

称号及び氏名 博士(農学) 長谷川 美奈

学位授与の日付 平成19年9月30日

論文名 「Studies on Toxicological Assessment by Metabolic Fingerprinting with Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置を用いたメタボリックフィンガープリンティングによる毒性評価に関する研究)」

論文審査委員 主査 小森 雅之
副査 小谷 猛夫
副査 松尾 三郎
副査 竹中 重雄

論文要旨

緒言

医薬品開発において、新規化合物の毒性を早期に検出するスクリーニング手法として、トランスクリプトミクスやプロテオミクス、メタボロミクス等の手法が注目されている。

メタボロミクスは、ある時点における生体や組織、細胞等に含まれるすべての低分子代謝物情報であるメタボロームを網羅的に定性・定量解析することを指している。しかし、メタボロームは、糖、有機酸、アミノ酸、脂質など多種多様な化合物からなり、すべてを同時一斉に解析できる手法は未だ確立されていない。近年、核磁気共鳴装置

(NMR) や質量分析装置 (MS) を用いたメタボローム測定が実施されているが、実際にはメタボロームの一部にあたる代謝物プロファイルを取得していることになる。メタボリックフィンガープリンティングは、化合物それぞれに焦点を当てるのではなく、分析結果をパターン認識法によってグループ化し、代謝物の変動を検出する手法であり、化合物投与による代謝への影響やバイオマーカーの探索に適している。

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置 (FT-ICR MS) は、高い分解能

により混合物の一斉分析が可能であり、高い質量精度によりイオンの組成式の推定が可能である。そこで、本研究では、FT-ICR MS を用いて毒性化合物を投与したラット尿メタボリックフィンガープリンティングを実施し、毒性評価への適用を検証した。

第一章 FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングの毒性評価への適用

FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングの毒性評価への適用を検討するため、バイオマーカーが報告されている薬剤誘発性リン脂質症 (PLD) ラットの尿メタボリックフィンガープリンティングを実施した。

6 週齢の雄ラットに、PLD を誘発する amiodarone (AMD) 300 mg/kg を 3 日間経口投与し、投与前 (D0)、投与 2 回目から 24 時間後 (D2)、投与 3 回目から 24 時間後 (D3) に採尿した。肺の病理検査から AMD 投与群での PLD の誘発を確認した。尿を FT-ICR MS で測定した結果、D3 でスペクトルに変化がみられた。多変量解析法の主成分分析 (PCA) を用いてスペクトルデータを解析した結果、AMD 投与に伴って、対照群と投与群がスコアプロット上で分離され、それぞれの群間での尿中代謝物組成の差異が示された。ローディングプロット (LP) から、スコアプロットの分離に寄与した代謝物は m/z 178.05101、191.01979、192.06676、212.00239、258.9944、283.0820 であった。MS/MS 解析により、 m/z 192.06676 は PLD バイオマーカーであるフェニルアセチルグリシン (PAG)、 m/z 178.05101、212.00239 はバイオマーカー候補として、それぞれ馬尿酸 (HA)、インジカン (IDN) と同定した。

以上の結果から、FT-ICR MS を用いた AMD 誘発性 PLD ラットの尿メタボリックフィンガープリンティングでは、AMD 投与に起因した代謝変動パターンや既知のバイオマーカーに加え、新たなバイオマーカー候補を検出できた。よって、FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングは、化合物の毒性評価に適用可能であると結論した。

第二章 FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングによる肝毒性 バイオマーカーの探索

肝毒性を有する化合物は多く、既知の肝毒性物質投与による代謝変動の検出やそのバイオマーカーの同定は、化合物の毒性評価に有用である。そこで、thioacetamide (TAA) および α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) を投与したラット尿を用いた FT-ICR MS によるメタボリックフィンガープリンティングを実施し、肝毒性誘発時における代謝変動の検出およびバイオマーカー探索を試みた。

第一節 FT-ICR MS を用いた TAA 誘発性急性肝傷害ラットの尿メタボリックフィンガープリンティング

6 週齢の雄ラットに TAA 300 mg/kg を単回腹腔内投与し、投与前、投与 1、3、5、7 日後の各日に 5 時間尿を採取した。剖検は採尿終了後の各日に行った。AST、ALT 値は、1 日後に上昇し、3 日後で低下がみられ、5、7 日後では投与前のレベルにまで回復した。肝臓の病理検査から、1 日後では中心静脈周囲に肝細胞の変性・壊死が、3 日後をピークに単核細胞の浸潤がみられ、5、7 日後には回復が認められた。浸潤した単核細胞は、免疫染色からマクロファージであった。尿を FT-ICR MS で測定した結果、陰イオンでは 1、3 日後で、陽イオンでは 3 日後でスペクトルに変化がみられた。PCA スコアプロットにおいて、尿中代謝物組成は、陰イオンでは 1 日後に最も大きな差異が認められたが、5 日後には投与前とほぼ同じ組成へと回復したことが示唆された。この結果は、血液生化学検査値の変動と一致した。陽イオンでは 1 日後から変化がみられ、3 日後に最も大きな差異が認められたが、5 日後には投与前とほぼ同じ組成へと回復したことが示唆された。この結果は、病理検査でのマクロファージの出現頻度と一致した。LP から、陰イオンでは m/z 178.05038、191.01967、192.06628、212.00226、220.14673、242.01320、258.99494、303.06000 がバイオマーカー候補であり、そのうち m/z 178.05038、192.06628、212.00226、242.01320 を、それぞれ HA、PAG、IDN、3-メチルジオキシインドール硫酸 (3-MIS) と同定した。陽イオンでは m/z 266.05390、401.20737、429.23882 がバイオマ

ーカー候補であり、中でも m/z 266.05390 はデオキシシチジン (dCyt) のカリウムイオン (K^+) 付加体であった。dCytはマクロファージ由来の代謝物であり、dCytの変動がマクロファージの出現頻度と一致したことから、 m/z 266.05390 は肝傷害部位に浸潤したマクロファージに由来する代謝物であり、dCytがTAA誘発性急性肝傷害ラットの尿中バイオマーカー候補であると結論した。

第二節 FT-ICR MS を用いた ANIT 誘発性肝内胆汁うっ滞ラットの尿メタボリックフィンガープリンティング

6週齢の雄ラットに ANIT 100 mg/kg を単回経口投与し、投与前、投与後 0-7、7-24、24-31、31-48、48-55、55-72、72-96 時間に採尿した。剖検は投与 1、2、4 日後に行った。AST、ALT、ALP、TBIL 値は、1 日後から上昇し、2 日後でピークに達したが、4 日後には低下した。肝臓の病理検査から、1 日後では壊死・脱落した胆管上皮細胞による胆管閉塞が、2 日後には再生性胆管や胆管増生が、4 日後では胆管増生や胆管の拡張がみられた。尿を FT-ICR MS で測定した結果、7-55 時間のスペクトルに変化がみられた。PCA スコアプロットにおいて、尿中代謝物組成は 7-24 時間から変化が認められ、24-31 時間には最も大きな差異がみられたが、55-72 時間には投与前とほぼ同じ組成へと回復したことが示唆された。対して、血液生化学検査の結果では、ANIT 投与による影響が最も強くみられるのは 2 日後であった。LP から m/z 178.05168、192.06730、195.05139、242.01323、512.26845、514.28485 が肝内胆汁うっ滞のバイオマーカー候補であり、そのうち m/z 178.05168、192.06730、242.01323、512.26845、514.28485 を、それぞれ HA、PAG、3-MIS、胆汁酸 2 種類と同定した。

以上の結果から、FT-ICR MS を用いた TAA 誘発性急性肝傷害あるいは ANIT 誘発性肝内胆汁うっ滞モデルラットのメタボリックフィンガープリンティングでは、それぞれの病態における代謝変動を検出し、従来の評価法である血液生化学検査以上の精度で毒性発現の進展・回復過程をモニタリングできた。加えて、急性肝傷害の新たなバイオマ

ーカー候補を検出できた。

総括

1. FT-ICR MS を用いたメタボリックフィンガープリンティングの毒性評価への適用を検討するため、AMD 誘発性 PLD ラットの尿メタボリックフィンガープリンティングを実施した結果、AMD 投与に起因した代謝変動の検出が可能であり、既知の尿中 PLD バイオマーカーに加え、新たなバイオマーカー候補を検出できた。
2. 急性肝傷害あるいは肝内胆汁うっ滞モデルラットの尿を用いて、FT-ICR MS によるメタボリックフィンガープリンティングを実施した結果、それぞれの病態における代謝変動の検出が可能であり、従来の評価法である血液生化学検査以上の精度で毒性発現の進展・回復過程をモニタリングでき、新たな急性肝傷害のバイオマーカー候補を検出できた。さらに、同じ肝毒性誘発モデルであっても毒性発現様式・部位が異なることで、代謝変動パターンも異なることが明らかとなった。

本研究から、FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングは、化合物の毒性評価に適用可能と結論した。今後は、既知の毒性化合物による代謝への影響をメタボロミクスから明らかにし、化合物による毒性発現に起因する代謝変動やバイオマーカーに関するデータをデータベース化することで、新規化合物の早期毒性評価の精度の向上に寄与すると考えられる。

審査結果の要旨

医薬品開発において、新規化合物の毒性を早期に検出するスクリーニング手法の一つにメタボロミクスがある。メタボロミクスでは、生体や組織、細胞等に含まれるすべての低分子代謝物情報であるメタボロームの網羅的な定性・定量解析を行うが、多種多様な代謝物すべてを同時一斉に解析できる手法は未だ確立されていない。メタボリックフィンガープリンティングは、それぞれの代謝物に焦点を当てるのではなく、得られたすべての代謝物の分析結果をパターン認識法によってグループ化し、代謝物の変動を検出する手法であり、化合物投与による代謝への影響やバイオマーカーの

探索に適している。フーリエ変換イオンサイクロロン共鳴質量分析装置(FT-ICR MS)は、その高い分解能により混合物イオンの一斉分析が、また、その高い質量精度によりイオンの組成式の推定が可能である。そこで、本研究では、FT-ICR MS を用いて毒性化合物を投与したラットの尿メタボリックフィンガープリンティングを実施し、毒性評価への適用を検証し、以下の成果を得た。

第1章では、FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングの毒性評価への適用を検討した。6週齢の雄ラットに、薬剤誘発性リン脂質症(PLD)を誘発する amiodarone(AMD)を3日間経口投与し、投与24時間後に採尿した。尿をFT-ICR MS で測定した結果、投与3回目の24時間後でスペクトルに変化がみられた。多変量解析法の主成分分析(PCA)を用いてスペクトルデータを解析した結果、AMD 投与に伴って、対照群と投与群がスコアプロット上で分離され、それぞれの群間での尿中代謝物組成の差異が示された。ローディングプロット(LP)から、スコアプロットの分離に寄与した代謝物は m/z 178.05101、191.01979、192.06676、212.00239、258.9944、283.0820 であった。MS/MS 解析により、 m/z 192.06676 は既に PLD バイオマーカーとして知られているフェニルアセチルグリシン(PAG)であった。また、 m/z 178.05101、212.00239 は、それぞれ馬尿酸(HA)、インジカン(IDN)と同定され、これらの代謝物が新たなバイオマーカー候補であることが示唆された。以上の結果から、FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングが化合物の毒性評価に適用できることが示された。

第2章第1節では、thioacetamide(TAA)を単回腹腔内投与した雄ラット(6週齢)の尿を用いてFT-ICR MS によるメタボリックフィンガープリンティングを実施した。尿は投与前、投与1、3、5、7日後の各日に5時間採取した。その結果、陰イオンでは1、3日後で、陽イオンでは3日後でスペクトルに変化がみられた。PCA スコアプロットにおいて、尿中代謝物組成は、陰イオンでは1日後に最も大きな差異が認められたが、5日後には投与前とほぼ同じ組成へと回復したことが示唆され、血液生化学検査値の変動と一致した。陽イオンでは1日後から変化がみられ、3日後に最も大きな差異が認められたが、5日後には投与前とほぼ同じ組成へと回復したことが示唆された。この結果は、病理検査でのマクロファージの出現頻度と一致した。LP から、バイオマーカー候補と考えられる陰イオンのうち、 m/z 178.05038、192.06628、212.00226、242.01320 を、それぞれ HA、PAG、IDN、3-メチルジオキシインドール硫酸(3-MIS)と同定した。また、バイオマーカー候補と考えられる陽イオンのうち、 m/z 266.05390 はデオキシシチジン(dCyt)のカリウムイオン付加体であった。dCyt はマクロファージ由来の代謝物であり、dCyt の変動がマクロファージの出現頻度と一致したことから、dCyt が TAA 誘発性急性肝傷害ラットの尿中バイオマーカー候補となることが示唆された。

第2章第2節では、 α -Naphthylisothiocyanate(ANIT)を単回経口投与した雄ラット(6週齢)の尿を用いてFT-ICR MS によるメタボリックフィンガープリンティングを実施した。尿は投与前、投与後0-7、7-24、24-31、31-48、48-55、55-72、72-96時間に採取した。肝臓の病理検査から、1日後では壊死・脱落した胆管上皮細胞による胆管閉塞が、2日後には再生性胆管や胆管増生が、4日後では胆管増生や胆管の拡張がみられた。FT-ICR MS で測定した結果、7-55時間のスペクトルに変化がみられた。PCA スコアプロットにおいて、尿中代謝物組成は7-24時間から変化が認められ、24-31時間には最も大きな差異がみられたが、55-72時間には投与前とほぼ同じ組成へと回復した

ことが示唆された。一方、血液生化学検査の結果では、ANIT 投与による影響が最も強くみられるのは 2 日後であった。LP から肝内胆汁うっ滞のバイオマーカー候補と考えられるイオンのうち、 m/z 178.05168、192.06730、242.01323 をそれぞれ HA、PAG、3-MIS と、また、 m/z 512.26845、514.28485 を胆汁酸 2 種類と同定した。

以上のように本研究は、FT-ICR MS を用いた尿メタボリックフィンガープリンティングが化合物の毒性評価に適用できることを示し、TAA 誘発性急性肝傷害あるいは ANIT 誘発性肝内胆汁うっ滞モデルラットにおいて、それぞれの病態における代謝変動および毒性発現の進展・回復過程をモニタリングできるだけでなく、新たなバイオマーカー候補を検出できることを明らかにした。これらの成果は、医学・獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(農学)の学位を授与することを適当と認める。