

質量分析技術を基盤とした動脈硬化性心血管疾患の リポタンパク質代謝解析

竹田, 浩章

<https://doi.org/10.15017/1931737>

出版情報 : Kyushu University, 2017, 博士 (理学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :



博士学位論文

質量分析技術を基盤とした動脈硬化性
心血管疾患のリポタンパク質代謝解析

2018年3月

九州大学大学院 システム生命科学府
システム生命科学専攻 生命医科学講座
メタボロミクス分野

竹田 浩章

目次

略称.....	4
第1章 緒論.....	7
1. 脂質の分類と代謝.....	7
1-1. 脂質とは.....	7
1-2. 脂肪酸の合成.....	8
1-3. 脂肪酸の分解.....	11
1-4. グリセロリン脂質の代謝.....	13
1-5. 脂質メディエーターの代謝.....	14
1-6. スフィンゴ脂質の代謝.....	17
1-7. コレステロールの代謝.....	18
2. 生体内の脂質の運搬体 リポタンパク質.....	21
3. 脂質代謝異常が引き起こす動脈硬化性心血管疾患.....	24
4. 研究目的.....	26
第2章 ワイドターゲット定量リピドーム解析法の構築.....	28
1. 緒言.....	28
2. 実験方法.....	32
2-1. 試薬.....	32
2-2. 実験動物.....	32
2-3. リピドーム解析用試料の調製.....	32
2-4. 脂質標準品のフローインジェクション分析条件.....	33
2-5. SFC/QqQ-MS の分析条件.....	33
2-6. 分析法の堅牢性の検証.....	34
2-7. データ解析.....	34
2-8. 統計解析.....	35
3. 結果.....	35
3-1. MRM トランジションの最適化.....	35
3-2. SFC の移動相と MS 用メイクアップ溶液の流速の最適化.....	37
3-3. 脂質クラスや異性体の高分離を目指したカラムスクリーニング.....	38
3-4. MRM 測定条件の検討.....	41
3-5. 分析法の堅牢性と定量性の検証.....	41
3-6. 分析プラットフォームの構築.....	43

4. 考察.....	44
5. 小括.....	47
第3章 リポタンパク質定量プロファイリング法の開発.....	48
1. 緒言.....	48
2. 実験方法.....	51
2-1. 試薬.....	51
2-2. 実験動物.....	51
2-3. リポタンパク質の超遠心分離.....	51
2-4. リピドーム解析用試料の調製.....	52
2-5. アポリポタンパク質定量分析用試料の調製.....	53
2-6. コレステロール, トリグリセリド, タンパク質の測定.....	54
2-7. SFC/QqQ-MS によるリピドーム解析条件.....	54
2-8. Nano-LC/QqQ-MS によるアポリポタンパク質の分析条件.....	54
2-9. アポリポタンパク質定量分析の MRM 測定条件.....	55
2-10. データ解析.....	55
2-11. 統計解析.....	56
3. 結果.....	56
3-1. ウサギの個体情報.....	56
3-2. アポリポタンパク質のトリプシン消化断片の一斉分析.....	57
3-3. Nano-LC/QqQ-MS を用いたアポリポタンパク質の定量分析.....	58
3-4. SFC/QqQ-MS を用いた血漿のリピドーム解析.....	59
3-5. リポタンパク質粒子の脂質組成の決定.....	60
4. 考察.....	61
5. 小括.....	65
第4章 総括と展望.....	66
謝辞.....	67
引用文献.....	68
論文目録.....	78
学会発表.....	80

略称

ABCA1	(Adenosine triphosphate-binding cassette transporter)	アデノシン三リン酸結合カセット輸送体
ABPR	(Active back pressure regulator)	背圧制御装置
ACAT	(Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase)	アシル補酵素 A コレステロールアシルトランスフェラーゼ
ACP	(Acyl-carrier protein)	アシルキャリアータンパク質
ADP	(Adenosine diphosphate)	アデノシン二リン酸
Apo	(Apolipoprotein)	アポリポタンパク質
APOBEC	(Apolipoprotein B-100 RNA editing catalytic subunit)	アポリポタンパク質 B mRNA 編集触媒サブユニット
ATP	(Adenosine triphosphate)	アデノシン三リン酸
BEH	(Ethylene bridged hybrid)	エチレン架橋型ハイブリッド
bHLH-Zip	(basic helix-loop-helix leucine zipper)	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパー
cAMP	(cyclic adenosine monophosphate)	環状アデノシン一リン酸
CDP-DAG	(Cytidine diphosphate diacylglycerol)	シチジン二リン酸ジアシルグリセロール
CE	(Cholesterol ester)	コレステロールエステル
Cer	(Ceramide)	セラミド
CETP	(Cholesterol ester transfer protein)	コレステロールエステル転送タンパク質
CM	(Chylomicron)	カイロミクロン
CoA	(Coenzyme A)	補酵素 A
COPII	(Coat protein complex II)	コートタンパク質複合体 II
COX	(Cyclooxygenase)	シクロオキシゲナーゼ
CVD	(Cardiovascular disease)	心血管疾患
DAG	(Diacylglycerol)	ジアシルグリセロール
DEA	(Diethylamine)	ジエチルアミン
DI	(Direct infusion)	ダイレクトインフュージョン
ELISA	(Enzyme-linked immunosorbent assay)	酵素結合免疫吸着検定法
ESI	(Electrospray ionization)	エレクトロスプレーイオン化

		法
FA	(Fatty acid)	脂肪酸
FAD	(Flavin adenine dinucleotide)	フラビンアデニンジヌクレオチド
FAS	(Fatty acid synthase)	脂肪酸合成酵素
FFA	(Free fatty acid)	遊離脂肪酸
GTP	(Guanosine triphosphate)	グアノシン三リン酸
G3P	(Glycerol 3-phosphate)	グリセロール 3-リン酸
G3PAT	(Glycerol 3-phosphate acyl transferase)	グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ
HDL	(High density lipoprotein)	高密度リポタンパク質
HDL-C	(High density lipoprotein-cholesterol)	高密度リポタンパク質コレステロール
HILIC	(Hydrophilic interaction chromatography)	親水性相互作用クロマトグラフィ
HMG-CoA	(Hydroxymethylglutaryl-CoA)	ヒドロキシメチルグルタリル
IDL	(Intermediate density lipoprotein)	中間密度リポタンパク質
INSIG	(Insulin inducing gene)	インスリン誘導遺伝子
IP ₃	(Inositol trisphosphate)	イノシトール 3 リン酸
LCAT	(Lecithin cholesterol acyltransferase)	レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ
LDL	(Low density lipoprotein)	低密度リポタンパク質
LDL-C	(Low density lipoprotein-cholesterol)	低密度リポタンパク質コレステロール
LOD	(Limit of detection)	検出限界
LOQ	(Limit of quantitation)	定量限界
LOX	(Lipoxygenase)	リポキシゲナーゼ
LPA	(Lysophosphatidic acid)	リゾホスファチジン酸
LPAAT	(Lysophosphatidic acid acyl transferase)	リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ
LPC	(Lysophosphatidylcholine)	リゾホスファチジルコリン
LPE	(Lysophosphatidylethanolamine)	リゾホスファチジルエタノールアミン

LPG	(Lysophosphatidylglycerol)	リゾホスファチジルグリセロール
LPI	(Lysophosphatidylinositol)	リゾホスファチジルイノシトール
LPL	(Lipoprotein lipase)	リポタンパク質リパーゼ
LPS	(Lysophosphatidylserine)	リゾホスファチジルセリン
LXR	(Liver x receptor)	肝臓 X 受容体
MAG	(Monoacylglycerol)	モノアシルグリセロール
MRM	(Multiple reaction monitoring)	多重反応モニタリング
mRNA	(messenger Ribonucleic acid)	メッセンジャーリボ核酸
NAD	(Nicotinamide adenine dinucleotide)	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NO	(Nitric oxide)	一酸化窒素
NPLC	(Normal phase liquid chromatography)	順相液体クロマトグラフィー
PA	(Phosphatidic acid)	ホスファチジン酸
PC	(Phosphatidylcholine)	ホスファチジルコリン
PCA	(Principal component analysis)	主成分分析
PE	(Phosphatidylethanolamine)	ホスファチジルエタノールアミン
PG	(Phosphatidylglycerol)	ホスファチジルグリセロール
PGD ₂	(Prostaglandin D ₂)	プロスタグランジン D ₂
PGE ₂	(Prostaglandin E ₂)	プロスタグランジン E ₂
PGF _{2α}	(Prostaglandin F _{2α})	プロスタグランジン F _{2α}
PGG ₂	(Prostaglandin G ₂)	プロスタグランジン G ₂
PGH ₂	(Prostaglandin H ₂)	プロスタグランジン H ₂
PGI ₂	(Prostaglandin I ₂)	プロスタグランジン I ₂
PI	(Phosphatidylinositol)	ホスファチジルイノシトール
PLA ₂	(Phospholipase A ₂)	ホスホリパーゼ A ₂
PLC	(Phospholipase C)	ホスホリパーゼ C
PS	(Phosphatidylserine)	ホスファチジルセリン
QC	(Quality control)	品質管理
QqQ-MS	(Triple quadrupole mass spectrometry)	三連四重極型質量分析
Q-TOF-MS	(Quadrupole-time of flight mass	飛行時間型質量分析

	spectrometry)	
RNA	(Ribonucleic acid)	リボ核酸
RPLC	(Reverse phase liquid chromatography)	逆相液体クロマトグラフィー
RSD	(Relative standard deviation)	相対標準偏差
RT	(Retention time)	保持時間
SCAP	(Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein)	ステロール調節配列結合タンパク質切断活性化タンパク質
SCF	(Supercritical fluid)	超臨界流体
SFC	(Supercritical fluid chromatography)	超臨界流体クロマトグラフィー
SM	(Sphingomyelin)	スフィンゴミエリン
S/N	(Signal-to-noise)	信号雑音比
SPT	(Serine palmitoyltransferase)	セリンパルミトイルトランスフェラーゼ
SREBP	(Sterol regulatory element-binding protein)	ステロール調節配列結合タンパク質
S1P	(Sphingosine-1-phosphate)	スフィンゴシン-1-リン酸
TAG	(Triacylglycerol)	トリアシルグリセロール
TCA	(Tricarboxylic acid)	トリカルボン酸
TXA ₂	(Thromboxane A ₂)	トロンボキサン A ₂
VLCFA	(Very long chain fatty acid)	極長鎖脂肪酸
VLDL	(Very low density lipoprotein)	超低密度リポタンパク質
WHHLMI rabbit (Myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit)		心筋梗塞発症遺伝性高脂血症ウサギ
1-AA	(1-aminoanthracene)	1-アミノアントラセン
2-EP	(2-ethylpyridine)	2-エチルピリジン
2-PIC	(2-picolyamine)	2-ピコリルアミン

第1章 緒論

1. 脂質の分類と代謝

1-1. 脂質とは

「脂質はカロリーが高く、肥満の原因にもなるため、できるだけ摂取をしない方がよい」。年に数回の定期健康診断の結果に一喜一憂し、このように考えている人は多いのではないか。しかし、脂質の役割はそれだけではない。脂質は生体膜の構成成分、エネルギー貯蔵物質、細胞内や細胞間のシグナル伝達として機能する重要な生体内代謝物の一つである¹⁻³⁾。脂質は大きく分けて3種類に分類することができ、これらは単純脂質、複合脂質、誘導脂質と呼ばれている^{4,5)}。単純脂質はアルコール(グリセリン、スフィンゴシン、ステロール)と脂肪酸がエステル結合あるいはアミド結合した脂質を指し、中性脂質(Monoacylglycerol, MAG; Diacylglycerol, DAG; Triacylglycerol, TAG)やコレステロールエステル(Cholesterol ester, CE)、セラミド(Ceramide, Cer)な

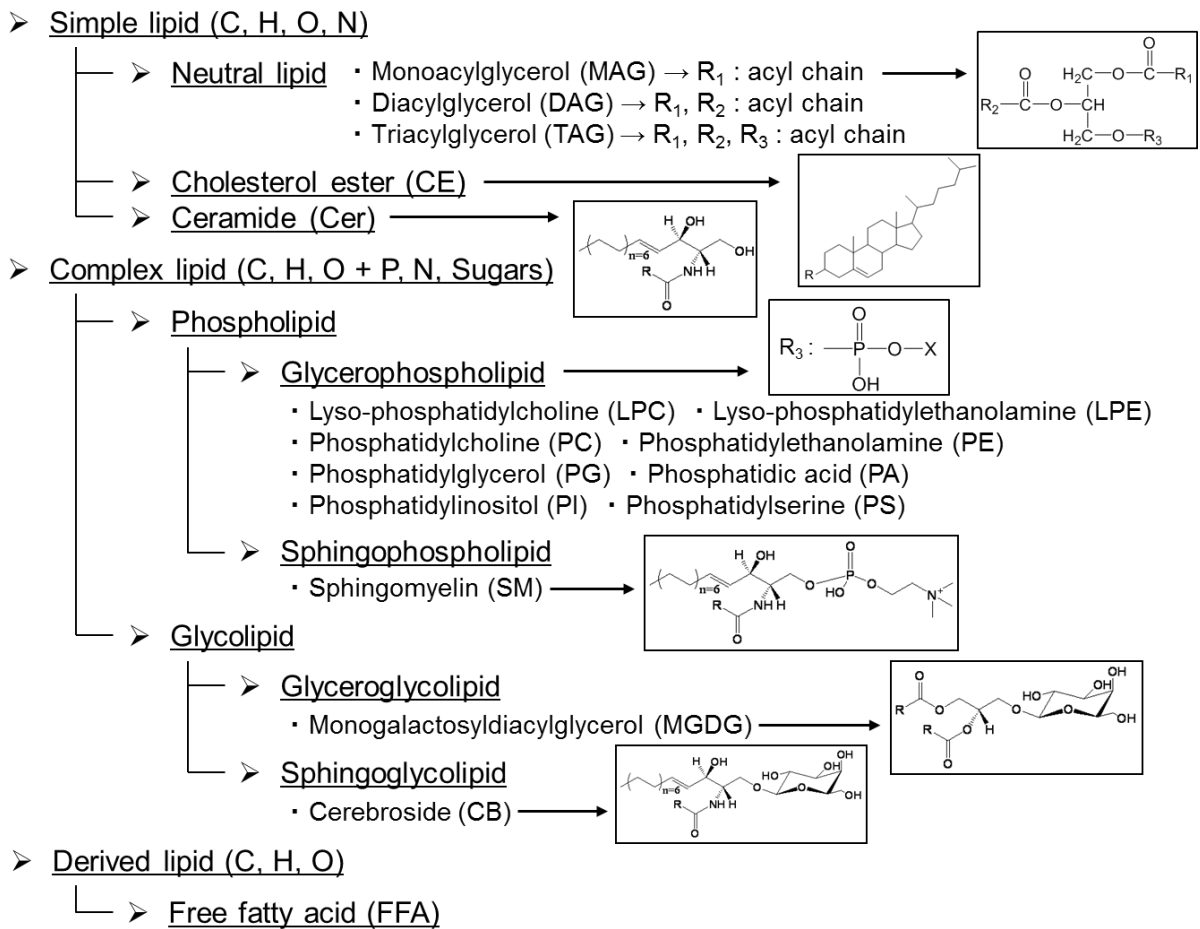


図1 脂質の分類

どが挙げられる。複合脂質はさらにリン酸や糖を含む脂質で、大きく分けてリン脂質と糖脂質が存在する。一般的にグリセリンまたはスフィンゴシンが骨格となり、骨格の違いに応じてリン脂質はグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質に、糖脂質はグリセロ糖脂質とスフィンゴ糖脂質に分類される。グリセロリン脂質は極性ヘッドグループの違いによりホスファチジルコリン (Phosphatidylcholine, PC) やホスファチジルエタノールアミン (Phosphatidylethanolamine, PE), ホスファチジルグリセロール (Phosphatidylglycerol, PG), ホスファチジン酸 (Phosphatidic acid, PA), ホスファチジルイノシトール (Phosphatidylinositol, PI), ホスファチジルセリン (Phosphatidylserine, PS) の6種類が存在する。一方、誘導脂質は単純脂質や複合脂質から加水分解によって誘導される脂質で、遊離脂肪酸やステロイド、カロテノイドなどが挙げられる (図 1)。このように、PC や TAG など骨格の違いにより分類された脂質の種類のことを脂質クラスと呼ばれている。それぞれの骨格には多種の脂肪酸が結合することから、理論的には 10000 種類以上にもおよぶ脂質分子が存在すると言われている⁶⁾。また、脂肪酸と脂質クラスの代謝が絡み合い、これらの酵素は細胞内での局在箇所・反応場が異なるため、非常に複雑で多彩な代謝経路を持つ化合物である。本節では細胞内における脂肪酸や脂質クラスの代謝、そして脂質がエネルギー貯蔵物質やシグナル伝達物質として機能し、5 大栄養素の一つである所以をそれぞれ概説する。

1-2. 脂肪酸の合成

動物細胞内の脂肪酸は、脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase, FAS) により生体内で合成されたもの、あるいは食事により摂取したものに由来する。生体内での脂肪酸合成は、炭水化物由来のグルコースやタンパク質由来のアミノ酸から代謝されたアセチル補酵素 A (Coenzyme A, CoA) から開始される。ミトコンドリアのクエン酸回路 (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) において、クエン酸シンターゼによりオキサロ酢酸とアセチル CoA から合成されたクエン酸は、トリカルボン酸輸送系と呼ばれる担体タンパク質によりミトコンドリアから細胞質へと輸送され、アデノシン三リン酸-クエン酸リアーゼによりアセチル CoA へと変換される (図 2)。アセチル CoA はアセチル CoA カルボキシラーゼによりマロニル CoA へと合成され、アシルキャリアータンパク質 (Acyl-carrier protein, ACP) と FAS により、縮合、還元、脱水、還元の4段階の反応を繰り返し行うことで炭素数を二つずつ伸長させ、最終的にパルミチン酸 (C16:0) を生産する⁷⁾ (図 3)。以上のように、炭素鎖長が 16 までの脂肪酸の合成は、

FAS によって ACP のセリン残基に付加したホスホパンテテイン基と結合したアシル ACP の状態で反応が進む。

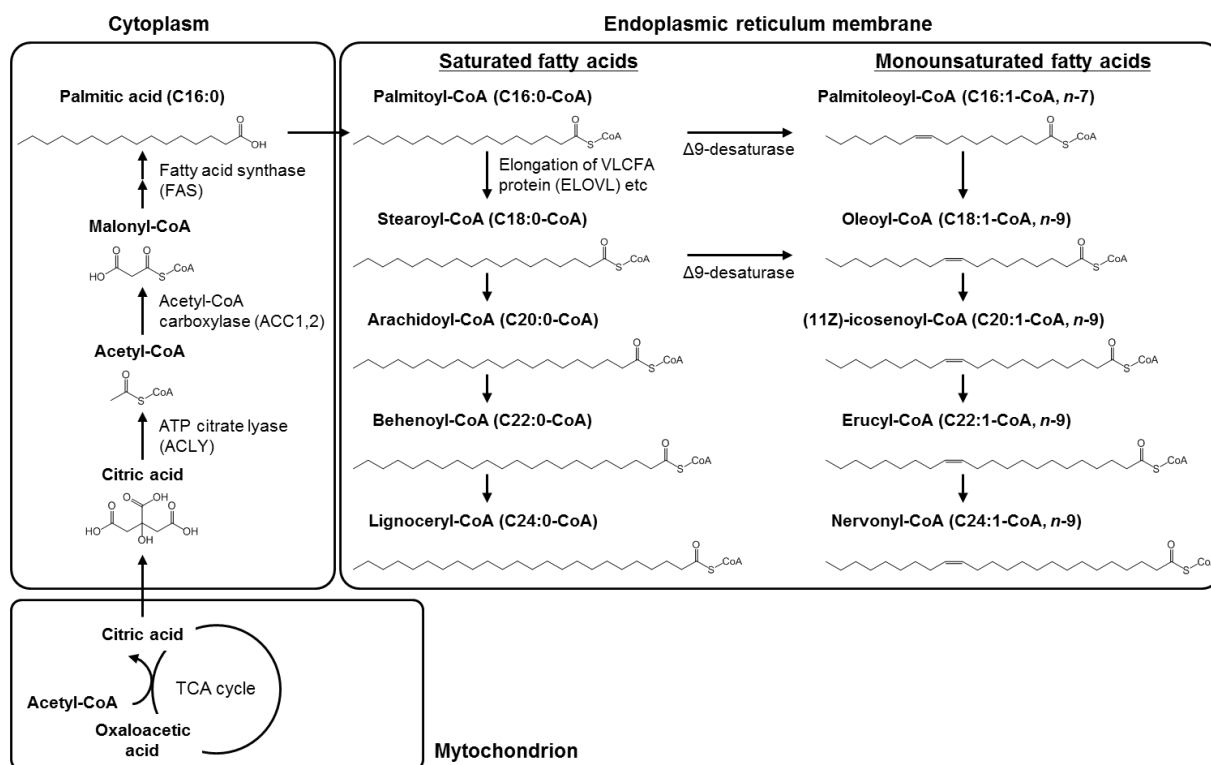
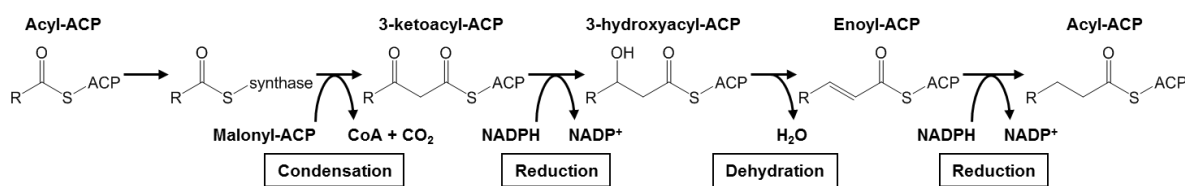


図 2 生体内における脂肪酸の合成

VLCFA (very long chain fatty acid), 極長鎖脂肪酸.

一方で、炭素鎖長が 18 以上の長鎖脂肪酸の合成は、極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体によってアシル CoA の状態で進行する (図 3)。CoA はホスホパンテテイン基と 3'-ホスホアデノシン二リン酸から構成されているため、アシル ACP およびアシル CoA はともにホスホパンテテイン基とチオエステル結合している点は同じである。細胞質で合成されたパルミチン酸 (C16:0) はパルミトイル CoA (C16:0) に変換後、小胞体膜へと輸送され、そこで極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体によりステアロイル CoA (C18:0) へと合成される⁸⁾。また、パルミトイル CoA (C16:0) やステアロイル CoA (C18:0) は、カルボキシル基から 9 番目の炭素を不飽和化する酵素である $\Delta 9$ 不飽和化酵素により二重結合が導入され、パルミトレオイル CoA (C16:1, n-7) やオレイル CoA (C18:1, n-9) へと変換される⁸⁾。ステアロイル CoA (C18:0) より長鎖の飽和脂肪酸やオレイル CoA (C18:1, n-9) より長鎖の一価不飽和脂肪酸は、同様に極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体により次々と産生される (図 2)。

・ Elongation of fatty acid (C2~C16)



・ Elongation of fatty acid (C16~)

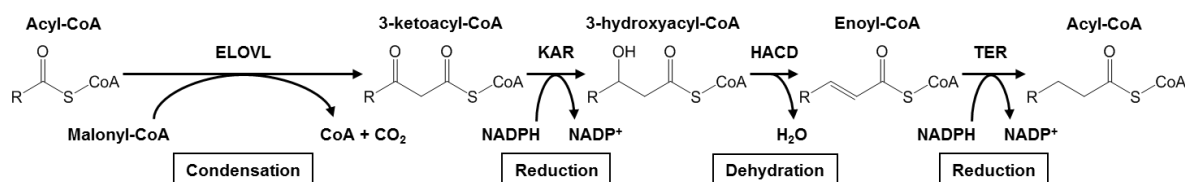


図3 4段階反応による脂肪酸の伸長

C16 までの脂肪酸合成は多機能酵素複合体である FAS によって各段階を触媒されている。

ヒトを含む動物では $\Delta 12$ 不飽和化酵素や $\Delta 15$ 不飽和化酵素をもたないため、オレイル CoA (C18:1, *n*-9) からリノレオイル CoA (C18:2, *n*-6) や α -リノレノイル CoA (C18:3, *n*-3) へ変換することはできない。したがって、それらを合成することができるその他の生物を食物として摂取する必要がある。このような脂肪酸のことを必須脂肪酸と呼ぶ。リノール酸 (C18:2, *n*-6) は脂肪酸の末端炭素から 6 番目の炭素に二重結合があることから、多価不飽和脂肪酸の中でもオメガ-6 (*n*-6) 脂肪酸と呼ばれる。体外から摂取されたリノール酸 (C18:2, *n*-6) はアシル CoA 合成酵素によりリノレオイル CoA (C18:2, *n*-6) に変換され、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素により γ -リノレノイル CoA (C18:3, *n*-6) へと変換され、極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体によりジホモ γ -リノレノイル CoA (C20:3, *n*-6) になる。さらに、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素によりアラキドノイル CoA (C20:4, *n*-6) へと変換されると、極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体による二度の伸長と $\Delta 6$ 不飽和化酵素による不飽和化、さらにペルオキシソームでの β 酸化により炭素数が 2 つ減少することで (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z)-ドコサペンタエノイル CoA (C22:5, *n*-6) が合成される⁸⁾ (図 4)。一方、 α -リノレン酸 (C18:3, *n*-3) は脂肪酸の末端炭素から 3 番目の炭素に二重結合があることから、多価不飽和脂肪酸の中でも *n*-3 脂肪酸と呼ばれ、*n*-6 脂肪酸と同様の代謝を受ける。体外から摂取された α -リノレン酸 (C18:3, *n*-3) はアシル CoA 合成酵素により α -リノレノイル CoA (C18:3, *n*-3) に変換され、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素によりステアリドノイル CoA (C18:4, *n*-3) へと変換され、極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体により (8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-エイコサテトラエノイル CoA (C20:4, *n*-3) になる。さらに、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素により (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-エイコサペンタエノイル CoA (C20:5, *n*-3) へと変換されると、極長鎖脂肪酸伸長酵素複合体による二度の伸長と $\Delta 6$ 不飽和化酵

素による不飽和化, さらにペルオキシソームでの β 酸化により炭素数が2つ減少することで(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-ドコサヘキサエノイル CoA (C22:6, *n*-3) が合成される^{8,9)}(図 4).

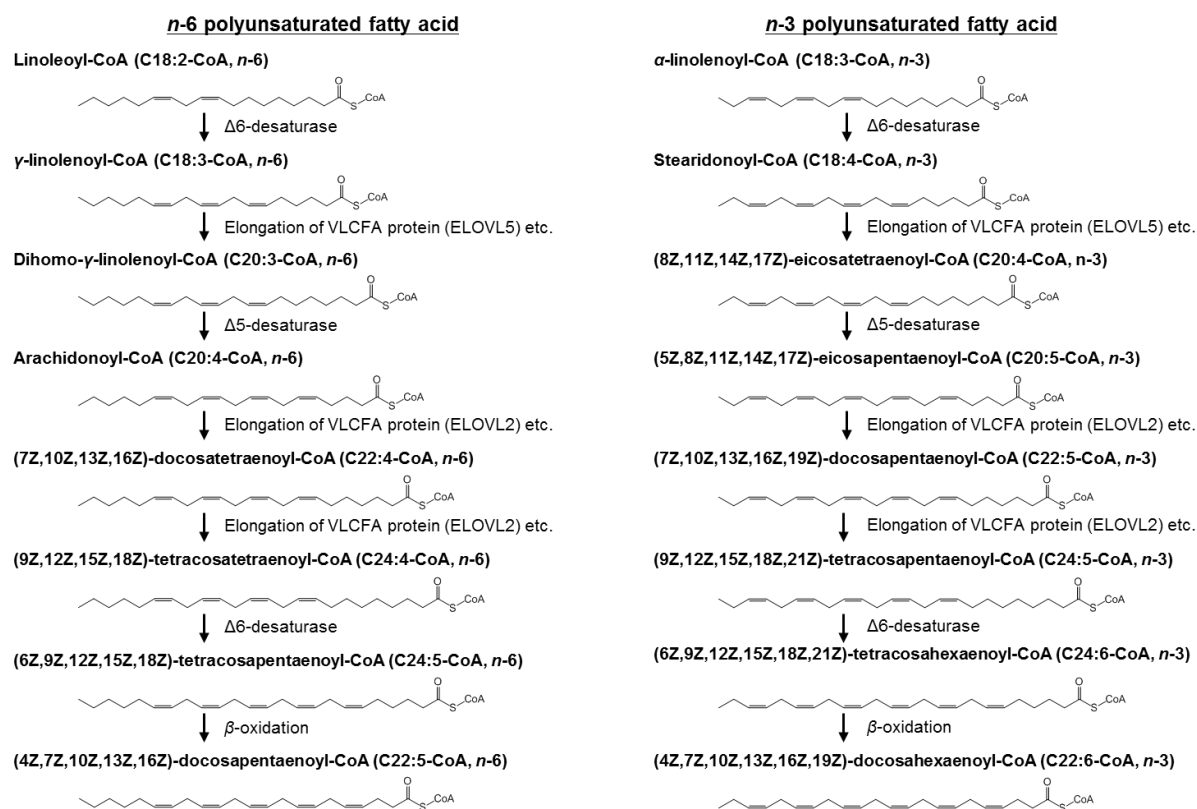


図 4 生体内における多価不飽和脂肪酸の合成

1-3. 脂肪酸の分解

ホルモン感受性リパーゼの作用によって脂肪滴に貯蔵された TAG が加水分解して生じた脂肪酸は β 酸化と呼ばれる脂肪酸の分解を繰り返すことで効率よくアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate, ATP) を産生することができる。アシル CoA はミトコンドリア内膜を透過することができないため、カルニチンアシル基転移酵素によりアシルカルニチンに変換することでミトコンドリアの膜内へと透過される。アシル CoA は1回の β 酸化により脂肪酸の炭素数が2つ減少したアシル CoA とアセチル CoA を1分子ずつ産出する(図 5)。例えばパルミチン酸からは β 酸化を7回繰り返すことで、最終的にアセチル CoA が8分子産生される。 β 酸化により産生されたアセチル CoA は TCA 回路によりグアノシン三リン酸 (Guanosine triphosphate, GTP), 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), 還

元型フラビンアデニンジヌクレオチド (Flavin adenine dinucleotide, FADH₂) を生成する. TCA 経路では, スクシニル CoA からコハク酸に代謝される過程で 1 分子の GTP, イソクエン酸からオキサロコハク酸, α-ケトグルタル酸からスクシニル CoA, L-リンゴ酸からオキサロ酢酸に代謝される過程で 3 分子の NADH, コハク酸からフマル酸に代謝される過程で 1 分子の FADH₂ が産生される. 電子伝達系において, 1 分子の NADH からは 2.5 分子の ATP, 1 分子の FADH₂ からは 1.5 分子の ATP を獲得することができる¹⁰⁾ ため, 1 分子のアセチル CoA からは 10 分子の ATP を獲得することができる. したがって, TCA 回路により 8 分子のアセチル CoA から獲得できる ATP は 80 分子である. また, 1 回の β 酸化からは, アシル CoA からエノイル CoA に代謝される過程で 1 分子の FADH₂, 3-ヒドロキシアシル CoA から 3-ケトアシル CoA に代謝される過程で 1 分子の NADH が産生される¹¹⁾ ため, パルミチン酸が 7 回の β 酸化を繰り返すことで獲得できる ATP は 28 分子である. パルミチン酸がパルミトイル CoA に活性化されるときに 2 分子の ATP が消費されるため, パルミチン酸 1 分子の β 酸化で産生できる ATP は 106 分子である (図 5).

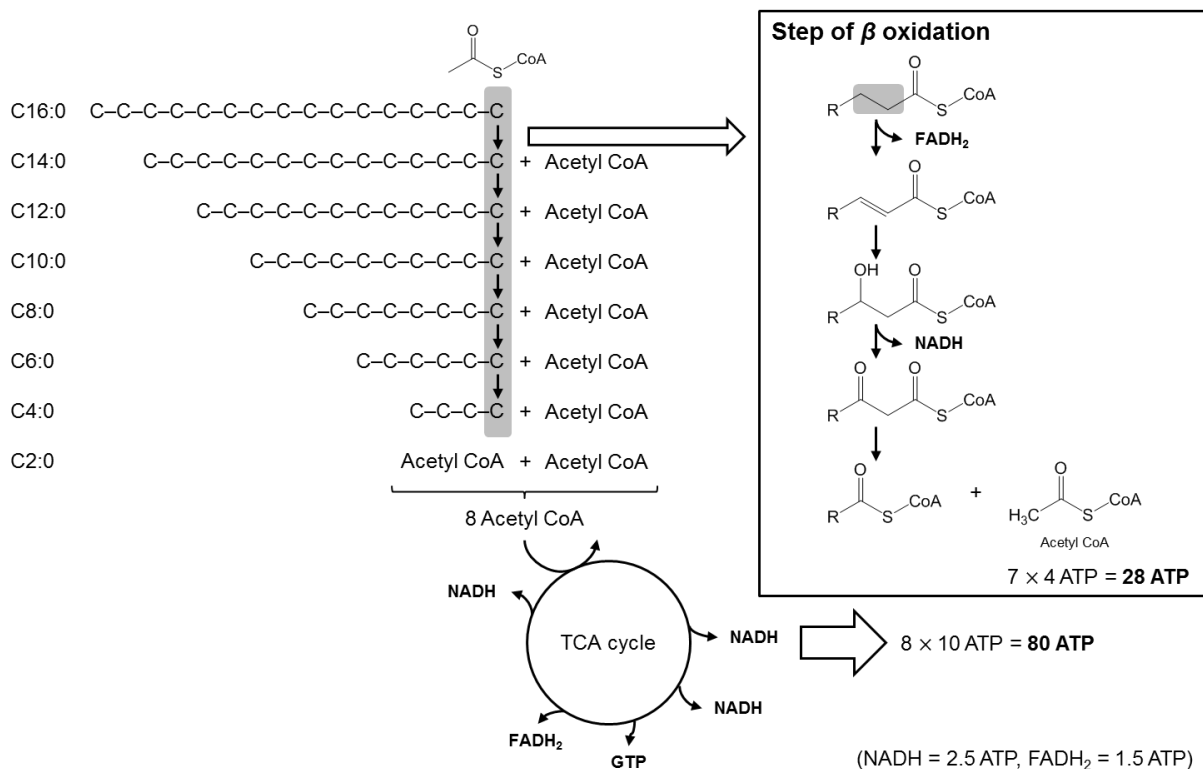


図 5 パルミチン酸 (C16:0) の分解によるエネルギーの獲得

一方, 天然にはシス型の脂肪酸が大半を占めるため, 二重結合を持つ不飽和脂肪酸を分解するためには, 途中でトランス型の脂肪酸へと変換する β 酸化以外の補助経路

が必要となる。奇数位に二重結合を持つ場合、 Δ^3 位にシス型の二重結合を持つアシル CoA に分解されるまで β 酸化が繰り返される。 Δ^3 位にシス型の二重結合を持つアシル CoA は Δ^3, Δ^2 -エノイル CoA 異性化酵素により Δ^2 位にトランス型の二重結合を持つアシル CoA へと変換され¹²⁾, β 酸化により再び分解される。一方、偶数位に二重結合を持つ場合、 Δ^4 位にシス型の二重結合を持つアシル CoA はアシル CoA 脱水素酵素により Δ^2 位にトランス型、 Δ^4 位にシス型の二重結合を持つアシル CoA へと変換され、2,4-ジエノイル-CoA 異性化酵素により Δ^3 位にトランス型の二重結合を持つアシル CoA へと変換される¹³⁾。この脂肪酸は Δ^3, Δ^2 -エノイル CoA 異性化酵素により Δ^2 位にトランス型の二重結合を持つアシル CoA へと変換され¹²⁾, β 酸化により再び分解される。このように、脂肪酸は生体内におけるエネルギー源として非常に優れており、エネルギーとして使用されない場合は脂肪組織で TAG として貯蔵される。

1-4. グリセロリン脂質の代謝

生体膜の構成成分であるグリセロリン脂質は、解糖系で合成されるグリセロール 3-リン酸 (Glycerol 3-phosphate, G3P) から代謝が開始される。G3P 脱水素酵素によりジヒドロキシアセトンリン酸から代謝された G3P は、G3P アシル基転移酵素 (Glycerol 3-phosphate acyl transferase, G3PAT) によって *sn*-1 位がアシル化されることでリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) へと代謝され、さらに LPA アシル基転移酵素 (LPA acyl transferase, LPAAT) によって *sn*-2 位がアシル化されることで PA へと代謝される¹⁴⁾。PA からは DAG とシチジン二リン酸ジアシルグリセロール (Cytidine diphosphate diacylglycerol, CDP-DAG) に代謝されることで 2 つに分岐される。DAG からは PC と PE に代謝され、いずれも PS へと代謝される。ほかにも、DAG から TAG へと変換される経路も存在する。一方、CDP-DAG からは PS や PI, PG へと代謝され、PG からはさらにカルジオリピンへと変換される。この一連の代謝経路はケネディー経路と呼ばれ、グリセロリン脂質の生合成経路として広く知られている¹⁵⁾。しかし、DAG や CDP-DAG より下流の代謝経路では、*sn*-3 位に存在する極性ヘッドグループの変化のみであり、*sn*-1 位や *sn*-2 位に存在する脂肪酸自体は変化しないため、ケネディー回路のみではグリセロリン脂質に結合している脂肪酸側鎖の多様性について説明することができなかった。その後、生合成されたグリセロリン脂質の脂肪酸側鎖を入れ替えるリモデリング経路としてランズ経路の存在が明らかとなり、この疑問の解決に至った¹⁶⁾。ケネディー経路で合成されたグリセロリン脂質はホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) によって *sn*-2 位の脂肪酸側鎖が加水分解され、リゾリン脂質

が生成される。これらのリゾリン脂質はアシル基転移酵素によって *sn*-2 位が再度アシル化されることで、様々な脂肪酸側鎖を持つグリセロリン脂質が合成される¹⁷⁾。このように、グリセロリン脂質はケネディー経路とランズ経路により多様に存在し、生体膜の構成成分としての機能を果たすと考えられている (図 6)。

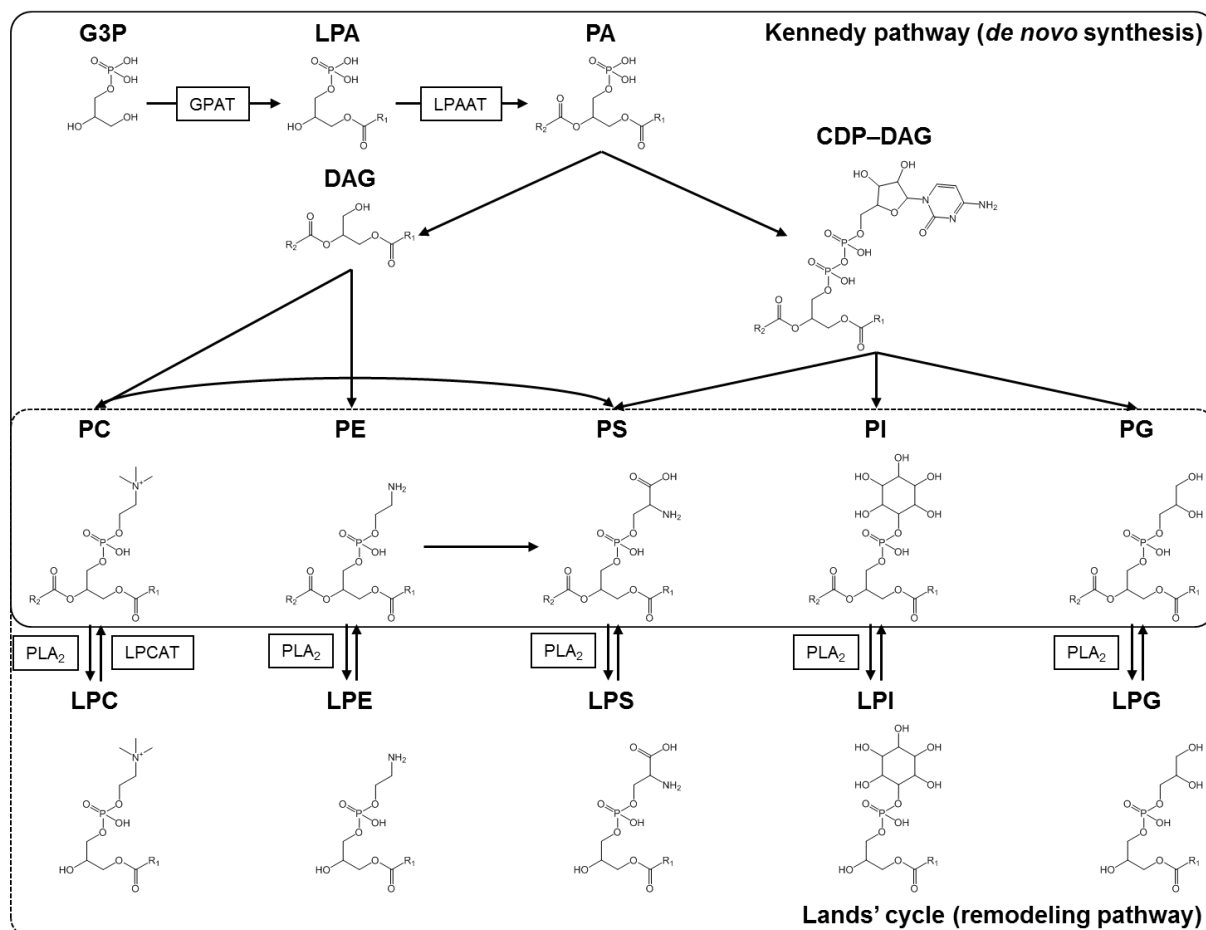


図 6 グリセロリン脂質の生合成経路
R₁ と R₂ は脂肪酸のアルキル基を示す。

1-5. 脂質メディエーターの代謝

細胞膜リン脂質は PLA₂ により各種脂肪酸が切り出され、脂質メディエーターと呼ばれる生理活性物質に代謝される。急性炎症期では血管透過性が亢進することで血漿成分が局所に漏出し、好中球が血管外遊走を介して炎症局所へと集まる。炎症局所へ浸潤した好中球は組織に侵入した細菌や侵襲物を貪食し、活性酸素やタンパク質分解酵素により分解することで排除する。その後、炎症局所へ浸潤したマクロファージは好中球を貪食し、自身でアポトーシスを引き起こすか、血漿とともにリンパ管から除

去されることで炎症が収束する。この一連の炎症過程において、オメガ 6 脂肪酸であるアラキドン酸 (C20:4, *n*-6) からシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase, COX) やリポキシゲナーゼ (Lipoxygenase, LOX) により産生されるエイコサノイド (プロスタグランジンやロイコトリエン) が中心的役割を果たすことが知られている^{18,19)}。

COX にはシクロオキシゲナーゼ活性部位とペルオキシダーゼ活性部位が存在し、前者はアラキドン酸からプロスタグランジン G₂ (Prostaglandin G₂, PGG₂), 後者は PGG₂ から PGH₂ を産生する。さらに、PGH₂ からは特異的な合成酵素により血小板や好中球などで各種プロスタグランジン (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) やプロスタサイクリン (PGI₂), トロンボキサン (Thromboxane A₂, TXA₂) へと変換され、細胞膜に存在する特異的な受容体 (Type D prostanoid receptor, DP; EP1~EP4; FP; IP; TP) と結合することでそれぞれ異なる生理活性を示す^{20,21)}。例えば PGE₂ は血管拡張作用により血流を増大させることで発赤や熱感を引き起こす。また、マスト細胞に存在する EP3 受容体に作用することでマスト細胞を活性化させ、脱顆粒により放出されたヒスタミンが血管透過性を亢進させることで腫脹を引き起こす²²⁾。一方、このような炎症惹起作用以外にも胃の粘膜保護作用などをもたらすことが報告されている。PGI₂ と TXA₂ は両者の拮抗作用を介することで血行動態の恒常性の維持に重要な役割を果たす²³⁾。主に血管内皮細胞で産生される PGI₂ は血小板に存在する IP に結合し、アデニル酸シクラーゼを活性化させることで血小板内の環状アデノシン一リン酸 (cyclic Adenosine monophosphate, cAMP) の濃度を上昇させる。さらに、cAMP により活性化された cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素は種々のタンパク質をリン酸化させることで血小板の機能を抑制させる。一方、血小板で産生された TXA₂ は血小板から放出され、オートクライン的に血小板の活性化を増幅させる。血小板から脱顆粒した物質は血小板の特異的な受容体に結合し、ホスホリパーゼ C (Phospholipase C, PLC) を活性化させることでイノシトール 3 リン酸 (Inositol trisphosphate, IP₃) の産生を高める。IP₃ は小胞体に存在する IP₃ 受容体に結合することで小胞体からカルシウムを放出させ、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。これにより PLA₂ が活性化され、TXA₂ が合成される。PGI₂ と TXA₂ は互いに拮抗し、両者のバランスにより血小板の機能は調整されている²³⁾。

好中球や単球、マクロファージなど、骨髄由来の白血球で発現量の多い 5-LOX は 5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (5-Lipoxygenase activating protein, FLAP) により活性化され、アラキドン酸から 5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸を経てロイコトリエン A₄ (Leukotriene A₄, LTA₄) を産生する。さらに、LTA₄ 加水分解酵素存在下ではロイコトリエン B₄ (Leukotriene B₄, LTB₄) へと変換される²⁴⁾。このようにロイコトリエンは急性炎症の早期に産生され、気管支の収縮作用や白血球の遊走の促進な

どといった生理活性を示す。その後、PGD₂やPGE₂は上皮作用に作用してマクロファージの15-LOXを誘導し、アラキドン酸から15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸を経てリポキシンA₄ (Lipoxin A₄, LXA₄) やリポキシンB₄ (Lipoxin B₄, LXB₄) が産生される。リポキシンは好中球の遊走を抑制するほか、マクロファージの遊走を活性化させることで炎症の収束を誘導する²⁵⁾。また、リポキシンはLTA₄からも産生されることが報告されている。通常、LTA₄は加水分解酵素存在下でLTB₄へと変換されるが、炎症部位に血小板が浸透することで、血小板で発現量の多い12-LOXが作用し、LXA₄やLXB₄へと変換される。

さらに近年、代表的なオメガ3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (C20:5, *n*-3) やドコサヘキサエン酸 (C22:6, *n*-3) からレゾルビンやプロテクチンといった強力な炎症収束作用を有するメディエーターを産生することが新たに報告され、炎症の収束が能動的に行われていることが認識されはじめている^{26,27)} (図7)。エイコサペンタエン酸 (C20:5, *n*-3) は血管内皮細胞でアスピリンによってアセチル化されたCOX-2あるいは微生物由来のシトクロムP450によって18R-ヒドロキシエイコサペンタエン酸へ

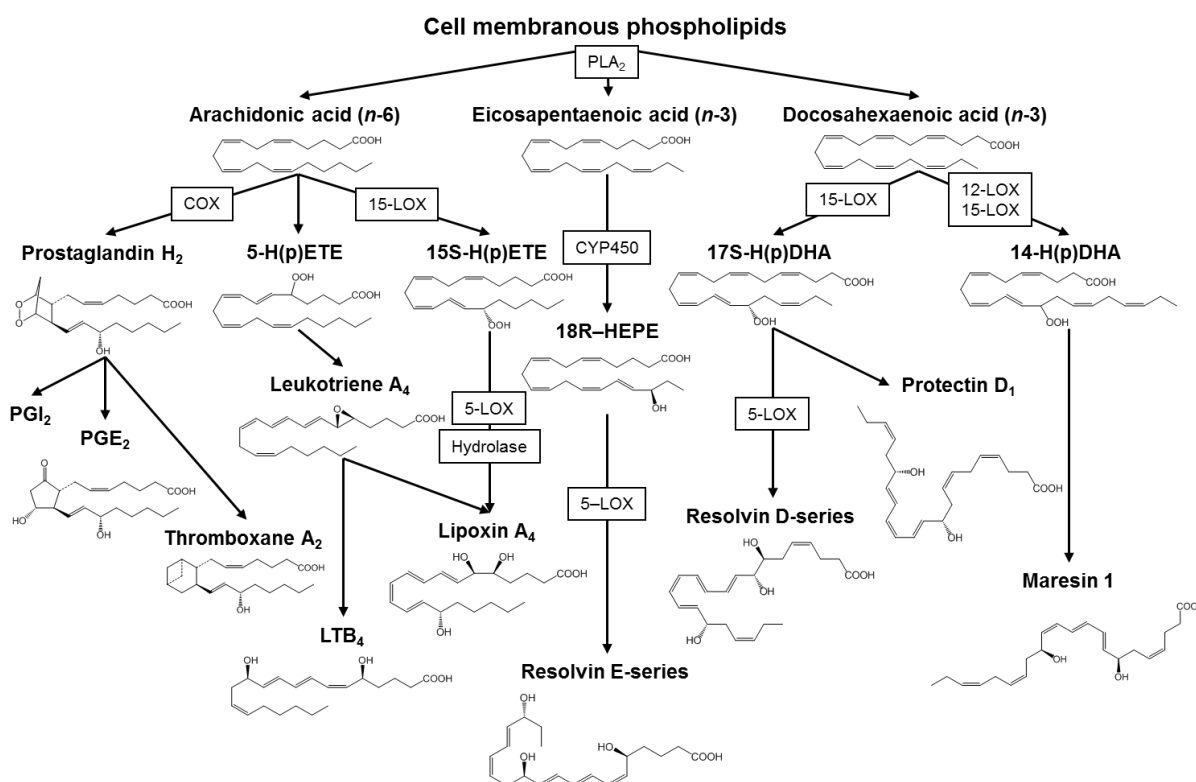


図7 脂質メディエーターの産生経路

HEPE (hydroxyeicosapentaenoic acid), ヒドロキシエイコサペンタエン酸; H(p)DHA (hydroperoxydocosahexaenoic acid), ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸, H(p)ETE (hydroperoxyeicosatetraenoic acid), ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸。

と変換され、さらに活性化された好中球の 5-LOX によりレゾルビン E1 が産生される。レゾルビン E1 は好中球の浸潤を抑制するほか、単球の血管外への遊出を促進することでマクロファージが好中球を貪食する作用を促進させ、マクロファージのリンパ管からの除去を促進する作用を持つ。一方、ドコサヘキサエン酸 (C22:6, *n*-3) からはアセチル化された COX-2 あるいは 15-LOX により 17-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸に変換され、さらに 5-LOX によりレゾルビン D が産生される。また、17-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸はエポキシド中間体を経てプロテクチン D1 へと変換される。プロテクチン D1 は好中球の浸潤を抑制したり、マクロファージの貪食を促進させたりするほか、神経細胞の保護作用を持つ。このように、脂質メディエーターは細胞膜のリン脂質から切り出された脂肪酸から産生されるが、いずれも蓄積されずに速やかに細胞外へと放出され、局所で生物活性を発揮する。また、細胞外に放出された脂質メディエーターはすぐに不活性型へと変換されるため、半減期は非常に短いことが特徴である。

1-6. スフィンゴ脂質の代謝

スフィンゴ脂質はグリセロリン脂質同様に生体膜の構成成分として機能するほか、細胞内外のシグナル伝達物質として機能を果たすことが明らかになってきている²⁸⁾。ス

フィンゴ脂質の代謝は、セリンパルミトイル転移酵素 (Serine palmitoyltransferase, SPT) によって L-セリンとパルミトイル CoA が縮合反応し、3-ケトジヒドロスフィンゴシンへと代謝されることで開始される。3-ケトジヒドロスフィンゴシンからはジヒドロスフィンゴシンに還元され、アミノ基が脂肪酸とアミド結合することでジヒドロセラミドを形成する。さらにジヒドロセラミドの塩基の部分に不飽和化酵素により二重結合が形成されることで Cer へと代謝される。Cer からはヒドロキシ基に糖が付加したスフィンゴ糖脂質やホスホコリンが付加したスフィンゴミエリン (Sphingomyelin, SM) のほか、加水分解によりスフィンゴシンへと代謝される。Cer の合成までは小胞体で行われるものの、Cer からスフィンゴシンの代謝に必要なセラミダーゼの活性は小胞体膜上では弱いため、*de novo* 合成により産生されたセラミドからは直接代謝されない。小胞体からゴルジ体へ輸送された Cer はスフィンゴミエリン合成酵素により SM へと代謝される。一方、スフィンゴミエリナーゼによって SM から生成された Cer は、リソソームもしくは細胞膜でセラミダーゼにより加水分解されることでスフィンゴシンへと代謝され、最終的にスフィンゴシンキナーゼによるリン酸化を経てスフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate, S1P) へと代謝される。この一連の

代謝過程はスフィンゴミエリンサイクルと呼ばれている²⁹⁾。S1Pは小胞体に局在しているS1Pホスファターゼによる脱リン酸化もしくはS1Pリアーゼによる分解を受け、それぞれスフィンゴシンとヘキサデセナールを経て、スフィンゴ脂質もしくはグリセロリン脂質へと代謝される。S1Pリアーゼ経路を介したグリセロリン脂質への代謝は古くから知られていたが、近年これらの代謝に関与する酵素が発見され、S1Pがヘキサデセン酸、ヘキサデセノイル CoA を介し、パルミトイル CoA へと代謝される機構が明らかとなった³⁰⁾ (図 8)。

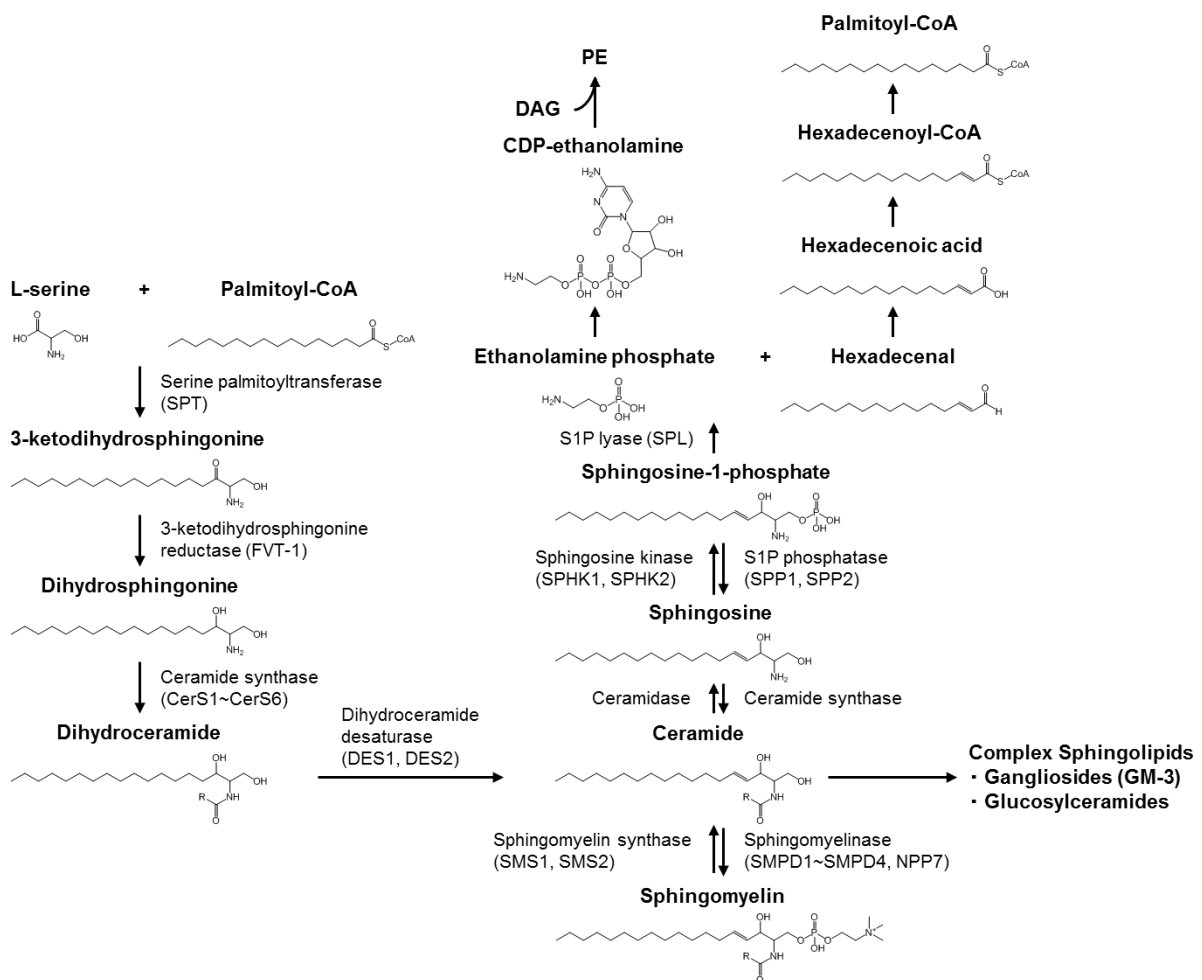


図 8 スフィンゴ脂質の生合成経路

1-7. コレステロールの代謝

コレステロールは脂肪酸と同様にアセチル CoA から代謝が開始され、多段階の反応を経て合成される。2分子のアセチル CoA は縮合することでアセトアセチル CoA を生成し、3分子目のアセチル CoA とアセトアセチル CoA の縮合と加水分解により

3-ヒドロキシ-3-メチルグリタリル CoA (Hydroxymethylglutaryl-CoA, HMG-CoA) へと代謝される。HMG-CoA は HMG-CoA 還元酵素によってアルデヒド中間体を経てメバロン酸へと還元される。メバロン酸は二度のリン酸化によりメバロン酸 5-二リン酸へと変換され、第三級ヒドロキシ基のリン酸化と、次いでリン酸イオンの脱離と脱炭酸によりイソペンテニル二リン酸へと変換される。イソペンテニル二リン酸は異性化酵素によりジメチルアリル二リン酸へと異性化され、2 分子のイソペンテニル二リン酸との結合反応によりファルネシル二リン酸が生成される。ファルネシル二リン酸は還元的二量化によりスクアレンを生成し、さらに環化を経てラノステロールを生成する。ラノステロールは三度に渡る脱メチル化、異性化酵素などによる二重結合の移動、還元酵素による二重結合の還元を経て最終的にコレステロールへと代謝される³¹⁾ (図 9)。

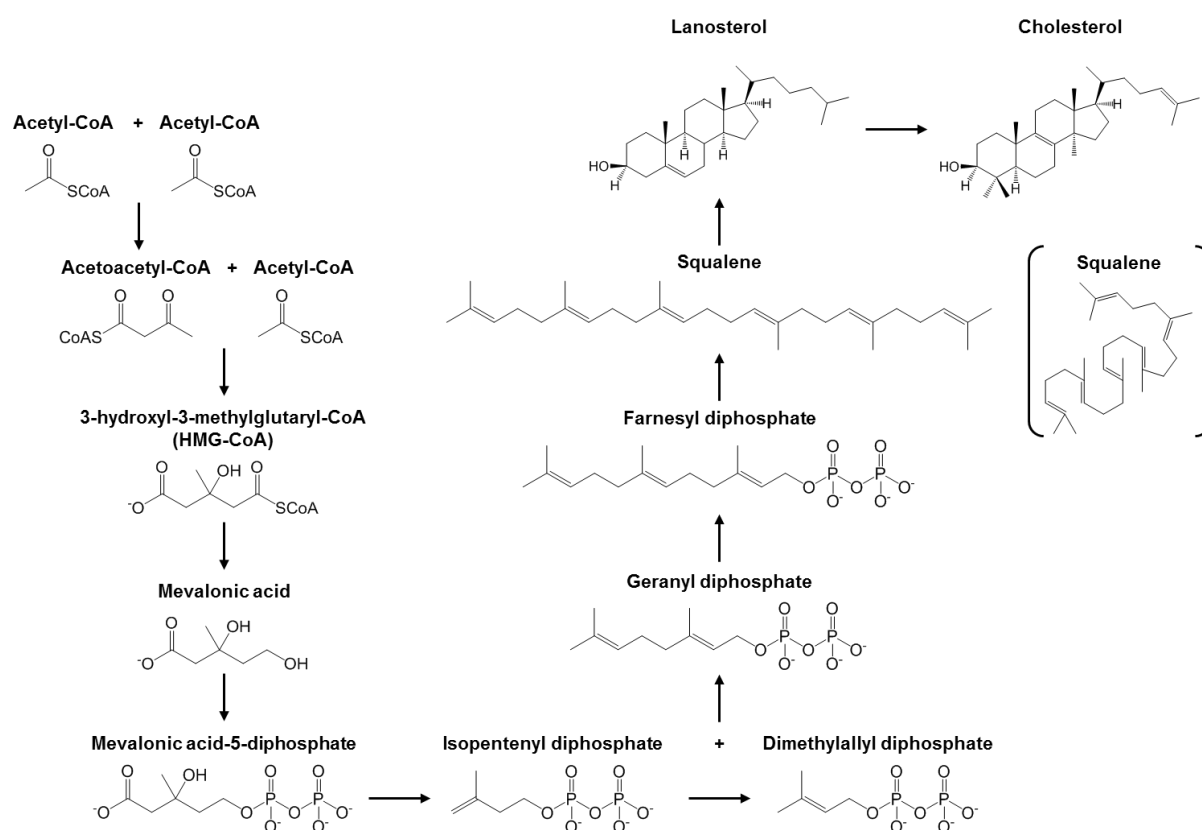


図 9 コレステロールの生合成経路

コレステロールは細胞膜の構成成分として機能し、細胞内コレステロール濃度を厳密に制御することは、細胞における機能の恒常性を維持するために必要不可欠である。細胞内のコレステロール濃度が十分に存在しない時、脂質合成酵素群の遺伝子発現を亢進させる転写因子としてステロール調節配列結合タンパク質 (Sterol regulatory element-binding protein, SREBP) が発見された³²⁾。SREBP は 3 種類のアイソフォーム

が存在し、これらは SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 と呼ばれる。SREBP はいずれも約 1100 アミノ酸から構成され、分子量も約 120 kDa にもおよぶ。N 末端には酸性アミノ酸を多く含む転写活性化領域、その後方には転写因子の機能に必須な塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパー (basic helix-loop-helix leucine zipper, bHLH-Zip) 領域を持つ。さらに後方には二箇所の膜貫通領域を持ち、これにより小胞体では N 末端と C 末端の両側が細胞膜に突き出す形で存在する。SREBP は小胞体膜で 8 回の膜貫通領域を持つ SREBP 切断活性化タンパク質 (SREBP cleavage-activating protein, SCAP) と C 末端側同士で結合し、二量体を形成する。十分なコレステロール濃度が維持されていると、SCAP に存在するステロールセンシングドメインにコレステロールが結合し、構造変化した SCAP をインスリン誘導遺伝子 (insulin inducing gene, INSIG) が認識することで三量体を形成する。これにより SREBP は不活性型として小胞体に留まることができる。しかし、細胞内コレステロール濃度が不足すると INSIG との三量体の形成は抑制され、SREBP-SCAP 複合体はコートタンパク質複合体 II (coat protein complex II, COPII) 小胞によりゴルジ体へと輸送される。セリンプロテアーゼである第 1 切断酵素 (site 1 protease, S1P) は SREBP の二箇所の膜貫通領域の間のループ部位を切断する。二分割された SREBP の N 末端側は少しだけ構造を変化させ、さらにメタロプロテアーゼである第 2 切断酵素 (site 2 protease, S2P) により切断される。プロセッシングにより SREBP は N 末端側の約 500 アミノ酸となり、分子量は 70 kDa 程度にまで減少する。活性化された SREBP は核へと移行し、脂質合成酵素群の遺伝子発現を亢進させることで機能を発揮する (図 10)。

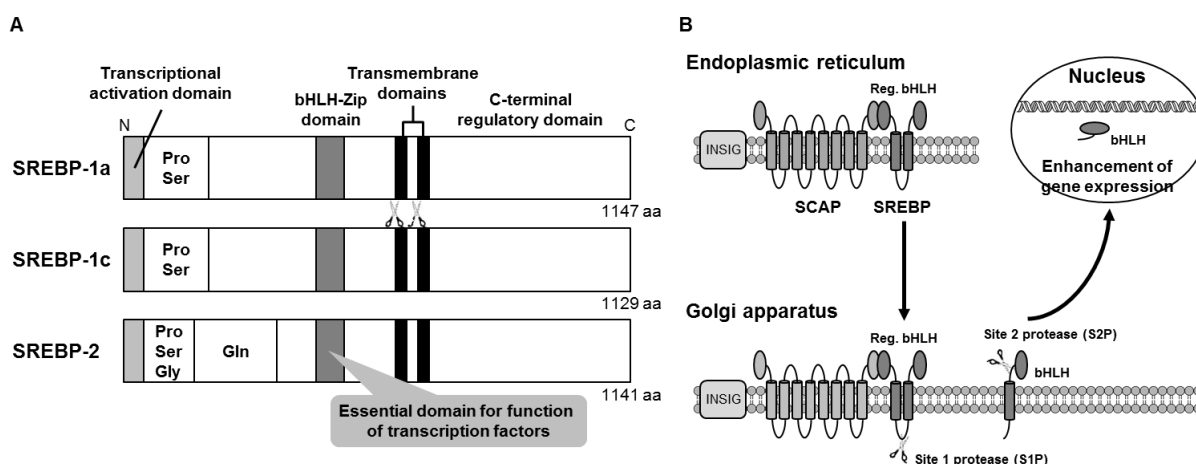


図 10 SREBP による脂質合成の活性化

(A) SREBP の構造 (B) SREBP のプロセッシング機構

それぞれの領域において豊富に含まれているアミノ酸を記した。

SREBP-1c は主に脂肪酸合成の制御，SREBP-2 は主にコレステロール合成の制御を行い，これらは独立して制御されている．核内受容体ファミリーの一員である肝臓 X 受容体 (liver x receptor, LXR) は酸化コレステロールをリガンドとして活性化される受容体である³³⁾．細胞内でコレステロールが過剰に存在すると，酸化コレステロールの濃度は上昇し，LXR は活性化される．これにより SREBP-1c の発現が上昇すると，脂肪酸合成を亢進し，遊離コレステロールを CE に変換することで貯蔵する．一方，酸化コレステロール濃度が上昇すると INSIG と結合し，SREBP-2 は三量体を形成して小胞体膜上に留まるため，プロセッシングによる活性を抑制することでコレステロールの合成を低下させる．このように，脂質は細胞内で複雑に代謝され，SREBP によって厳密に制御されている．

2. 生体内の脂質の運搬体 リポタンパク質

細胞内で代謝された脂質は血管を通過して輸送されるが，脂質は疎水性が高いため，血液中に溶解込むことができない．そこで，疎水性の高いコレステロールエステルや TAG は，親水基をもつリン脂質や遊離コレステロール，アポリポタンパク質で周囲を覆うことでリポタンパク質を形成し，血液を介した脂質の運搬を可能としている³⁴⁾．リポタンパク質は密度の違いによりカイロミクロン (Chylomicron, CM)，超低密度リポタンパク質 (Very low density lipoprotein, VLDL)，中密度リポタンパク質 (Intermediate density lipoprotein, IDL)，低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein, LDL)，高密度リポタンパク質 (High density lipoprotein, HDL) に分類され，これらの代謝はアポリポタンパク質により制御されている．

アポリポタンパク質はリポタンパク質粒子に固定される非交換性と，リポタンパク質粒子に固定されない交換性に分類される³⁵⁾．アポリポタンパク質 B (apolipoprotein B, apoB) は非交換性アポリポタンパク質に属し，これらのサブクラスは産生場所や局在場所が異なる．非交換性アポリポタンパク質の apoB-100 は 4500 アミノ酸残基以上からなる非常に大きな分子であり，VLDL や LDL の構成成分として apoB 遺伝子から肝臓で転写・翻訳されることで産生される．また，apoB-100 は LDL 受容体の主要なリガンドとして作用する．リボ核酸 (Ribonucleic acid, RNA) 編集を行うファミリーの一つとして知られているアポリポタンパク質 B mRNA 編集触媒サブユニット (apolipoprotein B-100 RNA editing catalytic subunit-1, APOBEC1) は，小腸において apoB-100 をコードする伝令 RNA (messenger RNA, mRNA) に含まれるシトシンをウラシルに変換し，CAA (グルタミン酸) から終止コドン (UAA) へと変換することで短縮化された

mRNA となる^{36,37)}。これにより小腸で生成されるタンパク質は apoB-100 の N 末端側の 48% で構成される由来から apoB-48 と呼ばれ、主に CM に包含されることで小腸からの脂質の吸収に重要な役割を果たす。このように一つの mRNA からは 2 種類のアポリポタンパク質が生成され³⁸⁾、apoB-100 は血液中の apoB の約 98% を占める。一方、apoA, apoC, apoE などその他のアポリポタンパク質は交換性アポリポタンパク質に属し、apoB 同様に産生場所や局在場所が異なるうえ、機能自体も全く異なる。

リポタンパク質は食事により取り込まれた脂質を運搬する外因性経路と肝臓で合成された脂質を運搬する内因性経路において、アポリポタンパク質により制御されることでそれぞれ機能を果たす。食事により摂取した食物は胃に蓄えられ、粘液や塩酸、ペプシノーゲンなどといった胃液により食物を吸収しやすい形にまで分解させた後、十二指腸へと送り出される。食物に含まれる中性脂肪は十二指腸で胆汁により乳化され、膵液に含まれるリパーゼにより脂肪酸、MAG、グリセロールに加水分解される。水溶性のグリセロールは小腸から吸収されるが、MAG や脂肪酸は水溶性が低くほとんど吸収されないため、腸内に分泌された胆汁酸によりミセルを形成して吸収される。吸収された長鎖脂肪酸や MAG は再び TAG に戻り、apoB-48 と結合して CM を形成する³⁹⁾。CM はリンパ管から大循環系に入り、全身へと輸送される。TAG は骨格筋や心臓、脂肪組織などへと循環する過程でリポタンパク質リパーゼによる加水分解を受け、生成した遊離脂肪酸は各組織へと取り込まれる。組織に取り込まれた遊離脂肪酸は、骨格筋や心臓ではエネルギーとして使用され、脂肪組織では TAG として貯蔵される。一方、組織に取り込まれない遊離脂肪酸は、血液中のアルブミンと結合することで引き続き循環する。リポタンパク質リパーゼにより分解された CM は CM レムナントとなり、最終的に apoE 受容体を介して肝臓へと取り込まれる。炭素数が 13 個以上の長鎖脂肪酸とは異なり、炭素数が 8 個から 12 個の中鎖脂肪酸は CM を形成せず遊離脂肪酸のまま門脈から肝臓へと輸送され、エネルギー源としてミトコンドリア内で代謝される。

食事により取り込まれた脂質や生体内で産生された脂質は VLDL を形成して血液中に分泌され、末梢組織へ輸送される。この輸送過程において、VLDL に含まれる TAG は CM と同様にリポタンパク質リパーゼにより加水分解を受け、遊離脂肪酸は各組織へと取り込まれる。この IDL へ代謝される過程では apoC が制御を行い、apoC-II はリポタンパク質リパーゼを活性化する一方、apo C-III はリポタンパク質リパーゼを抑制する。IDL は apoE を介して肝臓の LDL 受容体に結合することで肝臓に取り込まれるか、肝性リパーゼによりさらに TAG が加水分解を受け、LDL へと変換する⁴⁰⁾。LDL は apoB-100 をリガンドとして LDL 受容体に結合し、クラスリン被覆小胞を介したエ

ンドサイトーシスによって取り込まれる。LDL を取り込んだ小胞はエンドソームに取り込まれてリソソームへと輸送され，コレステロールやグリセロール，脂肪酸，アミノ酸などに分解される。細胞内で余剰なコレステロールはアシル CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ (Acyl-CoA cholesterol acyltransferase, ACAT) によって CE へと変換され，脂肪滴に貯蔵される。また，LDL 受容体はリサイクリングエンドソームにより細胞膜へと輸送されることで再利用される。

一方，HDL はコレステロールの逆輸送において重要な役割を果たす。新生 HDL は末梢組織において細胞膜表面に接着し，アデノシン三リン酸結合カセット輸送体 (adenosine triphosphate-binding cassette transporter, ABCA1) と呼ばれるトランスポーターにより遊離コレステロールを引き抜く⁴¹⁾。遊離コレステロールは HDL の主要な構成成分である apoA-I を補因子とし，新生 HDL 表面に存在するレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (Lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) により脂肪酸とエステル結合することで疎水性の高い CE へと変換され，HDL の内部に移行する。これにより円盤状の新生 HDL は球状の HDL₃ へとリモデリングする。さらに HDL₃ は細胞膜から遊離コレステロールを引き抜き，同様に CE を内部へと移行させること

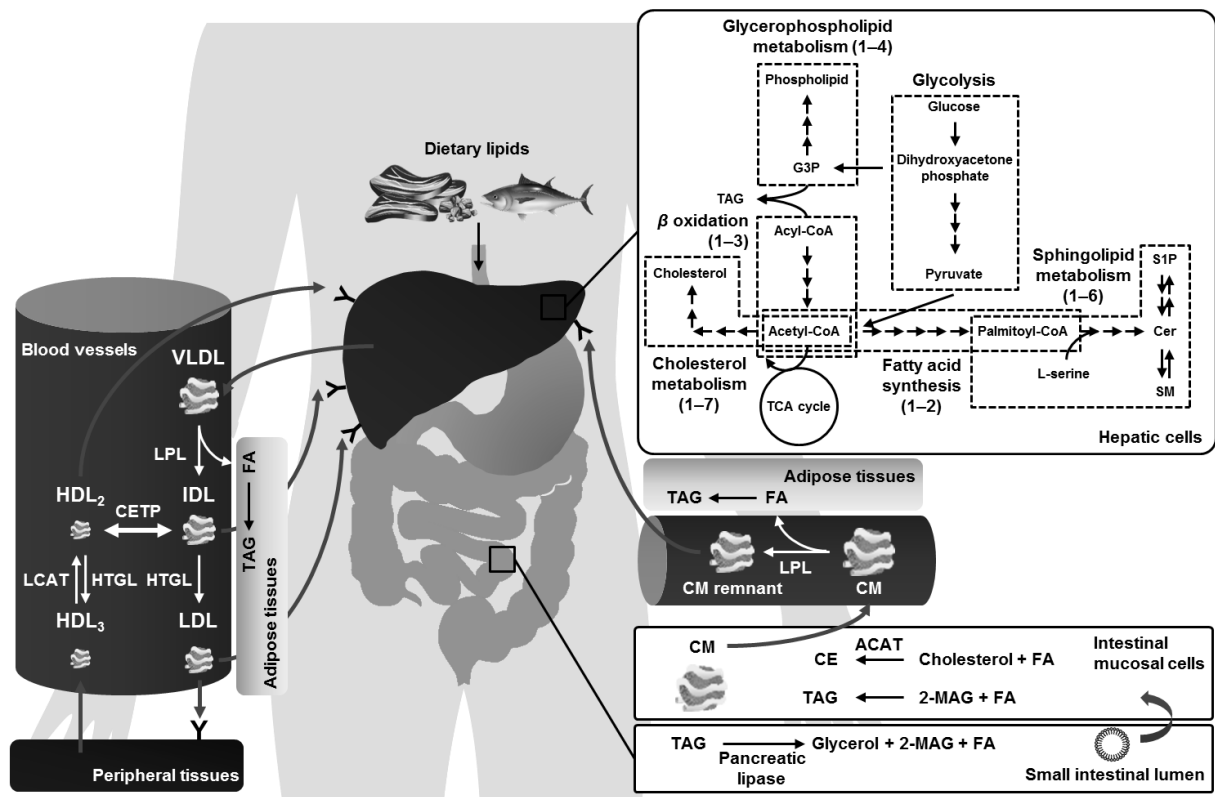


図 11 肝臓における脂質代謝とリポタンパク質による脂質の運搬
肝臓における脂質代謝は第 1 節で概説している。

でより大きな HDL₂ 粒子へと成熟する⁴²⁾。最終的に HDL₂ は肝臓の HDL 受容体を介して取り込まれることで、コレステロール逆輸送の機能を果たす。ほかにも、HDL₂ に含まれる CE はコレステロールエステル転送タンパク質 (Cholesterol ester transfer protein, CETP) により VLDL, IDL, LDL に含まれる TAG と交換する。肝性リパーゼにより TAG が加水分解を受けることで HDL₂ は HDL₃ や新生 HDL に戻る。

このように、食事により摂取された脂質や生体内で新たに合成された脂質はリポタンパク質を形成することで血管を通過して各組織へと運搬され、エネルギー源や細胞膜の構築など、種々の目的に利用される。また、各組織への一方的な輸送だけではなく肝臓への逆輸送も行われており、最終的には貯蔵や分解が行われることで生体内の脂質の量を制御している。

3. 脂質代謝異常が引き起こす動脈硬化性心血管疾患

「人間は血管とともに老いる」。この言葉は有名な内科医、ウィリアムオスラー博士が残した名言である。動脈は心臓から各組織へ酸素や栄養を運搬するために重要な役割を果たしている。しかし、動脈は血管壁の老化に伴い弾力性がなくなることによって硬化し、血圧の上昇により血管の破裂を引き起こす。ほかにも動脈の内側に形成されたプラークが破裂することで血栓を形成し、血管の内腔を閉塞させることで各組織への酸素や栄養の運搬を遮断する。このような状態を動脈硬化と呼び、発生した臓器により様々な動脈硬化性疾患の原因となる。例えば心臓の血管で起こると心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患、脳の血管で起こると脳梗塞や脳出血などの脳血管疾患の原因となる。近年、これらは世界規模で発症者数の多い重篤な疾患として認識されており、我が国においても死因別死亡数の第2位 (心疾患) と第4位 (脳血管疾患) を占める。

動脈硬化の危険因子として、加齢、喫煙、高血圧、肥満、高血糖、脂質異常症などが挙げられる。そのなかでも強力な危険因子は脂質異常症であり、特に LDL コレステロールが血液中に過剰に存在すると、動脈硬化を引き起こす原因となる。高血圧や血流の変化によるズリ応力などにより血管内皮細胞が損傷すると血漿成分は内皮下へと浸出し、LDL は活性酸素により酸化されることで酸化 LDL を形成する。一方、血管内皮細胞には接着因子が発現し、血液中の単球が血管内皮細胞に接着することが可能になる。単球は血管内皮細胞とゆるやかに接着し、内皮細胞上でローリングを引き起こす。これにより単球と血管内皮細胞の間で強い接着を生じ、次第に間隙から内皮下へ遊走し、浸出する。単球から成熟、分化したマクロファージはスカベンジャー受容体を介して酸化 LDL を際限なく取り込むことで泡沫細胞を形成し⁴³⁾、次第にプ

プラークを形成する (図 12)。このプラークが破綻することで種々の動脈硬化性疾患を引き起こす。

現在、脂質異常症の診断基準として LDL コレステロールや HDL コレステロールが使用されており、コレステロール濃度を低下させる薬剤としてスタチンが服用されている。スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することで肝臓におけるコレステロール合成経路を阻害する薬剤であり、実際スタチンの投与により LDL コレステロールを低下させることで心血管イベントは抑制され、LDL コレステロール値と心血管イベントの発生率は直線関係にあることが知られている⁴⁴⁾。一方、スタチンにより LDL コレステロール値を劇的に低下させた場合においても、心血管イベントの抑制は 45%程度であり、スタチンを用いた LDL コレステロール低下療法では未だに 55%の残存リスクが存在する⁴⁵⁾。

残存リスクを軽減するために多くの危険因子が注目されている。なかでも small dense LDL と呼ばれる小型の LDL が動脈硬化の進展に関与するとして注目を浴びている。Small dense LDL の特徴を以下に記す。(i) LDL 受容体への親和性が低いため、正常な LDL と比較して血液中の滞在時間が長い。(ii) 血管壁の細胞外マトリクスとして働くプロテオグリカンとの結合能が強い。(iii) 正常な LDL と比較してサイズが小さいため、内皮下に容易に侵入することができる。(iv) 抗酸化ビタミンの含有量が少なく、容易に酸化ストレスの影響を受ける。さらに、small dense LDL は正常な LDL とは異なり何らかの修飾を受けずにマクロファージのスカベンジャー受容体に取り込まれる。以上の性質により、正常な LDL と比較して動脈硬化を惹起するリスクが高いことが知られている⁴⁶⁾。

さらに、HDL が運搬しているコレステロールの量ではなく、HDL が泡沫細胞に蓄積したコレステロールを回収する能力、すなわちコレステロール引き抜き能を評価するほうが動脈硬化の予防をするうえで重要であることが報告されている⁴⁷⁾。これまで HDL コレステロール濃度が高いほど動脈硬化性心血管疾患を発症しにくいと考えられており、CETP 阻害薬により CETP の活性を抑制させることで患者の HDL コレステロール濃度を上昇させてきた。しかし、実際 CETP 阻害薬を服用した患者の心血管イベントは減少せず、単に HDL コレステロール濃度の増加をさせるだけではなく、HDL がコレステロールを引き抜く機能を改善することが重要であると考えられるようになった。HDL のコレステロール引き抜き能は、放射性同位体で標識したコレステロールを取り込ませた培養マクロファージに患者の HDL を添加し、培養液に引き抜かれたコレステロールの放射活性を測定することで評価することができる。このような背景から、HDL の機能に関する研究が飛躍的に加速していることがうかがえる。

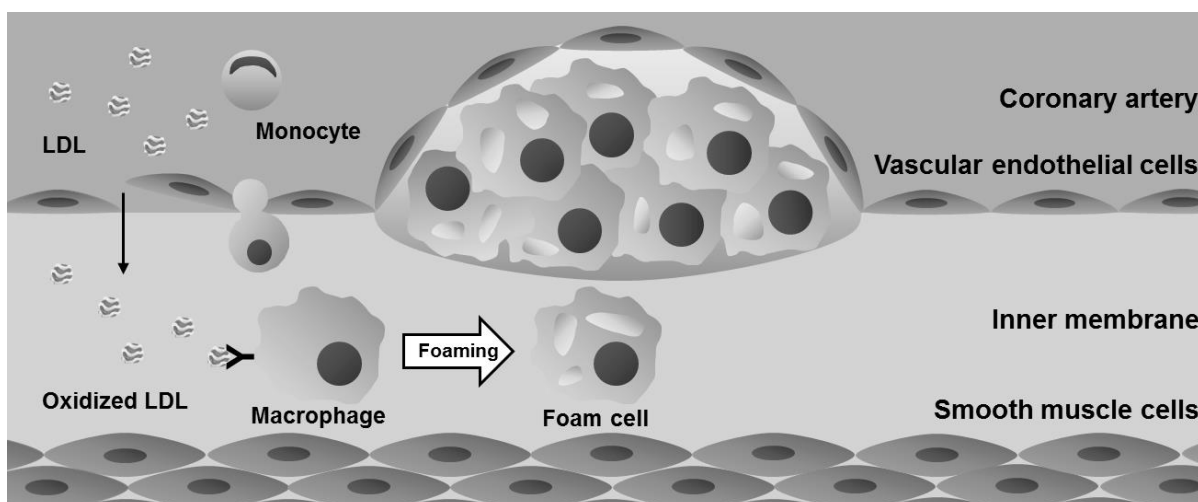


図 12 血管内皮細胞の損傷による動脈硬化の発症と進展

4. 研究目的

近年，small dense LDL や HDL のコレステロール引き抜き能といったリポタンパク質の「質」が動脈硬化を引き起こすことが認識されており^{46,47)}，疾患に伴うリポタンパク質の脂質組成の変化がこれらの質に影響を及ぼしている可能性が考えられる．しかし，実際にリポタンパク質の脂質組成がどのように変化しているかまでは明らかにされていない．エレクトロスプレーイオン化質量分析 (Electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS) はイオン化した分子の質量電荷比の差異を高精度に一斉測定することが可能な装置である．さらに，ESI-MS は液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography, LC) や超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography, SFC) などの各種クロマトグラフィーと連結することが可能である．すなわち，クロマトグラフィーおよび質量分析による化合物の分離分析技術を組み合わせることで，リポタンパク質に含まれる膨大な種類の脂質分子を一斉に測定することができることが示唆される．一方，アポリポタンパク質は 20 種のアミノ酸から構成される高分子化合物であり，そのままの状態では複数の多価イオンの形成によって ESI でのイオン化効率が極めて低い．しかし，トリプシンにより消化されたペプチド断片を解析するショットガンプロテオミクスの原理をアポリポタンパク質に適用することで，高感度分析が可能となる．このように，リポタンパク質の脂質組成を粒子レベルで定量的に取得し，アポリポタンパク質により制御されるリポタンパク質代謝の変動を観察することによって，残存リスクに関与する新たな知見が得られることが期待される．そこで当該研究では，質量分析技術を基盤としたリポタンパク質の定量プロファイリン

グ法の開発を目的とした。当該研究を遂行するにあたり、まずリポタンパク質画分の脂質分子を包括的かつ定量的に測定が可能な新規のリピドーム解析手法を開発した(第2章)。さらに、アポリポタンパク質の定量分析に基づきリポタンパク質粒子の脂質組成を決定し、リポタンパク質の代謝制御を観察する方法について提案した(第3章)。

第2章 ワイドターゲット定量リピドーム解析法の構築

1. 緒言

生体内の脂質は脂肪酸側鎖の多様性に伴い膨大な種類が存在することから、これらの脂質分子を網羅的かつ精確に測定するには高度な分析技術が必要である。近年、クロマトグラフィーやタンデム型質量分析を用いた数々のリピドーム解析手法が提案されている⁴⁸⁾。代表的なリピドーム解析手法を表1に示す。ショットガンリピドーム解析とも呼ばれるダイレクトインフュージョン質量分析 (Direct infusion tandem mass spectrometry, DI/MS/MS) はクロマトグラフによる分離を介さず直接 ESI-MS に導入する手法であり、短時間で脂質分子を一斉定量するために利用されている⁴⁹⁻⁵¹⁾。各脂質クラスにおいて、生体内で検出されない脂質標準品、あるいは安定同位体標識した脂質標準品を添加し、分析対象成分と共溶出する他の成分 (マトリクス) によるイオン化の促進 (イオン化エンハンスメント) あるいはイオン化の抑制 (イオン化サプレッション) を標準化することで、質量分析計を用いた個々の脂質分子の定量を実現することができる。しかし、あらゆる化合物が一斉にイオン化部に到達するため、異性体を同定することが困難であり、低濃度の脂質分子は夾雑物が引き起こすイオン化サプレッションによりほとんど検出することができない。さらに、イオン源におけるインソースフラグメントにより、脂質の同定や定量を複雑にする可能性も懸念される。以上の背景により、各脂質分子の同定や定量を達成するために、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) の技術開発が実施されている。DI/MS/MS 法と比較した LC/MS/MS 法の利点を以下に記す。(i) ESI イオン化法を搭載した質量分析計は濃度に依存する装置であるため、検出感度を向上させることができる⁵²⁾。(ii) LC の分離により生体試料のマトリクス効果を軽減し、脂質分子のイオン化効率を向上させることができる。(iii) 結果的に、検出可能な脂質分子数が増加する。逆相液体クロマトグラフィー (Reverse phase liquid chromatography, RPLC) は低極性固定相と高極性移動相を用い、移動相は固定相より高い極性をもつため、極性の高い化合物から順に溶出する。また、固定相のオクタデシルシリル基の非極性側鎖と脂質分子の疎水性脂肪酸側鎖との間の疎水性相互作用に基づき分離することができ、リピドーム解析では広く使用されている。RPLC は異性体を含む幅広い脂質分子を対象とし、クロマトグラフィーの分解能を向上させることができる^{53,54)}。一方、検出された全てのピークに対応する内部標準物質を準備することは不可能であるため、生体試料のマトリクス効果を標準化することができない。すなわち、個々の脂質分子の定量分析は困難となる。一方、順相液体クロマトグラフ

イー (Normal phase liquid chromatography, NPLC) は高極性固定相と低極性移動相を用い、固定相は移動相より高い極性をもつため、極性の低い化合物から順に溶出する。また、固定相は極性ヘッドグループの認識能が強く、各脂質クラスを分離することができる⁵⁵⁻⁵⁷⁾。したがって、NPLC/MS/MSでは、脂質クラスごとに内部標準物質を添加することで同じ脂質クラスの脂質分子のマトリクス効果を一斉に標準化し、各脂質クラスや個々の脂質分子において定量値を算出することができる。しかし、NPLCの移動相はヘキサンやクロロホルムなどプロトン供与性を持たない溶媒が多く、イオン化効率が低いため、脂質分子の感度の低下が懸念される。そこで、近年NPLC/MS/MSに代わり、親水性相互作用クロマトグラフィータンデム質量分析 (Hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry, HILIC/MS/MS) を用いたリピドーム解析が報告されている⁵⁸⁻⁶³⁾。HILICはNPLCで用いられる高極性固定相を、RPLCと同様の移動相で使用する分離モードである。そのため、親水性の固定相表面に水和相が形成され、試料の分配は移動相と水和相の間で生じる。水和相に親和性の高い極性化合物が保持されることから、リピドーム解析におけるHILICの分離挙動はNPLCと同様である。一方、HILIC/MS/MSはRPLC/MS/MSと同様にメタノールや水などプロトン供与性を持つ溶媒を移動相として使用するため、感度はNPLC/MS/MSと比較して高い⁵⁹⁾。また、HILICはCEやDAG、TAGなどといった疎水性の高い脂質の保持や分離が不十分である⁶⁰⁾。したがって、HILICは主にグリセロリン脂質やスフィンゴ脂質などといった比較的極性の高い脂質に適用範囲が限定される^{58,59,61-63)}。さらに、保持時間やピーク面積値の再現性を高い状態で担保しつつ、HILIC/MS/MSを用いたリピドーム解析を実施するためには、固定相表面の水和相の形成に多くの平衡時間を必要とする⁵⁹⁻⁶³⁾。

表1 リピドーム解析手法の特徴

	DI/MS/MS	RPLC/MS/MS	NPLC/MS/MS	HILIC/MS/MS	SFC/MS/MS (in this study)
Throughput	○	△	△	×	△
Sensitivity	×	○	△	○	○
Identification of isomers	×	○	△	△	○
Detected number of lipids	×	○	△	△	○
Quantification	○	×	○	○	○

それぞれの特徴は3段階で評価した。各リピドーム解析手法において特に優れた特徴を発揮できるものは○、全く特徴を発揮できないものは×とし、それ以外のものについては△と記載した。

超臨界流体 (Supercritical fluid, SCF) は温度と圧力が臨界点を越えた物質の領域として定義されており (図 13A), 超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography, SFC) は移動相として SCF を使用するクロマトグラフィー分離技術のことを指す. 二酸化炭素は容易に超臨界流体の状態 (臨界温度 31.1 °C, 臨界圧力 7.38 MPa) へと変換され (図 13B), 化学的に不活性で比較的毒性がなく, 取り扱いが容易なうえ, 安価である. また, 超臨界二酸化炭素は *n*-ヘキサン程度と極性が低く, メタノールなどの極性有機溶媒を添加することで SFC における移動相の極性を大きく変化させることができる. 先行研究では, 逆相カラムを用いた超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析 (Supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry, SFC/MS/MS) をリポドーム解析に適用することで, 幅広い脂質クラスを測定可能であることが報告されている⁶⁴⁻⁶⁶. さらに近年, エチレン架橋型ハイブリッド粒子を充填した順相シリカカラムを用いた超臨界流体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析 (Supercritical fluid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry, SFC/Q-TOF-MS) を用いたハイスループットリポドーム解析が実施されている⁶⁷. しかし, 位置異性体や構造異性体を含む個々の脂質分子の分離や定量性については十分に検討されていない.

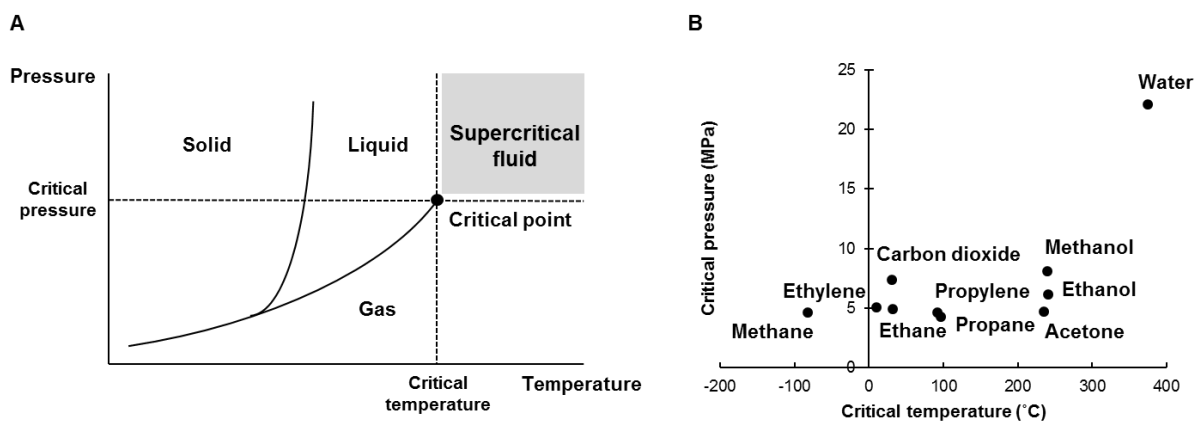


図 13 超臨界流体

(A) 物質の状態図. (B) 各物体における超臨界流体の条件.

三連四重極型質量分析 (Triple quadrupole mass spectrometry, QqQ-MS) を用いた多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring, MRM) 測定法では, Q1 でイオン化した目的化合物を選択し, Q2 で目的化合物を開裂させ, Q3 で開裂したフラグメントイオンを選択する. この一連の操作により高感度で選択的かつ定量的な性能を発揮することができ, 低濃度の化合物においても信頼性の高い定量値を獲得することができる.

さらに、Q3でフラグメンテーションにより開裂した脂肪酸イオンを選択することで、異なる脂肪酸側鎖を有する構造異性体(例 PC 16:0-20:4 と PC 18:2-18:2)の質量分離を達成することができる。近年、QqQ-MSの性能が格段に向上し、スキャンスピードが飛躍的に向上したQqQ-MSが次々と開発されている。脂質分子のフラグメンテーションは脂質クラスや脂肪酸側鎖の構造に従い規則的に行われるため、測定対象のあらゆる脂質分子の標準品を準備し、最適化を実施する必要はない。各脂質クラスにおいて代表的な脂質分子の標準品のみを用いて最適化を実施することで、各脂質分子における最適なパラメータを設定することができる。さらに、生体内に存在する脂肪酸の種類は限られていることから、これらの脂肪酸を側鎖に持つ脂質分子のMRMトランジションを包括的に組み合わせることで、生体内に含まれる脂質分子を広範囲で測定することができる。

そこで本章では、SFC/QqQ-MSを用いて、生体内に存在する脂質分子を測定対象とした新規ワイドターゲット定量リピドーム解析手法を開発することを目的とした(図14)。

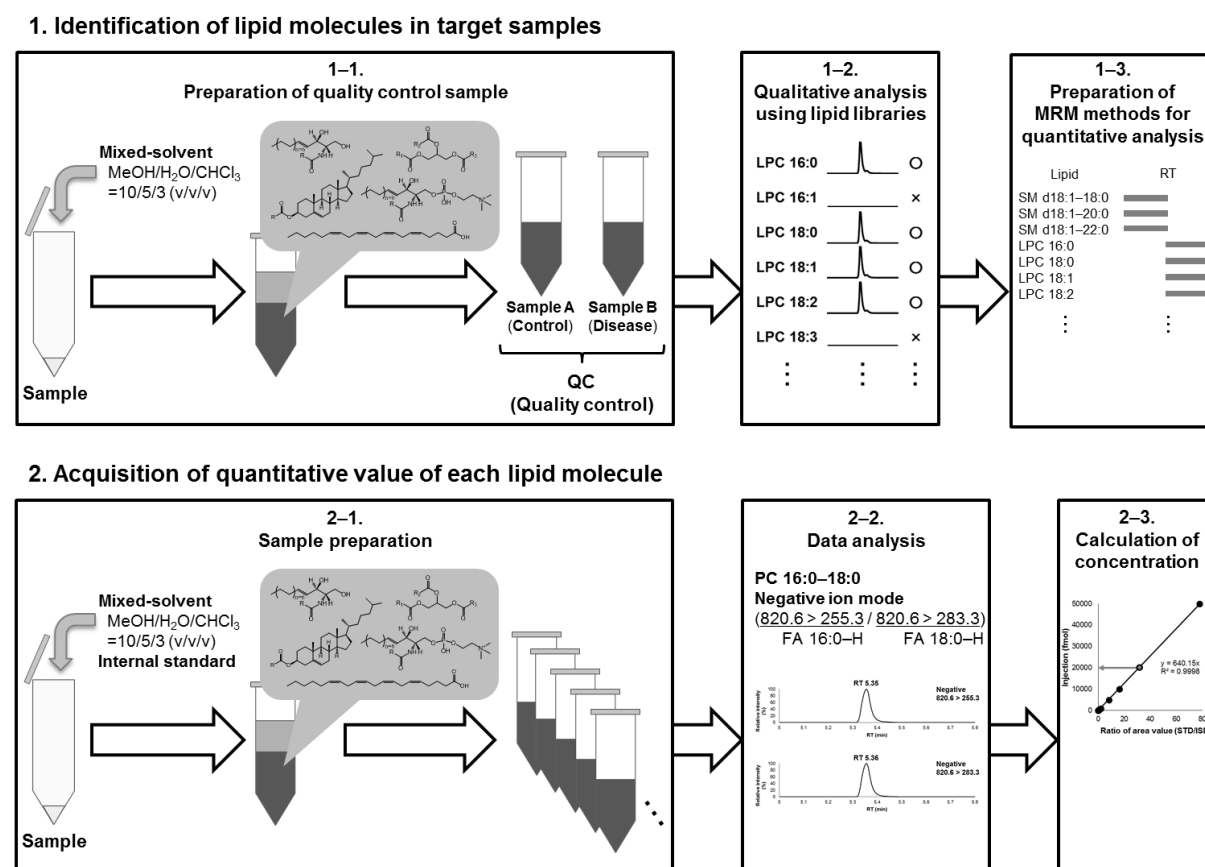


図14 SFC/QqQ-MSを用いた新規ワイドターゲット定量リピドーム解析手法

2. 実験方法

2-1. 試薬

酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。MS グレードのメタノールは関東化学株式会社 (東京, 日本), HPLC グレードのクロロホルムと LC/MS グレードの蒸留水はキシダ化学 (大阪, 日本) から購入した。全ての脂質標準品は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。ただし FA 17:0 は Sigma-Aldrich から購入した。二酸化炭素 (99.5%グレード, 吉田酸素, 福岡, 日本) を SFC 移動相として用いた。

2-2. 実験動物

動物に関わる全ての実験は神戸大学動物実験委員会の承認を受け、神戸大学動物実験実施規則、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 法律第 105 号 平成 18 年 改正), 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 環境省告示第 88 号), 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針 (平成 18 年 文部科学省告示第 71 号) に基づいて実施した。

MRM パラメータの検討と添加回収試験は心筋梗塞を自然発症する心筋梗塞発症遺伝性高脂血症ウサギ (WHHLMI ウサギ) を用いた^{68,69}。ウサギは一定の室温 (22±2°C) かつ一定の明暗サイクル (12 h light/dark) の室内に金属製のケージを設置し、個別に飼育した。食事は普通食 (120 g/day; LRC4, オリエンタル酵母株式会社, 東京, 日本) と水を与えた。

2-3. リピドーム解析用試料の調製

WHHLMI ウサギは 20 月齢時に絶食後 12 時間以上経過してから耳介中心動脈から採血した。ウサギ血漿からの脂質の抽出は Bligh and Dyer 法を一部改変して行った⁷⁰。各脂質分子を定量するために、ドデカノイル酸あるいはヘプタデカノイル酸を側鎖に有する脂質内部標準物質を添加した⁷¹。サンプル 20 µL に内部標準物質混合液 30 µL と混合溶液 (メタノール:クロロホルム:水=556:278:166, v/v/v) 1000 µL を添加し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、超音波処理によって 5 分間代謝物を抽出した後、16000 ×g, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離した。上清 700 µL を新しいチューブに回収し、クロロホルム 195 µL と水 195 µL を添加した後、1 分間ボルテックスミ

キサーで攪拌した。再び 16000 ×g, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離することで 2 層に分離させ、下層 200 μL を新しいチューブに回収した。回収した下層は混合溶液 (メタノール:クロロホルム=2:1, v/v) 600 μL を添加することで希釈した。

2-4. 脂質標準品のフローインジェクション分析条件

カラムスクリーニングおよび分析法の堅牢性の検証を実施するために、各脂質クラスが 1 μM となるよう混合溶液を調製した。SFC-MS は ACQUITY UltraPerformance Convergence Chromatography (UPC²) system (Waters, Milford, MA) と Xevo TQ-S micro tandem mass spectrometer (Waters) を用い、MassLynx ソフトウェア version 4.1 (Waters) により制御した。イオン化効率を向上させるために HPLC 515 pump (Waters) をメイクアップポンプとして使用し、手動で制御した。まず、コーン電圧や衝突エネルギーなど対象化合物の測定条件を決定するため、カラムを使用せずに分析を行うフローインジェクション分析によって最適化した。フローインジェクション分析条件を以下に記す。移動相 (A) は超臨界二酸化炭素を使用し、移動相 (B) は 0.1% (w/v) の酢酸アンモニウムを添加したメタノールを使用した。インジェクション量は 2 μL に設定した。流速は 1.0 mL min⁻¹ に設定し、メイクアップポンプの流速は 0.1 mL min⁻¹ に設定した。移動相 (B) は 40% のアイソクラティック条件で実施した。カラムオープン温度は 40 °C に設定した。背圧制御装置 (Active back pressure regulator, ABPR) は 1500 psi に設定した。分析条件は 1 分間に設定した。Xevo TQ-S micro にはエレクトロスプレーイオン化法を接続した。また、MS の分析条件を以下に記す。キャピラリー電圧は 3.0 kV に設定した。脱溶媒温度は 500 °C に設定した。コーンガス流速は 50 L h⁻¹, 脱溶媒ガス流速は 50 L h⁻¹ に設定した。コーン電圧と衝突エネルギーは最小値を 10 V, 最大値を 80 V に設定し、MS スペクトルを 10 V ごとに取得した。

2-5. SFC/QqQ-MS の分析条件

SFC の分析条件を以下に記す。移動相 (A) は超臨界二酸化炭素を使用し、移動相 (B) は 0.1% (w/v) の酢酸アンモニウムを添加した混合溶媒 (メタノール:水=95:5, v/v) を使用した。インジェクション量は 1 μL に設定した。流速は 1.0 mL min⁻¹ に設定し、メイクアップポンプの流速は 0.2 mL min⁻¹ に設定した。移動相 (B) は 1% (1 min), 1-65% (11 min), 65% (6 min), 65-1% (0.1 min), 1% (1.9 min) のグラジエント条件で実施した。カラムオープン温度は 50 °C に設定した。ABPR は 1500 psi に設定した。分析条件は 20 分間に設定した。カラムは ACQUITY UPC²TM エチレン架橋型ハイブリッド

粒子 (Ethylene bridged hybrid, BEH), 2-エチルピリジン (2-ethylpyridine, 2-EP), 2-ピコリルアミン (2-picolyamine, 2-PIC), ジエチルアミン (Diethylamine, DEA), ジオール (DIOL), 1-アミノアントラセン (1-aminoanthracene, 1-AA) カラム (100 × 3.0 mm i.d., particle size: sub 1.7 μm, Waters) を使用した (図 15). また, MS の分析条件を以下に記す. キャピラリー電圧は 3.0 kV に設定した. 脱溶媒温度は 500 °C に設定した. コーンガス流速は 50 L h⁻¹, 脱溶媒ガス流速は 50 L h⁻¹ に設定した.

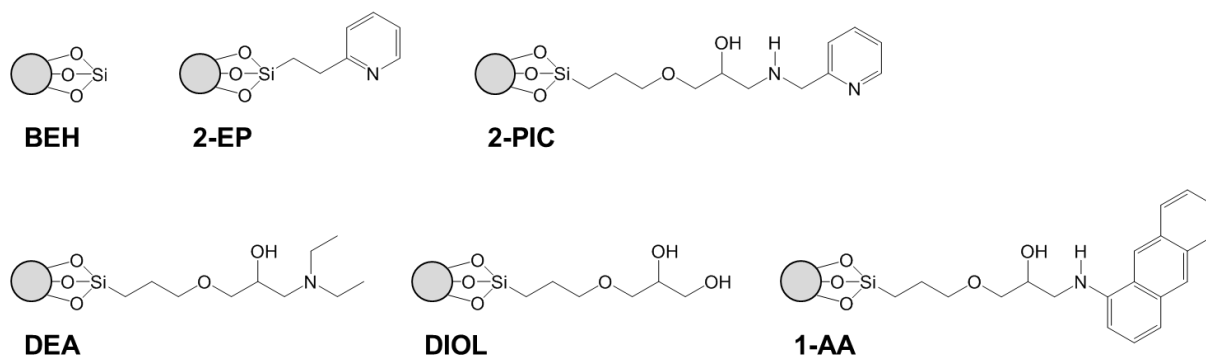


図 15 検討した 6 種類のカラムの構造

2-6. 分析法の堅牢性の検証

最終濃度が 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000 nM の合成脂質標準品の混合溶液を調製し, 各脂質クラスに特有な内部標準物質を添加することで検量線を作成した. WHHLMI ウサギの血漿サンプル抽出時に内部標準物質を添加し, 各脂質分子と内部標準物質のピーク面積値の比率を検量線に乗せることで各脂質分子の濃度を定量した. さらに, 算出された濃度と同濃度の合成脂質標準品を血漿脂質抽出溶液に添加して再度測定することで分析における回収率を算出した.

2-7. データ解析

脂質分子の同定と定量は MassLynx ソフトウェア version 4.1 (Waters) を用いた. 各脂質分子の m/z や RT, 検出する MRM トランジションを設定し, 各クロマトグラムのベースラインを引くことでピーク面積値を算出した. リン脂質や DAG など 2 種類の MRM トランジションを設定している化合物については, 2 つのクロマトグラムのピーク面積値を合算した.

2-8. 統計解析

カラムスクリーニングの結果は、AlOutput2 ソフトウェア version 1.29 を用い⁷²⁾、主成分分析 (Principal component analysis, PCA) により解析した。

3. 結果

3-1. MRM トランジションの最適化

まず、各脂質分子を MS で検出するためにプレカーサーイオンを同定し、脂質クラスごとにフローインジェクション分析を実施することで各脂質分子に特有なフラグメントパターンを決定した。各脂質分子のイオン化効率を向上させるため、モディファイア溶液やメイクアップ溶液に 0.1% (w/v) の酢酸アンモニウムを添加した。その結果、各脂質分子のプリカーサーイオンは、ポジティブイオンモードではプロトンアダクト $[M+H]^+$ やアンモニウムアダクト $[M+NH_4]^+$ 、ネガティブイオンモードでは脱プロ

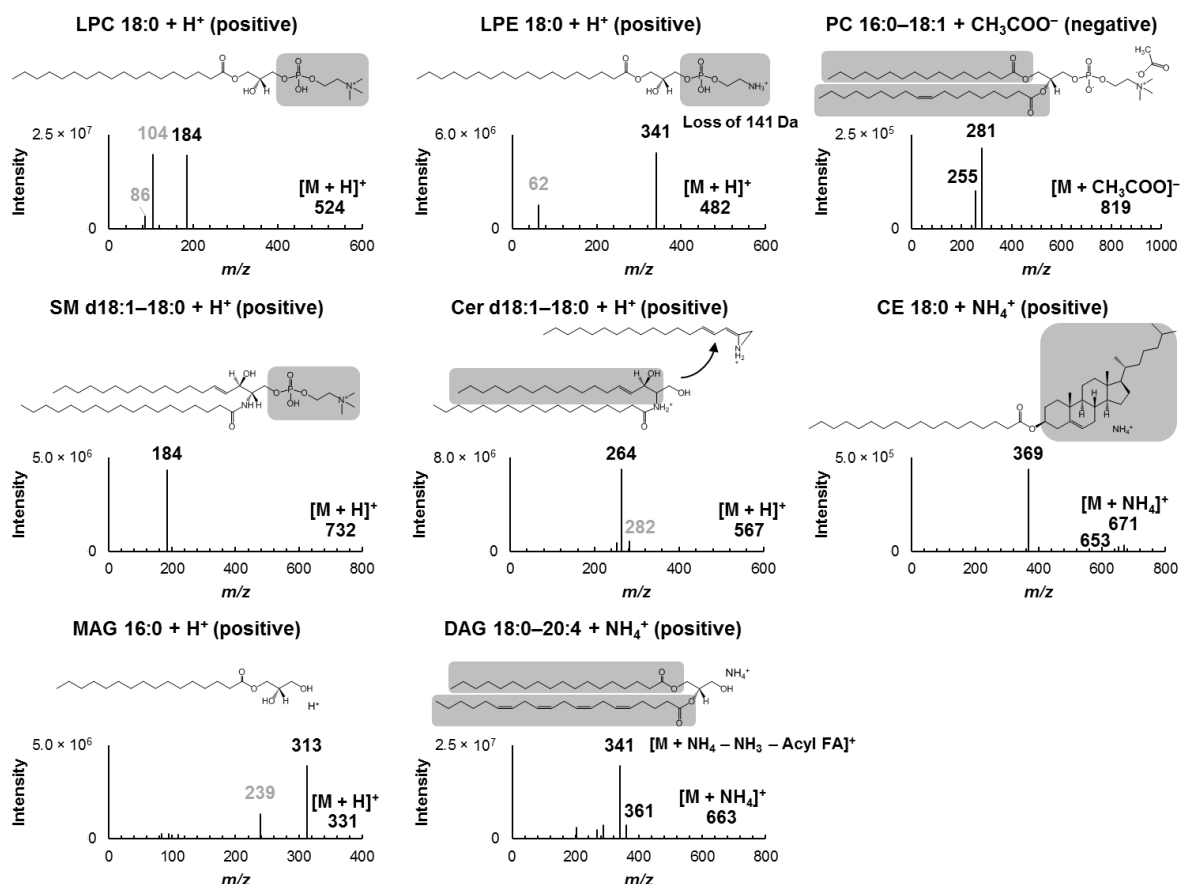


図 16 代表的な脂質クラスの構造と MS/MS スペクトル

ロトン $[M-H]^-$ や酢酸アダクト $[M+CH_3COO]^-$ で検出された。

続いて、最も高感度で検出されたアダクトイオンを用いて脂質クラスごとに MS コーロン電圧と衝突エネルギーの最適化を実施した (図 16, 表 2)。リン脂質はネガティブイオンモードで検出される脂肪酸イオンを選択した。これにより、異なる脂肪酸側鎖を有する構造異性体の質量分離を達成した。リゾリン脂質や SM は、リン酸とアルコールがエステル結合した極性ヘッドグループのフラグメントイオン、あるいはニュートラルロスとして失われたフラグメントイオンに基づき最適化した。Cer はポジティブイオンモードで検出されるスフィンゴイド塩基特有のフラグメントイオンに基づき最適化した。CE と DAG は、ポジティブイオンモードで検出される脂肪酸がニュートラルロスとして失われたフラグメントイオンに基づき最適化した。これにより、

表 2 最適化した各脂質クラスの MRM 条件

Lipid class	Ion mode	The number of MRM transitions	MS ¹ (m/z)	MS ² (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
LPC	ESI+	23	$[M + H]^+$	184.1	10	30
LPE	ESI+	23	$[M + H]^+$	$[M + H]^+ - 141.0$	30	20
LPG	ESI+	23	$[M + H]^+$	$[M + H]^+ - 172.0$	40	20
LPA	ESI-	23	$[M - H]^-$	153.8	10	20
LPI	ESI-	23	$[M - H]^-$	241.0	10	40
LPS	ESI+	23	$[M + H]^+$	$[M + H]^+ - 185.0$	30	20
PC	ESI-	529	$[M + CH_3COO]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	15	40
Ether PC	ESI+	319	$[M + H]^+$	$[LPC\ FAe\ and/or\ FAp + H]^+$ $[LPC - OH]^+$	20	30
PE	ESI-	529	$[M - H]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	50	25
PEpln	ESI+	345	$[M + H]^+$	$[M - FA - (CH_2=COHCH_2OH)]^+$	20	30
PG	ESI-	529	$[M - H]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	30	40
PA	ESI-	529	$[M - H]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	20	40
PI	ESI-	529	$[M - H]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	50	50
PS	ESI-	529	$[M - H]^-$	$[Acyl\ FA - H]^-$	30	50
SM	ESI+	23	$[M + H]^+$	184.1	50	30
Cer	ESI+	23	$[M + H]^+$	$[So\ dFA + H - H_2O]^+$	20	30
CE	ESI+	23	$[M + NH_4]^+$	369.4	20	10
MAG	ESI+	23	$[M + H]^+$	$[M + H - H_2O]^+$	10	10
DAG	ESI+	529	$[M + NH_4]^+$	$[M + NH_4 - NH_3 - Acyl\ FA]^+$	50	20
TAG	ESI+	167	$[M + NH_4]^+$	$[M + NH_4]^+$	10	10
FFA	ESI-	23	$[M - H]^-$	$[M - H]^-$	10	10

DAG はリン脂質同様に異なる脂肪酸側鎖を持つ構造異性体の質量分離を達成した。MAG はポジティブイオンモードで検出される脱水によるフラグメントイオンに基づき最適化した。一方、TAG や遊離脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) は Q1 と Q3 で同じイオンを選択し、最小限のコーン電圧と衝突エネルギーに設定した。

3-2. SFC の移動相と MS 用メイクアップ溶液の流速の最適化

SFC の移動相組成がもたらすピーク形状への影響について、シリカベースの充填剤である BEH カラム (図 15) を用いて評価した。0.1% (w/v) 酢酸アンモニウムを添加した 100%メタノールを使用した場合、LPA, LPS, PA, PS などの極性脂質のピーク形状が広がった。一方、モディファイア溶媒に水を 5% 添加することでピーク形状が大幅に改善された (図 17)。したがって、メタノールに水を 5% 添加した混合溶媒を移動相として決定した。

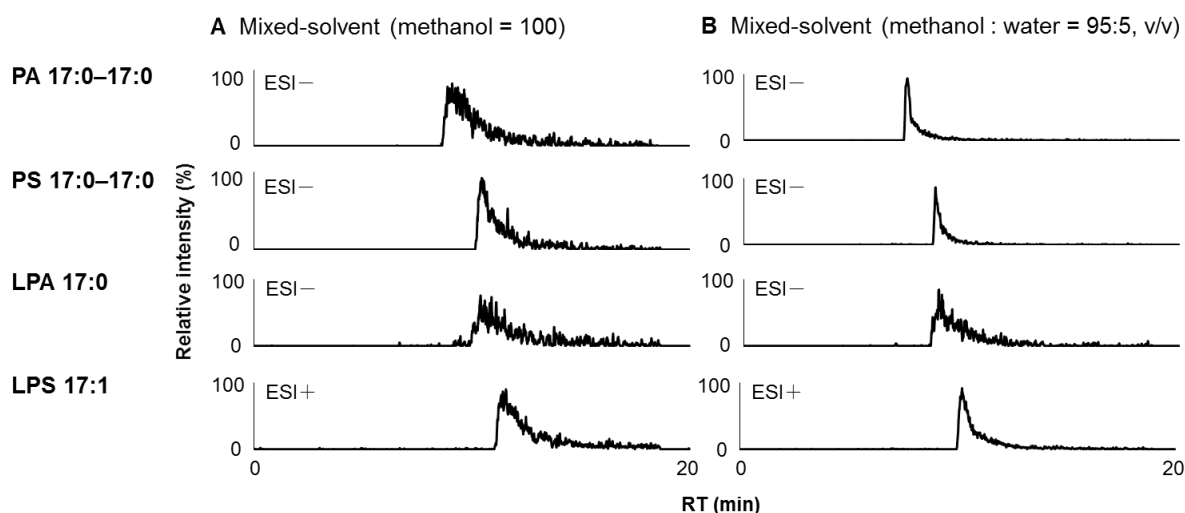


図 17 モディファイア溶液への水の添加による極性脂質のピーク形状の改善
(A) メタノール 100%. (B) メタノール : 水=95:5 (v/v).

続いて、MS のイオン化を補助するためにメイクアップ溶液の流速の最適化を実施した。当該研究で使用した SFC/QqQ-MS システムを図 18 に示す。SFC と QqQ-MS の連結では、固定寸法のピークチューブを備えた二箇所目の T 字で構成されている。一箇所目の T 字ではイオン化効率を向上させるためにメイクアップ溶液を添加している。また、二箇所目の T 字では流量を 9:1 に分離し、それぞれ ABPR と MS へ導入している。BEH カラムを用いた SFC の初期溶媒条件では、移動相はほとんど超臨界二酸化炭素で構成され、CE や TAG といったほとんどカラムによる保持を受けない脂質クラ

スは、イオン化時に十分な溶媒を担保することができない。しかし、メイクアップ溶液の流速を 0.2 mL min^{-1} 以上に設定することで初期グラジエントにおいても十分な溶媒を担保し、CE や TAG のイオン化効率の向上に成功した。したがって、メイクアップ溶液の流速は 0.2 mL min^{-1} に設定した。

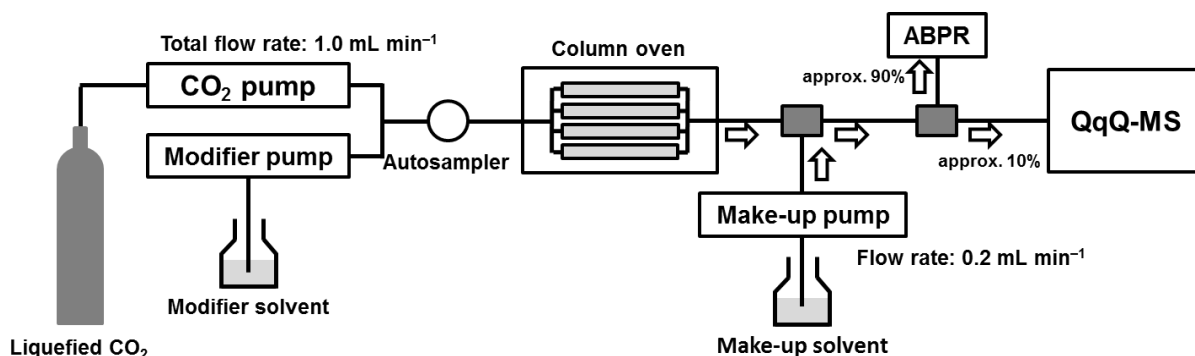


図 18 当該研究で使用した SFC/QqQ-MS システム

3-3. 脂質クラスや異性体の高分離を目指したカラムスクリーニング

各脂質分子の分離能を評価するために、BEH カラム、2-EP カラム、2-PIC カラム、1-AA カラム、DIOL カラム、DEA カラムを検証した。カラムの選定は、脂質クラスの分離を中心に、リゾリン脂質の位置異性体やリン脂質の構造異性体などの分離能を評価対象とした。まず、各 SFC 条件におけるポンプ圧力を計測し、最大ポンプ圧力下 (6000 psi) で適用可能なパラメータを検討した (図 19)。

分析開始時のモディファイア溶液は 1% に設定し、1 分間のアイソクラティック条

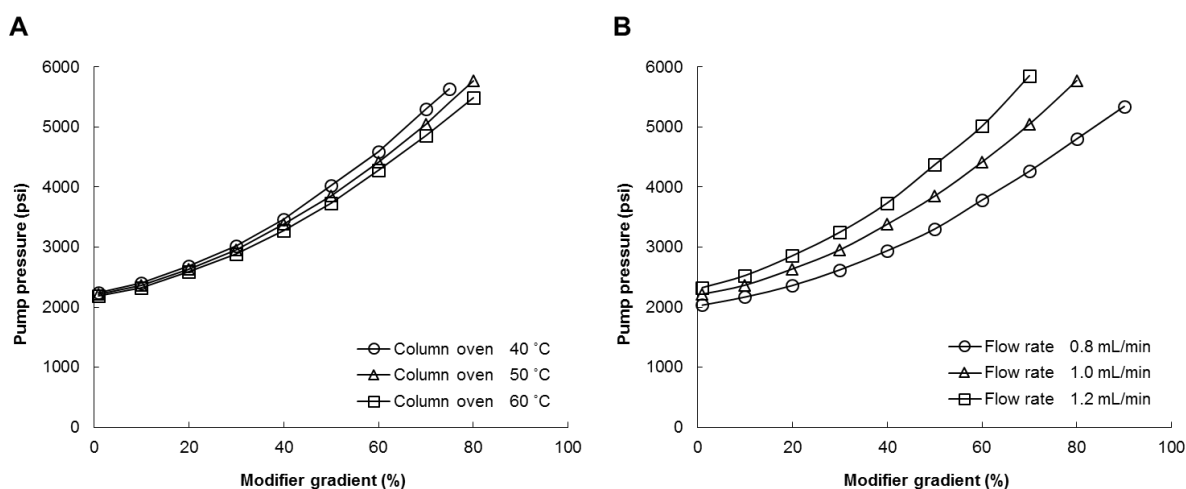


図 19 各 SFC 条件におけるポンプ圧力のモニタリング

(A) カラムオーブン温度. (B) 流速.

件で測定した。この条件下では、6種類全てのカラムにおいて最も保持の弱い CE や TAG のピーク形状を改善させることができた。次に、他の脂質クラスを高分離するためのグラジエント条件を検討した。6種類のカラムにおいて、DEA カラムを用いた LPA の保持が最も強かったため、LPA を溶出させることができる 65%までモディファイアの割合を上昇させた。カラムオープンの温度を検討したところ、オープン温度の上昇により各脂質クラスの保持はわずかに強くなり、ポンプ圧力は減少した (図 19) が、各脂質クラスの分離はほとんど変化しなかった。したがって、カラムオープンの温度は 50 °C に設定した。一方、各脂質クラスの分離とピーク形状は ABPR の条件 (1500 psi, 1750 psi, 2000 psi) による影響を受けなかった。したがって、ABPR は最低値の 1500 psi に設定した。DEA カラムを用いた場合、流速 1.0 mL min⁻¹ の条件下では LPA を 20 分以内に溶出することができ、最大ポンプ圧力で分析を実施することができた。以上より、流速は 1.0 mL min⁻¹ に設定した。

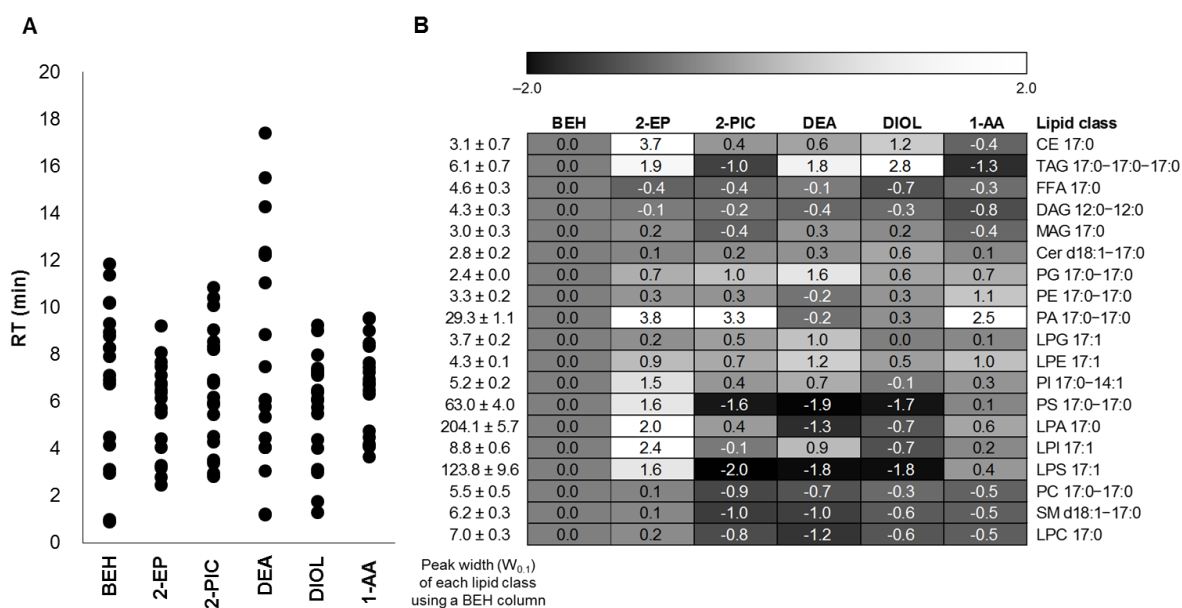


図 20 6種類のカラムスクリーニング

(A) 各脂質クラスの保持挙動. (B) BEH カラムを基準とした各脂質クラスの 10%ピーク高さ ($W_{0.1}$, sec) におけるピーク幅の評価. データは 5 回測定時におけるピーク幅の平均値を元に BEH カラムと各カラムの割合を算出し, \log_2 変換したものを示す.

続いて、6種類のカラムを用いて各脂質クラスの分離挙動を検討した。図 20A は各脂質クラスの保持挙動を示す。DEA カラムを用いた場合、極性の高い酸性脂質 (PI, PS, PA, LPI, LPS, LPA) との親水性相互作用が最も強く働き、各脂質クラスの分離は最も良好であった。また、これらの脂質クラス (特に LPA, PA, LPS, PS) のピーク幅は、

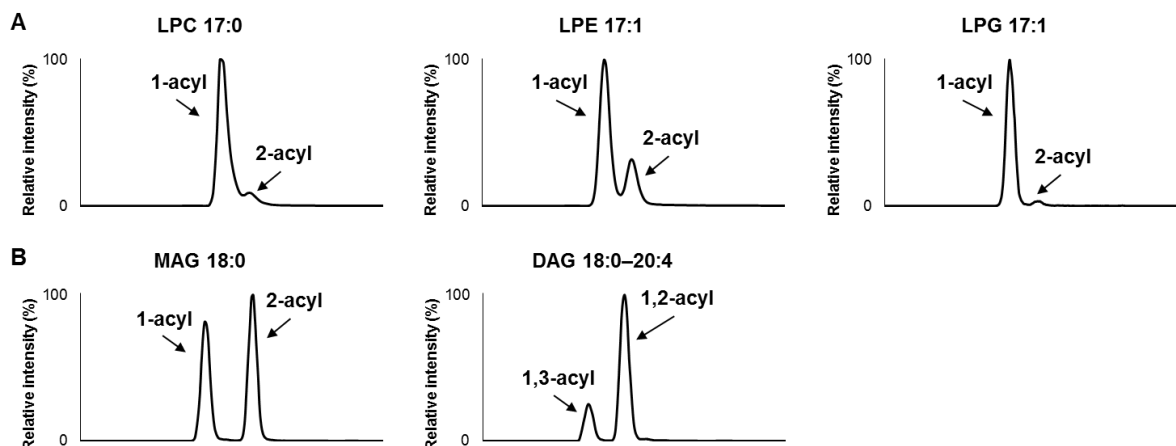


図 21 DEA カラムを用いた位置異性体の分離
(A) リゾリン脂質. (B) 中性脂質.

DEA カラムを用いることで大幅に改善された (図 20B). さらに, 異性体の分離能についても評価した. DEA カラムを用いた場合, リゾリン脂質 (LPC, LPE, LPG) や中性脂質 (MAG, DAG) の位置異性体を分離することができた (図 21). 一方, 異なる脂肪酸側鎖を有する構造異性体 (例えば PC 16:0-20:4 と PC 18:2-18:2) は, 6 種類全ての

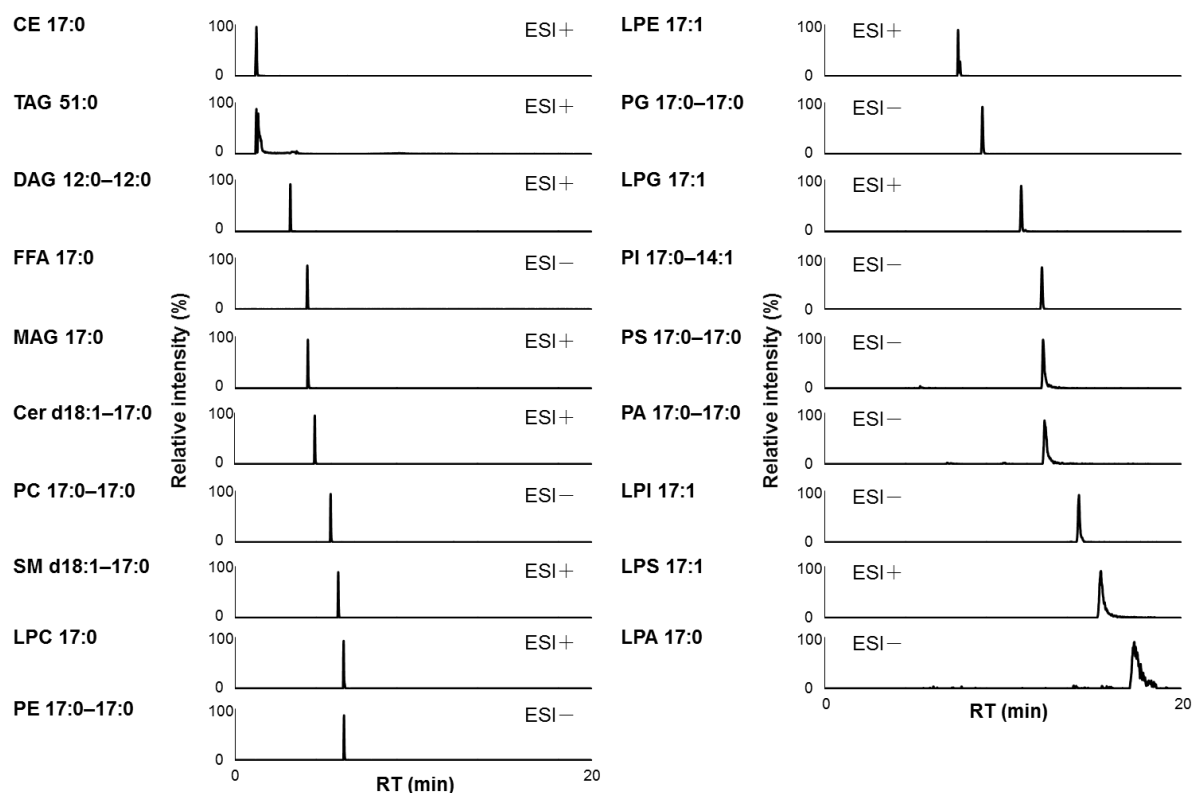


図 22 DEA カラムを用いた内部標準物質の MRM クロマトグラム
分析条件はそれぞれ最適化したパラメータを適用した.

カラムにおいて分離することができなかった。

以上の結果に基づき、DEA カラムをワイドターゲットリピドーム解析に使用することに決定した。最適化した分析条件を適用することで、ほとんど全ての脂質クラスをわずか 20 分で分離することに成功した (図 22)。

3-4. MRM 測定条件の検討

膨大な種類の脂質分子を一斉分析するためには、各ピークにおいて定量に必要なデータポイント数を担保する必要がある。例えば、1 つの化合物を測定するために必要な時間が 5 ミリ秒であった場合、100 化合物全てを順番に測定するためには 500 ミリ秒必要である。したがって、5 秒のピーク幅では合計 10 ポイントのデータポイントを担保することができる。このように、定量に必要なデータポイントを担保するために MRM 条件を最適化する必要がある。そこで、dwell time, MS inter-scan, inter-channel delay, polarity switch inter-scan など各 MRM パラメータを最適化し、1 サイクルあたりの MRM トランジションの限界数を検討した。まず、MRM トランジション数が及ぼす感度への影響について検討した。その他のパラメータ (dwell time, MS inter-scan, MS inter-channel delay, polarity switch inter-scan) はそれぞれ 1 msec, 2 msec, 2 msec, 15 msec に設定した。1 サイクルあたりの MRM トランジションを 200 種類以上設定した場合、良好なピーク形状で検出される脂質クラスは 10 点以上のデータポイントを担保することができず、感度や定量性の低下が確認された。したがって、1 サイクルあたりの MRM トランジション数は 150 種類以内に収めることにした。次に、その他のパラメータについて検討したところ、初期条件において十分なデータポイントを担保することができ、感度も良好であった。したがって、dwell time は 1 msec, MS inter-scan と MS inter-channel delay は 2 msec, polarity switch inter-scan は 15 msec に設定した。

3-5. 分析法の堅牢性と定量性の検証

脂質標準品の混合溶液を用いて当該分析手法の堅牢性の検証を実施した。検量線は脂質クラスごとに内部標準物質と合成標準品のピーク面積比に基づき作成した。各脂質クラスは保持時間 (relative standard deviation, RSD < 3.8%), ピーク面積 (RSD < 13.0%) とともに良好な再現性であった (表 3)。また、各脂質クラスの検量線は相関係数 (R^2) が 0.9922 以上の直線性を示し、検出限界 (limit of detection, LOD) は 5 fmol から 1000 fmol の範囲内であった。さらに、当該研究で構築した分析手法の感度を評価するため、同機種の SFC をノンターゲットリピドーム解析手法として広く利用され

ている Q-TOF-MS と接続し、それぞれの MS における検量線範囲の比較を行った。Q-TOF-MS では一度の分析結果を元に検量線を作成したため LPI や PC, FFA の検量線の R^2 値は 0.98 を下回ってしまったが、QqQ-MS は Q-TOF-MS と比較して高感度で測定可能であることが確認された (表 4)。

表 3 SFC/QqQ-MS を用いた脂質分析法の堅牢性と定量性

Lipid class	Ion mode	RT (min)	RSD (% , $n = 5$) ^a		Linear range (nM)	R^2 value	Internal standard	Spike-and-recovery test	
			RRT ^b	RPA ^c				Analyte	Recovery (% , $n = 5$)
LPC	ESI+	6.12	0.09	2.70	50 – 50000	0.9998	LPC 17:0	LPC 18:0	71.9 ± 4.9
LPE	ESI+	7.45	0.07	1.73	50 – 100000	0.9987	LPE 17:1	LPE 18:0	95.9 ± 3.5
LPG	ESI+	10.87	0.08	8.18	50 – 10000	0.9975	LPG 17:1	–	–
LPA	ESI–	17.43	0.57	8.97	1000 – 100000	0.9942	LPA 17:0	–	–
LPI	ESI–	14.02	0.09	3.50	5 – 50000	0.9966	LPI 17:1	–	–
LPS	ESI+	15.36	0.07	2.27	100 – 100000	0.9999	LPS 17:1	–	–
PC	ESI–	5.46	0.08	4.35	50 – 50000	0.9922	PC 17:0–17:0	PC 16:0–20:4	77.7 ± 3.5
PCpln	ESI+	5.45	0.10	3.65	50 – 50000	0.9977	LPC 17:0	PC 18:0p–20:4	78.0 ± 10.4
PE	ESI–	6.32	0.11	3.09	10 – 50000	0.9929	PE 17:0–17:0	PE 18:0–20:4	101.9 ± 17.0
PEpln	ESI+	6.22	0.09	9.91	10 – 100000	0.9976	LPE 17:1	PE 18:0p–20:4	95.8 ± 17.3
PG	ESI–	8.99	0.08	1.72	5–100000	0.9975	PG 17:0–17:0	–	–
PA	ESI–	12.43	0.82	4.17	10 – 100000	0.9985	PA 17:0–17:0	–	–
PI	ESI–	12.06	0.10	2.26	100 – 50000	0.9994	PS 17:0–17:0	PI 18:0–20:4	103.5 ± 7.6
PS	ESI–	12.23	0.09	1.87	50 – 100000	0.9959	PS 17:0–17:0	–	–
SM	ESI+	5.83	0.09	2.56	10 – 10000	0.9950	SM d18:1–17:0	SM d18:1–18:0	64.9 ± 3.0
Cer	ESI+	4.48	0.12	12.95	10 – 100000	0.9977	Cer d18:1–17:0	Cer d18:1–18:0	91.0 ± 14.2
CE	ESI+	1.12	1.81	11.32	50 – 50000	0.9994	CE 17:0	CE 16:0	67.2 ± 5.7
MAG	ESI+	3.97	0.18	3.49	500 – 100000	0.9974	MAG 17:0	MAG 16:0	98.4 ± 1.8
DAG	ESI+	3.25	0.14	8.36	5 – 10000	0.9976	DAG 12:0–12:0	DAG 16:0-16:0	86.6 ± 9.1
TAG	ESI+	1.61	3.76	2.86	500 – 100000	0.9992	TAG 51:0	TAG 54:2	72.8 ± 5.0
FFA	ESI–	4.02	0.11	1.18	500 – 100000	0.9988	FFA 17:0	FFA 18:0	91.8 ± 7.1

^a 定量再現性のバリデーションのためのインジェクション濃度は 10 μ M.

^b 相対 RT (analyte / internal standard).

^c 相対ピーク面積値 (analyte / internal standard).

続いて、作成した検量線を用いて WHHLMI ウサギの血漿に含まれる各脂質分子を定量した。血漿脂質抽出液に含まれる脂質分子と同濃度の合成脂質標準品を血漿脂質抽出液に添加して再度測定することで、検出された全ての脂質クラスにおいて分析の

回収率を算出した。その結果、回収率は 64.9%から 103.5%の範囲内に収まり (表 3), 絶対定量を実施するにあたり許容範囲内の濃度を取得することができた。以上より, 当該研究で構築した分析手法は高精度かつ高い再現性で定量可能であることが示された。

表 4 SFC/Q-TOF-MS の感度の評価

Lipids	Ion mode	Adduct ion	<i>m/z</i>	LOD ^a (μ M)	LOQ ^b (μ M)	Linear range (μ M)	<i>R</i> ² value
LPC 17:0	ESI+	+H	510.3554	0.1	0.1	0.1–50	0.9904
LPE 17:1	ESI+	+H	466.2928	0.1	0.1	0.1–50	0.9956
LPG 17:1	ESI+	+H	497.2874	50	50	-	-
LPA 17:0	ESI-	-H	423.2517	1	1		
LPI 17:1	ESI-	-H	583.2889	1	1	1–50	0.9593
LPS 17:1	ESI+	+H	498.3874	n.d.	n.d.	-	-
PC 17:0–17:0	ESI-	+CH ₃ COO ⁻	820.6073	1	1	1–50	0.9511
PE 17:0–17:0	ESI-	-H	718.5392	1	1	1–50	0.9840
PG 17:0–17:0	ESI-	-H	749.5338	0.1	0.1	0.1–50	0.9939
PA 17:0–17:0	ESI-	-H	675.4970	1	1	1–50	0.9887
PS 17:0–17:0	ESI-	-H	762.5291	1	1	1–50	0.9973
SM d18:1–17:0	ESI+	+H	717.5905	0.1	0.1	0.1–50	0.9962
Cer d18:1–17:0	ESI+	+H	552.5350	0.1	0.1	0.1–50	0.9822
CE 17:0	ESI+	+NH ₄	656.6340	n.d.	n.d.	-	-
MAG 17:0	ESI+	+H	245.2999	1	1	1–50	0.9960
DAG 12:0–12:0	ESI+	+NH ₄	474.4153	1	1	1–50	0.9887
TAG 17:0–17:0–17:0	ESI+	+NH ₄	866.8171	0.1	0.1	0.1–50	0.9874
FFA 17:0	ESI-	-H	269.2486	0.1	0.1	0.1–50	0.9645

^a Limit of detection (*S/N* = 3).

^b Limit of quantitation (*S/N* = 10).

3-6. 分析プラットフォームの構築

これまで、各脂質クラスにおいて代表的な脂質標準品を用いて MRM トランジションの最適化、SFC のカラムスクリーニングや分析条件の最適化、MRM パラメータの最適化を実施し、SFC/QqQ-MS の脂質分析系を構築した。さらに、各脂質クラスと主要脂肪酸組成の MS/MS フラグメントパターンに基づき、生体内に存在する脂質分子を包含した MRM ライブラリを作成した。一般的に、QqQ-MS の MRM モードは微量成分を含むターゲット化合物の定量分析に使われるが、当該研究では MRM ライブラ

リを搭載することで QqQ-MS を用いた包括的な脂質分析を実現した。作成した MRM ライブラリは 22 種類の脂質クラスを対象とし、それぞれ 23 種類の脂肪酸側鎖を有する脂質分子を網羅したため、MRM ライブラリに含まれる脂質分子の数は約 2500 種類にも及んだ。また、各脂質分子において構造特異的な MS/MS フラグメントを用いることで、約 5000 種類の MRM トランジションを決定した。さらに、各脂質分子を定量するために必要なデータポイント数を担保できるよう、これらの MRM トランジションを 16 種類のスケジュール MRM メソッドに分割した。当該研究で提案したワイドターゲット定量リピドーム解析法を以下に記す。(i) 脂質クラスごとに内部標準物質を添加した抽出サンプルを準備し、各サンプルから等量ずつ混合した quality control (QC) サンプルを作成する。(ii) 16 種類のスケジュール MRM メソッドを用いて QC サンプルをスクリーニングし、定量対象とする脂質分子を選択する。(iii) これらの脂質分子を含有したスケジュール MRM を作成し、全サンプルの定量分析を実施する (図 14)。

4. 考察

当該研究では、生体内に存在する脂質分子を包含した MRM ライブラリを作成し、膨大な種類の脂質分子を高感度かつ定量可能な新規リピドーム解析手法を開発した。脂質は親水性の極性ヘッドグループと疎水性の脂肪酸側鎖の組み合わせにより膨大な種類が存在し、幅広い極性を有している。これまで、リピドーム解析を実施するために様々な方法が提案されているが、包括的かつ定量的なリピドーム解析手法は未だに開発されていない。広範囲に渡る脂質分子の測定は、脂質代謝を理解するための新たな知見を提供することに繋がる。また、個々の脂質分子の定量分析を実現することで、異なる日や異なる研究施設で得られたデータの絶対比較が可能となる。先行研究では BEH カラムを用いた SFC/Q-TOF-MS 分析法により、ブタの脳抽出物において合計 436 種類の脂質分子をハイスループット分析したことが報告されている⁶⁷⁾。さらに、クロマトグラフィーの分解能の点においても SFC が従来の脂質クラスの分離法 (NPLC や HILIC) より優れていることを明らかにしている。しかし、リゾリン脂質の位置異性体 (例えば LPC 16:0 (*sn*-1) と LPC 16:0 (*sn*-2)) やジアシルリン脂質の構造異性体 (例えば PC 16:0-22:6 と PC 18:2-20:4) の同定までは実施されていなかった。したがって、既述の問題を解決するためには、位置異性体や構造異性体を含む個々の脂質分子の分離や定量性についても詳細に検討する必要がある。

まず、BEH カラムを用いてモディファイア溶液によるピーク形状への影響について

検討した。多くの極性脂質 (LPA, LPS, PA, PS) のピーク形状は、メタノールに5%の水を添加することで改善された (図 17)。メタノールに5%の水を添加すると、移動相の溶媒和力の向上や化合物の溶解度の上昇により、フラボノイドグリコシドなど親水性化合物のピーク形状が改善されることが報告されている⁷³⁾。したがって、既述の極性脂質分子でも同様の改善が観察されたことが示唆されている。SFC 条件の最適化の後、BEH カラム, 2-EP カラム, 2-PIC カラム, 1-AA カラム, DIOL カラム, DEA カラムを用いて各脂質クラスの分離挙動について検討した。これらのカラムは 1.7 μm の BEH 粒子を元に開発されたものである。図 23 は各カラムにおける各脂質標準品の保持時間を説明変数とし、PCA を用いて脂質クラスの保持の特徴を評価したものである。官能基としてベンゼン環を有する3種類のカラム (2-EP, 2-PIC, 1-AA) を使用する場合、CE や TAG といった疎水性の高い脂質は他のカラムと比較して少し強い保持挙動を示した (図 20, 図 23)。一方、DEA カラムのみはクロマトグラフィーの分解能を維持し、ピーク形状を損なうことなく、PI, PS, PA, LPI, LPS, LPA など極性の高い酸性脂質の強い保持挙動を示した (図 20, 図 23)。この理由として、強い塩基性を有する DEA カラムの固定相が極性の高い酸性脂質の保持や分離に寄与した可能性が考えられる。したがって、DEA カラムを用いることでほとんど全ての脂質クラスのベースライン分離を達成することができた。各脂質クラスを高分離することで、異なる脂質クラス間のマトリクス効果を回避するだけでなく、化合物の同定精度を改善することにも繋がる。さらに、DEA カラムを用いることで、リゾリン脂質 (LPC, LPE, LPG) や中性脂

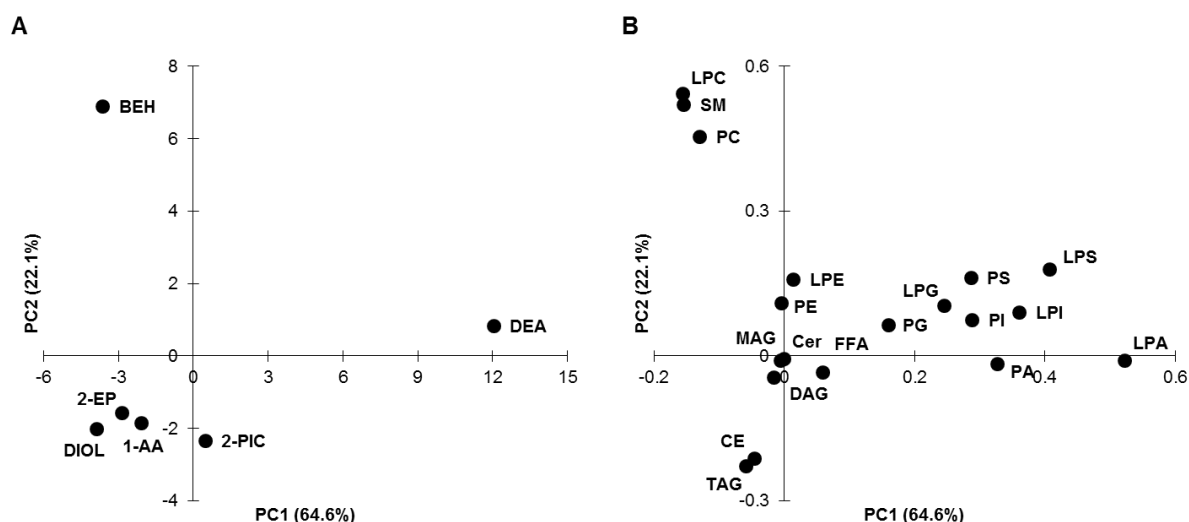


図 23 PCA を用いた各カラムの特徴の評価

(A) スコアプロット. (B) ローディングプロット. 説明変数は各カラムにおける各脂質標準品の保持時間を使用した. スケーリングは実施しなかった.

質 (MAG, DAG) の位置異性体を分離することができた。リゾリン脂質は、グリセロリン脂質やスフィンゴ脂質の代謝における生物活性分子や前駆体、中間体として知られている。しかし、生体内における 1-アシル-2-リゾリン脂質と 2-アシル-1-リゾリン脂質の機能の違いは未だに明らかにされていない⁷⁴⁾。同様に、1-アシル-2-MAG と 2-アシル-1-MAG や、1,2-アシル-DAG と 1,3-アシル-DAG の機能の違いについても不明である。これらの脂質分子の機能や役割を解明するために、当該分析手法が今後の研究に大いに役立つことが期待される。

続いて、異なる脂肪酸側鎖を持つジアシルリン脂質の構造異性体 (例えば PC 16:0-20:4 と PC 18:2-18:2) の分離を検討した。これらの構造異性体は DEA カラムを用いて分離することができなかったが、脂肪酸イオンの MRM トランジションに基づき、PC 16:0-20:4 (840.6 > 255.3 と 840.6 > 303.2) と PC 18:2-18:2 (840.6 > 279.3) を個々に識別することができた。一方、個々の TAG 分子種については、脂肪酸がニュートラルロスとして失われたフラグメントイオンの MRM トランジションでは質量分離を達成することができなかった。TAG はグリセロール骨格の *sn*-1, *sn*-2, *sn*-3 の位置に 3 種類の脂肪酸側鎖を持つため、クロマトグラフィーで共溶出した TAG の構造異性体は個々に識別することができない。例えば、TAG 16:0-18:1-20:4 (898.8 > 577.5, 898.8 > 599.5, 898.8 > 625.5) と TAG 16:0-18:2-20:3 (898.8 > 575.5, 898.8 > 601.5, 898.8 > 625.5) は同じ MRM トランジション (898.8 > 625.5) を含む。したがって、DEA カラムを用いた SFC の分離モードのように、脂質クラスの違いに基づく分離分析においては、個々の脂質値を取得することができない。したがって当該分析手法では、これらの構造異性体の脂質値を合計することで TAG 分子種を定量した。脂肪酸側鎖情報を有する詳細な分子情報を得るためには、逆相カラムを適用した LC/MS/MS や SFC/MS/MS の分析法が推奨される⁷⁵⁾。

QqQ-MS における MRM モードは S/N 比が向上することから非常に感度が高く、堅牢な定量値を取得することができるものの、一方で事前に測定対象とする化合物を選択しないといけない点から、包括的なリポドーム解析において致命的な問題点を有している。そこで当該研究では生体内に存在する脂質分子を包含した MRM ライブラリを作成した。QC サンプルを使用し、作成した MRM ライブラリで生体内に存在する脂質分子をスクリーニングすることで、定量可能な脂質分子の効率的な選択を実現した。Q-TOF-MS はノンターゲットでのリポドーム解析を達成することができるが、QqQ-MS と比較して各脂質クラスの感度の低下が生じた。さらに、順相カラムを使用した場合、同じ脂質クラスの脂質分子がほとんど同じ保持時間で溶出するため、Q-TOF-MS の四重極におけるプレカーサーイオンのアイソレーションは事実上不可

能である。したがって、異なる脂肪酸側鎖を有する構造異性体の質量分離を達成するためには QqQ-MS の MRM モードによる分離が最適であることが示された。

先行研究では、脂質分子のイオン化効率は主に極性ヘッドグループに依存し、脂肪酸側鎖の影響をほとんど受けないことが示されている^{49,76)}。さらに、脂肪酸鎖長および二重結合数が異なる脂質分子のイオン化効率には有意差がないことが実験的に証明されている⁷¹⁾。したがって、各脂質クラスをクロマトグラフィーにより分離し、添加した各脂質クラスに代表的な脂質標準品を元に内在性の脂質分子のピーク面積値を標準化することで、個々の脂質分子を一斉に定量することができる。当該研究では定量性の検証を実施するために、WHHLMI ウサギの血漿から検出された脂質分子を定量し、同じ合成脂質標準品を同濃度添加して再度測定することで、分析における回収率を算出した。その結果、64.9%から 103.5%の範囲内に収まり (表 3)、20 分以内に脂質分子を高精度で定量することができた。さらに、当該分析手法では個々の脂質分子を包括的に定量することができるため、各脂質クラスの濃度を精確に算出することが可能である。RPLC で分離した場合、同一脂質クラスの分子は異なる時間に溶出するため、それぞれの保持時間におけるマトリクス効果を補正することができず、脂質クラスの定量を実施することができなかった。したがって、市販の測定キットを使った脂質クラスの定量が主流であり、コレステロールや総リン脂質、トリグリセリド濃度しか測定することができなかった。一方、当該分析では個々の脂質分子の濃度を合算することで各脂質クラスの濃度を算出することが可能であり、今後脂質代謝の議論を深めるうえで画期的な手法になり得ることが期待される。

5. 小括

当該研究では、SFC/QqQ-MS を用いることでワイドターゲット定量リピドーム解析手法を構築するに成功した。生体内に存在する脂質分子を包含した MRM ライブラリを搭載することで血液や細胞、臓器などといった様々な生体試料にも適用可能となり、定量性の向上に伴いこれまで困難であった異なる研究施設で取得したデータや異なる日に取得したデータの絶対比較が可能となった。当該分析技術を元に脂質分子の内生量の情報を取得することで、脂質の生物学的機能の発達に大きく貢献することが期待される。当該分析技術は、脂質代謝や薬物投与試験、バイオマーカー探索に関する研究において有用な手法である。

第3章 リポタンパク質定量プロファイリング法の開発

1. 緒言

リポタンパク質粒子における脂質およびアポリポタンパク質組成の変化が動脈硬化性心血管疾患を誘発することが報告されており⁷⁷⁾, 近年リピドーム解析が動脈硬化性心血管疾患の病態の解明に用いられている. しかし, これらの研究は様々なりポタンパク質が混在した血漿や血清を測定試料としたものが大半であり, 動脈硬化におけるリポタンパク質の脂質組成の変化について理解を深めることができなかった. 一方で, 家族性低 β リポタンパク血症⁷⁸⁾, 高脂血症⁷⁹⁾, 冠動脈疾患⁸⁰⁾ のリポタンパク質画分を測定した研究も稀に存在するが, 画分の情報では各リポタンパク質画分に含まれる脂質分子の相対量のみにはしか言及することができない. リポタンパク質に含まれる脂質の質的变化を評価し, リポタンパク質代謝機構を解明するためには, リポタンパク質粒子レベルの脂質を捉える技術基盤が必要不可欠である.

アポリポタンパク質は血液中のリポタンパク代謝を調節し, 非交換性と交換性に分類される. リポタンパク質粒子に固定された非交換性アポリポタンパク質である apoB-100 は VLDL 粒子や LDL 粒子に 1 分子を包含するため^{81,82)}, 各リポタンパク質粒子の脂質組成は, 画分の脂質分子濃度を apoB-100 値から算出した粒子数で標準化することによって決定することができる. さらに, アポリポタンパク質は心血管疾患 (Cardiovascular disease, CVD) を予測するための重要なマーカーとして認識されている^{83,84)}. 例えば, 血漿中の apoB/apoA-I の比は, 総コレステロール濃度や総トリグリセリド濃度といった従来の診断マーカーよりも精確に CVD のリスクを予測可能であることが報告されている⁸⁵⁾. したがって, アポリポタンパク質の定量分析は, 血漿リポタンパク質画分のリピドーム解析のデータを標準化するだけでなく, CVD を予測するための新規なバイオマーカーの発見にも有用であることが期待される.

ウェスタンブロット⁸⁶⁾ や酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)⁸⁷⁾ などの抗原に基づく測定は, アポリポタンパク質の定量測定において最も一般的な方法である. これらの測定は高感度で特異性が高いものの, ウサギの apoB-100 など, 特定の動物種の目的タンパク質に対する特異的抗体や抗原の開発は実施されておらず, 開発のためには時間を要する. 近年, プロテオーム解析によるタンパク質の分析技術が発達し, ヒトやモデル動物由来のアポリポタンパク質の測定に関しても同様に実施されている⁸⁸⁻⁹²⁾. なかでもボトムアッププロテオミクスでは, 還元, アルキル化したタンパク質をアセトンなどの有機溶媒により沈殿させ, トリプシン消化により分解したペプチド断片を用いてタンパク質の分析を行う. タンパク質のアミ

ノ酸配列は動物種ごとに異なるが、測定対象となるペプチドのアミノ酸配列が異なるだけであるので、ウェスタンブロットや ELISA とは異なり様々な動物種において臨機応変に対応可能である。さらに、 ^{13}C や ^{15}N 標識したリジンやアルギニンを C 末端に持つ標準試料を内部標準物質とした安定同位体希釈法を用いることで、LC/MS/MS によるターゲットタンパク質の絶対定量分析を実施することができる^{93,94)}。

病態モデル動物は病態機序の解明や薬剤効果などを臨床試験の前段階として詳細に検討するために重要な役割を果たす。代謝物は種を越えて共通の分子が多く、最終的な表現型の変化を反映するため、病態モデル動物にリポドーム解析を適用することで、病態機序の解明や新規バイオマーカーの発見に繋がることが期待されている。例えば、病態モデル動物では食事や照明サイクルといった生活環境の調整を行うことが可能であるため、ヒト検体において課題となる遺伝的背景や生活習慣などによる個体差の軽減に繋がる。また、動脈硬化など初期段階において自覚症状のない疾患においても、疾患の段階ごとのスクリーニングに真価を発揮する。さらに、疾患と関連深い代謝経路をノックアウトすることで表現型への影響も検証可能である。

病態モデル動物を用いた試験では、ヒトとの種差を最大限に考慮し、目的に応じた動物種を選択する必要がある。リポタンパク質代謝に着目すると、マウスやラットではヒトと大きく異なり、ウサギは比較的類似していることが知られている。例えば、ヒトやウサギにおいて主要なリポタンパク質は LDL であるのに対し、マウスやラットでは主要なリポタンパク質は HDL である。これは、マウスやラットの血液中ではヒトと異なり CETP の活性が認められず⁹⁵⁾、HDL に含まれるコレステロールが VLDL や IDL、LDL へと転送されていないことが原因の一つであると考えられている。また、ヒトやウサギでは LDL で主要なアポリポタンパク質として apoB-100 を包含しているが、マウスやラットでは apoB-48 が主要なアポリポタンパク質として存在している。これは、肝臓における APOBEC1 の発現の有無が原因として挙げられる。全ての哺乳動物において、apoB をコードする遺伝子はほとんど全て RNA 編集が行われ⁹⁶⁾、apoB-48 が生成されるが、肝臓における RNA 編集は動物種により異なる。ヒトやウサギでは肝臓で APOBEC1 が発現していないため RNA 編集は行われず、結果として肝臓では apoB-100 のみを産生する⁹⁷⁾。しかし、マウスやラットなどげっ歯類では肝臓でも APOBEC1 が発現しているため、apoB-48 と apoB-100 のいずれもが産生される⁹⁷⁾。血液中からのリポタンパク質の消失速度は apoB-48 を包含している方が極めて速いため、リポタンパク質代謝の違いに影響を与えていると考えられる。リポタンパク質代謝だけでなく、動脈硬化病変もヒトとげっ歯類では異なる特徴を持つ。動脈硬化モデルマウスで発生する動脈硬化病変は脂質の蓄積や泡沫細胞に富み、線維成分が少

ない病変を形成する⁹⁸⁻¹⁰⁰。しかし、ヒトでは脂質とマクロファージの蓄積層を線維性皮膜が覆う病変や、平滑筋細胞やコラーゲン線維に富む病変など、様々な種類の病変を形成し¹⁰¹、マウス同様の病変を形成するのは稀である^{102,103}。ウサギはヒト同様に様々な種類の病変を形成するため、ヒトに近いモデル動物として使用されている。

WHHLMI ウサギはヒト家族性高コレステロール血症の病態モデル動物の一つであり¹⁰⁴、基礎研究や診断法の開発など多岐に渡り使用されている。これまで、WHHLMI ウサギは冠状アテローム性動脈硬化病変の進展の調査¹⁰⁵、放射性ヨウ素によりヨウ素化したペプチドプローブ断片を用いた LDL の酸化過程の観察¹⁰⁶、腸間膜脂肪蓄積とインスリン抵抗性、高脂血症、アテローム性動脈硬化の関係性についての研究¹⁰⁷などに使用されている。これらの研究成果に基づき、WHHLMI ウサギは心筋梗塞の病態機序の解明やバイオマーカーの探索を実施するうえで有用であることが明らかにされている。

そこで本章では、WHHLMI ウサギの血漿リポタンパク画分を測定対象とし、nano-LC/QqQ-MS を用いた apoB-100 の定量分析法と SFC/QqQ-MS を用いたリポドーム解析法に基づき、リポタンパク質の粒子に特異的な脂質成分を取得するための新規リポタンパク質定量プロファイリング法を構築することを目的とした。

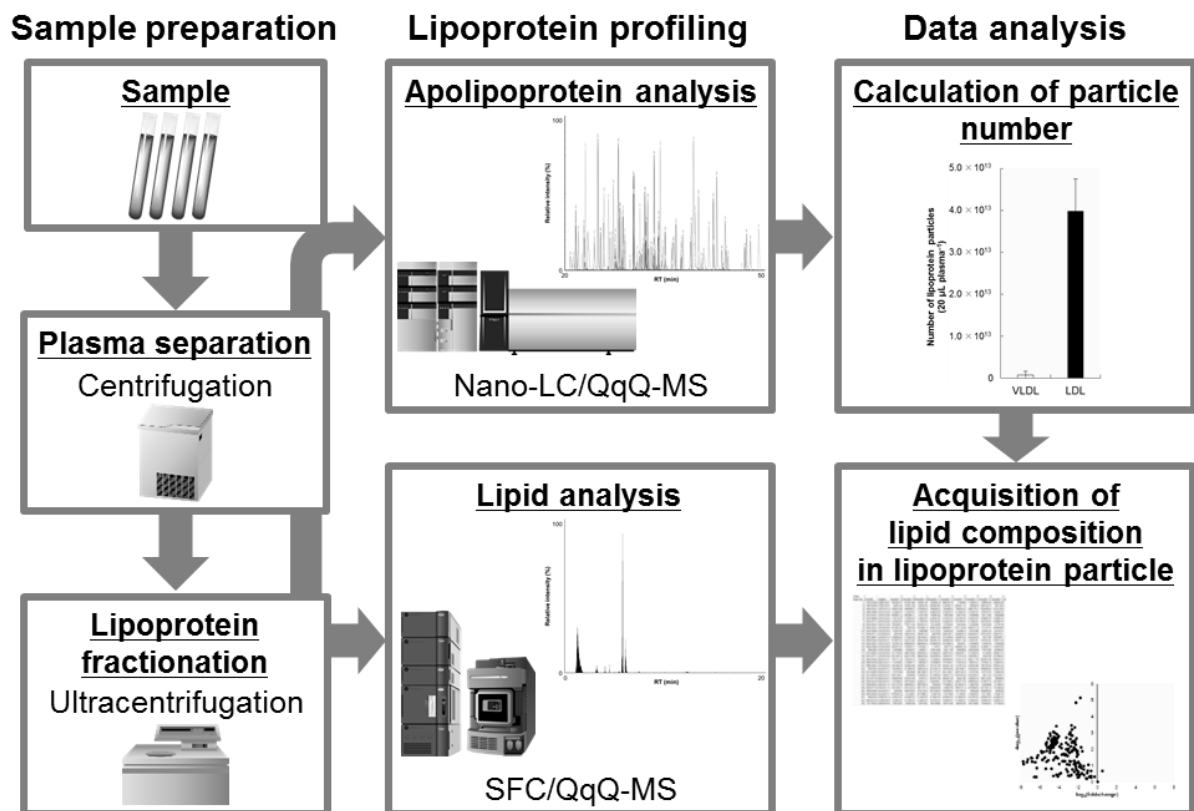


図 24 新規リポタンパク質定量プロファイリング法

2. 実験方法

2-1. 試薬

試薬特級の塩化ナトリウムや臭化ナトリウム、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol L^{-1}), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物は和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から購入した. LC/MS グレードの蒸留水, アセトニトリル, ギ酸は和光純薬株式会社から購入した. 酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. MS グレードのメタノールは関東化学株式会社 (東京, 日本), HPLC グレードのクロロホルムと LC/MS グレードの蒸留水はキシダ化学 (大阪, 日本) から購入した. 全ての脂質標準品は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した. ただし FA 17:0 は Sigma-Aldrich から購入した. 二酸化炭素 (99.5% グレード, 吉田酸素, 福岡, 日本) を SFC 移動相として用いた. 安定同位体標識 (アルギニンおよびリジンを ^{13}C および ^{15}N で標識) したペプチド (apoB-100, IEIPLPFGGK [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]; apoC-II, VQESLSSYW-DSAK [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]; apoE, AGQPWELALGR [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]) は Eurofins Genomics (東京, 日本) から購入した.

2-2. 実験動物

動物に関わる全ての実験は神戸大学動物実験委員会の承認を受け, 神戸大学動物実験実施規則, 動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 法律第 105 号 平成 18 年改正), 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 環境省告示第 88 号), 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針 (平成 18 年 文部科学省告示第 71 号) に基づいて実施した.

当該研究では 5 匹の WHHLMI ウサギを用いた. ウサギは一定の室温 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) かつ一定の明暗サイクル (12 h light/dark) の室内に金属製のケージを設置し, 個別に飼育した. 食事は普通食 (120 g/day; LRC4, オリエンタル酵母株式会社, 東京, 日本) と水を与えた.

2-3. リポタンパク質の超遠心分離

リポタンパク質はステップワイズ法に基づき超遠心分離法により分画を実施した^{108,109}. 塩化ナトリウムを 105°C の条件で 15 分間乾燥後 5.7 g 秤量し, 500 mL のメスフラスコに加えた. さらに 0.05 g の EDTA-2Na をメスフラスコに加え, 250 mL の蒸

留水と 0.5 mL の水酸化ナトリウムを加えて溶解させた。蒸留水を加えて 500 mL にスケールアップし、さらに 1.5 mL の蒸留水を加えることで 1.006 g mL^{-1} の比重液を調製した。また、臭化ナトリウムを 105°C の条件で 15 分間乾燥後 24.98 g 秤量し、 1.006 g mL^{-1} の比重液 100 mL に添加することで 1.182 g mL^{-1} の比重液を調製した。 1.019 g mL^{-1} の比重液は 1.006 g mL^{-1} の比重液 27.784 mL と 1.182 g mL^{-1} の比重液 2.216 mL を混合することにより調製した。また、 1.063 g mL^{-1} の比重液は 1.006 g mL^{-1} の比重液 20.284 mL と 1.182 g mL^{-1} の比重液 9.716 mL を混合することにより調製した。

EDTA-2Na チューブに 4 mL 採血し、 $700 \times g$, 4°C の条件で 25 分間遠心分離を行った。上層で得られた血漿のうち 1.5 mL を超遠心用チューブに入れ、 $700 \times g$, 4°C の条件で 3 分間スピンドウンを行った。血漿の上に 1.006 g mL^{-1} の比重液をパスツールピペットで 3.2 mL 重層し、 $375000 \times g$, 4°C の条件で 5 時間超遠心分離を行った。超遠心用チューブをカットし、上層 1.5 mL と下層をそれぞれ新しい超遠心用チューブに移した。上層に 1.006 g mL^{-1} の比重液をパスツールピペットで 3.2 mL 重層し、 $375000 \times g$, 4°C の条件で再び 5 時間超遠心分離を行うことで VLDL の洗浄を行った。再度超遠心用チューブをカットし、上層に浮上した VLDL を分析用サンプルとした。一方、先程得られた下層では、回収量 $x \text{ mL}$ を測定し、下記の数式 (1) に従って 1.182 g mL^{-1} の比重液を $y \text{ mL}$ 添加した後、5 秒間ボルテックスし、 $700 \times g$, 4°C の条件で 3 分間スピンドウンを行った。さらに、 1.019 g mL^{-1} の比重液をパスツールピペットで $(4.7-x-y) \text{ mL}$ 重層し、 $375000 \times g$, 4°C の条件で 5 時間超遠心分離を行った。その後、超遠心用チューブをカットし、下層を新しい超遠心用チューブに移した。下層に 1.019 g mL^{-1} の比重液をパスツールピペットで 3.2 mL 重層し、 $375000 \times g$, 4°C の条件で再び超遠心分離を行うことで IDL を除去し、下層の洗浄を行った。再度超遠心用チューブをカットし、下層の回収量 $a \text{ mL}$ を測定し、下記の数式 (2) に従って 1.182 g mL^{-1} の比重液を $b \text{ mL}$ 添加した後、5 秒間ボルテックスし、 $700 \times g$, 4°C の条件で 3 分間スピンドウンを行った。さらに、 1.063 g mL^{-1} の比重液をパスツールピペットで $(4.7-a-b) \text{ mL}$ 重層し、 $375000 \times g$, 4°C の条件で 5 時間超遠心分離を行った。その後、超遠心用チューブをカットし、上層に浮上した LDL を分析用サンプルとした。

$$\text{Sample } [x \text{ mL}] \times 1.006 + 1.182 y = \text{Sample } [x \text{ mL}] \times 1.019 + 1.019 y \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{Sample } [a \text{ mL}] \times 1.019 + 1.182 b = \text{Sample } [a \text{ mL}] \times 1.063 + 1.063 b \dots\dots\dots (2)$$

2-4. リピドーム解析用試料の調製

WHHLMI ウサギは絶食後 12 時間以上経過してから耳介中心動脈から採血した。ウ

サギ血漿リポタンパク質画分からの脂質の抽出は Bligh and Dyer 法を一部改変して実施した⁷⁰⁾。サンプル 20 μL に内部標準物質混合液 30 μL と混合溶液 (メタノール:クロロホルム:水=556:278:166, v/v/v) 1000 μL を添加し, 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後, 超音波処理によって 5 分間代謝物を抽出した後, 16000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 5 分間遠心分離した。上清 700 μL を新しいチューブに回収し, クロロホルム 195 μL と水 195 μL を添加した後, 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。再び 16000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 5 分間遠心分離することで 2 層に分離させ, 下層 200 μL を新しいチューブに回収した。回収した下層は混合溶液 (メタノール:クロロホルム=2:1, v/v) 600 μL を添加することで希釈した。

2-5. アポリポタンパク質定量分析用試料の調製

ウサギ血漿リポタンパク質画分からのアポリポタンパク質の抽出は, 先行研究の前処理法を一部改変して実施した¹¹⁰⁾。まず, タンパク質の還元とアルキル化を実施した。氷上に置いた低タンパク質吸着性チューブにサンプル 20 μL と 20 mg mL^{-1} のウシ血清アルブミンを 25 μL 添加し, 変性バッファー (500 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.5), 10 mM エチレンジアミン四酢酸, 7 M グアニジン塩酸塩) を 175 μL 添加した。50 mg mL^{-1} のジチオスレイトール溶液を 1 μL 添加し, チューブミキサーを使用してサンプルを室温で 60 分間振とうした。その後, チューブにアルミ箔を巻いて遮光してから 50 mg mL^{-1} のヨードアセトアミド溶液を 2.5 μL 添加し, チューブをセットしたチューブミキサーをアルミ箔で遮光してから室温で 60 分間振とうした。次に, タンパク質の沈殿を実施した。サンプル溶液に冷メタノール 600 μL , 冷クロロホルム 150 μL , 冷水 50 μL を添加して転倒混和させ, スイングローターを用いて 20000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 5 分間遠心分離した後, 上層を除去した。さらに冷メタノール 450 μL を添加し, 沈殿物を洗浄するため静かに転倒混和させ, スイングローターを用いて 20000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 5 分間遠心分離した後, 上層を除去した。もう一度スイングローターを用いて 20000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 1 分間遠心分離した後, 上層を完全に除去した。精製したタンパク質は, プロテアーゼ消化促進剤によりタンパク質分解効率を向上させつつ, リシルエンドペプチダーゼとトリプシンによる消化を実施した。6 M の尿素溶液を 9 μL 添加し, チューブミキサーを用いて室温で 10 分間振とうした後, 0.1 M の Tris-HCl バッファー溶液 (pH 8.5) を 36 μL 添加し, 超音波洗浄機を用いて完全に溶解させた。0.5 mg mL^{-1} のリシルエンドペプチダーゼ溶液を 1 μL と 1% のプロテアーゼ消化促進剤 (ProteaseMAXTM Surfactant) を 2.5 μL を添加し, サンプルを 25 $^{\circ}\text{C}$ で 3

時間インキュベートした。その後、 $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ のトリプシン溶液を $1 \mu\text{L}$ 添加し、サンプルを 37°C で 16 時間インキュベートした。最後にサンプルの脱塩処理を実施した。内部標準物質 $7.5 \mu\text{L}$ と 50% ギ酸水溶液 $3 \mu\text{L}$ を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。サンプルは GL-Tip SDB (ジーエルサイエンス株式会社, 東京, 日本) で脱塩処理を行い、濃縮乾固した後、0.1% のギ酸水溶液を $50 \mu\text{L}$ 添加した。

2-6. コレステロール, トリグリセリド, タンパク質の測定

総コレステロール値および総トリグリセリドの濃度はコレステロール E-テストアッセイキットおよびトリグリセリド E-テストアッセイキット (和光純薬株式会社) を用いて測定を行った。タンパク質の濃度は Bradford 法を用いて測定を行った¹¹¹⁾。

2-7. SFC/QqQ-MS によるリピドーム解析条件

リピドーム解析は 2 章で構築した分析法を適用した。SFC 分析条件を以下に記す。移動相 (A) は超臨界二酸化炭素を使用し、移動相 (B) は 0.1% (w/v) の酢酸アンモニウムを添加した混合溶媒 (メタノール:水=95:5, v/v) を使用した。インジェクション量は $1 \mu\text{L}$ に設定した。流速は 1.0 mL min^{-1} に設定し、メイクアップポンプの流速は 0.2 mL min^{-1} に設定した。移動相 (B) は 1% (1 min), 1–65% (11 min), 65% (6 min), 65–1% (0.1 min), 1% (1.9 min) のグラジエント条件で実施した。カラムオープン温度は 50°C に設定した。ABPR は 1500 psi に設定した。分析条件は 20 分間に設定した。カラムは ACQUITY UPC²™ DEA カラム ($100 \times 3.0 \text{ mm i.d.}$, particle size: sub $1.7 \mu\text{m}$, Waters) を使用した。MS 分析条件を以下に記す。キャピラリー電圧は 3.0 kV に設定した。脱溶媒温度は 500°C に設定した。コーンガス流速は 50 L h^{-1} , 脱溶媒ガス流速は 50 L h^{-1} に設定した。

2-8. Nano-LC/QqQ-MS によるアポリポタンパク質の分析条件

Nano-LC-MS は送液ユニット (LC-20Adnano, 島津製作所, 京都, 日本), 低容量ナノバルブ (FCV nano, 島津製作所), ナノスプレーインターフェイス (N8040, エーエムアール株式会社, 東京, 日本), 高性能 ESI スプレーチップ (Fortis tip 150-20, エーエムアール株式会社) と三連四重極型質量分析計 (LCMS-8040, 島津製作所) を用い, LabSolutions LCMS ソフトウェア version 5.6 (島津製作所) により制御した。MRM モードを用いたペプチドの分析条件は先行研究を元に設定した¹¹²⁾。Nano-LC の分析条

件を以下に記す. 移動相 (A) は 0.1% (v/v) のギ酸を添加した混合溶媒 (水:アセトニトリル=95:5, v/v) を使用し, 移動相 (B) は 0.1% (v/v) のギ酸を添加した混合溶媒 (アセトニトリル:水=95:5, v/v) を使用した. カラムは L-column Micro L-C18 (150 × 0.1 mm i.d., particle size: 3 μM, CERI) を使用し, トラップカラムは L-column Micro L-C18 (5 × 0.3 mm i.d., particle size: 5 μM, CERI) を使用した. インジェクション量は 1 μL に設定した. 流速は 400 nL min⁻¹ に設定した. 移動相 (B) は 0% (7 min), 0–65% (38 min), 65–100% (5 min), 100% (15 min), 100–75% (2 min), 75–0% (8 min), 0% (15 min) のグラジエント条件で実施した. また, MS の分析条件を以下に記す. 脱溶媒温度は 150 °C に設定し, ヒートブロック温度は 200 °C に設定した. 衝突誘起解離ガスの圧力は 310 kPa に設定し, インターフェイスの電圧は 1.6 kV に設定した.

2-9. アポリポタンパク質定量分析の MRM メソッド

ウサギのアポリポタンパク質のアミノ酸配列は National Center for Biotechnology Information のデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて取得した. また, トリプシン消化したペプチド断片の MRM トランジションは Skyline ソフトウェア version 2.5 を用いて決定した¹¹³⁾. Skyline で最適化したパラメータを以下に記す. プレカーサーイオンの電荷は二価に設定し, プロダクトイオンの電荷は一価に設定した. プロダクトイオンは y イオンを選択し, 1 つのペプチド断片から 3 種類のプロダクトイオンを検出した. 質量許容誤差は 0.5 Da に設定し, 質量範囲は m/z 50–2000 に設定した. ペプチドの質量とデータベースのペプチド理論質量の許容誤差は 0.055 Da に設定した.

2-10. データ解析

各アポリポタンパク質の MRM クロマトグラムは Skyline ソフトウェア version 2.5 を用いて解析した¹¹³⁾. アポリポタンパク質の濃度は, 非標識のペプチド断片と安定同位体標識 (アルギニンやリジンを ¹³C, ¹⁵N 標識) したペプチド断片のピーク面積値を用いて算出した. 一方, 脂質分子の同定と定量は MassLynx ソフトウェアを用いた. 定量値は, 各脂質分子のピーク面積値と, サンプル抽出時に添加した内部標準物質とのピーク面積値を用いて算出した.

2-11. 統計解析

WHHLMI ウサギにおける VLDL 画分と LDL 画分の脂質値の統計学的有意差は、F 検定により 2 群のデータの分散が等しいかを検定し、等分散であると仮定された場合はスチューデントの *t* 検定、等分散でないと仮定された場合はウェルチの *t* 検定を実施した (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). 相関関係はピアソンの相関解析に基づき評価した.

3. 結果

3-1. ウサギの個体情報

当該研究では 21 月齢の WHHLMI ウサギにおける血漿およびリポタンパク質画分 (VLDL および LDL) のアポリポタンパク質定量分析とリピドーム解析を実施した. 表 5 は WHHLMI ウサギにおける月齢, 性差, 体重, 総コレステロール濃度, 総トリグリセリド濃度を示す. WHHLMI ウサギでは総コレステロールの大半は LDL コレステロールが占め, HDL は極微量にしか存在しなかった. この結果は過去の知見とも一致していた⁶⁸⁾.

表 5 WHHLMI ウサギの個体情報

		WHHLMI rabbit (<i>n</i> = 5)
Age	Month	21 ± 0
Sex	% male	40
Weight	kg	3.4 ± 0.4
Total cholesterol	mg mL ⁻¹	9.14 ± 2.20
Total triglyceride	mg mL ⁻¹	3.05 ± 1.71
VLDL cholesterol	mg mL ⁻¹	0.79 ± 0.84
LDL cholesterol	mg mL ⁻¹	8.26 ± 1.89
HDL cholesterol	mg mL ⁻¹	0.09 ± 0.03
VLDL triglyceride	mg mL ⁻¹	0.76 ± 0.75
LDL triglyceride	mg mL ⁻¹	2.11 ± 0.98
HDL triglyceride	mg mL ⁻¹	0.19 ± 0.06

3-2. アポリポタンパク質のトリプシン消化断片の一斉分析

まず、nano-LC/MS/MS を用いたターゲットプロテオミクス技術に基づき、アポリポタンパク質 (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoA-V, apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoF) の一斉分析法の開発を実施した。ウサギアポリポタンパク質の定量分析に用いるターゲットペプチド断片を決定するために、WHHLMI ウサギから採取した血漿およびリポタンパク質画分 (VLDL および LDL) を用いてトリプシン消化したペプチド断片のスクリーニングを行った。WHHLMI ウサギから検出された各アポリポタンパク質由来のペプチド断片の検出数を表 6 に示す。当該研究では、12 種類のアポリポタンパク質を正確に同定するため、これらのアポリポタンパク質に由来する合計 146 種類のペプチド断片をそれぞれ 3 種類から 4 種類の MRM トランジションで測定した。そのため、ペプチド断片のスクリーニングに使用した MRM トランジションは合計 479 種類にも及んだ。その結果、多数のペプチド断片が血漿やリポタンパク質画分で検出されたが、リポタンパク質画分で検出されたペプチド数は血漿で検出されたペプチド数よりも多かった (表 6)。MRM モードを用いた nano-LC/QqQ-MS の測定により、ほとんど全てのアポリポタンパク質を同定することに成功した (表 6)。

表 6 ウサギのアポリポタンパク質から検出されたペプチド断片の数

Apolipoproteins	Number of peptides (MRM transitions)	Number of detected peptides			Peptide sequences for quantification
		Plasma	VLDL	LDL	
apoA-I	6 (20)	6	2	6	—
apoA-II	3 (11)	1	1	1	—
apoA-IV	7 (22)	3	3	6	—
apoA-V	6 (20)	0	6	4	—
apoB-100	92 (302)	84	91	92	IEIPLPFGGK
apoC-I	2 (6)	1	2	2	—
apoC-II	3 (9)	0	3	3	VQESLSSYWDSAK
apoC-III	5 (16)	2	3	3	—
apoC-IV	5 (16)	0	4	4	—
apoD	4 (15)	2	3	4	—
apoE	8 (26)	7	7	8	AGQPWELALGR
apoF	5 (16)	1	2	4	—
Total	146 (479)	107	127	137	

本学位論文に関連する論文 2 より許可を得て転載している。

3-3. Nano-LC/QqQ-MS を用いたアポリポタンパク質の定量分析

一斉スクリーニングの結果を踏まえ、リポタンパク質画分から検出されたアポリポタンパク質の定量分析を実施した。当該研究では、12種類のアポリポタンパク質のうち、VLDL および LDL 画分に多く含まれ、これらの代謝において重要であることが知られている apoB-100, apoC, apoE を定量対象として選定した。各アポリポタンパク質の定量分析に使用するペプチド断片を以下に記す：apoB-100, IEIPLPFGGK; apoC-II, VQESLSSYWDSAK; apoE, AGQPWELALGR (表 6)。これらのペプチド断片はいずれも測定するタンパク質に特有であり、イオン化効率が高い配列であった。各アポリポタンパク質の定量に使用した非標識のペプチド断片 (Light) と安定同位体標識 (アルギニンやリジンを ^{13}C , ^{15}N 標識) したペプチド断片 (Heavy) の MRM トランジションを表 7 に示す。WHHLMI ウサギのリポタンパク画分に含まれる apoB-100, apoC-II および apoE の濃度は、Light と Heavy のピーク面積値を用いて算出した。

表 7 アポリポタンパク質の定量に用いたペプチド断片の MRM トランジション

Apolipoproteins	Peptide sequences	Label	MS ¹ (m/z)	MS ² (m/z)				RT (min)
				y8	y7	y6	y5	
apoB-100	IEIPLPFGGK	light	535.8	828.5	715.4	618.4	505.3	39.1 ± 0.2
		heavy	539.8	836.5	723.4	626.4	513.3	39.1 ± 0.2
apoC-II	VQESLSSYWDSAK	light	750.4	943.4	856.4	769.4	–	32.1 ± 0.3
		heavy	754.4	951.4	864.4	777.4	–	32.1 ± 0.3
apoE	AGQPWELALGR	light	599.3	941.5	844.5	658.4	–	35.7 ± 0.3
		heavy	604.3	951.5	854.5	668.4	–	35.7 ± 0.3

本学位論文に関連する論文 2 より許可を得て転載している。

さらに、20 μL のリポタンパク質画分から得られた apoB-100, apoC-II および apoE の分子の数をアボガドロ定数 (N_A) を用いて計算した。既述の通り、apoB-100 は VLDL 粒子や LDL 粒子に 1 分子を包含するため^{81,82)}、apoB-100 の分子の数に基づき VLDL および LDL 粒子数を算出した (図 25A)。その結果、WHHLMI ウサギでは血液中で LDL 粒子が VLDL 粒子より非常に多く存在していることが分かった。また、20 μL のリポタンパク質画分から得られた apoC-II と apoE の分子の数をリポタンパク質の粒子数で標準化し、リポタンパク質粒子に含まれる apoC-II と apoE の分子の数を測定した (図 25B)。その結果、apoC-II と apoE は LDL 粒子よりも VLDL 粒子に多く存在していることが分かった。

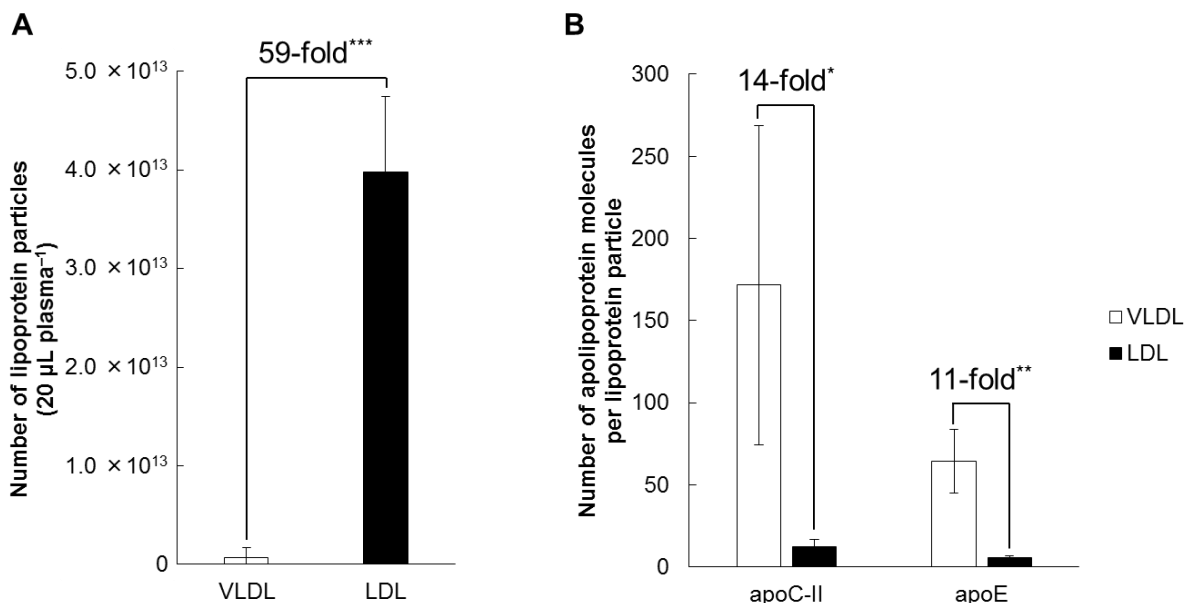


図 25 WHHLMI ウサギにおけるアポリポタンパク質の定量分析

(A) リポタンパク質の粒子数 ($n=5$). (B) リポタンパク質 1 粒子あたりの apoC-II および apoE の分子数 ($n=5$). エラーバーはウサギ検体の標準偏差を示す. 統計解析は F 検定により 2 群のデータの分散が等しいかを検定し, 等分散であると仮定された場合はスチューデントの t 検定, 等分散でないと仮定された場合はウェルチの t 検定を実施した ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

本学位論文に関連する論文 2 より許可を得て転載している.

3-4. SFC/QqQ-MS を用いた血漿のリピドーム解析

第 2 章で作成した脂質 MRM ライブラリを用いて WHHLMI ウサギの血漿に含まれる脂質分子の一斉スクリーニングを実施した. 図 26 は WHHLMI ウサギ血漿から得られた MRM クロマトグラムを示す. 血漿脂質のスクリーニングの結果, WHHLMI ウサギの血漿から合計 352 種類の脂質分子が同定された. また, ほとんど全ての脂質クラスはベースライン分離され, 同じ脂質クラスの脂質分子はほとんど分離しないことが実サンプルからも確認された. リポタンパク質は血漿の構成成分であるため, これら 352 種類の脂質分子を測定するための MRM メソッドを再構築し, リポタンパク質画分へと適用した. 抽出過程で内部標準物質を添加したりポタンパク質画分を用いて脂質分子の定量分析を実施したところ, 合計 279 種類の脂質分子を定量することに成功した (図 27A).

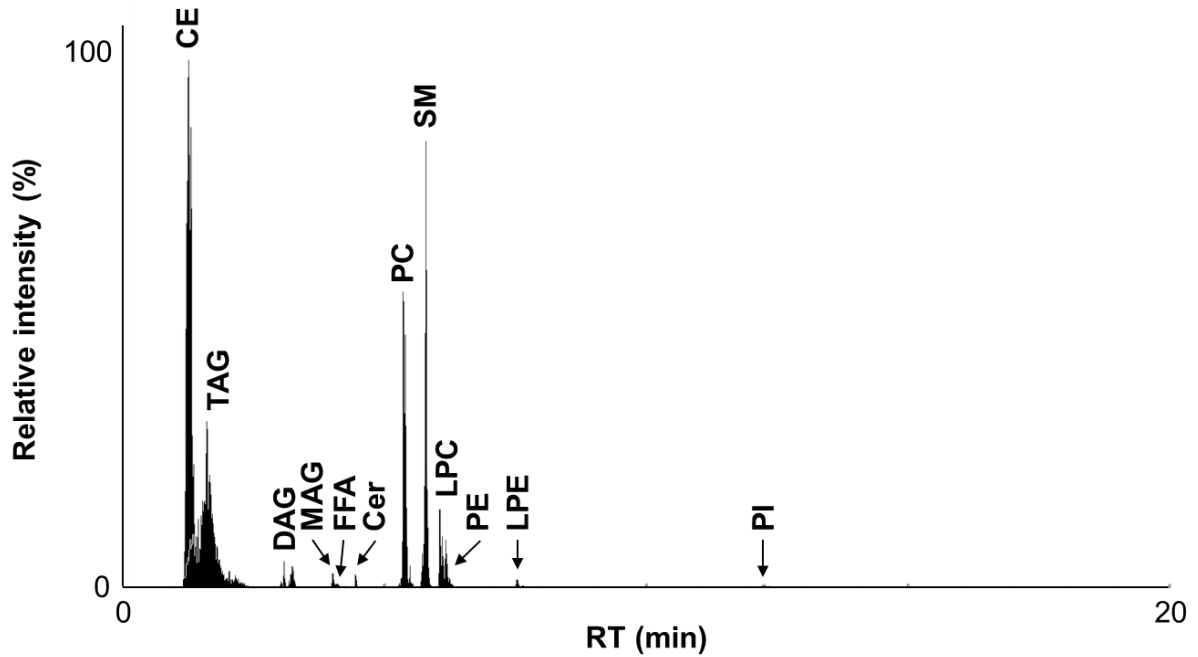


図 26 WHHLMI ウサギ血漿から得られた MRM クロマトグラム

3-5. リポタンパク質粒子の脂質組成の決定

リポタンパク質画分のリピドーム解析結果を算出した粒子数で標準化し、VLDL と LDL 粒子における脂質組成を定量的に評価した。図 27 は WHHLMI ウサギにおける VLDL 粒子と LDL 粒子の間の個々の脂質濃度の比較を示す。ほとんど全ての脂質分子は LDL 粒子よりも VLDL 粒子に多く含有していることが観察された。特に、リポタンパク質リパーゼや肝性リパーゼにより積極的に加水分解されることが知られている TAG は、VLDL から LDL に代謝される過程で大幅に減少していることが示された。一方、リン脂質に関しては TAG ほど VLDL の代謝過程で低下していなかった。興味深いことに、PE のなかでもジアシル型 PE はアルケニルアシル型 PE (PE プラズマローゲン) より VLDL の代謝過程で減少していた (図 27B)。本章で提案された新規リポタンパク質定量プロファイリング法を用いることで、WHHLMI ウサギのリポタンパク質代謝における脂質分子の変動を正確に評価することができた。

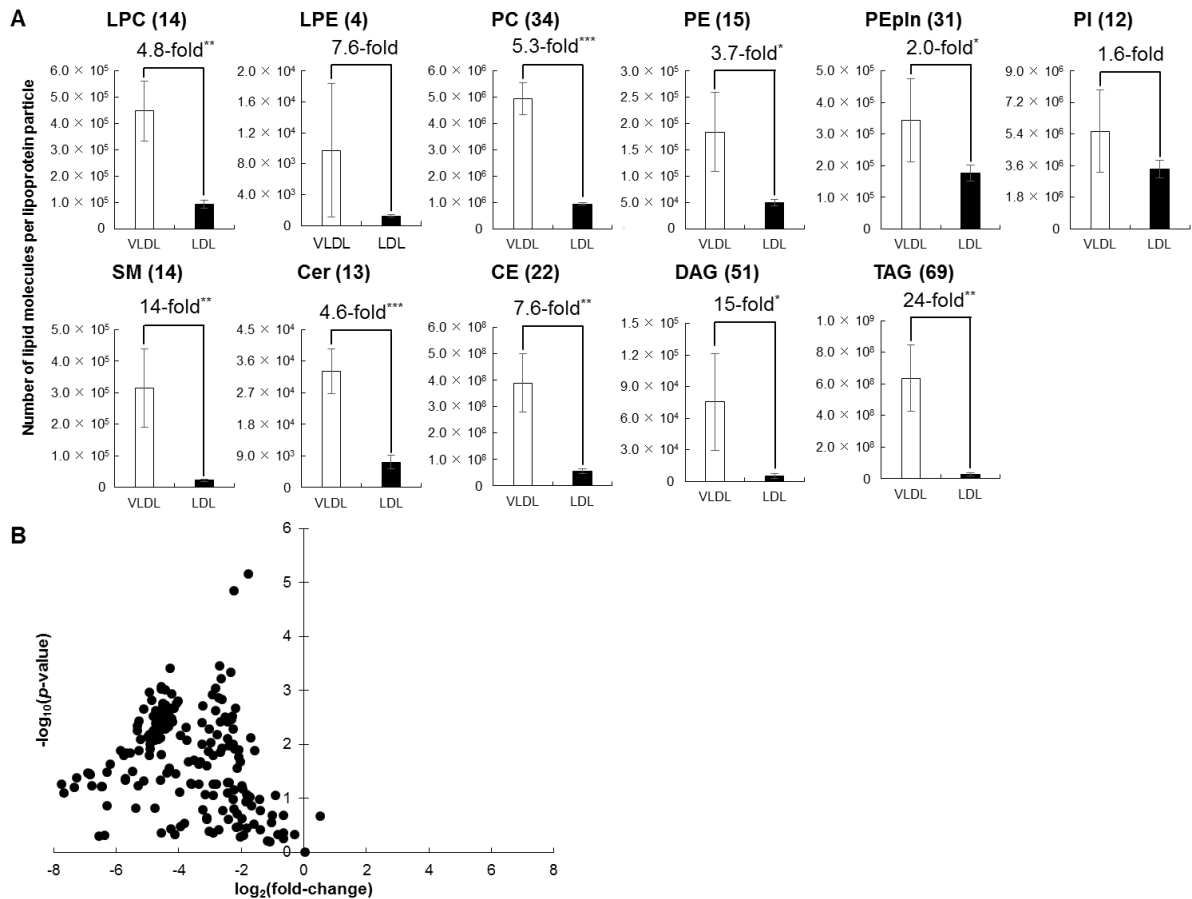


図 27 血漿リポタンパク質粒子の脂質プロファイリングの比較

(A) 脂質クラスの比較. エラーバーはウサギ検体の標準偏差を示す. 統計解析は F 検定により 2 群のデータの分散が等しいかを検定し, 等分散であると仮定された場合はスチューデントの t 検定, 等分散でないと仮定された場合はウェルチの t 検定を実施した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). 括弧内の数字は観測された脂質分子の数を示す. (B) 脂質分子の volcano plot. VLDL 粒子に含まれる脂質濃度を分母, LDL 粒子に含まれる脂質濃度を分子にした割合を \log_2 変換した値を横軸に示す.

4. 考察

当該研究では, nano-LC/QqQ-MS を用いたアポリポタンパク質の定量分析法を構築し, apoB-100 の濃度に基づきリポタンパク質画分に含まれる粒子数を測定した. さらに, リポタンパク質画分のリピドーム解析結果を標準化することで, リポタンパク質粒子の脂質組成を決定することに成功した. アポリポタンパク質はリポタンパク代謝において特定の役割を果たすことが知られている¹¹⁴⁾. 当該研究では, まず血漿とリポタンパク質画分に含まれるアポリポタンパク質をそれぞれ測定した. その結果, リポタンパク質画分で同定されたペプチドの数は血漿で検出されたペプチドの数よりも多かった (表 6). LC/MS/MS を用いて化合物を測定する場合, 生体試料の夾雑物に

よるマトリクス効果が原因となり感度の低下が懸念される。したがって、血液中でも豊富なタンパク質であるアルブミンはリポタンパク質の分画過程（超遠心分離）で除去され、リポタンパク質画分ではイオン化サプレッションが軽減されていることが考えられる。当該結果から、アルブミンの除去により同定されたペプチドの数の違いに影響を及ぼしたことが予想される。また、アポリポタンパク質はリポタンパク質ごとに存在量が異なると言われている。例えば、apoC は VLDL 粒子に主に存在するアポリポタンパク質成分であり、リポタンパク質リパーゼの調節因子である。また、apoB-100 は主に VLDL および LDL 粒子に多く存在し、apoE は肝臓や VLDL 粒子中に非常に豊富である。これらのアポリポタンパク質は、受容体を介したリポタンパク質の取り込みにおいてリガンドとして作用する。さらに、apoB-100 はリポタンパク質に固定されている非交換性アポリポタンパク質であり、VLDL および LDL 粒子に 1 分子包含するため、apoB-100 の濃度に基づきリポタンパク質の粒子数を算出することができる^{81,82)}。したがって、アポリポタンパク質の定量分析を実施することで、リポタンパク質代謝制御を理解し、かつリポタンパク質粒子の脂質組成を決定することが可能となる。

現在、質量分析を用いたタンパク質の測定は、トリプシン消化により分解したペプチド断片を用いて nano-LC/MS/MS で実施する方法が主流である。定量に用いるペプチド断片は測定するタンパク質に特有であり、イオン化効率が高い配列を選択する必要がある。また、安定同位体標識したペプチド断片を添加することで、脱塩などのサンプル前処理によるロスや共溶出した化合物によるマトリクス効果を除去することができる^{93,94)}。したがって、定量に用いるペプチド断片を安定同位体標識したペプチド断片を準備することで絶対定量を実施することができる。超遠心分離により血漿から分離した各リポタンパク質画分では、アポリポタンパク質がタンパク質の大半であることから、アポリポタンパク質由来のペプチド断片の一斉スクリーニングの結果に基づき、それぞれのアポリポタンパク質に特有なペプチド断片を決定することができた。

先行研究では、WHHLMI ウサギは LDL 受容体をほとんど欠損していることが報告されている。WHHLMI ウサギにおいて、LDL コレステロール濃度は VLDL コレステロールより約 11 倍高く（表 5, 図 28）、VLDL コレステロールが多く存在する通常の日本白色種ウサギとは VLDL と LDL の存在比が大きく異なる¹¹⁵⁾。WHHLMI ウサギで測定した apoB-100 の濃度に基づきリポタンパク質の粒子数を測定したところ、LDL 粒子は VLDL 粒子より非常に多く存在し、血液中に LDL 粒子が蓄積している可能性が示唆された（図 25A）。また、リポタンパク質粒子に含まれる apoC-II および apoE

の分子の数を算出したところ、いずれも VLDL 粒子に多く含まれることが示された。この結果は、これらのアポリポタンパク質が VLDL 粒子に主に存在するという過去の知見とも一致している。以上より、nano-LC/MS/MS を用いたアポリポタンパク質の定量分析は、リポタンパク質代謝制御を解明するために有用な手法であることが示された。

リポタンパク質定量プロファイリング法の開発は、リポタンパク質代謝の過程で変動した特定の脂質の生物学的機能を理解するために重要である。これまでリポタンパク質画分に含まれる脂質分子の相対定量値を標準化するパラメータとして、リポタンパク質の主要構成成分であるコレステロールやトリグリセリドが注目されてきた。WHHLMI ウサギにおいて VLDL と LDL 画分のコレステロール濃度、トリグリセリド濃度および apoB-100 濃度を比較したところ、これらの濃度はいずれも LDL 画分において有意に高値であった (表 5, 図 28)。しかし、apoB-100 の濃度はコレステロール濃度やトリグリセリド濃度と比較して LDL 画分で飛躍的に高い値を示した (図 28C)。この結果から、コレステロールやトリグリセリドはリポタンパク質の粒子数を反映していない可能性が示唆された。

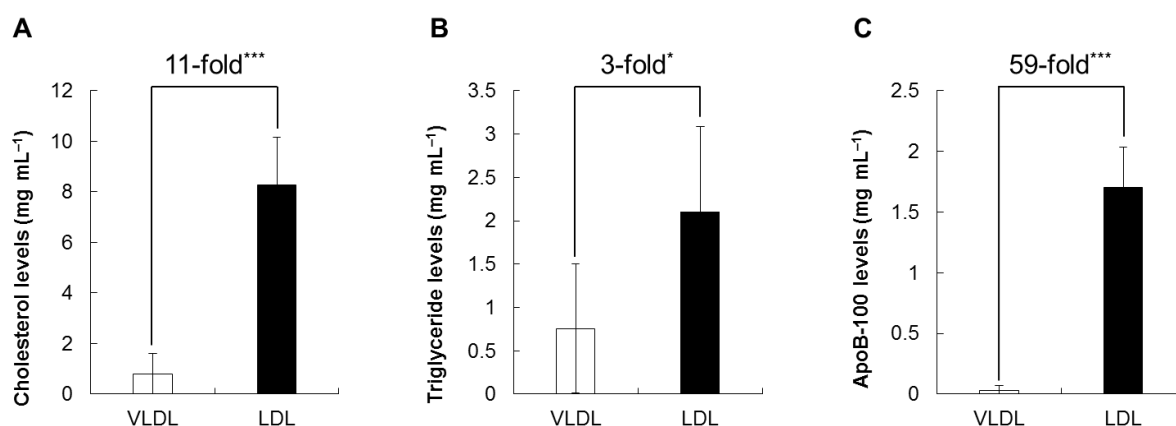


図 28 WHHLMI ウサギにおけるコレステロール、トリグリセリド、apoB-100 値
 エラーバーはウサギ検体の標準偏差を示す。統計解析は F 検定により 2 群のデータの分散が等しいかを検定し、等分散であると仮定された場合はスチューデントの *t* 検定、等分散でないと仮定された場合はウェルチの *t* 検定を実施した (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001)。

本学位論文に関連する論文 2 より許可を得て転載している。

コレステロールやトリグリセリドは VLDL および LDL 画分において最も豊富な成分であり、リポタンパク質は血液中でこれらの輸送を行っている。一方、動脈硬化の

進展とともにリポタンパク質に含まれるコレステロールやトリグリセリドは酸化されることが知られている。WHHLMI ウサギでは、酸化ストレスにより酸化 LDL の形成が進行することが報告されている¹⁰⁶⁾。LDL 粒子は動脈硬化の初期段階で酸化され、アテローム性動脈硬化病変の進展に寄与すると考えられている¹¹⁶⁾。また、コレステロールエステルは LDL 粒子がマクロファージによって修飾されると容易に酸化される¹¹⁷⁾。実際、主要な CE 分子種の酸化生成物はヒトの血漿中でも検出されている¹¹⁸⁾。さらに、酸化ストレスにより LDL 粒子に含まれるトリグリセリドを変性させる可能性が示唆されている¹¹⁹⁾。リポタンパク質の粒子数とこれらの成分の相関解析を実施したところ、VLDL と LDL の直線の傾きは大きく異なり、コレステロール濃度やトリグリセリド濃度はリポタンパク質の粒子数を忠実に反映しなかった (図 29)。以上より、リポタンパク質代謝の過程で変性するコレステロールやトリグリセリドは、リポタンパク質画分のリピドーム解析結果を標準化するパラメータとして不適切であることが示された。

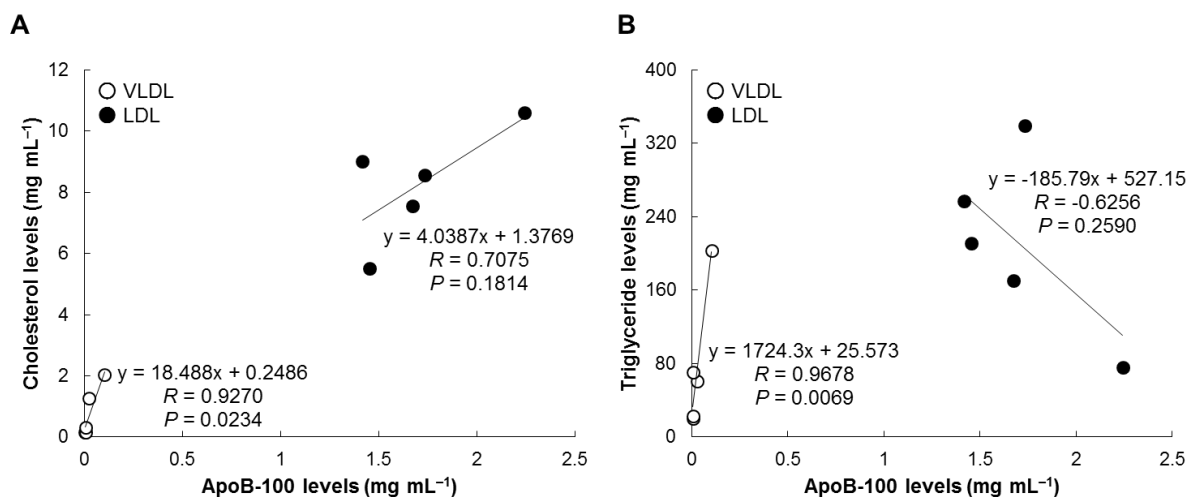


図 29 リポタンパク質粒子数とコレステロール，トリグリセリドの相関関係
 (A) apoB-100 とコレステロール. (B) apoB-100 とトリグリセリド. 各ドットはウサギ検体を示す. 相関関係はピアソンの相関解析により評価した.
 本学位論文に関連する論文 2 より許可を得て転載している.

肝臓から血液中に分泌された VLDL は肝臓から末梢組織へ脂質を輸送する。この代謝過程において、リポタンパク質リパーゼは VLDL に含まれる TAG を 3 つの遊離脂肪酸および 1 つのグリセロールに加水分解する。同様に、肝性リパーゼはリポタンパク質に含まれる TAG とリン脂質を加水分解するもう一つの酵素であり、IDL から LDL への代謝において重要な役割を果たす⁴⁰⁾。VLDL 粒子に含まれる脂質分子はリポタン

パク質リパーゼや肝性リパーゼにより加水分解され、LDL 粒子が生成される。構築したリポタンパク質プロファイリング法を適用したところ、ほとんど全ての脂質分子が VLDL 粒子に多く含まれることが示され、これらのリパーゼによる加水分解の結果を反映していた (図 27)。加水分解を受けることで生成した遊離脂肪酸は、各組織へと取り込まれることでエネルギーとして使用されるか、貯蔵物質として蓄えられることが知られている。各脂質クラスの中でも特に TAG が VLDL 粒子と比較して LDL 粒子で劇的に低下していたことから、TAG がエネルギー源として積極的に加水分解されていることが観察された。一方、肝性リパーゼによるリン脂質の加水分解も観察されたが、なかでもジアシル型 PE は PE プラズマローゲンより VLDL 代謝過程で大きく減少していた。この結果から、エステル結合とビニルエーテル結合といった脂肪酸との結合の仕方により、加水分解酵素の特異性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. 小括

当該研究では、血漿リポタンパク画分を測定対象とし、nano-LC/QqQ-MS を用いた apoB-100 の定量分析と SFC/QqQ-MS を用いたワイドターゲット定量リピドーム解析に基づき、リポタンパク質の粒子に特異的な脂質成分を取得するための新規リポタンパク質定量プロファイリング法を開発した。さらに、apoB-100 以外のアポリポタンパク質も測定対象としていることから、動脈硬化の進展におけるリポタンパク質代謝の制御についても言及することができる。当該研究では VLDL 粒子と LDL 粒子に含まれる脂質分子を比較することで、加水分解酵素による影響について評価した。他にも、二群 (正常群と疾患群、若齢時と高齢時など) における VLDL 粒子の脂質組成、あるいは LDL 粒子の脂質組成を比較することで、肝臓からの VLDL 分泌時における脂質組成の変化や、LDL の変性による脂質組成への影響についても観察することができると期待される。

第4章 総括と展望

当該研究では質量分析技術を用いることで、動脈硬化性心血管疾患によるリポタンパク質の脂質組成の変化を定量的に評価し、リポタンパク質代謝の制御機構を捉えるための方法論を開発することに成功した。

第2章では、リポタンパク質画分に含まれる脂質分子を一斉定量する方法を開発した。DEA カラムを用いることで各脂質クラスを保持時間の違いで分離し、脂質クラスごとに生体内に存在しない内部標準物質を添加することで、個々の脂質分子の濃度を一斉定量することに成功した。DEA カラムで分離することができない構造異性体に関しては、QqQ-MS のMRM モードで脂肪酸イオンのフラグメントを選択することで識別することができた。これまで報告されてきたリポドーム解析手法では、高い再現性をもった定量性の取得は困難であり、異なる分析バッチにおける定量性の差異が最大の障壁であったが、当該分析手法における脂質分子の網羅性と定量性の向上に伴い、異なる研究施設で取得したデータや異なる日に取得したデータの絶対比較が可能となった。この技術進歩により、動脈硬化性心血管疾患を含む様々な疾患において、信頼性の高いバイオマーカーの発見や脂質代謝に焦点をあてた病態機序の解明、将来的には実用的臨床診断に向けた研究が飛躍的に加速することが期待される。

第3章では、リポタンパク質粒子の脂質組成を定量的に決定することが可能な新規リポタンパク質定量プロファイリング法を提案した。非交換性アポリポタンパク質である apoB-100 がリポタンパク質粒子に1分子包含する知見に基づき、apoB-100 の定量結果からリポタンパク質画分に含まれる粒子数を算出した。さらに、第2章で構築したリポドーム解析手法をそれぞれのリポタンパク質画分に適用し、粒子数で標準化することで、リポタンパク質粒子あたりの脂質濃度を定量することができた。アポリポタンパク質はリポタンパク質代謝を制御することから、当該手法は、動脈硬化性心血管疾患におけるリポタンパク質粒子の脂質組成を評価するだけでなく、リポタンパク質代謝の制御にも言及することが可能な画期的な手法である。

質量分析技術を基盤とした当該手法により、これまで不明であったリポタンパク質の脂質組成の定量的変化を取得し、残存リスクに関与する因子を発見することができると期待される。現在、動脈硬化モデル動物を用いてリポタンパク質代謝を経時的に観察することで残存リスクに関与する因子を探索しており、並行して臨床研究への展開も実施している。最後に、当該分析手法に基づくリポタンパク質代謝解析が、自覚症状がなく未だ世界中での死亡者数の多い動脈硬化性心血管疾患において新たな研究戦略の一つになることを期待して、本博士論文の結びの言葉とする。

謝辞

この博士論文は、大阪大学大学院工学研究科および九州大学大学院システム生命科学府で実施した研究内容をまとめたものです。

当該研究を遂行するにあたり、格別なる御指導と御鞭撻を賜りました九州大学生体防御医学研究所の馬場健史教授と和泉自泰准教授に謹んで感謝の意を表します。また、博士論文の副査を快諾して下さいました同研究所の久保田浩行教授と神田大輔教授に深く感謝致します。大阪大学在学時、同じく御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科の福崎英一郎教授と小野比佐好助教に厚く御礼申し上げます。

当該研究で使用したウサギ検体を提供して下さい、活発な研究議論を賜りました神戸大学医学研究科の塩見雅志准教授、小池智也助教 (現 University of Michigan Medical Center)、吉田優准教授に心から感謝致します。また、リポタンパク質の超遠心分画を一から御指導頂きました Ying Yu 特命助教 (現 University of Michigan Medical Center) に深い感謝の意を表します。神戸大学でリポタンパク質の分画を行う際、様々な実験技術を伝授し、関連知識に関して御教授頂きました田村翔平修士 (現株式会社ワールドホールディングス) をはじめとする附属動物実験施設の一同に心より御礼申し上げます。

当該研究の遂行に必要な不可欠であるアポリポタンパク質の定量分析法について、実験の細部にわたり丁寧に指導して下さいました大阪大学大学院情報科学研究科の松田史生准教授 (現同研究科教授)、富田淳美特認技術職員 (現学校法人東京医科大学助手) に深く感謝致します。また、九州大学大学院システム生命科学府へ編入学した後、当該技術の移植に尽力頂きました九州大学生体防御医学研究所の松本雅記准教授に厚く御礼申し上げます。

加えて、三連四重極型質量分析装置を貸与し、デモカラムの提供や装置のトラブル発生時に迅速に対応して下さいました日本ウォーターズ株式会社の長瀬勝敏氏、Thanai Paxton 氏、加藤紀子氏に深く感謝の意を表します。

実験の細部にわたる技術や知識等、数多くの御指導、御助言を下して下さいました大阪大学大学院ならびに九州大学大学院の方々に深く感謝致します。特に、大阪大学在学時に実験技術の伝授や研究議論を頂きました山田貴之博士 (現日本たばこ産業株式会社)、日頃の研究議論や定量リピドーム解析手法の開発に助力頂きました高橋政友技術員、アポリポタンパク質の抽出や定量分析に助力頂きました秦康祐技術員、中谷航太修士に心より御礼申し上げます。また、当研究室で研究者の模範となり導いて下さった原健士特任准教授、山下俊幸学術研究員に深く感謝致します。

引用文献

1. D. J. Murphy, J. Vance: Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* **24**. 109–115 (1999).
2. N. Divecha, R. F. Irvine: Phospholipid signaling. *Cell.* **80**. 269–278 (1995).
3. J. Ohanian, V. Ohanian: Sphingolipids in mammalian cell signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**. 2053–2068 (2001).
4. W. R. Bloor: Biochemistry of the Fats. *Chem. Rev.* **2**. 243–300 (1925).
5. E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill Jr, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis: A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**. 839–862 (2005).
6. T. Kind, K. H. Liu, D. Y. Lee, B. DeFelice, J. K. Meissen, O. Fiehn: LipidBlast *in silico* tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat. Methods.* **10**. 755–758 (2013).
7. S. J. Wakil: Fatty Acid Synthase, A Proficient Multifunctional Enzyme. *Biochemistry.* **28**. 4523–4530 (1989).
8. H. Guilloua, D. Zadavec, P. G. P. Martina, A. Jacobsson: The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid. Res.* **49**. 186–199 (2010).
9. M. K. Gregory, R. A. Gibson, R. J. Cook-Johnson, L. G. Cleland, M. J. James: Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. *PLoS One.* **6**, 1–9 (2011).
10. D. Portilla: Energy metabolism and cytotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**. 432–438 (2003).
11. T. G. Cooper, H. Beevers: β Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *J. Biol. Chem.* **244**. 3514–3520 (1969).
12. D. Zhang, W. Yu, B. V. Geisbrecht, S. J. Gould, H. Sprecher, H. Schulz: Functional Characterization of Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerases from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **277**. 9127–9132 (2002).
13. V. Dommès, C. Baumgart, W. H. Kunau: Degradation of Unsaturated Fatty Acids in Peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **256**. 8259–8262 (1981).
14. R. A. Coleman, D. P. Lee: Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid. Res.* **43**. 134–176 (2004).
15. E. P. Kennedy, S. B. Weiss: The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J. Biol. Chem.* **222**. 193–214 (1956).
16. W. E. M. Lands: Metabolism of glycerolipides: A comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J. Biol. Chem.* **231**. 883–888 (1958).
17. H. Shindou, T. Shimizu: Acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **284**. 1–5 (2009).
18. J. R. Vane: Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for

- Aspirin-like Drugs. *Nat. New Biol.* **231**. 232–235 (1971).
19. S. E. Dahlén, J. Björk, P. Hedqvist, K. E. Arfors, S. Hammarström, J. A. Lindgren, B. Samuelsson: Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**. 3887–3891 (1981).
 20. S. Narumiya, Y. Sugimoto, F. Ushikubi: Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol. Rev.* **79**. 1193–1226 (1999).
 21. E. Ricciotti, G. A. FitzGerald: Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**. 986–1000 (2011).
 22. K. Morimoto, N. Shirata, Y. Taketomi, S. Tsuchiya, E. Segi-Nishida, T. Inazumi, K. Kabashima, S. Tanaka, M. Murakami, S. Narumiya, Y. Sugimoto: Prostaglandin E₂-EP3 Signaling Induces Inflammatory Swelling by Mast Cell Activation. *J. Immunol.* **192**. 1130–1137 (2014).
 23. Y. Cheng, S. C. Austin, B. Rocca, B. H. Koller, T. M. Coffman, T. Grosser, J. A. Lawson, G. A. FitzGerald: Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A₂. *Science*. **296**. 539–541 (2002).
 24. S. W. Crooks, R. A. Stockley: Leukotriene B₄. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**. 173–178 (1998).
 25. T. Takano, S. Fiore, J. F. Maddox, H. R. Brady, N. A. Petasis, C. N. Serhan: Aspirin-triggered 15-Epi-Lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ Stable Analogues Are Potent Inhibitors of Acute Inflammation: Evidence for Anti-inflammatory Receptors. *J. Exp. Med.* **185**. 1693–1704 (1997).
 26. S. Hong, K. Gronert, P. R. Devchand, R. L. Moussignac, C. N. Serhan: Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* **278**. 14677–14687 (2003).
 27. J. M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, C. N. Serhan: Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. *Nature*. **447**. 869–874 (2009).
 28. A. H. Merrill Jr, M. C. Sullards, E. Wang, K. A. Voss, R. T. Riley: Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**. 283–289 (2001).
 29. A. Kihara, S. Mitsutake, Y. Mizutani, Y. Igarashi: Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog. Lipid. Res.* **46**. 126–144 (2007).
 30. K. Nakahara, A. Ohkuni, T. Kitamura, K. Abe, T. Naganuma, Y. Ohno, R. A. Zoeller, A. Kihara: The Sjögren-Larsson Syndrome Gene Encodes a Hexadecenal Dehydrogenase of the Sphingosine 1-Phosphate Degradation Pathway. *Mol. Cell.* **46**. 461–471 (2012).
 31. J. L. Goldstein, M. S. Brown: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. **343**. 425–430 (1990).
 32. J. D. Horton, J. L. Goldstein, M. S. Brown: SREBPs: activators of the complete program

- of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**. 1125–1131 (2002).
33. C. Xhao, K. D. Wright: Liver x receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* **204**. 233–240 (2010).
 34. R. L. Jackson, J. D. Morrisett, A. M. Gotto: Lipoprotein Structure and Metabolism. *Physiol. Rev.* **56**. 259–316 (1976)
 35. J. P. Segrest, M. K. Jones, H. D. Loof, C. G. Brouillette, Y. V. Venkatachalapathi, G. M. Anantharamaiah: The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid. Res.* **33**. 141–166 (1992).
 36. L. M. Powell, S. C. Wallis, R. J. Pease, Y. H. Edwards, T. J. Knott, J. Scott: A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell.* **50**. 831–840 (1987).
 37. H. C. Smith, R. P. Bennett, A. Kizilyer, W. M. McDougall, K. M. Prohaska: Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **23**. 258–268 (2012).
 38. T. L. Innerarity, J. Borén, S. Yamanaka, S. O. Olofsson: Biosynthesis of Apolipoprotein B48-containing Lipoproteins REGULATION BY NOVEL POST-TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS. *J. Biol. Chem.* **271**. 2353–2356 (1996).
 39. J. P. Schuchardt, A. Hahn: Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* **89**. 1–8 (2013).
 40. J. Kobayashi, K. Miyashita, K. Nakajima, H. Mabuchi: Hepatic lipase: a comprehensive view of its role on plasma lipid and lipoprotein metabolism. *J. Atheroscler. Thromb.* **22**. 1001–1011 (2015).
 41. H. B. Brewer Jr., S. Santamarina-Fojo: New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Am. J. Cardiol.* **91**. 3–11 (2003).
 42. S. Eisenberg: High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid. Res.* **25**, 1017–1058 (1984).
 43. A. Boullier, D. A. Bird, M. K. Chang, E. A. Dennis, P. Friedman, K. Gilliotte-Taylor, S. Hörkkö, W. Palinski, O. Quehenberger, P. Shaw, D. Steinberg, V. Terpstra, J. L. Witztum: Scavenger Receptors, Oxidized LDL, and Atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **947**. 214–223 (2001).
 44. J. C. LaRosa, S. M. Grundy, D. D. Waters, C. Shear, P. Barter, J. C. Fruchart, A. M. Gotto, D. Phil, H. Greten, J. J. P. Kastelein, J. Shepherd, N. K. Wenger: Intensive Lipid Lowering with Atorvastatin in Patients with Stable Coronary Disease. *N. Engl. J. Med.* **352**. 1425–1435 (2005).
 45. P. M. Ridker, E. Danielson, F. A. H. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto, Jr., J. J. P. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti, J. G. MacFadyen, B. G. Nordestgaard, J. Shepherd, J. T. Willerson, R. J. Glynn: Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N. Engl. J. Med.* **359**. 1425–1435 (2005).
 46. R. Carmena, P. Duriez, J. C. Fruchart: Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Circulation.* **109**. 2–7 (2004).

47. A. V. Khera, M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, A. Rodrigues, M. F. Burke, K. Jafri, B. C. French, J. A. Phillips, M. L. Mucksavage, R. L. Wilensky, E. R. Mohler, G. H. Rothblat, D. J. Rader: Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **364**. 127–135 (2011).
48. T. Cajka, O. Fiehn: Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **61**. 192–206 (2014).
49. X. Han, R. W. Gross: Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass. Spectrom. Rev.* **24**. 367–412 (2005).
50. M. Ståhlman, C. S. Ejsing, K. Tarasov, J. Perman, J. Borén, K. Ekroos: High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **877**. 2664–2672 (2009).
51. L. A. Heiskanen, M. Suoniemi, H. X. Ta, K. Tarasov, K. Ekroos: Long-Term Performance and Stability of Molecular Shotgun Lipidomic Analysis of Human Plasma Samples. *Anal. Chem.* **85**. 8757–8763 (2013).
52. G. Hopfgartner, K. Bean, J. Henion, R. Henry: Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: A concentration- or a mass-flow-sensitive device?. *J. Chromatogr. A.* **647**. 51–61 (1993).
53. T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, E. Fukusaki, T. Bamba: Development of a lipid profiling system using reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry with rapid polarity switching and an automated lipid identification software. *J. Chromatogr. A.* **1292**. 211–218 (2013).
54. H. Tsugawa, T. Cajka, T. Kind, Y. Ma, B. Higgins, K. Ikeda, M. Kanazawa, J. VanderGheynst, O. Fiehn, M. Arita: MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods.* **12**. 523–526 (2015).
55. A. Å. Karlsson, P. Michelsen, Å. Larsen, G. Odham: Normal-phase Liquid Chromatography Class Separation and Species Determination of Phospholipids Utilizing Electrospray Mass Spectrometry/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **10**. 775–780 (1996).
56. S. Uran, Å. Larsen, P. B. Jacobsen, T. Skotland: Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **758**. 265–275 (2001).
57. L. Q. Pang, Q. L. Liang, Y. M. Wang, L. Ping, G. A. Luo: Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *J. Chromatogr. B.* **869**. 118–125 (2008).
58. M. Schwalbe-Herrmann, J. Willmann, D. Leibfritz: Separation of phospholipid classes by hydrophilic interaction chromatography detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1217**. 5179–5183 (2010).
59. Y. Y. Zhao, Y. Xiong, J. M. Curtis: Measurement of phospholipids by hydrophilic

- interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: The determination of choline containing compounds in foods. *J. Chromatogr. A.* **1218**. 5470–5479 (2011).
60. E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, M. Ovčačíková, A. Lyčka, F. Lynen, P. Sandra: Nontargeted Quantitation of Lipid Classes Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Single Internal Standard and Response Factor Approach. *Anal. Chem.* **84**. 10064–10070 (2012).
 61. C. Zhu, A. Dane, G. Spijksma, M. Wang, J. van der Greef, G. Luo, T. Hankemeier, R. J. Vreeken: An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column. *J. Chromatogr. A.* **1220**. 26–34 (2012).
 62. Y. Okazaki, Y. Kamide, M. Y. Hirai, K. Saito: Plant lipidomics based on hydrophilic interaction chromatography coupled to ion trap time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics.* **9**. 121–131 (2013).
 63. K. Sonomura, S. Kudoh, T. A. Sato, F. Matsuda: Plasma lipid analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **38**. 2033–2037 (2015).
 64. T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, K. Hirata, Y. Nakazawa, A. Kobayashi, E. Fukusaki: High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics. *J. Biosci. Bioeng.* **105**. 460–469 (2008).
 65. T. Uchikata, A. Matsubara, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba: Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1250**. 205–211 (2012).
 66. T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba: Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling. *J. Chromatogr. A.* **1301**. 237–242 (2013).
 67. M. Lísa, M. Holčapek: High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**. 7187–7195 (2015).
 68. M. Shiomi, T. Ito: The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis.* **1**. 1–7 (2009).
 69. M. Shiomi, T. Ito, S. Yamada, S. Kawashima, J. Fan: Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMI Rabbit). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**. 1239–1244 (2003).
 70. E. G. Bligh, W. J. Dyer: A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *J. Biochem. Phys.* **37**. 911–917 (1959).
 71. H. R. Jung, T. Sylvänne, K. M. Koistinen, K. Tarasov, D. Kauhanen, K. Ekroos: High

- throughput quantitative molecular lipidomics. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* **1811**. 925–934 (2011).
72. H. Tsugawa, Y. Tsujimoto, M. Arita, T. Bamba, E. Fukusaki: GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics.* **12**. 1–13 (2011).
 73. J. Liu, E. L. Regalado, I. Mergelsberg, C. J. Welch: Extending the range of supercritical fluid chromatography by use of water-rich modifiers. *J. Org. Biomol. Chem.* **11**. 4925–4929 (2013).
 74. K. M. Koistinen, M. Suoniemi, H. Simolin, K. Ekroos: Quantitative lysophospholipidomics in human plasma and skin by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* **407**. 5091–5099 (2015).
 75. J. W. Lee, T. Nagai, N. Gotoh, E. Fukusaki, T. Bamba: Profiling of regioisomeric triacylglycerols in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **966**. 193–199 (2014).
 76. X. Han, R. W. Gross: Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**. 10635–10639 (1994).
 77. E. Di Angelantonio, N. Sarwar, P. Perry, S. Kaptoge, K. K. Ray, A. Thompson, A. M. Wood, S. Lewington, N. Sattar, C. J. Packard, R. Collins, S. G. Thompson, J. Danesh: Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease. *JAMA.* **302**. 1993–2000 (2009).
 78. U. Sommer, H. Herscovitz, F. K. Welty, C. E. Costello: LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. *J. Lipid. Res.* **47**. 804–814 (2006).
 79. G. Stübiger, E. Aldover-Macasaet, W. Bicker, G. Sobal, A. Willfort-Ehringer, K. Pock, V. Bochkov, K. Widhalm, O. Belgacem: Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF-MS/MS. *Atherosclerosis.* **224**. 177–186 (2012).
 80. S. K. Byeon, J. Y. Lee, S. Lim, D. Choi, M. H. Moon: Discovery of candidate phospholipid biomarkers in human lipoproteins with coronary artery disease by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1270**. 246–253 (2012).
 81. J. P. Segrest, M. K. Jones, H. D. Loof, N. Dashti: Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **42**. 1346–1367 (2001).
 82. J. O. Mudd, B. A. Borlaug, P. V. Johnston, B. G. Kral, R. Rouf, R. S. Blumenthal, P. O. Kwiterovich Jr: Beyond low-density lipoprotein cholesterol: defining the role of low-density lipoprotein heterogeneity in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**. 1735–1741 (2007).
 83. J. H. Contois, J. P. McConnell, A. A. Sethi, G. Csako, S. Devaraj, D. M. Hoefner, G. R.

- Warnick: Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC lipoproteins and vascular diseases division working group on best practices. *Clin. Chem.* **55**. 407–419 (2009).
84. M. H. Davidson: Apolipoprotein measurements: is more widespread use clinically indicated?. *Clin. Cardiol.* **32**. 482–486 (2009).
85. G. Walldius, I. Jungner: The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *J. Intern. Med.* **259**. 493–519 (2006).
86. A. T. Nguyen, S. Braschi, M. Geoffrion, L. G. Fong, R. M. Crooke, M. J. Graham, S. G. Young, R. Milne: A mouse monoclonal antibody specific for mouse apoB48 and apoB100 produced by immunizing ‘apoB39-only’ mice with mouse apoB48. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**. 182–185 (2006).
87. J. J. Albers, M. S. Lodge, L. K. Curtiss: Evaluation of a monoclonal antibody-based ELISA as a candidate reference method for the measurement of apolipoprotein B-100. *J. Lipid. Res.* **30**. 1445–1458 (1989).
88. M. T. Mazur, H. L. Cardasis, D. S. Spellman, A. Liaw, N. A. Yates, R. C. Hendrickson: Quantitative analysis of intact apolipoproteins in human HDL by top-down differential mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **107**. 7728–7733 (2010).
89. L. A. Collins, M. Olivier: Quantitative comparison of lipoprotein fractions derived from human plasma and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proteome. Sci.* **8**. 1–9 (2010).
90. S. A. Agger, L. C. Marney, A. N. Hoofnagle: Simultaneous quantification of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B by liquid chromatography multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Clin. Chem.* **56**. 1804–1813 (2010).
91. M. E. Lassman, T. M. McLaughlin, E. P. Somers, A. C. Stefanni, Z. Chen, B. A. Murphy, K. K. Bierilo, A. M. Flattery, K. M. Wong, J. M. Castro-Perez, B. K. Hubbard, T. P. Roddy: A rapid method for cross-species quantitation of apolipoproteins A1, B48 and B100 in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **26**. 101–108 (2012).
92. A. Suto, M. Yamasaki, Y. Takasaki, Y. Fujita, R. Abe, H. Shimizu, H. Ohta, M. Takiguchi: LC-MS/MS analysis of canine lipoproteins fractionated using the ultracentrifugation-precipitation method. *J. Vet. Med. Sci.* **75**. 1471–1477 (2013).
93. Y. Izumi, K. Aritake, Y. Urade, E. Fukusaki: Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins. *J. Biosci. Bioeng.* **118**. 116–118 (2014).
94. E. Ciccimaro, I. A. Blair: Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis. *Bioanalysis.* **2**. 311–341 (2010).
95. L. B. Agellon, A. Walsh, T. Hayek, P. Moulin, X. C. Jiang, S. A. Shelanski, J. L. Breslow, A. R. Tall: Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **266**. 10796–10801 (1991).

96. J. Greeve, I. Altkemper, J. H. Dieterich, H. Greten, E. Windler: Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J. Lipid. Res.* **34**. 1367–1383 (1993).
97. M. Nakamuta, K. Oka, J. Krushkal, K. Kobayashi, M. Yamamoto, W. H. Li, L. Chan: Alternative mRNA Splicing and Differential Promoter Utilization Determine Tissue-specific Expression of the Apolipoprotein B mRNA-editing Protein (Apobec1) Gene in Mice. STRUCTURE AND EVOLUTION OF Apobec1 AND RELATED NUCLEOSIDE/NUCLEOTIDE DEAMINASES. *J. Biol. Chem.* **270**. 13042–13056 (1995).
98. G. Caligiuri, B. Levy, J. Pernow, P. Thorén, G. K. Hansson: Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**. 6920–6924 (1999).
99. S. Ishibashi, J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz, D. K. Burns: Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* **93**. 1885–1893 (1994).
100. A. Braun, B. L. Trigatti, M. J. Post, K. Sato, M. Simons, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, M. Schrenzel, M. Krieger: Loss of SR-BI Expression Leads to the Early Onset of Occlusive Atherosclerotic Coronary Artery Disease, Spontaneous Myocardial Infarctions, Severe Cardiac Dysfunction, and Premature Death in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circ Res.* **90**. 270–276 (2002).
101. M. Naghavi, P. Libby, E. Falk, S. W. Casscells, S. Litovsky, J. Rumberger, J. J. Badimon, C. Stefanadis, P. Moreno, G. Pasterkamp, Z. Fayad, P. H. Stone, S. Waxman, P. Raggi, M. Madjid, A. Zarrabi, A. Burke, C. Yuan, P. J. Fitzgerald, D. S. Siscovick, C. L. de Korte, M. Aikawa, K.E. J. Airaksinen, G. Assmann, C. R. Becker, J. H. Chesebro, A. Farb, Z. S. Galis, C. Jackson, I. K. Jang, W. Koenig, R. A. Lodder, K. March, J. Demirovic, M. Navab, S. G. Priori, M. D. Reikhter, R. Bahr, S. M. Grundy, R. Mehran, A. Colombo, E. Boerwinkle, C. Ballantyne, W. Insull, R. S. Schwartz, R. Vogel, P. W. Serruys, G. K. Hansson, D. P. Faxon, S. Kaul, H. Drexler, P. Greenland, J. E. Muller, R. Virmani, P. M. Ridker, D. P. Zipes, P. K. Shah, J. T. Willerson: From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I. *Circulation.* **108**. 1664–1672 (2003).
102. S. M. Schwartz, Z. S. Galis, M. E. Rosenfeld, E. Falk: Plaque Rupture in Humans and Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**. 705–713 (2007).
103. E. Falk, S. M. Schwartz, Z. S. Galis, M. E. Rosenfeld: Putative Murine Models of Plaque Rupture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**. 969–972 (2007).
104. M. Shiomi, T. Ito: The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe, *Atherosclerosis.* **207**. 1–7 (2009).
105. M. Shiomi, T. Ito, S. Yamada, S. Kawashima, J. Fan: Development of an animal

- model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbit). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**. 1239–1244 (2003).
106. K. Nishigori, T. Temma, K. Yoda, S. Onoe, N. Kondo, M. Shiomi, M. Ono, H. Saji: Radioiodinated peptide probe for selective detection of oxidized low density lipoprotein in atherosclerotic plaques. *Nucl. Med. Biol.* **40**. 97–103 (2013).
107. M. Shiomi, T. Kobayashi, N. Kuniyoshi, S. Yamada, T. Ito: Myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits with mesenteric fat accumulation are a novel animal model for metabolic syndrome. *Pathobiology.* **79**. 329–338 (2012).
108. R. J. Havel, H. A. Eder, J. H. Bragdon: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**. 1345–1353 (1955).
109. M. Shiomi, S. Yamada, Y. Amano, T. Nishimoto, T. Ito: Lapaquistat acetate, a squalene synthase inhibitor, changes macrophage/lipid-rich coronary plaques of hypercholesterolaemic rabbits into fibrous lesions. *Br. J. Pharmacol.* **154**. 949–957 (2008).
110. Y. Uchida, M. Tachikawa, W. Obuchi, Y. Hoshi, Y. Tomioka, S. Ohtsuki, T. Terasaki: A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTRAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids. Barriers. CNS.* **10**. 21 (2013).
111. M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**. 248–254 (1976).
112. F. Matsuda, T. Ogura, A. Tomita, I. Hirano, H. Shimizu: Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry. *J. Biosci. Bioeng.* **119**. 117–120 (2015).
113. B. MacLean, D. M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G. L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D. L. Tabb, D. C. Liebler, M. J. MacCoss: Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* **26**. 966–968 (2010).
114. R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall Jr, K. H. Weisgraber: Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.* **25**. 1277–1294 (1984).
115. H. Okamoto, F. Yonemori, K. Wakitani, T. Minowa, K. Maeda, H. Shinkai: A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature.* **406**. 203–207 (2000).
116. R. Stocker, J. F. Keane Jr.: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**. 1381–1478 (2004).

117. V. A. Folcik, M. K. Cathcart: Predominance of esterified hydroperoxy-linoleic acid in human monocyte-oxidized LDL. *J. Lipid. Res.* **35**. 1570–1582 (1994).
118. P. M. Hutchins, E. E. Moore, R. C. Murphy: Electrospray MS/MS reveals extensive and nonspecific oxidation of cholesterol esters in human peripheral vascular lesions. *J. Lipid. Res.* **52**. 2070–2083 (2011).
119. J. P. Suomela, M. Ahotupa, O. Sjövall, J. P. Kurvinen, H. Kallio: New approach to the analysis of oxidized triacylglycerols in lipoproteins. *Lipids*. **39**. 507–512 (2004).

論文目録

本博士論文に関連する論文

1. H. Takeda, T. Koike, Y. Izumi, T. Yamada, M. Yoshida, M. Shiomi, E. Fukusaki, T. Bamba: Lipidomic analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. *J. Biosci. Bioeng.* **120**. 476–482 (2015).
2. H. Takeda, Y. Izumi, A. Tomita, T. Koike, M. Shiomi, E. Fukusaki, F. Matsuda, T. Bamba: Lipoprotein profiling methodology based on determination of apolipoprotein concentration. *Bioanalysis.* **9**. 9–19 (2017).
3. H. Takeda, Y. Izumi, M. Takahashi, T. Paxton, S. Tamura, T. Koike, Y. Yu, N. Kato, K. Nagase, M. Shiomi, T. Bamba: Wide-targeted quantitative lipidomics methodology by supercritical fluid chromatography coupled with fast-scanning triple quadrupole mass spectrometry (minor revision in *J. Lipid. Res.*).

その他の原著論文

1. S. Minami, T. Yamamoto, Y. Takabatake, A. Takahashi, T. Namba, J. Matsuda, T. Kimura, J. Kaimori, I. Matsui, H. Takeda, M. Takahashi, Y. Izumi, T. Bamba, T. Matsusaka, F. Niimura, Y. Isaka: Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy.* **13**. 1629–1647 (2017).
2. J. A. Bowden, A. Heckert, C. Z. Ulmer, C. M. Jones, J. P. Koelmel, L. Abdullah, L. Ahonen, Y. Alnouti, A. Armando, J. M. Asara, T. Bamba, J. R. Barr, J. Bergquist, C. H. Borchers, J. Brandsma, S. B. Breitkopf, T. Cajka, A. Cazenave-Gassiot, A. Checa, M. A. Cine, R. A. Colas, S. Cremers, E. A. Dennis, J. E. Evans, A. Fauland, O. Fiehn, M. S. Gardner, T. J. Garrett, K. H. Gotlinger, J. Han, Y. Huang, A. H. Neo, T. Hyotylainen, Y. Izumi, H. Jiang, H. Jiang, J. Jiang, M. Kachman, R. Kiyonami, K. Klavins, C. Klose, H. C. Kofeler, J. Kolmert, T. Koal, G. Koster, Z. Kuklenyik, I. J. Kurland, M. Leadley, K. Lin, K. R. Maddipati, D. McDougall, P. J. Meikle, N. A. Mellett, C. Monnin, M. A. Moseley, R. Nandakumar, M. Oresic, R. E. Patterson, D. Peake, J. S. Pierce, M. Post, A. D. Postle, R. Pugh, Y. Qui, O. Quehenberger, P. Ramrup, J. Rees, B. Rembiesa, D. Reynaud, M. R. Roth, S. Sales, K. Schuhmann, M. L. Schwartzman, C. N. Serhan, A. Shevchenko, S. E. Somerville, L. St. John-Williams, M. A. Surma, H. Takeda, R. Thakare, J. W. Thompson, F. Torta, A. Triebel, M. Trotsmuller, S. J. K. Ubhayasekera, D. Vuckovic, J. M. Weir, R. Welti, M. R. Wenk, C. E. Wheelock, L. Yao, M. Yuan, X. H. Zhao, S. Zhou: Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics using Standard Reference Material 1950 Metabolites in Frozen Human Plasma. *J. Lipid. Res.* **58**. 2275–2288 (2017).
3. S. Tamura, Y. Koike, H. Takeda, T. Koike, Y. Izumi, R. Nagasaka, T. Tsunoda, M. Tori, K. Ogawa, T. Bamba, M. Shiomi: Ameliorating effects of D-47, a newly developed

compound, on lipid metabolism in an animal model of familial hypercholesterolemia (WHHLMI rabbits). *Eur. J. Pharmacol.* **822**. 147–153 (2018).

総説等

1. 竹田浩章, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた脂質プロファイリング, *JSBMS Letters*, 39, 26–34 (2014).
2. 和泉自泰, 竹田浩章, 馬場健史 (分担執筆), 2. 超臨界流体抽出分離技術を用いた代謝プロファイリング, *ヘルスケアを支えるバイオ計測*, 24–30 (2016).
3. 竹田浩章, 和泉自泰, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィーを用いた代謝物プロファイリング技術の開発と応用, *生物工学会誌*, 94, 405–408 (2016).
4. Y. Izumi, H. Takeda, T. Bamba: Supercritical Fluid. In “Encyclopedia of Lipidomics”, Edited by Markus R. Wenk, Springer Netherlands, 1–3 (2016). ISBN 978-94-007-7864-1.
5. H. Takeda, Y. Izumi, T. Bamba: Supercritical Fluid Extraction: Carbon Dioxide. In “Encyclopedia of Lipidomics”, Edited by Markus R. Wenk, Springer Netherlands, 1–3 (2016). ISBN 978-94-007-7864-1.
6. H. Takeda, Y. Izumi, T. Bamba: Supercritical Fluid Extraction: Modifier. In “Encyclopedia of Lipidomics”, Edited by Markus R. Wenk, Springer Netherlands, 1–3 (2016). ISBN 978-94-007-7864-1.

学会発表

国際学会

1. H. Takeda, T. Koike, Y. Izumi, T. Yamada, M. Yoshida, M. Shiomi, E. Fukusaki, ○T. Bamba: Lipidomics of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits, 『11th International Conference of the Metabolomics Society』, San Francisco CA, USA, June, 2015.
2. ○H. Takeda, T. Koike, Y. Izumi, T. Yamada, M. Yoshida, M. Shiomi, E. Fukusaki, T. Bamba: Lipidome analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits, 『Pacifichem 2015』, Honolulu HI, USA, December, 2015.
3. ○H. Takeda, Y. Izumi, T. Paxton, N. Kato, S. Horie, K. Nagase, T. Bamba: Development of a wide-targeted lipidomics methodology by supercritical fluid chromatography coupled with fast-scanning triple quadrupole mass spectrometry, 『64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics』, San Antonio TX, USA, June, 2016.
4. H. Takeda, Y. Izumi, T. Paxton, N. Kato, S. Horie, K. Nagase, ○T. Bamba: Wide-targeted and quantitative lipidome analysis by supercritical fluid chromatography coupled with fast-scanning triple quadrupole mass spectrometry, 『SFC 2016, 10th International Conference on Packed-Column SFC』, Vienna, Austria, October, 2016.

国内学会

1. ○竹田浩章, 小池智也, 山田貴之, 和泉自泰, 塩見雅志, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史, 「心筋梗塞自然発症モデルウサギのリポプロテイン脂質プロファイリング」, 『日本農芸化学会 2014 年度大会』, A03 会場, 明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月.
2. ○竹田浩章, 小池智也, 和泉自泰, 山田貴之, 吉田優, 塩見雅志, 福崎英一郎, 馬場健史, 「心筋梗塞自然発症モデルウサギにおける血漿リポプロテイン画分のリピドーム解析」, 『2014 年度 第 5 回 学際的脂質創生研究部会講演会』, 理学研究科セミナーハウス, 京都大学北部構内, 2015 年 1 月.
3. ○竹田浩章, 小池智也, 和泉自泰, 山田貴之, 吉田優, 塩見雅志, 福崎英一郎, 馬場健史, 「心筋梗塞自然発症モデルウサギにおける血漿リポプロテイン画分のリピドーム解析」, 『第 63 回質量分析総合討論会 2015』, つくば国際会議場 エポカルつくば, 2015 年 6 月.
4. ○竹田浩章, 和泉自泰, 富田淳美, 小池智也, 塩見雅志, 松田史生, 福崎英一郎, 馬場健史, 「心筋梗塞自然発症モデルウサギを用いた血漿リポタンパク質粒子のリピドーム解析法の開発」, 『第 9 回メタボロームシンポジウム』, 三島市民文化会館 ゆうゆうホール 三島商工会議所, 2015 年 9 月.

5. ○竹田浩章, 和泉自泰, Thanai Paxton, 加藤紀子, 堀江真之介, 長瀬勝敏, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析によるワイドターゲット定量リピドミクス手法の開発」, 『第 64 回質量分析総合討論会 2016』, ホテル阪急エキスポパーク, 2016 年 5 月.
6. 竹田浩章, 和泉自泰, Thanai Paxton, 加藤紀子, 堀江真之介, 長瀬勝敏, ○馬場健史, 「SFC-QqQMS を用いたワイドターゲット定量リピドーム解析」, 『第 10 回メタボロームシンポジウム』, 鶴岡メタボロームキャンパス レクチャーホール, 2016 年 10 月.
7. ○竹田浩章, 和泉自泰, Thanai Paxton, 加藤紀子, 堀江真之介, 長瀬勝敏, 小池智也, 塩見雅志, 松田史生, 福崎英一郎, 馬場 健史, 「オミクス解析に基づく血中リポタンパク質脂質解析法の開発」, 『第 7 回学際的脂質創生研究部会講演会』, 九州大学西新プラザ, 2017 年 1 月.
8. ○和泉自泰, 竹田浩章, 高橋政友, Thanai Paxton, 加藤紀子, 堀江真之介, 長瀬勝敏, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析によるワイドターゲット定量リピドミクス分析法の開発」, 『第 11 回メタボロームシンポジウム』, ホテル阪急エキスポパーク, 2017 年 11 月.

