

氏 名 (本籍)	あ 安	ど 藤	ま 昌	ゆ 幸
学 位 の 種 類	博	士	(薬	学)
学 位 記 番 号	薬	第	505	号
学 位 授 与 年 月 日	平	成	18	年 1 月 18 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当			

学 位 論 文 題 目

ハイファネーテッド質量分析法による脳内胆汁酸解析に関する研究

論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授	後 藤 順 一
	教 授	安 齋 順 一
	助 教 授	永 田 清

論文内容要旨

胆汁の主要構成成分である胆汁酸は、ステロイド骨格を有する炭素数 24 個のカルボン酸であり、A/B 環が折れ曲がった cis 構造をとっていることが他のステロイド系内因性物質とは異なる構造上の特徴となっている。胆汁酸のステロイド骨格の β 面は 18- および 19- メチル基を含めて疎水性に富んでおり、その一方ステロイド骨格上の水酸基の多くは α 面に存在することから、側鎖上の極性官能基とあわせて α 面に親水性に富む空間を形成している。このように単分子中に面状の疎水性領域と親水性領域を有するという化学構造上の特徴により、胆汁酸は界面活性物質として生体内で機能し、脂質の消化吸収において重要な役割を演じている。

近年の分子生物学的手法の進歩により、胆汁酸の生体内動態を制御するメカニズムが分子レベルで明らかになりつつある。核内レセプター FXR の内因性リガンドが哺乳類共通の一次胆汁酸である CDCA であることが明らかにされ、胆汁酸が情報伝達物質として自らの動態を制御していることが明らかとなった。また、胆汁酸の新たな生合成経路 (alternative pathway) およびこれに関与する酵素群も明らかになり、肝以外の組織においても生理的な必要性に応じて胆汁酸の生合成が行われている可能性も指摘されている。これら最近の知見は、胆汁酸に新規な機能が存在する可能性を示唆するものと考えられる。最近、中枢神経系でコレステロールあるいはその代謝産物から生合成されるプレグネノロンやデヒドロエピアンドロステロンなどの脳内ステロイドが、GABA_A や NMDA などの神経伝達物質受容体のアロステリック調節因子として機能することが明らかにされ、注目を集めている。その一方、コレステロールの最も主要な異化代謝産物である胆汁酸の脳内における存在はほとんど報告がなく、その存在の有無や存在した場合の生理的意義について興味もたれる。そこで脳内胆汁酸の解析を目的として本研究を開始し、その解析に必要となる生体内胆汁酸の網羅的な測定方法をまず開発することとした。

胆汁酸の動態研究に広く用いられているラットは、肝に胆汁酸の 6 位水酸化活性を有しており、そのためヒト主要胆汁酸である CA, CDCA, DCA, UDCA, LCA に加えて α -MCA, β -MCA, HDCA が多量に存在し、これらの遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型がラット主要胆汁酸とされている。共通して酸性官能基を有し、かつ熱安定性の低いこれら 24 種胆汁酸を一斉かつ高感度に定量するためには、負イオン検出 LC/ESI-MS/MS による測定が好適であると考え、ラット主要胆汁酸の ESI-MS におけるイオン化挙動、MS/MS における開裂挙動、HPLC における保持挙動を順次精査した。

その結果、HPLC における保持のみならず、液相反応と気相反応が動的に進行する ESI におけるイオン化の挙動解析においても、胆汁酸および共存する移動相中の pH 緩衝物質の酸塩基解離定数 pKa が非常に重要な物性パラメータであることが判明し、この知見に基づき ESI-MS における高感度一斉分析条件を設定できた。さらに、ステロイド核 12 位に α -水酸基を有する CA や DCA では、この水酸基と側鎖酸性官能基とが分子内水素結合を形成し、LC/ESI-MS/MS 分析において他の胆汁酸とは異なる特異な挙動を示すことが明らかになった。この現象を利用して HPLC での相互分離を改善した結果、24 種ラッ

ト主要胆汁酸を一斉に分離することが可能となった。この測定条件では全ての胆汁酸において注入量 50 pg で S/N > 10 であり、高感度な一斉分析が可能であった。

以上設定した測定法に固相抽出による前処理法を組み合わせることで生体試料中定量法を構築し、ラット血清を用いた添加回収実験を行ったところ、ラット血清中主要胆汁酸を高精度に一斉定量可能であることが実証された。さらに、本定量法を絶食モデルラットの血清中胆汁酸濃度測定に応用したところ、絶食による血清中胆汁酸の変動を明確に捕らえることが可能であり、本定量法の胆汁酸動態解析における有用性が明らかになった。

次いで開発した定量法を用いラット脳内胆汁酸の検索を行った。胆汁酸はその界面活性作用により細胞毒性を示し、たとえば神経細胞に対する脱髄作用が知られている。腸肝循環において胆汁酸輸送を担い、高濃度の胆汁酸にさらされる肝あるいは腸の細胞内には、胆汁酸を強く結合するタンパクが存在することが知られており、このタンパクが胆汁酸の細胞内輸送とともに毒性軽減に寄与していると考えられている。脳内に胆汁酸が存在する場合、同様にタンパクと結合している可能性があることから、脳試料中からの胆汁酸の抽出操作には十分な注意を払う必要があると考えられた。そこで、ラット脳の細胞分画により得られた各画分に、さまざまな抽出操作を加え、LC/ESI-MS にて胆汁酸の存在を検索した。

その結果、タンパク変性剤であるグアニジンで処理した細胞質画分から、遊離型の CA, DCA および CDCA に相当するピークが検出され、その他の胆汁酸はグリシンおよびタウリン抱合型を含めて検出されなかった。血清中胆汁酸は、血清中タンパクと比較的強く結合しているが、固相抽出や熱エタノール抽出により効率良く抽出可能である。しかしながら、脳細胞質画分中の CDCA に相当するピークはこれらの条件ではほとんど抽出されず、グアニジンで処理した後に熱エタノール抽出することにより多量に検出されるようになった。このため、このピークに相当する物質は脳内でタンパク質と非常に強く非共有結合しており、またグアニジンでタンパク変性処理せずに熱エタノール抽出を行うとこの結合タンパクに立体的に巻き込まれて沈殿しているものと考えられた。

脳細胞質画分で検出された3種のピークは、種々の移動相条件における HPLC 溶出挙動、種々の ESI 条件におけるイオン化挙動および同位体分布比が標品と一致したことから、遊離型の CA, DCA および CDCA と同定された。これら胆汁酸の脳内濃度を LC/ESI-MS にて定量したところ、脳内胆汁酸の大部分が CDCA であり、これは既知の脳内ステロイドで最も多量に存在するとされているプレグネノロンの10倍に相当する量であった。また CDCA よりはるかに少ない CA や DCA でも脳内濃度は代表的な脳内ステロイドであるデヒドロエピandroステロンより高く、脳内に遊離型胆汁酸が大量に存在していることが明らかとなった。なお、DCA に特異性の高い抗体を用いた ELISA にて脳内 DCA 濃度を定量したところ、LC/ESI-MS での定量と同様の測定結果が得られた。

脳内胆汁酸の由来はまだ不明である。ただし、ラット血清中に多量に認められたタウリン抱合型胆汁酸や、CDCA より多量に認められた6位に水酸基を有する α -MCA, β -MCA および HDCA が、脳内では全く認められないことから、脳内胆汁酸の由来が循環血からの単純拡散ではないことは明らかである。脳には肝で知られている alternative pathway による胆汁酸生合成に関与する酵素群が発現していることが

知られており、またこの経路の前駆物質になりえる 24-ヒドロキシコレステロールが脳内に大量に存在することも知られている。このことから脳内ステロイドと同様に脳内での生合成が行われていることも考えられうる。特に、この経路の最終段階の反応に関与する 3α -HSD の分子種ファミリーは、ヒト肝臓において胆汁酸の結合タンパクとしても機能しており、脳内 CDCA がタンパクと強く結合している事実と考え合わせると興味深い。高濃度の胆汁酸は細胞毒性を有するが、脳内の CDCA はタンパクと結合することにより毒性を示さない様式で通常は存在し、必要時に動員されて機能を発揮していることが予想された。

先述のように血清中ではラット特有の胆汁酸より少ししか存在しない CDCA が脳内では大量に存在していたが、このことは哺乳類に共通する一次胆汁酸である CDCA が生物進化の早い時期に脳内での機能を獲得し、それが脂質の消化吸収を行う腸肝系の胆汁酸とは異なり、幅広い動物種で保存されている可能性が考えられた。

LC/MS を活用して高感度な生体試料中胆汁酸の網羅的な定量法を開発し、脳内胆汁酸を同定および定量した本研究は、脳内に遊離型胆汁酸が大量に存在していることを世界で初めて明らかにしたものである。今後、本研究により明らかになった脳内胆汁酸が、生命科学の新たな研究につながることを大いに期待する。

審査結果の要旨

コレステロールの異化代謝産物である胆汁酸は、肝臓にて生合成された後、アミノ酸抱合体として胆管を経て腸へと排泄される。次いで腸壁より再吸収され、肝臓へと戻るいわゆる腸管循環を行っているが、各種肝胆道疾患時には、尿中にも多量排泄されるようになる。こうした体内動態から、これまで主に病態との関連から胆汁酸は取り上げられてきた。しかし、最近核内レセプター FXR の内因性リガンドとしてそれ自身の生合成を制御しているなど、胆汁酸が情報伝達物質としての機能を持つことも明らかにされてきている。一方、ステロイドホルモンが脳内における情報の伝達に大きく関わるということが明らかにされ注目を浴びているが、同様にコレステロールより生合成される胆汁酸についてはこうした検討は全く加えられていない。本論文は、こうした観点から LC/ESI-MS/MS を用いる感度、特異性に優れる胆汁酸の測定法を構築するとともに、脳内におけるその存在に検討を加えたものである。

先ず、対象動物としてラットを取り上げ、主要なモノー、ジー、並びにトリヒドロキシ胆汁酸 8 種とそれらのグリシン、タウリン抱合体計 24 種の標品を用い、LC における溶出挙動、ESI 条件下における効率的負イオン生成条件を吟味し、検出感度 50 pg (S/N<10) という LC/ESI-MS/MS による高感度一斉分析法を構築した。

引き続き、上記測定法を用い脳内胆汁酸の検索を行った。これまで胆汁酸の脳内における存在は否定的にとらえられてきた。これは、脳内における胆汁酸の存在形態が関与しているものと推測された。そこで、1: 蛋白結合をほとんどせず存在している、2: 血中アルブミンとほぼ同程度の蛋白結合をして存在する、3: 共有結合ではないが、脳内蛋白質と強固に結合して存在する、という場合を想定し、1: 蛋白質を全く保持せず低分子化合物のみを保持する固定相を充填したカートリッジによる抽出、2: ODS 固定相に牛血清アルブミンをコートしたカートリッジによる抽出、3: あらかじめ試料を高濃度のグアニジンで処理し、蛋白質のホールディングを解いた後、熱エタノールによる抽出という 3 種の前処理法を工夫し、比較検討した。その結果、1 ではコール酸、2 ではこれに加えてデオキシコール酸と同じ保持値を持つピークが確認された。これに対して 3 では、さらにケノデオキシコール酸に相当する位置に大きなピークが観察された。これら 3 種遊離型胆汁酸以外には、アミノ酸、硫酸、グルクロン酸抱合体を含めて相当する位置にピークは見られなかった。尚、これら 3 種胆汁酸の同定は LC における溶出挙動、MS における挙動、並びに特異抗体を用いた手法により行った。また、これら胆汁酸の濃度は、前処理において混入する可能性のある血中胆汁酸量の 3,000 ~ 60 倍以上であり、明らかに脳内に存在すると結論された。以上、本論文は、脳内にはじめて胆汁酸の存在することを世界で初めて証明すると共に、最も高濃度に存在するケノデオキシコール酸が、脳内のある種の蛋白質と強固に結合していることを明らかにしたものであり、胆汁酸研究に新たな展開を加えたものである。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。