

メタボロミクス臨床医学応用の 最先端を拓く

～脂質メディエーター分析に自動固相抽出装置「RapidTrace+」を活用～

神戸大学大学院 医学研究科 質量分析総合センター



神戸大学大学院 医学研究科 質量分析総合センターでは、ヒト血液などの臨床サンプルを使用した脂質メディエーター研究にバイオタージの自動固相抽出装置「RapidTrace+」を利用しています。脂質メディエーター研究の重要性や将来展望を含めて、篠原正和 特命助教にお話をうかがいました。

— 最初に、質量分析総合センターについてご紹介ください。

篠原先生：質量分析という分析科学の技術を医学に応用することを目的に、2008年に設立されました。タンパク質の総体（プロテオーム）の解析と、低分子代謝物の総体（メタボローム）の解析をおもに進めており、学内外での幅広い共同研究を行っています。オミックス研究の『データ主導型』手法を持ち込むことにより、病気を早期発見したい、治したい、防ぎたいというのがわれわれの研究へのモチベーションとなっています。

生命現象に直結したメタボローム、いま何が起きたかをとらえる

— 比較的新しい組織なのですね。

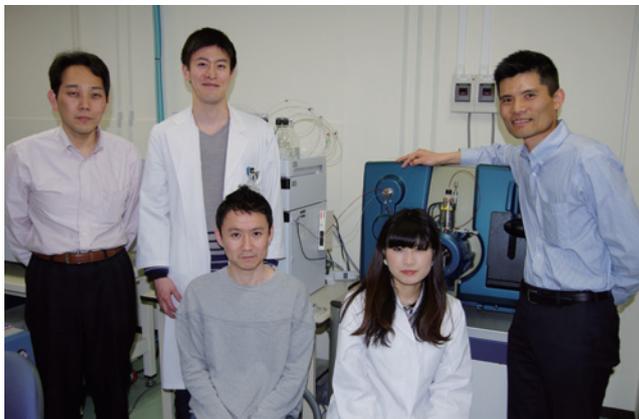
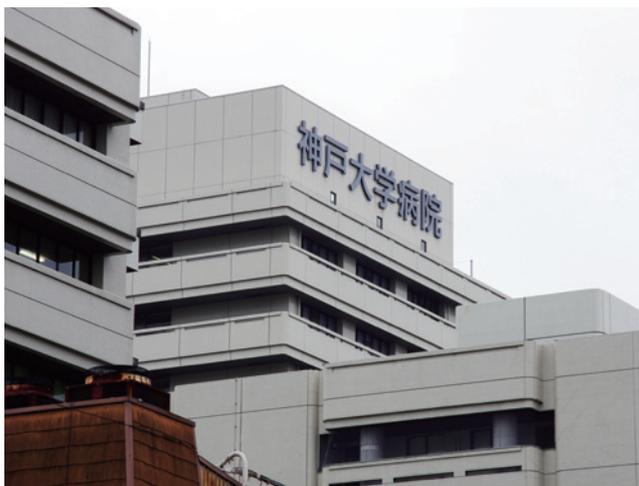
篠原先生：そうですね。オミックス研究の歴史的な流れを簡単にご説明します。ゲノム研究が始まった当初は、ヒトゲノムの解読とゲノミクスを通して病気の原因や予防法などがすべてわかると期待されたのですが、残念ながらゲノムだけではそこまでは解明されませんでした。



神戸大学大学院 医学研究科医学教育分野
質量分析総合センター 篠原 正和 特命助教

その後、1990年から2000年代にかけてタンパク質を解析するプロテオーム研究が盛んになり、当時もやはりこれで病気の原因がわかる、いろいろなバイオマーカーが見つかるという期待がありました。ところが、ヒトの血液を考えると、そもそも非常に多量のタンパク質が含まれているうえに、アルブミンなど直接病気とは無関係のタンパク質も存在するため、質量分析で解析してもそれらにじゃまをされて実際に病気と関係する物質を見つけるのが非常に難しいという問題に直面しました。プロテオミクスが開いたけれどもそういう限界もみえてきました。

そうした歴史的な経緯を踏まえて、低分子代謝物の総体であるメタボロームを解析しようという流れが出てきました。



質量分析センターの研究スタッフ

ク質は数万種類と数が多いですが、哺乳類では低分子代謝物は5000種類ぐらいなので解析しやすいともいえます。それに、ゲノムやタンパク質には生物の種差がありますが、低分子代謝物に種差はありません。患者さんの血液で変動している代謝物を見つけた時に、それをマウスの実験モデルに適用したり、細胞実験系に適用したりすることが比較的スムーズに行えます。

強い生理活性を持つ脂質メディエーター、炎症を惹起／収束

— 脂質メディエーターを研究テーマにされたのは、どういう経緯だったのですか。

篠原先生：質量分析総合センターの設立後、3年ほどここで研究を行い、疾患特異的な代謝パターン、特定の病気の時に変動している代謝物などがある程度わかるようになってきました。そして代謝物の中には、生命現象を引き起こす素材になっているばかりでなく、生理活性をもって生命活動を制御しているものが知られるようになってきました。

そこで、生体の中に微量に出現するだけで大きな生命現象を導くような、生理活性を持った代謝物の研究をしてみたいと思いき、米国のボストンにあるHarvard Medical School, Brigham Women's HospitalのCharles N. Serhan研究室に留学することになりました。脂質由来の低分子代謝物に生理活性を持つものが多いのですが、それが脂質メディエーターです。3年半ほどそちらに留学し、昨年(2014)夏に日本に戻ってきました。

— 脂質メディエーターは体の中でどういう働きをするのですか。

篠原先生：脂質メディエーターは生体内で様々な生理活性を發揮していますが、私は炎症に関わる脂質メディエーターに注目しています。なぜならば動脈硬化、糖尿病、肥満、アルツハイマー病など、数多くの疾患が炎症に関係していると考えられているからです。炎症を起こす脂質メディエーター(炎症惹起性)は古くからよく知られていて、例えばカゼをひいた時の発熱はアラキドン酸からつくられるプロスタグランジンという脂質メディエーターによって生じます。これまで、炎症が治ってくるときは炎症を起こす生理活性物質が希釈されることで、受動的に治ってくると考えられていたのですが、炎症が治るときには、炎症を抑える脂質メディエーター(炎症収束性メディエーター)が産生されてくるのが分かってきました。この炎症収束性脂質メディエーターを新しい研究対象として、実際のヒト疾患での役割を解明しようと研究を進めています。現在は、この研究にRapidTrace+を活用しています。

ゲノムは、生体が将来にこういうことをするかもしれないという設計図が書いてあるだけで、そこに書かれている生命現象がいま生じているのかどうかはわかりません。プロテオームになると、タンパク質が酵素として働き何らかの生理現象をいまから起こすという証拠を押さえることができます。しかし、タンパク質は種類が多い上に不安定で、きちんと同定・定量することは技術的にも困難です。

ただ、タンパク質は何かの生命現象を起こした後に低分子代謝物を残します。一連の生命現象の過程に酵素が関係し、そのステップごとに低分子代謝物が生成されていきます。つまり、低分子代謝物の変動が一種のフィンガープリントとなり、それを調べることで特定の生命現象そのものの全体をとらえることができますし、どんな生命現象がいま起こったのかを知ることもできます。

まとめると、ゲノムは将来何をするか、プロテオームはいま何をするか、メタボロームはいま何をしたのかを知るものだと思います。その下流には病気とか健康とかいう現象があるわけで、全体はそのようなヒエラルキーを構成しているのです。

— なるほど。オミックス研究の全体像がよく理解できました。ご研究の内容に関連して、メタボロミクスについてもう少し教えていただけますか。

篠原先生：生命現象に直結したフィンガープリントがみえるので、最も表現型に近いオミックスです。タンパ



実際にお使いいただいている RapidTrace+



数pgの脂質メディエーター検出には前処理が重要

— 固相抽出に取り組まれたのもこれが最初ですか。

篠原先生： サンプル前処理は見たい対象物によって大きく変わります。できるだけ多くのものを観察したいという目的であれば、水溶性代謝物と脂溶性代謝物に大きくわけるといった液体抽出が最適でしょう。これに対し、脂質メディエーターは血液1mL中に数pgほどしか存在しませんし、貴重な臨床サンプルですから、一度の分析で利用できるサンプル量も限られています。そのため、狙いたい分画のところを固相抽出で選択的に取り出してきて、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) で測定するという戦略が必要になります。

実際の臨床で得られた患者さんの血液ですとか、患者さんの手術標本でみてみたいとか、よりチャレンジングなテーマに取り組もうとすると、ますます前処理が重要になります。いかに効率良く、再現性良く、かつ簡便に行うかが勝負です。LC-MSの機械の性能が優れていても、検出を妨害するような成分が含まれていると正確な定量を得ることができず、誤った結果を導く恐れがあります。ですから、いかに前処理を最適化するかがとても大事なところなのです。

血液サンプルからの脂質メディエーターの測定は、留学先のSerhan研究室でも行われていませんでした。そこで、わたしが留学中のテーマとして取り組み、すでに研究室に導入されていたRapidTrace+を活用するかたちでいろいろと条件を検討し、向こうで論文をまとめました。そういった経緯でしたから、日本に戻った時にこのセンターでもRapidTrace+を導入することにしました。向こうで使っていて、性能も安定していましたから、いわば指名買いさせていただきました。

多検体処理で優れた再現性、コスト面の優位も

— とても光栄です、ありがとうございます。そうした重要なお研究にRapidTrace+が役立っているのはうれしいことです。実際にお使いになってのご感想もいただけますか。

篠原先生： 留学先で初めて触れた時も、すごく優秀な機械だなという印象でした。多検体処理をしても再現性が良く、処理も速くて、ソフトウェアの操作性も良かったです。とくに、ラインが8本あるので、異なる目的の固相抽出で、毎回溶媒を入れ替えなくても使えますので便利です。いまも、5本のラインを使って脂質メディエーターの固相抽出を行い、残りの3本を別の用途で使用しています。脂質メディエーター抽出の系だけでもメタノール、ヘキサン、ギ酸メチル、水、pH3に合わせた水の5種類の溶媒を使っていますので、入れ替えせずそのまま使えるのは非常に助かりますね。

前処理カラムも、ISOLUTE C18を使っていますが、他社品と同等以上の性能で、コストは2分の1になるのがメリットです。私たちの場合ヒトにおける科学的な指標を決めようという目的で研究を行なっていることもあり、たちまち数百といったサンプルが必要になります。生活習慣などのバックグラウンドの違いを考慮して統計的に処理することを考えると、サンプル数はぐんと跳ね上がるのです。そのため、100を超えるような多検体でも再現性良く前処理がきちんとできること、そして数をこなしますからコストが安いことが重要な要素になります。



RapidTrace+は1台のPCで10台までコントロールできます

— 高くご評価いただき、ありがとうございます。逆に、問題点などはございませんか。

篠原先生： RapidTrace+はコストパフォーマンスに優れ、われわれアカデミアでも導入しやすい機械なので満足しています。今後は、台数を増やして並列化できればいいですね。制御パソコン1台でRapidTrace+を10台までつなげられるようなので、まずはもう1台導入したいです。

健康診断の新たな指標にも期待

— 脂質メディエーター研究は、今後どのような応用・発展が考えられますか。

篠原先生： ヒトの血液の中での脂質メディエーターの濃度がわかると、いろいろな可能性が出てきます。例えば、健康な日本人の血液中に炎症惹起性脂質メディエーターと炎症収束性脂質メディエーターがどのような比率で存在するかなど、まだ誰も調べたことがありません。血液中を流れている脂質メディエーターはさまざまな臓器のコンディションをコントロールしており、それによって全身の健康度を知ることができるのではないかという仮説をわれわれは持っています。そして、それは個々人の性別、年齢、食生活、ライフスタイルで変化するはずですよ。

よく野菜多めの食事で適度に運動した方が健康に良いといいますが、そういう人は血液の中の炎症収束性脂質メディエーターが多いなどということが血液検査でわかるとすると、それを科学的な指標として未病時の生活のモニタリングができますし、正常な状態のプロファイルをベースにして、高血圧や糖尿病、動脈硬化などの患者さんはそのプロファイルがどうなっているかを比較したり、治療が進むとプロファイルがどう変化するかを調べたりすることができれば、非常に興味深いことになると思いますね。

最終的には健康診断の際に測定するパラメーターとして採用されて、全身の健康状態をあらわす指標として使われれば面白いと考えています。

— 将来私たちの身近な検査になる可能性もありますね。本日は長時間ありがとうございました。



〈インタビュー実施：2015年4月〉

導入製品

自動固相抽出装置 RapidTrace+

http://www.biotage.co.jp/rapidtrace_spe

1mL、3mL または 6mL の標準的な SPE (固相抽出) カラムを自動処理できます。各モジュールには、それぞれ SPE カラムを 10 本まで (6mL カラムは 5 本まで) セットでき、使いやすい制御ソフトウェアで最大 10 モジュールまで連結して動作させることができます。それぞれのカラムを全て異なるメソッドで処理することもできるため、メソッド開発の効率化などにも貢献します。

導入機関

国立大学法人 神戸大学

<http://www.kobe-u.ac.jp/>

神戸大学は、国際都市神戸を基点に「異文化との交流」を重視し、国際性豊かな総合大学として発展しています。人文・人間科学系、社会科学系、自然科学系、生命・医学系の四大学術系列の下に 11 の学部、14 の大学院、1 研究環、1 研究所と多数のセンターを擁しています。とくに、神戸大学医学部附属病院は、教育・研究・高度医療・地域医療に貢献しており、病床数は約 980 床、常勤医師数約 300 名、常勤看護師数約 860 名の規模です。地域の中核病院として、専門性を有した質の高い医療を提供しています。(データは 2014 年 5 月現在)

設立：1945 年 5 月

教職員数：3608 人

学生数：1 万 6537 人 (2014 年 5 月現在)