

## 質量分析を用いた低分子化合物の定量的解析法の構築とバイオマーカーに関する研究

鈴木直人

## Mass Spectrometry-based Quantitative Analysis and Biomarker Discovery

Naoto SUZUKI

Laboratory of Oncology, Pharmacy Practice and Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Tohoku University, Aoba 6-3, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received May 24, 2011)

Mass spectrometry-based quantitative analysis and biomarker discovery using metabolomics approach represent one of the major platforms in clinical fields including for the prognosis or diagnosis, assessment of severity and response to therapy in a number of clinical disease states as well as therapeutic drug monitoring (TDM). This review first summarizes our mass spectrometry-based research strategy and some results on relationship between cysteinyl leukotriene (cys-LT), thromboxane (TX), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and other metabolites of arachidonic acid and diseases such as atopic dermatitis, rheumatoid arthritis and diabetes mellitus. For the purpose of evaluating the role of these metabolites of arachidonic acid in disease status, we have developed sensitive determination methods with simple solid-phase extraction and applied in clinical settings. In addition to these endogenous compounds, using mass spectrometry, we have developed actually applicable quantitative methods for TDM. Representative example was a method of TDM for sirolimus, one of the immunosuppressant agents for a recipient of organ transplant, which requires rigorous monitoring of blood level. As we recognized great potential in mass spectrometry during these researches, we have become interested in metabolomics as the non-targeted analysis of metabolites. Now, established strategy for the metabolomics investigation applies to samples from cells, animals and humans to separate groups based on altered patterns of metabolites in biological fluids and to identify metabolites as potential biomarkers discriminating groups. We would be honored if our research using mass spectrometry would contribute to provide useful information in the field of medical pharmacy.

**Key words**—mass spectrometry; quantitative analysis; metabolites of arachidonic acid; therapeutic drug monitoring; metabolomics; biomarker

## 1. はじめに

液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) は、その優れた感度と汎用性から、低分子化合物からペプチド・タンパク質、薬物とその代謝物の解析等、基礎研究のみならず臨床研究・業務の分野においても近年ますますその重要性を増している。<sup>1-5)</sup>

筆者らはこれらのうち、*in vivo*あるいは*in vitro*において産生される微量の生理活性物質やその代謝物の定量的解析法を構築し、この定量的解析法を用いて生理活性物質と疾患との関連性を明らかにする手法で研究を行ってきた。特に一連のアラキドン酸

カスケード関連物質については、Leukotriene E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>), 11-dehydrothromboxane B<sub>2</sub> (11-dehydro TXB<sub>2</sub>), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), 各種アラキドン酸カスケード関連物質の同時定量法など、様々な化合物の定量的解析法を構築し、これらの化合物の病態における産生の意義と定量的モニタリングの有用性について明らかにしてきた。また、アラキドン酸カスケード関連物質のような内因性生理活性物質に加え、免疫抑制剤シロリムスなどの薬物の新規血中濃度測定法を開発し、臨床における therapeutic drug monitoring (TDM) を可能とした。さらに近年は、メタボロミクスによる疾病の早期診断・病態評価についての研究を展開している。本総説では、これらの研究の成果の概要について紹介する。

東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野  
(〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: nasuzuki@m.tohoku.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会東北支部奨励賞(医療薬学部門)の受賞を記念して記述したものである。

## 2. LTE<sub>4</sub>の定量的解析法の開発と病態との関連

生体内で産生された cysteinyl LT の 5-リポキシゲナーゼにおける最終尿中代謝物である LTE<sub>4</sub> の濃度を把握することは、極微量で様々な作用を発揮する cysteinyl LT の機能解明の上で重要であるが、従来、LTE<sub>4</sub> が化学的に不安定でありかつ産生量が極微量のためその測定は誘導体化が必要とされるなど煩雑であった。<sup>6)</sup> そこで筆者らは、LTE<sub>4</sub> のヒト尿中含有量を簡便かつ高感度に定量する手法を新規に構築し、ついで健常人における排泄変動を明らかにした。<sup>7)</sup> さらに本解析法を病態解析へと展開し、気管支喘息患者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者における LTE<sub>4</sub> の排泄亢進と各種臨床検査値、使用薬剤との関連性について明らかにしてきた。<sup>8-10)</sup> 特にアトピー性皮膚炎については、従来特異的な疾患マーカーが存在しないことが診療上問題となっていたが、LTE<sub>4</sub> 排泄量がアトピー性皮膚炎患者で亢進していることを明らかにし (Fig. 1)、またその亢進は皮膚症状の改善に伴い正常値へと減少することを見出し (Fig. 2)、測定法の有用性を示すことができた。<sup>9)</sup>

## 3. 11-dehydroTXB<sub>2</sub>の定量的解析法の開発と病態との関連

アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝物である TXA<sub>2</sub> の尿中安定代謝物 11-dehydroTXB<sub>2</sub> については、従来煩雑な前処理操作と誘導体化が必要であるガスクロマトグラフィー/質量分析計により測定

が行われていたが、<sup>11-15)</sup> 微量な生体試料から迅速に定量が可能な手法を新規に開発し、LTE<sub>4</sub> と同様に気管支喘息との関連が指摘されていた TXA<sub>2</sub> の産生亢進を明らかにし、本測定法の臨床応用への可能性を示した。<sup>16)</sup>

## 4. 12-HETEの定量的解析法の開発と光学異性体の分離、病態との関連

アラキドン酸の 12-リポキシゲナーゼ代謝物である 12-HETE の LC/MS による高感度測定法を構築したほか、12(S)-HETE 及び 12(R)-HETE の光学

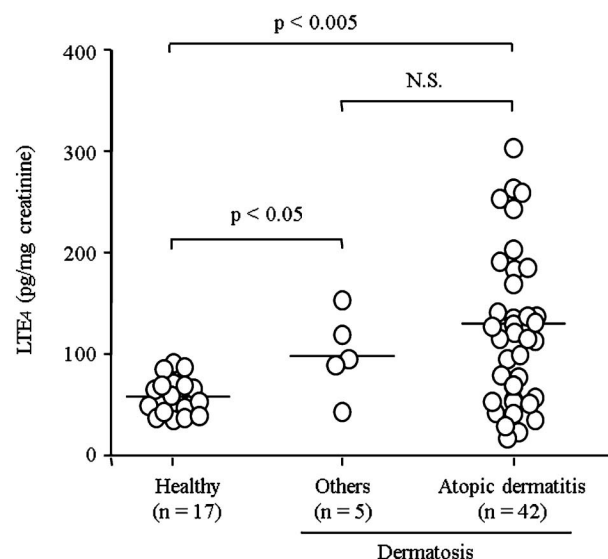


Fig. 1. Urinary LTE<sub>4</sub> Levels in Healthy Volunteers and Patients with Dermatitis

Horizontal bars indicate mean values. N.S.: Not significant.

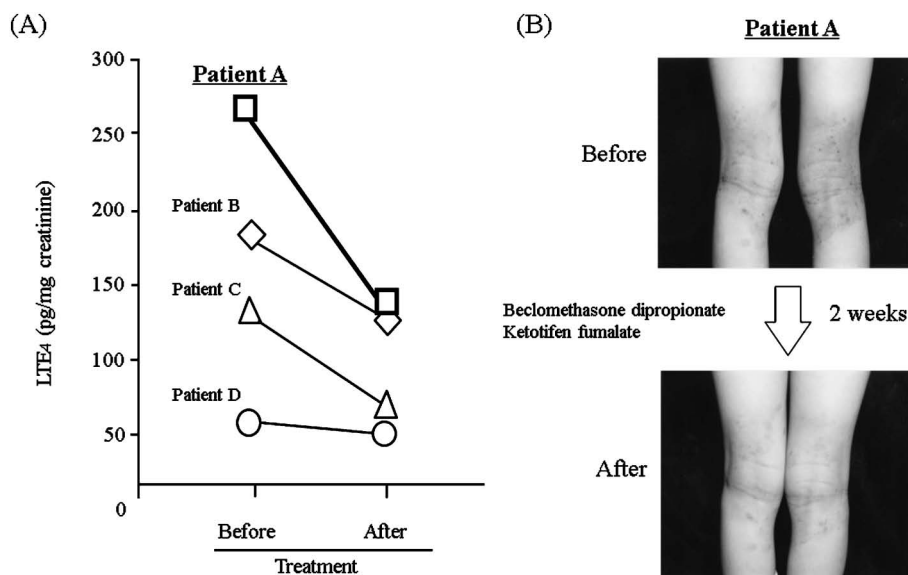


Fig. 2. Effects of Treatments on Urinary LTE<sub>4</sub> Levels (A) and Cutaneous Condition (B) in Patients with Atopic Dermatitis

異性体のクロマトグラフィーによる分離に成功した.<sup>17)</sup> これにより、これまで生体内における 12-HETE の産生の意義は不明であったが、これらの手法を用い、ヒト尿中に排泄される 12-HETE は S 体であること、健康人においてその排泄には性差が認められ女性で高い値を示すこと、加えて糖尿病患者においてその尿中排泄が亢進していることを見出し、生体内における産生メカニズムや糖尿病の病態に対する寄与を明らかにした (Fig. 3).<sup>17)</sup>

### 5. アラキドン酸カスケード関連物質の同時定量的解析法の開発と産生プロファイル解析

アラキドン酸カスケード関連物質は数多くの種類が存在し、それぞれが微量で多彩な生理作用を有するため、その生理的意義の解明には産生プロファイルを明らかにすることが必要である。そこで、多種のアラキドン酸カスケード関連物質を一斉に同時測定する手法を確立し、ヒト慢性関節リウマチ患者より採取した滑膜細胞、あるいはマウス肥満細胞等が産生するアラキドン酸カスケード関連物質の変動について解析を加え、その産生プロファイルと病態との関連性を明らかにした。<sup>18,19)</sup>

### 6. 免疫抑制剤シロリムスの血中濃度測定法の開発と TDM への応用

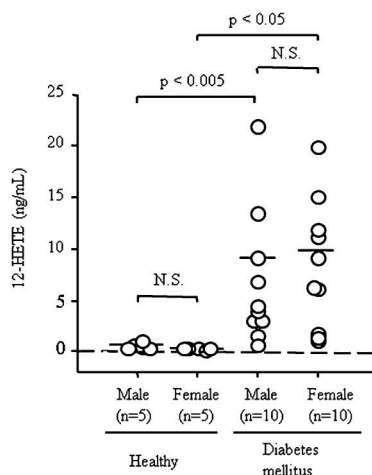
臓器移植患者に使用される免疫抑制剤シロリムスはその効果発現と副作用回避の目的から TDM が必須である薬物であるが、わが国において未承認であることもありその血中濃度測定が困難であった。そ

こで、構造類似体であるアスコマイシンを内部標準物質 (Internal Standard, IS) として用い、ヒト全血からの簡便なシロリムスの抽出法を組み合わせた LC/MS による簡便な血中濃度測定法を開発し、日本においても迅速な TDM を可能とした (Fig. 4).<sup>20)</sup>

### 7. メタボロミクスによる疾病の早期診断・病態評価

近年、質量分析装置の発展はめざましく、低分子化合物に関しては、これまでの微量定量や構造解析といった適用に加え多成分の網羅的解析・比較を行うメタボロミクスが注目を浴びている。<sup>21-23)</sup> 現在、われわれもメタボロミクスに重点を置き、これを用いた個別化医療の実現の可能性を模索しているところである。既にモデル動物を用いて本手法の有用性を明らかにする基礎データを得ており、各種多変量解析手法を用いたメタボリックプロファイリングによる疾患の診断・評価、また疾患特異的バイオマーカーの探索の可能性を見出している。一例としてコントロール及び糖尿病モデルマウス尿試料の正イオン LC/MS 分析により得られた 2 次元イオンマップを示す (Fig. 5)。それぞれ 1 分析で数千ものイオンが観測された。今後、特にがん領域において、原発不明がんの診断、がん治療に伴う末梢神経障害を始めとする早期の対策が求められる副作用の早期発見・感受性評価といった観点から研究を展開していく予定である。

(A) Plasma



(B) Urine

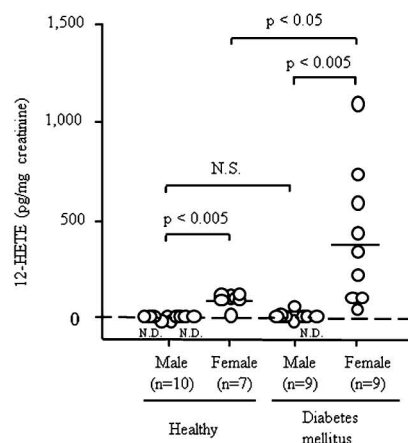


Fig. 3. Plasma (A) and Urinary (B) 12-HETE Levels in Healthy Volunteers and Patients with Diabetes Mellitus  
Horizontal bars indicate mean values. N.S.: Not significant. N.S.: Not Detected.

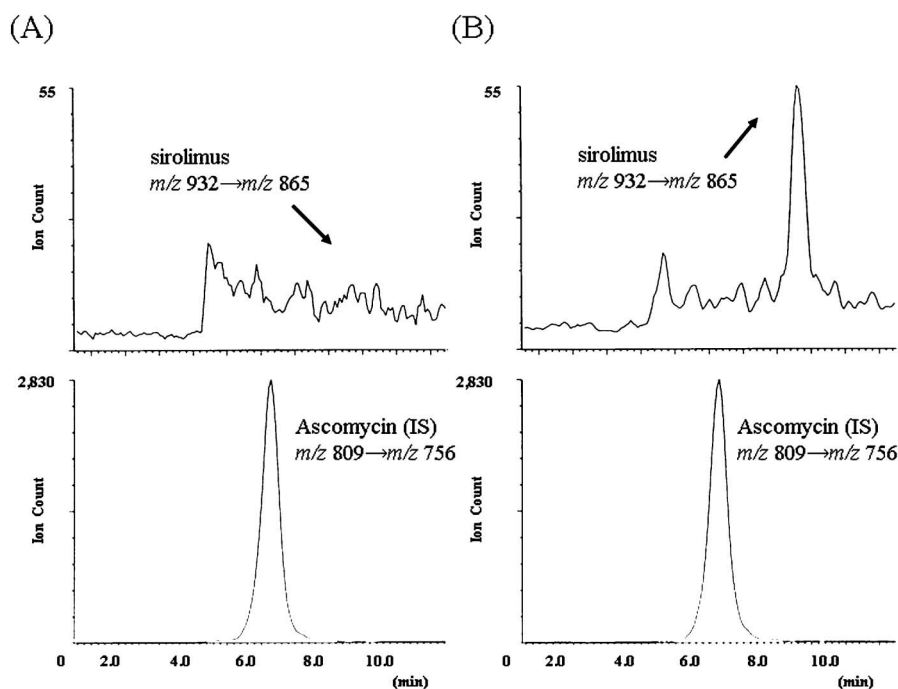


Fig. 4. SRM Chromatograms of Sirolimus and Ascomycin as an Internal Standard (IS) Extracted from Blank (A) and Sirolimus-spiked (1 ng/mL) Whole Blood Samples (B)

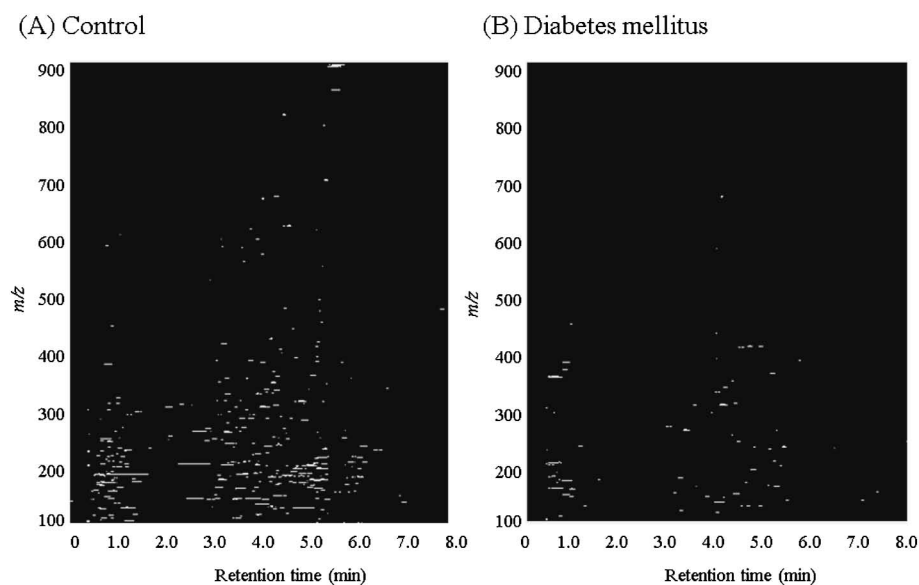


Fig. 5. Two-dimensional Ion Maps Obtained from LC/MS Analysis of Control (A) and Diabetes Mellitus Mouse Urine Samples (B)

## 8. おわりに

以上、これまでに行ってきた研究の成果について述べた。高感度・高選択的であること、また網羅的解析が可能であるといった特徴を有する質量分析は、病態における複雑な生体内の変化を鋭敏に捉えることができる。生体内に存在する微量の化合物を定量的に解析し、これを臨床に応用していくという

手法を生かし、今後も医療に貢献できるような研究を行っていきたい。

**謝辞** 本総説のアラキドン酸カスケード関連物質及び薬物血中濃度開発に関する研究は東北大学大学院薬学研究科病態分子薬学分野・東北大学病院薬剤部で行われたものであり、御指導と御鞭撻賜りま

した水柿道直教授・薬剤部長，後藤順一教授・薬剤部長並びに東北大学大学院薬学研究科薬物療法学分野菱沼孝則教授に心より御礼申し上げます。また，メタボロミクスに関する研究に関して終始御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野富岡佳久教授に厚く御礼申し上げます。さらに，東北大学大学院医学系研究科皮膚科学分野相場節也教授を始めとする共同研究者の諸先生方，本研究を遂行するに当たり御尽力と御助言を頂きました研究室の方々に感謝致します。また最後になりましたが，一方ならぬ御配慮と御督励を頂きました東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野寺崎哲也教授に深謝致します。

#### REFERENCES

- Peters F. T., *Clin. Biochem.*, **44**, 54–65 (2011).
- Chen G., Pramanik B. N., *Drug Discov. Today*, **14**, 465–471 (2009).
- Shushan B., *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 930–944 (2010).
- Liang Y., Wang G., Xie L., Sheng L., *Curr. Drug Metab.*, **12**, 329–344 (2011).
- Blow N., *Nature*, **455**, 697–700 (2008).
- Mizugaki M., Hishinuma T., Suzuki N., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **729**, 279–285 (1999).
- Suzuki N., Hishinuma T., Mizugaki M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 145–149 (2000).
- Suzuki N., Hishinuma T., Abe F., Omata K., Ito S., Sugiyama M., Mizugaki M., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **62**, 395–403 (2000).
- Hishinuma T., Suzuki N., Aiba S., Tagami H., Mizugaki M., *Br. J. Dermatol.*, **144**, 19–23 (2001).
- Nakamura H., Hishinuma T., Suzuki N., Chiba S., Tsukamoto H., Takabatake M., Sawai T., Mitomo T., Inoue H., Matsumoto F., Mizugaki M., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **65**, 301–306 (2001).
- Ishibashi M., Nakagawa Y., Harima N., Hishinuma T., Mizugaki M., *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 612–620 (1994).
- Yamanobe S., Nakagawa Y., Hishinuma T., Mizugaki M., Tamai M., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **58**, 65–68 (1998).
- Hishinuma T., Koseki Y., Murai Y., Yamazaki T., Suzuki K., Mizugaki M., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **58**, 263–271 (1999).
- Mizugaki M., Hishinuma T., Matsumura E., Murai Y., Yamazaki T., Yamanobe S., Tamai M., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **58**, 253–262 (1999).
- Hishinuma T., Koseki Y., Katayama J., Murai Y., Saito T., Mizugaki M., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **60**, 1–8 (2000).
- Suzuki N., Hishinuma T., Chiba S., Saga T., Tsukamoto H., Mizugaki M., Goto J., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **73**, 103–110 (2004).
- Suzuki N., Hishinuma T., Saga T., Sato J., Toyota T., Goto J., Mizugaki M., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **783**, 383–389 (2003).
- Takabatake M., Hishinuma T., Suzuki N., Chiba S., Tsukamoto H., Nakamura H., Saga T., Tomioka Y., Kurose A., Sawai T., Mizugaki M., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **67**, 51–56 (2002).
- Hishinuma T., Suzuki K., Saito M., Yamaguchi H., Suzuki N., Tomioka Y., Kaneko I., Ono M., Goto J., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **76**, 321–329 (2007).
- Suzuki N., Hishinuma T., Yamaguchi H., Sato M., Kaneko T., Matsuura M., Kaminishi T., Nakamura H., Ozawa M., Tomioka Y., Wada M., Ishii T., Hayashi Y., Goto J., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 289–294 (2006).
- Sreekumar A., Poisson L. M., Rajendiran T. M., Khan A. P., Cao Q., Yu J., Laxman B., Mehra R., Lonigro R. J., Li Y., Nyati M. K., Ahsan A., Kalyana-Sundaram S., Han B., Cao X., Byun J., Omenn G. S., Ghosh D., Pennathur S., Alexander D. C., Berger A., Shuster J. R., Wei J. T., Varambally S., Beecher C., Chinnaiyan A. M., *Nature*, **457**, 910–914 (2009).
- Theodoridis G., Gika H. G., Wilson I. D., *Mass Spectrom. Rev.*, 2011. (in press)
- Drexler D. M., Reily M. D., Shipkova P. A., *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 2645–2653 (2011).