

疾患モデル動物のメタボロミクスによる  
胆汁うっ滞及びハンチントン病の  
バイオマーカー探索及び病態メカニズム検討

2022年3月

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科

橋本 雅世

## 目次

第1章 諸言 .....	1
1.1 医薬品の研究開発の現状と課題 .....	1
1.2 医薬品の研究開発とバイオマーカー .....	5
1.3 バイオマーカー探索におけるメタボロミクスの活用 .....	7
1.3.1 メタボロミクスの特徴 .....	7
1.3.2 メタボロミクス研究の流れ.....	14
1.3.3 メタボロミクスで使用される分析手法 .....	16
1.4 医薬品の研究開発における疾患モデル動物の役割.....	21
1.5 本研究の目的.....	25
1.6 参考文献 .....	26
第2章 胆汁うっ滞モデルラットのメタボロミクス.....	31
2.1 序論 .....	31
2.2 実験材料及び方法.....	34
2.2.1 生体試料採取.....	34
2.2.2 試薬 .....	34
2.2.3 メタボロミクス分析法の確立 .....	35
2.2.4 血漿及び尿試料の測定.....	38
2.2.5 データ解析 .....	38
2.3 結果及び考察 .....	39
2.3.1 EHBR と SD ラットの血漿及び尿中代謝物プロファイルの比較.....	39
2.3.2 EHBR における代謝物レベルの変化 .....	42
2.4 結語 .....	51
2.5 参考文献 .....	51
第3章 ハンチントン病モデルマウスのメタボロミクス .....	55
3.1 序論 .....	55
3.2 実験材料及び方法.....	59
3.2.1 生体試料採取.....	59
3.2.2 試薬 .....	59
3.2.3 血漿及び脳試料の測定.....	60
3.2.4 データ解析 .....	64
3.3 結果及び考察 .....	64
3.3.1 ヒスチジン代謝.....	76
3.3.2 アルギニン代謝 .....	81
3.3.3 システイン及びメチオニン代謝 .....	86
3.3.4 グリシン・セリン・スレオニン代謝.....	91

3.3.5 脂質代謝 .....	95
3.3.6 神経伝達物質の代謝.....	99
3.4 結語 .....	101
3.5 参考文献 .....	102
第4章 総括 .....	112
目録 .....	114
謝辞 .....	115

## 略語

ATP:	adenosine triphosphate
BDNF:	brain-derived neurotrophic factor、脳由来神経栄養因子
CE:	capillary electrophoresis、キャピラリー電気泳動
CE-TOFMS:	capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry、 キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計
CSE:	cystathionine $\gamma$ -lyase
EGFR:	epidermal growth factor receptor、上皮細胞成長因子受容体
EHBR:	Eisai Hyperbilirubinuria Rat
FDA:	Food and Drug Administration、米国食品医薬品局
FDR:	false discovery rate
FIA-MS/MS:	flow injection analysis-tandem mass spectrometry、 フローインジェクション - タンデム質量分析装置
GC:	gas chromatography、ガスクロマトグラフィー
GC-MS:	gas chromatography-mass spectrometry、 ガスクロマトグラフィー - 質量分析装置
LC:	liquid chromatography、液体クロマトグラフィー
LC-MS:	liquid chromatography-mass spectrometry、 液体クロマトグラフィー - 質量分析装置
LC-MS/MS:	liquid chromatography-tandem mass spectrometry、 液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析装置
MRP:	multidrug resistance-associated protein
MS:	mass spectrometer/mass spectrometry、質量分析装置/質量分析
m/z	質量電荷比
NMR:	nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴
NO:	nitric oxide、一酸化窒素
NOS:	nitric oxide synthase、一酸化窒素合成酵素
PCA:	principal component analysis、主成分分析
PSA:	prostate specific antigen、前立腺特異抗原
SD:	Sprague-Dawley
WT:	wild type、野生型

## 第1章 諸言

### 1.1 医薬品の研究開発の現状と課題

近年、ゲノム解析技術などライフサイエンスの革新的な技術開発が進む一方で、新しい医薬品の承認数は伸び悩んでいる。新薬の創出が全世界的に停滞している中、医薬品の研究開発の効率化と成功確率の向上は医薬品産業の最大の課題となっている[1]。

医薬品の研究開発には9～17年要するとされており、大きく3つのステージに分けられる（図 1.1）。最初のステージの「基礎研究」では、通常2～3年かけて創薬ターゲットの探索や同定、新薬候補物質の創製を行う。次のステージの「非臨床試験」では、3～5年かけて新薬候補物質の有効性や安全性を動物や培養細胞を用いて研究する。次に、「臨床試験」と呼ばれるステージで、新薬候補物質のヒトでの効果、副作用等を研究する。臨床試験の期間は3～7年であるが、それ以上の年月を要することもある。臨床試験には、「第1相試験」、「第2相試験」、「第3相試験」の3つの段階がある。「第1相試験」では、比較的少数の健康な人を対象に、副作用等の安全性を確認する。安全性が確認できれば、「第2相試験」に進み、少数の患者を対象に有効で安全な投与量や投薬方法を確認する。続く「第3相試験」では多数の患者を対象に有効性と安全性について既存薬との比較等を行う。臨床試験で有効性や安全性を確認した後、各国の審査当局に医薬品の承認申請を行い、厳正な審査を受け、1～2年の後に医薬品として認可される。

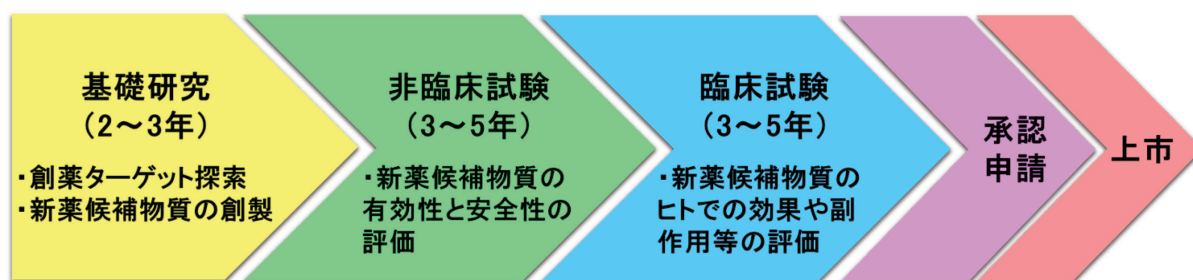


図 1.1 医薬品の研究開発の流れ

新薬の創出に必要な研究開発費用は年々増加しており、最近の調査では医薬品1品目の上市に必要な研究開発費用は10億ドル～26億ドルと算出されている[2][3]。しかしながら、医薬品の臨床試験の成功確率は低く、第1相試験に入った医薬品候補化合物が承認にこぎつける確率はわずか10%程度で

ある[4] (図 1.2)。

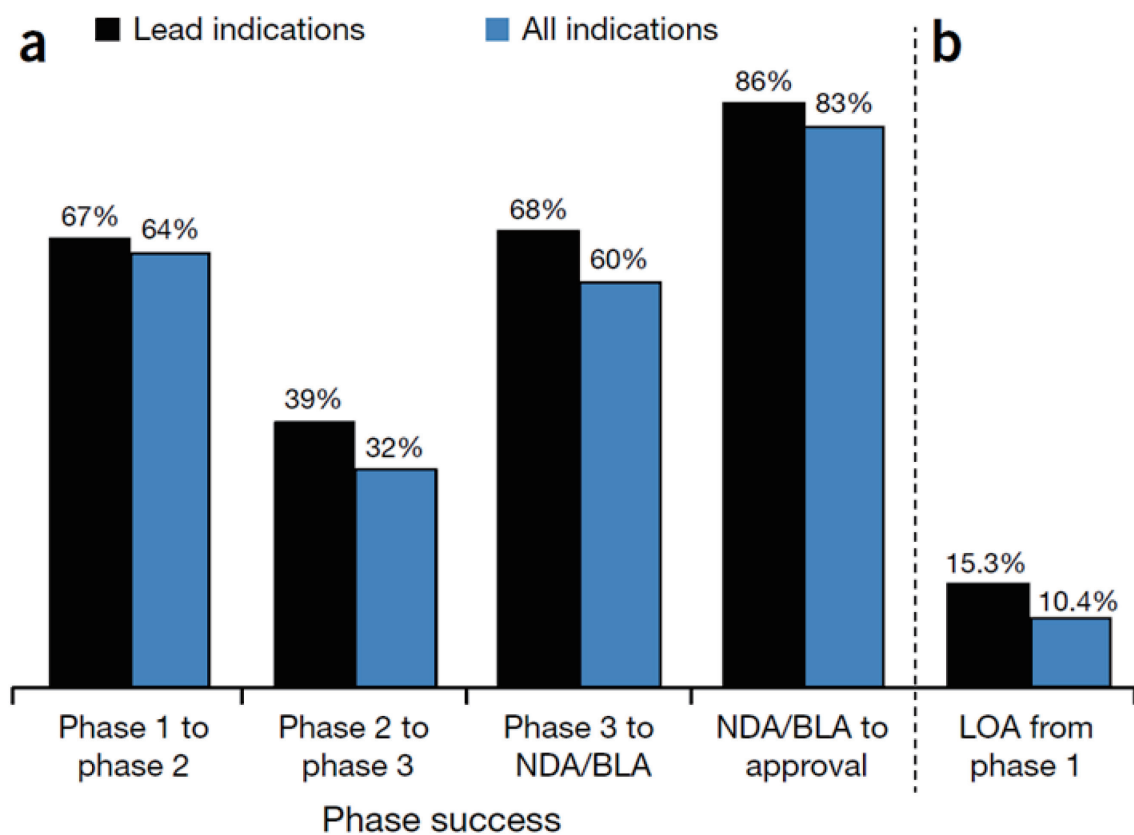


図 1.2 医薬品開発における臨床試験の成功確率

(a) 臨床試験の相ごとの成功確率。数値は次の相へ進む確率を表す。(b) 第 1 相試験に入った医薬品候補化合物が米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) に承認される確率。LOA: 医薬品として承認される確率 (Likelihood of Approval)、Lead indications: 第一適応疾患、All indications: 第一適応疾患を含むすべての適応疾患、NDA: 新薬承認申請 (new molecular entities)、BLA: 生物学的製剤認可申請 (biologic license applications)。(文献[4]の Figure 1 を引用)

臨床試験の主な失敗理由としては、(1)ヒトでの有効性の問題、(2)安全性の問題、(3)市場性、(4)開発戦略上の理由などがある。この中で最も大きな割合を占めるのが、(1)ヒトでの有効性の問題である。第 2 相試験及び第 3 相試験の主な失敗理由は、有効性 (efficacy) となっている (図 1.3)。また、臨床試験の中でも有効性の確認を主目的とする第 2 相試験の成功確率は約 30%と特に低くなっている (図 1.2)。これらは、前臨床段階や早期臨床段階で医薬品の有効性を予測することの難しさを反映していると考えられる [4][5][6][7]。

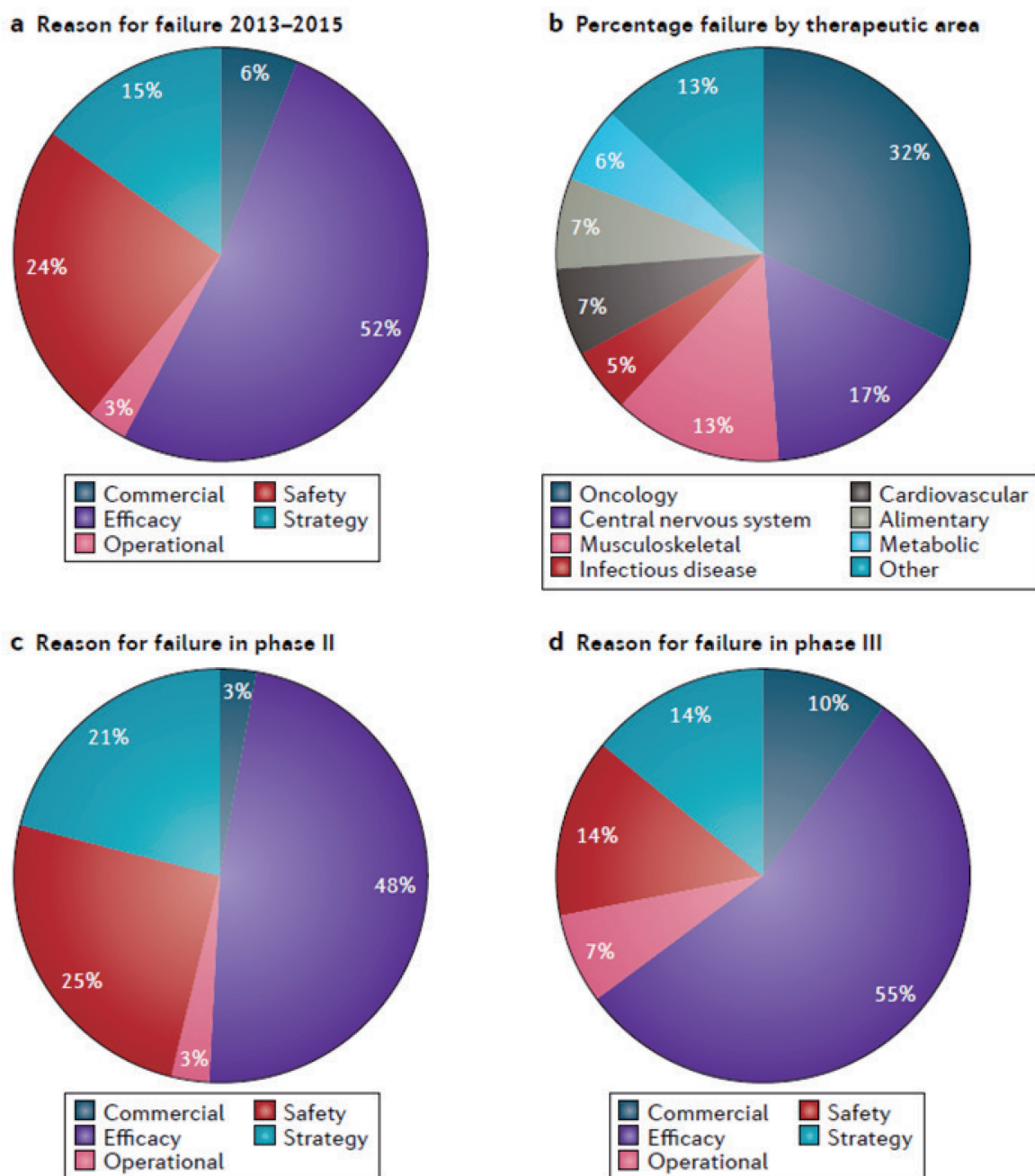


図 1.3 臨床試験の失敗の理由

(文献[7]の Figure 1 を引用、2013 年から 2015 年の臨床試験の失敗の理由)

- (a) 第 2 相及び第 3 相の臨床試験（全 174 試験）における失敗の理由。
- (b) 失敗した試験における疾患領域ごとの割合。
- (c) 第 2 相試験における失敗の理由。
- (d) 第 3 相試験における失敗の理由。

医薬品開発のコストや成功確率は、疾患領域によって差がある。中でも精神神経系の疾患は、医薬品開発の成功確率が最も低い領域の 1 つである（図

1.4)。精神神経領域の疾患には、うつ病、統合失調症、てんかん、アルツハイマー病やパーキンソン病などが含まれる。これらの精神神経疾患の治療薬の研究開発には、他の疾患領域の治療薬に比べて長い期間と多額の費用を必要とする。しかしながら開発の成功確率は極めて低く、臨床試験の第1相試験に入った医薬品候補化合物が承認されるまでの確率はわずか数%であり、第3相試験で失敗するものも多い[8][9][10]。

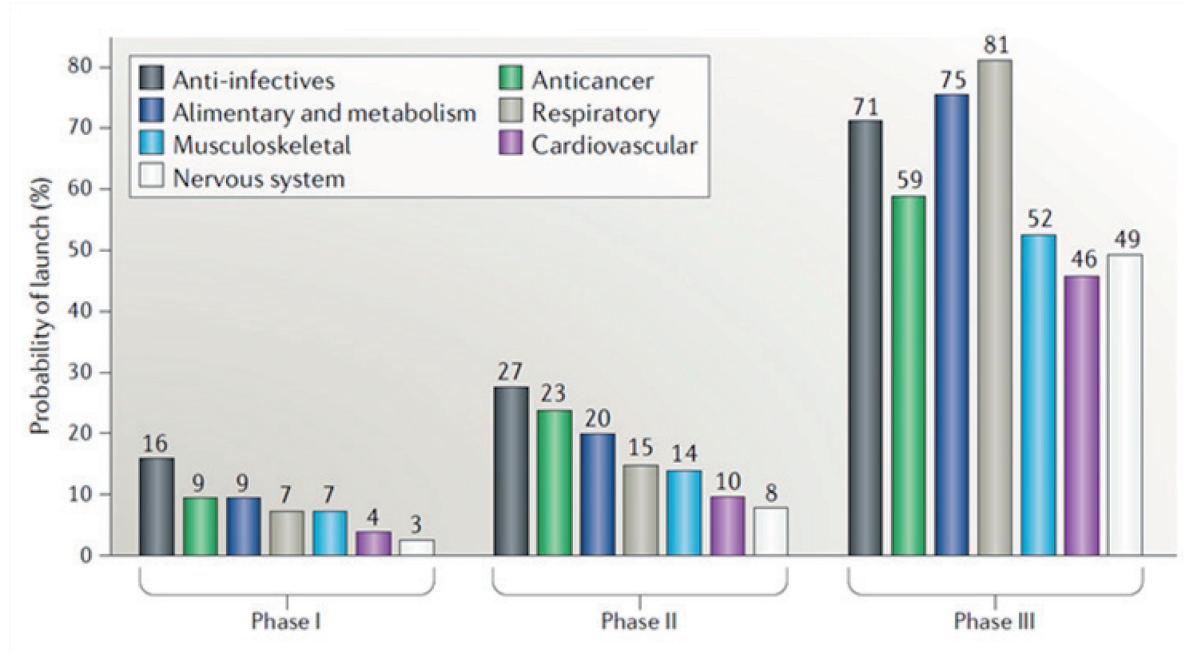


図 1.4 医薬品開発における疾患領域ごとの臨床試験の成功確率

2010年～2017年における第1相試験、第2相試験、第3相試験の各段階から上市に至る確率を疾患領域ごとに示した。(文献[8]の Figure 2 を引用)

医薬品の研究開発の生産性の低さは以前より課題となっており、米国食品医薬品局 (FDA) は 2006 年に「Critical Path Opportunities List」を公表している(表 1.1) [11]。ここでは、新しい医薬品・医療機器を患者の元へ早く提供できるように、研究開発プロセスにおいてその効率・予測性・生産性を向上させるために取り組むべき事項が提案されている。中でも、「新しいバイオマーカーの確立と疾患モデルの開発」は医薬品の開発研究の効率、予測性並びに生産性向上のための最重要分野の一つであると述べられており、バイオマーカー探索の有望な手段として、生体内分子を網羅的に調べるオミクス技術が挙げられている。



**表 1.1 Critical Path Opportunities List**

(文献[11]より作成)

トピック 1	よりすぐれた評価手段－新しいバイオマーカーの確立と疾患モデルの開発
トピック 2	臨床試験の効率化
トピック 3	生物情報科学 (Bioinformatics) の活用
トピック 4	21 世紀型の製造への転換 (医薬品・医療機器の特性分析、製造、検査、品質管理などの工業化プロセスの改善)
トピック 5	公衆衛生上の緊急の必要性に対応するための製品の開発 (新興感染症やバイオテロ攻撃に対抗するための新しい抗生物質やワクチンなどの開発)
トピック 6	小児および思春期の患者のための治療法の開発

## 1.2 医薬品の研究開発とバイオマーカー

バイオマーカーは、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義される[12][13]。血圧や心拍数といったバイタルサインの他、血液や尿などの体液、組織、糞便などに含まれる遺伝子、タンパク質、代謝物など様々な生体内物質がバイオマーカーとなり得る。

バイオマーカーの代表的な例としては、生活習慣病の診断に用いられる血糖値やコレステロール値などがある。がんの診断や治療においても様々なバイオマーカーが使用されている。例えば、前立腺がんの早期発見や進行度の判定に用いられる前立腺特異抗原 (prostate specific antigen: PSA)、肺がん治療薬の治療効果の予測に用いられる上皮細胞成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異などがある。患者個人の特性或生体情報をもとに最適な治療や疾病の予防を行う「個別化医療」においても、バイオマーカーを用いた患者の状態の把握が必要となる。

バイオマーカーの主な分類とその使用目的を表 1.2 に示す。

表 1.2 バイオマーカーの分類とその使用目的

(BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource [14]を基に作成)

バイオマーカーの分類	使用目的
予測・リスクマーカー (susceptibility/risk biomarker)	将来的な疾患発症の可能性を予測する 例:乳がん発症リスク予測のための breast cancer gene 1 及び 2 (BRCA1/2) 遺伝子変異
診断マーカー (diagnostic biomarker)	対象となる疾患または状態を検出する 例:脂質異常症(高脂血症)診断における LDL 及び HDL コレステロール値やトリグリセリド、前立腺がんの早期診断における PSA
モニタリングマーカー (monitoring biomarker)	疾患または医学的状态の評価、あるいは医療製品または環境因子への曝露の影響を評価する 例:C型肝炎の治療効果判定におけるC型肝炎ウイルス RNA レベル
進行マーカー (prognostic biomarker)	対象となる疾患または状態を有する患者における、臨床イベントや疾患再発、あるいは進行の可能性を同定する 例:前立腺がんの進行度の推定における PSA
予測マーカー (predictive biomarker)	医療製品または環境因子への曝露による影響を受けやすい可能性が高い個人を同定する 例:肺がんの EGFR 遺伝子変異、乳がんの HER2 (human EGFR-related 2) タンパク過剰発現
薬力学的/応答マーカー (pharmacodynamic/response biomarker)	医療製品または環境因子に曝露された個人において生物学的反応が生じていることを示す 例:糖尿病治療薬の効果判定におけるヘモグロビン A1c
安全性マーカー (safety biomarker)	医療製品または環境因子への曝露の前後に測定し、副作用としての毒性の発現やその程度を同定する 例:肝機能の評価に用いられる AST (aspartate aminotransferase) 及び ALT (alanine aminotransferase)

医療分野において、疾患の早期発見、進行度の診断、治療効果の判定、治療効果や副作用の予測などにつながるバイオマーカーのニーズは高く、様々な疾患を対象としたバイオマーカー探索研究が広く実施されている。また、1.1 項で述べたように、医薬品の研究開発の成功確度向上と効率化を目的としたバイオマーカーの活用が期待されている。医薬品の研究開発の各ステージにおけるバイオマーカーの活用について、図 1.5 に示した。医薬品の基礎研究の段階では、病態を反映するバイオマーカーが医薬品候補化合物の有効性（薬効）の検出や予測に活用される。また、毒性を検出するバイオマーカーも活用される。臨床試験の段階になると、有効性や毒性を判断するためのバイオマーカーの他、有効性が期待できる患者を選抜するためのバイオマーカー、薬効の早期判定のための代替バイオマーカーなど、多様なマーカーが利用される。

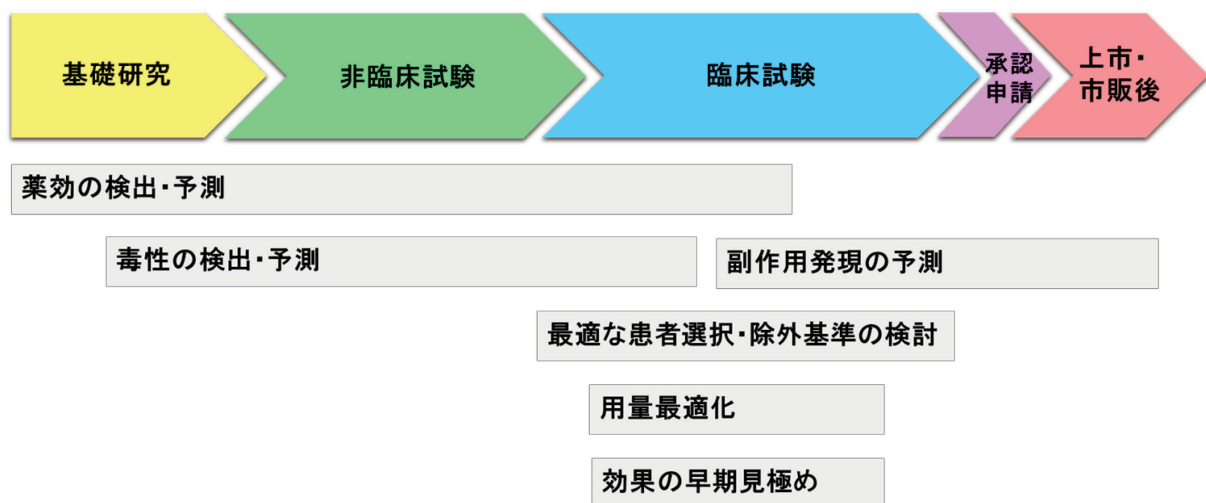


図 1.5 医薬品の研究開発におけるバイオマーカーの活用

### 1.3 バイオマーカー探索におけるメタボロミクスの活用

#### 1.3.1 メタボロミクスの特徴

バイオマーカーの探索においては、生体内の分子全体の変動を探索し、網羅的に生体分子をプロファイリングするオミクス技術が汎用されている[15]。代表的なオミクス技術とその解析対象を図 1.6 に示す。生体内では、生命活動の維持のため、あるいは環境変化や外部刺激に適応するため、遺伝子からメッセンジャーRNA (mRNA) を転写してタンパク質を合成しており、タンパク質の相互作用の働きやそれによって生成する代謝物によって生体の恒

常性が維持されている。ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスはそれぞれ生体内の DNA、mRNA、タンパク質を対象とする。メタボロミクスは、オミクスの中でも比較的新しい研究領域であり、生体内の代謝物の種類や濃度を網羅的に解析することで生命現象や生体内のメカニズムを調べる手法である[15][16]。代謝物は酵素やチャネルタンパク質の作用や非酵素的化学反応などによってその生合成や分布、分解が制御されているため、生命活動を直接的に反映すると考えられている[16]。

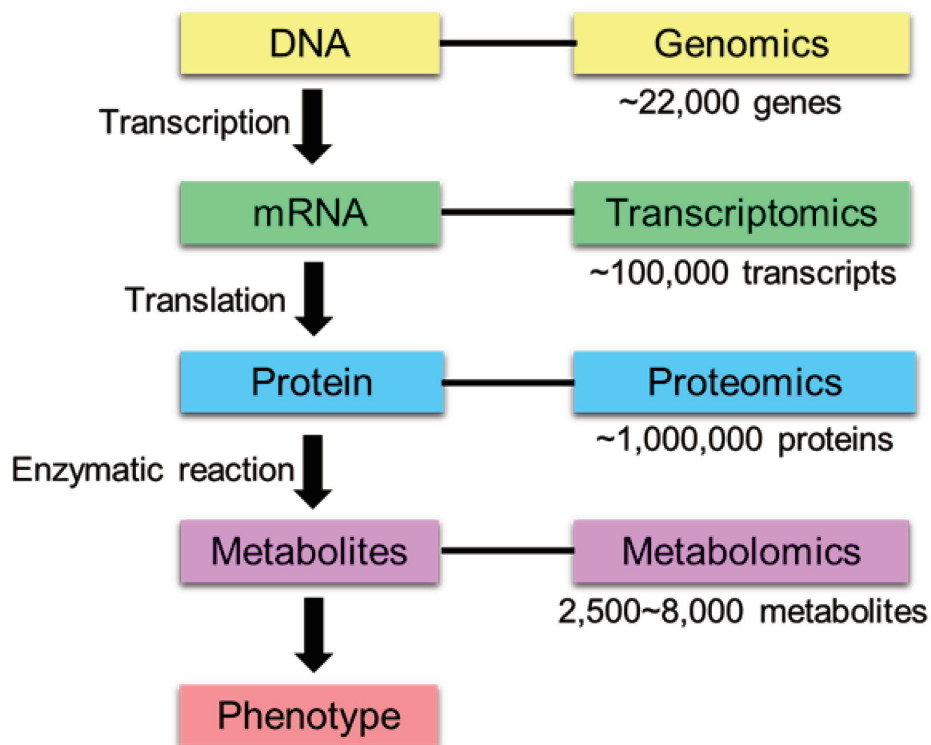


図 1.6 オミクス技術とその解析対象

メタボロミクスの主な利点としては、以下の点がある[17][18]。

1. 代謝物はゲノム情報の最終的表現であるフェノタイプ（表現型）の発現に直結することから、フェノタイプの変化と関連する分子を同定しやすい。
2. 他のオミクスに比べ解析対象となる物質数が少ない。
3. 代謝物は遺伝子やタンパク質とは異なり動物種特異性が少ないため、動物で見出したバイオマーカー候補をヒトに応用できる可能性がある。

メタボロミクスの解析対象となる生体内の代謝物はメタボロームと称され、アミノ酸、アミン、有機酸、核酸、糖類、脂質などが含まれる（図 1.7）。



グナル伝達経路で重要な役割を果たしており、遺伝子発現や細胞内のタンパク質のターンオーバー、栄養代謝、及び酸化ストレスに対する防御機能の調節なども担っている[19]。

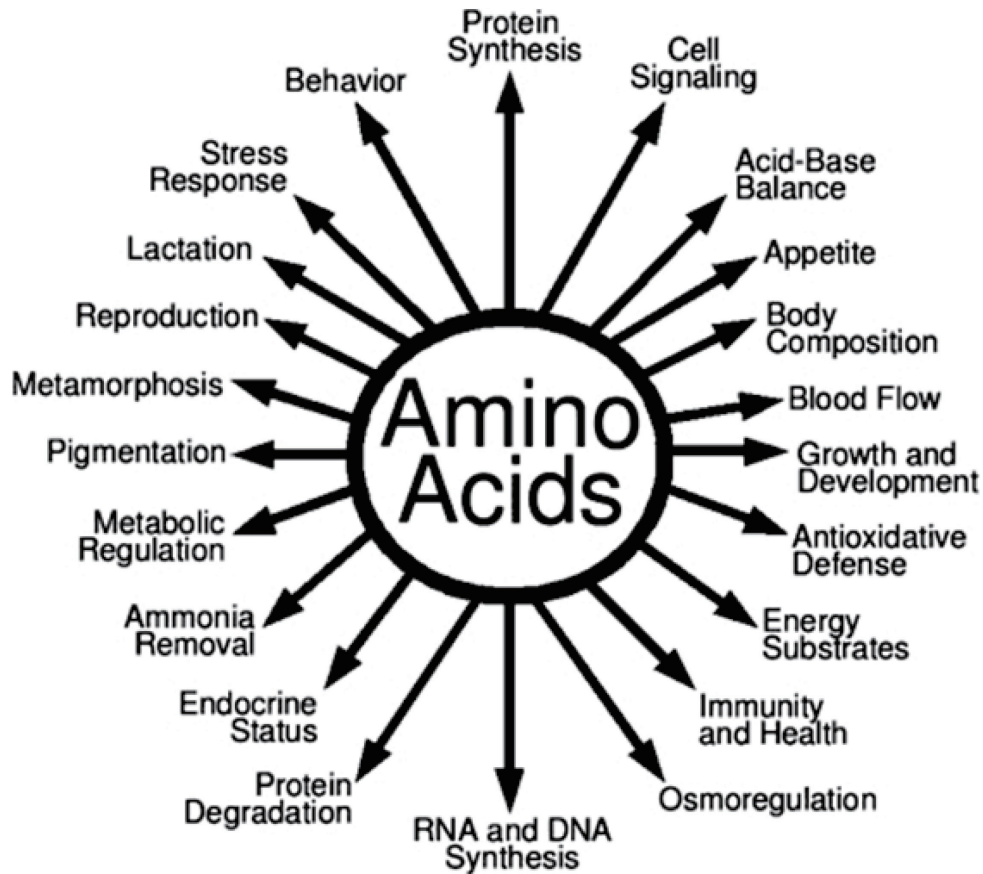


図 1.8 アミノ酸の機能  
(文献[19]の Figure 1 より引用)

解糖系やクエン酸回路、ペントースリン酸経路などの代謝物は、中心代謝経路を構成してエネルギー産生と代謝を担う[20]。解糖系では、グルコースのリン酸化で生成したグルコース 6 リン酸が複数の生化学反応を経由してピルビン酸へと変換され、その過程で ATP (adenosine triphosphate) が産生する。クエン酸回路は、解糖系に続く細胞内グルコース代謝を担う。クエン酸回路では、解糖系の最終産物であるピルビン酸の誘導体すなわちアセチル CoA により生化学反応（酸化還元反応）が開始され、NADH (nicotinamide adenine dinucleotide)、FADH<sub>2</sub> (flavin adenine dinucleotide)、GTP (guanosine triphosphate) といった高エネルギー分子が産生される。ペントースリン酸経路では解糖系と同様グルコース 6 リン酸から反応が開始され、NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)、ペントース、ヌクレオチド合成

の前駆体分子であるリボース-5-リン酸が産生される。また、これらの中心代謝経路の代謝物は、アミノ酸やヌクレオチド、脂質などの生合成や分解の代謝経路とも連携している（図 1.9）。

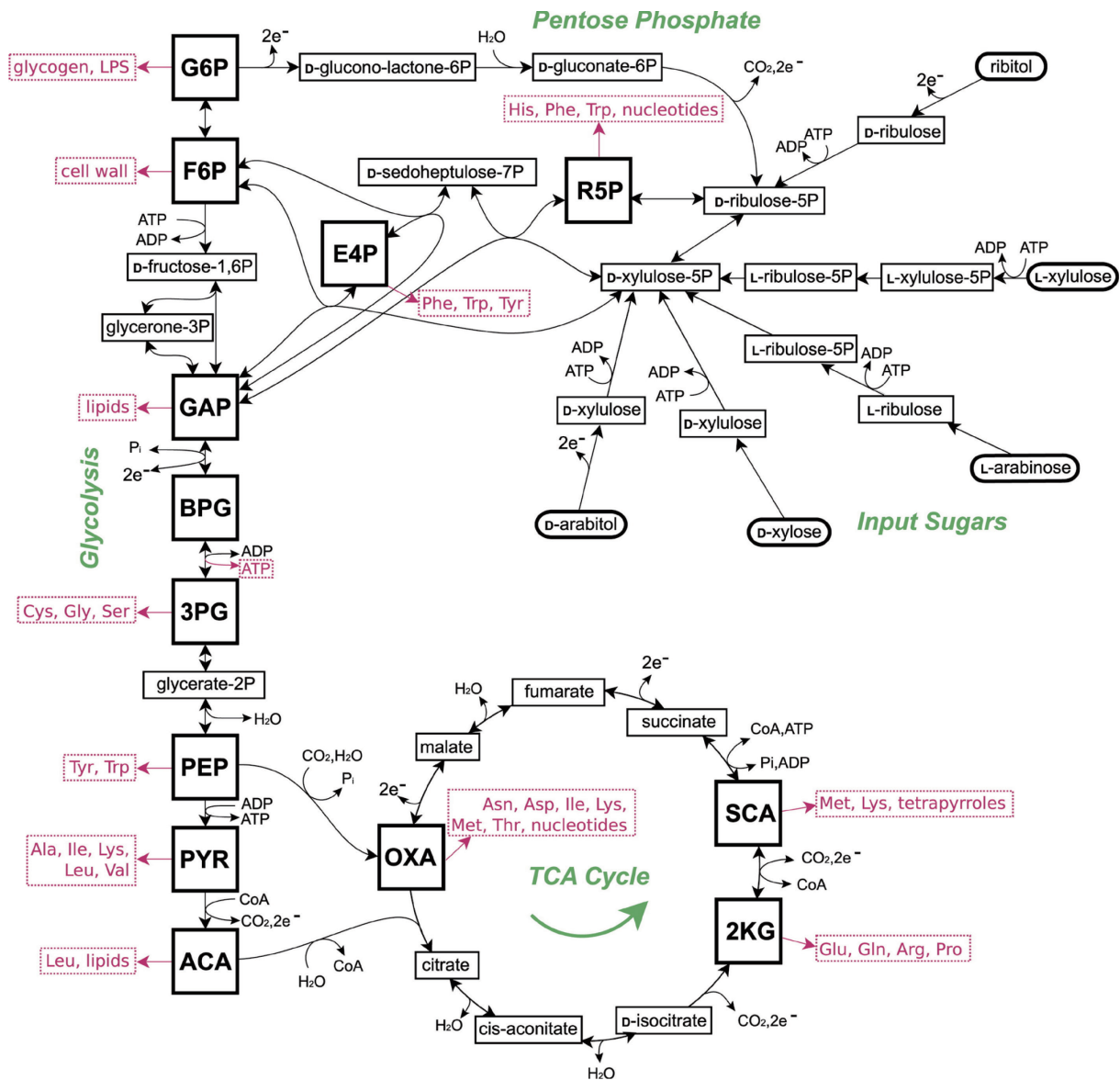


図 1.9 中心代謝経路

(文献[20]の Figure 2 より引用)

解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸経路は中心代謝経路を構成する。太線の四角で囲まれた代謝物は解糖系での ATP 産生に不可欠である： glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), ribose-5-phosphate (R5P), erythrose-4-phosphate (E4P), glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), glycerate-3P (3PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR), acetyl-CoA (ACA), 2-ketoglutarate (2KG), succinyl-CoA (SCA), oxaloacetate (OXA), glycerate-1,3P (BPG)。

脂質は細胞膜の主要な構成成分であるとともに、エネルギー貯蔵やシグナル伝達においても重要な役割を担っている。生体内の脂質は基本骨格となる脂肪酸の組み合わせにより多様性を有する[21][22]。代表的な脂質の分類を図 1.10 に示した。代謝物の中でも特に脂質 (lipid) を解析対象とするメタボロミクスは、リピドミクスと称される。

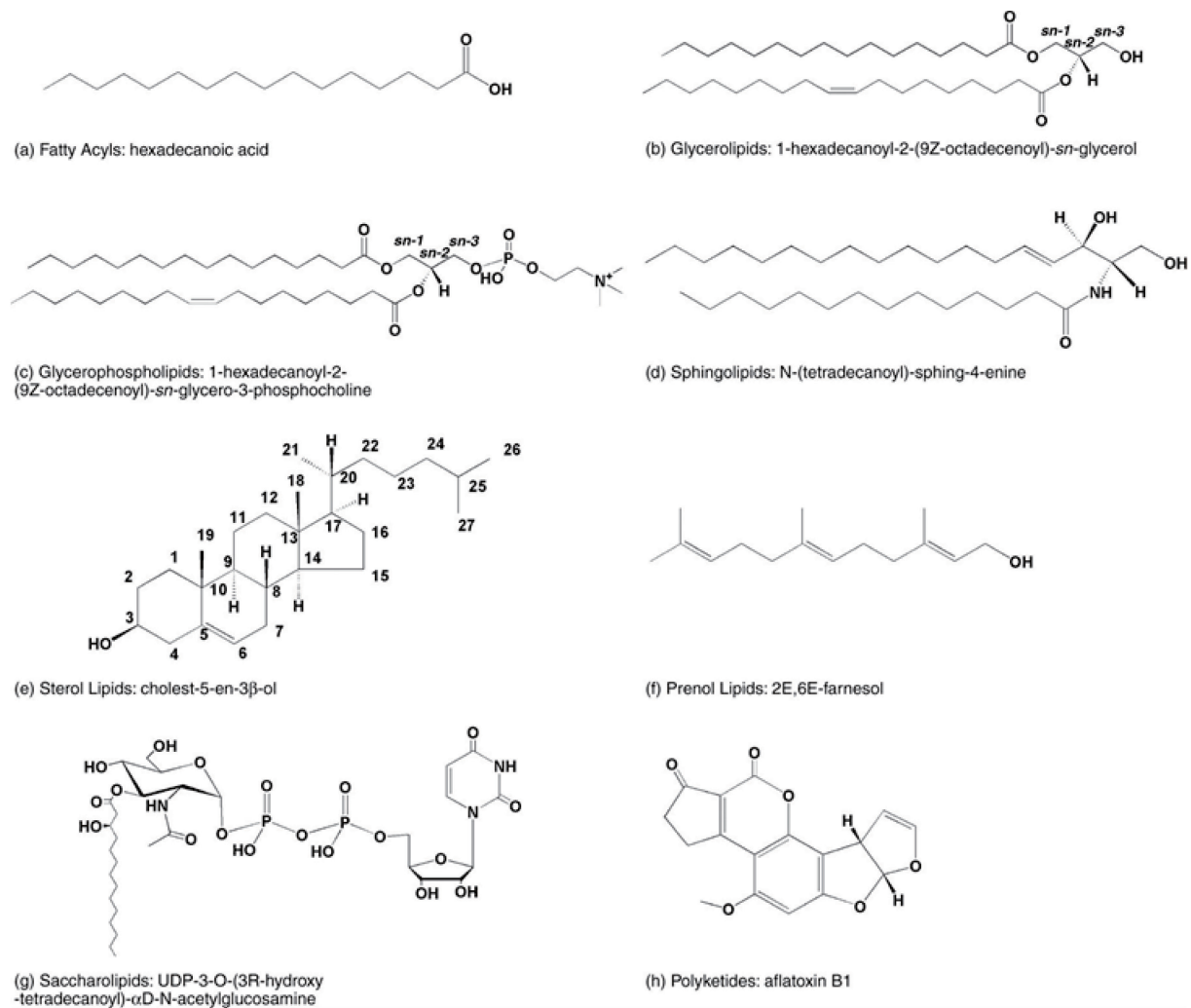


図 1.10 代表的な脂質の分類とその例

(文献[21]の Figure 1 より引用)

脂質はその構造により、主に 8 つのカテゴリーに分類される: (a) 脂肪アシル (fatty acyls)、(b) グリセロ脂質 (glycerolipids)、(c) グリセロリン脂質 (glycerophospholipids)、(d) スフィンゴ脂質 (sphingolipids)、(e) ステロール脂質 (sterol lipids)、(f) プレノール脂質 (prenol lipids)、(g) 糖脂質 (saccharolipids)、(h) ポリケチド (polyketides)



生体内の代謝物とタンパク質の相互作用も、生体の恒常性（ホメオスタシス）の維持に重要な役割を担っている。ATP、acetyl-CoA や S-adenosyl methionine (SAM) はタンパク質の翻訳後修飾、すなわちリン酸化、アセチル化及びメチル化といった共有結合修飾によってタンパク質の機能や活性に影響する。脂肪酸やホルモン等の代謝物もタンパク質と相互作用し、その機能を調整する[16]。

メタボロミクスは、医学、植物、微生物、環境、食品など様々な研究分野で活用されている。医学分野では、疾患の発症や進行の分子メカニズムの解明、疾患の診断バイオマーカーの探索、創薬ターゲットの同定、医薬品開発のための薬効や副作用を予測するバイオマーカー探索などへの活用が進んでいる[23][24][25]。メタボロミクスの手法により見出されたバイオマーカーの例としては、大うつ病の診断バイオマーカー[26]、結腸直腸がんの早期発見が可能なバイオマーカー[27]、複数の肝疾患を識別可能なバイオマーカー[28]、急性虚血性脳卒中の予後予測マーカー[29]などがある（表 1.3）。

表 1.3 メタボロミクスにより見出されたバイオマーカーの例

バイオマーカー	使用目的	参考文献
Phosphoethanolamine	大うつ病の診断	[26]
8 種の代謝物パネル: pyruvic acid glycolic acid tryptophan palmitoleic acid fumaric acid ornithine lysine 3-hydroxyisovaleric acid	結腸直腸がんの早期発見	[27]
$\gamma$ -Glutamyl dipeptides	複数の肝疾患の識別診断 (薬剤性肝炎、持続性 B 型肝炎、慢性 B 型肝炎、持続性 C 型肝炎、慢性 C 型肝炎、C 型肝炎硬変、C 型肝炎細胞がん、単純性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患)	[28]
Trimethylamine N-oxide	急性虚血性脳卒中の予後予測	[29]

### 1.3.2 メタボロミクス研究の流れ

メタボロミクス研究は、1) 試料採取、2) 試料前処理、3) 試料分析、4) データ解析の4つのステップで構成される。メタボロミクス研究の典型的なワークフローを図 1.11 に示す。

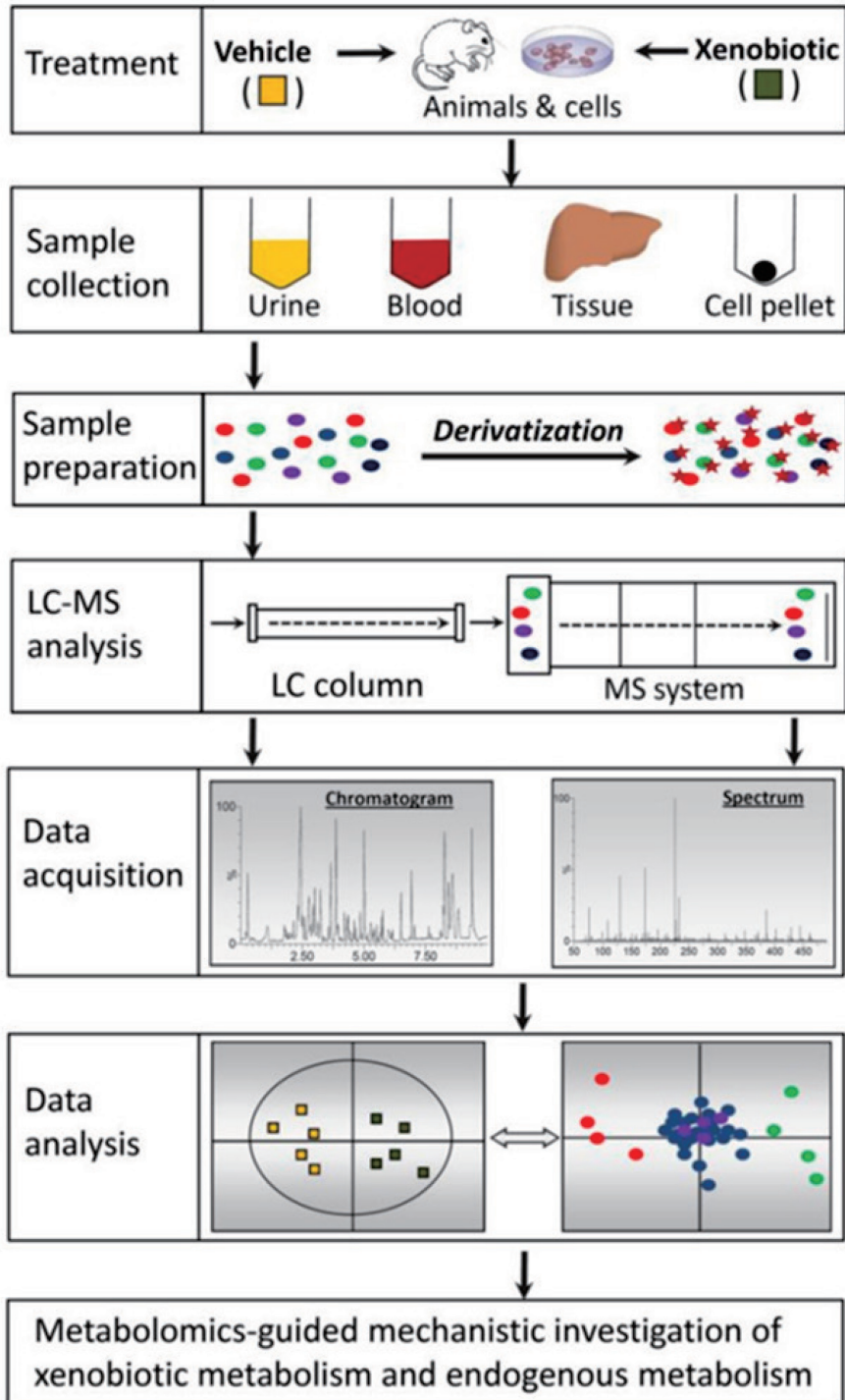


図 1.11 メタボロミクスのワークフロー

(文献[30]の Figure 1 を引用)

## 1) 試料採取

メタボロミクスでは、動物やヒトの生体試料や培養細胞など様々な試料が用いられる。血液や血漿、尿などは臨床現場でも比較的容易に採取可能であることからバイオマーカー測定用の試料として汎用されている。他に、液性の試料として脳脊髄液や唾液、涙液、汗なども用いられる。また、疾患の病変部位の代謝物の変動は病態をダイレクトに反映することが期待されるため、病変部位の組織が研究対象となることもある。試料採取の際は、研究の目的に応じて経時的な試料採取や、投薬処置を行う。

## 2) 試料前処理

生体試料中には物理化学的性質の異なる多数の代謝物が存在し、分析の障壁となる夾雑物も多く含まれる。そのため、夾雑物の除去と、分析対象の代謝物を選択的に抽出・分取することを目的として試料の前処理を実施する。前処理の際は、使用する生体試料の種類や、分析対象の代謝物の水溶性や脂溶性、極性などに応じて最適な抽出方法を選択する。生体試料として組織を用いる場合には、代謝物の抽出の前に組織破碎と均質化を行う。代謝物の抽出法としては、有機溶媒（エタノール、メタノール、アセトニトリル、アセトン、クロロホルム等）を用いてタンパク質の除去や水溶性成分と脂溶性成分の分離を行う方法が一般的である。汎用される **Bligh-Dyer** 法ではクロロホルムと水、メタノールを用い、高極性の水溶性成分は水に、脂質はクロロホルムに溶ける性質を利用して両者を分離する。このほか、固相抽出や限外濾過なども代表的な前処理法である。また、検出感度の向上のための誘導体化処理もしばしば適用される。

## 3) 試料分析

各種分析機器を用いて、試料中の代謝物の一斉分析を行う。代謝物の物理化学的性質は多様であるため、網羅性を高めるために複数の分析手法を用いることもある。メタボロミクスで使用される分析手法については、1.3.3.項で詳述する。

## 4) データ解析

得られた分析データから各代謝物のピークを同定する。各代謝物の分析データを用いて、単変量解析や多変量解析、代謝パスウェイ解析などを実施する。単変量解析では、**t** 検定や **ANOVA** などの手法により、各代謝物の変量を評価する。多変量解析では、主成分分析 (**principal component analysis: PCA**)

がよく用いられる。主成分分析では、多次元データにおいてデータ全体のばらつきが最大となる方向を見つけ、元の情報をできるだけ損なわずに縮約する。これを2次元もしくは3次元のデータ散布図にプロットして視覚化することにより、代謝物プロファイルの主要な傾向を把握することができ、データの解釈が容易になる。代謝パスウェイ解析では、検出された代謝物を代謝パスウェイに帰属し、変動している代謝パスウェイを同定する。これらの解析により、変動する代謝物及び代謝パスウェイが明らかとなり、生化学的意義の考察が可能となる。

メタボロミクス研究には、ターゲットメタボロミクスとノンターゲットメタボロミクスがあり、両者は目的に応じて使い分けられている[16]。ターゲットメタボロミクスでは、解析する代謝物をある程度特定して分析する。一方、ノンターゲットメタボロミクスでは、分析する代謝物を特定しない。アミノ酸やクエン酸回路の代謝物など、ターゲットとなる分析代謝物・代謝パスウェイがあらかじめ絞られている場合には、測定対象に最適化した分析法により高い定量性や検出感度が期待できるターゲットメタボロミクスが適する。一方で、ノンターゲットメタボロミクスを適用した場合には未知の代謝物まで解析対象が広がり、新たな知見が得られる可能性が期待できる。近年では分析技術の進歩により、ターゲットメタボロミクスの手法を用いながらも幅広い代謝物・代謝経路をカバーするワイドターゲットメタボロミクスも広く用いられている。

### 1.3.3 メタボロミクスで使用される分析手法

メタボロミクスでは数多くの代謝物を一斉に、網羅的に分析する技術が必要となる。メタボロミクス研究では様々な分析機器が使用されており、近年のメタボロミクス研究の進展には分析機器の技術革新とその性能の向上が大きく寄与している。メタボロミクスで用いられる主な分析手法としては、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR) 法と質量分析 (mass spectrometry: MS) 法がある[18][30]。

NMR 法では、生体分子を含む測定試料を強力な磁場の中に置き、外部からラジオ波を照射する。この際、分子中の原子核は化学結合の様式等の化学的環境に応じて特定の波長の電磁波を吸収する（共鳴現象）。この共鳴現象を観測することにより、分子の構造や量を分析することができる。NMR 法では試料の非侵襲的な測定が可能であるため、生体試料を生きたまま計測で

きる点や、装置の安定性が高くスペクトルの再現性が高い点などの利点がある[31]。一方で、検出感度は NMR 法に比べ質量分析法のほうが上回る。

質量分析法では、対象分子を正または負に帯電した荷電粒子（イオン）に変え、それらを真空中で加速し、電場や磁場の中を移動させる。電場や磁場の中において、イオンはその質量と電荷数によって移動速度に差が出る。このイオンの移動速度の違いを利用し、質量電荷比 ( $m/z$ ) によってイオンを分離・検出する[32]。質量分析装置 (mass spectrometer: MS) の構成を図 1.12 に示す。

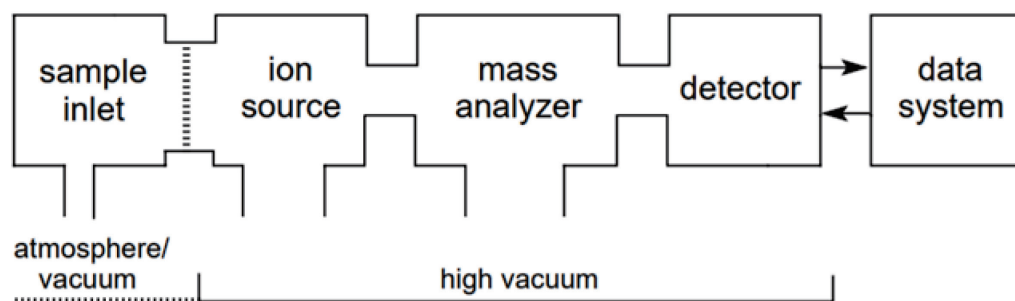


図 1.12 質量分析装置の構成

(文献[32]の Figure 1.1 を引用)

測定試料はまずイオンソースに導入され、イオン化される。生成したイオンは、電場によって加速されて質量分析部に送られ、高真空下で磁場や電場の作用を受けながら、質量電荷比 ( $m/z$ ) によって分離される。分離されたイオンは検出器部分で検出され、データ処理システムによって解析される。

質量分析を用いたメタボロミクスでは、測定対象の代謝物のイオン化が極めて重要なステップであり、代謝物の検出感度に大きく寄与する。質量分析で用いられる主なイオン化法について、表 1.4 に示す。エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray Ionization: ESI) は、中～高極性の幅広い測定対象に適用できるため、メタボロミクス研究では広く利用されている。このほか、電子イオン化法 (electron ionization: EI) や大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization: APCI) もしばしば利用される[33]。

表 1.4 質量分析におけるイオン化法

イオン化法	原理
化学イオン化法 (chemical ionization)	イオン化部内で試薬ガスをイオン化し、生成した反応イオンが試料分子と衝突することにより試料分子のイオンが生成する。
電子イオン化法 (electron ionization, EI)	高真空化で、加熱気化した分子に電子を衝突させることで分子イオンを生成させる。分子イオンの断片化により生成するフラグメントイオンピークから、分子構造に関する情報が得られる。
エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI)	試料を極性溶媒に溶解し、高電圧を印加したキャピラリーを通過させる。キャピラリーから噴霧された液滴から溶媒分子が蒸発し、帯電した液滴からイオンが生成する。
大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)	試料溶液を高電圧下で加熱しながら噴霧する。試料中の溶媒分子がコロナ放電でイオン化された後に試料分子と反応することによって、試料分子のイオンが生成する。
マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)	レーザー光を吸収するマトリックスに試料を溶解・固化し、真空下でレーザーを照射することでイオン化する。

質量分析装置は近年性能が劇的に向上しており、高感度かつハイスループットの分析手段としてメタボロミクス研究で汎用されている。MSを使用する際には、分子量の近い代謝物を分離するため、クロマトグラフィー技術が併せて用いられる。主なクロマトグラフィー技術として、液体クロマトグラフィー (liquid chromatography: LC)、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography: GC)、キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis: CE) がある。

GC-MS 分析では、GC 装置のカラム中にガスを通し、気化した試料を導入する。試料中の各成分は、カラム内面の固定相との相互作用の強弱に起因する移動速度の差によって分離され、その後 MS でイオン化された後に検出される。GC-MS は高い分離能を有し、低分子の有機酸や芳香族化合物などの揮

発性代謝物の分析に適している。GC-MS 分析では、試料の気化が必須である。アミノ酸や糖、有機酸などを分析する際は、気化しやすいよう分析前に誘導体化処理が必要になる[34]。

LC-MS 分析では、液体の試料もしくは液化した試料を分析する。シリカゲルなどの表面を修飾した充填剤（固定相）を詰めたカラムに試料を注入し、移動相を通液すると、分析試料中の各成分はカラムの固定相と移動相の相互作用の差によって分離される。その後、各成分は MS でイオン化された後に検出される。LC-MS では不揮発性代謝物質を含む代謝物を分析可能である。また、使用するカラムや移動相の工夫により高極性物質から非極性物質まで幅広い物質を分析できる[35]。

CE-MS 分析では、電解質溶液を充填したキャピラリーの両端に高電圧をかけることで電場を作り、分析試料中の成分の移動速度の違いで分離を行い、その後 MS で検出する。生体内の代謝物のうち、解糖系やクエン酸回路などの中心代謝経路の代謝物や、アミノ酸、核酸生合成経路の代謝物の多くはリン酸基、カルボキシル基、アミノ基などを有するイオン性化合物である。CE-MS を用いた生体試料の分析では、CE 内のキャピラリーの両端に高電圧をかけることで陽イオン性物質は陰極方向に、陰イオン性物質は陽極方向に移動する。そのため、キャピラリーの出口を陰極にすることで陽イオン性物質を、陽極にすることで陰イオン性物質をそれぞれ MS に導入して分析することができる[36]。メタボロミクスで利用される主な分析方法の特徴を表 1.5 に示した。

表 1.5 メタボロミクスで利用される主な分析方法

分析方法	長所	短所
NMR	装置の安定性が高い 再現性に優れる 生体試料を抽出せずに測定できる 定量性に優れる 分析コストが低い	感度が低い 必要な試料量が多い 分析できる成分数が少ない
GC-MS	分離能が高い 再現性が高い	誘導体化処理が必要 熱に不安定な物質は分析できない
LC-MS	感度が高い 分析が容易 幅広い成分の分析が可能	試料の前処理が必要 分析コストが高い
CE-MS	高極性・イオン性代謝物の分析に適する 分離能が高い 定量性に優れる	試料の前処理が必要 安定した分析には高度な技術が必要

メタボロミクスの対象となる内因性代謝物にはアミノ酸や糖、アミン、ヌクレオチド、脂質、脂肪酸などがあり、その物理化学的性質は多岐に渡る。そのため、単一の分析法で全ての代謝物を一度に分析することは困難である。その解決策として、複数の測定原理もしくは複数の分析法を組み合わせることにより、分析代謝物の網羅性を向上させることが期待できる[37][38]。



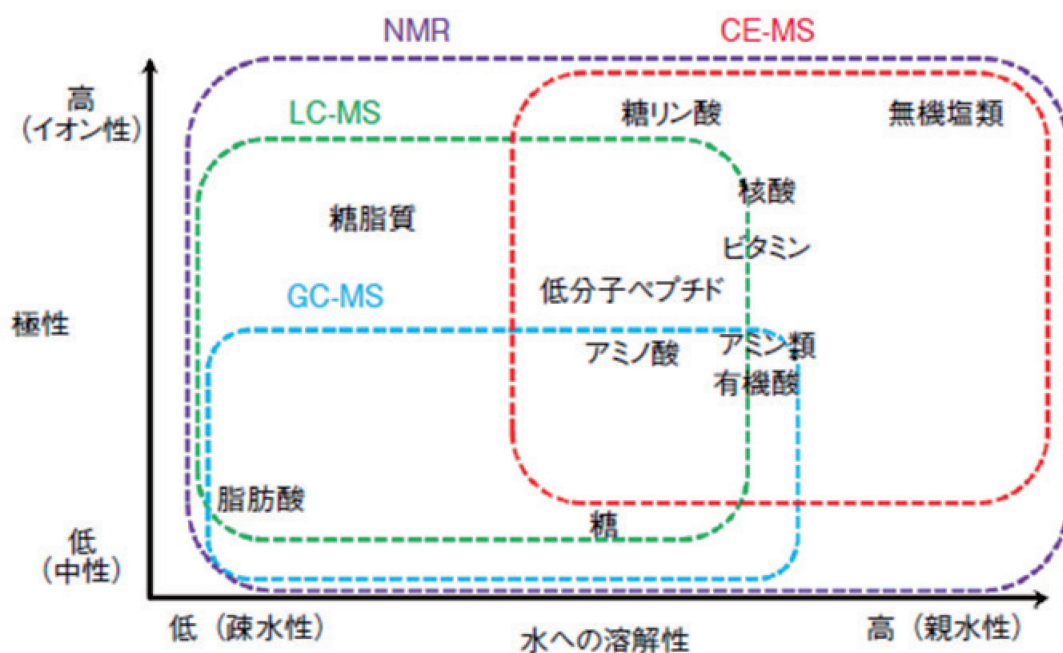


図 1.13 メタボロミクスで用いられる分析手法と代謝物質の特性  
(文献[38]の図を引用)

#### 1.4 医薬品の研究開発における疾患モデル動物の役割

医薬品の基礎研究段階において、ヒトに類似した病態を呈する疾患モデル動物は有用なツールであり、病態の解明や医薬品候補化合物の有効性の評価などに用いられている。疾患モデル動物は、自然発症型のモデル動物と人工的に作成されたモデル動物に大別され、後者は遺伝子改変や外科的手術、薬剤処置、病原菌・微生物の接種などにより作製される。

遺伝子組換え技術の進歩により、特にマウスなどの小型動物では様々な疾患モデル動物が創製されている。この中には、特定の遺伝子をゲノムに組み込ませるトランスジェニック動物、特定の遺伝子を欠失させるノックアウト動物、特定の遺伝子に付加置換するノックイン動物などがある。

医薬品の基礎研究では、細胞ベースのアッセイも汎用されるが、様々な生理学的条件や、組織や臓器における異なる細胞間の複雑な相互作用を再現することは難しい。そのため、複雑な生体の仕組みを有する疾患モデル動物が医薬品の基礎研究に果たす役割は大きい[39][40]。医薬品開発に使用されてきた疾患モデル動物の例を表 1.6 に示す。

表 1.6 医薬品開発に使用されてきた疾患モデル動物

(文献[40]より引用)

分類	疾患モデル動物または試験
中枢神経系疾患治療薬	
抗うつ薬	学習性無力モデル (マウス)、 嗅球摘出うつモデル (ラット)、 強制水泳試験 (マウス、ラット)、 尾懸垂試験 (マウス)
抗不安薬	Vogel 型コンフリクト試験 (ラット)、 社会的相互作用試験 (ラット)
認知症治療薬	Tg2576 マウス、 APP & PS1 double transgenic (PSAPP) マウス、 メタンフェタミン/クロルジアゼポキシド 誘発自発運動亢進モデル (マウス)、 コリン作動性神経核破壊モデル (マウス)、 薬物誘発記憶障害モデル (マウス)、 脳局所破壊*モデル (ラット) * : 脳内のコリン作動性神経を薬物等で破壊して作 製した機能障害
統合失調症治療薬	新生児期 phencyclidine (PCP) 投与マウス、 NR1 ノックダウンマウス、 G タンパク質共役型受容体 (SREB2) ノック アウトマウス、 SREB2 過剰発現マウス、 薬剤誘発カタレプシー (ラット)
抗パーキンソン病薬	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 誘発パーキンソン病モデル (マウ ス)
抗てんかん薬	痙攣モデル (マウス)、 扁桃核あるいは海馬キンドリングモデル (ラ ット)
神経細胞保護薬	脊髄挫滅による脊髄損傷モデル (ラット)、 坐骨神経挫滅あるいは切断による神経傷害 モデル (ラット)

分類	疾患モデル動物または試験
脳梗塞治療薬	中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデル（マウス）
循環器系・眼疾患治療薬	
降圧薬	心不全モデル（イヌ）、 慢性腎疾患モデル（マウス、ラット）
末梢動脈疾患治療薬	大腿動脈結紮モデル（ラット）
輸液	抗利尿ホルモン不適切分泌症候群（SIADH） モデル（ラット）
緑内障・高眼圧症治療薬	高眼圧モデル（ウサギ）、 牛眼ウサギ（遺伝性高眼圧ウサギ）
消化器系・呼吸器系疾患治療薬	
抗潰瘍薬	酢酸潰瘍モデル（ラット）、 虚血－再血流誘発胃粘膜損傷モデル（ラット）、 デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデル（ラット）
経口補水液	ヒマシ油誘発下痢モデル（ラット）
抗喘息薬	卵白アルブミン（OVA）誘発喘息モデル（モルモット）
泌尿器系疾患治療薬	
排尿障害治療薬	脳梗塞モデル（ラット）、 尿道部分閉塞排尿障害モデル（ラット）、 前立腺肥大モデル（ラット）
腎炎治療薬	IgA 腎症の自然発症モデル動物（HIGA マウス）
過活動膀胱治療薬	膀胱頸狭窄誘発蓄尿障害モデル（ラット）
代謝性疾患治療薬	
脂質代謝改善薬	db/db マウス、 KKAy マウス、 Zucker fatty ラット、 Goto- Kakizaki (GK) ラット、 apoE 欠損自然発症高脂血症マウス
糖尿病治療薬	GK ラット、

分類	疾患モデル動物または試験
	食餌誘発性肥満 (DIO) マウス、 non - obese diabetic (NOD) マウス、 db/db マウス、 ob/ob マウス、 Zucker Diabetic fatty (ZDF) ラット
抗肥満薬	db/db マウス、 ob/ob マウス
免疫・炎症性疾患治療薬・抗腫瘍薬	
鎮痛薬	炎症・関節炎モデル (ラット)
保湿薬	乾燥皮膚モデル (ウサギ、マウス、ヘアレスマウス、ヘアレスラット)
免疫抑制薬	心臓移植モデル (ラット)、 腎臓移植モデル (イヌ、サル)、 mdr1a 欠損マウス、 同種腎移植モデル (ラット)、 慢性関節リウマチ自然発症 (SKG) マウス、 D1CC マウス (関節リウマチ様病変モデル)
子宮内膜症治療薬	子宮内膜症モデル (ラット)
抗腫瘍薬	担がんモデル (マウス)、 化学発がんモデル (マウス、ラット)、 がん転移モデル (転移先臓器移植モデル) (マウス)、 ヒトがん細胞株皮下移植担がんモデル (ヌードマウス)
止血薬	抗がん薬投与による血小板減少症モデル (ラット)

疾患モデル動物の医薬品研究開発における役割を図 1.14 に示した。疾患モデル動物を用いた試験成績は疾患発症メカニズムの解明や新薬候補物質の薬効評価、既存薬・先行競合薬との差別化、臨床における投与量設定、臨床での Proof of Concept 試験 (臨床開発の比較的早期に実施される、新薬候補物質のある程度の有効性と安全性を確認する試験) の成功確率の推定において大きな役割を果たしている。

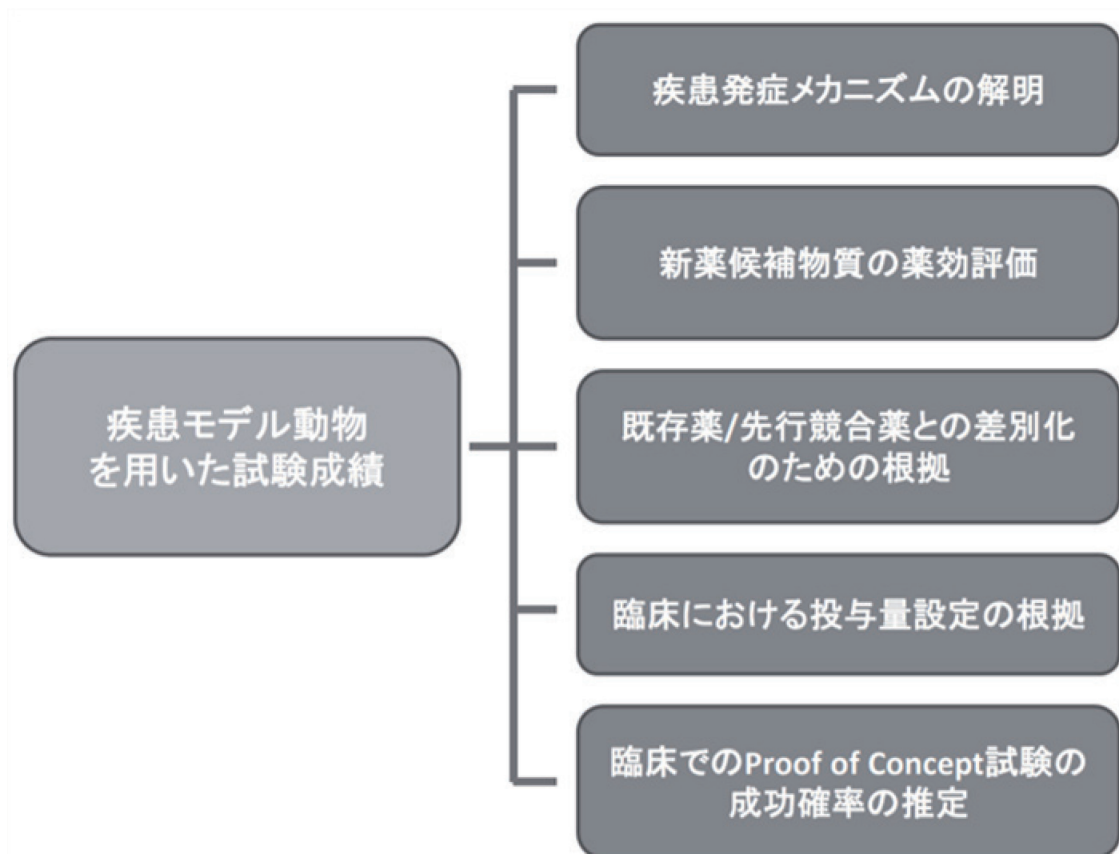


図 1.14 疾患モデル動物の医薬品研究開発における役割  
 (文献[40]より引用)

疾患モデル動物にメタボロミクスを適用することにより、病態の発症や進行のメカニズムを分子レベルで解明することや、創薬ターゲットの同定が可能になると考えられる。また、疾患モデル動物の病態を反映する内因性代謝物は、医薬品候補化合物の有効性評価においてバイオマーカーとして活用することができ、医薬品候補化合物のスクリーニングの効率化が期待される。さらに、医薬品候補化合物を投与した疾患モデル動物のメタボロミクスにより、化合物の作用点や作用メカニズムの解析も可能である。代謝物は種差が小さいことから、疾患モデル動物で見出したバイオマーカーを臨床試験でも活用できる可能性があり、医薬品候補化合物の臨床での有効性の早期判断による開発期間の短縮が期待できる。

### 1.5 本研究の目的

医薬品の研究開発において、医薬品候補化合物の臨床での有効性を非臨床試験段階や早期臨床段階で見極めることは極めて難しく、医薬品の開発中止

の要因となっている。バイオマーカーは、医薬品の研究開発を加速させ、成功確度を高めることにより医療の発展に貢献できる可能性があり、メタボロミクスはバイオマーカー探索に有用な技術である。本研究では、メタボロミクスの創薬での活用可能性について検討するため、医薬品の研究で汎用される疾患モデル動物にメタボロミクスを適用し、病態における代謝変化の解明や新規創薬ターゲットの取得、前臨床・臨床段階で使用可能なバイオマーカーの探索などを試みた。本論文の第2章では、LC-MS/MSを用いて幅広い物性の代謝物を網羅的に分析するためのメタボロミクス分析プラットフォームの構築について述べた。次に、この分析プラットフォームを用いた胆汁うっ滞モデルラットのメタボロミクスで見いだされた胆汁うっ滞下の代謝プロファイルの変化及びその生化学的意義について論じた。第3章では、異なる測定原理を持つ複数のメタボロミクス分析プラットフォームを組み合わせることで分析対象代謝物の網羅性を向上させ、ハンチントン病モデルマウスのメタボロミクスに適用した研究について述べた。この研究で得られた血漿と脳における多数の代謝変化、病態の分子メカニズム、病態進行と代謝プロファイルの変化の関係、新規治療の可能性について論じた。第4章では本論文を総括し、疾患モデル動物のメタボロミクスの医薬品研究開発への活用可能性について論じるとともに、今後の展望について述べた。

## 1.6 参考文献

1. Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(3):191-200. doi:10.1038/nrd3681
2. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA.* 2020;323(9):844-853. doi:10.1001/jama.2020.1166
3. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016;47:20-33. doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012
4. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(1):40-51. doi:10.1038/nbt.2786
5. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical

- industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):203-214. doi:10.1038/nrd3078
6. Hwang TJ, Carpenter D, Lauffenburger JC, Wang B, Franklin JM, Kesselheim AS. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. *JAMA Intern Med*. 2016;176(12):1826-1833. doi:10.1001/jamainternmed.2016.6008
  7. Harrison RK. Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(12):817-818. doi:10.1038/nrd.2016.184
  8. Dowden H, Munro J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(7):495-496. doi:10.1038/d41573-019-00074-z
  9. Kaitin KI, Milne CP. A dearth of new meds. *Sci Am*. 2011;305(2):16. doi:10.1038/scientificamerican0811-16
  10. Kaitin KI. The Quest to Develop New Medicines to Treat Alzheimer's Disease: Present Trends and Future Prospects. *Clin Ther*. 2015;37(8):1618-1621. doi:10.1016/j.clinthera.2015.07.004
  11. Food and Drug Administration. Critical Path Opportunities List. 2016. <http://wayback.archive-it.org/7993/20180125035449/https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/UCM077258.pdf>
  12. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
  13. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113(19):2335-2362. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570
  14. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST ( Biomarkers , EndpointS , and other Tools ) Resource. 2016
  15. Schnackenberg LK, Beger RD. Metabolomic biomarkers: their role in the critical path. *Drug Discov Today Technol*. 2007;4(1):13-16. doi:10.1016/j.ddtec.2007.10.012
  16. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*.

- 2011;40(1):387-426. doi:10.1039/b906712b
17. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-1189. doi:10.1080/004982599238047
  18. Richards SE, Dumas ME, Fonville JM, Ebbel, TMD, Holmes E, Nicholson JK. Intra- and inter-omic fusion of metabolic profiling data in a systems biology framework. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2010;104:121–131. doi:10.1016/j.chemolab.2010.07.006.
  19. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv Nutr.* 2010;1(1):31-37. doi:10.3945/an.110.1008
  20. Noor E, Eden E, Milo R, Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol Cell.* 2010;39(5):809-820. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.031
  21. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2005;46(5):839-861. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200
  22. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811(11):637-647. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009
  23. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol.* 2011;85(1):5-17. doi:10.1007/s00204-010-0609-6
  24. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:653-683. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715
  25. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, Brennan L, Wishart DS, Oresic M, Hankemeier T, Broadhurst DI, Lane AN, Suhre K, Kastenmüller G, Sumner SJ, Thiele I, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics enables precision medicine: "A White Paper, Community Perspective". *Metabolomics.* 2016;12(10):149. doi:10.1007/s11306-016-1094-6



26. Kawamura N, Shinoda K, Sato H, Sasaki K, Suzuki M, Yamaki K, Fujimori T, Yamamoto H, Osei-Hyiaman D, Ohashi Y. Plasma metabolome analysis of patients with major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018;72(5):349-361. doi:10.1111/pcn.12638
27. Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, Unno Y, Sakai T, Okamoto K, Yamada Y, Sudo K, Yamaji T, Saito Y, Kanemitsu Y, Okita NT, Saito H, Tsugane S, Azuma T, Ojima N, Yoshida M. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget*. 2017;8(10):17115-17126. doi:10.18632/oncotarget.15081
28. Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M. Serum metabolomics reveals  $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol*. 2011;55(4):896-905. doi:10.1016/j.jhep.2011.01.031
29. Zhai Q, Wang X, Chen C, Tang Y, Wang Y, Tian J, Zhao Y, Liu X. Prognostic Value of Plasma Trimethylamine N-Oxide Levels in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2019;39(8):1201-1206. doi:10.1007/s10571-019-00714-3
30. Chen C, Kim S. LC-MS-based Metabolomics of Xenobiotic-induced Toxicities. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;4:e201301008. doi:10.5936/csbj.201301008
31. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;43:34-40. doi:10.1016/j.copbio.2016.08.001
32. Gross JH, *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag, Berlin, 2004
33. Gowda GA, Djukovic D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol*. 2014;1198:3-12. doi:10.1007/978-1-4939-1258-2\_1
34. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol*. 2016;114:30.4.1-30.4.32. doi:10.1002/0471142727.mb3004s114
35. Becker S, Kortz L, Helmschrodt C, Thiery J, Ceglarek U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol*

- Biomed Life Sci.* 2012;883-884:68-75. doi:10.1016/j.jchromb.2011.10.018
36. Hirayama, A.; Wakayama, M.; Soga, T. Metabolome analysis based on capillary electrophoresis-mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2014;61:215-222. doi:10.1016/j.trac.2014.05.005
37. Yang Q, Zhang AH, Miao JH, Sun H, Han Y, Yan GL, Wu FF, Wang XJ. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Adv.* 2019;9:37245–37257. doi:10.1039/C9RA06697G
38. 福田 真嗣. メタボロミクス. アレルギー. 2016;65:75–76.  
<https://doi.org/10.15036/arerugi.65.75>
39. Reza Khorramizadeh M, Saadat F. Animal models for human disease. *Animal Biotechnology.* 2020;153-171. doi:10.1016/B978-0-12-811710-1.00008-2
40. 新井 裕幸, 倍味 繁, 田原 俊介, 伊藤 晋介, 中原 夕子, 守本 亘孝, 小林 伸好, 板野 泰弘, 山口 高史, 丹羽 一夫, 関 二郎, 志垣 隆通, 中村 和司. 疾患モデル動物の意義と役割. *日薬理誌.* 2014;144:126–132. doi:10.1254/fpj.144.126

## 第2章 胆汁うっ滞モデルラットのメタボロミクス

### 2.1 序論

胆汁うっ滞は、肝臓での胆汁の生成や分泌に関わるプロセスの障害により、胆汁物質が肝臓内にうっ滞し、体内に胆汁中の成分が蓄積した病態を指す。肝細胞または胆管細胞における胆汁分泌輸送の低下に起因するものを肝内胆汁うっ滞、胆汁排泄経路の遮断に起因するものを肝外胆汁うっ滞と呼ぶ。胆汁うっ滞では血中ビリルビンの上昇や、それに伴う黄疸が特徴的な症状である。胆汁うっ滞の原因は多岐に渡るが、そのひとつとして肝細胞や胆管上皮細胞、腸管上皮細胞に存在し、胆汁の生成や分泌および再吸収に関わる膜輸送系（トランスポーター）の発現と機能の障害がある[1][2][3]。胆汁の形成、分泌および再吸収に関与するトランスポーターを図 2.1 に示す。

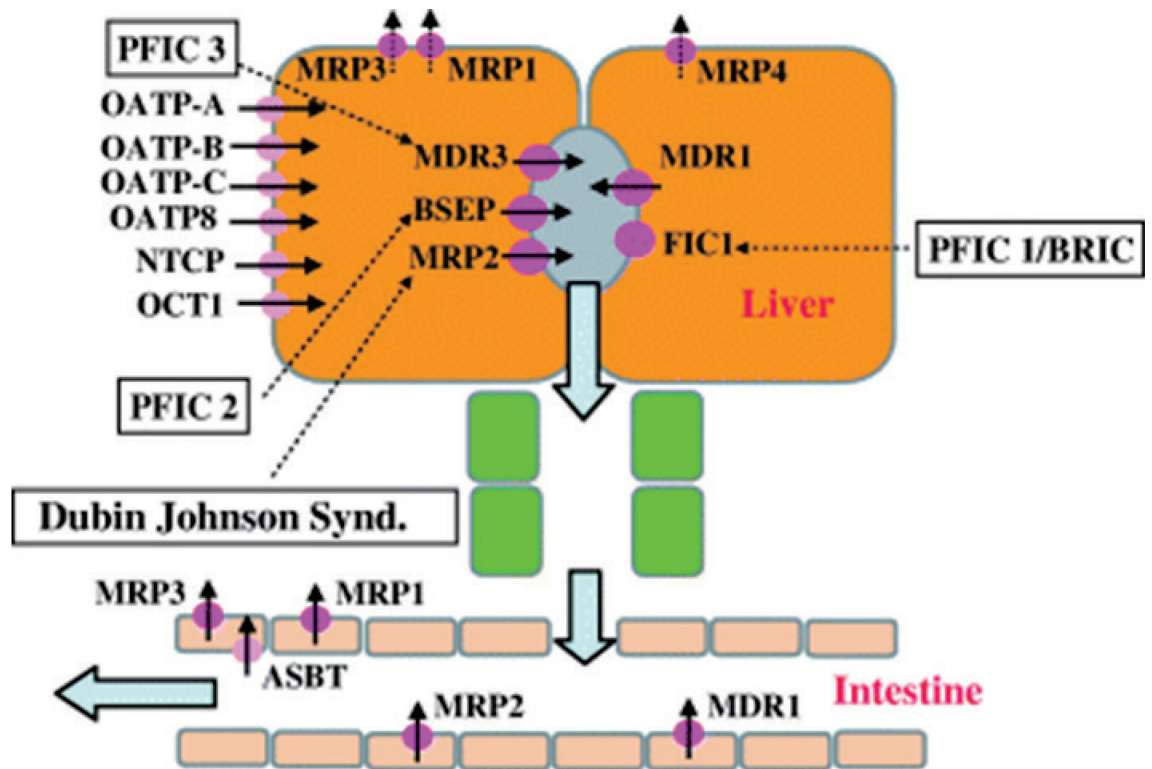


図 2.1 胆汁の形成、分泌および再吸収に関与するトランスポーター  
(文献[3]中の Figure 1 引用)

細胞の基底外側膜に発現するトランスポーター (NTCP, OATP, OCT1) は、胆汁酸塩、有機アニオンやカチオン、非荷電の分子の肝臓への取り込みに関与する。胆管膜に発現するトランスポーターは、胆汁酸塩、ホスファチジルコリン、コレステロール、グルタチオンの胆汁分泌や、薬物や毒素の排泄に

関与しており、胆汁酸塩排出ポンプの BSEP、ホスファチジルコリントランスポーターの MDR3、多剤有機アニオントランスポーターの multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)、多剤トランスポーターMDR1 などがある。MRP3 と MRP4 は、肝細胞から胆汁酸コンジュゲートを輸送する。FIC1 は、トランスポーターではないがホスファチジルセリンなどのアミノリン脂質を細胞膜の外側から内側へ移動させる機能を担っている。回腸の末端では、頂端のナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター (ASBT) が胆汁酸の再吸収を担う。これらのタンパク質の遺伝子変異は胆汁うっ滞の原因となる。例として、FIC1 の変異は進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (progressive familial intrahepatic cholestasis: PFIC) タイプ 1、BSEP の変異は PFIC タイプ 2、MDR3 の変異は PFIC タイプ 3、MRP2 は Dubin-Johnson 症候群、ASBT は胆汁酸吸収不良による胆汁うっ滞の原因であることが報告されている。

Dubin-Johnson 症候群は、胆汁の分泌障害により引き起こされる肝内胆汁うっ滞の一種であり、血中の抱合型ビリルビン濃度の上昇やそれに伴う黄疸症状、肝臓の細胞内への色素沈着を呈する[4][5]。Dubin-Johnson 症候群の発症率は男性と女性で同程度である。通常は青年期または若年成人期に発症するが、稀に新生児期や乳幼児期で発症することもある。本疾患は全ての人種で報告されているが、スペイン、フランス、ドイツ系のユダヤ人での頻度が比較的高い。ユダヤ人における発生率は約 1/3000 と報告されている[6][7]。

Dubin-Johnson 症候群は常染色体劣性遺伝の疾患であり、ATP 依存性のトランスポーターMRP2 をコードする adenosine triphosphate-binding cassette subfamily C member 2 (ABCC2) 遺伝子の異常により引き起こされる[8]。MRP2 は肝臓の毛細胆管膜上に発現し、抱合型ビリルビンの肝細胞からの胆汁中への排泄を担う。そのため、MRP2 欠損時にはビリルビンの胆汁排泄が低下する。さらに、肝細胞の血管側に発現している MRP3 の発現が誘導され、抱合型ビリルビンが代償的に血中へと輸送されることで高ビリルビン血症が引き起こされる。体内にビリルビンが蓄積すると、皮膚の黄変などの黄疸症状が現れる[9][10]。

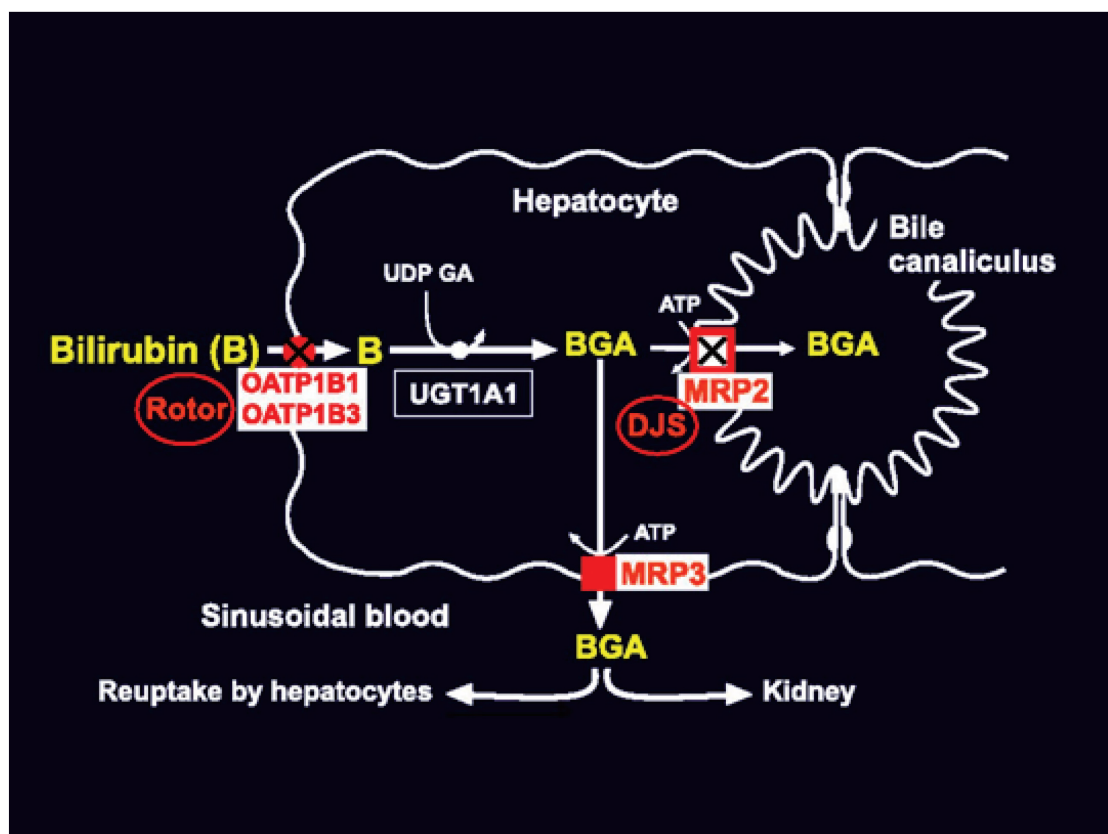


図 2.2 Dubin-Johnson 症候群における肝細胞へのビリルビン輸送、抱合、胆管排出

(文献[9]中の Figure 1 引用)

Dubin-Johnson 症候群 (DJS) のように MRP2 が欠損している場合、ビリルビンの胆管への排泄は低下し、肝細胞の側底膜に発現する MRP3 によって代償的に血中へ排出される。これにより高ビリルビン血症が引き起こされる。

EHBR (Eisai Hyperbilirubinuria Rat) は、実験動物として医薬品の研究で汎用される Sprague-Dawley (SD) ラットを起源とする胆汁うっ滞モデル動物であり、Dubin-Johnson 症候群のモデルとして知られている。EHBR においても MRP2 の欠損による胆汁排泄機構の障害が認められ、生後 1 日目より黄疸症状、高ビリルビン血症及び高ビリルビン尿症を呈し、生涯にわたり持続する。また、EHBR の肝臓では Dubin-Johnson 症候群と同様に色素顆粒が散在性に認められる[11][12]。EHBR は MRP2 の基質となる有機アニオン性薬物の体内動態の研究にも活用されている[13]。

生物は生体内及び生体外の変化に応答し、それらの影響を緩和することで生体の恒常性（ホメオスタシス）を維持している。EHBR では胆汁排泄機構

の障害に伴い、本来胆汁排泄されるべき物質の多くが血中に漏出することから、ホメオスタシス維持のために生体内の代謝が変化している可能性が考えられる。第1章で述べたように、メタボロミクスは生体内の代謝変化を捉えることで病態の解明に有用である。本研究では、LC-MS/MSを用いて幅広い物性の代謝物を網羅的に分析するためのメタボロミクス分析プラットフォームの構築を試みた。さらに、構築した分析系を用いてEHBRとSDラットの血漿と尿のメタボロミクスを実施し、EHBRにおける内因性代謝物の変化を検討した。

## 2.2 実験材料及び方法

### 2.2.1 生体試料採取

EHBRとSDラット（雌、8週齢、各群n=3）の血漿及び尿試料は、日本エスエルシー株式会社（浜松、日本）で採取された。生体試料採取の際、ラットを1個体ずつ代謝ケージに移し、尿を採取する24時間の間は、水のみを与えた。尿採取の間、尿は氷冷下で保存し、採取完了後は-80°Cで保存した。尿採取後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より血液を採取した。血液採取の際、採血管に血液凝固防止剤としてヘパリンを添加した。採取後の血液を速やかに遠心分離して血漿を採取し、測定まで-80°Cで保存した。なお、上記の実験方法は日本エスエルシー株式会社の動物実験委員会にて承認されたものである。

### 2.2.2 試薬

1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine [PC (12:0/12:0)] は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。Gamma-glutamyl-valinyl-glycine ( $\gamma$ -EVG) は大日本住友製薬で合成した。D<sub>4</sub>-taurocholic acid は Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) から購入した。その他の試薬は特級品もしくは高速液体クロマトグラフ用を用いた。精製水は水道水を Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) で精製することにより調製した。測定用標準品の溶液は、精製水、メタノールあるいはジメチルスルホキシドに測定用標準品を溶解することにより調製した。

### 2.2.3 メタボロミクス分析法の確立

分析対象の内因性物質として 535 成分を選択し、物理化学的性質に応じて 4 つの異なるグループ A~D (表 2.1) に分類し、それぞれのグループに対して LC-MS/MS 分析系 A~D を構築した。測定機器として、ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) 及び 4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を使用した。機器の制御及び測定データの解析には Analyst 1.5 software (AB Sciex) を使用した。分析系の構築にあたっては、各分析対象 (リン脂質とリゾリン脂質を除く) の標準品を用いて LC-MS/MS 分析条件を最適化した。リン脂質とリゾリン脂質については、PC (12:0/12:0) の標品を用いて最適化した LC-MS/MS 分析条件をベースに、各脂質分子の質量数と構造に基づいて Multiple Reaction Monitoring (MRM) 条件を設定することにより分析条件を構築した。

表 2.1 メタボロミクス分析系の概要

グループ /分析系	分析対象	代謝物数	イオンモード	測定時間 (分)	内標準物質
A	アミノ酸、 有機酸	210	Positive	35	γ-EVG
B	ヌクレオチド、 有機酸、糖	121	Negative	30	γ-EVG
C	リン脂質、 リゾリン脂質、 脂肪酸	190	Negative	30	PC (12:0/12:0)
D	胆汁酸	14	Negative	20	D <sub>4</sub> - taurocholic acid

#### 分析系 A

グループ A の代謝物の分離には Acquity UPLC HSS C18 カラム (2.1 × 150 mm, particle size 1.8 μm, Waters) を用いた。カラム温度は 40°C に設定し、サンプル注入量は 2 μL とした。移動相には、0.1%ヘプタフルオロ酪酸水溶液 (A 液) 及び 0.1%ヘプタフルオロ酪酸メタノール溶液 (B 液) を用いた。下表に流速及びグラジエント条件を示す。

表 2.2 流速及びグラジエント条件 (分析系 A)

Time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)	流速 (mL/min)
Initial	95	5	0.2
3.0	95	5	0.2
20	60	40	0.2
27	10	90	0.2
30	10	90	0.2
30.1	95	5	0.4
35	95	5	0.4

### 分析系 B

グループ B の代謝物の分離には Acquity UPLC BEH phenyl カラム (2.1 × 150 mm, particle size 1.7 μm, Waters) を用いた。カラム温度は 40°C に設定し、サンプル注入量は 2 μL とした。移動相には、0.1%酢酸水溶液 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液) を用いた。下表に流速及びグラジエント条件を示す。

表 2.3 流速及びグラジエント条件 (分析系 B)

Time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)	流速 (mL/min)
Initial	100	0	0.2
25	10	90	0.2
27	10	90	0.2
27.1	100	0	0.2
35	100	0	0.4

### 分析系 C

グループ C の代謝物の分離には Acquity UPLC HSS C18 カラム (2.1 × 150 mm, particle size 1.8 μm, Waters) を用いた。カラム温度は 40°C に設定し、サンプル注入量は 2 μL とした。移動相には、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) 及びアセトン/アセトニトリル/テトラヒドロフラン (1/1/1, vol/vol/vol) (B 液) を用いた。下表に流速及びグラジエント条件を示す。



表 2.4 流速及びグラジエント条件 (分析系 C)

Time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)	流速 (mL/min)
Initial	50	50	0.3
5	35	65	0.3
10	35	65	0.3
20	10	90	0.3
25	0	100	0.3
30	0	100	0.3
30.1	50	50	0.3
40	50	50	0.3

#### 分析系 D

グループ D の代謝物の分離には SunFire C18 カラム (2.1×150 mm, particle size 3.5 µm, Waters) を用いた。カラム温度は 40°C に設定し、サンプル注入量は 5 µL とした。移動相には、40 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液) を用いた。下表に流速及びグラジエント条件を示す。

表 2.5 流速及びグラジエント条件 (分析系 D)

Time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)	流速 (mL/min)
Initial	80	20	0.3
17	0	100	0.3
17.1	80	20	0.3
20	80	20	0.3

#### MS/MS 分析条件

MS/MS 測定にはエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモード (分析系 A) 及びネガティブイオンモード (分析系 B、C 及び D) を適用した。イオンスプレー電圧は 5000 V (ポジティブイオンモード) または -4500 V (ネガティブイオンモード) とし、イオンソース温度は 500°C、イオンソースガス 1 は 50 psi、イオンソースガス 2 は 80 psi、カーテンガスは 20 psi に設定した。その他の測定条件 [プロダクトイオン、declustering potential (DP)、entrance potential (EP)、collision energy (CE)、collision cell exit potential

(CXP)] は測定対象ごとに最適化したものを用いた。

#### 2.2.4 血漿及び尿試料の測定

血漿及び尿試料 (50  $\mu$ L) と内標準物質 [PC (12:0/12:0) (1  $\mu$ g/mL) 及び  $\gamma$ -EVG (10  $\mu$ g/mL)] のメタノール溶液 (200  $\mu$ L) を混合した。16,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離した後、上清 200  $\mu$ L を精製水 100  $\mu$ L 及びクロロホルム 200  $\mu$ L と混合し、遠心分離した。上層 100  $\mu$ L を等量の 0.1%ヘプタフルオロ酪酸水溶液あるいは 0.1%酢酸水溶液と混合し、それぞれグループ A 分析用試料とグループ B 分析用試料とした。下層 50  $\mu$ L を 450  $\mu$ L と混合し、グループ C 分析用試料とした。

グループ D 分析用試料は固相抽出法を用いて調製した。血漿及び尿試料 (100  $\mu$ L) と 0.1 M リン酸緩衝液 (900  $\mu$ L) 、 D4-taurocholic acid のメタノール溶液 (1  $\mu$ g/mL) 10  $\mu$ L を混合した。固相抽出カートリッジ Oasis HLB cartridge (Waters) をメタノール (1 mL) 及び水 (1 mL) でコンディショニングし、上記の混合溶液をロードした。カートリッジを 30%メタノール (1 mL) で洗浄後、メタノール (1 mL) で溶出した。溶出液をエバポレーターを用いて室温下で乾固した後、アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウム (1/1, v/v) 100  $\mu$ L で再溶解したものをグループ D 分析用試料とした。

調製した分析用試料は、2.2.3 項で構築した分析条件を用いて測定した。

#### 2.2.5 データ解析

LC-MS/MS 分析により得られたイオンクロマトグラムから、各代謝物のプレカーサーイオン及びプロダクトイオンの m/z、ならびに保持時間の情報を用いて各代謝物のピークを同定した。次に、各代謝物のピーク面積を内標準物質のピーク面積で補正した。補正済みのピーク面積値のデータセットを解析ツールである MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) [14]に供し、以降の解析を実施した。生体内の代謝物はその分子ごとに存在量が大きく異なるため、まず各代謝物データの平均が 1 となるようにスケーリングを実施した。その後、EHBR 群と SD ラット群の代謝物プロファイル全体の傾向を知るために主成分分析 (PCA) を実施した。さらに、各代謝物レベルについて群間比較をするために Fold change analysis 及び Student's t-test を実施した。

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 EHBR と SD ラットの血漿及び尿中代謝物プロファイルの比較

LC-MS/MS 分析により血漿及び尿の各試料に含まれる代謝物のトータルイオンクロマトグラムを分析系 A~D のそれぞれについて取得した。一例として、LC-MS/MS 分析系 A により得られたグループ A の代謝物群のトータルイオンクロマトグラムを図に示す。

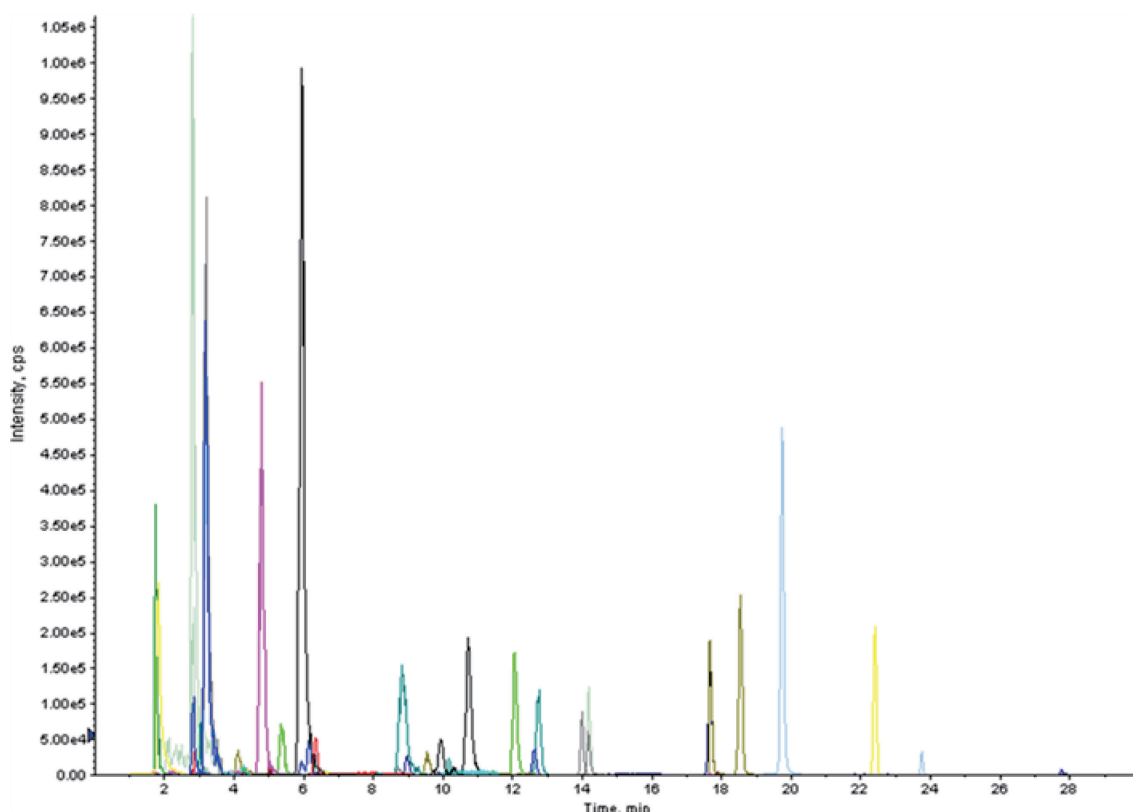
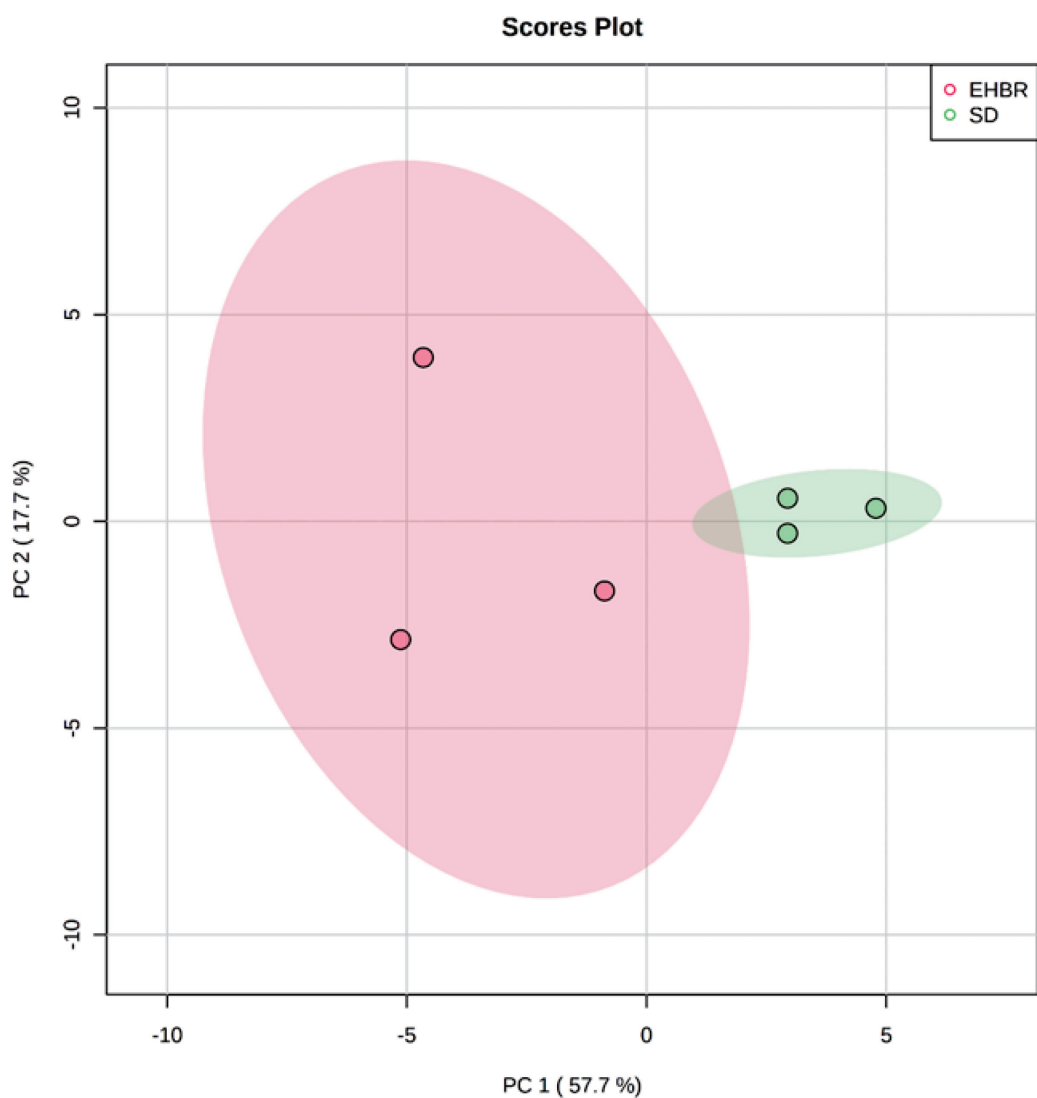


図 2.3 トータルイオンクロマトグラム(EHBR 血漿、グループ A の代謝物)

各代謝物のピークの同定は、各代謝物のプレカーサーイオン及びプロダクトイオンの  $m/z$ 、ならびに保持時間の情報を用いて行った。その結果、血漿では 287 の代謝物（グループ A：99 成分、グループ B：46 成分、グループ C：128 成分、グループ D：14 成分）が検出された。尿では 262 の代謝物（グループ A：118 成分、グループ B：67 成分、グループ C：66 成分、グループ D：11 成分）が検出された。

EHBR と SD ラットの代謝物プロファイル全体の傾向を知るため、血漿及び尿の代謝物データを用いて主成分分析を実施した。メタボロミクスで得られるデータは、個体ごとの各代謝物量から構成される多次元のデータである。

主成分分析では多次元からなる代謝物データを、できるだけ情報を維持しながら 2~3 次元に縮約する。これにより、試料間の代謝物プロファイルの違いを 2~3 次元のプロットとして視覚的に理解することを可能とする。まず、各サンプルの代謝物データ（補正済みピーク面積値）の分散が最大となる第一主成分軸（PC1 軸）、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる第二主成分軸（PC2 軸）をそれぞれ算出した。これらを 2 次元の図にプロットしたものを図 2.4 及び図 2.5 に示す。スコアプロット上の各ドットは EHBR 及び SD ラットの各個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はスコアプロット上の各軸にカッコ内の数値として示した。寄与率は PC1 及び PC2 が元の多次元データの情報をどれだけ反映できているかの目安となり、各主成分スコアの分散の和に対するそれぞれの主成分の分散の比として算出された。血漿、尿ともに第一主成分の寄与率が高く、第一主成分スコアと同様の傾向を示す代謝物質が多いことが示された。血漿及び尿のそれぞれで EHBR 群と SD ラット群は明確に分離されており、両群の代謝物プロファイルが異なることが示された。



**図 2.4 PCA スコアプロット (血漿)**

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが SD ラット、赤のドットが EHBR の個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 57.7% 及び 17.7% であった。

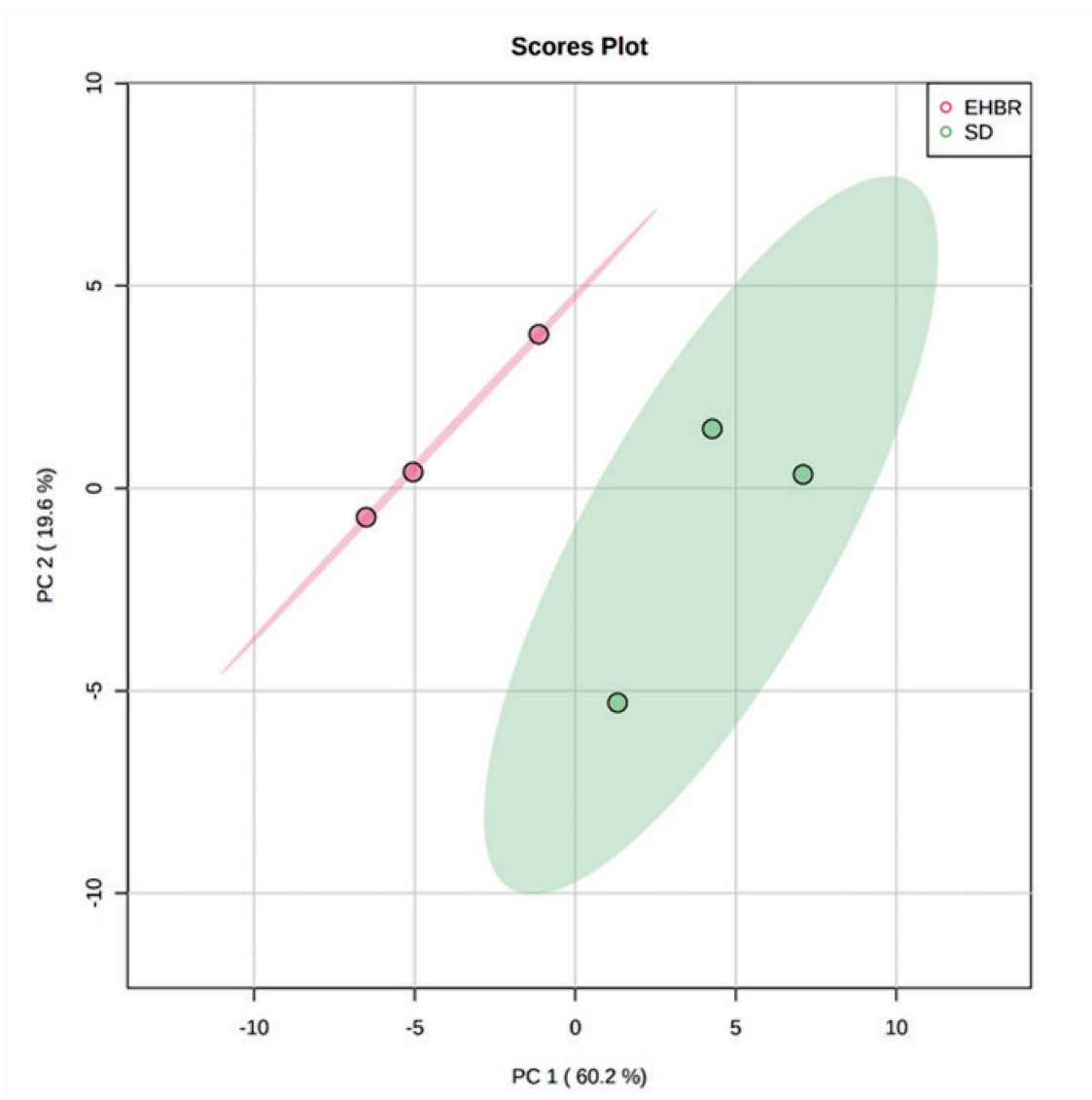


図 2.5 PCA スコアプロット (尿)

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが SD ラット、赤のドットが EHBR の個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 60.2% 及び 19.6% であった。

### 2.3.2 EHBR における代謝物レベルの変化

EHBR で SD ラットに比べて高値もしくは低値を示した代謝物 (胆汁酸を除く) を表 2.6 及び表 2.7 に示した。

表 2.6 血漿で EHBR と SD ラットの間に差が認められた代謝物

Metabolites	Fold change	p	FDR
Guanosine	3.88	0.00633	0.0914
L-PC-18:3	2.66	0.00454	0.0815
L-PC-20:4	2.41	0.00334	0.0738
L-PE-18:1	2.25	0.000991	0.0738
PC-18:3/16:0	2.17	0.0313	0.165
L-PE-18:2	2.09	0.00119	0.0738
PC-20:4/20:4	2.06	0.00869	0.0987
Glycolate	0.490	0.0847	0.264
Glutathione	0.469	0.0465	0.208
Ophthalmate	0.382	0.000193	0.0553

Fold change: IS 補正済みピーク面積値の平均値の比率 (EHBR/SD)、 p : t 検定における p 値、 FDR : false discovery rate

L-PC: lysophosphatidylcholine, L-PE: lysophosphatidylethanolamine,

PC: phosphatidylcholine

表 2.7 尿で EHBR と SD ラットの間に差が認められた代謝物

Metabolites	Fold change	p	FDR
Hypotaurine	8.84	0.0246	0.162
Taurine	4.83	0.0190	0.150
N-N-dimethylarginine	2.26	0.0487	0.220
Glycocholic acid	2.17	0.00124	0.0454
3-Methyl-histidine	0.493	0.000577	0.0342
1-7-Dimethylxanthine	0.491	0.0181	0.150
Adrenaline	0.478	0.0210	0.150
Carnosine	0.460	0.0378	0.204
Putrescine	0.456	0.0460	0.219
Trimethylamine N-oxide	0.450	0.0167	0.150
5-Hydroxyindoleacetate	0.413	0.0166	0.150

N-N-Dimethylglycine	0.401	0.0406	0.205
2'-3'-Cyclic GMP	0.389	0.0235	0.162
Hippurate	0.389	0.0287	0.180
1-Methylhistamine	0.386	0.0202	0.150
UMP	0.379	0.0576	0.236
Azetidine-2-carboxylate	0.371	0.00412	0.0815
Adenosine	0.364	0.00341	0.0794
Pantothenate	0.364	0.0202	0.150
D-Glucosaminic acid	0.361	0.0158	0.150
Pyridoxine	0.358	0.00597	0.0959
Cytosine	0.357	0.0277	0.178
N-acetyl-glutamate	0.345	0.0613	0.236
2-Aminophenol	0.342	0.0171	0.150
Arginine	0.340	0.0125	0.145
Mannitol	0.333	0.00243	0.0693
Spermine	0.330	0.0585	0.236
Aniline	0.329	0.00371	0.0794
L-Gulono-1,4-lactone	0.322	0.0163	0.150
Galactitol	0.313	0.000665	0.0342
Tryptamine	0.307	0.0167	0.150
Ornithine	0.292	0.00160	0.0512
Deoxyadenosine	0.274	0.00607	0.0959
Isoleucine	0.274	0.0122	0.145
4-8-Dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid	0.271	0.0430	0.212
2-Hydroxyhippurate	0.263	0.0209	0.150
Biotin	0.251	0.000428	0.0342
5-Methylcytosine	0.242	0.00293	0.0752
Thiamin	0.195	0.00933	0.126



Muramic acid	0.151	0.0000492	0.0126
--------------	-------	-----------	--------

Fold change: IS 補正済みピーク面積値の平均値の比率 (EHBR/SD) 、 p : t 検定における p 値、 FDR : false discovery rate

EHBR の血漿では複数のリン脂質の増加や glutathione の減少が認められた。血漿中リン脂質の増加と glutathione の減少は、他の胆汁うっ滞モデルのメタボロミクス研究でも報告されている。Yang らの検討では、マウスに alpha-naphthyl isothiocyanate (胆管上皮細胞の損傷により胆汁分泌を低下させる薬剤) を処置することで作成した胆汁うっ滞モデルにおいて、血漿中リン脂質の増加と glutathione の減少が検出されている[15]。リン脂質は正常時には胆汁から排泄されるが、胆汁うっ滞下ではこれらの胆汁排泄が停滞することで血漿中への排出が促進されたものと考えられる。Glutathione は抗酸化ストレス作用を有し、生体内の活性酸素種やフリーラジカルなどの有害物質の捕捉と解毒を担っている。EHBR における glutathione の減少は、胆汁うっ滞下で生じる酸化ストレスによる glutathione の枯渇を示唆するものである。

EHBR の尿では多数の代謝物が SD ラットと比べて増加あるいは減少していた。その中でも taurine 及び hypotaurine (図 2.6) は顕著に増加しており、SD ラットと比べてそれぞれ 4.8 倍及び 8.8 倍高値を示した。taurine とその前駆体の hypotaurine は、抗酸化作用及び抗アポトーシス作用を有する[16][17]。これらの分子は、細胞が障害を受けた後の回復過程において重要な役割を果たすと考えられており、ラットの肝虚血再灌流や肝部分切除による肝障害モデルにおいて増加することが報告されている[18][19]。また、臨床では尿中への taurine 排泄量が、腎移植後の遅発性移植片不全の発症リスクの低さと相関することも報告されている[20]。Taurine は医薬品としても臨床で使われており、高ビリルビン血症における肝機能の改善や、特定の薬物の投与が原因で起こる薬物性肝障害の治療に用いられている[21][22]。EHBR では、胆汁排泄の低下に伴い、毒性の強い内因性代謝物を含む有害物質の排泄が低下し、これら有害物質の全身曝露が増えると考えられる。EHBR における taurine と hypotaurine の増加は、胆汁うっ滞の病態下で細胞障害が生じていること、それに対する適応として細胞保護機能が亢進していることを示唆している。

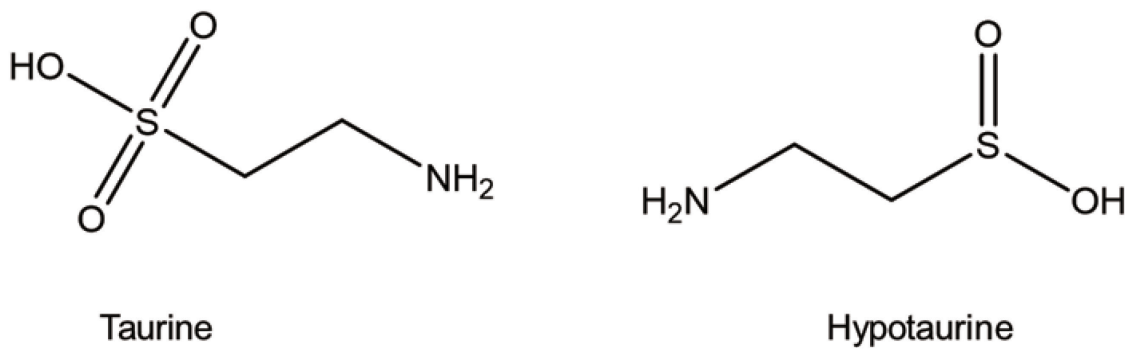


図 2.6 Taurine 及び hypotaurine

EHBR の尿では、putrescine 及び spermine、並びにこれらの前駆体である ornithine (図 2.7) の減少も認められた。ポリアミンである putrescine 及び spermine は核酸と相互作用することにより mRNA 合成やタンパク質合成を促進し、細胞増殖に不可欠な代謝物である[23]。また、ポリアミン代謝に関わる酵素の活性化がコレステロールからの胆汁酸合成を促進することが報告されている[24]。EHBR で認められたポリアミンの低下は、胆汁うっ滞下において胆汁酸生合成に対して抑制的な調節が機能していることを示唆している。

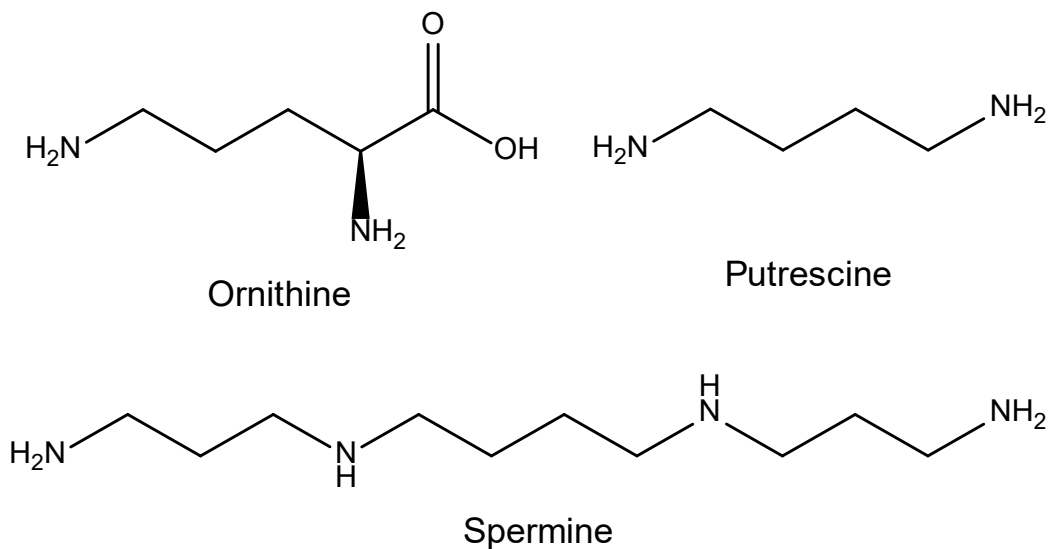


図 2.7 Ornithine、putrescine 及び spermine

EHBR における血漿及び尿の胆汁酸の変化を表 2.8、図 2.8 及び図 2.9 に示す。EHBR では血漿及び尿中の複数の胆汁酸が高値を示したが、その上昇幅は胆汁酸の種類によって顕著に異なっており、胆汁酸の構成が大きく変化

していることが明らかとなった。血漿中の ursodeoxycholic acid とそのタウリン抱合体 (tauroursodeoxycholic acid) 及びグリシン抱合体 (glycoursodeoxycholic acid) は EHBR では SD ラットの 20 倍以上高値を示した。

表 2.8 血漿及び尿の胆汁酸の変化

Metabolites	Plasma			Urine		
	Fold change	p	FDR	Fold change	p	FDR
Glycoursodeoxycholic acid	62.0	0.0614	0.234	-	-	-
Ursodeoxycholic acid	24.4	0.0736	0.251	22.1	0.248	0.562
Tauroursodeoxycholic acid	23.3	0.105	0.290	3.9	0.133	0.392
Deoxycholic acid	10.6	0.0697	0.247	22.1	0.215	0.532
Glycodeoxycholic acid	8.8	0.0309	0.165	-	-	-
Lithocholic acid	7.2	0.0567	0.223	14.8	0.169	0.457
Glycocholic acid	5.4	0.0388	0.186	2.2	<0.01	0.0454
Cholic acid	3.8	0.527	0.710	10.3	<0.01	0.0133
Taurocholic acid	3.1	0.219	0.425	2.0	0.0129	0.145
Taurolithocholic acid	2.8	0.160	0.352	0.6	0.147	0.427
Glycolithocholic acid	2.2	0.199	0.408	-	-	-
Glychenodeoxycholic acid	1.6	0.404	0.624	1.9	0.0732	0.265
Taurochenodeoxycholic acid	1.0	0.982	0.986	0.9	0.243	0.562
Chenodeoxycholic acid	0.820	0.840	0.932	2.00	0.0367	0.204

Fold change: IS 補正済みピーク面積値の平均値の比率 (EHBR/SD)、p : t 検定における p 値、FDR : false discovery rate、- : 未検出

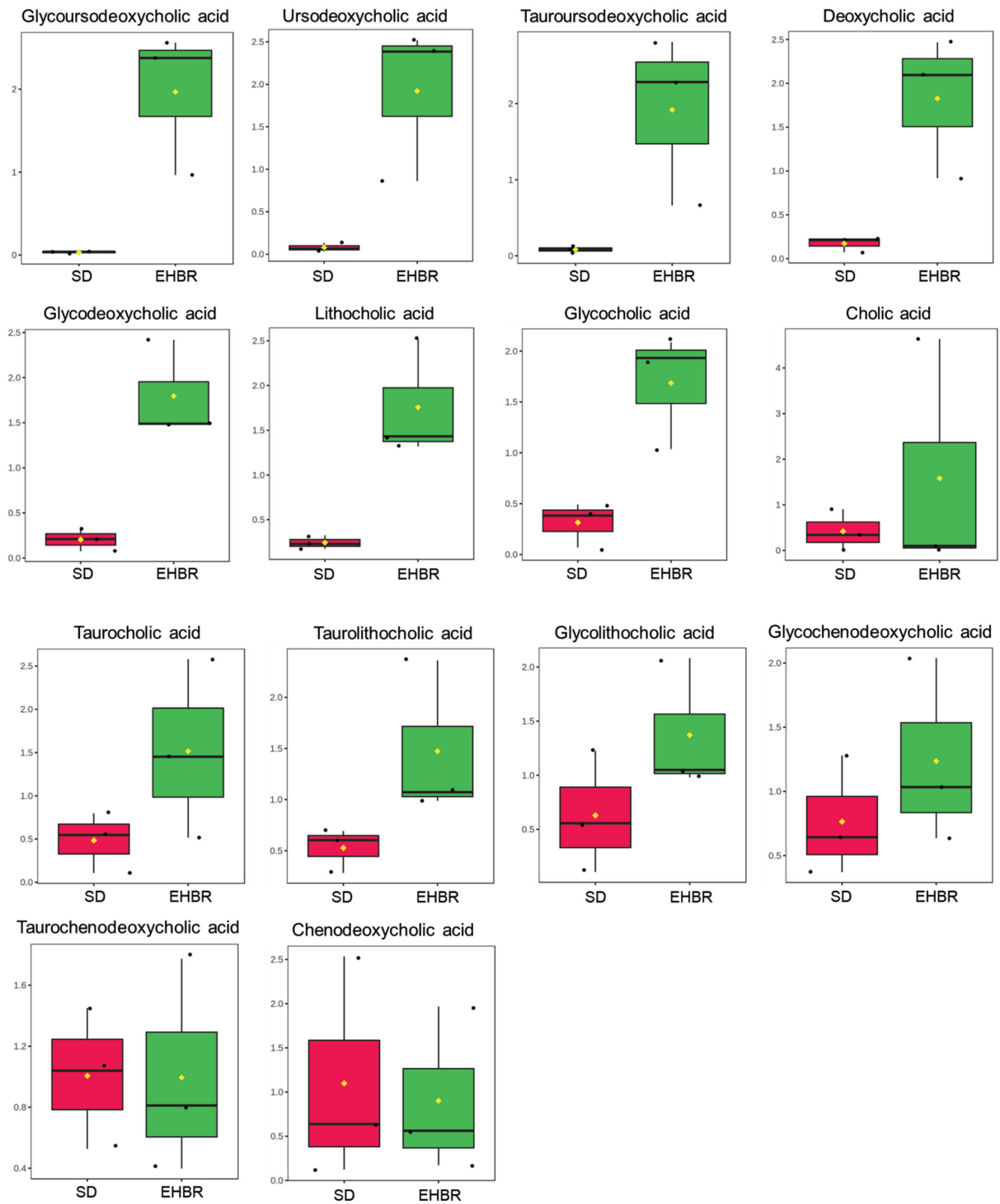


図 2.8 血漿中の胆汁酸の変化

縦軸はスケール後の代謝物レベルを示す。

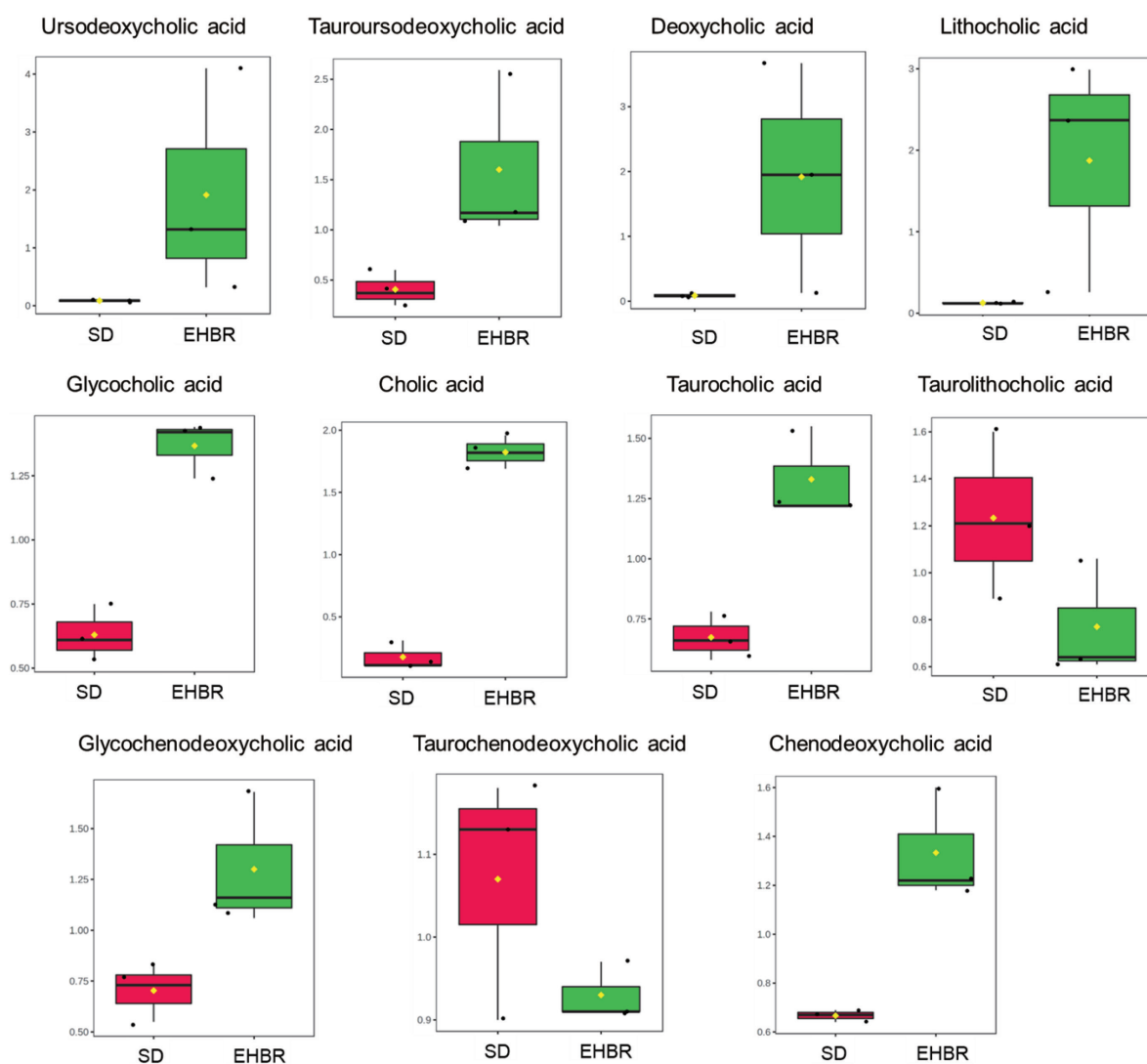


図 2.9 尿中の胆汁酸の変化

縦軸はスケール後の代謝物レベルを示す。

胆汁酸は胆汁の主構成成分であり、肝臓でコレステロールから生合成される。胆汁酸は食事由来の脂質やビタミンの可溶化など様々な生理学的役割を担う他、生体のホメオスタシス機構を制御するシグナル分子としての機能も有している[25]。腸管内に分泌された胆汁酸の大部分は、腸管より再吸収され門脈を通り肝臓に戻るという腸肝循環により、通常は全身循環血に移行する割合は極めて低い。しかし、胆汁うっ滞などの腸管への胆汁排泄障害がある場合は、胆汁酸が全身循環血に流入し、血中の総胆汁酸は増加する。EHBRにおいても胆汁酸の胆汁からの排泄が低下するため、血中及び尿中の総胆汁酸が増加することが知られている[26]。総胆汁酸は胆汁酸の複数の分子種の合計であるが、個々の胆汁酸はその分子構造や物理化学的性質により、毒性

やその他の特性が大きく異なっている[27]。図 2.10 に主な胆汁酸と、これらのグリシン抱合体及びタウリン抱合体の構造を示した。

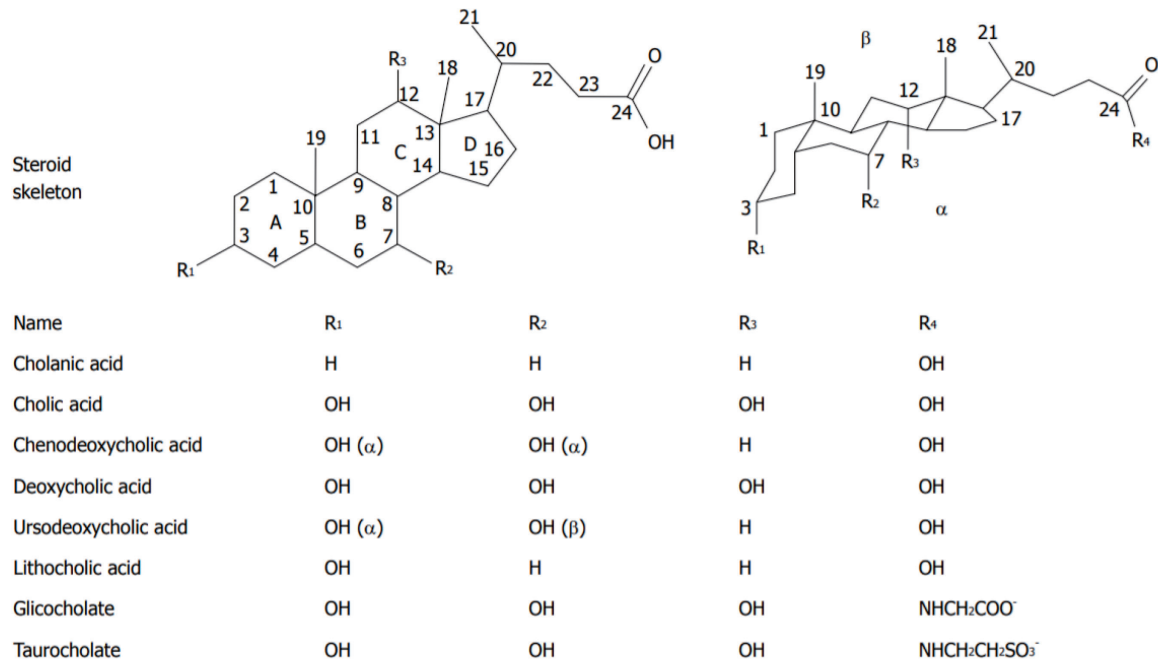


図 2.10 主な胆汁酸ならびにこれらのグリシン抱合体及びタウリン抱合体の構造

(文献[27]の Figure 1 より引用)

本研究では、血漿及び尿中の胆汁酸を分子ごとに分析することにより、EHBR の胆汁酸プロファイルを明らかにした。多くの胆汁酸は EHBR において SD ラットより高値を示したが、chenodeoxycholic acid とそのタウリン抱合体ならびにグリシン抱合体は、EHBR と SD ラットの血漿でほとんど差がなかった。chenodeoxycholic acid のような疎水性の強い胆汁酸は細胞障害性を有する。一方で、ursodeoxycholic acid とその抱合体は EHBR で顕著な上昇を示した。Ursodeoxycholic acid は親水性が高く細胞保護作用のある胆汁酸である。Ursodeoxycholic acid は胆汁うっ滞を伴う疾患の治療において、胆汁酸排泄の低下に伴う肝臓の実質細胞や肝外組織に対する障害を緩和する目的で使用されている[28]。Ursodeoxycholic acid の臨床効果は、胆汁酸プールの構成を親水性にシフトさせることで、肝細胞の細胞膜の安定化、酸化ストレスに対する防御機構の強化、アポトーシスの抑制を促進することに基づくと考えられている[27][29]。EHBR では総胆汁酸が血漿及び尿で増加する一方で、胆汁酸の構成バランスが細胞毒性を軽減する方向にシフトしており、こ

れによって生体の恒常性を維持していると考えられる。

## 2.4 結語

本検討では、LC-MS/MS を使用して幅広い種類の代謝物を網羅的に分析可能なメタボロミクス分析法の構築を試みた。代謝物を複数のグループに分け、それぞれに前処理方法や分析条件を最適化することにより、高極性成分や脂質を含む数百の代謝物を分析可能なターゲットメタボロミクス分析系を確立した。この分析法を用いて胆汁うっ滞モデル EHBR の血漿・尿のメタボロミクスを実施し、胆汁うっ滞の病態における特徴的な代謝物プロファイルを明らかにした。尿中 taurine 及び hypotaurine の増加、並びに血漿及び尿の胆汁酸プロファイルの変化は、胆汁排泄低下に伴い血液中に漏出した有害物質による細胞へのダメージを軽減するための代償機構であると考えられた。以上の結果により、疾患モデル動物の生体内代謝機構の解明、ならびに病態との関連性の考察においてメタボロミクスの手法が有効であることが実証された。

## 2.5 参考文献

1. Zollner G, Trauner M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr.* 2006;156(13-14):380-385. doi:10.1007/s10354-006-0312-7
2. Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2003;2(4):150-158. doi:10.1016/S1665-2681(19)32126-X
3. Jansen PL, Sturm E. Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver Int.* 2003;23(5):315-322. doi:10.1034/j.1478-3231.2003.00856.x
4. Dubin IN, Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore).* 1954;33(3):155-197. doi:10.1097/00005792-195409000-00001
5. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res.* 2016;79(3):378-386. doi:10.1038/pr.2015.247
6. Shani M, Seligsohn U, Gilon E, Sheba C, Adam A. Dubin-Johnson

- syndrome in Israel. I. Clinical, laboratory, and genetic aspects of 101 cases. *Q J Med.* 1970;39(156):549-567.
7. You SJ, Sun YX, Zhang J, He Q, Wu XM, Hu Y. Literature review and report of three cases of Dubin-Johnson syndrome related to ABCC2 gene mutations in children. *Am J Transl Res.* 2021;13(5):4477-4488.
  8. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1996;23(5):1061-1066. doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008621134
  9. Keppler, D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metab. Dispos.* 2014, 42. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(4):561-565. doi:10.1124/dmd.113.055772
  10. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 1999;29(4):1156-1163. doi:10.1002/hep.510290404
  11. Kawaguchi A, Nozaki Y, Hosokawa S, Tagaya O, Mikami T, Wakabayashi T. *Jikken Dobutsu.* 1994;43(1):37-44. doi:10.1538/expanim1978.43.1\_37
  12. Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol.* 1997;272(1 Pt 1):G16-G22. doi:10.1152/ajpgi.1997.272.1.G16
  13. Naba H, Kuwayama C, Kakinuma C, Ohnishi S, Ogihara T. Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) as an animal model affording high drug-exposure in toxicity studies on organic anions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19(5):339-351. doi:10.2133/dmpk.19.339
  14. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2019;68(1):e86. doi:10.1002/cpbi.86
  15. Yang R, Zhao Q, Hu DD, Xiao XR, Huang JF, Li F. Metabolomic analysis of cholestatic liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 2018;120:253-260. doi:10.1016/j.fct.2018.07.022
  16. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of



- taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J.* 1988;256(1):251-255. doi:10.1042/bj2560251
17. Yalçinkaya S, Unlüçerçi Y, Giriş M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: protective effect of taurine. *Nutrition.* 2009;25(4):436-444. doi:10.1016/j.nut.2008.09.017
  18. Sakuragawa T, Hishiki T, Ueno Y, Ikeda S, Soga T, Yachie-Kinoshita A, Kajimura M, Suematsu M. Hypotaurine is an Energy-Saving Hepatoprotective Compound against Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(2):126-134. doi:10.3164/jcbtn.09-91
  19. Bollard ME, Contel NR, Ebbels TM, Smith L, Beckonert O, Cantor GH, Lehman-McKeeman L, Holmes EC, Lindon JC, Nicholson JK, Keun HC. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *J Proteome Res.* 2010;9(1):59-69. doi:10.1021/pr900200v
  20. Post A, Said MY, Gomes-Neto AW, van der Krogt J, de Blaauw P, Berger SP, Geleijnse JM, Borgonjen K, van den Berg E, van Goor H, Rimbach G, Kema IP, Tsikas D, Heiner-Fokkema MR, Bakker SJL. Urinary Taurine Excretion and Risk of Late Graft Failure in Renal Transplant Recipients. *Nutrients.* 2019;11(9):2212. doi:10.3390/nu11092212
  21. タウリン散98%「大正」インタビューフォーム
  22. 滝川 一. 薬物性肝障害の診断と治療. *日本内科学会雑誌*, 2015;104(5):991-997.
  23. Pegg AE. Functions of Polyamines in Mammals. *J Biol Chem.* 2016;291(29):14904-14912. doi:10.1074/jbc.R116.731661
  24. Pirinen E, Gylling H, Itkonen P, Yaluri N, Heikkinen S, Pietilä M, Kuulasmaa T, Tusa M, Cerrada-Gimenez M, Pihlajamäki J, Alhonen L, Jänne J, Miettinen TA, Laakso M. Activated polyamine catabolism leads to low cholesterol levels by enhancing bile acid synthesis. *Amino Acids.* 2010;38(2):549-560. doi:10.1007/s00726-009-0416-7
  25. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(8):678-693. doi:10.1038/nrd2619
  26. Chen J, Terada T, Ogasawara K, Katsura T, Inui K. Adaptive responses of

- renal organic anion transporter 3 (OAT3) during cholestasis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(1):F247-F252. doi:10.1152/ajprenal.00139.2008
27. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804-816. doi:10.3748/wjg.15.804
28. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol*. 2001;35(1):134-146. doi:10.1016/s0168-8278(01)00092-7
29. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009;15(14):1677-1689. doi:10.3748/wjg.15.1677

## 第3章 ハンチントン病モデルマウスのメタボロミクス

### 3.1 序論

アルツハイマー病やパーキンソン病、統合失調症、うつ病、発達障害などの精神神経疾患は近年患者数が急増しており、その病態解明や治療法の開発が強く求められている。しかしながら、これらの疾患に対する根本的な治療方法や進行の抑制方法は存在せず、アンメットニーズの極めて高い疾患領域となっている。精神神経疾患の治療薬の成功確率は他の薬剤に比べて低い。その要因として、精神神経疾患の病態が非常に複雑であること、また病態そのものや発症・進行のメカニズムの解明が十分できていないことがある。これにより、病因に直接的に作用する治療薬の開発や、新規治療ターゲットの探索が困難な状態となっている。また、精神神経疾患の病態は複雑であるため、臨床試験においてはできる限り均一な患者集団を対象にすることが成功確度向上に必要と考えられる。しかしながら、患者を層別化し、治療薬の有効性が期待できる患者集団を選別するための客観的な指標、すなわちバイオマーカーは十分に特定されていないのが現状である。このような患者層別化のバイオマーカーの他、臨床試験において早期に有効性を判断するため、疾患の改善を反映するバイオマーカーも必要とされている。

メタボロミクスは多岐に渡る疾患領域のバイオマーカー探索へ適用されている。近年では精神神経疾患を対象としたメタボロミクスの報告も増えている。精神神経疾患の発症や進行メカニズムには未だ不明な点が多くあるが、近年のメタボロミクス研究により代謝プロファイルの異常が明らかにされつつある。モデル動物あるいは患者の生体試料を用いたメタボロミクスによって、精神神経疾患の複雑な病態の発症や進行メカニズムの解明、客観的な診断法の開発や医薬品開発に応用可能なバイオマーカーの探索が精力的に進められている[1][2]。

精神神経疾患のうち、進行的に神経細胞（ニューロン）の構造及び機能が欠落する疾患は神経変性疾患と称される。神経変性疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などが含まれる。これらの神経変性疾患は加齢とともに発症率が増加するため、平均寿命の上昇や高齢化に伴い全世界で患者数が急増している。しかしながら、これらの疾患に対する根本的な治療方法や進行の抑制方法は存在せず、アンメットニーズの極めて高い疾患領域となっている。

ハンチントン病は、常染色体優性遺伝形式をとる進行性の神経変性疾患である。典型的な症状としては不随意運動を始めとする運動障害、認知機能障害や精神症状がある。さらに、体重減少や骨格筋の萎縮、睡眠障害、自律神経障害なども認められる。平均的な発症年齢は 35~44 歳である。有病率は白人では人口 10 万人あたり 5~10 人であるが、アジア人ではこれより少なく人口 100 万人あたり 1 人程度とされている[3]。日本の患者数は 900 名超であり、難病に指定されている[4]。

ハンチントン病は遺伝子疾患であり、原因遺伝子はハンチンチン遺伝子である。ハンチンチンは 3144 アミノ酸からなる 348 kDa のタンパク質で、全身にユビキタスに発現しているが、特にニューロン、精巣、筋肉、肝臓、リンパ球で高発現している。ハンチントン病では、ハンチンチン遺伝子のエクソン 1 に存在するシトシン・アデニン・グアニンの繰り返し配列 (CAG リピート) の異常な伸長が認められる。この CAG リピート数は正常では 35 未満であるが、ハンチントン病患者ではこれより長いリピート数を有する。また、CAG リピート数が多くなるほど発症年齢が低くなることが知られている[5]。CAG はグルタミンをコードしており、変異型ハンチンチン遺伝子から翻訳されるハンチンチンタンパクの N 末端には異常に伸長したポリグルタミン鎖が形成される (図 3.1) [6][7]。

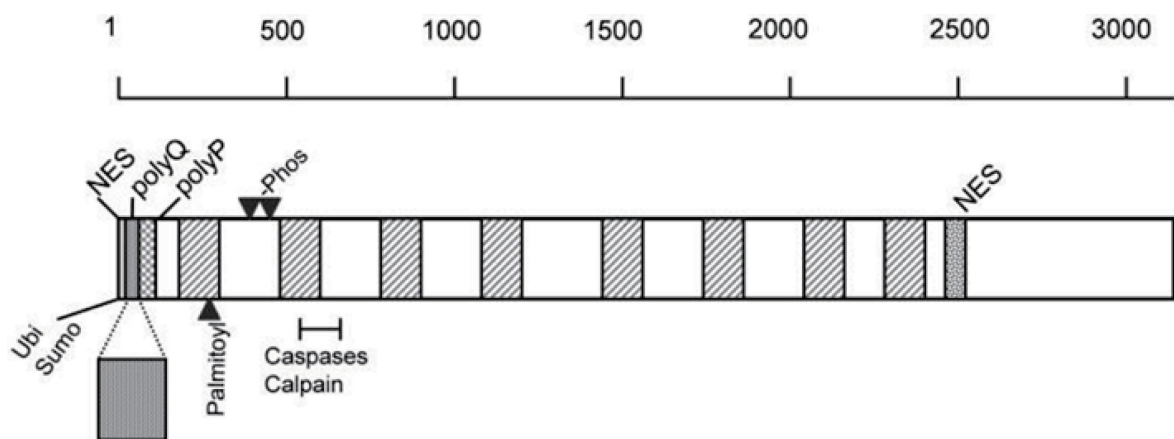


図 3.1 ハンチンチンタンパク

(文献[7]の Figure 1 より引用)

図上部の数字はアミノ酸長を示す。ハンチンチンは N 末端領域にユビキチン (ubiquitin) 化、SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化、核外輸送シグナル (nuclear export signal: NES)、ポリグルタミン (polyQ) とポリプロリン (polyP) 部位を有する。ハンチントン病ではポリグルタミン鎖の異常な伸長が認められる。

ハンチンチンタンパクの機能は十分に解明されていないものの、遺伝子転写や小胞輸送、軸索輸送、およびシナプス伝達などに関与することが報告されている。ハンチントン病では、ハンチンチンのポリグルタミン鎖が異常に伸長する。その結果、タンパク質のミスフォールディングが起こり、線維状凝集体であるアミロイドを含む凝集体が形成される。この凝集体が多くの生体内分子と相互作用することで神経変性や神経脱落を引き起こすと考えられている[8]。ハンチントン病では、脳の線条体において顕著な神経脱落が認められる(図 3.2)。線条体は被殻と尾状核から構成され、被殻は運動機能に、尾状核は記憶や学習、認知機能に重要な脳部位である。

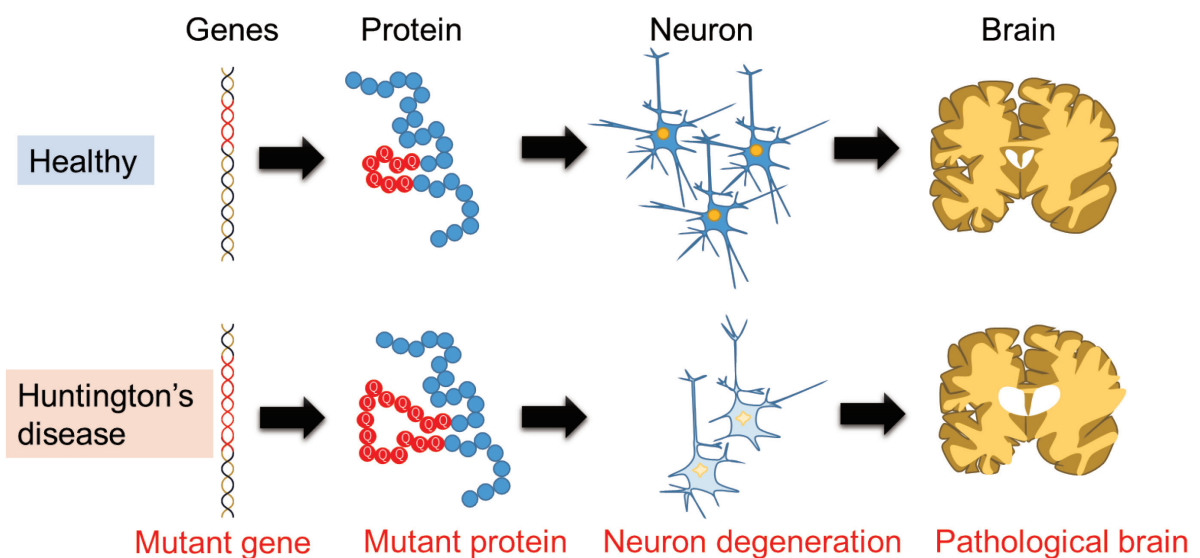


図 3.2 ハンチントン病における神経変性

ハンチントン病では、神経細胞脱落による線条体の尾状核の萎縮や側脳室前角の拡大が認められる。

ハンチントン病の原因遺伝子や変異ハンチンチンタンパク質の生成は明らかになっているものの、ハンチントン病の病態生理に関するメカニズムは十分に解明されていない。現状では、ハンチントン病の進行抑制や病態改善に有効な疾患修飾型の治療法は存在しない。そのため、新たな病態生理学的知見や新規治療法が必要とされている。

ハンチントン病の研究と治療薬の評価には、多様なモデル動物が使用されてきた。遺伝子改変により作製されるハンチントン病のマウスモデルには、(1) 全長変異型ヒトハンチンチンを発現するマウスや、(2) 変異型ヒトハンチンチン遺伝子の断片 (エキソン-1 および 2) を発現するマウス、(3) マウスハンチンチン遺伝子に病原性 CAG リピートを挿入されたマウスがある。

R6/2 マウスはハンチントン病の研究において最も広く使われている遺伝子改変モデル動物であり、過剰な CAG リピートを含むヒトハンチンチン遺伝子のエクソン 1 を発現する。R6/2 マウスではハンチントン病の臨床所見と同様に、変異ハンチンチンの N 末端のポリグルタミン鎖を含むフラグメントからなる核内封入体の形成が神経細胞において認められる。また、認知機能の障害、運動障害なども呈する[9][10][11]。R6/2 マウスでは 6 週齢から 8 週齢にかけて運動障害が発現し、その後症状が進行していき 12-15 週齢という早期に死亡する[12][13]。

近年の研究により、ハンチントン病は全身性の疾患であり、脳に限らず多くの末梢組織にも病態変化を引き起こすことが明らかになっている[14]。ハンチントン病の病態生理を解明し、診断や治療法の開発に有望なバイオマーカーを探索するため、これまでに様々なメタボロミクス解析が実施されてきた。これまでに報告されているハンチントン病の代謝異常について、表 3.1 に示す。ハンチントン病の動物モデルやハンチントン病の患者を対象としたメタボロミクスでは、タンパク質の代謝や糖代謝、コレステロール代謝などの異常が示されている。しかしながら、これらの結果は多様かつ一貫しておらず、有望なバイオマーカーは確立されていない[15][16][17]。また、これまでのハンチントン病に関するメタボロミクス研究の多くが単一の測定プラットフォームによるものであり、様々な物理化学的性質を有する生体内の代謝物を幅広くカバーできていない状況であった。

**表 3.1** ハンチントン病のメタボロミクスで検出された代謝異常

生体試料	変動代謝物	参考文献
ハンチントン病患者及びモデルマウスの血清	Glycerol, malonate, 2-amino-n-butyrate の増加	[15]
ハンチントン病患者及びモデルマウスの血液	Citruline の増加	[18]
ハンチントン病患者の血漿	分枝鎖アミノ酸 (valine, leucine, isoleucine) の減少	[19]
ハンチントン病患者の血清	Serine 及び threonine の増加、病態進行時のリン脂質の減少	[20]
ハンチントン病患者の血漿	24S-Hydroxycholesterol の減少	[21]
ハンチントン病患者の死後脳組織(線条体)	Cholesteryl esters の増加	[22]

本研究では、ハンチントン病の病態形成の分子メカニズムの解明並びに有望なバイオマーカーの探索を目的とし、R6/2 マウスのメタボロームプロファイルを包括的に解析した。R6/2 マウスの週齢としては、8 週齢と 10 週齢を使用した。8 週齢は病態が比較的早期の段階であり、一方 10 週齢は病態が進行した段階である。これらの週齢の R6/2 マウスはハンチントン病の医薬品研究において医薬品候補化合物の有効性評価でよく使われる週齢である。血漿のメタボロミクスにおいては CE-MS と LC-MS の二つの測定原理を相補的に用いることで、幅広い物性をもつ代謝物を網羅的に分析した。また、本研究ではハンチントン病の主要な疾患部位である脳のメタボロミクスも実施し、末梢血で認められた代謝変化と脳組織で認められる代謝変化の違いについても検討した。

## 3.2 実験材料及び方法

### 3.2.1 生体試料採取

3 週齢の雌性 R6/2 マウス(B6CBA-Tg[HDexon1]62Gpb/3J) [9] 及び 3 週齢の野生型 (WT) 雌性マウスを Charles River Laboratories Japan (Yokohama, Japan) から購入した。R6/2 マウスはヒトのハンチンチン遺伝子の 5'末端に 120 まで拡張した CAG リピートを有する。マウスは、温度 23°C±3°C、明期/暗期それぞれ 12 時間のサイクルに設定された動物室で飼育した。飼料と飲用水は自由に摂取させた。血漿及び脳試料は、8 週齢及び 10 週齢の R6/2 マウス及び同週齢の野生型マウス各 5 個体から採取した。生体試料採取の際、マウスは約 3 時間絶食した。イソフルラン麻酔下で心採血により血液を採取した。血液凝固防止剤として EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) を使用した。採取後の血液を速やかに遠心分離して血漿を採取し、測定まで-80°C で保存した。血液採取後、脳を採取し、測定まで-80°C で保存した。なお、上記の実験方法は大日本住友製薬株式会社の動物実験委員会にて承認されたものである。

### 3.2.2 試薬

LC-MS/MS 分析時の内標準物質として用いた 2-morpholinoethanesulfonic acid は、Dojindo (Kumamoto, Japan) から購入した。同様に内標準物質として用いた 12S-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d8 acid (12S-HETE-d8) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。メ

タボロミクス用測定キットの MxP® Quant 500 kit は Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Austria) から購入した。その他の試薬は特級品もしくは高速液体クロマトグラフ用を用いた。精製水は水道水を Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) で精製することにより調製した。

### 3.2.3 血漿及び脳試料の測定

血漿及び脳中の高極性の代謝物は (1) キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計 (capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, CE-TOFMS) で分析した。さらに、血漿中の脂質とその他の代謝物は(2) Biocrates MxP® Quant 500 kit と液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) 及びフローインジェクション - タンデム質量分析装置 (FIA-MS/MS) で分析し、一次代謝物 (アミノ酸・有機酸・核酸塩基) と脂質メドイエーターは(3) LC-MS/MS で分析した。

#### 3.2.3.1 CE-TOFMS による高極性代謝物の分析

高極性代謝物を対象とした CE-TOFMS 分析を Human Metabolome Technologies (Tsuruoka, Japan) で実施した。分析には Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) と曾我らの開発した分析法を用いた[23][24][25]。

血漿の測定では、200  $\mu$ L のメタノール (内標準物質入り) に、50  $\mu$ L の血漿試料を添加して攪拌した。これに 150  $\mu$ L の Milli-Q 水を加えて攪拌し、限外ろ過チューブ (ウルトラフリー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に 300  $\mu$ L 移し取った。これを遠心分離 (9,100  $\times$  g, 4°C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50  $\mu$ L の精製水に溶解して測定に供した。

脳試料の測定では、脳試料に 50%アセトニトリル水溶液 (v/v) (内標準物質入り) を加え、冷却下にて破砕機を用いて破砕した。組織破砕後、遠心分離 (2,300  $\times$  g, 4°C, 5 分) を行い、上層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に 400  $\mu$ L 移し取った。これを遠心分離 (9,100  $\times$  g, 4°C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50  $\mu$ L の精製水に溶解して測定に供した。

CE-TOFMS 分析で検出されたピークは、自動積分ソフトウェア



MasterHands (Keio University, Tsuruoka, Yamagata, Japan) で処理した。まず、シグナルノイズ比が 3 以上のピークを自動抽出し、 $m/z$ 、ピーク面積値及び泳動時間 (migration time) を得た。各代謝物ピークの同定は、各ピークの  $m/z$  と泳動時間の値をもとに HMT 社の保有する代謝物データベース情報と照合、検索することにより行った。各代謝物のピーク面積値は内標準物質のピーク面積値で補正し、以降のデータ解析に用いた。

### 3.2.3.2 LC-MS/MS 及び FIA-MS/MS による低分子代謝物及び脂質の分析 (MxP® Quant 500 kit)

脂質を含む代謝物の分析には、市販のメタボロミクスキットである MxP® Quant 500 kit (Biocrates Life Sciences) と LC-MS/MS 及び FIA-MS/MS を用いた。このキットには、サンプル調製用の器材と手順書、ならびに分析メソッドが含まれる。合計 630 の代謝物を分析対象としており、LC-MS/MS を用いた 13 種類の低分子代謝物 (アミノ酸とその誘導体、胆汁酸、アミン、カルボン酸、脂肪酸など) の分析と、FIA-MS/MS による 12 種類の脂質 (アシルカルニチン、ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、セラミド、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール、トリアシルグリセロールなど) 及びヘキソースの分析が可能である。

マウス血漿試料、検量線試料及び品質管理用試料各 10  $\mu\text{L}$  を前処理用 96 well プレートに添加し、窒素気流下で 30 分乾固した。アミノ酸及びアミンの誘導体化処理のため、5%の phenylisothiocyanate 溶液 50  $\mu\text{L}$  を添加し、1 時間室温でインキュベートした。窒素気流下で 1 時間乾固した後、5 mM 酢酸アンモニウム入りメタノールを 300  $\mu\text{L}$  を添加し、室温で 30 分振盪した。プレートを遠心分離し、代謝物を含む抽出液を分離した。LC-MS/MS 分析用サンプルは抽出液 150  $\mu\text{L}$  と精製水 150  $\mu\text{L}$  を混合して調製した。FIA-MS/MS 分析用サンプルは抽出液 10  $\mu\text{L}$  とキット付属の FIA 分析用溶媒 490  $\mu\text{L}$  を混合して調製した。

分析には Nexera™ X2 high performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) と 6500QTRAP mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を用いた。

LC-MS/MS 分析では、逆相カラム (Biocrates MxP® Quant 500 column) を用い、カラム温度は 50°C に設定した。LC の移動相には 2%ギ酸水溶液 (移動相 A) と 2%ギ酸入りアセトニトリル (移動相 B) を用いた。LC-MS/MS のポジティブイオンモードの分析では、グラジエント溶出条件を用い、移動相 B

の組成が 0% (0 分) – 0% (0.25 分) – 12% (1.5 分) – 17.5% (2.7 分) – 50% (4 分) – 100% (4.5 分) – 100% (5 分) – 0% (5.1 分) – 0% (5.8 分) となるように設定した。移動相の流速は 0.8 mL/min (0 - 4.7 分) 及び 1.0 mL/min (4.7 - 5.8 分) とし、サンプル注入量は 15 µL とした。LC-MS/MS のネガティブイオンモードの分析では、移動相の流速を 0.8 mL/min としたグラジエント溶出条件を用い、移動相 B の組成が 0% (0 分) – 0% (0.25 分) – 25% (0.5 分) – 50% (2 分) – 75% (3 分) – 100% (3.5 分) – 100% (5 分) – 0% (5.1 分) – 0% (5.8 分) となるように設定した。移動相の流速は 0.8 mL/min (0 - 4.7 分) 及び 1.0 mL/min (4.7 - 5.8 分) とし、サンプル注入量は 5 µL とした。ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードの MS 分析パラメータはそれぞれ、イオンスプレー電圧を 5500 V 及び -4500 V、イオンソース温度を 500°C 及び 650°C、ネブライザーガスを 60 psi 及び 40 psi、ターボガスを 70 psi 及び 40 psi、カーテンガスを 45 psi 及び 35 psi に設定した。

FIA-MS/MS 分析では、FIA 分析用溶媒を流速 30 µL/min (0 分) – 30 µL/min (1.6 分) – 200 µL/min (2.4 分) – 200 µL/min (2.8 分) – 30 µL/min (3 分) となるように設定し、ポジティブイオンモードの 2 種類の条件で分析を実施した。サンプル注入量は 20 µL とした。MS 分析パラメータはイオンスプレー電圧を 5500 V、イオンソース温度を 200°C、ネブライザーガスを 40 psi 及び 30 psi、ターボガスを 50 psi 及び 80 psi、カーテンガスを 30 psi 及び 20 psi に設定した。

分析データの解析には Analyst (AB Sciex) 及び MetIDQ™ (Biocrates Life Sciences) を使用した。各代謝物のピーク面積値を内標準物質のピーク面積値で補正した後、検量線を用いて代謝物濃度を算出し、以降のデータ解析に用いた。

### 3.2.3.3 LC-MS/MS による低分子代謝物及び脂質メディエーターの分析

一次代謝物と脂質メディエーターの分析には、LC-MS/MS と最適化された分析メソッドを用いた。分析機器として Nexera™ X2 HPLC system と LCMS-8060 (Shimadzu Co.) を用い、分析条件は一次代謝物メソッドパッケージ及び脂質メディエーターメソッドパッケージ (Shimadzu Co.) を用いた。一次代謝物メソッドパッケージにはアミノ酸・有機酸・塩基・ヌクレオチド・補酵素など約 100 成分の一斉分析可能な LC-MS/MS 分析条件が含まれる。脂質メディエーターメソッドパッケージにはアラキドン酸カスケードに由来するエイコサノイド類、DHA や EPA などの多価不飽和脂肪酸代謝物の他、主

要な脂質メディエーターやその関連物質約 160 成分の一斉分析が可能な LC-MS/MS 条件が含まれる。

血漿の前処理のため、血漿 10  $\mu$ L に内標準物質 (2-morpholinoethanesulfonic acid, 10  $\mu$ M) 入りメタノール 100  $\mu$ L を混和し、遠心分離した。上清 50  $\mu$ L を水 200  $\mu$ L 及びクロロホルム 200  $\mu$ L と混和し、遠心分離した後に水層と有機層をそれぞれ分取した。水層 20  $\mu$ L をエバポレーターで蒸発乾固し、残渣に 0.1%酢酸 40  $\mu$ L を加えて再溶解し、一次代謝物分析用試料とした。有機層はそのまま脂質メディエーター分析用試料とした。

一次代謝物の分析では、逆相カラム (Discovery HS F5-3, 2.1  $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m, Sigma-Aldrich, St Louis) を用い、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C に設定した。LC の移動相には 0.1%ギ酸水溶液 (移動相 A) と 0.1%ギ酸入りアセトニトリル (移動相 B) を用いた。移動相の流速を 0.25 mL/min とした。グラジエント溶出条件を用い、移動相 B の組成が 0% (0 分) - 0% (2 分) - 25% (5 分) - 35% (11 分) - 95% (15 分) - 95% (20 分) - 0% (20.1 分) - 0% (25 分) となるように設定した。サンプル注入量は 10  $\mu$ L とした。MS 分析パラメータはドラインガス流量 10 L/min、ネブライザーガス流量を 3 L/min、脱溶媒管 (desolvation line) 温度を 250 $^{\circ}$ C、インターフェイス温度を 300  $^{\circ}$ C、ヒートブロック温度を 400 $^{\circ}$ C とした。

脂質メディエーターの分析では、逆相カラム (Kinetex C8, 2.1  $\times$  150 mm, 2.6  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA) を用い、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C に設定した。LC の移動相には 0.1%ギ酸水溶液 (移動相 A) とアセトニトリル (移動相 B) を用いた。移動相の流速を 0.4 mL/min としたグラジエント溶出条件を用い、移動相 B の組成が 10% (0 分) - 25% (5 分) - 35% (10 分) - 75% (20 分) - 95% (20.1 分) - 95% (25 分) - 10% (25.1 分) - 10% (28 分) となるように設定した。サンプル注入量は 5  $\mu$ L とし、15  $\mu$ L の精製水を共注入することで高極性代謝物のピークリーディングを回避した。MS 分析パラメータはドラインガス流量 10 L/min、ネブライザーガス流量を 2.5 L/min、脱溶媒管 (desolvation line) 温度を 250 $^{\circ}$ C、インターフェイス温度を 270  $^{\circ}$ C、ヒートブロック温度を 400 $^{\circ}$ C、衝突誘起乖離 (collision-induced dissociation) ガス圧を 230 kPa とした。

LC-MS/MS 分析データは解析ソフトウェア LabSolutions Insight (Shimadzu Co.) で処理した。各代謝物のピーク高さを内標準物質のピーク高さで補正し、以降のデータ解析に用いた。

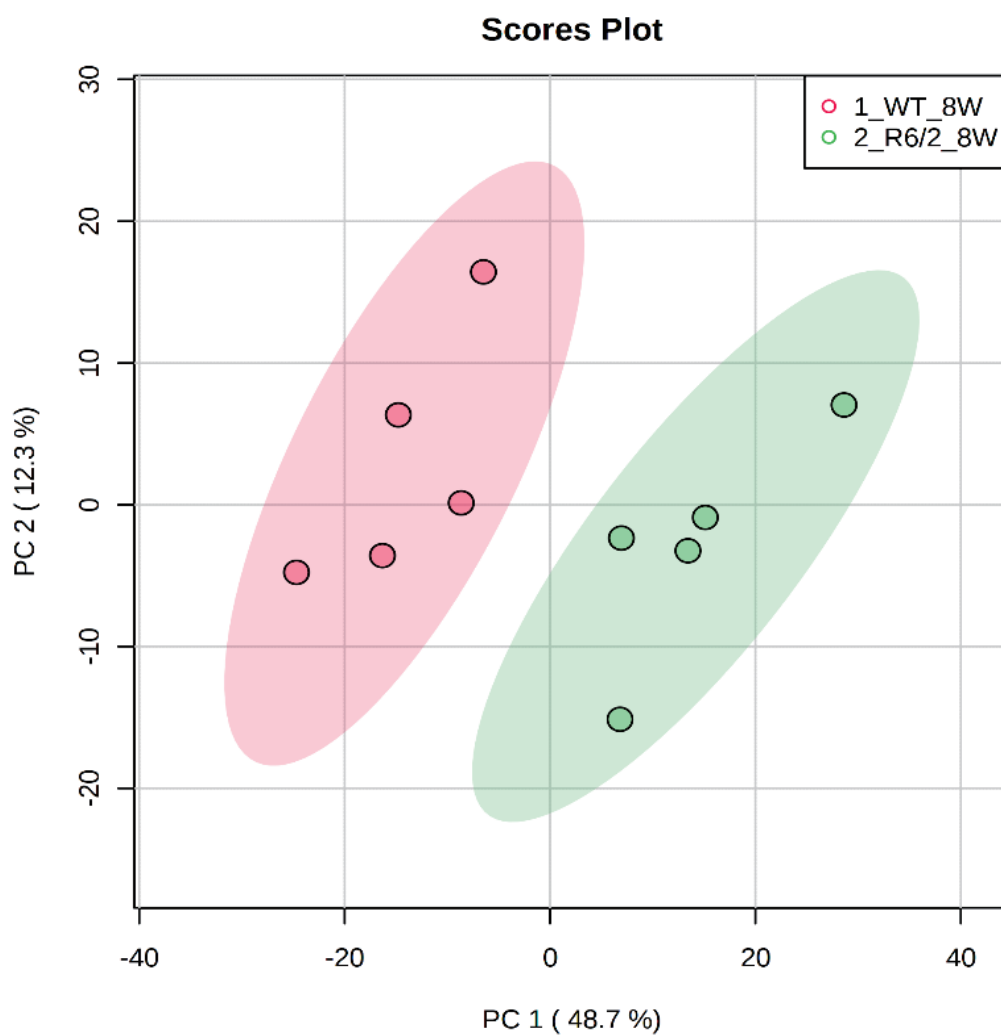
### 3.2.4 データ解析

血漿の分析には複数の分析プラットフォームを使用したことから、アミノ酸など一部の代謝物は重複してデータが取得された。そのため、各分析プラットフォームのデータを統合する際に CE-TOFMS データを優先する形で重複を削除し、得られた代謝物データセットを統計解析に供した。代謝物データの統計解析には MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) [26]を用い、2.2.5 項と同様の手順で解析を実施した。まず、Auto scaling 機能を用いて代謝物レベルを平均 0 及び分散 1 になるように変換した。得られたデータセットを用いて、Fold change analysis、Student's t-test、主成分分析及びパスウェイ解析を実施した。Fold change が 0.77 未満あるいは 1.3 倍を超え、t-test における p-value が 0.05 未満かつ FDR が 0.1 未満の場合に代謝物レベルに差があるものと定義した。パスウェイ解析においては、KEGG データベース (<https://www.genome.jp/kegg/>) のパスウェイ情報を使用した。脂質成分の多くに代謝物データベース ID が付与できなかったため、脂質はパスウェイ解析の対象外とし、脂質以外の分子について解析を実施した。

### 3.3 結果及び考察

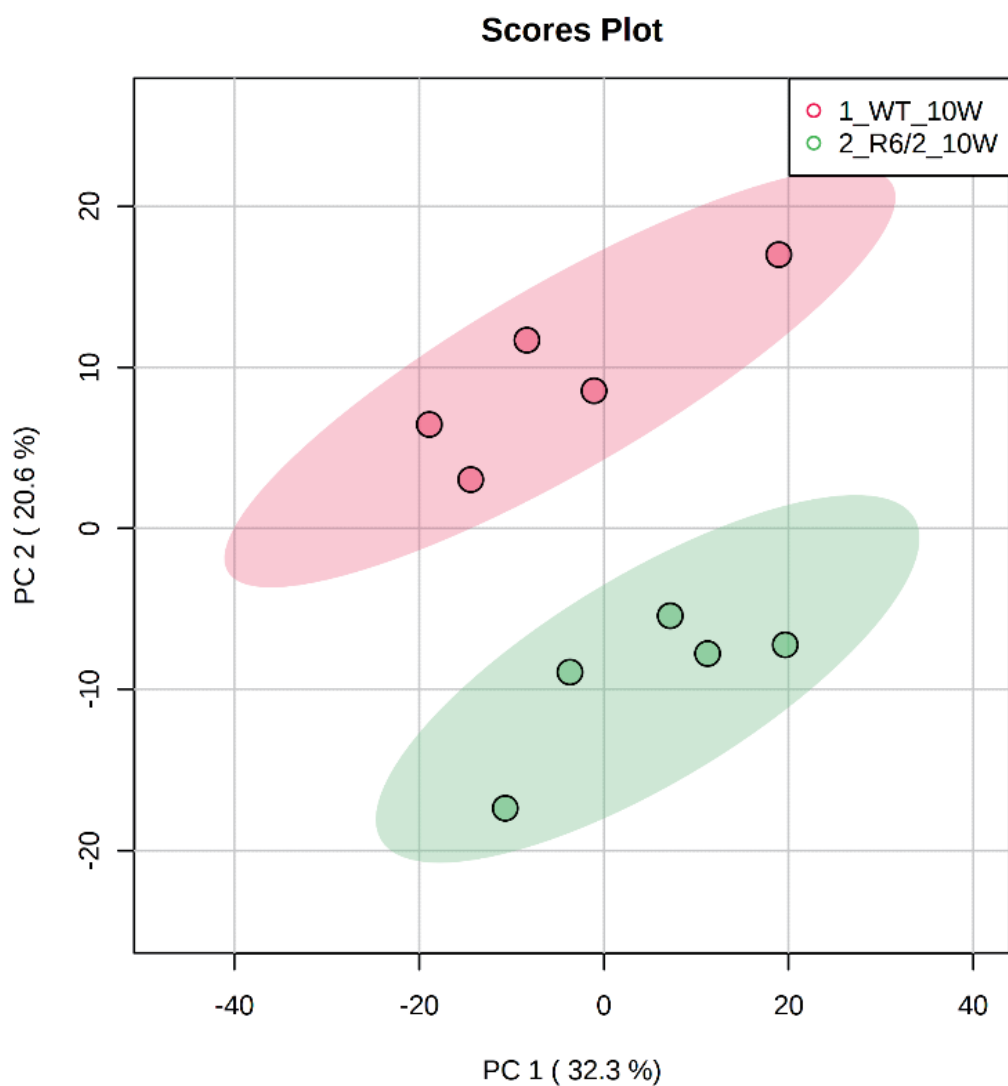
本研究では血漿の分析に複数の分析プラットフォームを適用することで幅広い代謝物をカバーすることを試みた。その結果、CE-TOFMS 分析では 202 成分、MxP® Quant 500 kit を用いた LC-MS/MS 及び FIA-MS/MS 分析では 408 成分、LC-MS/MS による一次代謝物及び脂質メディエーター分析では 87 成分が検出された。複数の分析プラットフォームで重複して分析していた成分は、CE-TOFMS 分析データを優先する形で重複を除き、最終的に残った 598 成分をその後のデータ解析に用いた。脳試料については CE-TOFMS 分析で検出・同定された 188 成分をデータ解析に用いた。

血漿及び脳の主成分分析結果をスコアプロットとして図 3.3 から図 3.6 示した。血漿、脳ともに各週齢で R6/2 マウスと WT マウスのグループは明確に分離されており、代謝物プロファイルが異なることが示された。



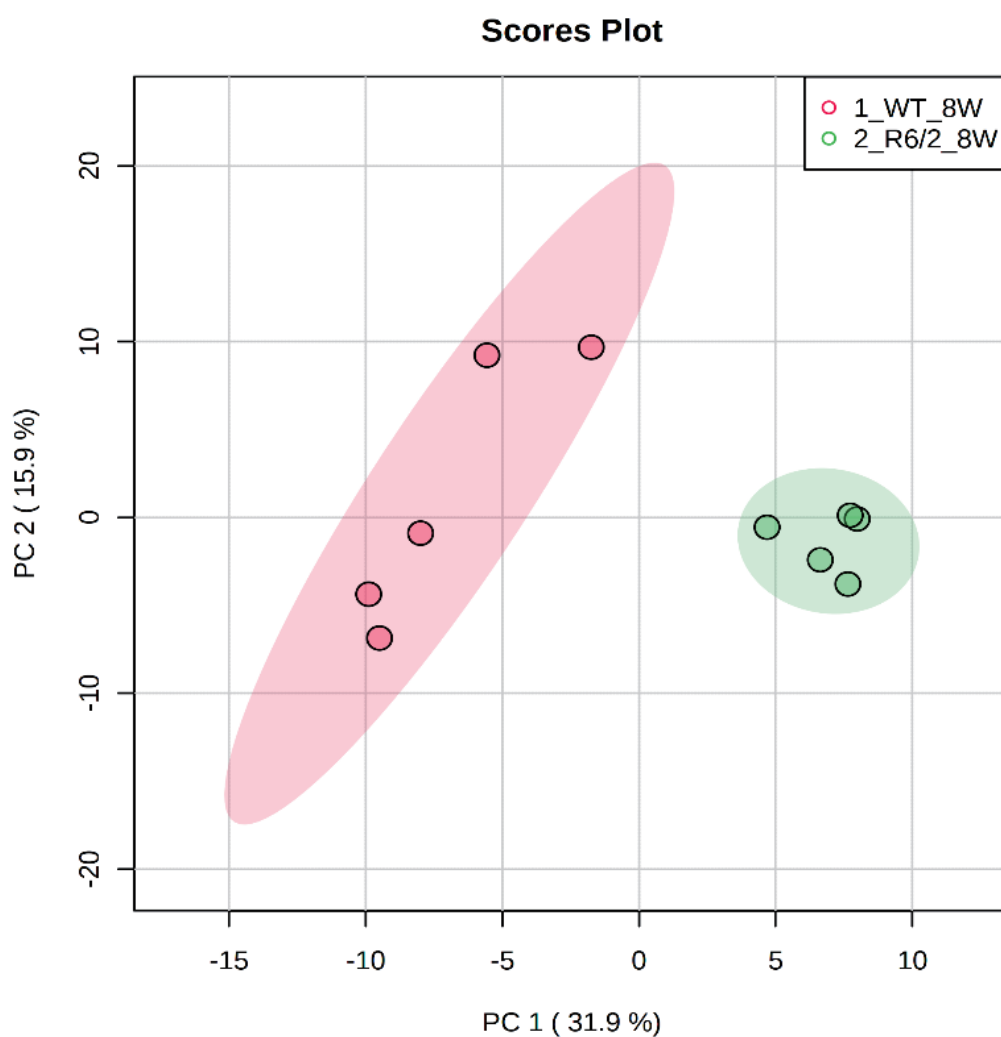
**図 3.3 PCA スコアプロット (血漿、8 週齢)**

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが R6/2 マウス、赤のドットが WT マウスの個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 48.7%及び 12.3%であった。



**図 3.4 PCA スコアプロット (血漿、10 週齢)**

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが R6/2 マウス、赤のドットが WT マウスの個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 32.3%及び 20.6%であった。



**図 3.5 PCA スコアプロット (脳、8 週齢)**

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが R6/2 マウス、赤のドットが WT マウスの個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 31.9% 及び 15.9% であった。

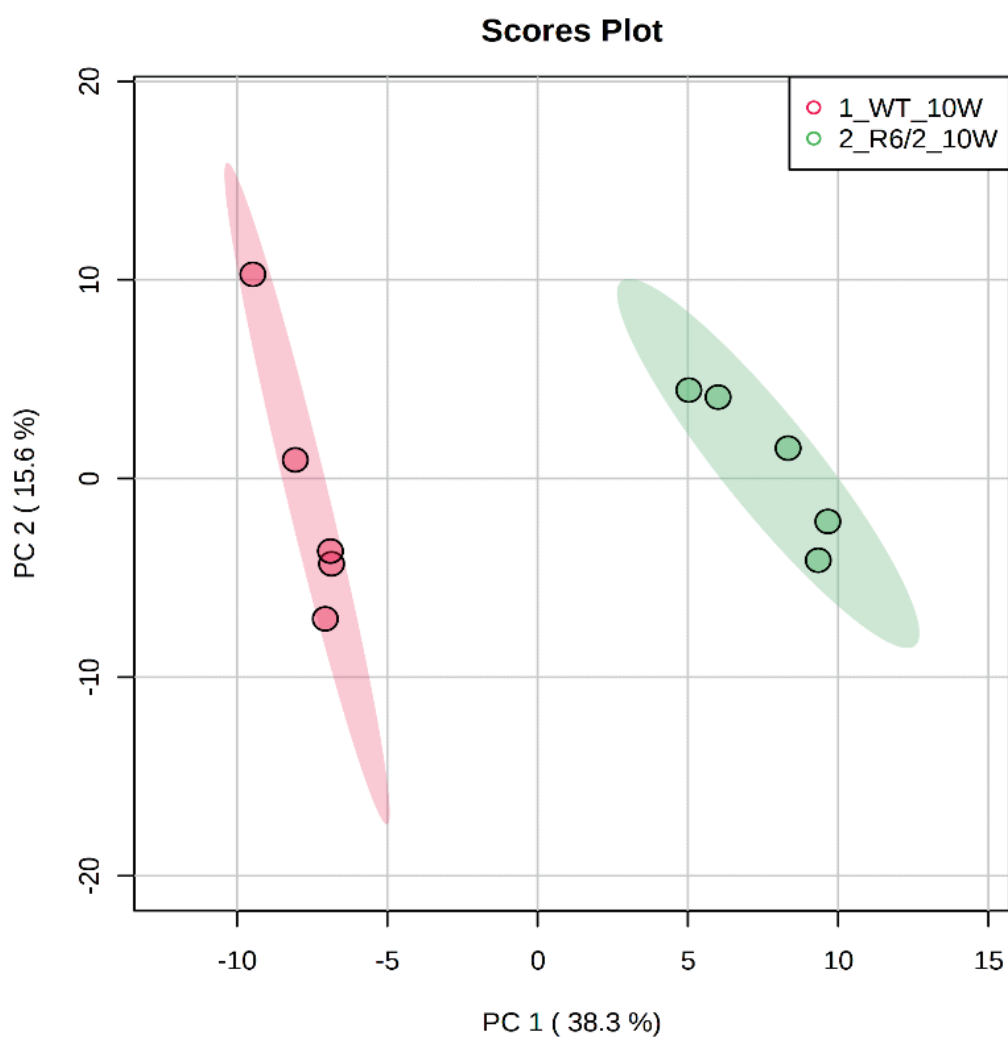


図 3.6 PCA スコアプロット (脳、10 週齢)

主成分分析の手法により、各サンプルの代謝物データの分散が最大となる軸 (PC1 軸)、PC1 軸と直行する軸で代謝物データの分散が最大となる軸 (PC2 軸) をそれぞれ算出し、これらを 2 次元の図にプロットした。緑のドットが R6/2 マウス、赤のドットが WT マウスの個体を示しており、ドット間の距離は各個体の代謝物データの類似性を反映している。PC1 及び PC2 の寄与率はそれぞれ 38.3% 及び 15.6% であった。

各代謝物について、R6/2 マウスと WT マウスの比較解析 (fold change analysis 及び t-test) を行った結果、Fold change が 0.77 未満あるいは 1.3 倍を超え、p-value が 0.05 未満かつ FDR が 0.1 未満の代謝物数は血漿で 285 (8 週齢) 及び 99 (10 週齢)、脳では 28 (8 週齢) 及び 47 (10 週齢) であった。



パスウェイ解析の結果を以下に示す。パスウェイ解析では、R6/2 マウスと WT マウスの二群間比較において存在量が変動した代謝物群が、どのパスウェイに多く含まれるのかを統計的に解析している。

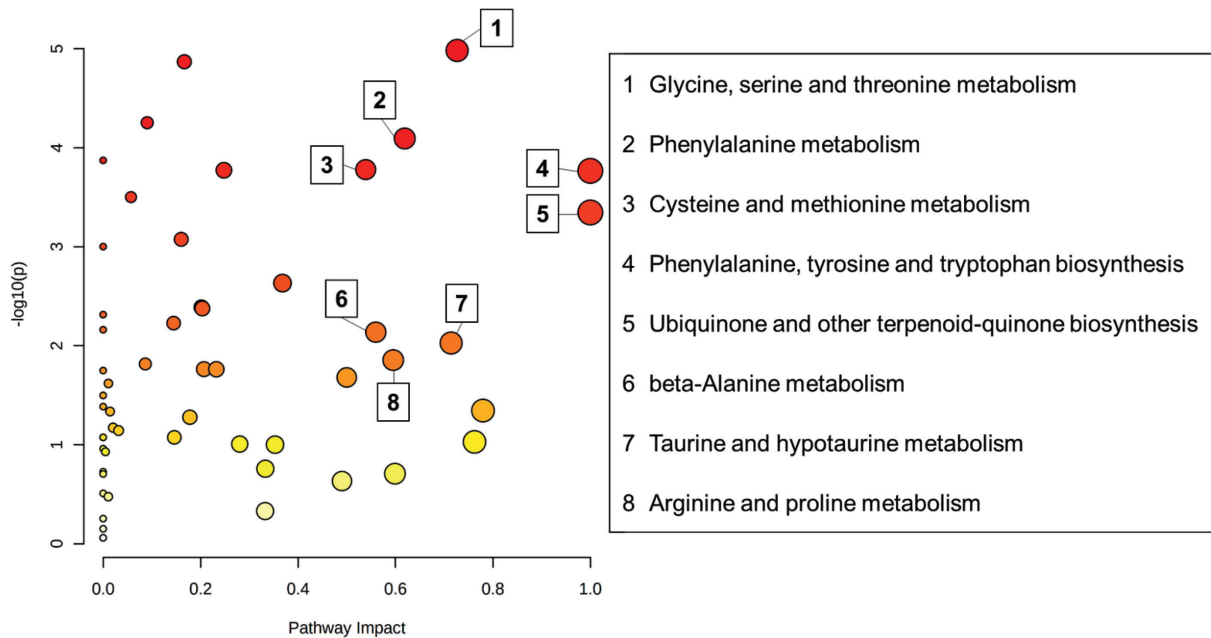


図 3.7 パスウェイ解析結果（血漿、8 週齢）

縦軸を  $-\log_{10}(p)$  ( $p$  はエンリッチメント解析で得られた  $p$  値)、横軸を Pathway impact (各パスウェイの差の大きさを示す) としてプロットした。各ノードは代謝パスウェイを示す。

表 3.2 パスウェイ解析結果（血漿、8週齢）

	Pathway	Total	Hits	-LOG10(p)	FDR	Impact
1	Glycine, serine and threonine metabolism	34	13	4.98	0.0004	0.73
2	Phenylalanine metabolism	12	5	4.09	0.0011	0.62
3	Cysteine and methionine metabolism	33	7	3.78	0.0012	0.54
4	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	4	3.77	0.0012	1.00
5	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	2	3.35	0.0024	1.00
6	beta-Alanine metabolism	21	8	2.14	0.0207	0.56
7	Taurine and hypotaurine metabolism	8	4	2.03	0.0253	0.71
8	Arginine and proline metabolism	38	15	1.86	0.0359	0.60

Total : パスウェイに含まれる代謝物数、Hit : 実際に検出された代謝物数、p : エンリッチメント解析で得られた p 値、FDR : False Discovery Rate によって補正された p 値、Impact : Pathway impact

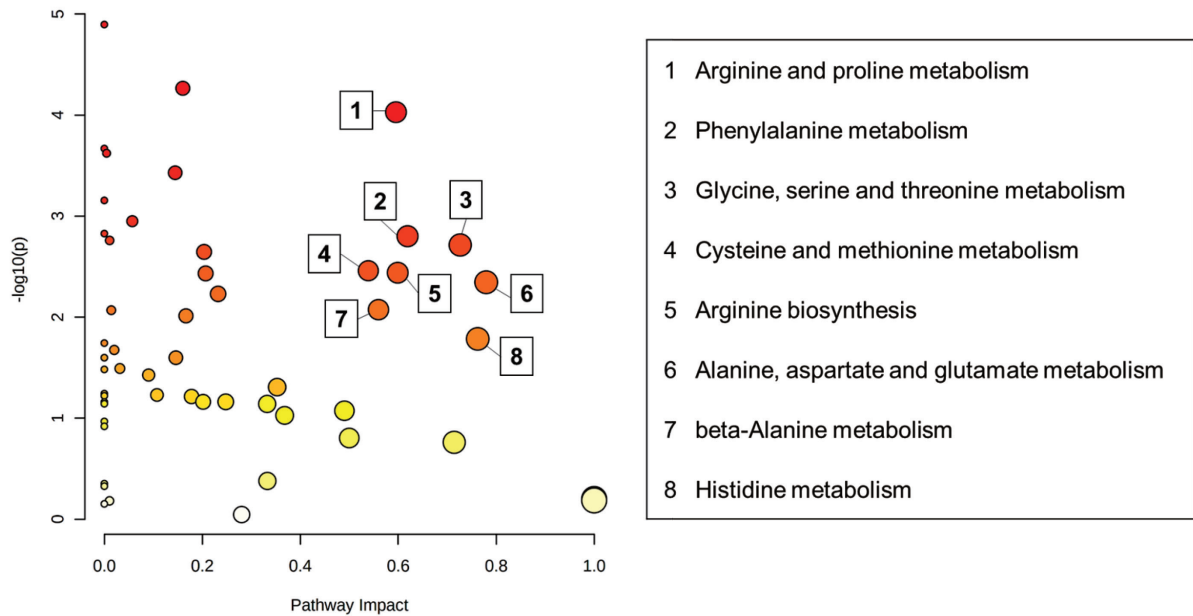


図 3.8 パスウェイ解析結果（血漿、10 週齢）

縦軸を  $-\log_{10}(p)$  ( $p$  はエンリッチメント解析で得られた  $p$  値)、横軸を Pathway impact (各パスウェイの差の大きさを示す) としてプロットした。各ノードは代謝パスウェイを示す。

表 3.3 パスウェイ解析結果（血漿、10 週齢）

	Pathway	Total	Hits	-LOG10(p)	FDR	Impact
1	Arginine and proline metabolism	38	15	4.03	0.0017	0.60
2	Phenylalanine metabolism	12	5	2.80	0.0085	0.62
3	Glycine, serine and threonine metabolism	34	13	2.71	0.0087	0.73
4	Cysteine and methionine metabolism	33	8	2.46	0.0125	0.54
5	Arginine biosynthesis	14	11	2.44	0.0125	0.60
6	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	13	2.35	0.0143	0.78
7	beta-Alanine metabolism	21	8	2.07	0.0231	0.56
8	Histidine metabolism	16	10	1.78	0.0403	0.76

Total : パスウェイに含まれる代謝物数、Hit : 実際に検出された代謝物数、p : エンリッチメント解析で得られた p 値、FDR : False Discovery Rate によって補正された p 値、Impact : Pathway impact

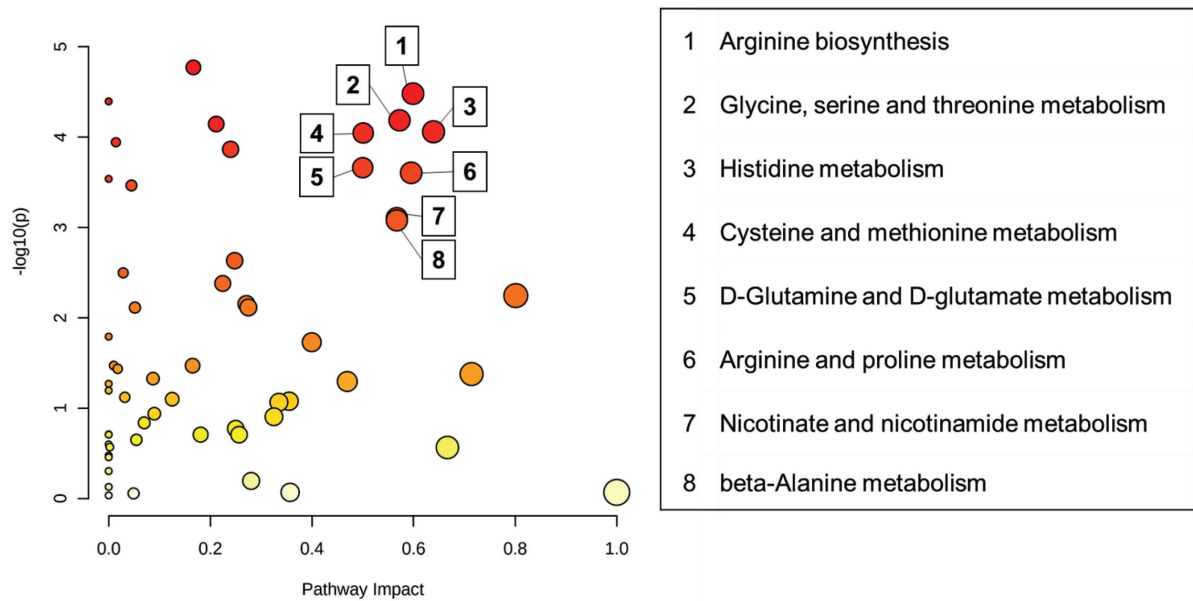


図 3.9 パスウェイ解析結果（脳、8週齢）

縦軸を  $-\log_{10}(p)$  ( $p$  はエンリッチメント解析で得られた  $p$  値)、横軸を Pathway impact (各パスウェイの差の大きさを示す) としてプロットした。各ノードは代謝パスウェイを示す。

表 3.4 パスウェイ解析結果（脳、8週齢）

	Pathway	Total	Hits	-LOG10(p)	FDR	Impact
1	Arginine biosynthesis	14	11	4.48	0.0006	0.60
2	Glycine, serine and threonine metabolism	34	10	4.19	0.0007	0.57
3	Histidine metabolism	16	8	4.06	0.0007	0.64
4	Cysteine and methionine metabolism	33	8	4.05	0.0007	0.50
5	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	3	3.66	0.0011	0.50
6	Arginine and proline metabolism	38	15	3.60	0.0012	0.60
7	Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	5	3.10	0.0030	0.57
8	beta-Alanine metabolism	21	9	3.08	0.0030	0.57

Total : パスウェイに含まれる代謝物数、Hit : 実際に検出された代謝物数、p : エンリッチメント解析で得られた p 値、FDR : False Discovery Rate によって補正された p 値、Impact : Pathway impact

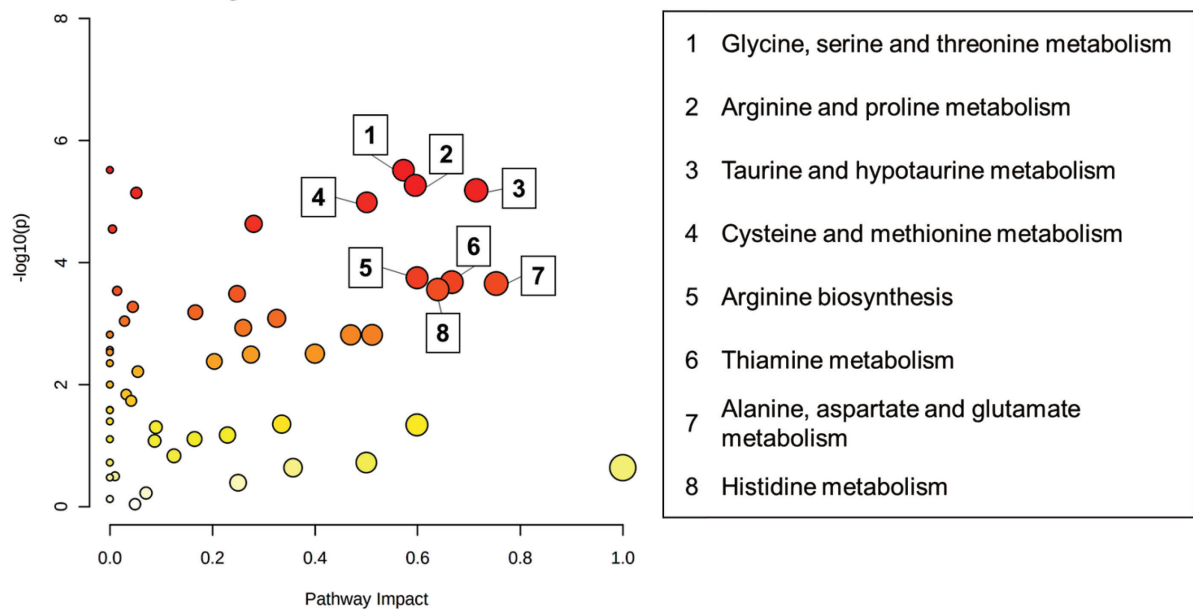


図 3.10 パスウェイ解析結果（脳、10 週齢）

縦軸を  $-\log_{10}(p)$  ( $p$  はエンリッチメント解析で得られた  $p$  値)、横軸を Pathway impact (各パスウェイの差の大きさを示す) としてプロットした。各ノードは代謝パスウェイを示す。

表 3.5 パスウェイ解析結果（脳、10 週齢）

	Pathway	Total	Hits	-LOG10(p)	FDR	Impact
1	Glycine, serine and threonine metabolism	34	10	5.51	0.0001	0.57
2	Arginine and proline metabolism	38	15	5.27	0.0001	0.60
3	Taurine and hypotaurine metabolism	8	3	5.19	0.0001	0.71
4	Cysteine and methionine metabolism	33	8	4.99	0.0001	0.50
5	Arginine biosynthesis	14	10	3.75	0.0010	0.60
6	Thiamine metabolism	7	4	3.68	0.0010	0.67
7	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	12	3.66	0.0010	0.75
8	Histidine metabolism	16	8	3.56	0.0011	0.64

Total : パスウェイに含まれる代謝物数、Hit : 実際に検出された代謝物数、p : エンリッチメント解析で得られた p 値、FDR : False Discovery Rate によって補正された p 値、Impact : Pathway impact

R6/2 マウスと WT マウスの比較解析（fold change analysis 及び t-test）及びパスウェイ解析の結果から、R6/2 マウスでは、ヒスチジン代謝、アルギニン代謝、システイン及びメチオニン代謝、グリシン・セリン・スレオニン代謝、脂質代謝及び神経伝達物質の代謝が顕著に変化することが明らかになった。以下、これらの代謝変化について詳述する。

### 3.3.1 ヒスチジン代謝

ハンチントン病におけるヒスチジン代謝の変化はこれまでほとんど報告されていないが、本研究ではヒスチジン代謝が R6/2 マウスで顕著に変化していることを見出した。R6/2 マウスの脳ではヒスチジン含有ジペプチドである carnosine と anserine の減少が認められた。さらに、R6/2 マウスでは histamine 代謝物である 1-methylhistamine 及び 1-methyl-4-imidazoleacetic acid の減少も認められた。



表 3.6 ヒスチジン代謝の変化（血漿）

Metabolite	Plasma, 8 weeks			Plasma, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Histidine	0.94	0.646	0.725	1.22	0.054	0.235
Carnosine	1.11	0.579	0.670	0.52	0.067	0.257
Anserine	0.54	0.014	0.041	1.03	0.866	0.961
beta-Alanine	0.84	0.116	0.172	0.78	0.004	0.067
1-Methylhistidine/ 3-Methylhistidine	1.17	0.099	0.151	1.23	0.021	0.144
Urocanic acid	0.72	0.012	0.038	0.79	0.112	0.352
Histamine	1.36	0.312	0.403	0.86	0.688	0.912
1-Methylhistamine	1.06	0.873	0.904	0.91	0.760	0.940
1-Methyl-4- imidazoleacetic acid	1.05	0.836	0.880	0.70	<0.001	0.007
Imidazole-4-acetic acid	0.91	0.677	0.745	0.65	0.030	0.177

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

表 3.7 ヒスチジン代謝の変化（脳）

Metabolite	Brain, 8 weeks			Brain, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Histidine	1.15	0.008	0.042	1.10	0.198	0.322
Carnosine	0.51	<0.001	0.002	0.50	<0.001	<0.001
Anserine	0.69	0.007	0.038	0.69	0.024	0.071
beta-Alanine	0.81	0.002	0.015	0.82	0.003	0.013
1-Methylhistidine/ 3-Methylhistidine	1.48	0.006	0.033	1.17	0.042	0.098
Histamine	0.88	0.493	0.679	1.03	0.883	0.930
1-Methylhistamine	0.36	<0.001	<0.001	0.35	<0.001	0.003
1-Methyl-4- imidazoleacetic acid	0.39	<0.001	<0.001	0.34	<0.001	0.004

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

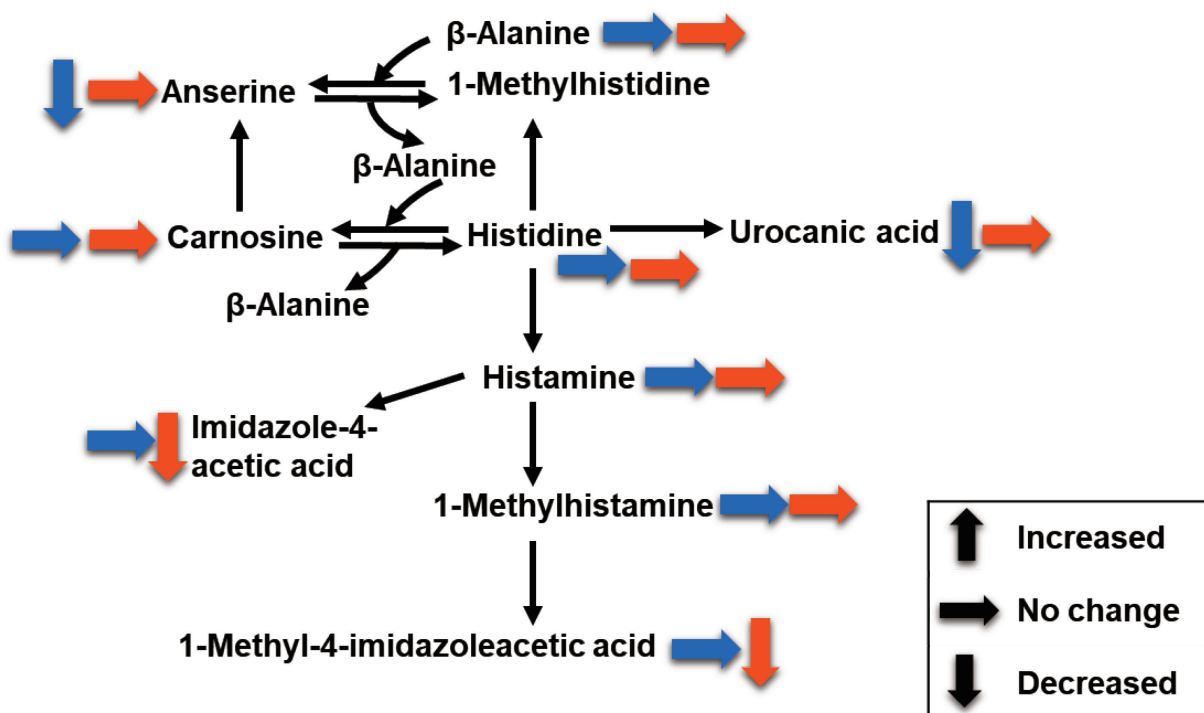


図 3.11 R6/2 マウス血漿におけるヒスチジン代謝の変化

青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。R6/2 マウスで増加した場合は上向きの矢印、減少した場合は下向きの矢印、変化がなかった場合は横向きの矢印で示した。

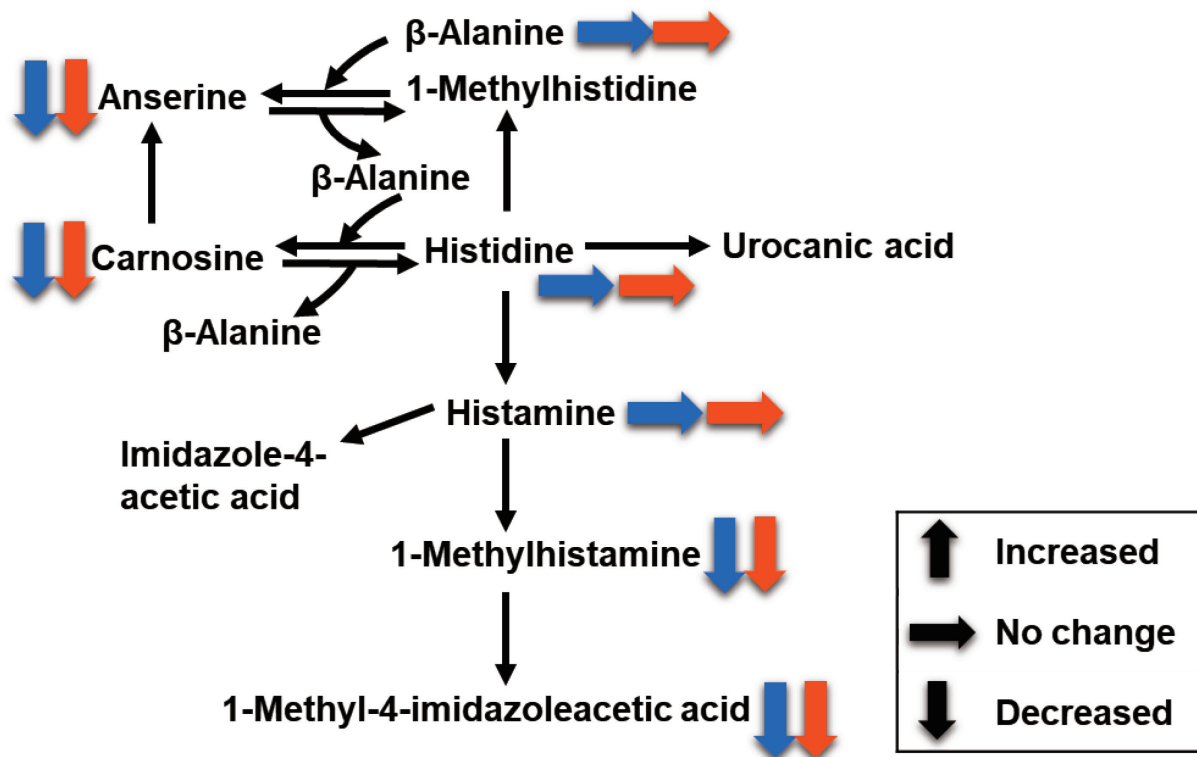


図 3.12 R6/2 マウス脳におけるヒスチジン代謝の変化  
青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。

R6/2 マウスの脳で減少が認められた carnosine と anserine の構造を図 3.13 に示した。Carnosine は histidine と beta-alanine から構成されるジペプチドであり、anserine は carnosine の誘導体である。

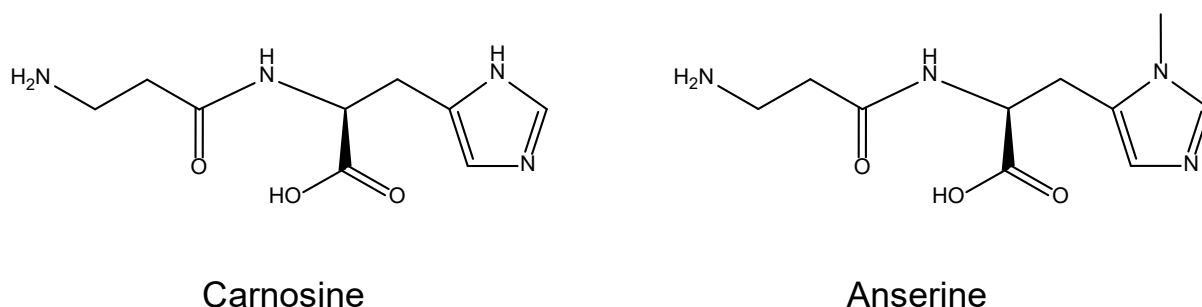


図 3.13 Carnosine と anserine

Carnosine 及び anserine は、ほ乳類の骨格筋や脳組織に多く分布し、抗酸化作用、金属イオンのキレート活性、抗糖化作用、pH 調節作用など様々な機能を有する[27][28]。また、近年では、神経保護作用や認知機能改善作用が注

目されている。アルツハイマー病における **carosine** 及び **anserine** の効果に関する研究は数多く行われており、**carosine** がアルツハイマー病の特徴であるアミロイド  $\beta$  ペプチドの凝集を防ぐことや[29]、**carosine** と **anserine** がアルツハイマー病モデルマウスにおいて神経保護効果や認知機能の改善効果を示すことが報告されている[30][31]。さらに、**carosine** と **anserine** の経口補充療法が高齢者の言語性記憶の維持に有効であることや、軽度認知機能障害患者の認知機能低下を抑制することも臨床研究で明らかにされている[32][33]。**Carosine** 及び **anserine** が神経保護作用や認知機能改善作用を示すメカニズムについては解明されていない点が多くあるが、**carosine** が血液脳関門を通過できることや、神経細胞を直接活性化し神経突起伸長を促すこと、さらに神経細胞において脳由来神経栄養因子 (**brain-derived neurotrophic factor: BDNF**) 及び神経成長因子 (**nerve growth factor: NGF**) の発現を誘導することなどが報告されている[34]。ハンチントン病では脳の皮質における **BDNF** 産生が低下すること、また皮質から線条体への **BDNF** 供給が低下することにより線条体ニューロンが死に至ることが知られている[35]。**R6/2** マウスで認められた **carosine** と **anserine** の低下は、ハンチントン病の神経変性の病態を反映すると考えられ、これらの補充による神経保護療法の可能性を示唆するものである。

**R6/2** マウスでは **histamine** 代謝物である **1-methylhistamine** 及び **1-methyl-4-imidazoleacetic acid** の減少も認められた。これらの構造を図 3.14 に示す。

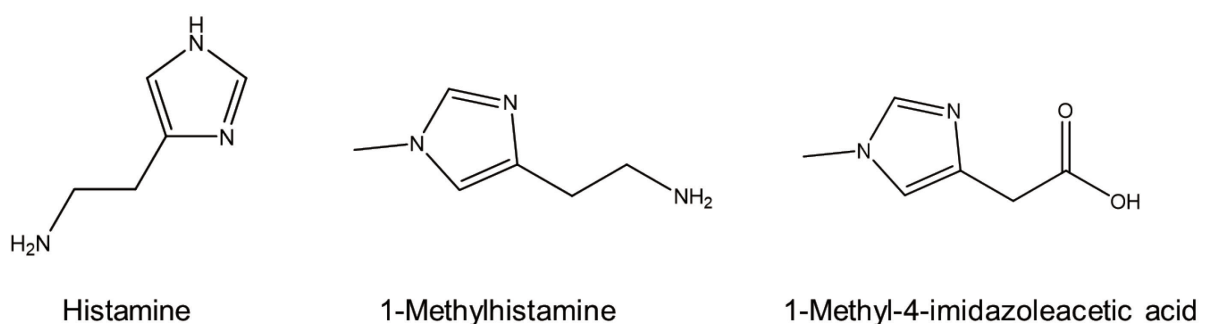


図 3.14 **Histamine**、**1-methylhistamine** 及び **1-methyl-4-imidazoleacetic acid**

**1-methylhistamine** 及び **1-methyl-4-imidazoleacetic acid** は、ヒスタミン固有の代謝産物であることから、ヒスタミン代謝の指標物質として知られている[36]。ヒスタミンは脳において、神経伝達物質や神経調節物質として作用する。脳のヒスタミン代謝系は、睡眠 - 覚醒サイクルの調節や、感覚及び運動

機能、認知や記憶など様々な生体機能に関与している[37][38]。最近の研究では、脳のヒスタミンシグナル伝達の異常が、アルツハイマー病やパーキンソン病など複数の神経変性疾患で明らかになっている[39]。また、ハンチントン病患者の死後脳を用いた研究では、脳のヒスタミンシグナルの増加が報告されている[40]。ハンチントン病の脳におけるヒスタミンシグナル伝達の変化とヒスタミン代謝の変化の関係性については、動物モデルやヒトでのさらなる研究が必要である。

### 3.3.2 アルギニン代謝

アルギニン代謝は尿素、一酸化窒素、クレアチン、ポリアミン、アミノ酸など、生化学的に重要かつ多様な分子の生産を担っている。R6/2 マウスではアルギニン周辺代謝に顕著な変化が認められた。

表 3.8 アルギニン代謝の変化（血漿）

Metabolite	Plasma, 8 weeks			Plasma, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Arginine	0.99	0.915	0.934	2.16	0.001	0.041
Ornithine	0.81	0.133	0.194	2.05	<0.001	0.030
Citrulline	0.89	0.621	0.705	1.95	<0.001	0.028
Argininosuccinic acid	1.02	0.933	0.948	1.34	0.009	0.093
Urea	0.86	0.196	0.274	0.94	0.311	0.649
Aspartic acid	1.05	0.799	0.857	1.03	0.810	0.945
Fumaric acid	0.99	0.990	0.995	0.91	0.842	0.953
Glycine	1.27	0.004	0.023	1.33	0.012	0.111
4-Guanidinobutyric acid	0.59	0.020	0.048	3.40	<0.001	0.010
Guanidoacetic acid	0.97	0.829	0.880	1.33	0.094	0.314
Creatine	1.25	0.013	0.041	1.16	0.101	0.327
Phosphocreatine	1.00	0.995	0.999	0.62	0.024	0.157
Creatinine	0.89	0.212	0.293	0.86	0.014	0.117

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

表 3.9 アルギニン代謝の変化 (脳)

Metabolite	Brain, 8 weeks			Brain, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Arginine	1.40	0.024	0.096	1.73	<0.001	0.002
Ornithine	1.05	0.563	0.731	1.79	<0.001	0.003
Citrulline	0.80	0.133	0.277	1.12	0.246	0.375
Argininosuccinic acid	1.07	0.493	0.679	1.41	0.016	0.051
Urea	0.87	0.182	0.345	0.92	0.124	0.223
Aspartic acid	0.83	0.002	0.015	0.97	0.700	0.784
Fumaric acid	0.86	0.025	0.099	0.83	0.080	0.157
Glycine	1.32	<0.001	0.002	1.41	<0.001	<0.001
4-Guanidinobutyric acid	0.89	0.147	0.302	1.18	0.026	0.072
Guanidoacetic acid	1.64	0.004	0.028	1.89	<0.001	0.002
Creatine	1.09	0.074	0.193	1.16	0.016	0.051
Phosphocreatine	1.30	0.010	0.051	1.42	0.071	0.148
Creatinine	0.95	0.339	0.540	1.00	1.000	1.000

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

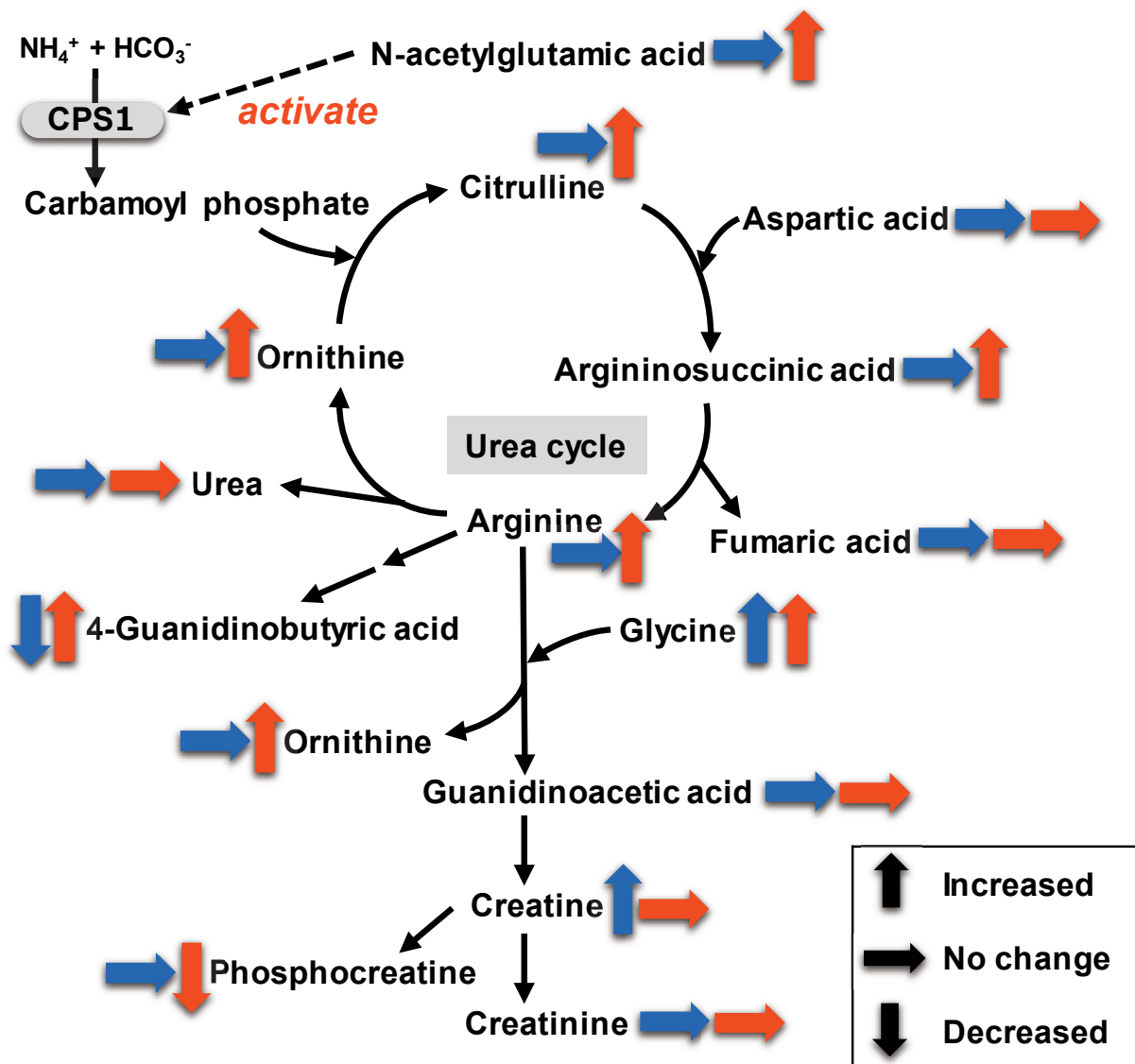


図 3.15 R6/2 マウス血漿におけるアルギニン代謝の変化  
 青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。  
 CPS1: carbamoyl-phosphate synthase 1.

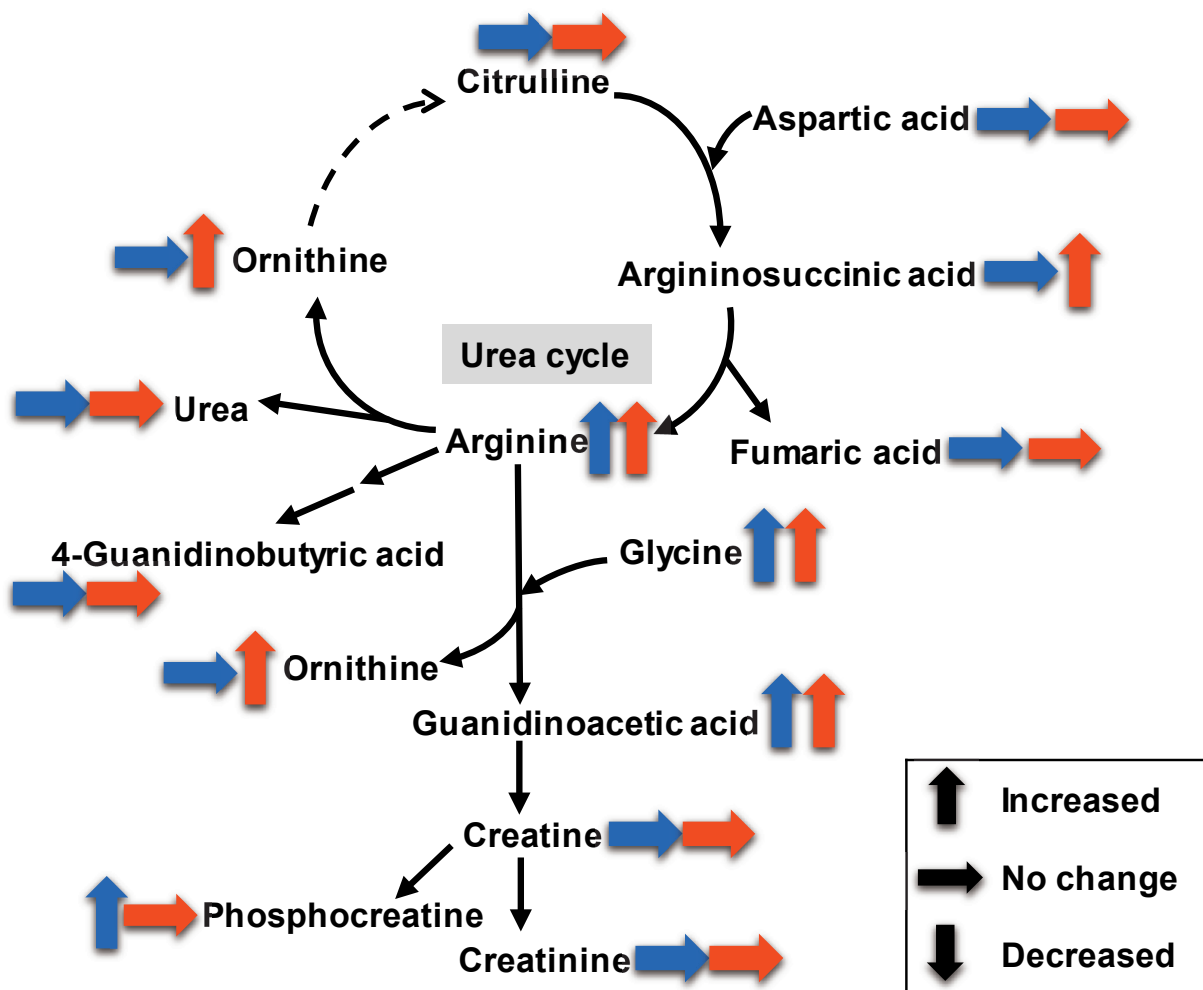


図 3.16 R6/2 マウス脳におけるアルギニン代謝の変化

青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。

アルギニン代謝系のひとつである尿素回路は、生体内の窒素代謝で生成される有害なアンモニアを尿素に変換して体外に排泄するための解毒機構を担っている。肝臓は尿素回路のすべての酵素を有しており、生体内のアンモニアの解毒の大部分を担っている。また、肝臓以外の組織にもアンモニアの解毒のための部分的な尿素回路が存在する。尿素回路の障害は高アンモニア血症の他、嘔吐、痙攣、意識障害、行動異常、発達障害などを引き起こす[41]。尿素回路を構成する代謝物のうち、arginine, citrulline, ornithine, arginosuccinic acid は R6/2 マウスの血漿で増加していた。また、arginine, ornithine, arginosuccinic acid は脳でも増加していた。



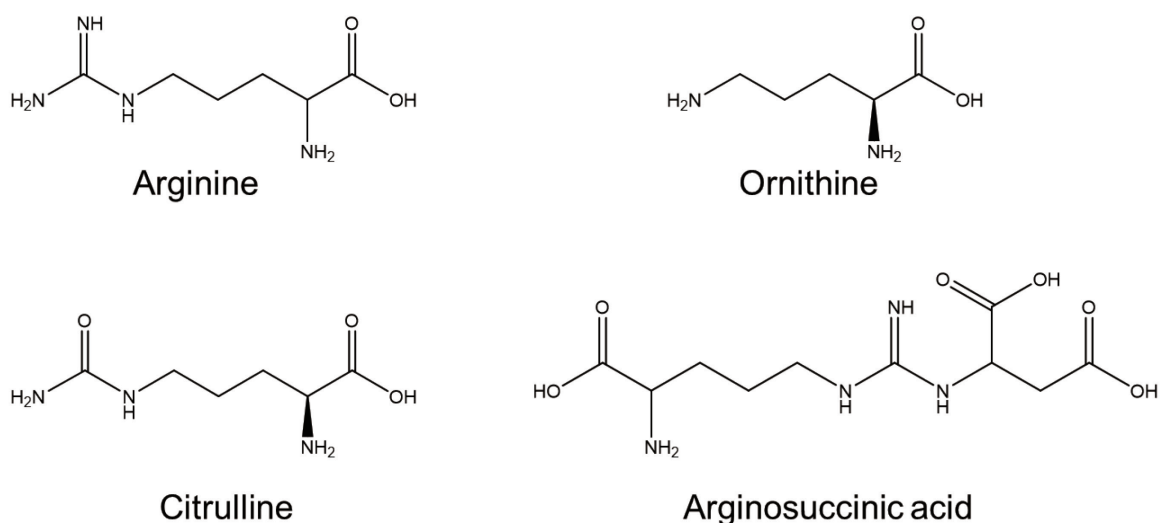


図 3.17 尿素回路を構成する代謝物

R6/2 マウスで認められた尿素回路の代謝物の変化は、ハンチントン病患者や動物モデルを対象とした過去の報告[42][43][44]と一致しており、これらの代謝物がハンチントン病のバイオマーカーであることを支持している。ハンチントン病における尿素回路の異常のメカニズムとしては、変異ハンチンチンが尿素回路酵素の転写因子と相互作用することにより、尿素回路酵素の発現異常が生じることが示唆されている[18]。

尿素回路の代謝物のうち、有意な増加が認められた代謝物の数は 8 週齢よりも 10 週齢の R6/2 マウスのほうが多く、尿素回路の各代謝物のレベルがハンチントン病の病態進行と関連している可能性が示唆された。また、R6/2 マウスの血漿では、有意差はつかなかったものの N-acetylglutamic acid の増加が認められた。N-acetylglutamic acid は、尿素回路の酵素である carbamoylphosphate synthetase 1 のアロステリック調節因子である[45]。このことから、R6/2 マウスにおける尿素回路亢進の背景には N-acetylglutamic acid の増加による carbamoylphosphate synthetase 1 の活性化が寄与することが示唆された。

Arginine は、一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の産生にも関わる。NO は、arginine から nitric oxide synthase (NOS) を介した citrulline への変換の際に生成し、血流の制御や内分泌機能、神経伝達、神経調節、炎症など、多くの生理学的プロセスの調節に関与する。R6/2 マウスの脳では、citrulline/arginine の比率 (NOS の活性の指標として用いられる) が低下しており、NOS の活性低下が示唆された。過去の研究では、NOS 活性と NO 産生の低下がハンチントン病における酸化ストレスの増加や神経毒性に寄与する可能性が示されて

いる[46]。また、R6/2 マウスの脳では、NOS のアイソザイムであり中枢神経系に発現する神経型 NOS のタンパク発現と酵素活性の両方が低下することが報告されている[47]。本研究で得られた知見は、これらの過去の報告を支持し、ハンチントン病の病態における NO 産生系の異常を示唆するものである。

R6/2 マウスの脳では、8 週齢と 10 週齢ともに guanidinoacetic acid と phosphocreatine の増加が認められた。Guanidinoacetic acid と phosphocreatine はともに arginine から生成するグアニジノ化合物である。

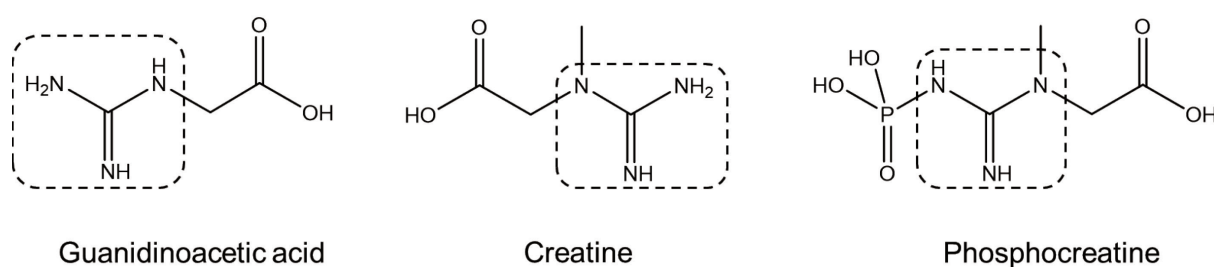


図 3.18 グアニジノ化合物

グアニジノ基を点線で示した。

Guanidinoacetic acid は creatine の前駆体であり、神経組織のエネルギー恒常性維持に重要な役割を担っている[48]。Phosphocreatine は高エネルギーリン酸の貯蔵庫として機能しており、creatine と phosphocreatine は脳のエネルギー恒常性維持に重要な役割を担っている[49]。R6/2 マウスの脳における guanidinoacetic acid と phosphocreatine の増加は、ハンチントン病の病態下で脳のエネルギー代謝の恒常性が変化していることを示しており、過去の報告とも一致するものであった[50]。R6/2 マウスにおけるグアニジノ化合物の増加は血漿では認められず脳のみで認められた。この理由としては、グアニジノ化合物やその合成前駆体の脳への分布が、血液脳関門及び血液脳脊髄液関門に発現するトランスポーターにより制御されているためと考えられる[51]。

### 3.3.3 システイン及びメチオニン代謝

Cysteine は、抗酸化ストレス作用を有する glutathione や taurine の合成に用いられる[52][53]。Methionine は、メチル基の代謝や、ポリアミン及び creatine の合成、cysteine 等の硫黄原子を含む含硫アミノ酸の合成に関与する

[54]。R6/2 マウスの脳ではシステイン及びメチオニン代謝に顕著な変化が認められた。

**表 3.10** システイン及びメチオニン代謝の変化（血漿）

Metabolite	Plasma, 8 weeks			Plasma, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Methionine	0.74	0.094	0.145	1.19	0.233	0.542
S-Adenosylmethionine	-	-	-	-	-	-
S-Adenosylhomocysteine	-	-	-	-	-	-
Homocysteine	0.95	0.635	0.717	0.90	0.390	0.715
Cystathionine	0.90	0.656	0.729	1.05	0.776	0.940
Cysteine	1.73	0.018	0.046	1.38	0.050	0.233
r-Glu-Cys	-	-	-	-	-	-
Glutathione (GSH)	-	-	-	-	-	-
Oxidized glutathione (GSSG)	0.44	0.005	0.023	0.72	0.157	0.431
Cystine	1.50	<0.001	0.009	1.34	0.047	0.226
Hypotaurine	0.68	0.166	0.237	0.79	0.146	0.414
Taurine	1.21	0.052	0.091	1.06	0.640	0.894
Serine	1.20	0.015	0.042	1.37	0.001	0.038

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

表 3.11 システイン及びメチオニン代謝の変化 (脳)

Metabolite	Brain, 8 weeks			Brain, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Methionine	1.11	0.114	0.248	1.31	0.008	0.031
S-Adenosylmethionine	1.14	0.055	0.164	1.30	0.001	0.008
S-Adenosylhomocysteine	0.99	0.907	0.949	0.83	0.064	0.139
Homocysteine	-	-	-	-	-	-
Cystathionine	1.46	0.001	0.014	2.42	<0.001	<0.001
Cysteine	0.85	0.582	0.735	2.81	<0.001	0.003
r-Glu-Cys	1.07	0.563	0.731	1.28	0.252	0.381
Glutathione (GSH)	1.16	0.360	0.545	2.16	0.012	0.042
Oxidized glutathione (GSSG)	0.97	0.859	0.936	0.88	0.310	0.439
Cystine	-	-	-	-	-	-
Hypotaurine	1.09	0.601	0.745	1.95	<0.001	<0.001
Taurine	1.14	0.002	0.018	1.22	0.005	0.019
Serine	0.85	0.012	0.056	0.89	0.082	0.159

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

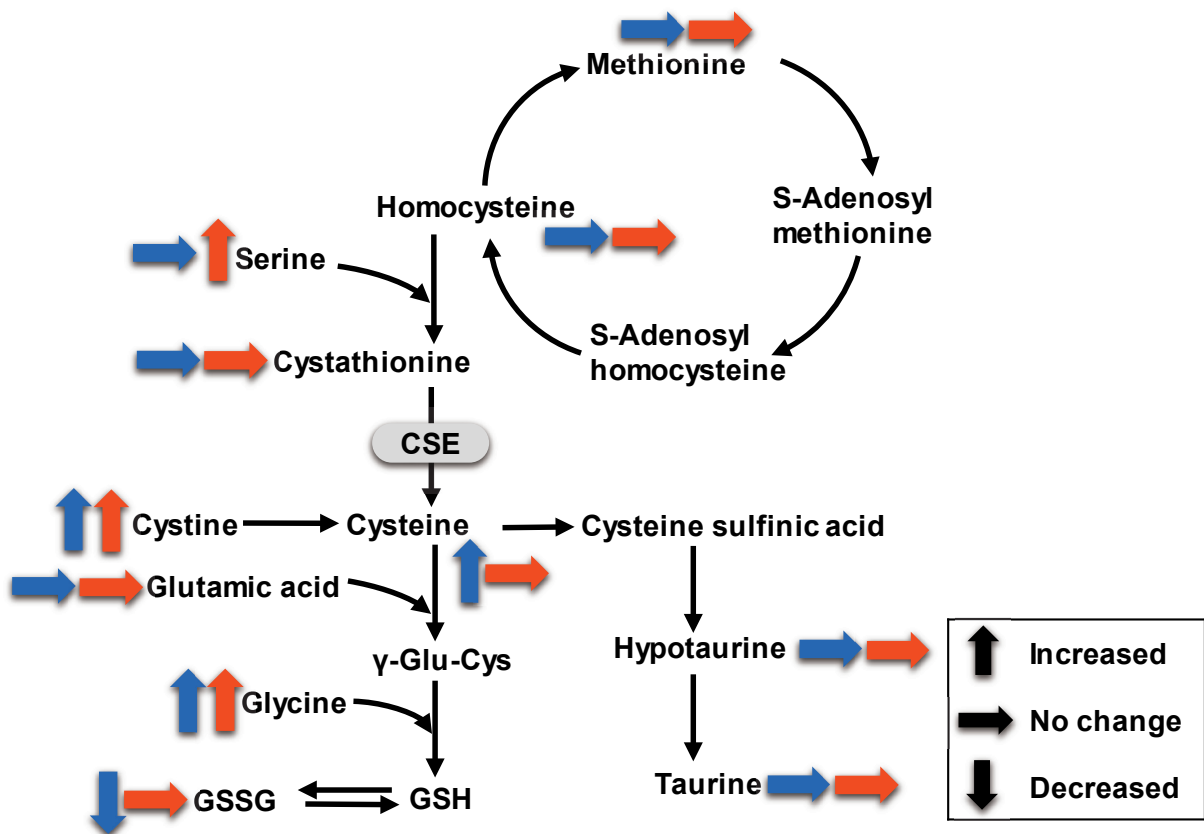


図 3.19 R6/2 マウス血漿におけるシステイン及びメチオニン代謝の変化  
 青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。

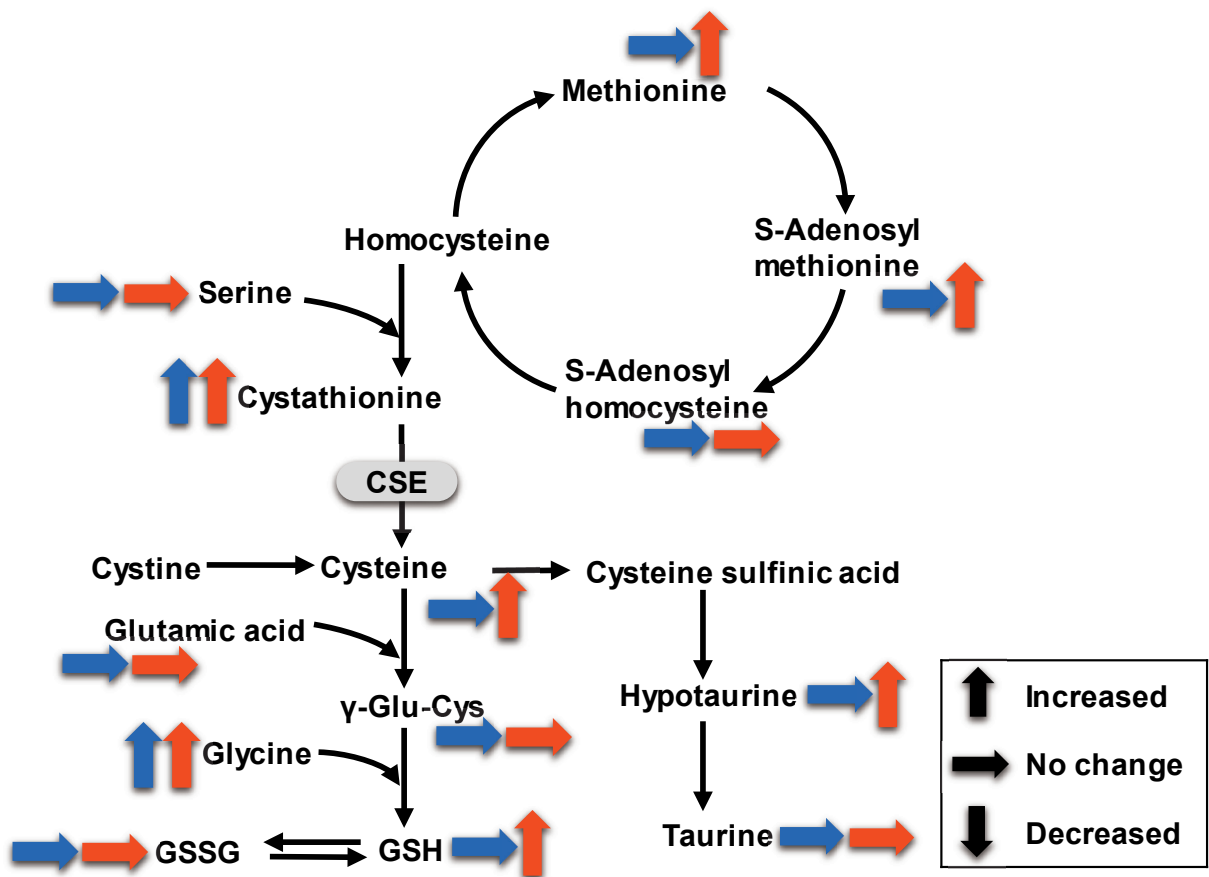


図 3.20 R6/2 マウス脳におけるシステイン及びメチオニン代謝の変化  
 青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。

R6/2 マウスでは脳の cystathionine の有意な増加が 8 週齢と 10 週齢ともに認められた。Cystathionine は cysteine の前駆体であり、cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) を介して cysteine に変換される (図 3.21)。ハンチントン病患者及び R6/2 マウスの脳では、CSE の大部分が欠損していることが報告されている。この機序としては、変異ハンチンチンタンパクが CSE の転写因子である specificity protein 1 (SP1) に結合することで、SP1 による CSE の転写活性化が抑制され、その結果 CSE の発現が転写レベルで阻害されるものと考えられている [55]。R6/2 マウスの脳で認められた cystathionine の増加は、CSE の欠損による脳内 cystathionine の蓄積を示唆するものである。

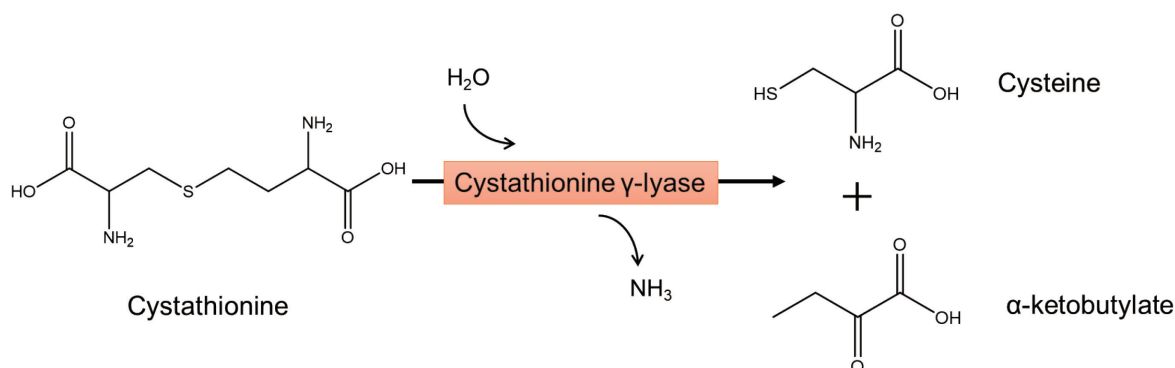


図 3.21 Cystathionine γ-lyase を介する cystathionine の代謝反応

10 週齢の R6/2 マウスの脳では、hypotaurine と glutathione の増加も認められた。これらの代謝物並びに cysteine は、抗酸化作用や細胞保護作用を有しており、生体内の酸化ストレス応答に重要な役割を果たしている[56][57]。酸化ストレスの増大は、ハンチントン病の神経細胞死の一因であると報告されている[58]。R6/2 マウス脳における抗酸化作用を有する代謝物の増加が 8 週齢より 10 週齢で顕著であったことから、病態進行とともに増大する酸化ストレスへの応答が示唆された。

### 3.3.4 グリシン・セリン・スレオニン代謝

R6/2 マウスでは、グリシン・セリン・スレオニン代謝の変化も認められた。Glycine や serine、threonine はいずれもアミノ酸であり、タンパク質や小分子代謝物など様々な生体分子の前駆体となる。また、glycine や serine は神経伝達物質としても機能する。R6/2 マウスでは 10 週齢の血漿と脳において glycine や threonine、serine の増加が認められた。脳では glycine や serine 周辺の代謝物 (guanidinoacetic acid 及び cystathionine) にも変化が認められており、これらについては 3.3.1 項及び 3.3.3 項にて言及した。

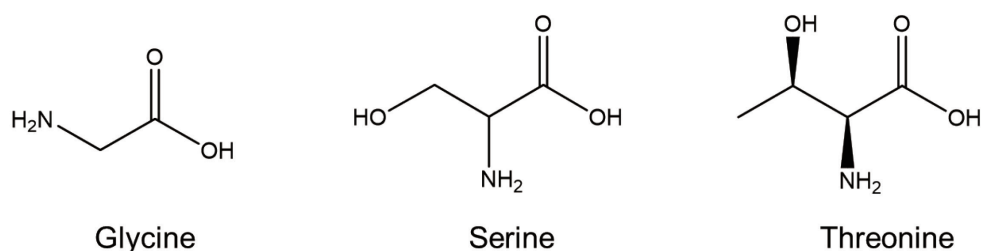


図 3.22 Glycine、serine 及び threonine

表 3.12 グリシン・セリン・スレオニン代謝の変化（血漿）

Metabolite	Plasma, 8 weeks			Plasma, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Choline	0.89	0.040	0.076	0.98	0.855	0.956
Betaine	1.06	0.441	0.534	1.24	0.040	0.213
N,N-Dimethylglycine	0.883	0.387	0.481	1.24	0.012	0.111
Sarcosine	0.763	0.073	0.119	1.25	0.076	0.278
Threonine	0.938	0.259	0.345	1.49	0.002	0.045
Glycine	1.27	0.004	0.023	1.33	0.012	0.111
Guanidoacetic acid	0.97	0.829	0.880	1.33	0.094	0.314
Creatine	1.25	0.013	0.041	1.16	0.101	0.327
Serine	1.20	0.015	0.042	1.37	0.001	0.038
Cystathionine	0.90	0.656	0.729	1.05	0.776	0.940
Cysteine	1.73	0.018	0.046	1.38	0.050	0.233
Pyruvate	0.806	0.018	0.046	0.672	0.015	0.122

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate



表 3.13 グリシン・セリン・スレオニン代謝の変化（脳）

Metabolite	Brain, 8 weeks			Brain, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Choline	0.94	0.207	0.368	0.89	0.035	0.091
Betaine	0.66	0.013	0.059	0.56	0.005	0.021
Threonine	1.22	0.027	0.101	1.50	<0.001	0.001
Glycine	1.32	<0.001	0.002	1.41	<0.001	<0.001
Guanidoacetic acid	1.64	0.004	0.028	1.89	<0.001	0.002
Creatine	1.09	0.074	0.193	1.16	0.016	0.051
Serine	0.85	0.012	0.056	0.89	0.082	0.159
Cystathionine	1.46	0.001	0.014	2.42	<0.001	<0.001
Cysteine	0.85	0.582	0.735	2.81	<0.001	0.003

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

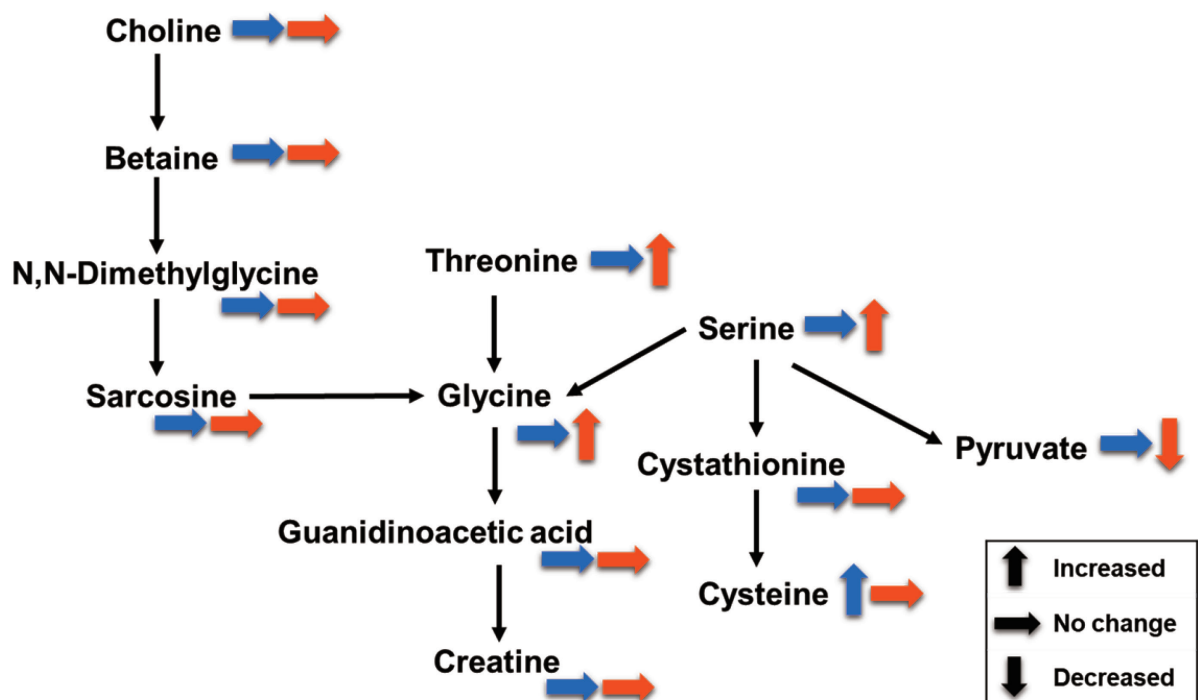


図 3.23 R6/2 マウス血漿におけるグリシン・セリン・スレオニン代謝の変化

青色矢印は8週齢、赤色矢印は10週齢の変化を示す。R6/2 マウスで増加した場合は上向きの矢印、減少した場合は下向きの矢印、変化がなかった場合は横向きの矢印で示した。

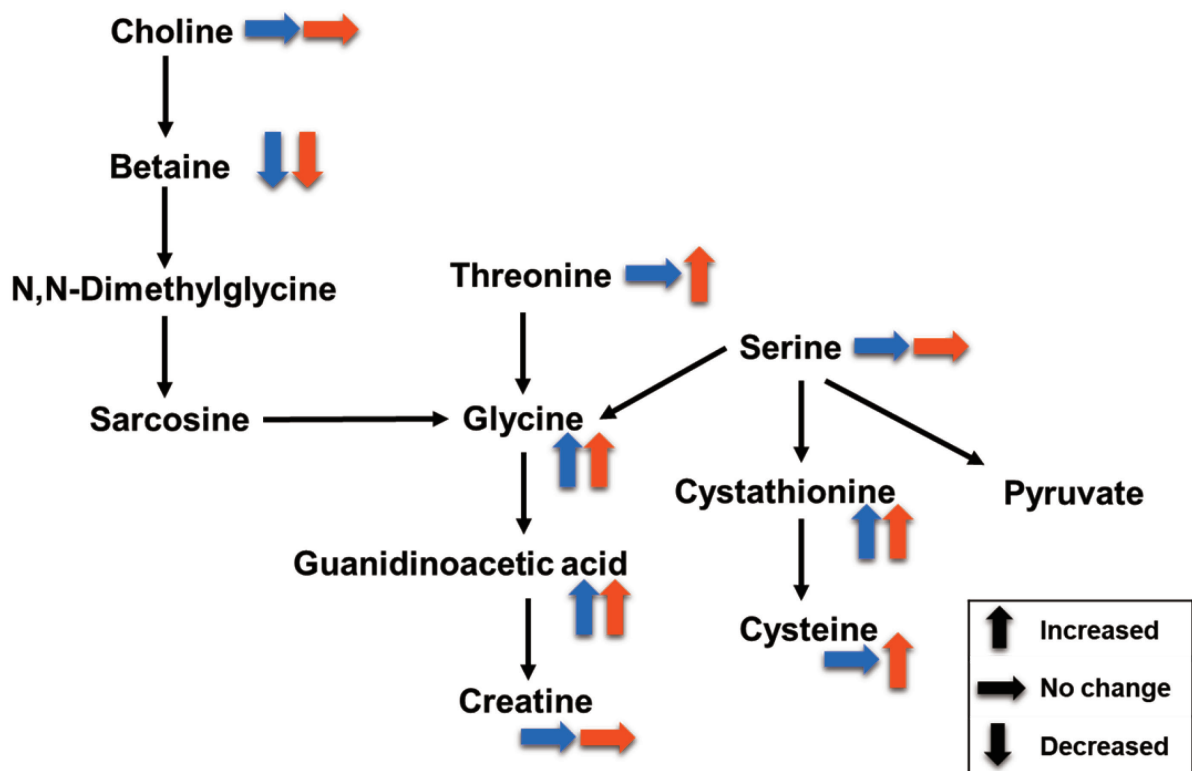


図 3.24 R6/2 マウス脳におけるグリシン・セリン・スレオニン代謝の変化  
 青色矢印は 8 週齢、赤色矢印は 10 週齢の変化を示す。R6/2 マウスで増加した場合は上向きの矢印、減少した場合は下向きの矢印、変化がなかった場合は横向きの矢印で示した。

Glycine の増加は、ハンチントン病患者の血漿や CSF、R6/2 マウスの尿及び筋肉でも報告されている[59][60][61]。ハンチントン病患者の血清で serine と threonine が増加したという報告もある[20]。さらに、アルツハイマー病患者の死後脳を用いた研究においても serine と threonine が報告されている[62]。Glycine は N-メチル-d-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の共アゴニストとして作用する。NMDA 受容体は中枢神経系を中心に生体内に広く分布し、興奮性シナプス伝達、記憶や学習に関与する。神経変性疾患を含む様々な精神神経疾患において、NMDA 受容体の機能障害が報告されており、治療ターゲットにもなっている[63]。ハンチントン病では、NMDA 受容体の過剰な活性化が、神経興奮毒性を引き起こすと考えられている。ハンチントン病で形成される変異型ハンチンチンの凝集体は、NMDA 受容体を介した細胞毒性に対するニューロンの感受性を高めることも報告されている[64]。本研究で認められたグリシン・セリン・スレオニン代謝の変化は、ハンチントン病におけるこれらの代謝変化の病態への寄与を示唆するものである。

R6/2 マウスの血漿では、pyruvate の減少も認められた。Pyruvate は解糖系の最終産物であり、エネルギー代謝の基質となるほか、神経保護作用があることも報告されている[65]。R6/2 マウスの血漿における pyruvate の低下は、病態化におけるエネルギー代謝の低下や、神経変性状態を反映している可能性がある。

R6/2 マウスの脳では、betaine の減少も認められた。Betaine はメチル基供与体としての機能を有し、メチオニン代謝やミトコンドリア機能の調節にも関わるほか、細胞の浸透圧調節物質としても重要な役割を果たしている。神経変性を呈する多発性硬化症の患者の脳では betaine の減少が報告されている[66]。また、アルツハイマー病患者において betaine を食事で補充することにより、タウタンパク質の過剰リン酸化の抑制や、記憶関連タンパク質の増加、認知機能の改善が報告されている[67]。ハンチントン病と betaine の関係、また補充療法の可能性については今後の研究課題である。

### 3.3.5 脂質代謝

R6/2 マウス血漿では特定の脂質クラスの変化が認められ、トリアシルグリセロール、ホスファチジルコリン、グリセロホスホコリン、コレステロールエステル、セラミド、及びヘキソシルセラミドの増加が認められた。一方で、アシルカルニチン、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ヒドロキシスフィンゴミエリン、ジアシルグリセロールにはほとんど変化はなかった。

表 3.14 R6/2 マウス血漿中の脂質の変化

Lipid class	Measured	Detected		Differential metabolites (increased/decreased)*	
		8 weeks	10 weeks	8 weeks	10 weeks
Triacylglycerol	242	196	194	156/0	0/0
Phosphatidylcholine	76	66	67	49/0	2/0
Glycerophosphocholine	1	1	1	1/0	1/0
Cholesterol ester	22	15	14	10/0	5/0
Ceramide	28	9	7	7/0	0/0
Hexosylceramide	34	7	6	5/0	3/0
Acylcarnitine	40	9	8	0/1	0/0
Lysophosphatidylcholine	14	9	9	1/0	2/0
Sphingomyelin	10	9	10	1/0	1/0
Hydroxysphingomyelin	5	5	5	1/0	0/0
Diacylglycerol	44	17	16	4/0	0/0

\*number of metabolites with fold change > 1.3 (increased) or < 0.77 (decreased), p-value < 0.05, and FDR < 0.1.

脂質は生体膜を構成する他、エネルギー源貯蔵庫として機能し、プロスタグランジンやロイコトリエン等の細胞シグナル伝達物質の前駆体ともなる。細胞内の脂質とタンパク質の相互作用は、生体の恒常性維持に不可欠であり、脂質組成の変化は膜輸送やシグナル伝達などの細胞機能に影響を与える[68][69][70]。脂質代謝障害はハンチントン病やアルツハイマー病、パーキンソン病を含む神経変性疾患の特徴の一つである[71]。アルツハイマー病では高コレステロール血症が発症リスクを増加させることや、トリアシルグリセロールの増加が星状細胞を介して神経炎症を誘発し、アルツハイマー病の発症機序に関連していることが明らかにされている[72]。また、パーキンソン病患者では血漿中のセラミド及びヘキソシルセラミドのレベルの上昇が報告されている[73]。ハンチントン病では、変異ハンチンチンタンパク質がステロール調節エレメント結合タンパク質などの転写因子と相互作用することで、コレステロールや脂肪酸代謝の調節異常に重要な役割を果たすと考えられている[74][75]。また、変異ハンチンチンタンパクがリン脂質二重層の安

定性に直接的な障害を引き起こすことや、この過程が変異ハンチンチンの凝集に関係していることも報告されている[76][77]。

脂質は構成される脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度の違い、あるいは極性基の違いにより幅広い分子多様性を有する。本研究では、脂質分子を網羅的に分析することで、R6/2 マウスにおける脂質プロファイルの変化を明らかにした。

ホスファチジルコリンは、生体膜の脂質二重層の主成分である。また、スフィンゴ脂質（セラミドなど）やスフィンゴ糖脂質（ヘキサシルセラミドなど）はコレステロールと共に細胞膜上で集合し、脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成する。脂質ラフトは細胞膜上でシグナル伝達分子を会合させることにより、生体膜を介するシグナル伝達の中継地点として機能する[78]。

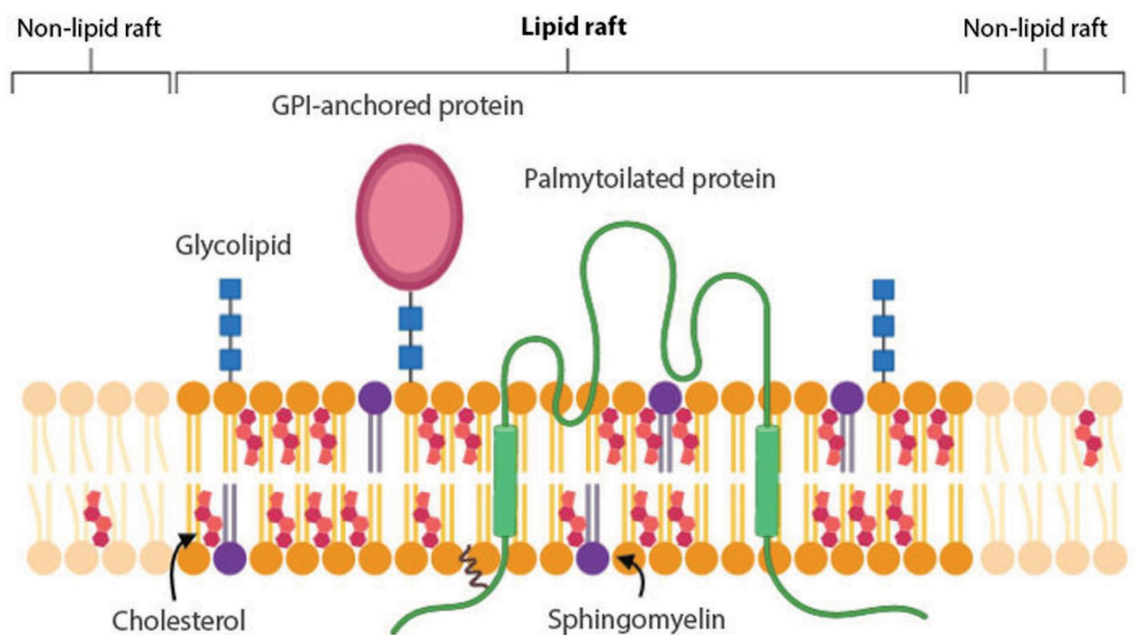


図 3.25 細胞膜のリン脂質二重層と脂質ラフト

(文献[73]の Figure 1 より引用)

R6/2 マウスの血漿ではホスファチジルコリンやセラミド、ヘキサシルセラミドの生体膜の構成成分の増加が認められた。これらの生体膜の生合成変化は、膜輸送及び細胞シグナル伝達カスケードの変化を示唆している[79]。トリアシルグリセロールの増加も R6/2 マウスの血漿で認められたが、これはトリアシルグリセロールがホスファチジルコリンの生合成に密接に関わる

ことに起因する可能性がある[80][81]。

R6/2 マウス血漿中の各脂質クラスの変化には、週齢間で異なるものもあり、8週齢と10週齢で生体内の脂質代謝が変化することが示された。ヘキシルセラミド、コレステロールエステル、グリセロホスホコリンの増加は8週齢と10週齢の両方で観察された。一方、トリアシルグリセロール、ホスファチジルコリン、及びセラミドの増加は、8週齢で顕著であった(図 3.26)。

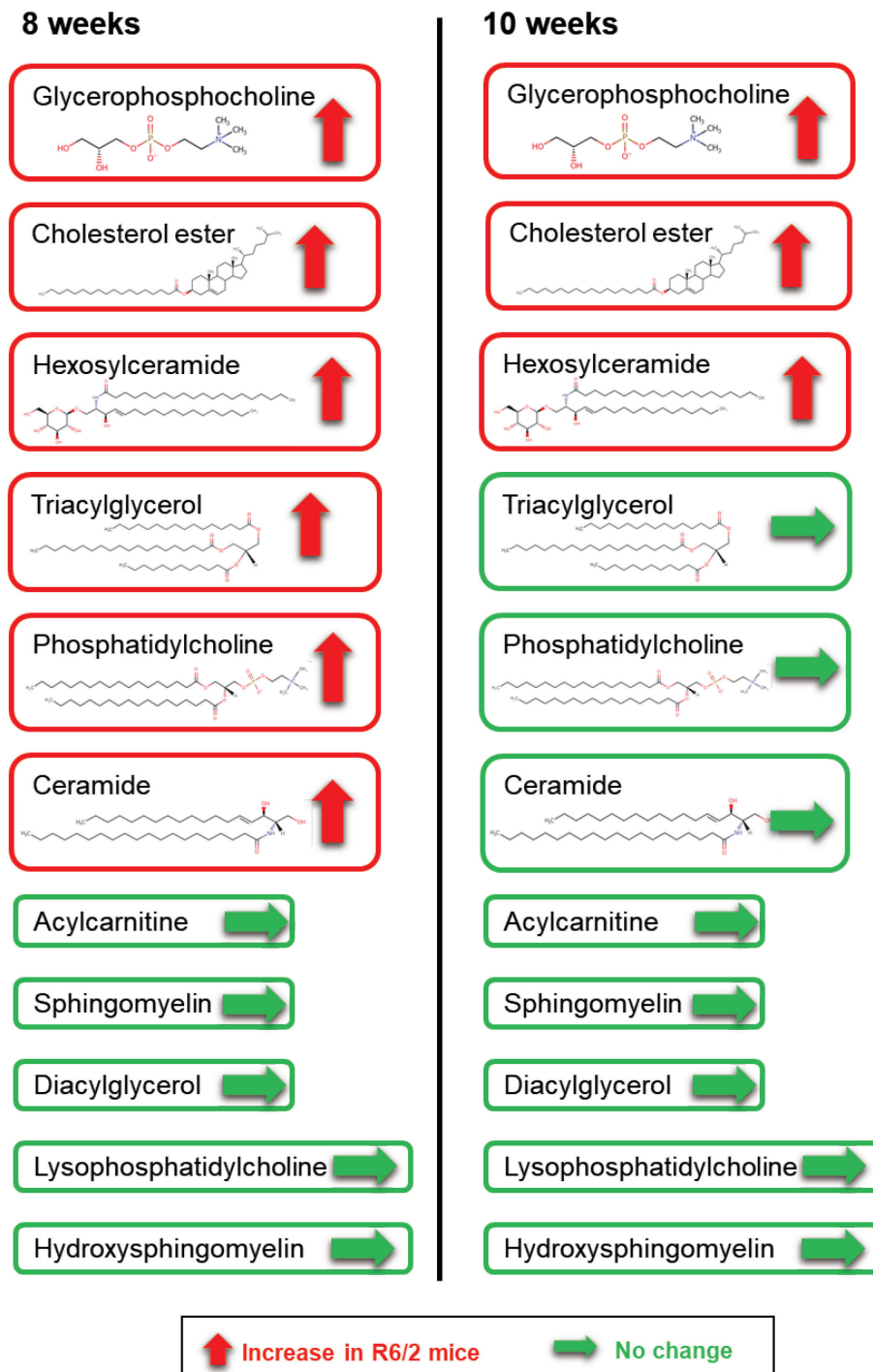


図 3.26 R6/2 マウスの各週齢における脂質変化の比較

R6/2 マウスは 8 週齢前後から進行性の運動障害を示す[12][13]。R6/2 マウスで認められた特定の脂質クラスの変化が運動障害の出現に関連している場合、病態初期のバイオマーカーとして役立つ可能性がある。これらの変化が、病態の発症前などさらに早い段階で始まるかどうかは、今後の研究で取り組むべき課題である。また、血漿で認められた脂質の代謝変化が脳組織あるいは脳脊髄液で検出できるかという点も、今後追及すべき課題である。

メタボロミクスの中でも脂質を対象としたリポドミクスの研究は、その技術革新も相まって近年では報告が増えている。ハンチントン病の患者の試料を用いた最近の研究においては、特定のホスファチジルコリンがバイオマーカー候補となることが報告されている。Mastrokolias らは、血清中の phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:0 の低下がハンチントン病の重症度と相関することを報告した[82]。また、Cheng らは血漿中の phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:0、phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:0 及び lysophosphatidylcholine acyl C20:3 の低下を報告している[83]。本研究においては、R6/2 マウス血漿で上記のホスファチジルコリンの分子種の変化は認められていない。ハンチントン病の患者及び動物モデルの脂質プロファイルの違いについては、今後検証する必要があると考えられる。

### 3.3.6 神経伝達物質の代謝

R6/2 マウスの脳では複数の神経伝達物質の変化が検出された。神経伝達物質は、神経細胞間のシナプスにおいて情報伝達を介在する役割を担っており、精神神経疾患の病態生理に関わることが知られている。ハンチントン病ではうつ症状や運動障害が認められるが、これらの症状には神経伝達物質を介する神経伝達の機能不全が関与すると考えられている[84][85][86]。本研究では、R6/2 マウスの脳において、脳内の主要な神経伝達物質の変化を検出した。Serotonin、dopamine（構造異性体である octopamine との総和として検出）、noradrenaline（構造異性体である 6-hydroxydopamine との総和として検出）、acetylcholine は R6/2 マウスの脳で減少していた。また、histamine 代謝物である 1-methylhistamine 及び 1-methyl-4-imidazoleacetic acid も減少しており（3.3.1 項）、histamine の異化作用の低下や脳におけるヒスタミンシグナルの変化を示唆していた。

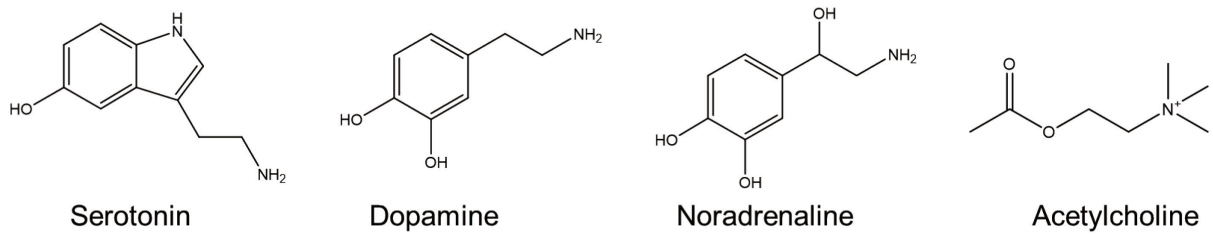


図 3.27 Serotonin、dopamine、noradrenaline 及び acetylcholine

表 3.15 R6/2 マウス脳中の神経伝達物質の変化

Metabolite	Brain, 8 weeks			Brain, 10 weeks		
	FC	p	FDR	FC	p	FDR
Serotonin	0.47	<0.001	<0.001	0.38	<0.001	<0.001
Dopamine/Octopamine	0.64	<0.001	<0.001	0.61	<0.001	<0.001
Noradrenaline/ 6-Hydroxydopamine	0.41	<0.001	0.0463	-	-	-
Acetylcholine	0.69	<0.001	0.0319	0.72	0.0168	0.0513
$\gamma$ -Aminobutyric acid	0.916	0.113	0.248	0.97	0.613	0.723
Histamine	0.88	0.493	0.679	1.03	0.883	0.930
1-Methylhistamine	0.36	<0.001	<0.001	0.35	<0.001	0.003
1-Methyl-4- imidazoleacetic acid	0.39	<0.001	<0.001	0.34	<0.001	0.004

FC: fold change in R6/2 mice compared with WT mice, p: p-value, FDR: false discovery rate

ハンチントン病の症状の一つとして、うつ症状、不安、過敏症などの気分障害がある。Serotonin や noradrenaline、dopamine はうつ病と密接に関連する代謝物である。うつ病ではこれらの神経伝達物質のシグナル伝達に異常が生じていることが知られており、うつ病の治療薬の多くがこれらの代謝物を標的としている[87]。ハンチントン病で認められるうつ症状などの気分障害においても、脳内のセロトニン作動性シグナルが変化することや、セロトニンレベルの低下が関与することが報告されている[88]。また、ハンチントン病モデルマウスにおいてもうつ症状が観察されており、脳におけるセロトニンやドパミンの減少や、セロトニン受容体の発現量の低下が認められる[89][90][91]。本研究で認められた R6/2 マウス脳での serotonin 等の神経伝達物質



の減少は、ハンチントン病に関する過去の報告を支持するものであり、ハンチントン病における神経伝達物質の変化が有用な治療ターゲットとなることを示唆している。

### 3.4 結語

本研究では、複数のメタボロミクス分析プラットフォームを組み合わせることで代謝物の網羅性を向上し、ハンチントン病モデル動物として創薬研究で汎用される R6/2 マウスのワイドターゲットメタボロミクスを実施した。その結果、R6/2 マウスの血漿及び脳において様々な代謝変化が明らかになった。

R6/2 マウスの脳で観察された **carosine** 及び **anserine** の減少は、ハンチントン病の神経変性状態を反映する可能性があるとともに、これらの分子をターゲットとした治療の可能性を示唆している。Histamine 代謝物の **1-methylhistamine** 及び **1-methyl-4-imidazoleacetic acid** の脳における減少は、ハンチントン病とヒスタミンシグナルとの関係を示唆するものである。また、アルギニン代謝、システイン代謝及びメチオニン代謝経路の代謝物の多くにも変化が認められ、病態下における尿素回路の異常や酸化ストレスの増加、エネルギー恒常性の乱れを反映していた。グリシン・セリン・スレオニン代謝の変化は、これらの代謝物がハンチントン病と関連するという過去の知見を支持するものであった。さらに、特定の脂質クラスの変化は、ハンチントン病の病態進行に関連する脂質代謝の調節異常を示唆するものであった。病態下の脳における神経伝達物質の代謝変化も検出され、これらを治療ターゲットとすることの妥当性が示唆された。

本研究で見出されたバイオマーカーは、病態の進行や薬剤の有効性の指標として、創薬の前臨床段階及び臨床段階での活用が期待される。さらに、本研究で得られた多数の代謝異常は、今後のハンチントン病の病態解明や新たな治療ターゲットの探索にも有用と考えられる。メタボロミクスに加えてプロテオミクスやトランスクリプトミクスを活用することによって、さらに包括的に生体内の代謝変化を捉えることが期待される。病態のパラメータと代謝変化の相関解析も有用である。本研究では脳における代謝変化も多数検出されているため、脳の部位ごとに代謝変化を観察することや、臨床でも採取可能な脳脊髄液においても脳と同様の代謝変化を検出できるかという点も今後の検討課題である。

### 3.5 参考文献

1. Wishart DS. Applications of metabolomics in drug discovery and development. *Drugs R D*. 2008;9(5):307-322. doi:10.2165/00126839-200809050-00002
2. Kaddurah-Daouk R, Soares JC, Quinones MP. Metabolomics: A global biochemical approach to the discovery of biomarkers for psychiatric disorders. *Biomarkers for Psychiatric Disorders*. 2009:129-162. doi:10.1007/978-0-387-79251-4\_6
3. Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet*. 2014;384(9942):545-555. doi:10.1016/S0140-6736(14)61010-2
4. 難病情報センター ハンチントン病ページ (2021.12.21アクセス)  
<https://www.nanbyou.or.jp/entry/175>
5. Gusella JF, MacDonald ME. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1(2):109-115. doi:10.1038/35039051
6. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971-983. doi:10.1016/0092-8674(93)90585-e
7. Schulte J, Littleton JT. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr Trends Neurol*. 2011;5:65-78.
8. Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron*. 2016;89(5):910-926. doi:10.1016/j.neuron.2016.02.003
9. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 1996;87(3):493-506. doi:10.1016/s0092-8674(00)81369-0
10. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*.

- 1999;19(8):3248-3257. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-08-03248.1999
11. Menalled LB, Chesselet MF. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(1):32-39. doi:10.1016/s0165-6147(00)01884-8
  12. Hockly E, Woodman B, Mahal A, Lewis CM, Bates G. Standardization and statistical approaches to therapeutic trials in the R6/2 mouse. *Brain Res Bull.* 2003;61(5):469-479. doi:10.1016/s0361-9230(03)00185-0
  13. Reiner A, Del Mar N, Deng YP, Meade CA, Sun Z, Goldowitz D. R6/2 neurons with intranuclear inclusions survive for prolonged periods in the brains of chimeric mice. *J Comp Neurol.* 2007;505(6):603-629. doi:10.1002/cne.21515
  14. van der Burg JM, Björkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 2009;8(8):765-774. doi:10.1016/S1474-4422(09)70178-4
  15. Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, Ellis DI, Michell AW, Vacher C, Mosedale DE, Kell DB, Barker RA, Grainger DJ, Rubinsztein DC. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain.* 2006;129(Pt 4):877-886. doi:10.1093/brain/awl027
  16. Leoni V, Caccia C. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(8):1095-1105. doi:10.1016/j.bbali.2014.12.018
  17. Gruber B, Kłaczko G, Jaworska M, et al. Huntington' disease--imbalance of amino acid levels in plasma of patients and mutation carriers. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(4):779-783.
  18. Chiang MC, Chen HM, Lee YH, et al. Dysregulation of C/EBPalpha by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16(5):483-498. doi:10.1093/hmg/ddl481
  19. Mochel F, Charles P, Seguin F, et al. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One.* 2007;2(7):e647. doi:10.1371/journal.pone.0000647
  20. Mastrokoulas A, Pool R, Mina E, et al. Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood

- samples. *Metabolomics*. 2016;12:137. doi:10.1007/s11306-016-1084-8
21. Leoni V, Mariotti C, Tabrizi SJ, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. *Brain*. 2008;131(Pt 11):2851-2859. doi:10.1093/brain/awn212
  22. Phillips GR, Hancock SE, Brown SHJ, et al. Cholesteryl ester levels are elevated in the caudate and putamen of Huntington's disease patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):20314. doi:10.1038/s41598-020-76973-8
  23. Soga T, Heiger DN. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000;72(6):1236-1241. doi:10.1021/ac990976y
  24. Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Ohashi Y, Tomita M, Nishioka T. Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74(10):2233-2239. doi:10.1021/ac020064n
  25. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2003;2(5):488-494. doi:10.1021/pr034020m
  26. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2019;68(1):e86. doi:10.1002/cpbi.86
  27. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803-1845. doi:10.1152/physrev.00039.2012
  28. Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol*. 2005;513(1-2):145-150. doi:10.1016/j.ejphar.2005.02.010
  29. Attanasio F, Convertino M, Magno A, Caflisch A, Corazza A, Haridas H, Esposito G, Cataldo S, Pignataro B, Milardi D, Rizzarelli E. Carnosine inhibits A $\beta$ (42) aggregation by perturbing the H-bond network in and around the central hydrophobic cluster. *Chembiochem*. 2013;14(5):583-592. doi:10.1002/cbic.201200704
  30. Herculano B, Tamura M, Ohba A, Shimatani M, Kutsuna N, Hisatsune T.  $\beta$ -alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat

- diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(4):983-997. doi:10.3233/JAD-2012-121324
31. Kaneko J, Enya A, Enomoto K, Ding Q, Hisatsune T. Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged A $\beta$ PP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> Alzheimer's-model mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):12571. doi:10.1038/s41598-017-12785-7
  32. Hisatsune T, Kaneko J, Kurashige H, et al. Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People. *J Alzheimers Dis.* 2016;50(1):149-159. doi:10.3233/JAD-150767
  33. Masuoka N, Yoshimine C, Hori M, et al. Effects of Anserine/Carnosine Supplementation on Mild Cognitive Impairment with APOE4. *Nutrients.* 2019;11(7):1626. doi:10.3390/nu11071626
  34. Yamashita S, Sato M, Matsumoto T, et al. Mechanisms of carnosine-induced activation of neuronal cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;82(4):683-688. doi:10.1080/09168451.2017.1413325
  35. Yu C, Li CH, Chen S, Yoo H, Qin X, Park H. Decreased BDNF Release in Cortical Neurons of a Knock-in Mouse Model of Huntington's Disease. *Sci Rep.* 2018;8(1):16976. doi:10.1038/s41598-018-34883-w
  36. Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, et al. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(12):3071-3077. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.07028.x
  37. Shan L, Bao AM, Swaab DF. The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 2015;38(3):167-177. doi:10.1016/j.tins.2014.12.008
  38. Provensi G, Costa A, Izquierdo I, Blandina P, Passani MB. Brain histamine modulates recognition memory: possible implications in major cognitive disorders. *Br J Pharmacol.* 2020;177(3):539-556. doi:10.1111/bph.14478
  39. Shan L, Swaab DF, Bao AM. Neuronal histaminergic system in aging and age-related neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol.* 2013;48(7):603-607. doi:10.1016/j.exger.2012.08.002
  40. van Wamelen DJ, Shan L, Aziz NA, et al. Functional increase of brain histaminergic signaling in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 2011;21(4):419-427. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00465.x

41. Lichter-Konecki, U. Defects of the urea cycle. *Transl. Sci. Rare Dis.* 2016;1(1):23-43. doi:10.3233/trd-160002
42. Nambron R, Silajdžić E, Kalliolia E, Ottolenghi C, Hindmarsh P, Hill NR, Costelloe SJ, Martin NG, Positano V, Watt HC, Frost C, Björkqvist M, Warner TT. A Metabolic Study of Huntington's Disease. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146480. doi:10.1371/journal.pone.0146480
43. Patassini S, Begley P, Xu J, Church SJ, Reid SJ, Kim EH, Curtis MA, Dragunow M, Waldvogel HJ, Snell RG, Unwin RD, Faull RL, Cooper GJ. Metabolite mapping reveals severe widespread perturbation of multiple metabolic processes in Huntington's disease human brain. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(9):1650-1662. doi:10.1016/j.bbadis.2016.06.002
44. Bichell TJV, Wegrzynowicz M, Tipps KG, Bradley EM, Uhouse MA, Bryan M, Horning K, Fisher N, Dudek K, Halbesma T, Umashanker P, Stubbs AD, Holt HK, Kwakye GF, Tidball AM, Colbran RJ, Aschner M, Neely MD, Di Pardo A, Maglione V, Osmand A, Bowman AB. Reduced bioavailable manganese causes striatal urea cycle pathology in Huntington's disease mouse model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1596-1604. doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.013
45. Caldovic L, Tuchman M. N-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem J.* 2003;372(Pt 2):279-290. doi:10.1042/BJ20030002
46. Deckel AW. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *J Neurosci Res.* 2001;64(2):99-107. doi:10.1002/jnr.1057
47. Deckel AW, Gordinier A, Nuttal D, Tang V, Kuwada C, Freitas R, Gary KA. Reduced activity and protein expression of NOS in R6/2 HD transgenic mice: effects of L-NAME on symptom progression. *Brain Res.* 2001;919(1):70-81. doi:10.1016/s0006-8993(01)03000-1
48. Ostojic SM. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *Eur J Nutr.* 2015;54(8):1211-1215. doi:10.1007/s00394-015-1050-7
49. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1107-1213. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1107
50. Mochel F, Durant B, Meng X, O'Callaghan J, Yu H, Brouillet E, Wheeler VC, Humbert S, Schiffmann R, Durr A. Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1361-1370. doi:10.1074/jbc.M111.309849
51. Tachikawa M, Hosoya K. Transport characteristics of guanidino

- compounds at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier: relevance to neural disorders. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8(1):13. doi:10.1186/2045-8118-8-13
52. Malmezat T, Breuillé D, Pouyet C, Buffière C, Denis P, Mirand PP, Obled C. Methionine transsulfuration is increased during sepsis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(6):E1391-E1397. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.6.E1391
53. Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE. Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:427-453. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.002235
54. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990;1(5):228-237. doi:10.1016/0955-2863(90)90070-2
55. Paul BD, Snyder SH. Neurodegeneration in Huntington's disease involves loss of cystathionine  $\gamma$ -lyase. *Cell Cycle*. 2014;13(16):2491-2493. doi:10.4161/15384101.2014.950538
56. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J*. 1988;256(1):251-255. doi:10.1042/bj2560251
57. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-492. doi:10.1093/jn/134.3.489
58. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol*. 1999;9(1):147-163. doi:10.1111/j.1750-3639.1999.tb00216.x
59. Cheng ML, Chang KH, Wu YR, Chen CM. Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. *J Nutr Biochem*. 2016;31:38-44. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.001
60. Nicoli F, Vion-Dury J, Maloteaux JM, et al. CSF and serum metabolic profile of patients with Huntington's chorea: a study by high resolution proton NMR spectroscopy and HPLC. *Neurosci Lett*. 1993;154(1-2):47-51. doi:10.1016/0304-3940(93)90168-k
61. Tsang TM, Woodman B, McLoughlin GA, et al. Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS 1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res*. 2006;5(3):483-492. doi:10.1021/pr050244o

62. Paglia G, Stocchero M, Cacciatore S, et al. Unbiased Metabolomic Investigation of Alzheimer's Disease Brain Points to Dysregulation of Mitochondrial Aspartate Metabolism. *J Proteome Res.* 2016;15(2):608-618. doi:10.1021/acs.jproteome.5b01020
63. Zhou Q, Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology.* 2013;74:69-75. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.030
64. Van Dongen AM, ed. *Biology of the NMDA Receptor.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
65. Zilberter Y, Gubkina O, Ivanov AI. A unique array of neuroprotective effects of pyruvate in neuropathology. *Front Neurosci.* 2015;9:17. Published 2015 Feb 17. doi:10.3389/fnins.2015.00017
66. Singhal NK, Li S, Arning E, Alkhayer K, Clements R, Sarcyk Z, Dassanayake RS, Brasch NE, Freeman EJ, Bottiglieri T, McDonough J. Changes in Methionine Metabolism and Histone H3 Trimethylation Are Linked to Mitochondrial Defects in Multiple Sclerosis. *J Neurosci.* 2015;35(45):15170-15186. doi:10.1523/JNEUROSCI.4349-14.2015
67. Sun J, Wen S, Zhou J, Ding S. Association between malnutrition and hyperhomocysteine in Alzheimer's disease patients and diet intervention of betaine. *J Clin Lab Anal.* 2017;31(5):e22090. doi:10.1002/jcla.22090
68. Gallazzini M, Burg MB. What's new about osmotic regulation of glycerophosphocholine. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:245-249. doi:10.1152/physiol.00009.2009
69. Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry.* 2016;55(39):5483-5506. doi:10.1021/acs.biochem.6b00342
70. Sabourdy F, Astudillo L, Colacios C, et al. Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(8):1040-1051. doi:10.1016/j.bbali.2015.01.010
71. Shamim A, Mahmood T, Ahsan F, Kumar A, Bagga P. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clin. Nutr. Exp.* 2018;20:1-19. doi:10.1016/j.chemolab.2010.07.006.
72. Lee LL, Aung HH, Wilson DW, Anderson SE, Rutledge JC, Rutkowsky JM. Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis products increase blood-brain barrier transfer coefficient and induce astrocyte lipid droplets and cell



- stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(4):C500-C516.  
doi:10.1152/ajpcell.00120.2016
73. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VV, Savica R, Deuschle C, Gasser T, Hauser AK, Gräber-Sultan S, Schleicher E, Berg D, Liepelt-Scarfone I. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. *PLoS One*. 2013;8(9):e73094.  
doi:10.1371/journal.pone.0073094
74. Block RC, Dorsey ER, Beck CA, Brenna JT, Shoulson I. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *J Clin Lipidol*. 2010;4(1):17-23. doi:10.1016/j.jacl.2009.11.003
75. Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM, Cattaneo E. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet*. 2002;11(17):1953-1965. doi:10.1093/hmg/11.17.1953
76. Kegel KB, Schewkunow V, Sapp E, Masso N, Wanker EE, DiFiglia M, Goldmann WH. Polyglutamine expansion in huntingtin increases its insertion into lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(3):472-475. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.039
77. Kegel-Gleason KB. Huntingtin interactions with membrane phospholipids: strategic targets for therapeutic intervention?. *J Huntingtons Dis*. 2013;2(3):239-250. doi:10.3233/JHD-130068
78. Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Front Microbiol*. 2021;12:631274.  
doi:10.3389/fmicb.2021.631274
79. Korade Z, Kenworthy AK. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1265-1273.  
doi:10.1016/j.neuropharm.2008.02.019
80. van der Veen JN, Lingrell S, Vance DE. The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J Biol Chem*. 2012;287(28):23418-23426. doi:10.1074/jbc.M112.381723
81. Moessinger C, Klizaite K, Steinhagen A, Philippou-Massier J, Shevchenko A, Hoch M, Ejsing CS, Thiele C. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC Cell Biol*.

- 2014;15:43. Published 2014 Dec 10. doi:10.1186/s12860-014-0043-3
82. Mastrokoulas A, Pool R, Mina E, Hettne KM, van Duijn E, van der Mast RC, van Ommen G, 't Hoen PA, Prehn C, Adamski J, van Roon-Mom W. Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood samples. *Metabolomics*. 2016;12:137. doi:10.1007/s11306-016-1084-8
  83. Cheng ML, Chang KH, Wu YR, Chen CM. Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. *J Nutr Biochem*. 2016;31:38-44. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.001
  84. D'Souza GX, Waldvogel HJ. Targeting the Cholinergic System to Develop a Novel Therapy for Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*. 2016;5(4):333-342. doi:10.3233/JHD-160200
  85. Ransome MI, Renoir T, Hannan AJ. Hippocampal neurogenesis, cognitive deficits and affective disorder in Huntington's disease. *Neural Plast*. 2012;2012:874387. doi:10.1155/2012/874387
  86. Bédard C, Wallman MJ, Pourcher E, Gould PV, Parent A, Parent M. Serotonin and dopamine striatal innervation in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011;17(8):593-598. doi:10.1016/j.parkreldis.2011.05.012
  87. Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety*. 2000;12 Suppl 1:2-19. doi:10.1002/1520-6394(2000)12:1+<2::AID-DA2>3.0.CO;2-4
  88. Pla P, Orvoen S, Saudou F, David DJ, Humbert S. Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:135. doi:10.3389/fnbeh.2014.00135
  89. Mochel F, Durant B, Durr A, Schiffmann R. Altered dopamine and serotonin metabolism in motorically asymptomatic R6/2 mice. *PLoS One*. 2011;6(3):e18336. doi:10.1371/journal.pone.0018336
  90. Pang TY, Du X, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18(4):753-766. doi:10.1093/hmg/ddn385

91. Renoir T, Zajac MS, Du X, et al. Sexually dimorphic serotonergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease and depression. *PLoS One*. 2011;6(7):e22133. doi:10.1371/journal.pone.0022133

## 第4章 総括

生体内の変化や病態を反映するバイオマーカーは、医薬品の研究開発を加速させ、成功確度を高めることにより医療の発展に貢献できる可能性がある。生体内の代謝物を網羅的に分析するメタボロミクスは、バイオマーカー探索のための有用な手法である。本研究では、疾患モデル動物にメタボロミクスを適用し、病態における代謝変化の解明や新規創薬ターゲットの取得、医薬品研究開発の前臨床段階及び臨床段階で利用可能なバイオマーカーの探索を実施した。

第2章では、LC-MS/MSを用いたメタボロミクス分析プラットフォームの構築を試みた。代謝物をその物性によりグルーピングし、それらに最適な分析条件を検討する手法により、親水性代謝物とリン脂質を含むメタボロミクス分析プラットフォームを確立した。さらに、この分析プラットフォームを胆汁うっ滞モデル動物であるEHBRのメタボロミクスに適用し、胆汁うっ滞の病態下における代謝変化を検討した。その結果、EHBRでは生体内の代謝プロファイルが大きく変化していることを見出した。中でも、細胞保護作用を有するタウリン及びヒポタウリンはEHBRの尿中で顕著に増加していた。また、EHBRの血漿と尿の胆汁酸プロファイルに特徴的な変化が認められ、細胞障害性の高い胆汁酸は大きく変化していないのに対して、細胞保護作用のある胆汁酸は顕著に増加しており、全体として胆汁酸の細胞障害性を軽減する方向に組成が変化していることが明らかになった。このように、メタボロミクスの手法によって得られた代謝プロファイルの変化から、胆汁うっ滞下における生体のホメオスタシス維持のための代償機構の存在を示すことができた。

第3章では、ハンチントン病モデル動物であるR6/2マウスのメタボロミクスを実施した。異なる測定原理による複数のメタボロミクス分析プラットフォームを組み合わせることで代謝物の網羅性を向上し、R6/2マウスの血漿と脳における数多くの代謝変化を検出することができた。また、週齢による代謝変化も明確に検出することができた。神経保護ペプチドであるカルノシン及びアンセリンの減少は、ハンチントン病の神経変性状態を反映する可能性があるとともに、これらの分子の治療可能性を示唆するものであった。また、脳におけるヒスタミン代謝系の変化も見出され、ハンチントン病におけるヒスタミンシグナル伝達の変化が示唆された。さらに、アルギニン代謝、

システイン及びメチオニン代謝に関わる代謝物の多くにも変化が認められ、病態下における尿素回路の異常や酸化ストレスの増加、エネルギー恒常性の乱れを反映するものと考えられた。特定の脂質クラスの週齢特異的な増加は、ハンチントン病の進行に関連する脂質代謝の調節異常を示すものであった。グリシン・セリン・スレオニン代謝の変化や、病態下の脳における神経伝達物質の代謝変化も多数検出され、これらの代謝物がハンチントン病の病態に寄与することを示唆していた。本研究で見出されたバイオマーカーは、病態の進行や薬剤の有効性の指標として、創薬の前臨床段階及び臨床段階での活用が期待される。また、今後のハンチントン病の病態解明や、治療ターゲットの探索にも有用と考えられる。

以上の結果から、病態モデル動物のメタボロミクスは、病態における代謝変化の解明や新規創薬ターゲットの取得、新規バイオマーカーの探索において有効であることを実証した。医薬品研究開発の初期では、動物を用いた医薬品候補化合物の有効性評価が重要な役割を担っている。動物で認められた薬効を臨床試験（ヒト）で確認できるかという点が医薬品開発における最大の難関であり、成功確度を左右する要因である。病態モデル動物はヒトの病態を再現しており、メタボロミクスは動物種間の差が少ない代謝物を標的としている。ともに動物からヒトへの橋渡しを担う両者の組み合わせにより、医薬品研究開発の成功確度を向上させることが期待される。

研究開発費の増加、アンメットニーズの高い疾患領域への挑戦などにより、医薬品研究開発の難易度は上昇を続けている。その中で、疾患モデル動物とバイオマーカーの活用は医薬品研究開発の成功確度向上のための有望な手段と考えられる。メタボロミクスは医薬品研究開発の早期から後期までの様々なステージで適応可能であり、近年の技術革新に伴いより幅広い代謝物の分析が可能となっている。また、メタボロミクスに加えてトランスクリプトミクスやプロテオミクスなどの他のオミクス技術を活用することによって、病態時や医薬品候補化合物の投与時に生じる生体内の変化をより包括的に解明できると考えられる。このような複合オミクスの活用による創薬の効率化と成功確度の向上にも期待したい。

## 目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Aoki M, Konya Y, Takagaki T, Umemura K, Sogame Y, Katsumata T, Komuro S. Metabolomic investigation of cholestasis in a rat model using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011;25(13):1847-1852.  
doi:10.1002/rcm.5072
2. Hashimoto M, Watanabe K, Miyoshi K, Koyanagi Y, Tadano J, Miyawaki I. Multiplatform metabolomic analysis of the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *FEBS Open Bio.* 2021;11(10):2807-2818.  
doi:10.1002/2211-5463.13285

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域 機能超分子化学研究室 廣田俊教授に深く感謝し、心から御礼を申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域 岡部高明客員教授、藤間祥子准教授、松尾貴史准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は、大日本住友製薬株式会社において行われました。本研究の機会を与えてくださり、終始ご激励を賜りました、小室勢津子博士、宮脇出博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進及び論文投稿にあたり、終始懇切なご指導とご助言を賜りました、勝又隆氏、十亀祥久博士、只野純氏に心から感謝申し上げます。

本研究の推進にあたり、ご指導及びご協力いただきました紺屋豊博士、高垣武司氏、渡辺健一博士、三好歓博士、小柳友佳子氏、梅村康士氏、高山早余氏に心から感謝申し上げます。

最後に、本論文を作成するにあたり、温かく見守ってくれ、支えてくれた家族に心から感謝します。