

ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術と診断法開発への応用 — 希少疾患ファブリー病の診断の改善に向けて —

大日本住友製薬株式会社 ゲノム科学研究所
末岡 英明 青木 幹雄

はじめに

質量分析 (MS) は、測定試料にエネルギーを与えてイオン化させて、そのイオンを分離・検出することで物質の質量 (正確には質量電荷比) を測定する技術である。タンデム質量分析計 (タンデムマス (MS/MS)) では1段目のMSで特定の質量のイオンのみを選択し、さらに不活性ガスなどに衝突させることで生じた2次的なイオンを2段目のMSで検出する。質量分析技術は生体に含まれるタンパク質や代謝物も測定対象にできることから、病気の早期診断などを目的としたバイオマーカーの探索や開発に活用されている。医療現場においては、既に28種類の先天代謝異常症を対象にタンデムマスを用いた新生児スクリーニングが開始されており、患者の早期診断に貢献している¹⁾。

大日本住友製薬株式会社でも、質量分析技術を活用したバイオマーカー研究を行っているが、臨床試料を用いた分析では利用できる試料が微量であることも多い。このような場合には、高い感度と精度を併せ持つ分析系が必要となる。本稿では、高感度かつ高精度の分析が可能なナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術 (ナノLC-MS/MS) と、当該技術を用いて実施した、当社製品リプレガル®の適応症であるファブリー病の診断の改善に向けたバイオマーカー研究の取り組みを紹介したい。

ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術

一般に生体試料を分析する場合には、質量分析装置に液体クロマトグラフィー (LC) を接続し、さらに測定したい目的物質を他の成分から分離、濃縮させることを目的として分析カラムを利用する。ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術は、汎用的な分析カラムの内径を数10分の一程度に微小化し、さらにイオン化した試料を効率よく質量分析装置に取り込ませることで検出感度を飛躍的に向上させる技術である (Fig. 1)。本技術は、血液であれば数マイクロリットルという極

微量の生体試料から調製した分析サンプルの高感度測定が可能であることから、臨床検体などの分析に有用であるが、微細な分析カラムでの分離には安定した低流速制御や微小化した配管の扱いに習熟が必要であり、一般的には、分析の精度や再現性に関わる堅牢性が課題であった。近年、本技術を用いた創薬研究も報告されてきているが²⁾、大日本住友製薬株式会社 ゲノム科学研究所では、設立当初から本技術の検討を進め、高感度かつ高精度な分析が可能な研究ノウハウを蓄積し、創薬研究に活用している^{3), 4)}。

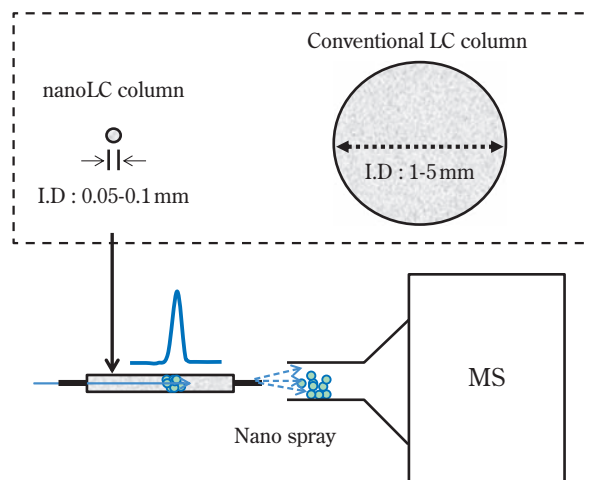


Fig. 1 Mechanism of high sensitivity in nanoLC-MS/MS System

希少疾患ファブリー病

ファブリー病は細胞内小器官リソソームに存在する加水分解酵素 α -ガラクトシダーゼA (GLA) の遺伝子変異を原因とする酵素活性低下により、本来、この酵素の働きで分解されるべきグロボトリアオシルセラミド (Gb3) を始めとする糖脂質等が多くの組織に蓄積することで、心障害、腎障害、脳血管障害などの様々な臨床症状が出現するX染色体性の遺伝子疾患である⁵⁾

(Fig. 2)。ファブリー病の原因となるGLA遺伝子変異は、700種類以上が知られており、男性患者では、翻訳されたGLAの残存酵素活性の違いによって、若年期から発症する古典型と壮年期以降に発症する遅発型に分類される⁶⁾。また女性患者では胎生早期に起こるX染色体のランダムな不活性化によって組織全体のGLA活性が決定されるため、臨床的には無症状から重症例までの幅広い臨床像を示すことが知られている⁷⁾。現在、当社製品プレガル®などの組み換えGLA酵素を用いた酵素補充療法によって、ファブリー病は治療可能な疾患となっており、早期診断・早期治療に繋がる診断バイオマーカーが重要となっている。

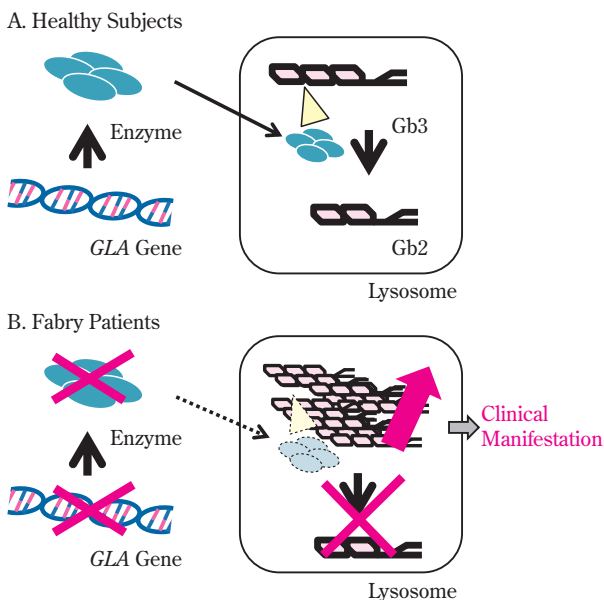


Fig. 2 Molecular mechanism for Fabry disease

Lyso-Gb3

ファブリー病の診断に用いられるバイオマーカーとして、男性患者では尿中Gb3の増加や白血球GLA活性の低下があるが、女性患者では明確なGb3の増加やGLA活性の低下が認められないケースがあり、女性患者の診断において有用な新たなバイオマーカーが望まれている。近年、Gb3の構成成分であるセラミドから脂肪酸部分が脱離したLyso-Gb3が見出され (Fig. 3)、女性患者を含めたファブリー病患者の血液中で増加する有用なバイオマーカーとして注目されてきている^{8), 9)}。しかしながら、血液中のLyso-Gb3濃度は低いため、

誘導体化後にHPLCで検出する方法や一般的なLC-MS/MSでは、健常人および一部のファブリー病患者 (女性患者や遅発型患者の一部) においてLyso-Gb3を検出できず^{9), 10)}、新たな診断法が求められている患者層においてLyso-Gb3が有用なバイオマーカーになるかどうか明らかにされていなかった。

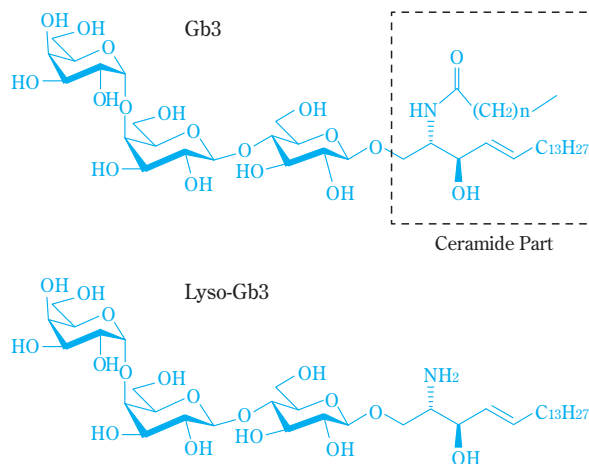


Fig. 3 Structures of Gb3 and Lyso-Gb3

ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術によるファブリー病患者の血漿Lyso-Gb3測定

ファブリー病診断バイオマーカーとしてのLyso-Gb3の有用性を検証するため、ナノLC-MS/MSを用いた高感度かつ高精度なLyso-Gb3測定法を開発した。Table 1に、従来用いられていたHPLC法とナノLC-MS/MS法との比較を示す。本法では、質量の違いの見極めが可能なMSの特徴を活かして、物理的・化学的性質がLyso-Gb3と類似するが、質量が異なる安定同位体標識Lyso-Gb3を内部標準物質として使用している。その結果、HPLC法と比較して、少ない血漿量で、高精度かつ高感度な測定が可能となっている。

Table 1 Comparison between HPLC and nanoLC-MS/MS based Lyso-Gb3 assay

	Plasma volume	Limit of quantification	Internal standard
HPLC	50 μ L	2 nM	None
nanoLC-MS/MS	20 μ L	0.03 nM	Stable-isotoped Lyso-Gb3

遅発型ファブリー病に位置づけられるGLA遺伝子変異としてR112H変異 (GLAタンパク質の112番目のアルギニンがヒスチジンに置き換わっている) やM296I変異 (296番目のメチオニンがイソロイシンに置き換わっている) が知られている。これらの変異を有する患者の血漿中Lyso-Gb3濃度は、既存の定量法では定量限界以下と報告されており、詳細な血中濃度はこれまで明らかにされていなかった^{9),10)}。今回開発したLyso-Gb3測定法を用いて、遅発型患者を含む実際のファブリー病患者血漿中のLyso-Gb3濃度の測定を実施した。Fig. 4の横軸は、HPLCを用いた従来の測定法で定量したLyso-Gb3濃度であるが、健康人やR112H変異やM296I変異を持つ遅発型患者ではLyso-Gb3濃度が定量限界である2 nM未満であり測定不能であった¹⁰⁾。それに対し、縦軸はナノLC-MS/MSを用いて開発した測定法で定量したLyso-Gb3濃度であるが、健康人並びに全ての患者の血漿中Lyso-Gb3濃度が測定可能であった¹¹⁾。Table 2に健康人およびR112H変異およびM296I変異を持つ遅発型患者の血漿Lyso-Gb3濃度を示す。今回の検討に

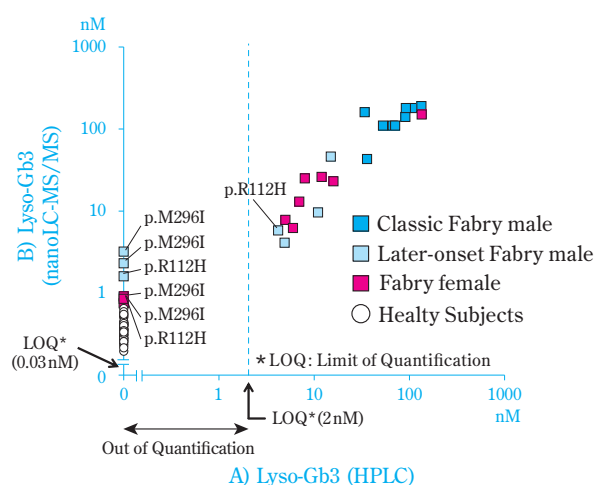


Fig. 4 Lyso-Gb3 concentrations in the patients with Fabry disease by
A) HPLC and B) nanoLC-MS/MS

Table 2 Lyso-Gb3 concentrations in the healthy subjects and later-onset Fabry patients with R112H or M296I

Plasma Lyso-Gb3 concentration				
Healthy Subjects (n=40)	Fabry males with R112H (n=2)	Fabry males with M296I (n=2)	Fabry female with R112H (n=1)	Fabry females with M296I (n=2)
0.37 ± 0.11 nM (Mean ± SD)	1.6 nM	2.3 nM	0.75 nM	0.85 nM
	4.1 nM	3.2 nM		0.91 nM

おいては患者数が少なかったものの、古典型ファブリー病患者のみならず、遅発型患者や女性患者においても血漿中Lyso-Gb3濃度が健康人よりも高濃度であることが初めて明らかとなった。

おわりに

ナノ液体クロマトグラフィー/質量分析技術を活用することで、Lyso-Gb3濃度が不明であった遺伝子変異型を持つファブリー病患者においても、健康人より高い血中濃度を示すことが明らかとなった。本結果は、ファブリー病の診断に繋がるバイオマーカーとしてのLyso-Gb3の有用性をサポートするものである。更なるエビデンスの蓄積により、希少疾患ファブリー病の診断が改善され、適切な治療へと導入されることが期待される。

謝辞

本研究は、明治薬科大学臨床遺伝学教室・櫻庭 均教授および明治薬科大学生体機能分析学教室・鬼川忠靖教授と大日本住友製薬株式会社との共同研究で成し得た成果であり、研究に用いたファブリー病患者の血漿は、本共同研究先から入手しました。本研究に向けて多くのアドバイスを戴いた共同研究者の皆様へ感謝いたします。

引用文献

- 1) 山口 清次, “タンデムマス・スクリーニング ガイドブック”, 診断と治療社 (2013).
- 2) M. R. Gama, C. H. Collins and C. B. Bottoli, *J. Chromatogr. Sci.*, **51**, 694 (2013).
- 3) K. Higashi, Y. Tomigahara, H. Shiraki, K. Miyata, T. Mikami, T. Kimura, T. Moro, Y. Inagaki and H. Kaneko, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4485 (2011).
- 4) M. Hashimoto, N. Bogdanovic, H. Nakagawa, I. Volkmann, M. Aoki, B. Winblad, J. Sakai and L. O. Tjernberg, *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 1686 (2012).

- 5) 衛藤 義勝, “ファブリー病UpDate”, 診断と治療社 (2013).
- 6) C. S. Nance, C. J. Klein, M. Banikazemi, S. H. Dikman, R. G. Phelps, J. C. McArthur, M. Rodriguez and R. J. Desnick, *Arch. Neurol.*, **63**, 453 (2006).
- 7) K. D. MacDermot, A. Holmes and A. H. Miners, *J. Med. Genet.*, **38**, 769 (2001).
- 8) J. M. Aerts, J. E. Groener, S. Kuiper, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. van Roomen, M. Mirzaian, F. A. Wijburg, G. E. Linthorst, A. C. Vedder, S. M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R. G. Boot, C. E. Hollak, R. O. Brady and B. J. Poorthuis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 2812 (2008).
- 9) S. M. Rombach, N. Dekker, M. G. Bouwman, G. E. Linthorst, A. H. Zwinderman, F. A. Wijburg, S. Kuiper, M. A. vd Bergh Weerman, J. E. Groener, B. J. Poorthuis, C. E. Hollak and J. M. Aerts, *Biochem. Biophys. Acta*, **1802**, 741 (2010).
- 10) S. Mitobe, T. Togawa, T. Tsukimura, T. Kodama, T. Tanaka, K. Doi, E. Noiri, Y. Akai, Y. Saito, M. Yoshino, T. Takenaka, S. Saito, K. Ohno and H. Sakuraba, *Mol. Genet. Metab.*, **107**, 623 (2012).
- 11) H. Sueoka, J. Ichihara, T. Tsukimura, T. Togawa and H. Sakuraba, *PlosOne*, **10**, e0127048 (2015).