

1. 研究課題名

「ステロイド骨格を有する生理活性物質の体内動態解析に基づいた創薬研究」

2. 研究メンバー

池川 繁男 近畿大学薬学薬学部生体分子解析学研究室・教授

三田村 邦子 近畿大学薬学薬学部生体分子解析学研究室・准教授

3. 研究成果

3-1 ラット肝サイトゾール画分におけるグルタチオン抱合型胆汁酸の硫酸抱合

先に我々は、*N*-アセチルシステイン (NAC) 抱合型胆汁酸の3位水酸基がラット肝サイトゾール画分において硫酸抱合を受けることを示した (研究業績1)。こうした硫酸抱合を同種代謝物であるグルタチオン抱合型胆汁酸 (BA-GSH) に適用して考えると、本抱合体がラット肝サイトゾール画分において3位水酸基が硫酸抱合を受けることが推測される。そこで、ヒト主要胆汁酸5種のGSH抱合型胆汁酸-3-サルフェートを標品として合成するとともに、これらのエレクトロスプレーイオン化 (ESI) ー質量分析法 (MS) における特徴的イオンを精査し、液体クロマトグラフィー (LC)/ESI-MSによる高感度測定法を構築した。さらに、本法によってラット肝サイトゾール画分におけるGSH抱合型胆汁酸の硫酸抱合に検討を加えた。その結果、GSH抱合体の3位水酸基に対する硫酸抱合は、モノヒドロキシ>ジヒドロキシ>トリヒドロキシの順であり、疎水性の高い胆汁酸ほど硫酸抱合を受けやすく、肝内サイトゾール画分ではGSH部が容易に加水分解を受け、生成する遊離型胆汁酸が硫酸抱合を受けることも判った (Fig. 1)。(研究業績2)

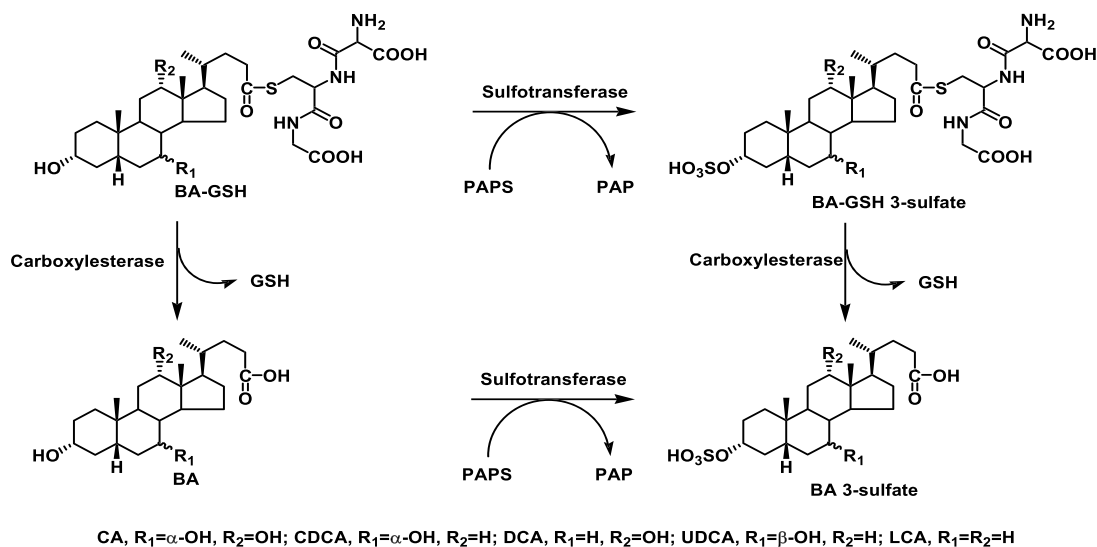


Fig. 1 Sulfation of BA-GSH by a rat liver cytosolic fraction

3-2. NAC抱合型ウルソデオキシコール酸の体内動態と肝機能改善作用

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) のNAC抱合体は、肝胆消化機能の改善が期待されるプロドラッグである。今回、UDCA-NACの体内動態解明と薬理効果に関する基礎的知見を得る目的で、[2,2,4,4-d₄]-UDCA-NAC (d₄-UDCA-NAC) 投与ラットの代謝物をも含めた血中本薬物濃度をLC/ESI-MSによって測定するとともに、アセトアミノフェン誘発肝障害ラットの肝機能改善効果に吟味を加えた。その結果、d₄-UDCA-NACは、投与後速やかに加水分解を受けて遊離型に変換されてアミノ酸抱合体として血中に出現することが分った (Fig. 2)。また、APAP誘発肝障害ラットの血中ALT及びASTは、非投与群と比較して有意に低下し (Fig. 3)、UDCA-NACが薬物性肝障害を改善する可能性のあることが示唆された。

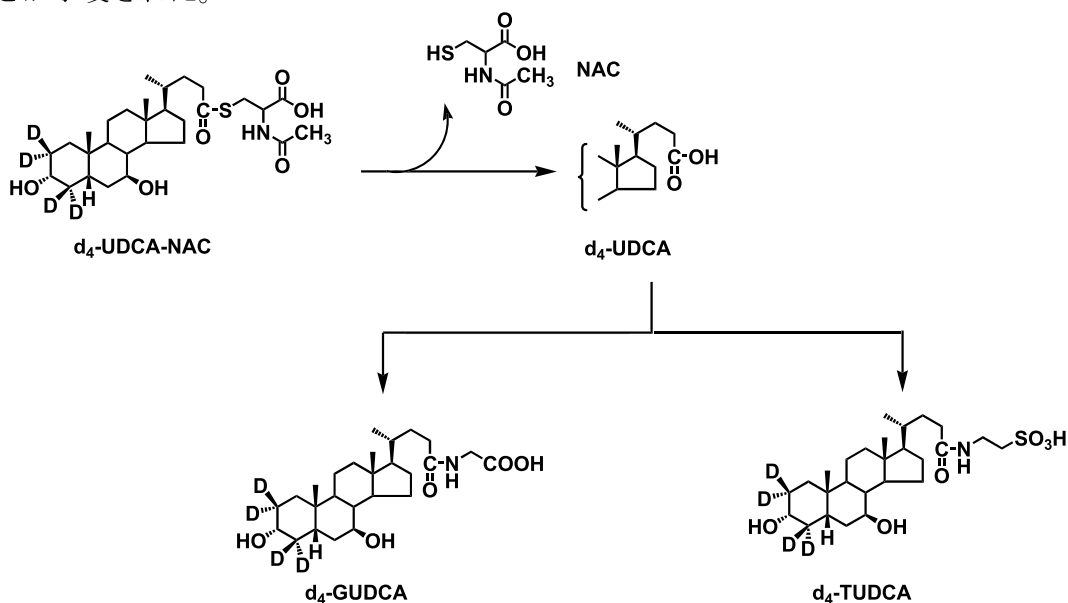


Fig. 2 Plausible Metabolic Pathway of [2,2,4,4-d₄]-UDCA-NAC in Rat

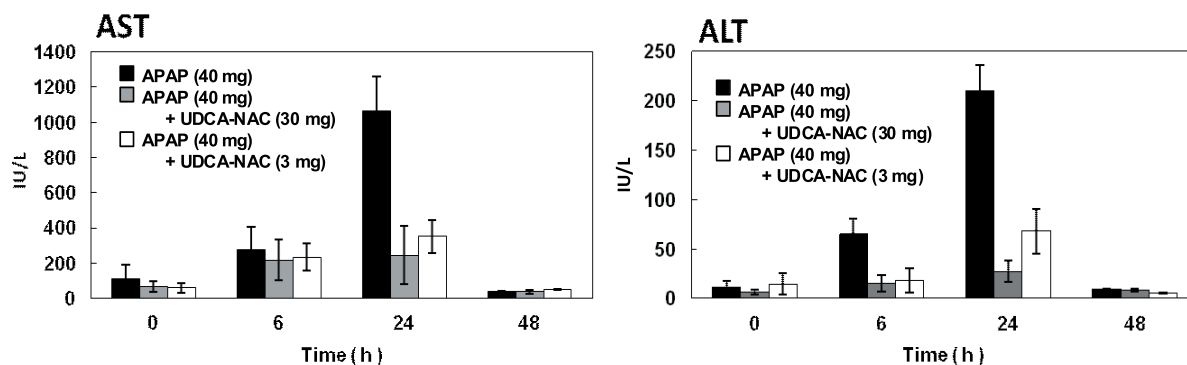


Fig. 3 Effect of UDCA-NAC on transaminase activity in acetoaminophen over-dosed

3-3. グルタミン抱合型胆汁酸の高感度測定法開発に関する基礎的検討

分子内にカルボキシル基を有するフェニル酪酸やフェニル酢酸は、代謝活性化された CoA チオエステルが肝内でグルタミン抱合体に変換されて尿中に排泄されることが知られる。このため、胆汁酸についても CoA チオエステルを前駆体とするグルタミン抱合体への変換と尿中への排泄が新たな代謝経路として推測される。そこで、本抱合体の生成と体内動態を明らかにすべく、標品としてヒト主要胆汁酸 5 種のグルタミン抱合体を合成するとともに、LC/ESI-MS/MS による高感度測定法に基礎的検討を加えた。

初めにヒト胆汁中の主要な胆汁酸 5 種を混合酸無水物法によりグルタミンと縮合させ、グルタミン抱合型胆汁酸 (BA-Gln) 標品を合成した (Fig. 4)。引き続き、LC/ESI-MS/MS による高感度測定法を構築する上で必須となる特徴的イオンの生成に検討を加えた。その結果、正イオン検出では強度の大きい $[M+H]^+$ 及び $[M+NH_4]^+$ が認められ、 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとする MS/MS では $[M+H-H_2O]^+$ を基準ピークとして与えた。一方、負イオン検出では $[M-H]^-$ のみが認められ、これをプリカーサーイオンとする MS/MS では強度の大きい $[M-H-H_2O]^-$ 及び $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ を明瞭に与えた (Fig. 5)。今後さらに、今回得られた特徴的イオンの生成に関する知見を基に選択反応検出による高感度一斉測定法を構築し、本法によるグルタミン抱合型胆汁酸の生成と代謝研究を進めてゆく。

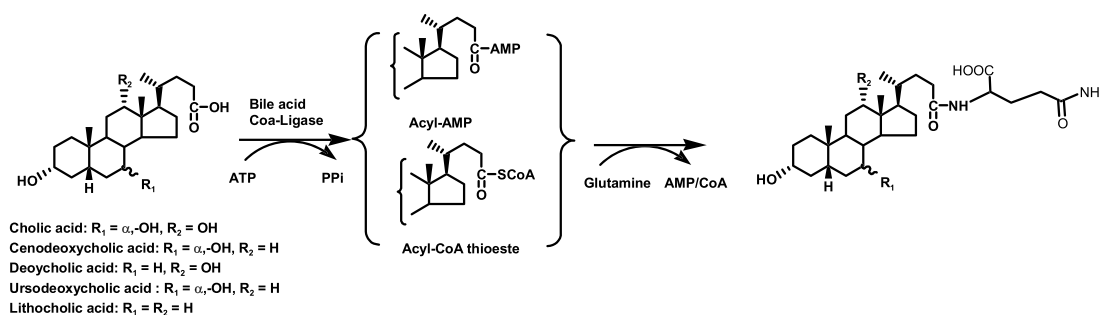


Fig. 4 Formation of glutamine conjugate via reactive metabolites of bile acids

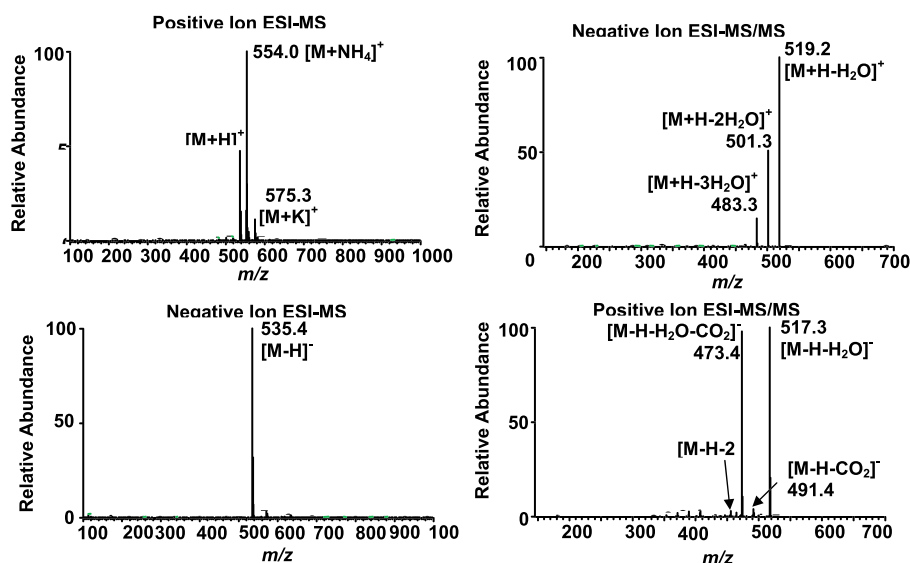


Fig. 5 Positive and negative ion ESI-MS and ESI-MS/MS spectra of glutamine conjugate of cholic acid

3-4. 安定同位体希釈 LC/ESI-MS による尿中テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェート高感度直接一斉分析法の開発

ステロイドホルモンや胆汁酸などの低分子生理活性物質にフォーカスした臨床メタボローム研究では、隠された未知代謝物が少なからず存在し、これらを解き明かすことが病因を解明し、病態を解析する上で重要な課題となる。そこで、内分泌・代謝疾患の診断指標として期待される尿中抱合型テトラヒドロコルチコステロイドを対象とするメタボロミクス研究を展開すべく、昨年度までにグルクロニド 12 種の LC/MS による高感度測定法を構築するとともに、本法を臨床に適用して有用な知見を得た。また、尿中テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの標品として 3-及び 21-モノサルフェートと 3,21-ジサルフェート計 15 種と、内標準物質として多重重水素標識 5 β -テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェート 6 種の合成を達成した[研究業績 3]。今年度は、これらの研究成果を基に、多重重水素標識 5 α -テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェート 8 種 (Fig. 6) の合成を達成するとともに (投稿準備中)、尿中テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの安定同位体希釈 LC/MS による定量メタボロミクスにも成功した (投稿準備中)。

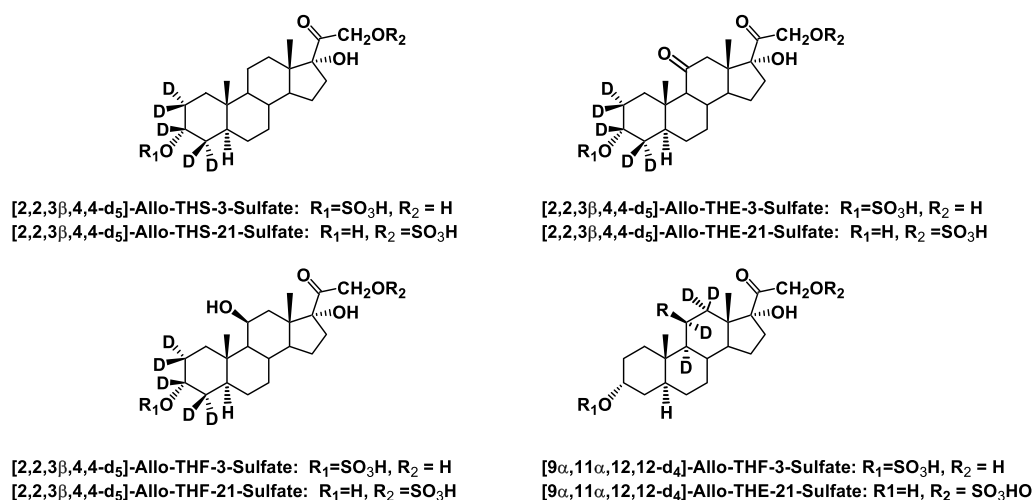


Fig. 6. Structures of 3- and 21-monosulfate conjugates of multi-deuterated tetrahydrocorticosteroids in the 5 α -series

3-5 LC-ESI-MS/MSによる硫酸抱合型オキシステロール高感度一斉分析法の開発

コレステロールは、細胞膜の重要な構成成分であるばかりか、ステロイドホルモンの合成原料ともなっている。その一方では、高脂血症や高コレステロール血症では動脈硬化性疾患をもたらす。その動脈硬化巣には正常な組織や血漿と比べ酸化変性したコレステロール(酸化LDL)が存在し、特異的な受容体を介してそれらを際限なく取り込み、泡沫細胞化したマクロファージが動脈硬化症の進展に重要な役割を果たしている。酸化LDLは、コレステロール 3-サルフェート(CS)には及ばないものの、3位水酸基が硫酸エステル化された 3-サルフェートとしても存在し、近年、動脈硬化症や脂質代謝異常症と

関連して多くの注目が寄せられている。そこで、ヒト血中に存在することが推測される 24-OHC、25-OHC、26-OHC、7 α -OHC、7 β -OHC、5 α ,6 α -epoxycholesterol (5 α ,6 α -EC)、5 α ,6 β -hydroxycholesterol (5 α ,6 β -OHC)の 3-サルフェート並びに内標準物質として、[25,26,26,26,27,27,27-d₇]-cholesterol 3-sulfate、[25,26,26,26,27,27,27-d₇]-7-ketocholesterol 3-sulfateをトリメチルアミン-三酸化硫黄錯体を用いる硫酸化反応を駆使して合成した (Fig. 7)。引き続き、CS及び 7-KCSを含めたサルフェート 9 種の負イオン検出 ESI-MS/MSにおける特徴的イオンの生成とLCによる分離、さらにはOasis® WAXカートリッジを用いる簡便な固相抽出法を組み合わせたLC/ESI-MS/MSによる直接一斉分析法に検討を加えた。その結果、本法が血中オキシステロール 3-サルフェートの感度、選択性に優れる定量法として臨床に適応しうる可能性のあることが判った (Fig. 8)。

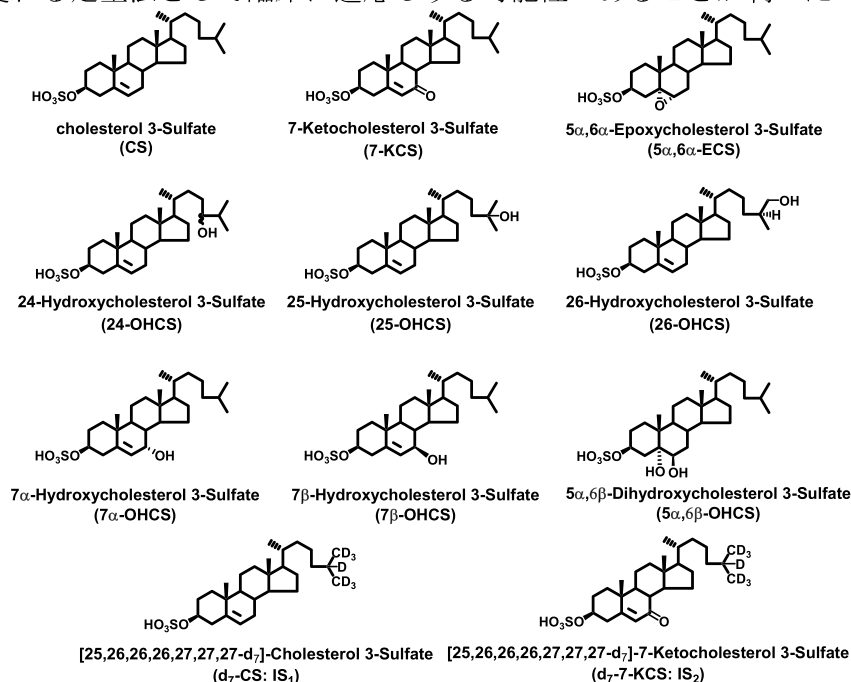


Fig. 7 Structure of oxysterol 3-sulfates and internal standards

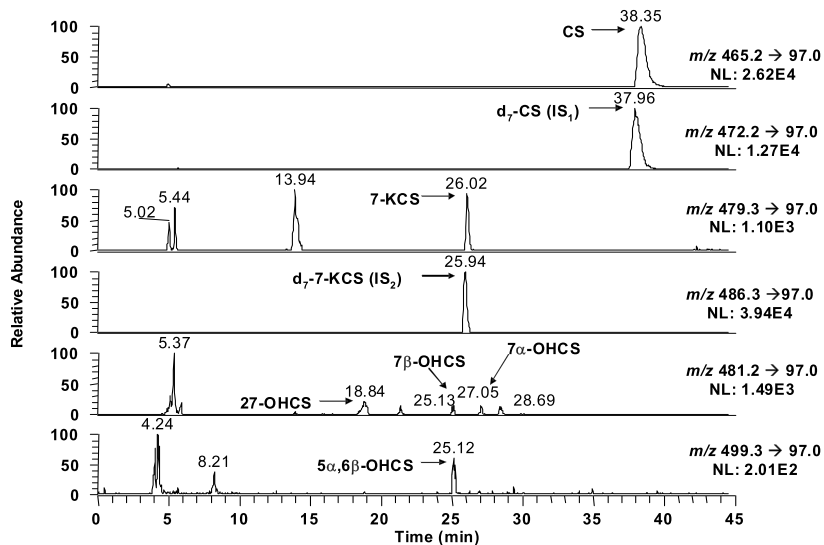


Fig. 8 Typical SRM Chromatogram of CS and Oxysterol 3-Sulfates in Human Serum