付加による質量の増加分 ( $+C_6H_{10}O_5=162.052$ ) を反応する可能性のあるアミノ基を有する以下のアミノ酸の可変修飾として設定し、データベース検索を行うことにより、全てのタンパク質に対する糖付加体の網羅的検出を可能とした。

(反応部位)

N 末端アミノ酸、リジン (K)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、トリプトファン (W)

(倫理面での配慮)

動物実験の実施に際しては、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に則り、動物実験委員会の承認を得て行った。ヒトサンプルに関しては、インフォームドコンセント取得済みの市販サンプルを使用した。

### C. 研究結果：

#### 1) ラット尿プロテオーム解析における週齢差の影響

昨年度の実験で、データ解析の残っていた高週齢のサンプルについて解析し、全データが揃ったので、全体をまとめて主成分分析による解析を行った。その結果、図 3 に示すように、各群内で比較的まとまったパターンを示すことがわかった。群内でのばらつきは第一主成分 (PC1) 方向に観察された。雌雄各群において週齢差の影響を検討したところ、雄は比較的近いパターンを示したのに対し、雌の高齢群においては比較的他と違うパターンを示していた。30 週例の雌雄ラットのデータのみを取り出して検討したところ、図 4 に示すように、雄の群内において明らかな分離が認められた。孤立した雄サンプルにおいて特異的に発現しているタンパク質を Progenesis および Mascot

検索による同定を行ったところ、Seminal vesicle secretory protein 2、Prostatic spermine-binding protein、Aminopeptidase N という三種類のタンパク質が同定された(図 5)。これらのタンパク質は、精子および精液と関連があるため、これらの個体サンプルにおける精液の混入が示唆された。

#### 2) ProteoMiner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化の検討

これまでの検討において、ラット尿中には高発現量タンパクとして MUP タンパク質群が存在し、これらが低発現量のタンパク質の検出感度を落としていることが考えられたため、昨年度はタンパク質沈殿の際に用いる有機溶媒の種類と濃度に関する検討を行い、最終的にエタノールを 50% の濃度で用いることにより MUP 群以外のタンパク質を選択的に沈殿させ、検出されるペプチドの総数を増やすことに成功した。今後、ヒトを含めた試料として、血清タンパクの解析を行う必要性も出てくると考えられるが、血清中ではアルブミンなどの高発現量のタンパク質の占める割合が高く、よりこれらの除去が重要な課題となる。従来血清中の主要な高発現タンパクは、それらに対する抗体を結合したカラムを用いた除去法が検討されてきたが、価格と効率面において必ずしも満足するパフォーマンスは得られていなかった。しかし、最近になって新たな原理に基づく高発現量タンパクの除去法として、2 次元電気泳動のサンプル前処理を目的とした ProteoMiner というキットが利用可能となった。これは、特定の抗体を用いるのではなく、ランダムに合成したペプチドを担体に結合させたもので、低用量のペプチドを含めて親和性のあるペプチドを普遍的かつ量的な制約を持って結合させることにより、高発現量タンパク質を除き、低発現量タンパクの相対的な割合を増やすことにより検出ペプチド数を増やすという従来とは逆の発想による手法を用いている。元来 2 次元電気泳動用に試薬類が設計されているため、我々は系を LC-MS サンプル用にスケールダウンすることを検討した。

まず最初に、高発現量タンパクがより問題となるヒト血清を用いて、検出されるペプチド数の変化を検討した。用いる担体の量としては、規定量およびその 1/5、1/10 スケールを検討した。その結果、図 6 に示すように、未処理 (Raw) 群と比較して、処理群では 1/10 スケール群を除き、いずれも Progenesis ソフトウェアにて検出される総ペプチド数、Mascot にて同定された総タンパク数、取得 MS/MS スペクトル数ともに増加が見られた。特に 1/5 スケールでは、規定量

と同等もしくはそれ以上の効果が得られており、経済的な面からも 1/5 スケールでの処理が適当であると結論づけた。

次に、同様の検討をラット尿サンプルに対しても検討した。ここでは、用いる担体量は 1/5 としたが、血清タンパクに比べて尿タンパクはタンパク含量が低く必要な液量が大きという問題もあり、遠心濃縮処理を行い濃度調節したサンプルも同時に検討した。その結果、図 7 に示すように、我々が開発した 50%エタノールを用いる方法と比較し、濃縮処理を行った場合に MS/MS スペクトルの取得数の若干の増加が見られたが、総ペプチド数および総タンパク数に明らかな向上は見られず、ラット尿に関しては 50%エタノールによる選択的沈殿法で十分であることがわかった。

### 3) ヒト尿サンプルのプロテオーム解析

ヒト尿中にはこれまでの予備的な検討によりラット尿中のような高発現量のタンパクはないことがわかっていたので、従来の手法でサンプル処理を行い、解析をすることにした。

サンプルは正常白人由来の尿であり、男女各 15 サンプルに対して、25-35 歳の若年群と、55-65 歳の高齢群とを設定した。

これらの検体に関して LC-MS データを取得し、Progenesis にて解析した結果を用いて全体を主成分分析した結果を図 8 に示す。

ヒト尿サンプルの場合、主成分分析によりラットに見られたような群内でのまとまりは見られず、ランダムなばらつきの大い傾向を示し、性差や年齢差を越えて個体間のバラツキが大いことがわかった。そこでこのバラツキの要因に関して考察を加える目的で、サンプルのドナー情報として利用可能であった身長および体重のデータを元に BMI の値を算出し、これを基準に正常体重 (Normal weight)、過体重 (Overweight)、肥満 (Obese) の 3 群に分類した。この群分けによる情報を主成分分析プロットに導入すると、図 9 に示したように、肥満度によって群分けがされる傾向が認められた。即ち、肥満度によって第二主成分 (PC2) 方向に分類される傾向にあり、肥満群のサンプルは全てグラフの上半分位置した。個体間のばらつきは、第一主成分方向に広がっており、ラットの場合と合わせ、第一主成分即ち個体差の要因となっているタンパク質の解明が今後の課題である。

肥満度による尿中タンパク発現の変化を、尿中の主要タンパクであるアルブミンを例にとって示したのが図 10 である。ラットの場合は個体間で比較的均一な発現を示すが、ヒトの場合には特

に高い発現を示す個体が存在し、年齢には影響を受けない。しかし、肥満度で分類した場合にはきれいな傾向を示し、肥満度が高い個体において発現が高い個体が多くみられた。

### 4) 性差、年齢差、肥満度の差により変化するタンパク質の同定

ラットの場合と同様、性特異的な発現を示すタンパクを調べた結果を図 11 に示す。男性特異的なタンパク質のうち半数以上がケラチン類であったが、これは尿な採取にあたって、男性の場合ケラチンの混入が多いことを示している。トップヒットした Glutamyl aminopeptidase は腎近位尿細管上皮に発現するタンパク質であり、性差を示す点は興味深い。Bromodomain testis-specific protein については、その名の示すとおり男性特異的であることは納得がいくが、活性酸素除去酵素である Catalase が性差を示した点は注目される。尿中カタラーゼは尿路感染や炎症のマーカーとして用いられており、注意が必要である。女性特異的な発現を示すタンパク質も同様にリストアップされたが、トップヒットである alpha-2-macroglobulin-like protein は alpha-2-macroglobulin 自体が最近アルツハイマー病の進行にかかわる女性特異的なバイオマーカーとして報告されている点で注目される。

次に、年齢差を示す特徴的なタンパクを図 12 に示した。明らかな年齢差を示すタンパクは少なく、若年群で発現の高いタンパク質として CD59、Interferon induced protein with tetratricopeptid repeats 2、multimerin-1、sulphydryl oxidase-1 の 4 種類のみが同定された。CD59 は赤血球の膜抗原であり、その他のタンパク質についても、主に血液由来であると考えられる。

さらに、肥満度により発現差の見られたタンパク群は 460 と多数見られたが、その一部を図 13 に示した。これらのタンパク質は肥満度の影響を受けやすい点で注意が必要であるが、逆に肥満が誘発する疾患のバイオマーカーとなりうることも期待できるため、個々のタンパクの機能との関連性が注目される。

### 5) プロテインアダクトーム解析

タンパクの付加体に関しては、従来の解析では全く考慮してこなかったが、MASCOT によるタンパク同定の際に、未同定のタンパク質の多くが何らかの修飾タンパクである可能性も考えられる。血糖値のマーカーとしてのヘモグロビンの糖化アダクト A1c に代表されるように、付加体として存在するタンパク質がバイオマーカーとなる事例もあり、今後のバイオマーカー探索において、