

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	HPLC を用いた新規リゾフォスファチジルコリン分析法の確立
キーワード	① リゾフォスファチジルコリン、② 簡易分析法の開発、③ 誘導体化

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ナガセ ミドリ 永瀬 翠
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東京工科大学 応用生物学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東京工科大学 応用生物学部 助教
プロフィール	2015年に東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻博士前期課程を修了。その後、同大学で実験助手として勤務しながら、2018年に論文博士として博士(工学)の学位を取得し、2019年から同大学の助教として勤務。主な研究テーマは「生体内酸化ストレス」である。これまで、指導教員の共同研究により、実際の患者さんの血漿サンプル中の酸化ストレスマーカーの分析を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行ってきた。そのため、現在はHPLC分析技術を活かしながら、酸化ストレス関連の研究を行っている。

1. 研究の概要

リゾフォスファチジルコリン(LPC)は、酸化ストレスが関与しているといわれている、動脈硬化や糖尿病を含む、様々な病態における炎症マーカーとなる可能性がある。しかし現在主流となっているLPCの分析法は簡便ではなく、健康診断などで測定することは難しい。そこで本研究では、液体クロマトグラフィー(HPLC)の汎用的な検出器を用いた、生体試料中LPCの簡便で高感度な測定方法を確立することを目指した。

2. 研究の動機、目的

超高齢化社会である日本において、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病やアルツハイマー病は、国民医療費や介護などの点で問題となっており、健康面だけでなく日本の国政にとっても重要な課題の1つである。また、人生100年時代と言われる昨今、高い生活の質を保つには、このような疾病の予防や早期発見は重要である。そこで必要となるのは、これらの疾病の予兆を健康診断などで見つけることであり、その臨床マーカーとして、リゾフォスファチジルコリン(LPC)に注目した。

LPCは、図1に示したように、生体膜の主成分であるホスファチジルコリン(A)がホスホリパーゼやレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼなどの酵素によって、エステル結合している脂肪酸が1つになったもの(B)を指す。糖尿病患者では、血漿中LPCレベルが健常コントロールと比較して有意に高いこと(Rabini. R. A et al., Diabetes., 1994)、血管内でのLPCレベルの増加が長期の内皮活性とアテローム発生を引き起こすこと(Goncalves. I et al., Arterioscler. Thromb. vasc. Biol., 2012)、またアルツハイマー病患者では、血漿中LPCレベルが有意に低いこと(Mapstone. M et al., Nat. Med., 2014)

が報告されている。しかし、現在主流となっている LPC の測定方法である液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) は、技術や価格などの点で、健康診断などで測定するには困難である。そこで本研究では、LC/MS を用いない、液体クロマトグラフィー (HPLC) による LPC の新たな簡易分析法を確立することを目的とした。

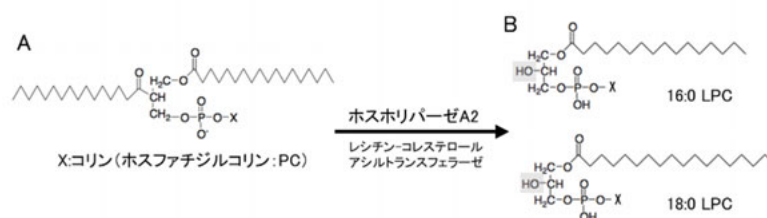


図1 リゾフォスファチジルコリン (LPC)

3. 研究の結果

本研究では、対象とする LPC を 16:0、16:1、18:0、18:1 LPC とした。これは、LPC 中にエステル結合している脂肪酸として最も多いと考えられているのが、16:0、18:0 であり、これらが酸化されると、16:1 や 18:1 LPC が生成されるためである。しかし、16:1 LPC は市販されていなかったため、分析法の確立と同時に、卵黄由来 LPC からの精製も試みた。メタノールで溶解した卵黄由来 LPC を分取用 HPLC で回収し、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) で分取したフラクションを確認したところ、質量電荷比 +516 を観察したフラクションが存在した。これは、16:1 LPC の Na^+ アダクトだと考えられ、卵黄由来 LPC から、16:1 LPC の精製が可能であることが示唆された。

LPC は、特定の吸収波長をもたないため、UV 検出器付き HPLC で測定するには、紫外吸収をもつ化合物で誘導体化する必要がある。本研究ではまず、p-ニトロベンゾイルクロリド (PNBC) を用いて、ヒドロキシ基を誘導体化することが可能か検討した。PNBC のヒドロキシ基との反応性は高いため、直接反応させる方法や、ショッテンバウマン反応での誘導体化など、様々な条件で検討したが、誘導体化されたピークの検出はできなかった。また、申請書にも記載した通り、LPC と構造が似ている 1,3-ジアシルグリセロールの誘導体化が、ピレン-1-カルボニシアニド (PPC) で可能であることがタニノらによって報告されているため (Tanino Y et al., *J Dermatol Sci Suppl.*, 2005)、PPC での誘導体化の検討も行う予定であったが、PPC の販売が終了しており、検討することができなかった。そこで、カルボニル基をラベル化する Dansyl Hydrazine、2,4-Dinitrophenylhydrazine を用いた誘導化が可能であるか検討を行った。しかし、いずれのラベル化剤でも LPC が誘導体化されたピークを検出することができなかった。以上の結果より、検討した全ての誘導体化剤での誘導化は行えなかった。しかし、触媒などの検討まではできていないため、今後のさらなる検討も必要であると考えます。

4. 研究者としてのこれからの展望

酸化ストレスは、老化や様々な病気に関与していると言われており、多くの研究が行われています。その中には、酸化ストレス亢進の生体マーカーとして有用なものも多く見出されていますが、酸化ストレスマーカーを実際の治療などで有効活用できているとは言い難いのが現状です。しかし、多くの病気で酸化ストレスが関与していることから、酸化ストレスがどのような影響を与えるかなどを詳しく明らかにすることができれば、病気の予防や、新しい治療のターゲットなどを提唱できる可能性があると考えています。そのため、酸化ストレスに関する基礎研究を進めることで、社会に貢献できるような研究者になれるよう尽力していきたいと思っています。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

まず、本研究課題の意義をご理解いただき、2022 年度若手研究者奨励金に採択していただいたこと、また、奨励金のために寄付していただいた支援者の皆様に感謝申し上げます。若手研究者奨励金は、2022 年度が初めての採択となりました。このように、若手でも奨励金をいただけるチャンスがあるということは、自身の研究や、若手研究者としてのキャリアアップにも繋がる、非常に重要な制度だと感じております。今回は一身上の都合により、研究を途中で中断せざるを得ませんでした。今後とも研究を進め、社会に還元できるよう努めてまいります。これからもご支援のほど、よろしくお願い申し上げます。