

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 :



氏 名 : 竹田 浩章

論 文 名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

脂質は血液中のリポタンパク質を介して様々な組織に輸送されるが、これらの均衡が崩れることで動脈硬化性心血管疾患を引き起こすことが知られている。現在、低密度リポタンパク質のコレステロール (LDL-C) は脂質異常症の診断基準として使用されており、LDL-C 値を低下させると心血管イベント発生率は有意に抑制されることが報告されている。その一方、LDL-C 値を低下させただけでは心血管イベント発生率を半分程度しか抑えることができず、LDL-C 以外に心血管イベントのリスクが存在することが指摘されている。近年、心血管イベントの残存リスクに関与する因子の一つとしてリポタンパク質の質が注目されているものの、これらの脂質組成がどのように変化しているのかは未だ不明である。リポタンパク質の脂質組成を高解像度にて取得し、代謝変動を経時的に観察することで、残存リスクに関与する新たな知見を得られることが期待される。そこで本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実施した。

本研究では、心筋梗塞を自然発症する WHHLM1 ウサギを使用した。血漿からリポタンパク質画分を分離し、脂質とアポリポタンパク質をそれぞれ抽出した。脂質は超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析 (SFC/QqQ-MS) により分析し、アポリポタンパク質はナノ液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析 (nano-LC/QqQ-MS) により分析した。画分のリポドーム解析結果はアポリポタンパク質 B-100 (apoB-100) から算出したリポタンパク質の粒子数に基づき補正した。

まず *in silico* の多重反応モニタリング (MRM) ライブラリと SFC/QqQ-MS によるワイドターゲットの新規脂質定量手法の開発を実施した。各脂質クラスはエチレン架橋型ハイブリッド粒子にジエチルアミンを結合させた順相カラムを使用することで 20 分以内に分離を達成し、異なる脂肪酸側鎖を持つリン脂質などの構造異性体は、側鎖由来の MRM トランジションによる質量分離を実施した。さらに、本分析手法の定量性を検証するために、WHHLM1 ウサギの血漿抽出物を定量し、同濃度の標準品を血漿抽出物に添加することで各脂質クラスの回収率を計算した。その結果、64.9%から 103.5%の回収率を達成し、個々の脂質クラスや分子種の濃度を高精度に定量することができた。

続いて、WHHLM1 ウサギの血漿リポタンパク質画分において、アポリポタンパク質と脂質分子の定量分析を実施した。トリプシン消化で分解したアポリポタンパク質由来のペプチド断片をスクリーニングし、高感度で検出可能な定量用ペプチド配列を決定した。安定同位体標識 (リジンやアルギニンを ^{13}C , ^{15}N 標識) したペプチド溶液を添加して測定することにより、共溶出した化合物に伴うマトリックス効果を除き、アポリポタンパク質の濃度を絶対定量した。さらに apoB-100 はリポタンパク質 1 粒子につき 1 分子存在することから、VLDL と LDL の粒子数を算出した。その結果、LDL 粒子数は VLDL 粒子数より豊富に存在し、LDL 受容体の欠損に伴い LDL が血中に蓄積していることが示唆された。一方、画分からは計 352 種類の脂質分子を一斉分析することに成功し、画分のリポドーム解析結果を粒子数で補正することで、1 粒子辺りの脂質組成を取得することができた。

本手法により、動脈硬化の進展に伴うリポタンパク質代謝機構の解明に繋がることが期待される。