

博士論文（要約）

論文題目 脂質網羅的分析法の開発と  
アルツハイマー病バイオマーカー探索への応用

氏名 佐藤 義明



# 目次

緒論	1
第1章 モデル動物からのADバイオマーカー探索	5
第1節 序	5
第2節 リン脂質の網羅的分析法の確立	8
第3節 ガングリオシドの網羅的分析法の確立	16
第4節 モデルマウスの評価	17
第5節 モデルマウス脳による脂質変動解析	20
第6節 ヒト血漿によるリン脂質バイオマーカー探索	29
第7節 結語	35
第2章 ヒト試料からのADバイオマーカー探索	36
第1節 序	36
第2節 コレステロール周辺代謝物の分析法の構築	38
第3節 ヒト血漿によるバイオマーカー探索	40
第4節 血漿中デスモステロールの定量法の確立	43
第5節 中規模コホートによる再現性の確認	45
第6節 脳脊髄液や脳試料による検証	48
第7節 既報との乖離原因の究明	50
第8節 大規模日本人コホートによる確認	52
第9節 経過観察試料による評価	53
第10節 デスモステロールの疾患との関連性についての仮説	53
第11節 結語	55
結論	57
謝辞	59
実験の部	61
引用文献	80

## 論文目録

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東京大学薬学部薬学系研究科に提出されたものである。

1. Y. Sato, T. Nakamura, K. Aoshima, Y. Oda

Quantitative and wide-ranging profiling of phospholipids in human plasma by two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry

Anal. Chem., 82 (2010) 9858–9864

2. Y. Sato, I. Suzuki, T. Nakamura, F. Bernier, K. Aoshima, Y. Oda

Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology

J. Lipid Res., 53 (2012), 567-576

3. Y. Sato, F. Bernier, I. Suzuki, S. Kotani, M. Nakagawa, Y. Oda

Comparative Lipidomics of Mouse Brain exposed to enriched environment

J. Lipid Res., 54 (2013), 2687–2696

## 略語表

AD	: アルツハイマー病 (alzheimer's disease)
APCI	: 大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization)
APOE	: アポリポタンパク E (apolipoprotein E)
APP	: アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein)
AUC	: 曲線下面積 (area under curve)
A $\beta$	: アミロイド $\beta$ タンパク (amyloid $\beta$ protein)
BrdU	: ブロモデオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CREB	: cAMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element binding protein)
CSF	: 脳脊髄液 (cerebrospinal fluid)
DHCR24	: 24-デヒドロコレステロール還元酵素 (24-dehydrocholesterol reductase)
DHCR7	: 7-デヒドロコレステロール還元酵素 (7-dehydrocholesterol reductase)
EC	: 刺激のある条件下での飼育 (enriched condition)
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸 (([2- [bis (carboxymethyl) amino) ethyl] (carboxymethyl) amino) acetic acid)
ESI	: エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization)
GC	: ガスクロマトグラフィー (gas chromatography)
GD	: ジシアログングリオシド (disialoganglioside)
GM	: モノシアログングリオシド (monosialoganglioside)
GT	: トリシアログングリオシド (trisialoganglioside)

I.S.	: 内部標準物質 (internal standard)
IC	: 刺激の少ない条件下での飼育 (impoverished condition)
IHC	: 免疫組織化学 (immunohistochemistry)
LC	: 液体クロマトグラフィー (liquid chromatography)
LPA	: リゾホスファチジン酸 (lyso-phosphatidic acid)
LPC	: リゾホスファチジルコリン (lyso-phosphatidylcholine)
LPE	: リゾホスファチジルエタノールアミン (lyso-phosphatidylethanolamine)
LPG	: リゾホスファチジルグリセロール (lyso-phosphatidylglycerol)
LPI	: リゾホスファチジルイノシトール (lyso-phosphatidylinositol)
LPS	: リゾホスファチジルセリン (lyso-phosphatidylserine)
MCI	: 軽度認知障害 (mild cognitive impairment)
MMSE	: 認知機能検査 (mini-mental state examination)
MS	: 質量分析法 (mass spectrometry)
PA	: ホスファチジン酸 (phosphatidic acid)
PC	: ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine)
p-CREB	: リン酸化 cAMP 応答配列結合タンパク質 (phospho- cAMP response element binding protein)
PE	: ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine)
PG	: ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol)
PI	: ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol)
PLS	: 主成分回帰分析 (partial least squares)

PLs : リン脂質 (phospholipids)

PS : ホスファチジルセリン (phosphatidylserine)

ROC : 受信者動作特性 (receiver operatorating characteristic)

R.S.D.% : 相対標準偏差 (relative standard deviation)

SRM : 選択反応検出法 (selected reaction monitoring)





## 緒論

我が国の平均寿命は、50年前に比べると30歳も上昇し、2013年の調査では女性が86歳、男性が80歳となり、我が国は世界第二位の長寿国となった。一方で、他の先進国に例を見ない少子高齢化が加速し、現在、日本は4人に1人が65歳以上という超高齢社会を迎えており、2050年には65歳以上の高齢者人口が総人口に占める割合を示す高齢化率が40%に達すると予想されている。超高齢社会への移行に伴い、社会問題になっている1つが認知症患者の増加である。厚生労働省研究班の2013年の調査によれば、65歳以上の認知症は15%を既に超え、患者数は約462万人以上、その予備軍は400万人と推定され、高齢者の3~4人に1人は認知症またはその予備軍とされている。

認知症は幾つかに細分化されるが、認知症患者の約7割をアルツハイマー病（AD）が占める。ADは病理学的に、大脳を中心とする広範な神経脱落と共に、老人斑（senile plaque）および神経原線維変化（neurofibrillary change）による蓄積物の出現を特徴とし、これに伴い神経細胞死から脳萎縮や記憶機能の低下を引き起こす病である。その発症原因は未だ不明な部分が多く、しかも根本治療法や適切な診断法がない現状から、ADは最もアンメットニーズの高い疾患に位置付けられ[1]、ADの患者本人や家族のみならず、団塊世代が10年以内に高齢化層に移行することを考慮すると医療経済の面からも重要課題である。

近年、多くの研究機関による精力的な研究からADの診断方法に大きな進展が見られている。中でもADの原因物質であるアミロイドβタンパク（Aβ）の脳内沈着を可視化・定量化する診断用放射線医薬品をアメリカ食品医薬品局が承認したことや、我が国においても神経変性の指標となる脳脊髄液（CSF）中のリン酸化タウタンパク濃度の測定キットが体外診断薬として保険収載されたことなどが具体例として挙げられる。これらADにおけるAβとリン酸化タウなどの新たなバイオマーカーの出現は、従来の医師の経験による臨床診断に加え、客観的な画像やバイオマーカーによる診断が加わることになった。しかしながら、これら既存の客観的診断手法には以下の課題を抱えている。診断用放射性医薬品のうちポジトロン断層法（PET）用のプローブによる画像診断は、放射性同位体元素を作り出すサイクロトロン設備を施設内あるいは施設の近傍に保有することが必須であり、しかもPET装置も高額なことから、極限られた病院でのみしか実施できない。一方のリン酸化タウタンパク濃度の測定においては侵襲性の高い脳脊髄液の採取が伴うことから、被験者の肉体的・精神的負担が大きく波及性は乏しい。さらに両バイオマーカーの診断指標は、認知機能との相関も低いことが知られおり、医療現場でこれらバイオマーカーを指標にADの進行を観察することは難しいと言われている。また、医療現場での認知機能の診断指標として広く利用されているMini-Mental State Examination（MMSE）などの認知機能検査は、医師の熟練度によって診断

結果が異なることや、軽度認知障害（mild cognitive impairment : MCI）や軽症の AD の診断が十分に確立されていないという課題がある。このような背景から医療現場において、低侵襲性の早期診断ならびに経過観察を可能とする客観的バイオマーカーが強く望まれている。

同様に、創薬現場においても AD バイオマーカーのニーズは非常に高い。これまで数多くの AD を対象とした治験が行われてきたが、その有用性の高い薬剤の開発に成功した例は膨大な研究開発費が費やされたにもかかわらず殆どない。このような背景をふまえ、進行した AD の治療は困難であるとの考えから、早期 AD 患者を対象にした薬剤の臨床評価が注目されているが、早期 AD 患者を抽出するための画像診断を臨床試験に組み込む際、PET 設備保有施設へのアクセスや画像診断費用の増大は治験を行う上での課題となる。さらに、その薬剤が上市されたとしても薬剤費に診断薬剤費が加算されることになり、医療経済上大きなハードルになる。また、AD の進行および回復過程における小さな変化を感知できるバイオマーカーがないことも AD 治療薬を開発する上で大きな課題でもある。このため、新薬の有効性を検証する際、進行が緩徐である MCI や早期 AD などの患者をターゲットとした場合、治験を続行すべきかを早い段階で判断することが困難となり、臨床試験の大規模化および長期化に繋がり臨床開発費はさらに増大する。このように、創薬現場では低侵襲でかつ早期 AD 患者を簡便に診断可能とするバイオマーカーおよび薬剤の有効性をより鋭敏に評価できるバイオマーカーに期待が寄せられ、AD バイオマーカーは新薬開発の加速化に大きく貢献できるものと期待される。

生体内において内因性低分子代謝物は、様々な疾患において遺伝子やタンパク質の異常発現を反映し、表現型変化に直結するものと考えられている。このことから、近年、疾患関連パスウェイやバイオマーカーの同定および治療薬の作用機序の解析を目的として、分子量 1500 以下の内因性の低分子代謝物を標的とした網羅的解析法であるメタボロミクスが多くの研究機関で実施され注目されている[2]。メタボロミクスは、分析法の違いから大きく分けて極性代謝物をターゲットとしたものと脂質をターゲットとしたものに大別される。脂質をターゲットとしたものは“リピドミクス”と称され、生体中のリン脂質 (PLs)、ガングリオシドおよび中性脂質等を網羅的に分析・解析する手法である[3-5]。これまで、多くの研究機関においてリピドミクスを用いた研究が数多く展開され、生体内における脂質分子の役割の解明のみならず、疾病の予防或いは治療に有用と考えられる脂質バイオマーカーが発見されており、注目を浴びている分野の一つである[3,6-8]。最近では、脂質により糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化症およびアルツハイマー病などの疾患においての脂質の役割が徐々に解明されてきている[6,9-11]。

AD と脂質の関連性は非常に強く、数多くの論文が存在する。例えば PLs は神経伝達[12-14]、並びにイオンチャネル[15,16]の働き等の脳の機能に深く関与しており、ガングリオシドは脂

質ラフトに特異的に存在し[17], 細胞のシグナル伝達の調節や細胞接着のメディエーターおよび免疫学的に重要な働きなど様々な役割を担っている[18]. さらに, コレステロールのホメオスタシスに關与する多くの遺伝子は孤発性 (非遺伝性) の AD に關与することが明らかにされつつあり[19-21], 高コレステロール血症が孤発性 AD 発症の危険因子であると報告されている[20,22-24]. 以上のことから, これら脂質をより網羅的に解析することが, 疾患に対する理解を深め, 新規メカニズムの解明および新規 AD バイオマーカーの発見に繋がる可能性が示唆される.

生体試料中の脂質を網羅的に分析・解析する際には, その試料の複雑さや微量性などから検出器には感度と特異性が共に優れる質量分析計が用いられる場合が多い. 従って, これまでの多くの研究は, 生体試料から抽出した脂質を直接質量分析計に注入する直接注入法と液体クロマトグラフィー (LC) [25,26]やガスクロマトグラフィー (GC) [27,28]と質量分析計を組み合わせた手法に大別される. 直接注入法は, 処理能力, 堅牢性および自動化に優れていることから迅速性が重視される場においては威力を発揮する. 一方で, 質量分析法 (MS) による分析では, イオン化の競合が生じるため, 存在量の少ない脂質はイオン化抑制や促進を受けやすいことから, 直接注入法による分析は網羅性や再現性を重視した研究では不向きとなる. 更に, 脂質には二重結合の位置異性による構造異性体が非常に多いことから, 脂質代謝物の異性体を考慮した分析が求められる. したがって, 相互分離に優れているクロマトグラフィーと MS の組み合わせが, 生体試料由来等の複雑な試料のリピドミクス研究の際には威力を発揮する. 特に, 異性体を識別する上でクロマトグラフィーにおける溶出時間情報は極めて有用であり[29-31], また, 存在量が少ない代謝物と多い代謝物を MS の前に分離することで, MS におけるイオン化抑制および促進を抑え, より正確に分析することが可能となる. また, PLs やガングリオシドなどのように, GC 分析のための誘導体化が困難である低分子代謝物の場合, LC と MS を組み合わせることで, 高感度でより網羅的な分析が可能となる.

以上のような観点から, 臨床研究および創薬研究の現場で強く望まれている低侵襲性サンプルを用いた新規の AD バイオマーカー探索を目的として, LC/MS を用いた脂質網羅的分析法を開発すると同時に, 記憶機能向上モデルマウスの脳や低侵襲性試料であるヒト血液を用いた脂質網羅的解析を行った.

第一章では, まず PLs とガングリオシドの LC/MS による網羅的な分析法を検討した. 次に, 本方法を記憶機能向上モデルマウスの脳内 PLs, ガングリオシドおよびスルファチドの網羅的解析に応用し, AD バイオマーカー探索を実施した. さらに, マウス脳で変動が認められた脂質情報を基に, 低侵襲性の試料であるヒト血液での AD バイオマーカー探索および確認作業を実施した.

第二章では、モデル動物やモデル細胞を使わず直接ヒト血液を用いた AD バイオマーカーを行なうために、まず AD との関連が深いとされるコレステロール関連代謝物を網羅的に分析する方法を確立した。次に、本方法をヒト血液に応用し、低侵襲の AD バイオマーカーを探索した。その結果見出された血漿中バイオマーカー候補について、検体数を増やすことによって再現性を確認した後、ヒト脳脊髄液（CSF）やヒト死後脳でも測定を行い、血液中のマーカー変化が中枢系の変化を反映しているかについて調査した。更に、この AD バイオマーカーについては、既報の結果とは乖離していたため、その原因について解明し、バイオマーカーの妥当性を確認した。最後に、大規模なコホート試料を用いた横断的研究や経時的研究を実施することで AD バイオマーカーとしての検証や有用性を評価した。

# 第1章 モデル動物からの AD バイオマーカー探索

## 第1節 序

刺激の豊かな環境下で飼育したマウスやラットは、神経伝達物質の分泌や神経可塑性などの亢進から[32,33]、脳における構造変化、学習および記憶能力が促進することが知られている[34]。特に、AD モデルマウスを刺激が豊かな環境下で飼育することにより認知機能低下を抑制する効果があることも報告されており、AD などに見られる記憶低下の改善の足掛かりとなるモデルの 1 つとしても注目されている[35]。このような環境がもたらす脳構造変化や神経生理学的変化は、これまで遺伝子発現解析やタンパク質解析により細胞・分子レベルでの解析が多くの研究グループによって行われてきた。例えば、Rampon らのグループは遺伝子発現解析により、短期および長期間の刺激を与えた飼育で変動する分子として DNA/RNA 合成、神経シグナリング、神経細胞成長や構造、細胞死およびタンパク質の翻訳に関連する遺伝子を特定した[36]。さらに、McNair らはタンパク質の網羅的な解析であるプロテオミクス研究において、エネルギー代謝や情報伝達等に関与するタンパク質が有意に変動することを明らかにした[37]。しかしながら、上記のような断片的な情報は記憶機能改善という表現系と直接結びつく解析には未だ達していないのが現状である。一方で、これまでのバイオマーカーに関する研究では遺伝子発現やタンパク質解析が主であり、PLs やガングリオシドをはじめとする脂質低分子代謝物の研究は殆ど着手されていない。

膜の重要な構成成分である PLs は、構造中にリン酸エステル部位をもつ脂質の総称であり、大きく分けてグリセリンを骨格とするグリセロリン脂質と、スフィンゴシンを骨格とするスフィンゴリン脂質の 2 つが存在する。グリセロリン脂質には、グリセリンの C1, C2 位に脂肪酸が、C3 位にリン酸がそれぞれエステル結合したホスファチジン酸 (PA) と PA から C2 位の脂肪酸が脱離したリゾホスファチジン酸 (LPA) が存在する。また、C3 位のリン酸基にコリン、エタノールアミン、イノシトール、セリンおよびグリセリンなどのアルコールがそれぞれ結合した、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) およびホスファチジルグリセリン (PS) が存在する。一方、スフィンゴリン脂質はスフィンゴシンの C2 位のアミノ基に脂肪酸、C1 にリン酸がそれぞれ結合し、ヒトにおいてはリン酸にさらにコリンが結合したスフィンゴミエリン (SM) が知られている (Figure 1)。これら PLs は、構成する脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度などの違いにより非常に多くの分子種が存在し、その種類は数百にも及ぶ。このことから、本論文中においてはリン酸に結合するアルコールや脂肪酸の違いを区別するため、PA (18 : 0, 20 : 2) などと、その PLs のクラス情報 (PA) に続いて、C1 (18 個) と C2 (20 個) の脂肪酸の炭素数およびその不飽和度 (0 あるいは 2 個) の情報を記載すること

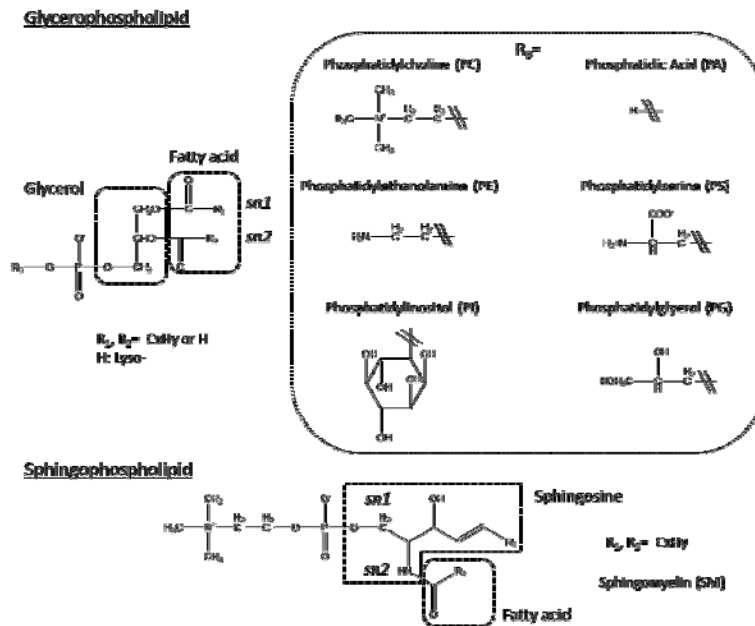


Figure 1 Chemical structures of phospholipids.

で各 PLs を区別することにする。

組織中の PLs は、自己組織化によって脂質二重層を形成し、生体での機能として細胞膜の主要な成分となるばかりでなく、シグナル伝達にも関わっている。また脳内の PLs は、脳血管関門 (BBB) [38], 神経伝達[12-14], 並びにイオンチャネル[15,16]等の脳の機能に深く関与しており、特にリン酸と結合するアルコールの違いによる PLs のクラス (PA, PS および PC 等) や脂肪酸の不飽和度はこれら機能の維持に関与していると報告されている[39]。

ganglioside は、糖鎖上に 1 つ以上のシアル酸を結合しているスフィンゴ糖脂質の一種である。その代表的な構造を Figure 2 に示す。ganglioside の構造はセラミド骨格を有し、一位の水酸基から順にグルコース、ガラクトース、N アセチルガラクトサミン、ガラクトースの糖が結合し、さらにこれら糖に 1 から 4 個のシアル酸が結合している。これらganglioside を、モノシアログanglioside (GM1), ジシアログanglioside (GD1), トリシアログanglioside (GT1) およびテトラシアログanglioside とそれぞれ呼ぶ。また、セラミドにグルコース、ガラクトース、N アセチルガラクトサミンが結合し、さらにシアル酸が 1 から 3 個結合したものを GM2, GD2 および GT2, 同様にセラミドにグルコースおよびガラクトースが結合し、シアル酸が 1 から 3 個結合したものを GM3, GD3 および GT3, セラミドにガラクトースと硫酸が結合したものをスルファチドと呼ぶ (Figure 2)。これらganglioside は生体内で主に細胞膜表面の脂質ラフトに存在し[17], 細胞のシグナル伝達の調節や

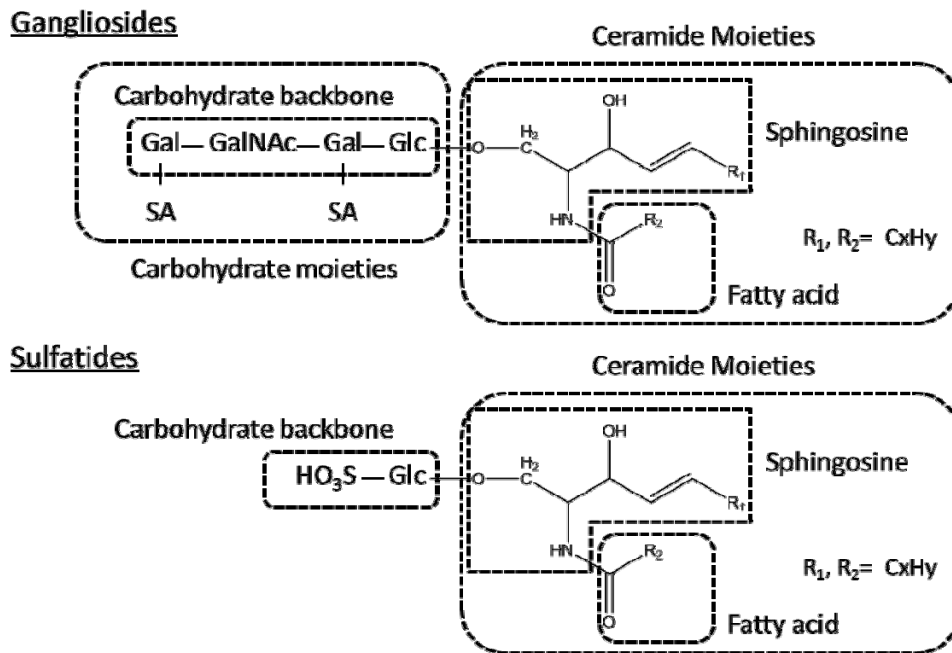


Figure 2 Structures of gangliosides and sulfatides. Glc, glucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; SA, sialic acid; Cer, ceramide; GlcCer, glucosylceramide; GalCer, galactosylceramide; LacCer, lactosylceramide [40,41].

細胞接着のメディエーターおよび免疫学的に重要な役割を担う[18]. ガングリオシドは特に脳において最も多く存在しており, 神経細胞の分化やシナプスの形成および樹状突起の伸長などに関与しているとされる[42-44].

特に脳は脂質含量が最も高い器官であり, PLs やガングリオシド等を始めとする脂質の変化の影響を受けやすく, 脳における脂質代謝やその量的変化は AD を始めとする認知症などの神経変性疾患に関与するとされる[45]. 事実, 脳において AD へと進行する過程で PI, PE, PC および SM などの PLs の量的変化が認められることや, PLs が AD の原因物質とされる A $\beta$  の前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の代謝に強く関与しているという多くの報告がある[45]. また AD の脳内におけるガングリオシドについての研究も最近多く報告されており, AD 患者の脳内で GM1, GD1a, GD1b および GT1b を始めとするガングリオシドの量が減少し, 逆に GM2, GM3 および GT1 の量が増加することや[46-49], 孤発性の AD ではガングリオシドが側頭皮質や海馬などの部位において選択的に減少することが判明している[50]. 更に GM1, GD1 および GT1 は神経細胞で濃縮され, その量的変化はシナプス形成や樹状突起の伸展において異常を引き起こすことも知られている[17].

以上のことから, PLs やガングリオシドは AD と深く関連しており, これら分子を網羅的

かつ高い精度で分析し、これらの動的な変化を捉えることが AD の病態解明並びに新規 AD バイオマーカーの発見に寄与できると考えた。そこで、記憶機能に密接に関連する AD のバイオマーカーの探索を目的に、脳機能に深く関わる PLs とガングリオシドの網羅的分析法を開発し、モデル動物やヒト試料を用いた脂質網羅的解析を行うこととした。

本章では、先ず網羅性が高く再現性に優れた PLs とガングリオシドの分析法の確立について述べる。そして、その方法により記憶機能に差が生じる刺激が豊かな条件下で飼育したマウス (enriched condition mouse: EC マウス) と刺激が少ない条件下で飼育したマウス (impoverished condition mouse, IC マウス) の脳を用いた脂質の網羅的解析により、記憶機能に関連する脂質分子を探索した。さらに、このモデルマウスで新たに発見した代謝物の情報を基にヒト検体に展開し、AD バイオマーカーの探索を行うこととした。

## 第2節 リン脂質の網羅的分析法の確立

### 生体試料からの PLs 抽出法の確立

生体試料より PLs を抽出する際の一般的な手法としてクロロホルム、メタノールおよび水を用いた液-液抽出法である Bligh and Dyer 法が幅広く用いられているが[51]、この方法は酸性の LPA やホスファチジルイノシトールリン酸等を初めとする高極性 PLs の抽出効率が低いことが知られている。これを改善するために、Shan らは水-クロロホルム抽出の際の水層を酸性下にする事で抽出効率が改善すると報告している[52,53]。一方で、石田らは液-液抽出の際に水層を酸性にすることにより、PC や PA のエステル結合の加水分解を生じることとも報告しており[54]、生体試料中から酸性 PLs を効率よく抽出する方法の確立が求められている。そこで我々は、生体試料から酸性 PLs の回収を確保することを目的として、まず標品の PLs を用いた抽出法を検討した。一般に、液-液抽出の際の水層の塩濃度を増すことによる塩析効果で目的化合物の有機層への転層を向上させることが知られている。そこで、酸性リン脂質である LPA (18 : 1)、PA (16 : 0, 16 : 0)、PG (16 : 0, 16 : 0) および PS (18 : 0, 18 : 0) について、飽和 NaCl または酸を水層に添加する Bligh and Dyer 法にて抽出した際の回収率を比較し、結果を Table 1 に示した。その結果、PA は塩酸または塩の添加に依存せず回収率は高かったが、LPA (18:1) の回収率は Bligh and Dyer 法では 44.7%と低い回収率であったのに対し、塩酸や飽和食塩水を水層に添加することにより、それぞれ 88.6%および 97.6%と、40~50%も改善した。このことから、水層への塩添加は有用な手法であった。一方で、PG および PS の回収率については、Bligh and Dyer 法および塩添加でも高い回収率であったが、酸性条件下では逆に回収率が約 20%程度低下した。この原因として、石田らが報告している



Table 1 Effect of addition of NaCl or HCl on recovery of acidic phospholipid standards in the Bligh and Dyer method.

Molecular Species	Recovery (%)		
	Bligh and Dyer	1N HCl	NaCl
LPA (18:1)	44.7 ± 2.0	88.6 ± 0.2	97.6 ± 2.9
PA (16:0, 16:0)	101.4 ± 5.2	97.9 ± 1.0	102.1 ± 0.8
PG (16:0, 16:0)	99.8 ± 1.1	77.1 ± 2.0	97.7 ± 3.5
PS (18:0, 18:0)	71.0 ± 4.8	50.8 ± 4.7	75.3 ± 3.7

酸性条件下での PLs の加水分解が懸念された。以上の結果から、水層へ塩を添加した改良 Bligh and Dyer 法を用いることで酸性の PLs を効率よく回収できることが判明した。

#### 前処理分画法の確立

PLs は、その構造の多様性から LC/エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) -MS を使用し、一斉に分析することが一般的である。その際、LC の PLs の分離モードには順相系或いは逆相系のカラムを用い、LC の検出器として MS を組み合わせた手法が広く用いられている。順相系カラムと逆相系カラムではそれぞれ特徴的な PLs 分離能を有しており、順相系カラムによる PLs の分離では、PLs のリン酸を含む極性官能基（ポーラーヘッドグループという）の分離が、逆相系カラムによる分離では、PLs のエステル結合する脂肪酸の長さや不飽和度、不飽和炭素の位置異性の分離が期待できる。しかし、いずれの分離モードのカラムを用いた場合でも複雑な生体試料中の PLs を同定・定量分析する際には、分離が充分ではなく、夾雑物や存在量の多い PLs により存在量の少ない PLs が MS においてイオン化抑制を受け、感度の低下に伴う同定や定量性の低下が生じる。このことから、MS におけるイオン化抑制を回避する為には、LC にて夾雑物との十分な分離を達成すると共に、存在量が多い PLs と少ない PLs を適切に分離することが課題とされている。

この課題を改善するため、Johanson らは強陽イオン交換 (SCX) ゲルにて脳試料中の塩基性 PLs と酸性 PLs を分画した後、分画した試料を MALDI-TOF-MS で分析することにより塩基性 PLs の影響を受け易い酸性 PLs の感度を増大させることに成功している[55]。また、Sommer らは、リポタンパク中の PLs を順相系の LC で PLs のポーラーヘッドの違いによるサブクラス分離をした後、逆相系の液体クロマトグラフィー (LC) で分析することで、網羅性を向上させた PLs の解析を行っている[56]。しかしながら、これらの方法は多検体処理 (スループット性) に乏しいばかりか、同定を目的とした手法であり、再現性や定量性を

考慮していない。小木曾らは、酸性 PLs の網羅的解析を目的に第一段階として DEAE セルロース（セルロースにジエチルアミノエチル基が結合）を用いた前処理により存在量が少ない酸性 PLs と存在量が多い塩基性 PLs を分離した後、第二段階の逆相系カラムでさらに分離することで、多くの酸性 PLs の分析に成功している[57]。しかし、彼らの報告も、同定の域を出ていない。さらにこの手法では、PLs の PC と PE が同一画分であるため、生体内で多く存在する PC が PE のイオン化を抑制する懸念がある。

そこで、我々は網羅性が高く再現性に優れた PLs の分析法を確立することを目的として、生体中で存在量が多い夾雑物である TAG やコレステロールなどの中性脂質と、PLs の中でも存在量が多い PC、中程度の PE、さらに存在量が少ない PI、PS 並びに PA などの酸性 PLs についてスループットに優れた前処理による分離法の検討を行った。前処理カラムとして、中性脂質と PLs の分離を考えた場合、PLs はリン酸基を含むことから陰イオン交換カラムにより非イオン性（中性）の夾雑物の除去に効果的と考えた。さらに、イオン交換カラムの使用により酸性 PLs と塩基性 PLs の分離も達成できると推測された。そこで、陰イオン交換カートリッジカラムを使用し、PC、PE および酸性 PLs の標品を用いたクラス分離条件を検討した。まず、過去に小木曾らが報告している DEAE セルロースによる前処理を行った。その結果、彼らと同一条件にて前処理を実施した時、PC は 89%と高い回収率が得られたが、一方で、PE、PG および PA はそれぞれ 24、48 および 11%と非常に回収率が低かった。この低回収率の原因として、基材であるセルロースへの PLs の吸着が原因の一つと考えられたため、次に基材への吸着を抑制するために基材がポリマー製のイオン交換カラムである PL-WAX（スチレンジビニルベンゼンにポリエチレンイミンが結合）を使用した前処理分画法を検討した。その結果、溶出液としてクロロホルム（画分 1）、メタノール/クロロホルム（5 : 95、画分 2）、メタノール/クロロホルム（50 : 50、画分 3）およびメタノール/クロロホルム/酢酸/28%アンモニア水（25 : 50 : 0.35 : 1.17、画分 4）を順次用いることにより、高い再現性で PLs のクラス分離が可能となることが明らかになった（Table 2）。本条件では、画分 1 には TAG やコレステロールを含む中性代謝物、画分 2 では PC および LPC、画分 3 には PE および LPE、また画分 4 には PI、PA、PS および PG を含む酸性 PLs が選択的に溶出することを確認した（Figure 3）。また、本条件を用いて脳試料に添加した PLs の回収率を算出したところ、PC、PE、PG および PA はいずれも 80%以上の高い回収率で分画・回収されることが判明し、本手法の有用性が示された。この結果、当初懸念していた中性代謝物、存在量の多い PC、中程度の PE、並びに存在量の少ない酸性 PLs の分離が前処理カラムにて達成された。

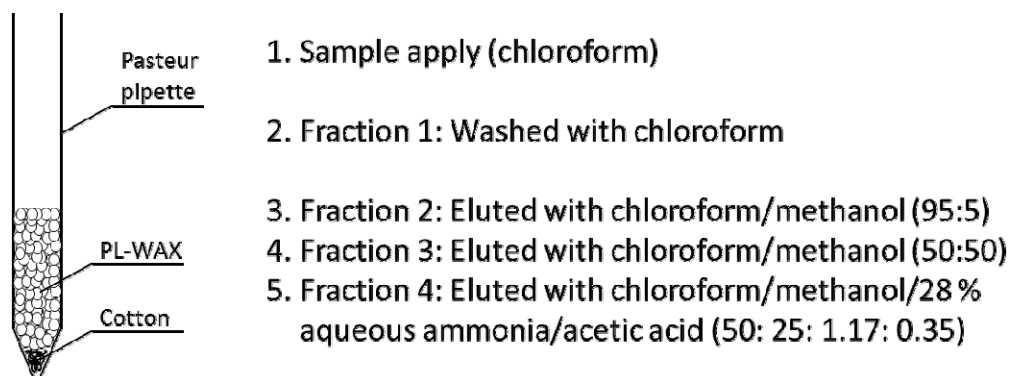


Figure 3 Protocol of class separation of PLs using PL-WAX gel.

Table 2 Recovery and reproducibility of PLs standard from mouse brain.

	PC (12:0, 12:0)	PE (12:0, 12:0)	PG (14:0, 14:0)	PA (14:0, 14:0)
Fraction No.	2	3	4	4
Recovery (%)	105 ± 10.6	106 ± 9.3	83.5 ± 8.5	97.7 ± 4.4

### LCによる分析法の確立

生体試料中の PLs の定量には、その複雑性および存在量の少なさから、高い分離性能を有する逆相系のカラムを接続した LC と感度特異性に優れる MS を組み合わせたシステムが一般的に用いられている。しかし、逆相系の LC で PA や PS を始めとする酸性 PLs を分析する際、クロマトグラム上でピークのテーリングを生じることが、代謝物を定量する上での課題の 1 つになっている。これは、金属で構成される LC システムの金属イオンと酸性 PLs が錯体を形成することが原因の一つと考えられている。すでに小木曾らはこの課題に直面し、ピーク形状のテーリングを防止するために LC 移動相の水含量を高く設定し (40%以上)、さらに移動相に 5  $\mu$ M のリン酸を添加することにより酸性 PLs のリン酸基とシステムの金属イオンとの相互作用を防止し、酸性 PLs のピーク形状を改善したことを報告している[57]。一方で、上記方法でも酸性度が最も高い LPA は、移動相へのリン酸の添加でもテーリングは抑えることが出来ないことも、同時に報告している。さらに、検出器として ESI-MS を用いる場合、不揮発性のリン酸等の LC の移動相は検出器を汚染するため、特に長時間の分析の際には検出感度の低下が引き起こされる可能性がある。そこで我々は、逆相 LC/MS による再現性と定量性に優れた PLs 分析法の確立を目的として、酸性 PLs の逆相系カラムでのピーク形状を改善するための分析条件を検討した。まず PLs 標品を用い、逆相系の LC と ESI-MS を接続したシステムにて分析したところ Figure 4A に示すように、LPA、PA および PS で顕著

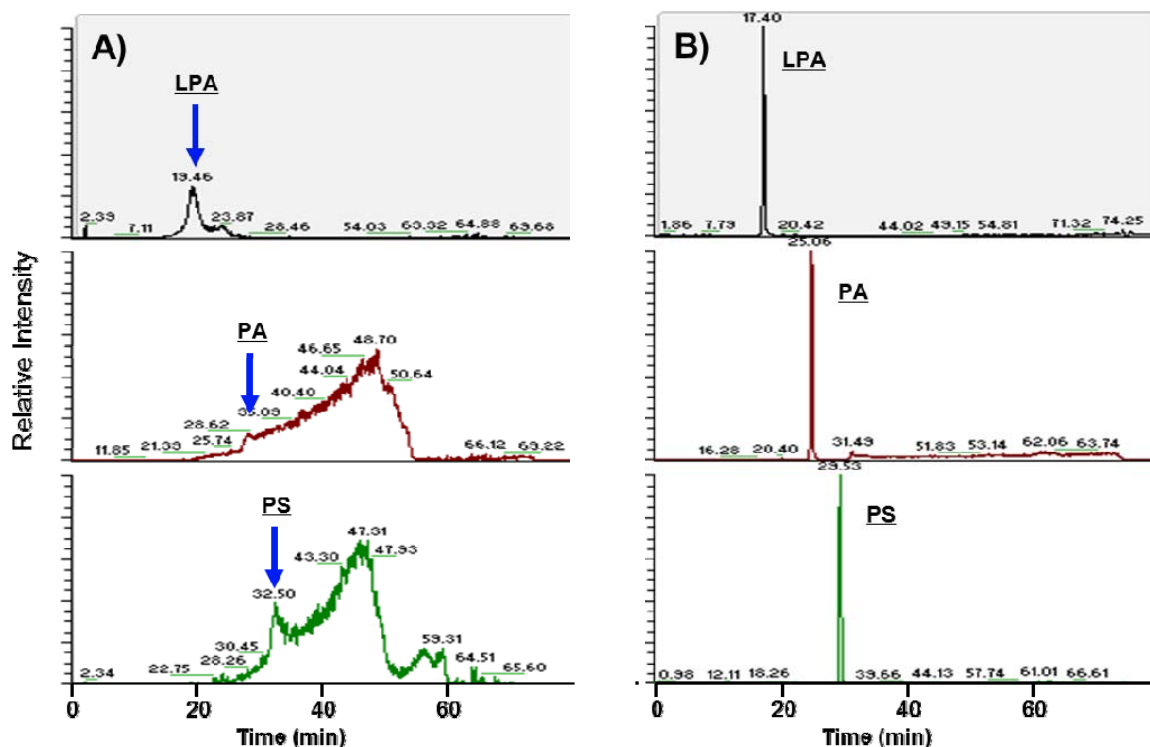


Figure 4 Extracted LC/MS chromatograms of LPA, PA and PS separated on Luna C18 column (A) and Capcell Pack C18 prewashed with EDTA solution (B).

なピークのテーリングが認められた。中村や Khin らは、リン酸化ペプチドおよびリン酸化低分子代謝物の分析においてリン酸基と LC システムの金属との錯形成によるピークのテーリングを改善するために、分析の前に Na フリーのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) でシステム内をマスキングしたり、サンプルに少量の EDTA を添加したりすることでこの問題を改善している[58,59]。そこで我々は、この情報を基に PLS の分析前に LC システムの分析系内を EDTA 溶液 (0.5 mg/mL) で十分にマスキングし、ピーク形状へ与える影響について検討した。その結果、逆相 LC における酸性 PLS のピークのテーリングは EDTA のマスキングにより飛躍的に改善されることが判明し、さらに、残存シラノール基の影響の少ない逆相カラムの選択とこの EDTA によるマスキングを組み合わせることにより Figure 4B に示すように、LPA, PA および PS のピーク形状を劇的に改善した。また、この洗浄効果は、1 週間の連続分析でも持続することを確認した。この結果より、この分析法は酸性 PLS のピーク形状を改善し、再現性と定量性に優れた PLS の LC/MS による分析法を確立した。なおリン酸基を含む物質のピークテーリングはメタルフリーの LC 系においても観測されることから、移動相や大気中の極微量金属が影響していると考えている。

## PLs 二次元網羅的分析法の有用性の確認

塩添加により Bligh and Dyer 法を改良した PLs の抽出と, LC 分析条件および PLs 二次元分離法を組み合わせた PLs 網羅的分析法の有用性を検証することを目的として, 本手法を生体試料に適用し, PLs 分析法の網羅性について小木曾らが報告した結果[57]と比較をした. まず, 生体試料としてホモジネートしたラット肝臓を用い, 改良した Bligh and Dyer 法にて PLs を抽出後, PL-WAX を用いて PLs のクラス分離を行い, 各画分を LC/MS 分析した. PLs の同定は精密質量情報, LC の溶出時間情報および MS/MS フラグメント情報を基に実施し, 同定された PS ならびに PA の種類について小木曾らが報告した結果と比較したものを Table 3 に示した. その結果, 二次元 PLs 網羅的分析法では 22 個の PS が同定され, 小木曾らが報告した結果と比べて 4 倍以上の数の PS が再現性良く同定された. また, PA の同定では, 小木曾らは 1 つの PA (34 : 1) の同定にとどまっているのに対し, 本分析法では 21 個の PA を同定することができた. さらに本分析法では低含量の PLs である PC 46 : 7, PG 42 : 2, PI 40 : 6, LPS 24 : 1, LPA 24 : 1, LPI 24 : 5 および LPG 22 : 4 を同定でき, 従来法と比較してより我々が開発した PLs 分析法は網羅性に優れた分析法であることが明らかになった.

Table 3 Molecular species of PS and PA detected by 2D-phospholipidomics in fraction 4 of rat liver samples. a) differences between theoretical  $m/z$  and observed  $m/z$ , b) i.d.: these molecular species were already identified in rat liver with the previous method.

Molecular Species	Retention Time (min)	Observed $m/z$	Theoretical $m/z$	$\Delta$ (ppm) <sup>a)</sup>	Relative Areas	Previous Method	
PS	34:2	28.2	758.4983	758.4972	1.5	0.54	
PS	36:5	26.1	780.4837	780.4815	2.8	0.49	
PS	36:4	27.7	782.4977	782.4972	0.7	6.12	
PS	36:3	29.4	784.5145	784.5128	2.1	0.37	
PS	36:2	31.6	786.5298	786.5285	1.7	8.56	i.d. <sup>b)</sup>
PS	36:1	34.6	788.5457	788.5442	2.0	8.84	i.d.
PS	38:6	27.1	806.4987	806.4972	1.9	4.85	
PS	38:5	28.0	808.5143	808.5128	1.8	3.60	
PS	38:4	31.0	810.5292	810.5285	0.9	59.77	
PS	38:4	34.9	810.5273	810.5285	-1.4	0.47	
PS	38:3	32.7	812.5448	812.5441	0.8	2.98	
PS	38:2	35.2	814.5604	814.5598	0.7	0.59	
PS	38:1	38.9	816.5771	816.5755	2.0	0.76	i.d.
PS	40:7	27.3	832.5143	832.5128	1.8	1.28	
PS	40:5	31.4	836.5439	836.5441	-0.3	3.21	i.d.
PS	40:5	32.8	836.5441	836.5441	0.0	0.62	
PS	40:4	34.0	838.5602	838.5598	0.5	2.82	i.d.
PS	40:4	35.3	838.5605	838.5598	0.9	0.27	
PS	40:2	38.9	842.5924	842.5911	1.6	0.47	
PS	40:1	43.4	844.6084	844.6068	2.0	0.53	
PS	42:4	37.3	866.5923	866.5911	1.4	0.10	
PS	42:2	43.1	870.6238	870.6224	1.6	0.16	
PA	32:0	32.0	647.4657	647.4652	0.8	0.10	
PA	32:1	29.0	645.4502	645.4495	1.1	0.17	
PA	32:2	26.8	643.4349	643.4339	1.6	0.19	
PA	32:3	24.7	641.4201	641.4182	3.0	0.02	
PA	34:0	36.5	675.4982	675.4965	2.5	0.06	
PA	34:1	32.4	673.4814	673.4808	0.9	0.26	i.d.
PA	34:2	29.7	671.4661	671.4652	1.4	3.63	
PA	34:3	27.1	669.4504	669.4495	1.3	0.42	
PA	34:4	25.1	667.4358	667.4338	2.9	0.05	
PA	34:4	26.4	667.4358	667.4338	2.9	0.05	
PA	36:1	37.0	701.5140	701.5121	2.7	1.87	
PA	36:2	33.0	699.4975	699.4965	1.5	2.97	
PA	36:2	33.7	699.4976	699.4965	1.6	0.30	
PA	36:3	29.8	697.4813	697.4808	0.7	1.01	
PA	36:4	29.4	695.4673	695.4651	3.1	3.48	
PA	38:1	41.4	729.5451	729.5434	2.3	0.10	
PA	38:2	37.6	727.5293	727.5278	2.1	0.11	
PA	38:3	34.9	725.5129	725.5121	1.1	0.61	
PA	38:4	33.1	723.4978	723.4964	1.9	15.48	
PA	38:5	29.5	721.4817	721.4808	1.3	1.85	
PA	40:1	46.0	757.5762	757.5747	2.0	0.05	

## 生体試料を用いた測定再現性の確認

次に、今回確立した PLs 分析法について生体試料での再現性を確認することを目的として、マウス脳ホモジネートを用いて PLs を分析した。一般に、定量の際には内部標準物質 (I.S.) を添加することにより、抽出や検出におけるイオン化のバラツキを補正することが可能となる。そこで、PL-WAX カートリッジカラムによる PLs の前処理において画分 2 から 4 に溶出し、かつ生体内に存在しない PLs を I.S. として選択し、前処理前の試料に添加した。すなわち、マウス脳試料に PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PA (14 : 0, 14 : 0) および PG (14 : 0, 14 : 0) を I.S. として添加し、前処理した後、それぞれ画分 2, 3, 4, 4 に溶出されるので、各画分を LC-MS 分析し、得られたマウス脳由来の PLs のピーク面積と、それぞれの画分で検出される I.S. ピーク面積を計算した。無作為に選んだマウス脳由来の 8 つの PLs ピークである PC (32 : 0), PC (36 : 1), PC (38 : 6), PE (32 : 0), PE (32 : 1), PE (44 : 7), PS (40 : 6), PS (42 : 6), PA (34 : 1), PA (38 : 4), PI (38 : 3), PI (38 : 4), PG (38 : 4) および PG (38 : 5) の面積について、同一画分に溶出する I.S. で補正した場合と、補正しない場合の相対標準偏差 (R.S.D.%) を比較した (Table 3)。その結果、I.S. で補正しない場合にくらべ、I.S. で補正した場合には、より良好な再現性が得られることが明らかになった。以上の結果から、生体試料の PLs 分析の際にはクラス別の I.S. による補正がより最適であることが示され、何れの分子も再現性に優れた分析が可能であることが明らかになった。従って、今回開発した網羅的 PLs の分析法は、従来の方法よりも網羅性が高く、精度も高い分析法であることが判明した。

Table 4 Reproducibility of representative endogenous PLs from mouse brains with or without I.S. normalization (n=3).

	PC	PC	PC	PE	PE
	32:0	36:1	38:6	32:0	32:1
Fraction No.	2	2	2	3	3
R.S.D.% without I.S. normalization	10.7	9.3	9.8	10.4	11.2
R.S.D.% with I.S. normalization	7.1	7.0	4.1	3.0	3.9
	PE	PS	PS	PA	PA
	44:7	40:6	42:6	34:1	38:4
Fraction No.	3	4	4	4	4
R.S.D.% without I.S. normalization	12.2	2.7	11.6	2.7	3.0
R.S.D.% with I.S. normalization	3.7	1.9	10.8	2.0	3.3
	PI	PI	PG	PG	
	38:3	38:4	38:4	38:5	
Fraction No.	4	4	4	4	
R.S.D.% without I.S. normalization	13.3	3.8	5.2	3.9	
R.S.D.% with I.S. normalization	11.7	2.1	2.0	1.8	

### 第3節 ガングリオシドの網羅的分析法の確立

#### 前処理法の確立

ガングリオシドやスルファチドは、PLsと同様、その構造の多様性からLC-ESI/MSによる一斉分析が一般的である。しかし、生体試料より抽出された脂質画分を直接LC-ESI/MSで測定する方法では、ガングリオシドは存在量が多い脂質により検出器においてイオン化が抑制され、検出感度の低下に伴い再現性が得られないという課題がある。このため、生体試料中の存在量が多いPCおよびPEなどの塩基性PLsや中性脂質を前処理により除去することが必須となる。池田やLeeらは、前処理法として陰イオン交換カートリッジにより中性脂質や塩基性PLsからシアル酸を有する酸性のガングリオシドを分離精製することに成功している[40,41]。しかし、彼らの報告はガングリオシドの同定に限られ、バイオマーカーの探索に求められる定量分析法としては更に検討が必要である。そこで我々は生体内のガングリオシドについて網羅性が高く再現性に優れる分析法の確立を目的として、まず生体試料中の夾雑物を前処理にて除去する条件を標品にて検討した。PCおよびPEなどの塩基性PLsや中性脂質からガングリオシドとスルファチドのような化学構造中にシアル酸と硫酸基を有する酸性脂質を前処理にて除去するために、PLsのクラス分離時と同様に陰イオン交換カートリッジを選択した。そこで、Figure 5のようにパスツールピペットにPL-WAXを充填したものを前処理カラムとして採用し、ガングリオシドおよびスルファチドを含む酸性脂質を固相抽出する条件を検討した。その結果、洗浄液としてメタノール、抽出液として5%アンモニアを含むメタノール溶液を用いることによりガングリオシドとスルファチドを固相抽出により粗精製することを可能とした。本条件では、夾雑物質となる塩基性PLsや中性脂質を洗浄段階で除去し、同時にイオン化抑制の原因となる脂質も除去することが可能な手法であることが判明した。これにより当初懸念していた存在量の多い中性代謝物ならびに塩基性のPC、PEの除去とガングリオシドやスルファチドの選択的な固相抽出を可能とした。

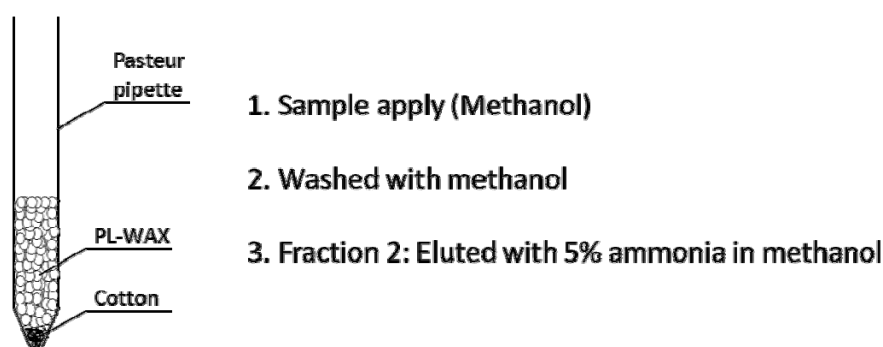


Figure 5 Protocol of class separation of PLs using PL-WAX gel.



## 生体試料を用いた再現性の確認

続いて、生体試料としてマウス脳ホモジネートを用いてガングリオシドやスルファチドの定量分析における再現性を評価した。ガングリオシドはその構造中に多くの糖鎖および異なる数のシアル酸を有することから、生体試料からの抽出やMS分析の際には各種ガングリオシドのI.S.を用いることが理想である。しかし、生体に存在しない各々のガングリオシドのI.S.を入手することは困難であったために、我々はスルファチド(d18:1, 12:0)のみをI.S.として選択し、生体試料中のガングリオシドおよびスルファチドを分析することにした。まず、マウス脳ホモジネート20 µLにI.S.として500 nMのスルファチド(d18:1, 12:0)を添加後、クロロホルム/メタノール混液(2:1, v/v)の抽出により得たガングリオシドおよびスルファチドを含む脂質画分を回収し、PL-WAXを用いて夾雑物を除去した後、ガングリオシドおよびスルファチドを濃縮し、LC/ESI-MSで分析した。同一の脳試料をn=3で分析した再現性の結果をTable 5に示した。その結果、評価した全てのガングリオシドとスルファチドのR.S.D.%は10%以下と良好な結果が得られた。以上の結果から、新たに開発したガングリオシドとスルファチドの分析法は網羅性が高く、精度も優れた分析法であることが示された。

Table 5 Reproducibility of endogenous gangliosides from mice brains (n=3).

Compound	RT (min)	Theoretical value		Measured value <i>m/z</i>	Recovery (%) (mean ± SD, n=3)			R.S.D.(%)
		Exact Mass	<i>m/z</i>					
GM1 d18:1-18:0	4.9	1545.8767	1544.8694	1544.8682	56	± 2.0	3.6	
GM1 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	6.7	1573.908	1572.9007	1572.9004	58	± 1.7	2.8	
GM2 d18:1-18:0	5.2	1383.8238	1382.8166	1382.8152	80	± 5.4	6.7	
GM2 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	7	1411.8551	1410.8479	1410.8466	70	± 5.5	7.8	
GM3 d18:1-18:0	5.4	1180.7445	1179.7372	1179.7350	63	± 3.2	5.1	
GM3 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	7.3	1208.7758	1207.7685	1207.7678	73	± 6.2	8.5	
GD1 d18:1-18:0	4.3	1836.9721	917.4788	917.4775	54	± 4.8	8.8	
GD1 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	5.8	1865.0034	931.4944	931.4929	65	± 1.4	2.1	
GD2 d18:1-18:0	4.4	1674.9193	836.4523	836.4509	72	± 5.1	7.0	
GD2 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	5.9	1702.9506	850.468	850.4666	86	± 8.5	9.9	
GD3 d18:1-18:0	4.9	1471.8399	734.9127	734.9115	53	± 2.7	5.1	
GD3 d18:1-20:0 (d20:1, 18:0)	6.7	1499.8712	748.9283	748.9272	58	± 1.3	2.3	
GT1 d18:1-18:0	3.9	2128.0675	1063.0265	1063.0241	64	± 2.5	4.0	
Sulfatide d18:1-22:0 (d20:1, 20:0)	10.6	863.6156	862.6084	862.6074	61	± 1.5	2.5	
Sulfatide d18:1-24:0 (d20:1, 22:0)	14.1	891.6469	890.6397	890.6393	63	± 1.5	2.4	

## 第4節 モデルマウスの評価

### 作製したマウスの行動試験を用いた評価

EC マウスおよび IC マウスは、異なる飼育環境により学習能力や記憶能力に差が出ること

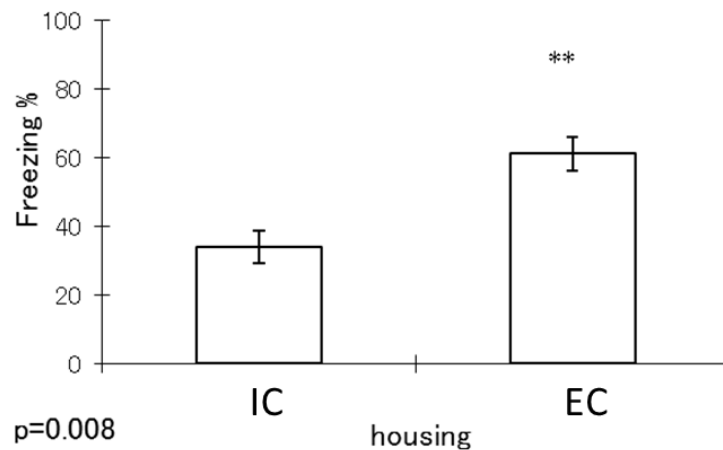


Figure 6 Contextual Fear Conditioning test result. “IC” represents mouse group housed in IC while “EC” represents mouse group that has access to various novel objects, tunnels and running wheels (EC). n=8 per group. Y axis represents % of freezing time. Higher % is associated with better memory retention. Student T test result is shown on the figure. \*\* means p value < 0.01

が報告されている[60]. また記憶機能テストの一つである恐怖条件付け試験法[60,61]は、電線が敷かれた透明のケージにマウスを入れ、まず電気ショックを与え、24時間後に、再度ケージに入れた際に、マウスが電気刺激の恐怖で硬直している時間を測定する試験であり、マウスが過去の電気刺激を記憶すればするほど硬直時間が長くなる。そこで、記憶機能向上に関連する脂質の探索のモデルとして異なる飼育条件下で作製した EC マウスの妥当性を確認するために、恐怖条件付け試験を実施した。そこで、刺激が豊かな条件下および刺激の少ない条件下で5週間飼育した EC マウスおよび IC マウスについて本試験法による記憶機能の評価結果を Figure 6 に示した。EC マウスは IC マウスに比べて有意な硬直時間の延長が認められ ( $p < 0.01$ ), 既に報告されている EC マウスの記憶の改善[60]と同様の結果が得られた。この結果から、5週間の刺激豊かな環境下での飼育は記憶機能に関連する脳の部位に変化を与えるには十分な期間であることが示唆された。

#### 作製したマウス脳の免疫染色を用いた評価

一般に、プロモデオキシウリジン (BrdU) は成人脳における神経幹細胞での神経新生に、チミジンのアナログとして機能するため、増殖細胞のマーカーとして有糸核分裂細胞の標識に用いられている[62]. また、cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) は神経細胞ニューロン間の恒久的接続を司るタンパク質を転写・翻訳するのに必要な因子であり、その CREB のリン酸化による活性化は神経細胞生存や[63]記憶形成に深く関与している[64]. そこで、5週

間の刺激豊かな環境下で作製した EC マウスおよび IC マウスの脳における記憶形成や神経新生についての検討を行うため、摘出した脳の海馬の一部である歯状回における BrdU およびリン酸化 CREB (p-CREB) の免疫染色を行った。EC マウスおよび IC マウスの歯状回における BrdU の代表的な染色像を Figure 7A に、また各マウスでの BrdU および p-CREB の染色が認められた神経細胞の数を Figure 7B および 7C に、それぞれ示した。その結果、神経細胞の細胞増殖を示す BrdU の値は EC マウスにて有意に高値を示し ( $p < 0.001$ )、さらに、EC マウスの歯状回において記憶形成に関与する p-CREB は IC マウスに比べて有意に増加することが判明した ( $p < 0.001$ , Figure 7)。この結果より、EC マウスの脳内では記憶形成や神経新生が IC マウスに比べ誘発されていることが示された。

以上の結果より、5 週間の刺激が豊かな条件および刺激の少ない条件でのマウスの飼育期間は、記憶機能に関与する脳の変化に十分であり、作製したモデルマウスの脳は記憶機能向上に関連する脂質解析に用いることは脳の免疫染色の結果からも妥当であることが示唆された。

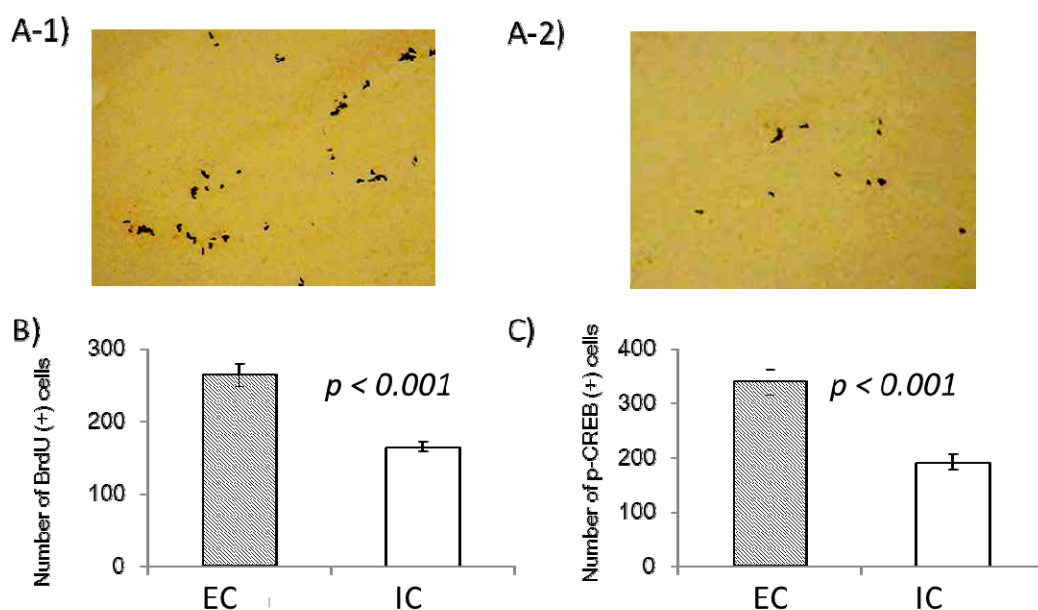


Figure 7 Immunohistochemistry (IHC: Bromodeoxyuridine (BRDU) staining) of dentate gyrus (DG). The upper two pictures (A-1: EC, A-2: IC) show the representative IHC photos and the lower graph shows the summary of IHC data (B). Increased BRDU staining is linked to neuronal progenitor cell differentiation. Summary of IHC data (p-CREB staining) of DG (C). Increased p-CREB staining in the dentate gyrus as reported in the literature is linked to increased memory formation.

## 第5節 モデルマウス脳による脂質変動解析

次に、記憶機能に差のある EC マウスおよび IC マウスの脳のうち、記憶に関与するとされる海馬と大脳皮質のホモジネートを用いて、ガングリオシド、スルファチドおよび PLs の網羅的分析を行った。一般に、メタボロミクス研究において検出ピークを同定する際、MS/MS や MS/MS/MS の情報以外に親イオンの精密質量の情報は非常に重要である。そこで、我々は、精密質量の情報が得られる高分解能 MS である Orbitrap-MS と LC を組み合わせたシステムを引き続き採用し分析した。

### ガングリオシドおよびスルファチドの分析

まず、記憶機能に関わるガングリオシドとスルファチドを見出すために、EC マウスと IC マウスの大脳皮質と海馬を用いたガングリオシドとスルファチドの網羅的分析に着手した。池田らは、ガングリオシドやスルファチドのポジティブモードの MS/MS スペクトルから、セラミド骨格の炭素鎖の同定を可能とし、その代謝物ピークの同定に有用であることを報告している[40]。しかし、我々の検討では、検出機器である Orbitrap-MS を用いた場合、ポジティブモードではネガティブモードに比べガングリオシドの親イオンの感度が著しく低下したため、ネガティブモードを採用することとした。一方、ネガティブモードでは骨格となるセラミド構造を MS/MS フラグメント情報からは得ることが出来なかったため、ガングリオシドおよびスルファチド標品の LC 保持時間の情報、精密質量の理論値および糖鎖構造の MS/MS フラグメント情報を基にガングリオシドやスルファチドの分子種を同定した。例としてマウス大脳皮質と海馬のホモジネートを LC/MS/MS にて分析した際に得られたガングリオシドやスルファチドの代表的な MS/MS スペクトルを Figure 8 に示した。その結果、GM1 と GD1 の MS/MS スペクトルから、セラミドに結合している多糖が開裂エネルギーにより末端から糖やシアル酸が一つずつ脱離したピークが出現し、セラミドへの糖およびシアル酸の結合形式の情報を得ることが可能となった。また、同定されたガングリオシドおよびスルファチドのマスキロマトグラムを Figure 9 に示した。その結果、何れのピークも良好に検出が可能であることが判明し、マウス脳では 20 個のガングリオシドと (GM1; 4 個, GM2; 2 個, GM3; 4 個, GD1; 5 個, GD1; 1 個, GD3; 2 個, GT1; 2 個), 14 個のスルファチドの同定に成功した。続いて、これら同定したピークを IC マウスと EC マウスで比較した。

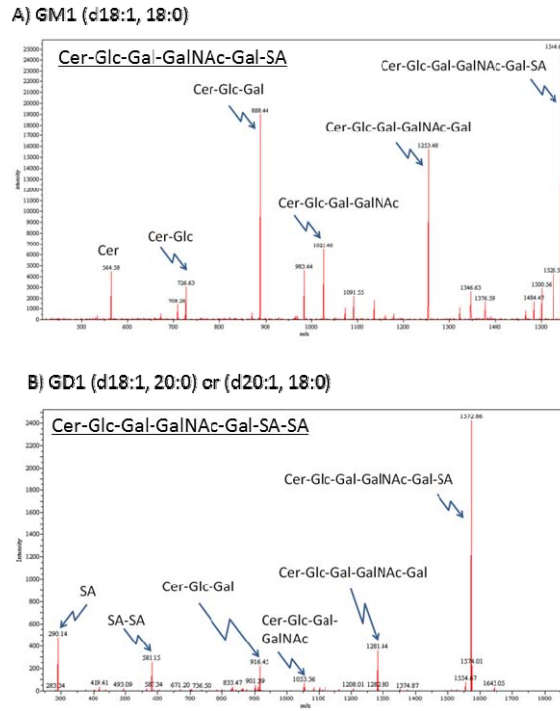


Figure 8 Representative MS/MS data of the peak. A) GM1 (d18:1, 18:0) ( $m/z$  1544.866) and B) GD1 (d18:1, 20:0 or d20:1, 18:0) ( $m/z$  931.493). Glc, glucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; SA, sialic acid; Cer, ceramide

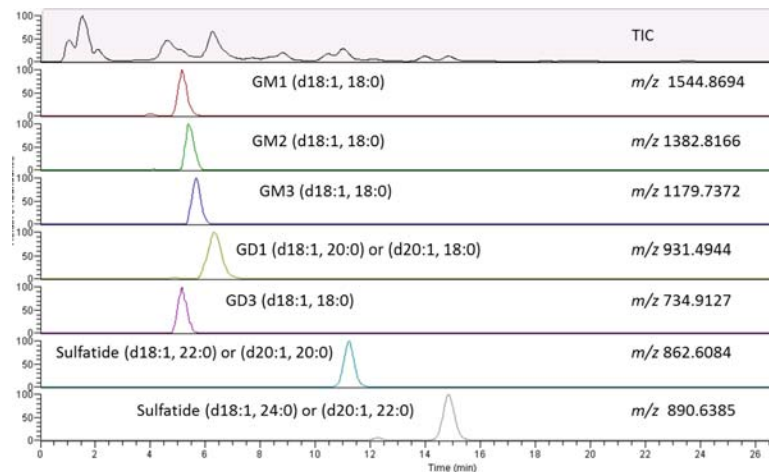


Figure 9 Representative LC-MS mass chromatograms of gangliosides in mouse cortex.

Table 6 Gangliosides levels in cortex and hippocampus of EC and IC mice.

Compound	RT (min)	Theoretical value m/z	Measured value m/z	Cerebral Cortex				Hippocampus				
				Internal control ratio (mean $\pm$ SD)		Statistical change IC over EC	Student's TTest IC over EC	Internal control ratio (mean $\pm$ SD)		Statistical change IC over EC	Student's TTest IC over EC	
				EC	IC			EC	IC			
GM1	d18:1, 16:0	3.7	1516.8381	1516.8357	0.17 $\pm$ 0.057	0.16 $\pm$ 0.027	-	0.81	0.12 $\pm$ 0.019	0.11 $\pm$ 0.020	-	0.34
GM1	d18:1, 18:0	5.2	1544.8694	1544.8658	11 $\pm$ 2.8	10 $\pm$ 1.5	-	0.68	9.3 $\pm$ 1.6	8.3 $\pm$ 1.5	-	0.42
GM1	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	7.1	1572.9007	1572.8967	2.1 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.23	-	0.65	1.3 $\pm$ 0.27	1.1 $\pm$ 0.18	-	0.22
GM1	d18:1, 22:0 (d20:1, 20:0)	9.6	1600.932	1600.9284	0.098 $\pm$ 0.31	0.093 $\pm$ 0.013	-	0.78	0.057 $\pm$ 0.017	0.048 $\pm$ 0.014	-	0.44
GM2	d18:1, 18:0	5.5	1382.8166	1382.8137	0.44 $\pm$ 0.44	0.43 $\pm$ 0.059	-	0.87	0.39 $\pm$ 0.073	0.36 $\pm$ 0.064	-	0.59
GM2	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	7.5	1410.8479	1410.8443	0.086 $\pm$ 0.86	0.084 $\pm$ 0.0069	-	0.89	0.035 $\pm$ 0.0071	0.029 $\pm$ 0.006	-	0.25
GM3	d18:1, 16:0	4.1	1151.7059	1151.7042	0.012 $\pm$ 0.012	0.0092 $\pm$ 0.0063	-	0.52	0.022 $\pm$ 0.0081	0.017 $\pm$ 0.0048	-	0.29
GM3	d18:1, 18:0	5.7	1179.7372	1179.7351	1.1 $\pm$ 0.37	1.1 $\pm$ 0.213	-	0.99	1.7 $\pm$ 0.43	1.5 $\pm$ 0.27	-	0.43
GM3	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	7.8	1207.7685	1207.766	0.15 $\pm$ 0.053	0.15 $\pm$ 0.026	-	0.89	0.17 $\pm$ 0.044	0.13 $\pm$ 0.022	-	0.20
GM3	d18:1, 22:0 (d20:1, 20:0)	10.6	1235.7998	1235.7966	0.044 $\pm$ 0.028	0.049 $\pm$ 0.015	-	0.75	0.060 $\pm$ 0.017	0.047 $\pm$ 0.011	-	0.24
GD1	d18:1, 16:0	3.3	903.4631	903.4625	0.19 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.044	-	0.62	0.13 $\pm$ 0.042	0.12 $\pm$ 0.031	-	0.59
GD1	d18:1, 18:0	4.6	917.4788	917.4778	31 $\pm$ 7.5	31 $\pm$ 5.1	-	0.78	28 $\pm$ 5.7	25 $\pm$ 3.9	-	0.43
GD1	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	6.6	931.4944	931.4928	7.4 $\pm$ 2.2	6.6 $\pm$ 0.81	-	0.53	5.0 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 0.62	-	0.25
GD1	d18:1, 22:0 (d20:1, 20:0)	8.9	945.5101	945.5083	0.47 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.062	-	0.71	0.33 $\pm$ 0.084	0.27 $\pm$ 0.032	-	0.23
GD1	d18:1, 24:0 (d20:1, 22:0)	11.9	959.5257	959.5241	0.11 $\pm$ 0.028	0.11 $\pm$ 0.024	-	0.87	0.081 $\pm$ 0.019	0.073 $\pm$ 0.015	-	0.57
GD2	d18:1, 18:0	4.5	836.4523	836.4515	0.0041 $\pm$ 0.0048	0.01 $\pm$ 0.0054	-	0.50	0.011 $\pm$ 0.0067	0.010 $\pm$ 0.0045	-	0.88
GD3	d18:1, 18:0	5.2	734.9127	734.9118	0.16 $\pm$ 0.054	0.15 $\pm$ 0.021	-	0.69	0.11 $\pm$ 0.035	0.088 $\pm$ 0.023	-	0.36
GD3	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	7.0	748.9283	748.9237	0.038 $\pm$ 0.019	0.031 $\pm$ 0.0064	-	0.47	0.004 $\pm$ 0.0041	0.0028 $\pm$ 0.0015	-	0.56
GT1	d18:1, 18:0	7.1	1063.0265	1063.0252	18 $\pm$ 5.6	17 $\pm$ 2.3	-	0.83	22 $\pm$ 4.9	20 $\pm$ 3.1	-	0.36
GT1	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	9	1077.0421	1077.0401	7.8 $\pm$ 2.9	7.7 $\pm$ 1.1	-	0.93	5.0 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 0.76	-	0.24
Sulfatide	d18:1, 12:0	2.5	722.4519	722.4515	1 $\pm$ 0.0048	1.0 $\pm$ 0.021	-	0.48	1.00 $\pm$ 0.0010	1.0 $\pm$ 0.0010	-	0.21
Sulfatide	d18:1, 16:0	4.5	778.5145	778.5133	0.33 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.049	-	0.46	0.29 $\pm$ 0.024	0.28 $\pm$ 0.052	-	0.61
Sulfatide	d18:1, 18:0	6.1	806.5458	806.5453	9.1 $\pm$ 3.5	9.0 $\pm$ 1.0	-	0.95	8.0 $\pm$ 1.1	8.1 $\pm$ 1.5	-	0.97
Sulfatide	d18:1, 18:0h	5.6	822.5407	822.5398	4.1 $\pm$ 1.3	3.9 $\pm$ 0.51	-	0.80	3.5 $\pm$ 0.50	3.2 $\pm$ 0.51	-	0.58
Sulfatide	d18:1, 18:1	4.6	804.5301	804.529	0.46 $\pm$ 0.18	0.43 $\pm$ 0.067	-	0.79	0.34 $\pm$ 0.041	0.33 $\pm$ 0.069	-	0.71
Sulfatide	d18:1, 20:0 (d20:1, 18:0)	8.3	834.5771	834.5772	1.1 $\pm$ 0.41	1.1 $\pm$ 0.098	-	0.76	0.95 $\pm$ 0.089	0.92 $\pm$ 0.16	-	0.75
Sulfatide	d18:1, 20:1 (d20:1, 18:1)	6.4	832.5614	832.5635	0.097 $\pm$ 0.051	0.071 $\pm$ 0.021	-	0.39	0.065 $\pm$ 0.021	0.068 $\pm$ 0.028	-	0.87
Sulfatide	d18:1, 22:0 (d20:1, 20:0)	11.3	862.6084	862.6077	8.1 $\pm$ 3	7.6 $\pm$ 0.87	-	0.77	6.8 $\pm$ 0.61	6.6 $\pm$ 1.1	-	0.80
Sulfatide	d18:1, 22:1h (d20:1, 20:0h)	8.2	876.5876	876.5864	1.8 $\pm$ 0.59	1.6 $\pm$ 0.18	-	0.64	1.6 $\pm$ 0.20	1.5 $\pm$ 0.26	-	0.65
Sulfatide	d18:1, 24:0 (d20:1, 22:0)	14.9	890.6397	890.6386	21 $\pm$ 7.8	20 $\pm$ 2.2	-	0.79	17 $\pm$ 1.8	17 $\pm$ 3.2	-	0.96
Sulfatide	d18:1, 24:0h (d20:1, 22:0h)	14.1	906.6346	906.6335	18 $\pm$ 6.2	17 $\pm$ 2.1	-	0.72	15 $\pm$ 1.6	14 $\pm$ 2.5	-	0.62
Sulfatide	d18:1, 24:1h (d20:1, 22:1h)	10.4	904.6189	904.6173	7.8 $\pm$ 2.6	7.0 $\pm$ 0.90	-	0.60	7.6 $\pm$ 0.97	6.8 $\pm$ 1.1	-	0.35
Sulfatide	d18:1, 24:2 (d20:1, 22:2)	8.7	886.6084	886.6068	3.5 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 0.33	-	0.67	2.8 $\pm$ 0.31	2.7 $\pm$ 0.44	-	0.87
Sulfatide	d18:1, 24:2h (d20:1, 22:2h)	8.1	902.6033	902.6021	0.62 $\pm$ 0.18	0.57 $\pm$ 0.075	-	0.61	0.56 $\pm$ 0.077	0.51 $\pm$ 0.073	-	0.41

マウス大脳皮質および海馬のホモジネートを用い LC/MS/MS 分析した際に同定された全てのガングリオシドおよびスルファチドの保持時間, 精密質量値とその理論値, I.S.補正した IC マウスおよび EC マウス脳での相対ピーク面積平均値, さらにその t-検定による有意差検定の結果を Table 6 に示した. その結果, EC マウス脳で同定された 20 個のガングリオシドと 14 個のスルファチドの代謝物は統計学的に有意な変化を確認することはできなかった. この結果から, 第 4 節で述べた飼育環境による記憶機能の変化とガングリオシドの関連性は見つけることができなかった.

### PLs の分析

次に, 異なる環境下で飼育したマウスの脳について, 第 2 節にて開発した PLs 網羅的分析法を用いて解析した. すなわち, IC マウスおよび EC マウスの海馬および大脳皮質のホモジネートから改良 Bligh and Dyer 法にて脂質を抽出後, 陰イオン交換カラムにより PC, PE および酸性 PLs と PLs を 3 画分し, その画分を LC/ESI-MS で分析した. その結果, 海馬および大脳皮質試料において 2,037 個のピークが観測された. 従来の一次元での分析法では, 1,073 個のピークしか検出できなかったため, 二次元網羅的分析法の有用性が確認された. 各画分で得られた代表的なピークの同定結果を Figure 10 に示す. このように, 各 PLs は特徴的な MS/MS および MS/MS/MS パターンを示し, このマスフラグメント情報, 前駆体イオンの精密質量の情報, さらに前処理にて溶出した画分の情報から各ピークを同定することが可能であった. また, 同定された PLs のマスクロマトグラムの代表例を Figure 11 に示す. 各画分にて同定された PLs は良好なピーク形状であり, さらに PLs の前処理法および LC 条件は適切であることを確認した.

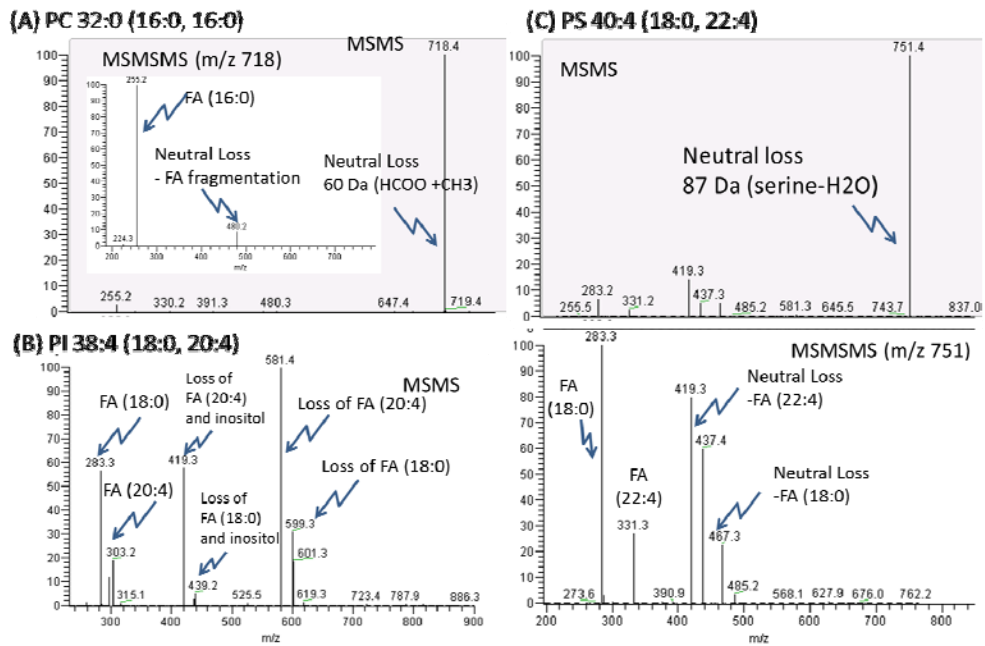


Figure 10 Representative MS/MS and MS/MS/MS data of PLs. A) PC32:0 (16:0-16:0)  $m/z$  778.5604, B) PI 38:4 (18:0-20:4)  $m/z$  885.5493 and C) PS 40:4 (18:0-22:4)  $m/z$  838.5598

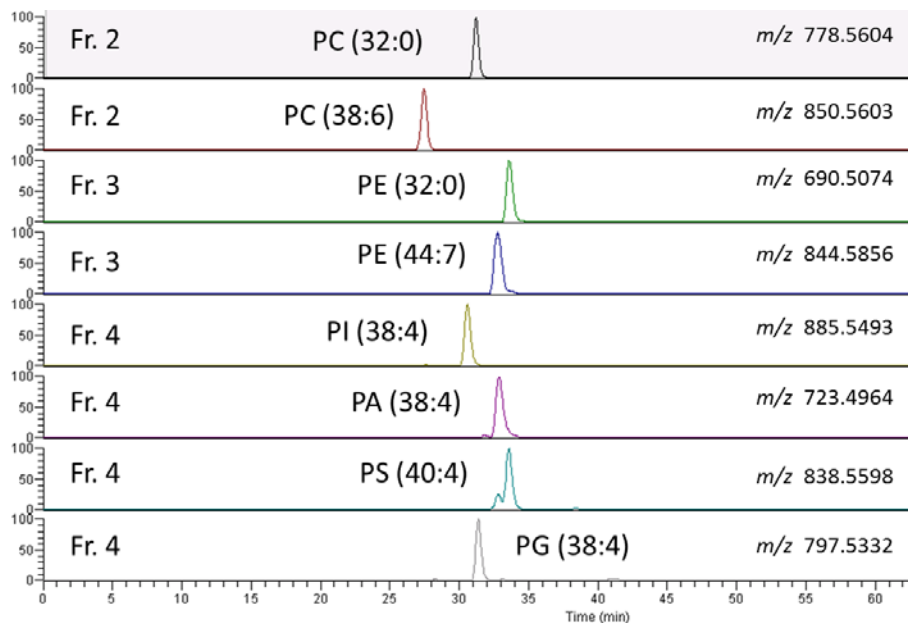


Figure 11 Representative LC-MS mass chromatograms of phospholipids in mouse cortex.



次に、EC マウスの脳内にて変化した PLs を検索するため、観測された全ての PLs ピークに対して I.S.を用いた相対面積について IC マウスと EC マウス間で比較した。その結果、海馬と大脳皮質にて 38 個のピークが統計学的に有意に変化することが明らかになった。EC マウスにて統計学的に有意な変動を示した PLs の前処理の画分、溶出時間、質量電荷比および統計解析の結果を Table 7 に示した。その結果、海馬では画分 2 より 5 個、大脳皮質では画分 2 より 7 個、画分 3 より 13 個および画分 4 より 13 個の PLs の変動が認められた。陰イオン交換カラムを前処理に用いた PLs の分画では、それぞれのピークが溶出した分画から、画分 2 で変化が認められたピークは PC、画分 3 は PE および画分 4 は酸性 PLs と予想された。続いて、溶出時間、精密質量、MS/MS および MS/MS/MS スペクトルの情報を基に、これらピークの同定を行った。代表例として今回同定した PC (22 : 6, 22 : 6) と PS (20 : 4, 22 : 6) の 2 つを取り上げ、その MS クロマトグラム、ボックスプロット、並びに同定の際に用いた MS/MS と MS/MS/MS スペクトルをそれぞれ Figure 12 に示した。MS/MS スペクトルの結果から、それぞれ PC および PS に特徴的なメチル基とアダクトイオンの脱離ピーク (m/z 862) および脱セリンピーク (m/z 767) が確認されたことからこれらピークは PC および PS であることがそれぞれ判明した。さらに Figure 12 に示した C-2 と F-2 の MS/MS/MS スペクトルの結果は  $C_{21}H_{31}COO^-$  (m/z 327) や  $C_{19}H_{31}COO^-$  (m/z 303) のフラグメントイオンを示したことから、DHA やアラキドン酸が結合していることが明らかになり、さらに精密質量や溶出時間の情報から、それぞれ PC (22 : 6-22 : 6) および PS (20 : 4-22 : 6) と同定した。他の変動したピークについても同様に同定したところ、38 個の PLs のうち 6 個のピークの同定が可能となり、EC マウスの脳内にて統計学的に有意に変化した PLs は PC (22 : 6, 22 : 6)、PE (22 : 6, 22 : 6)、PE (20 : 4, 22 : 6)、PS (22 : 6, 22 : 6)、PS (20 : 4, 22 : 6) および PS (18 : 1, 22 : 6) であることが明らかとなった (Table 8)。また、これら PLs は EC マウスの大脳皮質においてのみ減少することが明らかになった。以上の結果から、EC マウス脳内において、C22 : 6 の不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) が結合した PLs は EC マウスの大脳皮質にて特異的に減少することが判明した。その他 32 個のピークについては同定できなかった。その主な原因として、良好な MS フラグメント情報が得られなかったことや同定のために用いたデータベース中の脂質の種類網羅性が低いものと考えた。これは、我々が分析法の網羅性を向上させた結果であり、今後、良好なフラグメント情報を得るために MS/MS の感度向上や同定効率の向上のためのデータベースの充実が課題として示唆された。

Table 7 Statistical results of phospholipidomics analyzed by R software, showing the peak lists which were significantly changed between IC and EC (change > 25% and  $p < 0.05$ ).

Peak No.	Sample Type	Fr. No	R.t. (min)	$m/z$	Statistical change		Peak No.	Sample Type	Fr. No	R.t. (min)	$m/z$	Statistical change	
					IC over EC	$p$ value						IC over EC	$p$ value
1	Cerebral cortex	Fr.2	32.8	1511.1	30% up	< 0.05	21	Cerebral cortex	Fr.4	30.9	1575.1	99% up	< 0.05
2	Cerebral cortex	Fr.2	32.8	1511.1	129% up	< 0.05	22	Cerebral cortex	Fr.4	30.4	848.5	39% up	< 0.01
3	Cerebral cortex	Fr.2	25.6	810.5	38% up	< 0.05	23	Cerebral cortex	Fr.4	33.6	596.5	32% up	< 0.05
4	Cerebral cortex	Fr.2	24.9	834.5	32% up	< 0.01	24	Cerebral cortex	Fr.4	24.6	854.5	31% up	< 0.05
5	Cerebral cortex	Fr.2	24.3	922.6	30% up	< 0.01	25	Cerebral cortex	Fr.4	24.0	968.5	30% up	< 0.05
6	Cerebral cortex	Fr.2	32.9	793.6	27% up	< 0.05	26	Cerebral cortex	Fr.4	30.6	888.1	29% up	< 0.05
7	Cerebral cortex	Fr.2	31.3	803.4	27% down	< 0.05	27	Cerebral cortex	Fr.4	31.7	818.5	28% up	< 0.01
8	Cerebral cortex	Fr.3	32.9	845.6	30% up	< 0.05	28	Cerebral cortex	Fr.4	30.5	1765.1	27% up	< 0.05
9	Cerebral cortex	Fr.3	29.5	842.6	29% up	< 0.05	29	Cerebral cortex	Fr.4	32.5	790.5	30% down	< 0.05
10	Cerebral cortex	Fr.3	29.5	841.6	28% up	< 0.05	30	Cerebral cortex	Fr.4	41.0	844.7	33% down	< 0.05
11	Cerebral cortex	Fr.3	36.1	836.5	27% up	< 0.01	31	Cerebral cortex	Fr.4	30.5	746.5	34% down	< 0.05
12	Cerebral cortex	Fr.3	33.5	1582.1	26% down	< 0.05	32	Cerebral cortex	Fr.4	37.4	744.6	35% down	< 0.05
13	Cerebral cortex	Fr.3	35.6	1553.1	26% down	< 0.01	33	Cerebral cortex	Fr.4	28.9	762.5	37% down	< 0.05
14	Cerebral cortex	Fr.3	35.5	1550.1	28% down	< 0.01	34	Hippocampus	Fr.2	32.0	789.5	46% down	< 0.01
15	Cerebral cortex	Fr.3	31.6	1521.1	28% down	< 0.01	35	Hippocampus	Fr.2	44.9	1723.3	40% down	< 0.05
16	Cerebral cortex	Fr.3	29.7	1527.0	29% down	< 0.05	36	Hippocampus	Fr.2	31.7	1641.2	33% up	< 0.01
17	Cerebral cortex	Fr.3	29.8	1549.0	29% down	< 0.05	37	Hippocampus	Fr.2	34.5	674.5	262% up	< 0.05
18	Cerebral cortex	Fr.3	33.5	1583.1	30% down	< 0.05	38	Hippocampus	Fr.2	34.8	1428.1	301% up	< 0.05
19	Cerebral cortex	Fr.3	29.8	1526.0	33% down	< 0.01							
20	Cerebral cortex	Fr.3	29.7	1548.0	33% down	< 0.05							

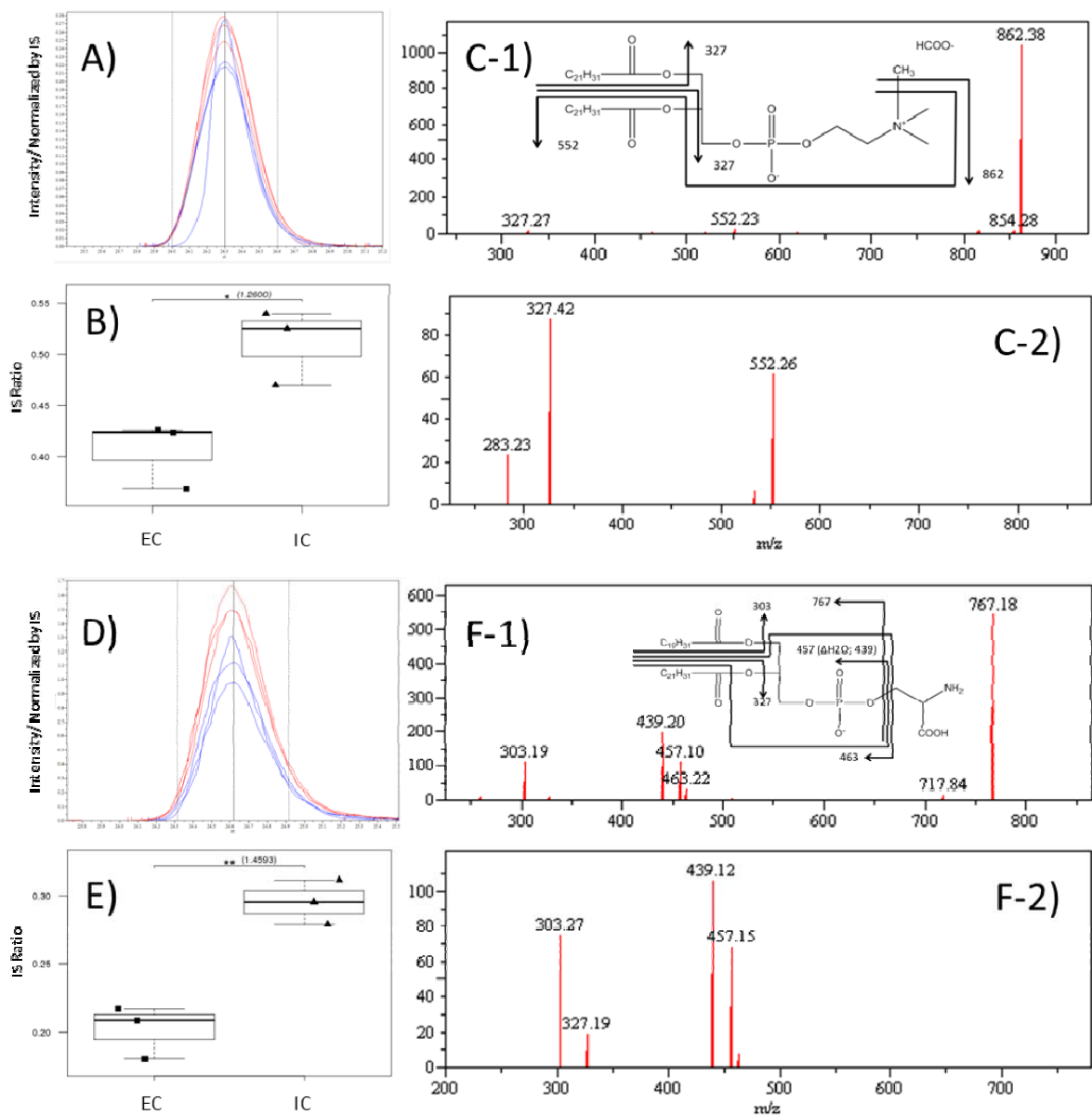


Figure 12 A) Mass chromatogram of  $m/z$  922.570 at 24.3 min (PC (22:6, 22:6)), B) categorized box and whisker plot of PC (22:6, 22:6), C-1) MS/MS spectrum of  $m/z$  922.570 at 24.3 min and fragmentation pattern with chemical structure of PC (22:6, 22:6), C-2) MS/MS/MS spectrum of  $m/z$  862.38 of C-1), D) Mass chromatogram of  $m/z$  854.501 at 24.6 min (PS (20:4, 22:6)), E) categorized box and whisker plot of PS (20:4, 22:6), F-1) MS/MS spectrum of  $m/z$  854.501 at 24.6 min and fragmentation pattern with chemical structure of PS (20:4, 22:6), F-2) MS/MS/MS spectrum of  $m/z$  767.18 of F-1).

Table 8 Statistical results of phospholipidomics analyzed by R software, showing the peak lists which were significantly changed between IC and EC, and were identified candidate structures with MS/MS and MS/MS/MS spectra, based on Student's t-test *p*-value (< 0.05) and fold- change (> 25%).

Sample Type	Measured			Theoretical <i>m/z</i>	EC mean ± SD	IC mean ± SD	Rate of Change IC v.s. EC	<i>p</i> value
	RT (min)	<i>m/z</i>	Identification by MSMS					
Cerebral cortex	24.3	922.570	PC(1-acyl-2-acyl 22:6-22:6)	922.560	0.41 ± 0.03	0.51 ± 0.04	26% up	<0.05
Cerebral cortex	25.6	810.516	PE(1-acyl-2-acyl 20:4-22:6)	810.507	0.59 ± 0.03	0.83 ± 0.08	42% up	<0.01
Cerebral cortex	24.9	834.507	PE(1-acyl-2-acyl 22:6-22:6)	834.507	1.00 ± 0.05	1.30 ± 0.13	31% up	<0.05
Cerebral cortex	31.7	818.535	PS(1-alk-2-acyl 18:1-22:6)	818.534	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.01	42% up	<0.001
Cerebral cortex	24.6	854.501	PS(1-acyl-2-acyl 20:4-22:6)	854.497	0.20 ± 0.02	0.30 ± 0.02	46% up	<0.01
Cerebral cortex	24.0	878.499	PS(1-acyl-2-acyl 22:6-22:6)	878.497	0.87 ± 0.09	1.15 ± 0.05	32% up	<0.01

特に脳内には不飽和脂肪酸 (PUFA) である DHA が非常に多く存在する[65]. 一方で, 脳内には DHA を始めとする n-3 PUFA を生合成する酵素が存在せず, その殆どは BBB を介して血液からの取り込みによるものとされている[66-68]. この際, DHA はアシル CoA 合成酵素により活性化された後, アシル CoA 転移酵素により PLs の二位の DHA エステル化を受ける[69,70]. さらに, 脳内でホスホリパーゼ A2 により DHA が切り出される[71]. 脳内の DHA は, 脂質二重膜の流動性亢進[72]や細胞寿命の延長[73-75]に関与し, 核内受容体への結合によりセカンドメッセンジャーとして機能する[76-78]. また, 神経発達において重要な働きを示すことや[79,80], DHA の代謝異常等により AD[81]やうつ[82]を始めとする神経変性疾患が惹起されることも知られている. さらに, DHA の脳内枯渇は神経可塑性, 脳障害時の修復および記憶や学習等にも悪影響を及ぼし[83], また DHA の酸化により強力な抗炎症作用を有する代謝物へと変換されるという報告がある[84,85].

最近, Holguin らは, モーリス水迷路試験において EC ラットへの DHA の長期投与は記憶能力へ変化を与えなかったが, 一方, IC ラットへの投与により, 記憶機能が向上し EC ラットとの記憶機能の差が減少したと報告した[86]. これは, 2つの異なる条件での飼育ラットの記憶機能の差に DHA 関連の脂質代謝が関与していることを示唆するデータである. また, Runyan らは恐怖条件付け学習試験における記憶形成プロセスに大脳皮質が関与していると報告している[87].

今回の我々の EC マウスの恐怖条件付け学習試験において学習能力の向上が観測された. さらに IC マウスと EC マウスの脳を用いた脂質の網羅的分析から, 大脳皮質にて DHA 結合型 PLs の量が選択的に変化していることが明らかとなった. この DHA 結合型 PLs の量的変

化とマウスの記憶機能向上の関与については、この試験結果のみでは言及できないが、ECマウスの記憶機能の向上とDHA代謝の関連性について、リン脂質の解析からも支持された。

## 第6節 ヒト血漿によるリン脂質バイオマーカー探索

前節において記憶機能が改善したECマウスの脳の解析より、記憶機能とDHA結合型PLsが関連することが示唆された。この結果より記憶機能が低下しているAD患者、即ちヒトにおけるDHA結合型PLsおよびその関連代謝物の挙動が変化している可能性があるとの仮説を立てた。これまで多くの論文において記憶機能が低下したADの脳内にてPI、PEおよびPC等のPLsの量が増加することが報告されており、ADと脳内PLs代謝は密接に関連しているとされている[45]。さらに脳と直接接している体液であるCSFを使用し、LPC/PC比がAD患者にて顕著に減少することや[88]、PCがAD患者のCSF中にて顕著に増加することを見出している[89]。このように、ADとPLsの関連性を脳や浸襲性の高いCSFを用い研究した例はいくつかあるが、血液などの低侵襲性試料を用いたADバイオマーカー探索研究はこれまで報告例はない。従って、血漿中ADバイオマーカーの発見を目的として、低侵襲性試料である血漿中PLs網羅的分析を行い、DHA結合型PLsの変化およびADでのその他PLsの変動を把握することは、大きな意義がある。そこでまず、血漿中PLsの解析に応用するために第2節にて開発した網羅性および再現性に優れた二次元PLs解析手法を検討した。

### 二次元PLs分析法の血漿への応用の検討

まず、ヒト血漿試料を用い二次元PLs解析手法での回収率並びに再現性を検討した。検討では、ヒト血漿中にI.S.として一定量のPC(12:0, 12:0)、PE(12:0, 12:0)、PA(14:0, 14:0)およびPG(14:0, 14:0)を添加し前処理での塩添加による抽出とPL-WAXでの分画後、LC/ESI-MSにより得た回収率をTable 9Aに示す。その結果、添加したI.S.の回収率は75%以上であることを確認した。また、各標品は脳と同様にPC(12:0, 12:0)は画分2、PE(12:0, 12:0)は画分3、PA(14:0, 14:0)およびPG(14:0, 14:0)は画分4にそれぞれ溶出することを確認した。次に、ヒト血漿由来のPLsから無作為に8つピークを選び、面積の再現性を4種類のI.S.補正の有無により評価した。その結果、I.S.を用いた場合、8つのピーク面積のn=3でのR.S.D.%は1.6~8.2%であった。一方で、I.S.を用いない場合、R.S.D.%は0.3~25.8%であることを確認した(Table 9B)。このことから、脳での分析と同様、血漿においてもI.S.による補正で再現性のよい分析が可能になった。また、本検討で用いた内因性の8つのPLsは、全て期待通りの画分に溶出し、内因性のPLsであるPC、PE、PG、PI、PAおよびPS等がPL-WAXによる前処理にてクラス分離できていることも確認し

Table 9 Recovery and reproducibility of A) added standard PLs and B) endogenous plasma PLs from human plasma (n=3).

A)		PC 12:0, 12:0	PE 12:0, 12:0	PG 14:0, 14:0	PA 14:0, 14:0
	Fraction No.	2	3	4	4
	Recovery (%)	91.1 ± 2.7	117 ± 2.3	77.1 ± 6.9	108 ± 11.3
B)		PC	PC	PC	PE
		36:1	36:4	40:5	34:2
	Fraction No.	2	2	2	3
	R.S.D. (%) without I.S. normalization	1.6	0.3	3.0	19.5
	R.S.D. (%) with I.S. normalization	2.7	4.4	4.0	2.1
		PE	PI	PI	PS
		38:5	38:4	40:6	40:4
	Fraction No.	3	4	4	4
	R.S.D. (%) without I.S. normalization	25.8	3.2	2.2	5.7
	R.S.D. (%) with I.S. normalization	8.2	1.9	1.6	1.9

た。さらに、これら 8 つの PLs は、目的とする画分でほぼ 100%溶出することが確認でき、二次元 PLs 解析手法は、血漿にも適用可能であることが実証された。

#### 血漿中 AD バイオマーカー探索

次に、二次元 PLs 解析法による血漿中 AD バイオマーカー探索に着手した。まず、試料として白人の AD 患者、MCI 患者および老齡健常人それぞれ 10 名の血漿サンプル 60  $\mu$ L を用い、PLs を網羅的に分析した。LC/MS 分析にて得られた各画分のピークを MS/MS スペクトル、保持時間および精密質量情報を基に同定したところ、60  $\mu$ L の血漿から 400 以上の PLs ピークが同定され、その結果を Table 10 に示した。存在量の高い塩基性 PLs のみならず多くの PA, PS などの酸性 PLs やカルジオリピン等も同定も可能となった。続いて、健常者に比べて MCI や AD にて有意に変動しているピークの抽出を目的とし、同定できなかったピークも含めた全てのピークを健常者、MCI 並びに AD 患者間で群間比較した。健常人に比べ AD における変化倍率が 0.5 以下若しくは 2 以上であり、さらに変動が統計学的有意 ( $p < 0.05$ ) であるピークを抽出したところ、合計 31 個のピークを確認した (Table 11)。興味深いことに変動が確認された 31 個全てのピークは、AD にて減少することが判明した。さらに、31 個中 28 個のピークにおいて AD の早期ステージの MCI においても統計学的有意に変化することが判明した。続いて、第 5 節の動物モデルにおいて変動が確認された DHA 結合型 PLs について検討した。その結果、DHA 結合型 PLs はヒト血漿中では変動が確認されず、動物モデルのみ変化し、ヒトとは一致しないことを確認した。この原因の一つとして、脳と血漿の違いとも考えられるが、動物モデルの妥当性や種差による変動脂質の乖離も原因の一つと考え、探索初期段階からヒトの試料を用いた AD バイオマーカー研究が必要であることが強く示唆された。

Table 10 Identified PLs in each fraction; 2, 3 and 4 of 60  $\mu$ l human plasma sample. ePC: ether-linked PC, ePE: ether-linked PE, CL: cardiolipin

Class	Number of identified PLs	Class	Number of identified PLs
PC	71	LPS	7
LPC	39	PA	11
ePC	46	LPA	12
SM	35	PI	35
PE	32	LPI	16
LPE	18	PG	20
ePE	24	LPG	8
PS	44	CL	8

Table 11 Statistical results of 2D-LC/MS analyzed by R software, showing the most significant features/components that can be used for class discrimination. a)  $<0.05$ , b)  $<0.01$  and c)  $<0.001$

Peak No.	Fr. No	RT (min)	$m/z$	Fold change		Peak No.	Fr. No	RT (min)	$m/z$	Fold change	
				Control vs MCI	Control vs AD					Control vs MCI	Control vs AD
1	2	15.2	1603.0	0.19*	0.19 <sup>a)</sup>	17	3	17.1	478.3	0.49**	0.45**
2	2	15.2	1083.7	0.27** <sup>b)</sup>	0.29**	18	3	15.1	1515.0	0.51*	0.40**
3	2	15.1	1627.0	0.34*	0.32*	19	4	21.2	629.4	0.48**	0.45**
4	2	27.3	738.5	0.19**	0.32**	20	4	27.9	835.5	0.26**	0.47*
5	2	17.3	1087.7	0.29*	0.34*	21	4	27.2	909.5	0.43**	0.46**
6	2	36.9	744.6	0.36*	0.36*	22	4	28.0	927.5	0.34**	0.49*
7	2	13.9	538.3	0.32*	0.37*	23	4	33.2	947.5	0.57**	0.48*** <sup>c)</sup>
8	2	14.8	564.3	0.42**	0.38**	24	4	62.4	1061.8	0.56**	0.46**
9	2	15.3	1107.7	0.42*	0.43*	25	4	36.1	1303.8	0.62	0.31**
10	2	15.2	1151.7	0.39*	0.43*	26	4	35.7	1329.8	0.64	0.33**
11	2	17.3	506.3	0.55*	0.45*	27	4	30.0	1723.1	0.35*	0.40**
12	2	17.1	1155.7	0.47*	0.49*	28	4	33.4	1729.1	0.37**	0.37**
13	3	23.0	548.4	0.36**	0.32**	29	4	30.0	1744.1	0.42**	0.48**
14	3	14.7	996.6	0.38**	0.45**	30	4	33.1	1750.1	0.40**	0.40**
15	3	25.8	1339.7	0.86	0.46*	31	4	30.5	1771.1	0.58*	0.33**
16	3	17.3	999.6	0.52**	0.48**						

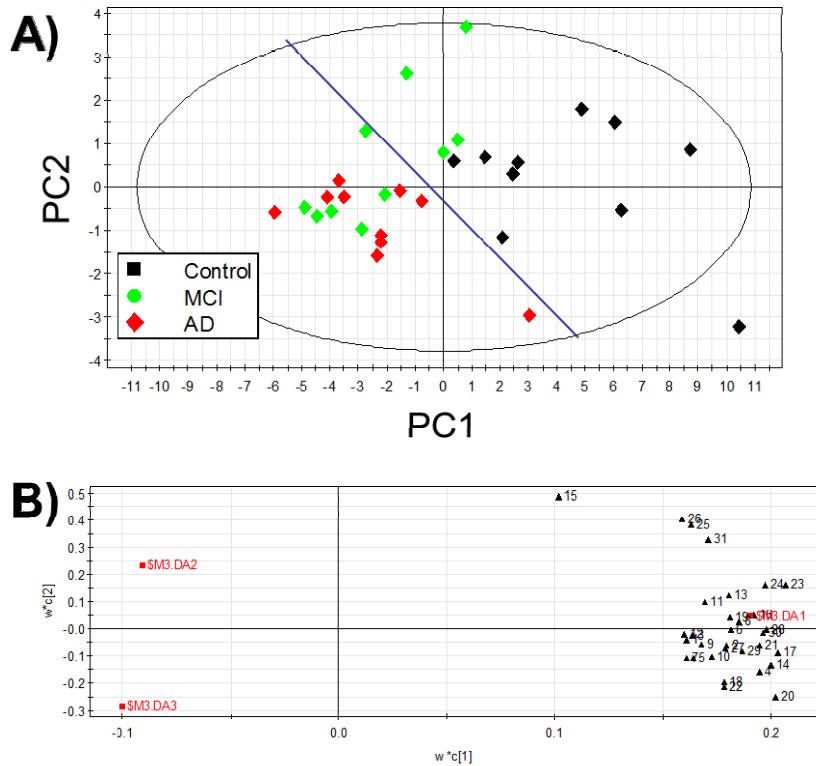


Figure 13 PLS score plots for 2D-LC/MS plasma analysis using 31 important features: 2D-PLS score plot (A). PLS loading plots for 2D-LC/MS (B). Components far from the origin of coordinates (0, 0) have higher discrimination power.

さらに、健常者に比べ AD にて有意な変動が確認された 31 個の PLs の中から健常者と MCI および AD 患者間で最も乖離している PLs を確認するため、31 個の PLs ピークを用いて supervised clustering 法を活用した主成分回帰解析を行い、PLS スコアプロットを Figure 13 に示した。A) の主成分回帰解析の結果、AD 患者と健常者は明確に分離され、MCI 患者は AD 患者寄り、若しくは健常者寄りに分布し、大きく 2 群に分離することが明らかになった。また、特に横軸方向の第一主成分において AD 患者、MCI 患者および健常者が良好に分離していることが解析の結果から明らかになった。そこで次に、第一主成分のパラメータに最も寄与率が高い PLs を PLS ローディングプロットにて解析した (Figure 13 B)。尚、このプロットは、原点 (0, 0) から偏りが大きいほど、よりクラス分離に寄与していることを示し、また座標軸 (x, y) の x の絶対値が大きいほど第一主成分への寄与が高く、y の絶対値が大きくなれば第二主成分への寄与が大きいことを示す。従って、最も x の絶対値が大きいパラメータとして、No. 23 と No. 17 の PLs は、第一主成分への寄与が大きく、健常者と AD 患者を最もよく分離する能力のあるパラメータであることが判明した。



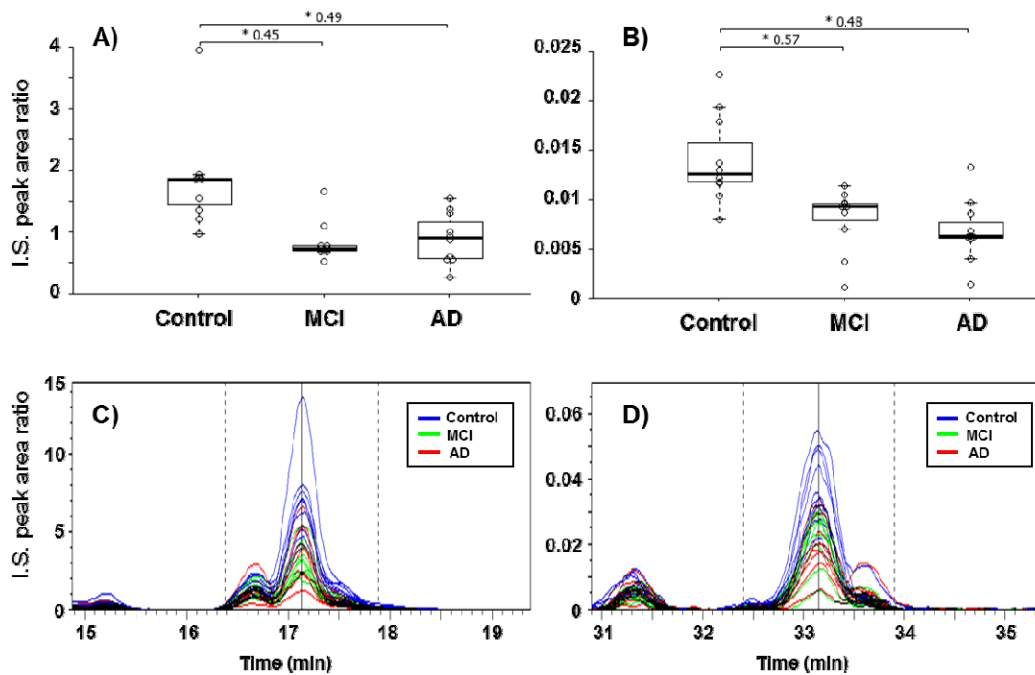


Figure 14 Categorized box and whisker plot for 2D-LC/MS features #17 (a) and #23 (b). Chromatograms of #17 and #23 are shown in (c) and (d), respectively.

次に、健常者、MCI および AD 患者の No. 17 と No. 23 の PLs の I.S.ピーク比を比較した (Figure 14). その結果、A) と B) に示すように、何れも健常者に比べ AD および MCI にて有意に減少し、しかも AD と MCI は同等レベルに減少することが確認されたことにより、これらピークは AD 早期診断マーカーとしての可能性を示唆した。

続いて、この2つのピークについて MS フラグメント、精密質量および溶出時間の情報を基に同定した。その結果、No. 17 は MS/MS フラグメント、溶出時間、精密質量情報等から LPE (18 : 1) であることが判明した (Figure 15)。一方、No. 23 は同定することが出来なかった。

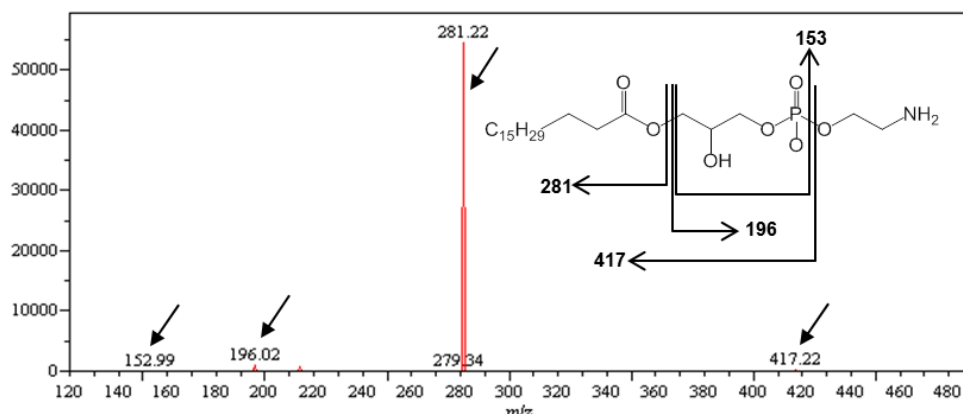


Figure 15 MSMS spectrum and possible structure of the compound corresponding to #17.

LPC や LPE などのリゾ PLs は、特に炎症と深く関わっていることが知られ[90,91]、また、AD において炎症性のメディエーターの発現が上昇することが報告されている[92,93]。さらに、AD の脳内においてリゾ PLs を生成する酵素であるホスホリパーゼ A2 活性が健常者に比べて減少することも報告されている[94,95]。これらのことから、血漿中 LPE (18 : 1) は初期ステージの AD を診断することが可能な AD バイオマーカー候補であると判断した。

次に、AD で変化した 31 個の PLs ピークの再現性を確認するため、別に白人の AD 患者、MCI 患者および健常人各 10 名の新たなコホートを用いて PLs を分析した。分析の結果、31 個中で #17 (LPE (18 : 1)) や未同定ピークである #20 を含む 4 つのピークは、健常者に比べて AD 患者にて変化する傾向を認めたが (Figure 16)、統計学的に有意な差は得られなかった。

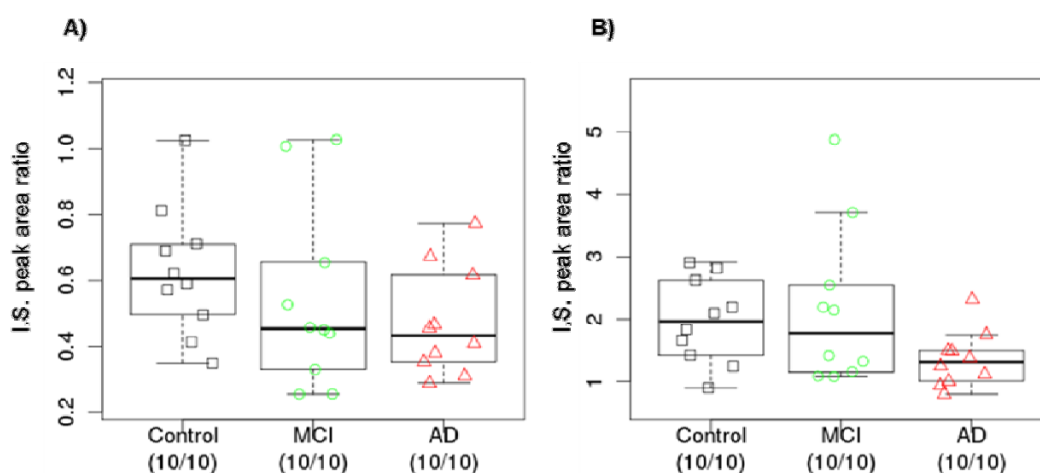


Figure 16 Comparison of features #17 (A) and #20 (B) between control, MCI and AD plasma.

## 第7節 結語

脳および血漿中の PLs, ガングリオシドおよびスルファチドの網羅的分析法を確立し、以下の知見を得た。

- 開発したイオン交換カラムと逆相系のカラムを組み合わせた二次元 PLs 分析法およびガングリオシドとスルファチド分析法は、従来法に比べて網羅性および再現性に優れた手法である。
- 行動試験による記憶機能向上や脳内における神経細胞の増殖および記憶形成が IC マウスに比べ亢進した EC マウスの脳中の脂質の網羅的分析により、大脳皮質にて特異的に DHA 結合型 PLs が有意に減少した。この事実は、EC および IC マウスの記憶機能と DHA の代謝が関連するという従来の報告を支持した。
- ヒトでも DHA 結合型 PLs が変化する仮説を立て、ヒト血漿の PLs 網羅的分析を実施した。その結果、AD 患者血漿中で DHA 結合型 PLs の変化は認められなかったが、新たに 31 個の脂質代謝物が AD 患者で健常者に比べて有意に変動することを確認した。その中で、AD および MCI 患者において顕著に変化しているピークを同定したところ LPE (18:1) であることが判明し、AD バイオマーカー候補となる可能性が示唆された。さらに LPE (18:1) を含む 4 つについてはコホートを変えた試験においても AD で変化の傾向が認められた。統計学的に有意な変動ではなかったが、患者の多様性や血液採取条件が施設間で異なることなどが示唆され、バイオマーカーとしての可能性を更に追求するためには、適切な患者情報の獲得や、サンプル採取法から分析法にわたる標準化などが今後の課題と考えられる。
- 今回開発した PLs, ガングリオシドおよびスルファチドの網羅的分析法により、従来の報告から記憶機能や AD との関連性が示唆される脂質分子は、今回の解析においても記憶機能に差のあるモデルマウスの脳内や AD 患者の血液で変動することを明らかにした。一方で、ヒト血漿を用いた研究ではコホート間により異なる結果が得られた代謝物も多く確認された。今後バイオマーカーを探索する際には患者の多様性を考慮し、規模を大きくした幾つかのコホートの確保や服薬や疾患情報などの患者情報も含めた詳細な解析が重要であることも示唆された。さらに、脳と血漿の違いとも考えられるが、動物モデルとヒトとの乖離も確認されたことにより、探索段階から低侵襲性のヒト試料を用い AD バイオマーカーを探索する重要性も同時に示唆された。

## 第2章 ヒト試料からの AD バイオマーカー探索

### 第1節 序

第1章で動物モデルから得られたバイオマーカー候補が必ずしもヒトでは検証できないことから、探索段階からヒト試料を直接使用し AD バイオマーカーを見出す重要性が示唆された。そこで、動物モデルを経由せず、直接ヒト試料を使用したバイオマーカー探索に着手することにした。また第一章での検討結果から、PLs 群からの血漿中 AD バイオマーカー候補を見出すことは難しいと考え、別の脂質分子群について検索することにした。

これまで、AD の発症や進行に関わる因子として酸化ストレス、炎症およびコレステロール代謝の異常などが報告されている[96]。この中でも疫学のおよび生化学的エビデンスからコレステロール代謝と AD の発症や進行は極めて関連性が強いとされ注目されている。例えば、コレステロール生合成や代謝に関与する多くの遺伝子は孤発性 AD に関与すること [19-21]、コレステロール代謝の変化が脳内での A $\beta$  の沈着やタウタンパク質の過剰なリン酸化に重要な役割をすること [97,98]、さらに高コレステロール血症が孤発性 AD 発症の危険因子であるとの報告がある [20,22-24]。また、コレステロールの運搬に対して重要な機能を果たしているアポリポプロテイン E (APOE) と AD の関連性はとりわけ強い。APOE は、脳内で最も多いアポリポプロテインであり、アストロサイトからニューロンへのコレステロールを始めとする脂質の運搬に対して重要な機能を果たしている。二か所のアミノ酸配列の違いにより  $\epsilon 2$  (cys112, cys158) ,  $\epsilon 3$  (cys112, arg158) および  $\epsilon 4$  (arg112, arg158) のアイソマーが存在し、その中でも APOE  $\epsilon 4$  は、リポプロテインの構造を変形させることにより、脳内のコレステロール代謝異常を招き、A $\beta$  の脳内沈着や脳の委縮を引き起こし、AD の最も強力な危険因子であることが多くの全ゲノム関連解析研究にて報告されている [99-102]。

コレステロールは、細胞膜の基本成分であり、リポタンパク質によって輸送され体循環している。生体内のコレステロールは、食事摂取による吸収や、アセチルコエンザイム A を出発物質として肝臓や脳などでラノステロールを介して生合成され、胆汁酸やステロイドホルモンの前駆体としても重要な役割を果たす。中枢神経系の体全体に占める容積の割合は 2% であるが、生体内コレステロールのうち 25% は中枢神経系に存在し [103]、細胞膜、膜輸送および細胞内のシグナル伝達の安定性と流動性に影響を及ぼしている。脳内のコレステロールの殆どは食事摂取により吸収されるコレステロールとは全く異なり、脳内にて生合成されることが知られ [104]、神経の細胞死などによって生じた余分なコレステロールは、ニューロンにて 24 (S) 位が主に水酸化を受けることで (24 (S) -ヒドロキシコレステロール) 脳から排出される [105]。肝臓で作られられた 24 (S) -ヒドロキシコレステロールはすぐに代謝される

ため、末梢血中の 24 (S) -ヒドロキシコレステロールの殆どは脳由来とされ、その量は神経変性や髄鞘脱落を反映する血漿中のバイオマーカー候補となっている[96]。しかし、ニューロンの減少に伴う 24 位水酸化酵素活性の減少は、グリア細胞での 24 位水酸化酵素の発現上昇等を伴うため、各バイオマーカー検証試験により結果が異なり、現在ではマーカーとしての妥当性が議論的になっている[96]。

このように、コレステロール代謝は AD バイオマーカーを検索する上で極めて魅力的な代謝経路であり、コレステロールの代謝物のみならずその前駆体を含めた網羅的な解析が新たな AD バイオマーカー発見に繋がる可能性は充分にあると考えた。

現在の脂質の網羅的分析研究での標的の多くは、MS/MS フラグメントより容易に同定が可能であることからトリアシルグリセリド等の中性脂質、PLs ならびにガングリオシド等が主流となっている。一方で、コレステロール関連の代謝物は、MS/MS スペクトルからは同定が困難な場合が多く、その同定には標品を必要とすることから、特に LC/MS による報告例は殆どない。そこで我々は、新規 AD バイオマーカーを発見することを目的として、コレステロールの代謝物やその前駆体に着目した網羅的な分析法を開発すると同時に、ヒト試料での AD バイオマーカー探索に適用することとした。

本章では、血漿中のコレステロール周辺代謝物を網羅的に分析することで、血中 AD バイオマーカーを新たに見出すために以下の検討を実施した。

- コレステロール周辺代謝物の網羅的な分析法を確立し、低侵襲の試料の 1 つであるヒト血漿に適用することにより AD バイオマーカーを探索した。
- 見出されたバイオマーカーについて信頼性の高い定量法を確立し、中規模なコホートによる再現性試験に適用した。
- 血漿中で見出したバイオマーカー候補について CSF や脳に適用し、中枢神経系における変動を検討した。
- 人種を跨いだ横断的な大規模研究において AD バイオマーカーとしての検証や APOE 遺伝多型、年齢および認知機能との関連を評価した。
- 日本人や白人における経時的な評価により AD バイオマーカーと認知機能との関連性について更に深く考察した。

## 第2節 コレステロール周辺代謝物の分析法の構築

今日までステロールの分離分析には GC が主に使用されてきた[106-108]. しかしながら, GC は分析の前処理として脱抱合や誘導体化といった煩雑な前処理を必要とするばかりではなく, エポキシコレステロールの様に熱に不安定なステロールは GC では分析することが不可能である[109,110]. このような背景から最近, LC によりコレステロール関連代謝物を分析した報告が増加しており[111,112], LC を用いた生体内ステロールの分析・定量が汎用されてきている.

一方, ステロールの検出には, これまで GC では FID 検出器[113,114], LC では UV[115,116] や RI[117]検出器が主に活用されてきた. しかしながら, これらの検出器は感度が十分でなく, ごく微量成分の定量には限界がある[117]. 一方で, MS を活用した検出器は高感度であり, 生体内での微量代謝物の検出に好都合な場合が多い. 更に, MS は感度のみならず質量分離が可能であることから, GC や LC のクロマトグラフィーでの分離が不可能な代謝物でも特異性を発揮する. 特に LC/MS では検出器に ESI や大気圧化学イオン化法 (APCI) に接続可能であり, とりわけ APCI は難揮発性非イオン性化合物を効率よくイオン化し, コレステロール類縁体のように中性化合物のイオン化に適している[117-120]. 以上のような観点から, コレステロール周辺代謝物の網羅的測定法を LC/APCI-MS により確立することとした.

まず前処理条件を検討した. 一般的に, 血漿においてコレステロールは3位の水酸基に脂肪酸が結合したエステル型で存在する. しかもステロールや脂肪酸は構造異性体が多く, エステル型での分析は煩雑となり, 同定は困難となる. そこで, 血漿試料を50%の水酸化カリウムを用いる溶液にて鹼化し, ステロールを遊離型とした上で, 前処理としてヘキサンによる液-液抽出で目的とする代謝物を選択的に抽出することとした. また, 抽出時のパラツキを考慮し, コレステロールの安定同位体元素標識体を I.S.として試料に添加し, 再現性に優れた LC/APCI-MS 分析を可能とした (Figure 17A). この前処理により, 煩雑な誘導体化を必要としない, コレステロールの前駆体およびその代謝物を網羅的に分析する手法を構築することに成功した. 本手法では, ヒト血漿 25  $\mu$ L を用い, コレステロールの約 100,000 分の 1 の存在量のコレステロール類似分子を測定することが可能であり, コレステロールの代謝物である水酸化体やコレスタ-7,24-ジエン-3 $\beta$ -オールおよび 7-デヒドロデスモステロール等のコレステロール生合成前駆体を含む内因性中性代謝物の再現性の高い測定を可能とした (Figure 17B).

**A)** Human plasma sample(25uL)  
 ↓ ← D7-cholesterol  
 ↓ ← 50% potassium hydroxide  
 Saponification  
 ↓ ← Hexane  
 Liquid/liquid extraction  
 ↓ Hexane layer  
 Reconstituted in ethanol and the solution was subjected to LC/APCI-LTQ  
 Orbitrap analysis  
 Full FT scan mass spectrum (200–1000 m/z, resolution of 30,000)

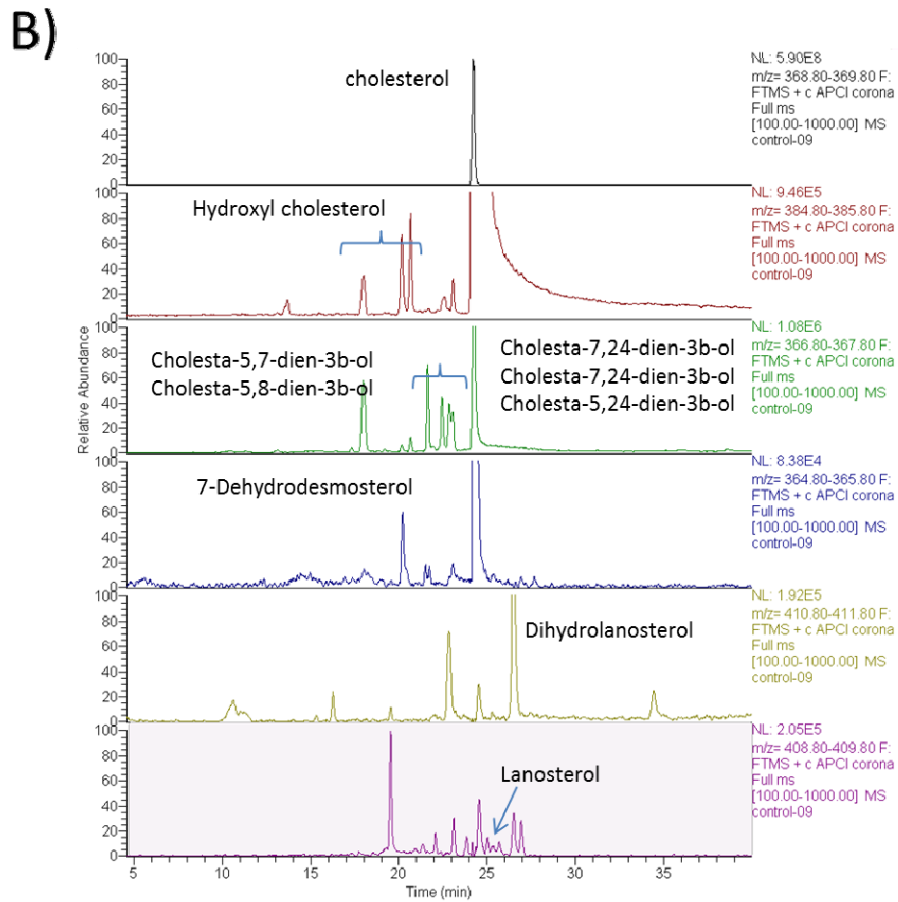


Figure 17 Protocol of cholesterol metabolites and precursors analysis in human plasma sample (A), and representative LC/APCI-MS chromatogram of human plasma (B).

### 第3節 ヒト血漿によるバイオマーカー探索

#### 網羅的な血漿中ステロールの解析

次に、コレステロール関連代謝物からの AD バイオマーカー探索を目的に、前節にて開発した LC-APCI-MS による網羅的な分析法を用い、AD 患者および健常者それぞれ 10 例の血漿中コレステロール関連代謝物を分析した。解析には、我々の研究室で開発した質量分析解析ソフトウェアである MS++ を使用し、得られた全てのピークを対象に各ピーク面積を算出し、健常者と AD 患者群でディファレンシャル解析を行った。健常者と比較して AD で 2 倍以上、或いは 1/2 以下に有意に ( $p < 0.05$ ) 変化しているピークを検索した結果、分解能 60,000 で  $m/z$  367.3349 のベースピークを示し、コレステロールのピークより溶出時間が 2 分程度早い 21.5 分に出現するピークが変動倍率 0.36 と有意に AD において減少していることが判明した (Figure 18).

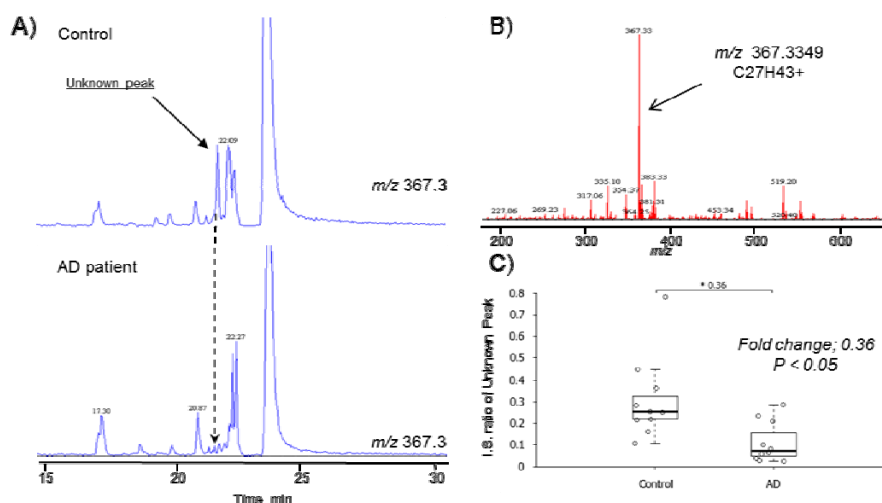


Figure 18 Extracted ion chromatograms in the positive ionization made of  $m/z$  367.3 of age-matched control sample (A) and AD plasma sample (B). (C) MS spectrum of unknown peak decreased in AD plasma samples.

#### 変動ピークの同定

続いて、AD において有意に減少するピークの同定を試みた。一般に、構造が非常に類似している脂質の同定において、イオン精密質量、MS/MS フラグメント並びに LC カラムからの溶出時間は重要な情報である。この分析では、対象としたピークの検出強度が極めて弱く、また MS/MS フラグメントが殆ど生じなかったため、検出されたイオンの精密質量と分析カラム溶出時間の情報を基にその構造を同定することとした。



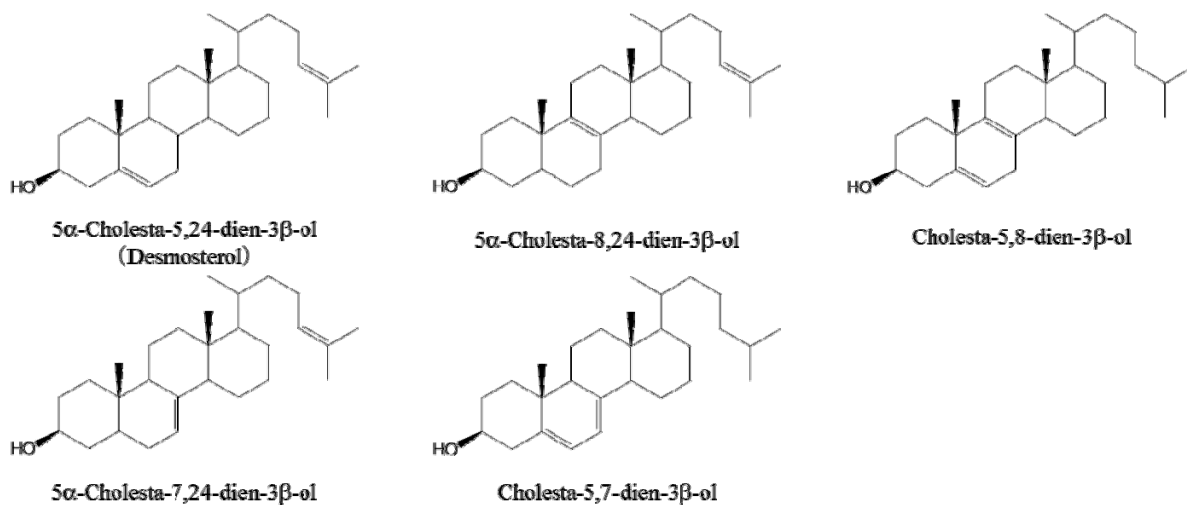


Figure 19 Hypothesized chemical structure of unknown peak which changes in AD.

そこでまず、ADにて減少が認められたピークについてイオン精密質量情報からイオンの組成式を推定した。その結果、精密質量データである  $m/z$  367.3349 より、イオンの組成式を  $C_{27}H_{43}^+$  とした (Figure 18B)。組成式が  $C_{27}H_{47}O$  であるコレステロールは APCI でのイオン化の過程にて脱水を伴い  $C_{27}H_{45}^+$  で観測されることを本実験において確認していることから、このピークはコレステロールに二重結合が一つ多い  $C_{27}H_{45}O$  の組成式をもつ代謝物と推定した。一般に、逆相分配型のカラムによる脂質の分析では、二重結合の導入は溶出時間が早まることが知られている。したがって、このピークの溶出時間がコレステロールに比べ数分早いということからも、コレステロールに一つの二重結合を有する代謝物である仮説を支持した。この結果とヒトにおけるコレステロール合成経路と代謝経路から、5 $\alpha$ -コレスタ-7, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール、5 $\alpha$ -コレスタ-8, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール、コレスタ-5, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール (デスモステロール)、コレスタ-5, 7-ジエン-3 $\beta$ -オールもしくはコレスタ-5, 8-ジエン-3 $\beta$ -オールの構造を Figure 19 に示す。

次に、溶出時間の情報をもとにピークの同定を試みた。同定にあたっては、精密質量情報から推察された候補化合物5種類の標品を入手し、これら全てを分離する LC 条件を確立し、その条件にて AD で減少したピークの同定を行うこととした。そこで先ず、5種の構造異性体の LC 分離法を検討した。一般的に、LC 移動相中の有機溶媒の種類及び含有量は、分離に大きく影響を与えることが知られている。特に脂溶性が高いステロールなどを分離する際には、移動相への溶解性を確保する必要があるため、アセトニトリルよりもアルコール系の有機溶媒の選択がピーク形状や分離が改善する報告がある[121]。この情報を基に、5種類の構造異性体の分離条件を検討した結果、移動相にメタノールを用いることにより、ピークの形状が最も良好であり、Figure 20B に示すように、コレスタ-5, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール、5 $\alpha$ -コレ

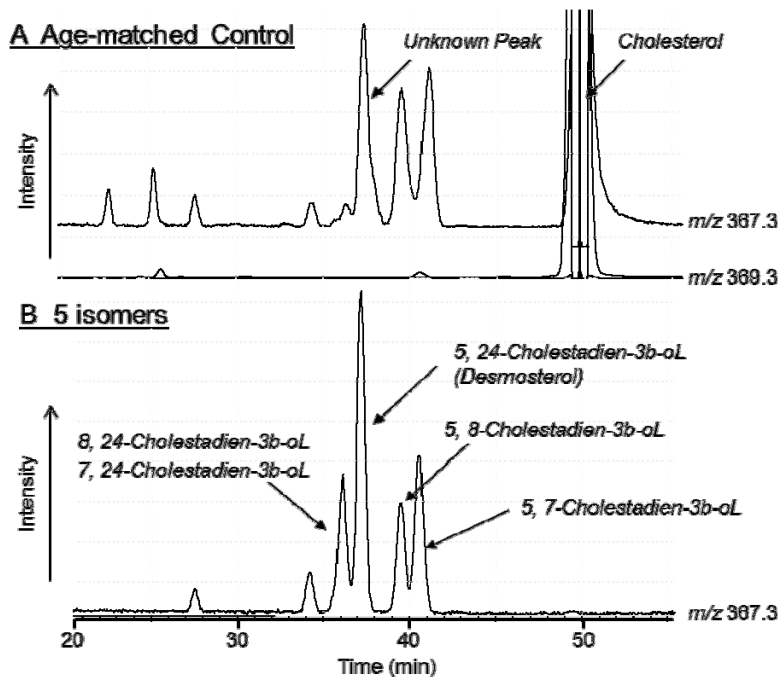


Figure 20 Extracted ion chromatograms in the positive ionization made of  $m/z$  367.3 and 369.3 of age-matched control sample (A) and standards of 5 isomers (B).

スタ-7, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール, コレスタ-5, 7-ジエン-3 $\beta$ -オールおよびコレスタ-5, 8-ジエン-3 $\beta$ -オールの LC 分離に成功した. 尚, 本条件では 5 $\alpha$ -コレスタ-7, 24-ジエン-3 $\beta$ -オールと 5 $\alpha$ -コレスタ-8, 24-ジエン-3 $\beta$ -オールの LC 分離は達成できなかった. 次に, この移動相で, AD にて顕著に減少した未知ピークと標品 5 種の LC 溶出時間を比較した. その結果, 未知ピークはデスモステロールの標品と溶出時間が完全に一致したことから, 血漿中コレステロールの網羅的分析で AD 患者において顕著に減少するピークは, 代謝経路におけるコレステロールの一つ前の前駆体であるデスモステロールであると結論付けた (Figure 20).

次に, AD で変化したデスモステロールの再現性を確認するため, 別に白人の AD 患者, MCI 患者および健常人各 10 名の新たなコホートを用いてデスモステロールを分析した. 分析の結果を Figure 21 に示すが, 先ほどのコホートと同様に, 健常者に比べて AD 患者にて統計学的に有意に変化することが判明し ( $p < 0.01$ ), 確度が高い AD のバイオマーカーである可能性が示唆された. さらに, MCI でも健常者に比べて有意な減少が確認され ( $p < 0.05$ ), 早期診断マーカーとしての可能性も同時に示唆された.

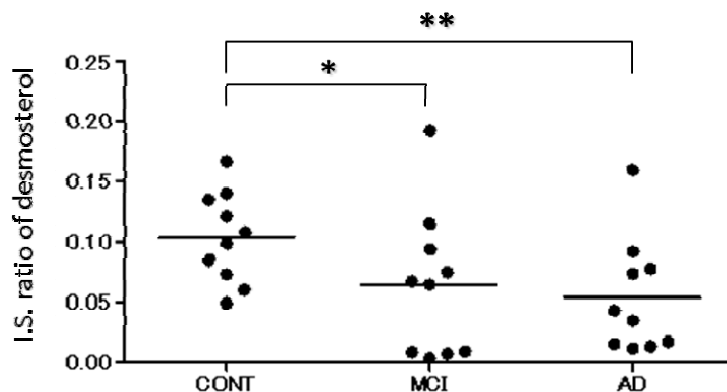


Figure 21 Comparison of plasma desmosterol level between control and AD plasma. \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$

#### 第4節 血漿中デスモステロールの定量法の確立

##### 血漿中デスモステロールの定量法の確立

これまでのヒト血漿を用いた網羅的分析から、コレステロールの前駆体であるデスモステロールが AD バイオマーカー候補として見出された。そこで、AD のバイオマーカーとしてデスモステロールの LC/MS による定量法の確立を試みた。まず、定量で精度を確保するために I.S. として安定同位体元素標識体の D6-デスモステロールおよび D7-コレステロールを血漿に添加することにより、前処理時での回収率のバラツキを補正した。尚、構造異性体の分離は、先の異性体の分離の際に用いた LC 条件を採用した。その結果、デスモステロールは 10~30,000 ng/mL の範囲の 8 濃度水準において相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示し、またコレステロールは、0.1~10 mg/mL の範囲の 8 濃度水準において相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示した。この際、両化合物とも定量に影響を与えるキャリーオーバーは認められなかった。

次いで、本分析法における日内、日間変動における真度および精度を検討し、その結果を Table 12 に示した。日内変動における各化合物の真度はデスモステロールで -3.3~10.4%、コレステロールで -11.7~7.9% であり、R.S.D.% はデスモステロールで 0.7~2.6%、コレステロールで 0.7~2.5% であった。一方、日間変動における各化合物の真度はデスモステロールで 2.1~4.5%、コレステロールで -1.9~7.9% であり、R.S.D.% はデスモステロールで 3.4~3.6%、

Table 12 Accuracy and precision of the analysis of desmosterol and cholesterol in human plasma (n=3).

Desmosterol	Blank			30 ng/mL			300 ng/mL			1000 ng/mL		
	Observed conc: (ng/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (ng/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (ng/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (ng/mL)	R.S.D.%	R.E.%
intra-day	864	1.7	-	893	1.2	-2.3	1176	1.3	4.0	11506	2.4	6.4
	805	1.9	-	834	1.6	-1.7	1095	2.6	-3.3	11003	1.9	2.0
	833	0.9	-	866	1.6	10.4	1150	2.2	5.8	11573	0.7	7.4
inter-day	834	3.6	-	865	3.4	2.1	1141	3.6	2.2	11288	3.6	4.5

Cholesterol	Blank			0.2 mg/mL			1 mg/mL			5 mg/mL		
	Observed conc: (mg/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (mg/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (mg/mL)	R.S.D.%	R.E.%	Observed conc: (mg/mL)	R.S.D.%	R.E.%
intra-day	1.47	2.2	-	1.68	2.4	3.8	2.47	2.3	0.2	6.73	2.5	5.3
	1.47	2.3	-	1.64	3.1	-11.7	2.42	0.7	-4.8	6.86	1.2	7.9
	1.46	3.2	-	1.66	3.1	2.0	2.51	1.4	4.8	6.85	1.1	7.9
inter-day	1.46	0.4	-	1.66	1.1	-1.9	2.46	1.8	0.0	6.86	0.1	7.9

コレステロールで 0.1~1.8%であった。尚、血漿中デスモステロールは検量線の下限領域の 30 ng/mL においても R.S.D.%が 5%以下であった。この結果より、ヒト血漿中のデスモステロール濃度は 100 から 2,000 ng/mL の濃度範囲を考慮すれば定量法としては極めて信頼性が高く実用的な手法であることが判明した。

#### サーカディアンリズムおよび摂食効果の検討

一般的にバイオマーカーを測定する際、サーカディアンリズムや摂食効果によりマーカーが変動することがあり、分析結果および診断結果に大きな影響を与えることもある。そこで、まずデスモステロール値のサーカディアンリズムの有無について検討した。採血は、2名の健常のボランティアから朝食抜きで9:30と11:00、昼食後に13:00、15:00および17:00にそれぞれ採血し、デスモステロールおよびコレステロールをLC/APCI-MSにて定量した。その結果をFigure 22に示す。顕著なサーカディアンリズムや摂食効果は確認されず、5回の採血での値はデスモステロールおよびデスモステロール/コレステロール比ともに平均値の±10%以内であることが明らかになった。また、興味深いことに、2名の健常人のデスモステロール値は両者間に1.5倍程度の乖離があるものの(Figure 22A) デスモステロール/コレステロール比では、両者がほぼ同じ値を示した。従って、デスモステロール/コレステロール比で評価することにより、被験者間の値のバラツキを抑えられる可能性が示唆された(Figure 22B)。以上の結果から、今後の研究においては血漿中のデスモステロールのみならず、デスモステロール/コレステロール比でも検証することにした。

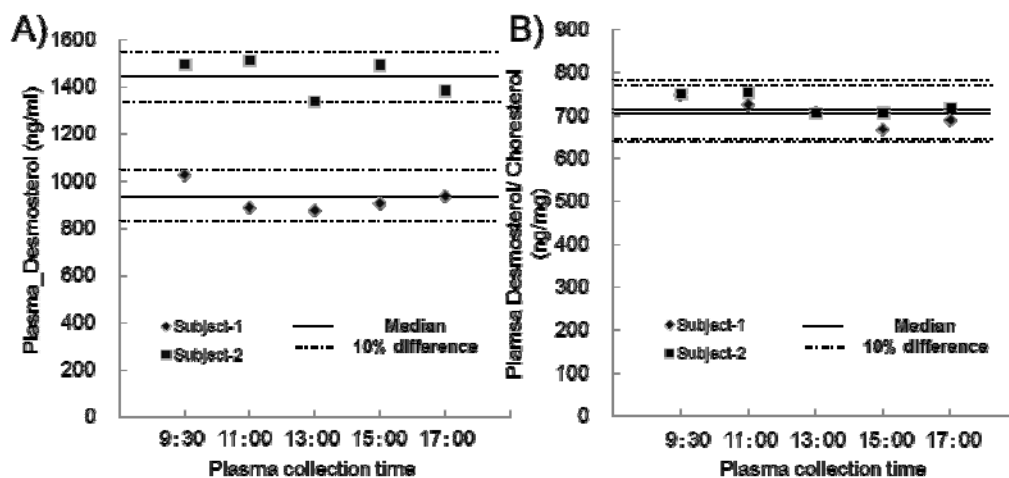


Figure 22 Circadian rhythm of (A) desmosterol concentration and (B) desmosterol/cholesterol ratio in healthy volunteer's plasma. Plasma samples of each subject were drawn at 9:30, 11:00, 13:00, 15:00 and 17:00. Desmosterol and cholesterol were measured by LC/APCI-MS described in Materials and methods section.

## 第5節 中規模コホートによる再現性の確認

### 中規模白人コホートを用いたデスモステロールの分析

前述のように、血漿中デスモステロールやデスモステロール/コレステロール比は新たなADバイオマーカーである可能性が示唆された。そこで、中規模の白人コホートを用い血漿中デスモステロールとデスモステロール/コレステロール比を確認することとした。白人の健康人42人、MCI患者26人およびAD患者42人の総数109名の血漿サンプルを用いてLC/APCI-MSにてデスモステロールの分析を実施した。本検討で用いたサンプル情報の詳細をTable 13に示した。

Table 13 Characteristics of AD patients MCI patients and elderly healthy controls (n=109).

	No. of patients		Age		
	Total	Female (%)	Total	Male	Female
Control	42	50.0	66.7 ± 5.5	67.4 ± 5.6	66.0 ± 5.5
MCI	26	50.0	73.1 ± 9.0	73.5 ± 8.3	72.7 ± 10.1
AD	41	48.8	76.9 ± 6.3	77.7 ± 6.5	76.0 ± 6.3

分析した結果を Figure 23 に示した. この中で, A と D に示すように健常人に比べ AD 患者においてデスモステロールとデスモステロール/コレステロール比が有意に減少した ( $p < 0.001$ ). また, デスモステロールとデスモステロール/コレステロール比共に MCI 患者においても有意な減少が認められたことから, AD 早期ステージのバイオマーカーとなり得る可能性が本結果からも同様に示唆された ( $p < 0.05$ ). さらに, 本コホートでは血漿中デスモステロールとデスモステロール/コレステロール比は男性よりも女性において, より有意に変化した. 特に, 男性においては, デスモステロールは AD で変化の傾向はあるものの, 統計学的有意差な差は認められなかった. 一方で女性においては AD 患者のみならず MCI 患者でも有意に減少した ( $p < 0.001$ ). また, デスモステロール/コレステロール比は男性 AD 患者においても統計学的有意に減少したが ( $p < 0.05$ ), 女性は男性よりも大きな統計学的有意な減少が認められた (女性:  $p < 0.001$ ).

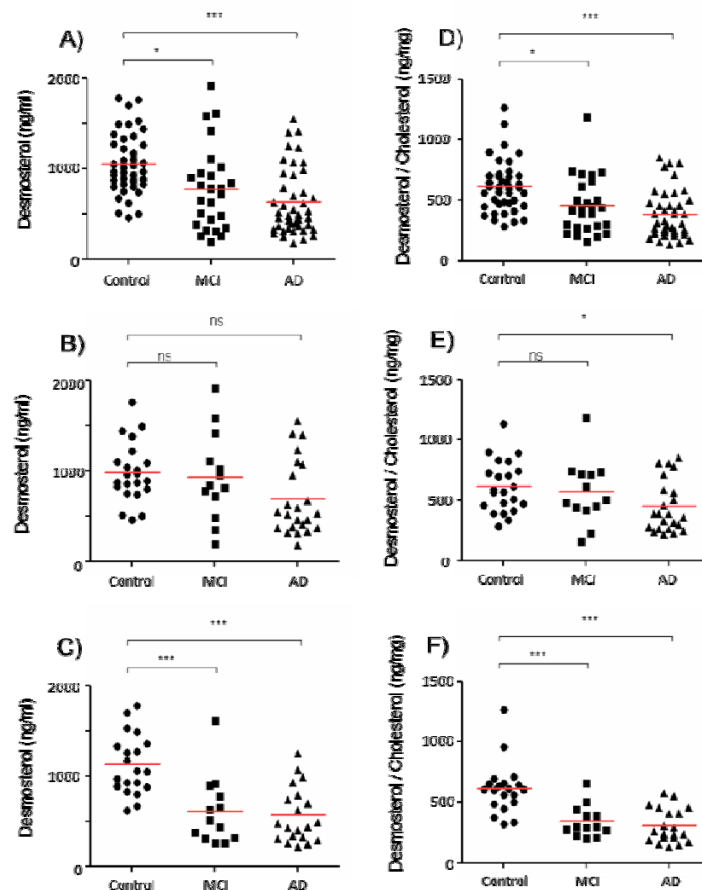


Figure 23 Comparison of plasma desmosterol level in all patients (A), male (B) and female (C). And comparison of plasma desmosterol/cholesterol ratio in all patients (D), male (E) and female (F). \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , n.s.; not significant

## 受信者動作特性曲線を用いたバイオマーカーの評価

縦軸に真の陽性率（感度）、横軸に偽陽性率（1 - 特異度）の受信者動作特性曲線（Receiver Operating Characteristic curve, ROC 曲線）を用いることにより、バイオマーカーの診断性能、つまりバイオマーカーを診断に用いる際の感度および特異性を評価することが可能である。そこで、見出した血漿中デスマステロールとデスマステロール/コレステロール比について、AD 診断バイオマーカーとしての診断能力を評価するために、ROC 曲線を用い評価した（Figure 24）。その結果、健常人と AD 患者におけるデスマステロールおよびデスマステロール/コレステロール比を ROC 曲線に適用した時、両者とも AUC が 0.8 と中程度の診断能力を有することが判明した（Figure 24A, B）。さらにこの ROC 曲線を用いた評価からも性差が観測され、特に、デスマステロール/コレステロール比は、女性で AUC が 0.91 とバイオマーカーとして高い診断能力を示したが（特異性 76%/感度 90%）、男性では AUC が 0.73 と中程度の能力（特異性 76%/感度 62%）であることが判明した。

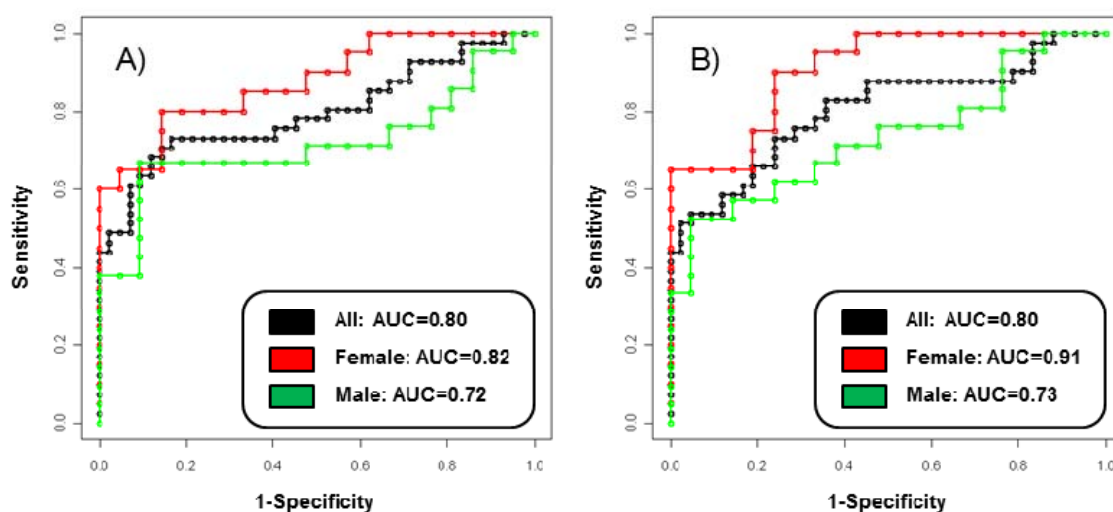


Figure 24 ROC plots analysis using plasma desmosterol values (A) or plasma desmosterol/cholesterol ratios (B) in AD (n=41) versus control (n=42).

## 第6節 脳脊髄液や脳試料による検証

### 脳脊髄液による検討

ADは脳の疾患であることから、今回見出したデスモステロールの血漿中での変動と同様に中枢神経系での変動も考えられる。一般に、神経変性疾患の診断およびその研究において、脳と物理的に接触する体液であるCSFの採取が可能であることから、CSFは最も有益な脳の状態を把握するための情報源の一つである。そこで、AD患者やMCI患者におけるCSF中のデスモステロールの変化の有無および血漿との関連性について検討した。CSF中のデスモステロールを分析した結果、コレステロールおよびデスモステロールでは統計学的に有意な変化が認められなかったが、デスモステロール/コレステロール比は血漿中と同様にAD患者やMCI患者にて有意に減少した（AD患者： $p<0.001$ ，MCI患者： $p<0.01$ ）。また、MCIおよびADと病状（認知症）が悪化するに従い、段階的にCSF中のデスモステロール/コレステロール比が減少することが明らかになった（Table 14, Figure 25）。この結果を基に、コレステロール、デスモステロールおよびデスモステロール/コレステロール比のCSFと血漿中の相関をFigure 26に示した。その結果、血漿とCSF中のデスモステロールやデスモステロール/コレステロール比の間には良好な相関関係が認められ、特にCSF中と血漿中のデスモステロール/コレステロール比の間には非常に高い相関関係があることが明らかになった（ $r^2=0.65$ ，Figure 26）。一方、CSFと血漿中のコレステロールの間には相関関係が認められなかった。これにより、血漿中のデスモステロールやデスモステロール/コレステロール比は、中枢神経系でのデスモステロールの変化を反映している可能性を強く支持した。

Table 14 CSF levels of cholesterol, desmosterol and desmosterol/cholesterol ratio in AD patients (n=10), MCI (n=10) patients and elderly healthy controls (n=15).

		Control (n=10)	MCI (n=10)	AD (n=10)
		conc.	conc.	conc.
CSF	Cholesterol ( $\mu\text{g/mL}$ )	3.6 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.9
	Desmosterol (ng/mL)	4.9 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.8
	Desmosterol/Cholesterol (ng/ $\mu\text{g}$ )	1.4 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1

		MCI v.s. Control		AD v.s. Control		AD v.s. MCI	
		Fold change	p value	Fold change	p value	Fold change	p value
CSF	Cholesterol ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.2	n.s.	1.5	n.s.	1.2	n.s.
	Desmosterol (ng/mL)	0.8	n.s.	0.8	n.s.	0.7	n.s.
	Desmosterol/Cholesterol (ng/ $\mu\text{g}$ )	0.7	<0.01	0.5	<0.001	0.8	n.s.



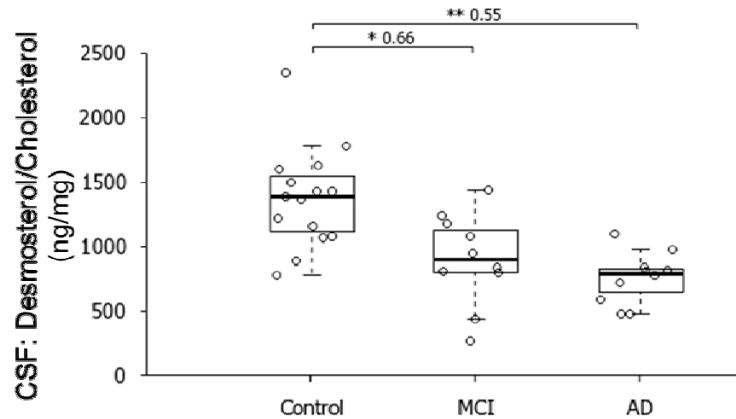


Figure 25 Comparison of plasma desmostero/cholesterol ratios in CSF. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$

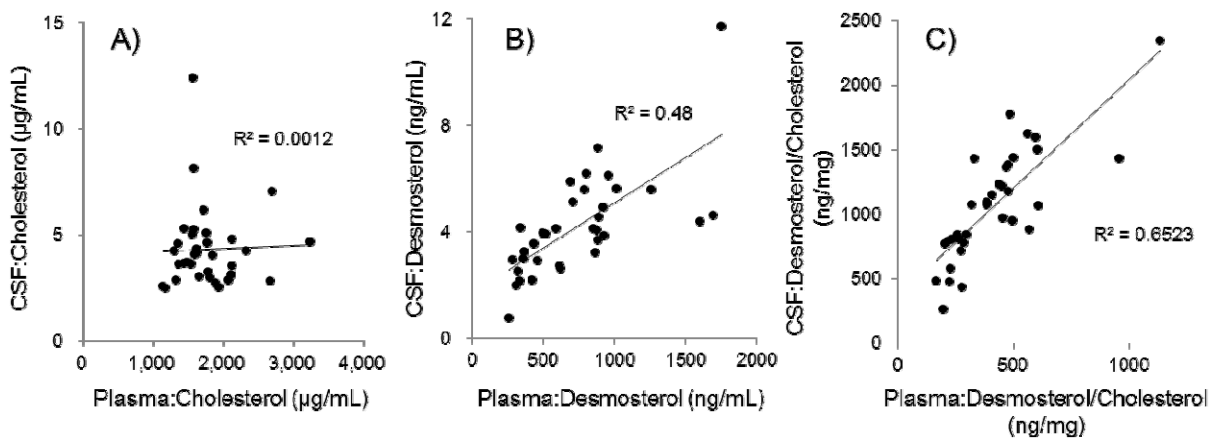


Figure 26 Correlation between the values of A) cholesterol, B) desmostero and C) desmostero/cholesterol ratio in human plasma and CSF (n=35).

### ヒト死後脳による検討

次に、AD 患者の脳組織におけるデスモステロールの量的な変化を確認するため、AD 患者および AD ではない死後脳を用いた検討を行った。比較に用いた脳の部位としては AD と関連性が強いとの報告がある前頭部皮質と海馬を使用した。その結果、コレステロールはいずれの部位においても AD 患者で変化が認められず、デスモステロールにおいても前頭部皮質の部位では変化が認められなかった (Figure 27B)。その一方で、Figure 27A に示すように、海馬においてデスモステロールの特異的な減少が確認された ( $p < 0.05$ , 38%の減少)。この

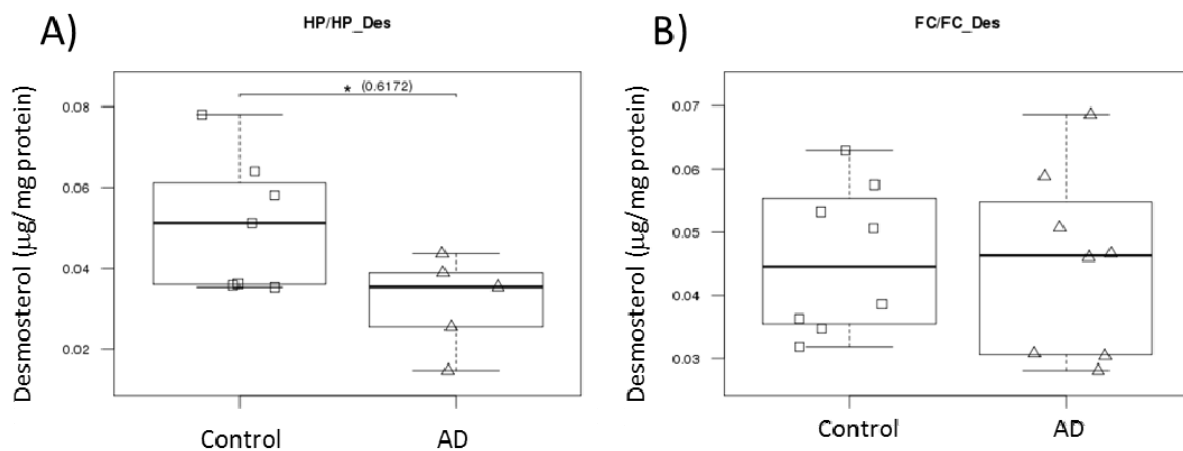


Figure 27 Categorized box and whisker plot of desmosterol in human brains; A) hippocampus and B) frontal cortex.

ことから、血漿中デスモステロールは CSF のみならず脳、特に海馬でのステロールの変化をも反映していることが示唆され、AD バイオマーカーとしての血漿中デスモステロールの確度がより一層高まった。

## 第7節 既報との乖離原因の究明

2010年に Kölsch らは、既にドイツ人のコホートを用い GC/MS により血漿中デスモステロールを測定し、AD 患者において変化がないことを報告している。一方で、我々の研究では血漿中デスモステロールは AD 患者で減少することを確認し、Kölsch らの結果とは乖離がある。そこで、この原因として双方の研究の大きな相違点である分析法に着目した。まず、我々が 2 章 3 節にて使用し、AD にて有意なデスモステロールの減少が認められた AD 患者および健常者の各 10 名の血漿を用い、Kölsch らと同一条件の GC/MS 法を用いてデスモステロールを分析した。その結果、我々が開発した LC/MS 分析法により健常者に比べ AD で統計学的有意な減少が認められたサンプルにおいて、GC/MS 法では血漿中デスモステロールの有意な減少は認められなかった (Figure 28)。さらに、GC/MS 法での血漿デスモステロールの分析値は、LC/MS 法の結果に比べ 2 倍以上も高く (LC/MS 平均値 : 640 ng/mL, GCMS 平均値 : 1800ng/mL)、LC/MS 法と GC/MS 法での分析値の相関はなかった ( $r^2=0.52$ , Figure 29B)。そこで GC/MS 法により得られたデスモステロールのクロマトグラムを詳細に検証したところ、Figure 29A 左に示すように GC/MS によるデスモステロールのピークと夾雑物ピークとの分

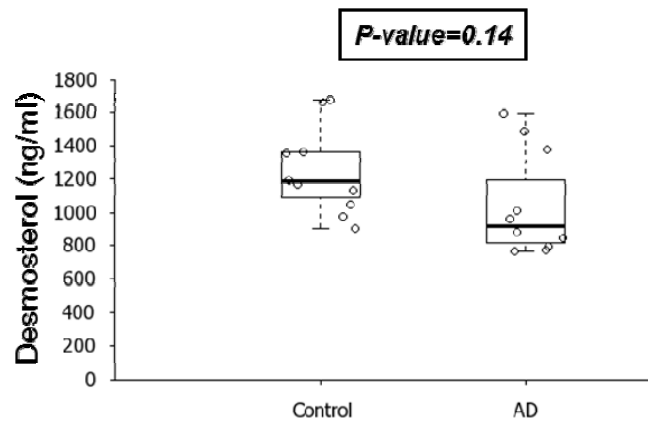


Figure 28 Categorized box and whisker plot of desmosterol with published GC/MS method.

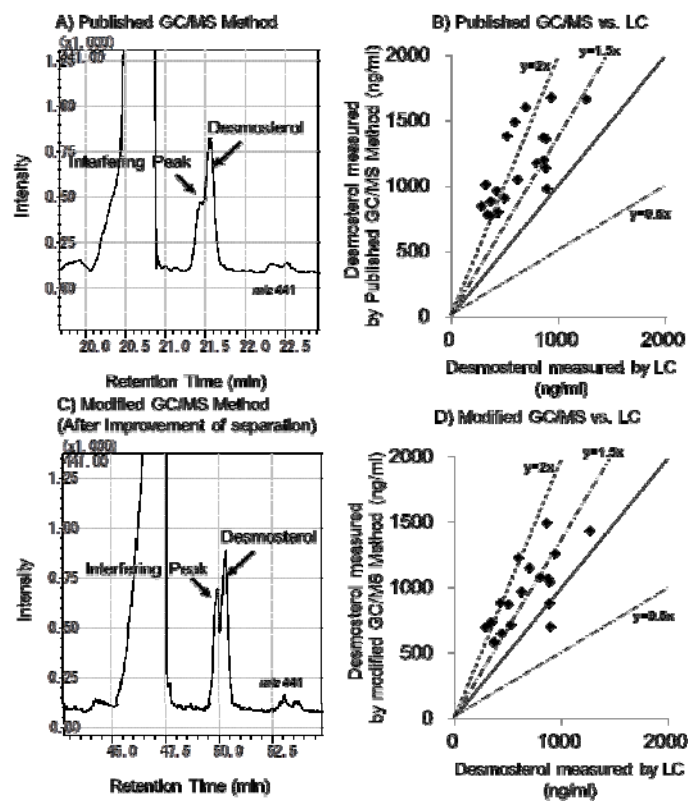


Figure 29 Extracted ion chromatograms in the positive ionization made of  $m/z$  367.3 of control sample with reported (A) and modified GC/MS method (C). Correlation of the values of desmosterol in human plasma between our LC/MS method and reported GC/MS method (B) or versus modified GC/MS method (D).

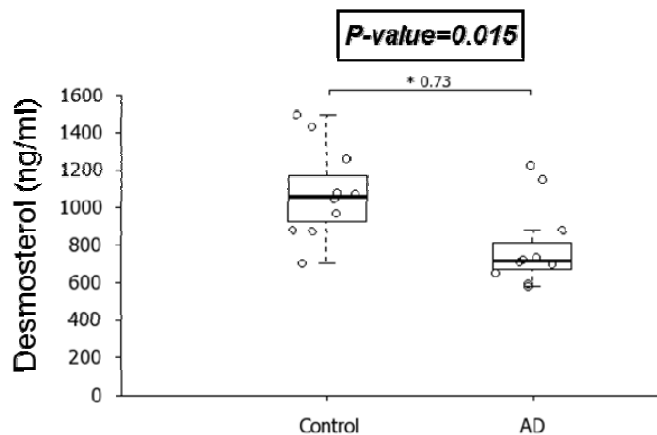


Figure 30 Categorized box and whisker plot of desmosterol with modified GC/MS method.

離が不十分であり，デスモステロールを正確に定量できないことから，GC/MS 法による AD 患者の血漿中デスモステロールの変化はなかったとの結果に至った原因であると考察した。

そこで，Kölsch らの GC/MS 条件でのデスモステロールに隣接する夾雑物質のピークの分離について検証した。その結果，デスモステロールの GC カラムへの保持を強くすることにより，デスモステロールと夾雑ピークとの分離を改善し (Figure 29C)，結果として健常人に比し AD 患者におけるデスモステロールの有意な減少が確認された (Figure 30)。また，LC/MS のデータとの相関も改善された ( $r^2=0.55$ , Figure 29D)。この一連の研究から，我々の結果との乖離はデスモステロールと他の物質との不十分な分離によるものであると考えられる。

#### 第8節 大規模日本人コホートによる確認

(未発表データのため未掲載)

## 第9節 経過観察試料による評価

(未発表データのため未掲載)

## 第10節 デスモステロールの疾患との関連性についての仮説

### デスモステロールの AD における減少メカニズム

デスモステロールはコレステロール生合成経路において、コレステロールの一つ前の前駆体であり、7-デヒドロコレステロール還元酵素 (DHCR7) により 7-デヒドロデスモステロールにより生成され、24-デヒドロコレステロール還元酵素 (DHCR24) によりコレステロールへと代謝される。このことから、今回我々が見出した AD におけるデスモステロールの減少の原因について AD の脳内において 1) DHCR24 の活性亢進 と 2) DHCR7 の活性低下の 2 つの可能性が考えられた。

#### 1) DHCR24 の活性亢進の仮説

DHCR24 活性は、プロゲステロンなどのニューロステロイドにより阻害され、一方で、AD の脳においてニューロステロイドが減少することが報告されている[122]。これら報告から、今回我々が明らかにした AD におけるデスモステロールの減少は、AD 進行に伴う DHCR24 活性の亢進が原因の一つではないかと考えられた。また、酸化ストレス等の炎症によって DHCR24 の発現が上昇するとの報告もあり[123]、脳での炎症反応の亢進が AD の発生において重要なプロセスであることを考えると、AD 脳内における DHCR24 の炎症部位での発現増加がデスモステロールの減少に関与している可能性も推察された (Figure 31)。

#### 2) DHCR7 の活性低下の仮説

DHCR7 遺伝子の突然変異は、先天性奇形症候群の一つであるスミス・レムリ・オピッツ症候群を引き起こし、90%以上が認知機能障害を呈することが報告されている[124]。また 1998 年 Xu らは、DHCR7 の阻害により作製したモデルマウスにおいて学習機能および認知機能が低下することを確認している[125]。これらの知見から、AD の脳においても DHCR7 の活性が何らかの原因で低下しており、これが AD における認知機能の低下およびデスモステロールの減少の原因の一つになっているのではないかと考えられた (Figure 31)。

以上、2つの仮説を検証するためには、まず脳内におけるそれぞれの酵素活性や量を正確に測定することが求められる。したがって、今後、脳内における各酵素活性や量の位置情報も含めた解析法を確立し、ADにおけるデスモステロールの減少メカニズムを解明していきたい。

#### ADの進行に対するデスモステロールの寄与

他のコレステロールの前駆体と同様にデスモステロールは、脳内のステロールの1%前後であるとされるが、脳の発生段階においては30%にもなることが報告され[126,127]、ミエリン形成[127]や神経の可塑性[128]等に重要な役割を示すことが報告されている。また、特に海馬のデスモステロール濃度が神経の新生や神経へと分化する始原細胞数と関連するという報告もある[129]。さらに、生体内においてデスモステロールはADに深く関連する ABCA1 や APOE などといった LXR 関連遺伝子の発現や NFκB を解して炎症抑制に関与しているという報告もされている[130]。したがって脳内のデスモステロールの減少は、記憶形成の低下、LXR 下流の AD 関連タンパクの変動による Aβ の産生亢進、さらには脳内における炎症の惹起に影響すると考えられることから、AD の進行にも関与しているのではないかと推察した (Figure 31)。今後、神経細胞若しくは脳中のデスモステロール量を人工的に変化させる系を構築し、デスモステロールがミエリン形成、Aβ の蓄積および炎症作用にどのような影響を及ぼすか精査することで、デスモステロールと AD 進行の関連性についての仮説を検証していきたい。

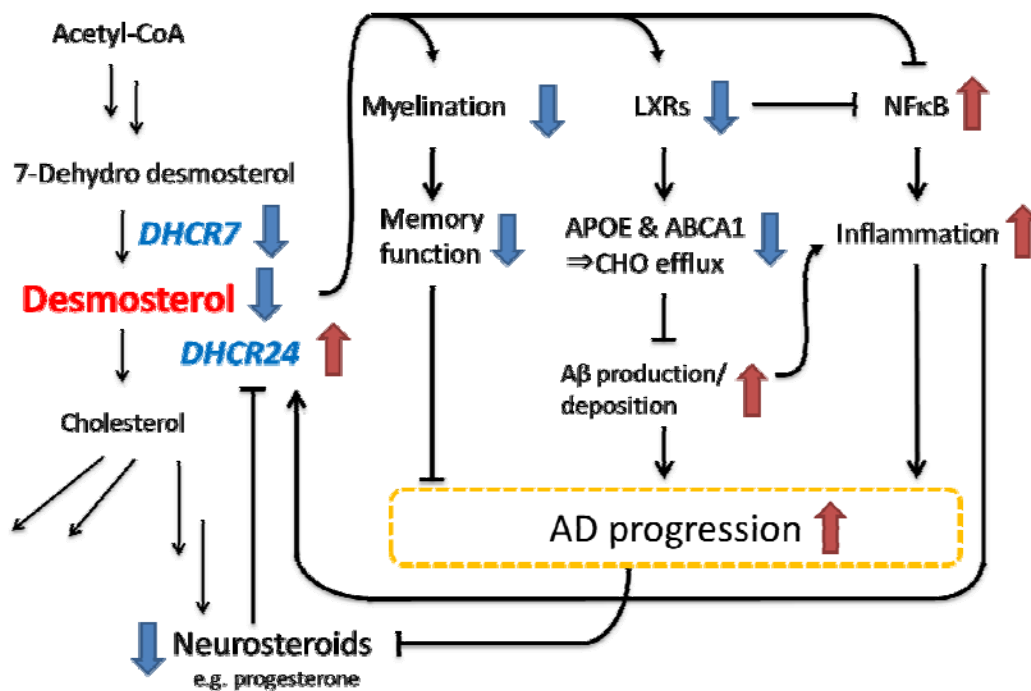


Figure 31 Hypothesized relationships between AD and desmosterol.

## 第11節 結語

AD の血漿中バイオマーカー探索を目的として、感度および特異性に優れる LC/APCI-MS によるコレステロール関連代謝物を対象にした網羅的分析法を構築した。本分析法は煩雑な誘導体化を必要とせず、血漿 25  $\mu\text{L}$  でコレステロールの約 100,000 分の 1 相当量の関連代謝物の定量を可能とした。

この分析法を、ヒト試料での AD のバイオマーカー探索に応用することにより、健常者に比べ AD において血漿中デスモステロールが顕著に減少することを明らかにした。さらに、白人 109 例のコホートで血漿中デスモステロールの AD マーカーとしての妥当性を検証したところ、探索段階で用いた白人 20 例での結果を反映し、AD 患者、並びに MCI にて有意にデスモステロールが減少することを確認した。

血漿中のデスモステロールが中枢神経系のステロイド代謝に及ぼす影響を確認するため、CSF や死後脳のデスモステロールを分析した結果、血漿中と CSF 中のデスモステロールの量は相関関係にあり、特にデスモステロール/コレステロール比は AD 患者で低下することが判明した。一方で、脳の海馬においても健常者に比べ AD 患者でデスモステロールが統計学的

に有意に低下していることから、血漿中デスモステロールは AD 患者の中樞神経系のコレステロール代謝異常を反映する血液バイオマーカーである可能性が示唆された。

また、Kölsch らによる GC/MS による検討では、AD 患者では血漿中デスモステロールは変化しないとの報告に対し、我々の結果との乖離の原因として分析法に着目し、検討した。その結果、Kölsch らの測定法はデスモステロールと夾雑物質との分離が不十分であり、そのため我々の結果と乖離を生じたことを明らかにした。

次に、日本人 401 人に及ぶ AD 患者および健常者を用いた試験を追加して、日本人と白人による横断研究において AD にて血漿中デスモステロールが変化し、特にデスモステロール/コレステロール比が AD で減少することが明らかになった。さらに、このデスモステロール/コレステロール比は APOE の遺伝子多型には依存しないこと、年齢とは相関が低いこと、MMSE スコアが大きく低下している患者では血漿中デスモステロールも低値を示す傾向にあることが明らかになった。なお性差については今後の課題と考えた。

最後に、認知機能と血漿中デスモステロール/コレステロール比の関連を検討するため、健常者、MCI 患者および AD 患者での経時的研究を行った。その結果、健常人をはじめ MMSE スコアの変化が小さい被験者では、血漿中デスモステロール/コレステロール比の減少も小さく、一方、MMSE スコアが大きく減少する患者では変化しない群に比べ血漿中デスモステロール/コレステロール比も顕著に変動することがわかった。

以上一連の研究から血漿中デスモステロール/コレステロール比は認知機能をよく反映する AD バイオマーカーである可能性が強く示唆された。



## 結論

臨床現場および創薬研究の現場で強く望まれている低侵襲性サンプルを用いた新規の AD バイオマーカー探索を目的として、LC/MS を用いて脂質網羅的分析法を開発すると同時に、記憶機能向上モデルマウスの脳や低侵襲性試料であるヒト血液を用いた脂質網羅的分析を行い、以下の結論を得た。

- 生体内の PLs, ガングリオシドおよびコレステロール周辺代謝物を網羅的かつ優れた精度を確保できる分析方法を確立した。この PLs の網羅的分析法は、順相系と逆相系を用いる二次元の前処理と LC-ESI/MS を組み合わせた。ガングリオシドの網羅的測定においても GM, GD, GT を始めとする多くのガングリオシドおよびスルファチドに対し優れた精度で測定することができる手法であることを明らかにした。コレステロール周辺代謝物を対象にした網羅的分析では、煩雑な誘導体化を必要とせず、コレステロールの 10,000 分の 1 の測定が可能である分析法を構築した。また、一連の検討から、確立したこの高い脂質網羅的分析法は、バイオマーカー探索に有用であり、更に、新たな情報を付与できる可能性があることが明らかにした。
- 開発した PLs, ガングリオシドおよびスルファチドの網羅的分析法の活用により、モデル動物の AD バイオマーカー探索に応用した。その結果、DHA 結合型 PLs や LPE (18 : 1) などの記憶機能や AD との関連性を示唆する脂質分子が記憶機能に差のあるモデルマウスの脳内や AD 患者の血液で変動することを見出した。一方で、AD 患者の血液を用いた研究ではコホート間で結果が異なる代謝物が多く観測され、バイオマーカーの評価には患者の多様性や代謝物の安定性等を考慮し、服薬情報や疾患の罹患情報を含めた解析やサンプル採取法から分析法にわたる標準化が今後の課題となった。さらに、動物モデルとヒトとの乖離が見いだされたことにより、創薬現場の探索段階から低侵襲性のヒト試料を用い、AD バイオマーカーを探索する重要性が明らかになった。
- コレステロール関連代謝物の網羅的分析を、血漿を用いた AD バイオマーカー探索に適用し、健常者に比べ AD 血漿中にて変化する代謝物としてコレステロールの前駆体であるデスモステロールを見出した。このデスモステロールは CSF や脳内においても変化することから、中枢のステロイド代謝異常を反映する代謝物である可能性を見出した。更に、経時的な検討により、血漿中デスモステロールは認知機能をも反映するマーカーであることを明らかにした。

本検討で見出した血漿中デスモステロールの挙動を把握することにより認知機能を客観

的指標で予測できる可能性があることから、臨床有用性は極めて高く、さらに創薬現場での本バイオマーカーによる患者の層別化や薬の効果のモニターの可能性を示唆し、ADの臨床研究への効率化に大きく貢献できるものと考えます。今回の研究では、血漿中デスモステロール/コレステロール比が健常者と比較して有意にADで減少する理由や認知機能と相関する理由については明らかではないが、今後、本ADバイオマーカーを診断補助や経過観察マーカーとして臨床研究に応用してゆく上で極めて大きな意義があると考え、今後の課題として取り組みたい。

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、本論分をまとめるに際し、親身なご助言と力強い励ましを頂いた、東京大学薬学部薬学研究科 衛生化学 新井 洋由教授に、心より感謝を申し上げます。

本論文をご精読頂き有益なご助言とご校閲を賜りました東京大学薬学部薬学研究科 薬品代謝化学 浦野 泰照教授、臨床薬学 富田 泰輔教授、疾患細胞生物学 田口 友彦准教授、細胞情報学 名黒 功講師に深謝致します。

本研究の着想から遂行に至るまでご指導ご鞭撻を賜ったエーザイ株式会社バイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニットプレジデント 小田 吉哉博士に心より感謝申し上げます。

本研究における議論・検討に当たってご指導を賜り、また多くの臨床サンプルの提供をしていただきました新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター 遺伝子機能解析学 池内 健教授、桑野 良三フェロー（元教授）、宮下 哲典助教、スウェーデンウプサラ大学 Lars Lannfelt 教授、Martin Ingelsson 博士に感謝いたします。

本研究の根幹である分析の基礎をご指導くださいましたファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー機能ユニット シニア・サイエンティフィック・アドバイザー 浅川 直樹博士に感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、アルツハイマー病に関して終始貴重なご意見を頂いたバイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニット Bernier Francois 博士に感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂いたエーザイ株式会社 内藤 晴夫社長、バイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニット バイオマーカー研究部部長 Jesse Chow 博士、バイオマーカー研究部筑波グループ室長 大郷 真博士、バイオマーカー研究部筑波グループ元室長 青島 健博士（現 チーフ クリニカル オフィサー 日本解析室）、診断薬開発部 渡辺 啓介部長、企画推進室元室長 飛弾 隆之博士（現 グローバルアクセスストラテジー室）、企画推進室 中村 立二博士、バイオマーカー研究部 柳町 守主幹研究員、伊野 充洋博士に深く感謝いたします。

共同研究を行い、ご助言を頂いたニューロサイエンス&ジェネラル・メディシン 中川 誠

博士，小谷 定治博士，エーディア株式会社 茨城事業所 研究開発室 鈴木 郁美研究員，山中 保和研究員に感謝申し上げます。

本研究における議論・検討にあたって，ご激励ならびに情報交換をさせていただいたファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー機能ユニット 製剤研究部 山本 栄一博士，バイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニットおよびファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー機能ユニット 分析研究部物性研究グループの皆様に感謝申し上げます。

本研究の一部は，CREST 科研費の助成を受けたものです。

最後に，これまで自分の思う道を進むことに対し，温かく見守りそして支援して下さった祖父 故 佐藤 繁雄，祖母 富子，父 佐藤 一也，母 寿子に感謝します。また終始励まし支えてくれた妻 里美，息子 優灯に感謝します。

## 実験の部

### 1 装置

#### 1) LC/MS

##### 1-1) LC/MS システム-1

###### LC/ESI-MS システム-1 (第1章第2節, 5節, 6節)

20AD ポンプ [島津製作所 (島津), 京都] に SIL-20AC オートインジェクター (島津), CTO-20A カラムオープン (島津) および分析カラムとして 1.0 i.d. × 150 mm Capcell Pack C18 column (資生堂, 東京) を装着し, これに検出器として LTQ Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher, CA) を接続したものをを用いた.

###### LC/ESI-MS システム-2 (第1章第3節, 5節)

20AD ポンプ [島津製作所 (島津), 京都] に SIL-20AC オートインジェクター (島津), CTO-20A カラムオープン (島津) および分析カラムとして 2.0 i.d. × 50 mm Capcell Pack C18 column (資生堂, 東京) を装着し, これに検出器として LTQ Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher, CA) を接続したものをを用いた.

###### LC/APCI-MS システム-1 (第2章第2節, 3節)

20AD ポンプ (島津), CTO-20A カラムオープン (島津) および分析カラムとして 3.0 i.d. × 100 mm Shim-Pak XR-ODS column (島津) を装着し, これに検出器として LTQ Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher, CA) を接続したものをを用いた.

###### LC/APCI-MS システム-2 (第2章第3節, 4節, 5節, 6節, 7節, 8節, 9節)

20AD ポンプ (島津) に SIL-20AC オートインジェクター (島津), CTO-20A カラムオープン (島津) および分析カラムとして 4.6 mm i.d. × 250 mm YMC-Pack Pro C18 RS column (YMC,

Inc. , Wilmington, NC) を装着し, これに検出器として LCMS-2010EV high performance single quadrupole mass analyzer (島津) を接続したものをを用いた.

## 2) GC/MS (第2章第7節)

GC-2010 (島津) に分析カラムとして DB-XLB 122-1232 フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m×0.25 mm i.e. ×0.25 μm film thickness, J&W, Folsom, USA) を装着し, これに検出器として GCMS-QP2010 plus (島津) を接続したものをを用いた.

## 2. 試薬および実験材料

健常者, MCI および AD 患者の血漿および脳脊髄液 (CSF) は, PrecisionMed Inc. (San Diego, CA) より購入, 若しくは社内および大学施設での採取後, 使用時までディープフリーザーにて−80°Cにて保存した. 上記ヒト由来生体試料については, エーザイ株式会社の倫理委員会より承諾を受けたものを使用した. n-デカン, ホルムアミド, クエン酸ナトリウム, Triton X-100, パラホルムアルデヒド, スクロース, ジブチルヒドロキシトルエン, ギ酸およびガングリオシド混合物アンモニウム塩は和光純薬 (大阪) より購入した. ヤギ血清, ジアミノベンジジン基質キット, ジアミノベンジジン, avidin-biotin-complex, ビオチン化抗ラット IgG 抗体, ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体, ウサギ血清は, Vector Laboratories (Burlingame, USA) より購入した. リン酸ナトリウム, ラット抗 BrdU 抗体は, Accurate Chemical & Scientific Corporation (Westbury, USA) より購入した. TMSi 試薬 (ピリミジン: 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン: トリメチルクロロシラン; 9: 3: 1) は spelco (Bellefonte, USA) より購入した. ウサギ抗 p-CREB 抗体は, Cell Signaling Technology (Beverly, USA) より購入した. プロテアーゼインヒビターカクテルは, Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) より購入した. ペントバルビタールナトリウムは Abbott Laboratories (North Chicago, USA) より購入した. PC (12: 0, 12: 0), PE (12: 0, 12: 0), PG (14: 0, 14: 0), PA (14: 0, 14: 0), 5α-コレスタ-7, 24-ジエン-3β-オール, 5α-コレスタ-8, 24-ジエン-3β-オール, コレスタ-5, 24-ジエン-3β-オール (デスモステロール), コレスタ-5, 7-ジエン-3β-オールおよびコレスタ-5, 8-ジエン-3β-オールは, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) より購入した. 牛脳由来スルファチド, BrdU, EDTA および 28%アンモニア水はシグマ アルドリッチ (Dorset, UK) より購入した. 水は, 超純水製造装置 Milli-Q water システム (Millipore, USA) により精製したものをを用いた.

### 3. 付属実験

#### 第1章第2節

##### PLs 標準物質の調製

PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PG (14 : 0, 14 : 0) および PA (14 : 0, 14 : 0) はメタノールにてそれぞれ溶解させ 1 mg/mL のストック溶液とした。さらに、各ストック溶液をメタノールにて希釈操作を行い、回収率測定用、分析条件検討用、若しくは試料分析時の I.S.として、100 ng/mL とした。

##### ラット肝臓のサンプルの調製

雄の Sprague-Dawley (SD) は Charles River Laboratories Japan (横浜, 日本) より購入した。麻酔下にて肝臓還流後、肝臓を摘出し、ラット肝臓を 10 倍量の 0.01%ジブチルヒドロキシトルエンを含むリン酸ナトリウム緩衝溶液にてホモジナイズした。サンプルは、使用時までディープフリーザーにて $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。本動物実験は、エーザイ株式会社の動物実験委員会の承認を得て実施した。

##### 肝臓組織からの PLs の回収

$-80^{\circ}\text{C}$ にて保存済みの肝臓ホモジネートを氷上で融解させた。次に、肝臓ホモジネート 60  $\mu\text{L}$  (タンパク質 50  $\mu\text{g}$  相当) を改良した Bligh and Dyer 法にて脂質の抽出を行った。すなわち、2 ml のクロロホルム/メタノール (3 : 1) と 0.5 ml の塩化ナトリウム飽和水溶液 (約 18%) を添加し良く攪拌後、1,600 g にて 10 分遠心した。二層分離を確認後、クロロホルム層である下層を取り出し、再度上層に 2 ml のクロロホルムを添加し同様に液-液抽出を行った。クロロホルム層を  $40^{\circ}\text{C}$ 窒素気流下にて溶媒を留去し分析時までディープフリーザーにて $-80^{\circ}\text{C}$ 保存した。

##### PLs のクラス分離用のオープンカラムの作製

PL-WAX (Agilent Technologies, CA) を水, 1 M 塩酸, 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液, 水およびメタノール, 酢酸, メタノールおよびクロロホルムにて洗浄し, PL-WAX 表面に酢

酸を配位させ乾燥させた。次に、TMS コート済みのパスツールピペットに少量の綿、ついで 140 mg の酢酸配位型の PL-WAX を詰め込み、PLs のクラス分離用のオープンカラムを作製した。

#### PLs の前処理によるクラス分離

サンプルをクロロホルムに溶解させ、PLs のクラス分離用のオープンカラムに通導した (3×1 ml, 画分 1)。その後、カラムに保持された PLs を 1 mL のメタノール/クロロホルム (5/95) にて溶出した (画分 2)。さらに、1 mL のメタノール/クロロホルム (50/50) および 1 mL のメタノール/クロロホルム/酢酸/28%アンモニアにて溶出することで、それぞれ画分 3、及び画分 4 を得た。酸化防止のため、溶出した溶液には、3 µL の 10% ジブチルヒドロキシルトレンのジメチルスルホキシド溶液を添加した後、40°C、窒素雰囲気下にて溶媒を留去した。試料は分析間で -20°C で保存した。分析時には 100 µL エタノールにて良く溶解した後、その一部を LC/ESI-MS 分析に供した。

#### 脳組織中 PLs 分析のための前処理

-80°C にて保存済みの大脳皮質若しくは海馬ホモジネートを氷上で融解させた。次に、組織ホモジネート 25 µL (タンパク質量 34 µg 相当) に 2 µL の 10% ジブチルヒドロキシルトレンのジメチルスルホキシド溶液および I.S. として 200 µL の 100 ng/mL に調製した PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PG (14 : 0, 14 : 0) および PA (14 : 0, 14 : 0), を添加し、Bligh and Dyer 法にて脂質の抽出を行った。すなわち、0.2 mL のメタノール、0.8 mL クロロホルムを添加後、ボルテックスにて 1 分間攪拌した。続いて、0.8 mL のクロロホルムを再度添加した後、1 分間攪拌の後、2 分間超音波処理した。0.5 mL のリン酸緩衝液と 0.5 mL の塩化ナトリウム飽和水溶液を添加し、1 分間攪拌後、1,600 g にて 10 分間遠心した。二層分離を確認後、下層であるクロロホルム層をパスツールピペットで別のチューブに移し、再度上層に 1 mL のクロロホルムを添加し同様の操作を行い、クロロホルム層を回収した。二回の液-液抽出にて得られたクロロホルム層は混合し、40°C、窒素気流下にて溶媒を留去後、脂質混合物を得た。続いて、得られた脂質混合物は、PLs のクラス分離用のオープンカラムにて PLs の精製およびクラス分離を実施し、窒素気流下にて溶媒流去後に分析時まで -20°C にて冷凍保存した。



### LC/ESI-MS を用いた網羅的な PLs の分析

移動層は A (0.1%ギ酸および 0.028%アンモニアを含む, 水 : アセトニトリル : メタノール = 4 : 4 : 2), 並びに B (0.1%ギ酸および 0.028%アンモニアを含む, イソプロパノール : メタノール = 8 : 2) を用い, 流速 0.2 mL/min のグラジエント分析 (10 分間で B ポンプの比率を 5%から 60%へ増大させ, その後 40 分間で 80%へ増大, 5 分間で 100%へ増大, 最後に 10 分間 B100%で保持した) にてステロールを分離後, ネガティブモードの ESI-MS 分析を実施した. 検出器のスプレー電圧は -4.5 kV にて設定し, 試料をイオン化させた後, 分解能 30000, スキャン幅  $m/z$  400-2000 にてスキャンを実施後, リニア-イオントラップにてデータディペンデント MS/MS スキャンおよび MS/MS/MS スキャンを行った (設定エネルギー 35%).

(補足 1) Summary of LC gradient conditions for phospholipids.

Phospholipid	
Solvent A	Water: acetonitrile: methanol = 4: 4: 2 containing 0.1% formic acid and 0.028% aqueous ammonia
Solvent B	Isopropanol: methanol = 8: 2 containing 0.1% formic acid and 0.028% aqueous ammonia
Column	1.0 i.d. × 150 mm Capcell Pack C18 column
Flow rate	50 mL/min
Gradient Condition	0min 5%
	10min 60%
	50min 80%
	55min 100%
B (%)	65min 100%
	66min 5%
	70min 5%

## PLs の同定

PLs ピークの同定は社内で開発した Lipid Research ソフトウェアにて実施した。すなわち、各 PLs の精密質量、および仮想の MS フラグメント情報を基に作成した Lipid Research ソフトに、出現したピークの精密質量と MS フラグメント情報を入力し、PLs の同定を実施した。同定の基準としては、代謝物の精密質量の理論値と観測された精密質量値の差が 10 ppm 以内であること、および観測された MS/MS フラグメントと仮想の MS フラグメントの一致が 3 つ以上あることを同定の条件とした。

## 脳組織中 PLs 分析の再現性試験

25  $\mu\text{L}$  の脳ホモジネートに 40 pmol の PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PG (14 : 0, 14 : 0) および PA (14 : 0, 14 : 0) を I.S.として添加し、改良した Bligh and Dyer 法にて脂質を抽出した。その後、PL-WAX のオープンカラムにて PLs のクラス分離を行い、各画分を 100  $\mu\text{l}$  のメタノールにて溶解後、LC/ESI-MS 分析を行った。次に、内因性の PLs として PC (32 : 0), PC (36 : 1), PC (38 : 6), PE (32 : 0), PE (32 : 1), PE (44 : 7), PS (40 : 6), PS (42 : 6), PA (34 : 1), PA (38 : 4), PI (38 : 3), PI (38 : 4), PG (38 : 4) および PG (38 : 5) の面積および I.S.との面積比を求め (n=3), その再現性を確認した。

## 第 1 章第 3 節

### 脳組織からのガングリオシドを含む脂質混合物の回収

-80°Cにて保存済みの大脳皮質若しくは海馬ホモジネートを氷上で融解させた。次に、組織ホモジネート 20  $\mu\text{L}$  (タンパク量 27  $\mu\text{g}$  相当) に 1  $\mu\text{L}$  の 10% ジブチルヒドロキシトルエンのジメチルスルホキシド溶液, I.S.として 60  $\mu\text{L}$  のスルファチド (d18 : 1, 12 : 0, 500 nM) および 1 mL のクロロホルム/メタノール (2 : 1, v/v) を添加し 1 分間攪拌の後, 3 分間超音波処理した。1,600 g にて 10 分間遠心にて上清と沈殿物を分離後, 沈殿物に 0.8mL クロロホルム/メタノール/水 (2 : 1, v/v) および 1  $\mu\text{L}$  の 10% ジブチルヒドロキシトルエンのジメチルスルホキシド溶液を添加し, 再度抽出を行った。二回の抽出で回収した上清は混合し, 40°C, 窒素気流下にて溶媒を留去後, ガングリオシドを含む脂質混合物を得た。試料は使用時まで -20°Cにて保存した。本動物実験は, エーザイ株式会社の動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 脳組織中ガングリオシド分析のための前処理

サンプルを 1 mL のメタノールに溶解させ、PLs のクラス分離用と同様のオープンカラムに通導し、2 mL のメタノールにてカラムを洗浄した。その後、カラムに保持されたガングリオシドを 3 mL の 5%アンモニアを含むメタノールにてガングリオシドを溶出させた。サンプルの酸化防止のため、溶出溶液には、3  $\mu$ L の 10% ジブチルヒドロキシトルエンのジメチルスルホキシド溶液を添加した後、40°C、窒素雰囲気下にて溶媒を留去した。試料は分析間で-20°Cで保存した。分析時には100  $\mu$ L メタノールにて良く溶解した後、その20  $\mu$ L を LC/ESI-MS 分析に供した。

### 脳組織中ガングリオシドおよびスルファチド分析の再現性の確認

20  $\mu$ L の脳ホモジネートに 30 pmol のスルファチド (d18 : 1-12 : 0) を I.S.として添加し、脂質をクロロホルム/メタノール (2 : 1, v/v) にて抽出した。次に、PL-WAX のオープンカラムにて夾雑物質を除去し、ガングリオシドとスルファチドの溶出した画分を濃縮後、100  $\mu$ l のメタノールにて溶解し、LC/ESI-MS 分析した。次に、内因性のガングリオシドとスルファチドとして、GM1 (d18 : 1, 18 : 0), GM1 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GM2 (d18 : 1, 18 : 0), GM2 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GM3 (d18 : 1, 18 : 0), GM3 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GD1 (d18 : 1, 18 : 0), GD1 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GD2 (d18 : 1, 18 : 0), GD2 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GD3 (d18 : 1, 18 : 0), GD3 (d18 : 1, 20 : 0 若しくは d20 : 1, 18 : 0), GT1 (d18 : 1, 18 : 0), スルファチド (d18 : 1, 22 : 0 若しくは d20 : 1, 20 : 0) およびスルファチド (d18 : 1, 24 : 0 若しくは d20 : 1, 22 : 0) を選び出し、面積および I.S.との面積比を求め (n=3), その再現性を確認した。

### LC/ESI-MS によるガングリオシドの分析

分析装置は、LC として島津製作所社製 20AD system, SIL-20AC auto-sampler, CTO-20A column oven, 分析カラムとして 2 mM EDTA 溶液で洗浄済みの Capcell Pack C18 colum (2.0 i.d.  $\times$  50 mm, Shiseido, Tokyo, Japan), 並びに検出器として ThermoFisher 社製 LTQ Orbitrap mass spectrometer (San Jose, CA)とした。移動層は A (0.1%ギ酸および 0.028%アンモニアを含む, 水 : アセトニトリル : メタノール=4 : 4 : 2), 並びに B (0.1%ギ酸および 0.028%アンモニアを含む, イソプロパノール : メタノール=8 : 2) を用い、流速 0.15 mL/min のグラジエント

分析（25 分間で B 液濃度を 60%から 70%に増大後，3 分間で 100%に増大させ，2 分間保持した）にてステロールを分離後，ネガティブモードの ESI-MS 分析を実施した。

検出器のスプレー電圧は−4.5 kV にて設定し，試料をイオン化させた後，分解能 30,000，スキャン幅  $m/z$  400-2000 にてスキャンを実施後，リニアードイオントラップ若しくは C-トラップにてデータディペンデント MS/MS スキャンおよび MS/MS/MS スキャンを行った（設定解裂エネルギー35%）。

（補足 2） Summary of LC gradient conditions for phospholipids and gangliosides

Ganglioside		
Solvent A	Water: acetonitrile: methanol = 4: 4: 2 containing 0.1% formic acid and 0.028% aqueous ammonia)	
Solvent B	Isopropanol: methanol = 8: 2 containing 0.1% formic acid and 0.028% aqueous ammonia	
Column	2.0 i.d. × 50 mm Capcell Pack C18 column	
Flow rate	150 mL/min	
Gradient Condition B (%)	0min	60%
	25min	70%
	28min	100%
	30min	100%
	31min	60%
	35min	60%

#### 第 1 章第 4 節

#### EC マウスおよび IC マウスの作製

Charles River より購入した C57Bl6 マウス（メス，5 週齢）をまず通常の大サイズのケージ（300×195×135 mm）にて試験を始める前の 1 週間飼育した。その後，マウスを二群に分け，チューブ，走行輪および梯子などの遊具を設置した大きめのケージ（900×900×400 mm，刺激

が豊かな条件) と遊具なしの小さいケージ (275×125×145 mm, 刺激の少ない条件) にて飼育した。餌および水の条件は同一とした。遊具は一週間ごとに場所の移動および新しい遊具への取替えを行った。この条件下でそれぞれのグループのマウスを 5 週間飼育し, EC マウスと IC マウスを得た。本動物実験は, エーザイ株式会社の動物実験委員会の承認を得て実施した。

A)



week 2



week 3



week 4



week 5

B)



(補足 3) Photos showing mice housed in the A) enriched environment condition and B) impoverished condition taken at various time points. For enriched environment condition, objects consisted of various plastic tunnels, pipes, running wheels and other hamster toys were rearranged as shown.

## 恐怖条件付け試験法

5週間飼育した後に、電線が敷かれた透明のケージ（300×240×210 mm）にマウスを一匹ずつ入れ、120秒後に0.5 mAの電気ショックを60秒間隔で3回与えた。その120秒後にケージに戻し、24時間後、再度電線が敷かれた透明のケージにマウスをいれ、マウスが動かなくなっている時間を計測した。

## BrdUの投与およびIHCサンプルの採取

5週間飼育したマウスに、BrdUを50 mg/kgにて4時間ごとに3回腹腔内投与した。投与後、1 mLのペントバルビタールナトリウムにてマウスを安楽死させ、生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドにて経心腔的灌流を実施した。その後、脳組織を取り出し、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液中に4℃にて終夜保存した。さらに、25%スクロースにて凍結保護を行った後、40 μmの厚さにて冠状面にて切断した。

## BrdU染色

まず、内因性のペルオキシダーゼの除去を目的として海馬のFree-floating sectionを2%過酸化水素に30分間浸した後、DNAを変性させるために60℃にて3時間50%ホルムアミド/クエン酸ナトリウム溶液でインキュベートした。クエン酸ナトリウム溶液で洗浄後、37℃にて2 N塩酸中で30分インキュベートした。続いてpH8.5のホウ酸緩衝液に10分間浸した後、0.2% Triton X-100と3%ウサギ血清を含む溶液にてブロッキング操作を行い、ラット抗BrdU抗体（1:500）を4℃にて終夜反応させた。さらに、ビオチン化抗ラットIgG抗体（1:200）を1時間反応させた後、avidin-biotin-complexにて反応させ、ジアミノベンジジン基質キットを用いてジアミノベンジジンにて細胞を染色した。

## p-CREB染色

p-CREBの染色は、2%過酸化水素水に30分間浸した後、3%ヤギ血清にてブロッキング操作を行い、ウサギ抗p-CREB抗体（1:200）を4℃にて終夜反応させた。さらに、ビオチン化抗ウサギIgG抗体（1:200）を1時間反応させた後、avidin-biotin-complexにて反応させ、ジアミノベンジジンにて細胞を染色した。

## 第 1 章第 5 節

### 脳組織の採取と脳ホモジネートの作製

脳組織を取り出した後、直ちに氷冷の生理食塩水にて洗浄後、大脳皮質および海馬を取り出し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。続いて、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存された大脳皮質（約 30 mg）および海馬（約 15 mg）は、10 倍量の 0.1% ジブチルヒドロキシトルエンおよびプロテアーゼインヒビターカクテルを含むリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）にてホモジナイズ後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。本動物実験は、エーザイ株式会社の動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 脳ホモジネートのタンパク質定量

$-80^{\circ}\text{C}$ にて保存済みの脳ホモジネートを氷上で融解させ、1%ドデシル硫酸ナトリウムにて希釈しアルブミンを用いた検量線にて BCA タンパク質測定法にて脳ホモジネートのタンパク量を算出した。

### 脳中 ganglioside の網羅的分析

抽出および分析は、第 1 章第 3 節と同様に行った。

### 脳中 PLs の網羅的分析

抽出および分析は、第 1 章第 2 節と同様に行った。

### 脳 PLs の網羅的分析データの解析

機器付属のソフトウェアである Xcalibur にてデータ取得後、データは in-house にて開発した Mass++ソフト (<http://groups.google.com/group/massplusplus>) を用いて解析を行った。すなわち、Mass++ソフトにて測定データのピークアライメントおよびピークピッキングを行った後、ピークリストを作成し、出現ピーク全ての面積を算出した。面積は各画分の I.S. (画分 2:

PC (12 : 0, 12 : 0), 画分 3 : PE (12 : 0, 12 : 0), 画分 4 : PA (14 : 0, 14 : 0) にて補正後, R ソフトウェア パッケージ (<http://www.r-project.org/>) にて有意に変動あるピークを抽出した.

### 脳ガングリオシドの網羅的分析データの解析

機器付属のソフトウェアである Xcalibur にてデータ取得後, 精密質量情報, 標品のカラム保持時間情報および MS フラグメント情報を基にピークを同定し, Xcalibur にてピークリスト作成および出現ピーク全ての面積を算出した. その後, I.S. にて面積補正後, R ソフトウェア パッケージにて有意に変動あるピークを抽出した.

## 第 1 章第 6 節

### 血漿からの PLs の回収

-80°C にて保存済みの血漿を氷上で融解させた. 次に血漿 60  $\mu$ L に 200  $\mu$ L の 100 ng/mL PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PG (14 : 0, 14 : 0) および PA (14 : 0, 14 : 0) を I.S. として添加し, Bligh and Dyer 法にて脂質の抽出を行った. すなわち, 2 ml のクロロホルム/メタノール (3 : 1) と 0.5 ml の塩化ナトリウム飽和水溶液 (約 18%) を添加し良く攪拌後, 16,000 g にて 10 分間遠心した. 二層分離を確認後, クロロホルム層である下層を取り出し, 再度上層に 2 ml のクロロホルムを添加し同様に液液抽出を行った. クロロホルム層を 40°C 窒素気流下にて溶媒を留去後, 脂質混合物を得た. 続いて, 得られた脂質混合物は, PLs のクラス分離用のオープンカラムにて PLs の精製およびクラス分離を実施後, 窒素気流下にて溶媒流去後に分析時まで -20°C にて冷凍保存した.

### LC/MS を用いた網羅的な PLs の分析

分析は, 第 1 章第 2 節と同様に行った.



## 血漿中 PLs 分析の再現性の確認

60  $\mu\text{L}$  のヒト血漿に 40 pmol の PC (12 : 0, 12 : 0), PE (12 : 0, 12 : 0), PG (14 : 0, 14 : 0) および PA (14 : 0, 14 : 0) を添加し PL-WAX にて PLs クラス分離後, 各画分を 100  $\mu\text{l}$  のメタノールにて溶解後 LC/ESI-MS 分析を行った. 次に, 内因性の PLs をいくつか選び出し, 面積および I.S.との面積比を求め (n=3), その再現性を確認した.

## 血漿 PLs 網羅的分析データの解析

機器付属のソフトウェアである Xcalibur にてデータ取得後, データは in-house にて開発した Mass ++ソフトを用いて解析を行った. すなわち, Mass++ソフトにて測定データのピークアライメントおよびピークピッキングを行った後, ピークリストを作成し, 出現ピーク全ての面積を算出した. 面積は各画分の I.S. (画分 2 : PC (12 : 0, 12 : 0), 画分 3 : PE (12 : 0, 12 : 0), 画分 4 : PA (14 : 0, 14 : 0) にて補正後, One-way variance analysis (ANOVA) 若しくは R ソフトウェア パッケージにて有意に変動あるピークを抽出した. 主成分回帰分析は, SIMCAP v11 (Umetrics, NJ) を用いて実行した.

## 第 2 章第 2 節

### 血漿中コレステロール関連代謝物の網羅的測定のためのサンプル調製

-80°Cにて保存済みの血漿サンプルを氷上で融解させ, 25  $\mu\text{L}$  の血漿に 50  $\mu\text{L}$  の D7-コレステロール (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を I.S.として添加した. 次に, 100  $\mu\text{L}$  の 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を添加し 70°Cにて 60 分間インキュベーションした. その後, 2 mL の n-ヘキサンと 0.5 mL のリン酸緩衝液 (pH6.8) および塩化ナトリウム飽和水溶液を添加しよくかき混ぜ, 2,000 g にて 10 分間遠心した. 二層分離したことを確認後, 上層のヘキサン層を取り出した. 水層には再度 1 mL の n-ヘキサンを添加し, 同様の操作を繰り返し, ヘキサン層を回収した. ヘキサン層は, 窒素ガス雰囲気下 40°Cにてヘキサンを留去することにより網羅的ステロール分析用サンプルを得た. 分析時には 100  $\mu\text{L}$  エタノールにて良く溶解した後, その 20  $\mu\text{L}$  を LC/APCI-MS 分析に供した.

## LC/APCI-MSによる血漿中コレステロール関連代謝物の分析

移動層は A (50%メタノール), 並びに B (メタノール) を用い, 流速 0.4 mL/min のグラジエント分析 (20 分で B 液濃度を 40%から 90%に増大させ 10 分間保持後, 10 分で B 液濃度を 100%に増大させ 10 分間保持した)にてステロールを分離後, ポジティブモードの APCI-MS 分析を実施した. 検出器のスプレー電圧は 2.5 kV にて設定し, 試料をイオン化させた後, オービトラップ部にて分解能 30,000, スキャン幅  $m/z$  200-1000 にてスキャンを実施後, リニア イオントラップ部にてデータディペンデント MS/MS スキャンを行った (設定エネルギー 35%).

### 第 2 章第 3 節

#### 血漿中コレステロール関連代謝物の網羅的分析

抽出および分析は, 第 2 章第 2 節と同様に行った.

#### Mass ++を用いたデータ解析

機器付属のソフトウェアである Xcalibur にてデータ取得後, データは in-house にて開発した Mass++ソフトを用いて解析を行った. すなわち, Mass++ソフトにて測定データのピークアライメントおよびピークピッキングを行った後, ピークリストを作成し, 出現ピーク全ての面積を算出した. 面積は I.S.である D7-コレステロールにて補正後, ANOVA にて AD にて 2 倍以上の有意に変動あるピークを抽出した.

#### 変動ピークの同定

5 $\alpha$ -コレスタ-7, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール, 5 $\alpha$ -コレスタ-8, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール, コレスタ-5, 24-ジエン-3 $\beta$ -オール (デスマステロール), コレスタ-5, 7-ジエン-3 $\beta$ -オールおよびコレスタ-5, 8-ジエン-3 $\beta$ -オールをそれぞれメタノールに溶解させ, 20~30  $\mu\text{g/ml}$  の分析試料を作製した. カラム温度を 50°Cに設定し, 移動層は A (50%メタノール), 並びに B (メタノール) を用い, 流速 1 mL/min のグラジエント分析にてステロールを分離後, ポジティブモードの APCI-MS 分析を実施した. イオン源スプレー温度を 250°C, スプレー電圧は 2.5 kV, シースガスの流速 2.5 L/min, ドライングガス 0.02 MPa にて設定し, 試料をイオン化させた後, 選択的イオン分析法 (SIM) を実施した. モニタリングイオンは  $m/z$  367.3 とした.

## 第2章第4節

### LC/MSによる血漿中デスモステロールおよびコレステロールの定量

−80℃にて保存済みの血漿を氷上で融解させ、血漿 25 μL に 100 μL の D7-コレステロール (200 μg/mL) および 100 μL の D6-デスモステロール (500 ng/mL) を I.S.として添加した。次に、100 μL の 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を添加し 70℃にて 60 分間インキュベーションし、その後、2 mL の n-ヘキサンと 0.5 mL のリン酸緩衝液 (pH6.8) および塩化ナトリウム飽和水溶液を添加しよくかき混ぜ、2,000g にて 10 分間遠心した。二層分離したことを確認後、上層のヘキサン層を取り出した。水層には再度 1 mL の n-ヘキサンを添加し、同様の操作を繰り返し、ヘキサン層を回収した。ヘキサン層は、窒素ガス雰囲気下 40℃にてヘキサンを留去することにより網羅的ステロール分析用サンプルを得た。

分析時に 100 μL エタノールにて良く溶解した後、その 20 μL をデスモステロール分析用として、若しくはエタノールにて 200 倍希釈したサンプル 2 μL をコレステロール分析用として LC/APCI-MS 分析した。カラム温度を 50℃に設定し、移動層は A (50%メタノール)、並びに B (メタノール) を用い、流速 1 mL/min にてステロールを分離後 (デスモステロール : B 濃度 85%の 45 分間のイソクラティック分析, コレステロール : B 濃度 100%の 15 分間のイソクラティック分析), ポジティブモードの APCI-MS 分析を実施した。イオン源スプレー温度を 250℃, スプレー電圧は 2.5 kV, シースガスの流速 2.5 L/min, ドライングガス 0.02 MPa にて設定し、試料をイオン化させた後、選択的イオン分析法 (SIM) を実施した。モニタリングイオンは  $m/z$  367.3 (デスモステロール),  $m/z$  373.3 (D6-デスモステロール),  $m/z$  369.3 (コレステロール) および  $m/z$  376.3 (D7-コレステロール) とした。

### 血漿中デスモステロールおよびコレステロールの分析法のバリデーション試験

デスモステロールの血漿用検量線試料は、10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 および 30000 ng/mL のデスモステロールに I.S.として 500 ng/mL の D6-デスモステロールを添加したものを窒素にて溶媒留去後、100 μL のエタノールにて溶解し、その 20 μL を LC/APCI-MS 分析に供した。また、コレステロールの血漿用検量線試料は、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 および 10 mg/mL のコレステロールに I.S.として 200 μg/mL の D7-コレステロールを添加したものを窒素にて溶媒留去後、100 μL のエタノールにて溶解し、さらにエタノールにて 200 倍希釈し、その 2 μL を LC/APCI-MS 分析に供した。検量線は、X 軸にデスモステロールあるいはコレステロールの濃度と Y 軸にデスモステロールあるいはコレステロールのピーク面積と I.S.のピーク面積比を用いて作成し、 $1/x^2$  で重み付け下にて直線回帰を行うことで作成した。

血漿測定バリデーションサンプルは、25  $\mu$ L の血漿サンプルに 0, 30, 300 若しくは 10000 ng/mL のデスマステロール、0, 0.2, 1 若しくは 5 mg/mL のコレステロールを 25  $\mu$ L 添加したものをを用いて定量値の日内変動 (n=3) および日間変動 (n=3) を確認した。Relative error (R.E.%) は、 $[(\text{observed concentration} - \text{theoretical concentration}) / \text{spiked concentration}] \times 100 (\%)$ にて計算し R.S.D.%を算出した。

## 第2章第5節

### LC/MS による血漿中デスマステロールおよびコレステロールの定量

分析は、第2章第4節と同様に行った。

### ROC curve を用いた診断マーカー特性評価

感度を y 軸に特異性を x 軸にした受信者操作特性曲線 (ROC 曲線) および ROC 曲線の AUC を GraphPad Prism を用いることで算出した。

## 第2章第6節

### LC/MS による CSF 中デスマステロールおよびコレステロールの定量

-80°Cにて保存済みの CSF サンプルを氷上で融解させ、CSF 100  $\mu$ L に 100  $\mu$ L の D7-コレステロール (1  $\mu$ g/mL) および 100  $\mu$ L の D6-デスマステロール (100 ng/mL) を I.S.として添加した。次に、100  $\mu$ L の 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を添加し 70°Cにて 60 分間インキュベーションすることにより鹸化し、その後、2 mL の n-ヘキサンと 0.5mL のリン酸緩衝液 (pH6.8) および塩化ナトリウム飽和水溶液を添加しよくかき混ぜ、2,000g にて 10 分間遠心した。二層分離したことを確認後、上層のヘキサン層を取り出した。水層には再度 1 mL の n-ヘキサンを添加し、同様の操作を繰り返し、ヘキサン層を回収した。ヘキサン層は、窒素ガス雰囲気下 40°Cにてヘキサンを留去することにより網羅的ステロール分析用サンプルを得た。

分析時に 100  $\mu$ L エタノールにて良く溶解した後、その 20  $\mu$ L をデスマステロール分析用として、2  $\mu$ L をコレステロール分析用として LC/APCI-MS 分析した。分析は、第2章第2節と同

様に行った。

### LC/MS による血漿中ステロールの分析

分析は、第 2 章第 4 節と同様に行った。

### ヒト脳ホモジナイズの作製

−80℃にて保存済みのヒト脳ブロックに 10 倍量のプロテアーゼインヒビターおよび 5 mM EDTA 含有 100 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH7.6) を添加し, Omni Tissue Homogenizer TH (125Watt ; 5,000-30,000 rpm) にてホモジナイズした。作製した脳ホモジネートは小分けして使用時まで−80℃保存した。

### 脳のステロール分析

−80℃にて保存済みの脳ホモジネートを氷上で融解させ, 脳ホモジネート 10 μL に 100 μL の D7-コレステロール (50 μg/mL) および 100 μL の D6-デスモステロール (50 ng/mL) を I.S. として添加した。次に, 100 μL の 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を添加し 70℃にて 60 分間インキュベーションし, その後, 2 mL の n-ヘキサンと 0.5 mL のリン酸緩衝液 (pH6.8) および塩化ナトリウム飽和水溶液を添加しよくかき混ぜ, 2,000 g にて 10 min 遠心した。二層分離したことを確認後, 上層のヘキサン層を取り出した。水層には再度 1mL の n-ヘキサンを添加し, 同様の操作を繰り返し, ヘキサン層を回収した。ヘキサン層は, 窒素ガス雰囲気下 40℃にてヘキサンを留去することにより網羅的ステロール分析用サンプルを得た。

デスモステロールの血漿用検量線試料は, 5, 10, 20, 50, 100, 200 および 500 ng/mL のデスモステロールに I.S.として 50 ng/mL の D6-デスモステロールを添加したものを窒素にて溶媒留去後, 100 μL のエタノールにて溶解し, その 20 μL を LC/APCI-MS 分析に供した。また, コレステロールの血漿用検量線試料は, 10, 20, 50, 100, 200, 500 および 1000 μg/mL のコレステロールに I.S.として 50 μg/mL の D7-コレステロールを添加したものを窒素にて溶媒留去後, 100 μL のエタノールにて溶解し, さらにエタノールにて 10 倍希釈し, その 2 μL を LC/APCI-MS 分析に供した。検量線は, ターゲットの化合物の濃度とターゲットの化合物の面積と I.S.の面積の比を用いて作製し,  $1/x^2$  で重み付け下にて直線回帰を行うことで作成した。分析は, 第 2 章第 2 節と同様に行った。

## 第2章第7節

### LC/MSによる血漿中ステロールの分析

分析は、第2章第4節と同様に行った。

### GC/MSによる血漿中デスモステロールの定量

−80℃にて保存済みの血漿サンプルを氷上で融解させ、血漿 100 μL に 100 μL の D7-デスモステロール (10 μg/mL) を I.S. として添加した。次に、100 μL の 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を添加し 70℃にて 60 分間インキュベーションすることにより鹼化し、その後、2 mL の n-ヘキサンと 0.5 mL のリン酸緩衝液 (pH6.8) および塩化ナトリウム飽和水溶液 (約 18%) を添加しよくかき混ぜ、2,000g にて 10 分間遠心した。二層分離したことを確認後、上層のヘキサン層を取り出した。水層には再度 1mL の n-ヘキサンを添加し、同様の操作を繰り返す、ヘキサン層を回収した。次いで、ヘキサン層を窒素ガス雰囲気下 40℃にて完全に留去した後、1 mL の TMSi 試薬を加え 64℃にて 1 時間誘導体化反応を行った。その後、溶液を窒素ガス雰囲気下 40℃にて完全に留去し、160 μL の n-デカンにて溶解し、その 2 μL を GC-MS-SIM 分析に付した。

カラムへの注入は、スプリットレスモードにて行い、キャリアーガスとしてヘリウム(1 mL/min)を用い分析を行った。初期カラム温度を 150℃に設定し、注入後 1 分間保持した後、20℃/min にて 260℃までカラム温度を上昇させ、ついで 10℃/min にて 280 °C まで昇温させるグラジエント分析、若しくは注入後 1 分間保持した後、20℃/min にて 250℃までカラムを昇温させるグラジエント分析にて TMS 誘導体化ステロールを分離後、ポジティブモードの CI/SIM 分析を実施した。モニタリングイオンは  $m/z$  441 (デスモステロール:  $[M^+-CH_3]$ ) および  $m/z$  447 (D6-デスモステロール) とした。

## 第2章第8節

### 血漿中ステロールの分析

分析は、第2章第4節と同様に行った。

## 第 2 章第 9 節

### 血漿中ステロールの分析

分析は、第 2 章第 4 節と同様に行った。

## 引用文献

- [1] M. Citron, *Nat Rev Drug Discov* 9 (2010) 387.
- [2] K.M. Wilcoxon, T. Uehara, K.T. Myint, Y. Sato, Y. Oda, *Expert Opinion on Drug Discovery* 5 (2010) 249.
- [3] C. Hu, R. van der Heijden, M. Wang, J. van der Greef, T. Hankemeier, G. Xu, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (2009) 2836.
- [4] X. Han, R.W. Gross, *Mass Spectrom Rev* 24 (2005) 367.
- [5] X. Han, R.W. Gross, *J Lipid Res* 44 (2003) 1071.
- [6] M.R. Wenk, *Nat Rev Drug Discov* 4 (2005) 594.
- [7] R.S. Rosenson, *Curr Atheroscler Rep* 12 184.
- [8] P.M. Kochanek, R.P. Berger, H. Bayir, A.K. Wagner, L.W. Jenkins, R.S. Clark, *Curr Opin Crit Care* 14 (2008) 135.
- [9] A.D. Watson, *J Lipid Res* 47 (2006) 2101.
- [10] D. Steinberg, *J Lipid Res* 46 (2005) 179.
- [11] Y. Sato, T. Nakamura, K. Aoshima, Y. Oda, *Anal Chem* 82 (2010) 9858.
- [12] M. Minami, S. Kimura, T. Endo, N. Hamaue, M. Hirafuji, H. Togashi, M. Matsumoto, M. Yoshioka, H. Saito, S. Watanabe, T. Kobayashi, H. Okuyama, *Pharmacol Biochem Behav* 58 (1997) 1123.
- [13] H.Y. Kim, L. Edsall, *Lipids* 34 Suppl (1999) S249.
- [14] S. Delion, S. Chalon, D. Guilloteau, J.C. Besnard, G. Durand, *J Neurochem* 66 (1996) 1582.
- [15] M. Vreugdenhil, C. Bruehl, R.A. Voskuyl, J.X. Kang, A. Leaf, W.J. Wadman, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 12559.
- [16] M. Nishikawa, S. Kimura, N. Akaike, *J Physiol* 475 (1994) 83.
- [17] N.J. Haughey, V.V. Bandaru, M. Bae, M.P. Mattson, *Biochim Biophys Acta* 1801 (2010) 878.



- [18] S. Hakomori, *Curr Opin Hematol* 10 (2003) 16.
- [19] M.A. Wollmer, *Biochim Biophys Acta* 1801 (2010) 762.
- [20] I.J. Martins, T. Berger, M.J. Sharman, G. Verdile, S.J. Fuller, R.N. Martins, *J Neurochem* 111 (2009) 1275.
- [21] C.J. Carter, *Neurochem Int* 50 (2007) 12.
- [22] L.A. Shobab, G.Y. Hsiung, H.H. Feldman, *Lancet Neurol* 4 (2005) 841.
- [23] M.A. Pappolla, T.K. Bryant-Thomas, D. Herbert, J. Pacheco, M. Fabra Garcia, M. Manjon, X. Girones, T.L. Henry, E. Matsubara, D. Zambon, B. Wolozin, M. Sano, F.F. Cruz-Sanchez, L.J. Thal, S.S. Petanceska, L.M. Refolo, *Neurology* 61 (2003) 199.
- [24] F. Panza, A. D'Introno, A.M. Colacicco, C. Capurso, G. Pichichero, S.A. Capurso, A. Capurso, V. Solfrizzi, *Brain Res Rev* 51 (2006) 275.
- [25] R. Homan, M.K. Anderson, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 708 (1998) 21.
- [26] H.Y. Kim, T.C. Wang, Y.C. Ma, *Anal Chem* 66 (1994) 3977.
- [27] B.F. Dickens, C.S. Ramesha, G.A. Thompson, Jr., *Anal Biochem* 127 (1982) 37.
- [28] S.J. Gaskell, C.J. Brooks, *J Chromatogr* 142 (1977) 469.
- [29] T. Houjou, K. Yamatani, M. Imagawa, T. Shimizu, R. Taguchi, *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 654.
- [30] K. Ikeda, Y. Oike, T. Shimizu, R. Taguchi, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (2009) 2639.
- [31] R. Taguchi, M. Nishijima, T. Shimizu, *Methods Enzymol* 432 (2007) 185.
- [32] F.L. Huang, K.P. Huang, J. Wu, C. Boucheron, *J Neurosci* 26 (2006) 6230.
- [33] F. Naka, N. Narita, N. Okado, M. Narita, *Brain Dev* 27 (2005) 275.
- [34] D.O. Hebb, *Am Psychol* 2 (1947) 306.
- [35] J.L. Jankowsky, T. Melnikova, D.J. Fadale, G.M. Xu, H.H. Slunt, V.

- Gonzales, L.H. Younkin, S.G. Younkin, D.R. Borchelt, A.V. Savonenko, *J Neurosci* 25 (2005) 5217.
- [36] C. Rampon, C.H. Jiang, H. Dong, Y.P. Tang, D.J. Lockhart, P.G. Schultz, J.Z. Tsien, Y. Hu, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 12880.
- [37] K. McNair, J. Broad, G. Riedel, C.H. Davies, S.R. Cobb, *Neuroscience* 145 (2007) 413.
- [38] S.T. Hussain, B.I. Roots, *Biochem Soc Trans* 22 (1994) 338S.
- [39] R. Mozzi, S. Buratta, G. Goracci, *Neurochem Res* 28 (2003) 195.
- [40] K. Ikeda, T. Shimizu, R. Taguchi, *J Lipid Res* 49 (2008) 2678.
- [41] H. Lee, H.J. An, L.A. Lerno, Jr., J.B. German, C.B. Lebrilla, *Int J Mass Spectrom* 305 (2010) 138.
- [42] S. Ngamukote, M. Yanagisawa, T. Ariga, S. Ando, R.K. Yu, *J Neurochem* 103 (2007) 2327.
- [43] M. Yanagisawa, R.K. Yu, *Glycobiology* 17 (2007) 57R.
- [44] R.K. Yu, *Prog Brain Res* 101 (1994) 31.
- [45] M. Kosicek, S. Hecimovic, *Int J Mol Sci* 14 (2013) 1310.
- [46] B.W. Brooksbank, J. McGovern, *Mol Chem Neuropathol* 11 (1989) 143.
- [47] I. Kracun, S. Kalanj, J. Talan-Hranilovic, C. Cosovic, *Neurochem Int* 20 (1992) 433.
- [48] W. Op Den Velde, G.J. Hooghwinkel, *J Am Geriatr Soc* 23 (1975) 301.
- [49] L. Svennerholm, C.G. Gottfries, *J Neurochem* 62 (1994) 1039.
- [50] L. Svennerholm, *Life Sci* 55 (1994) 2125.
- [51] E.G. Bligh, W.J. Dyer, *Can J Biochem Physiol* 37 (1959) 911.
- [52] L. Shan, K. Jaffe, S. Li, L. Davis, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 864 (2008) 22.
- [53] H. Ogiso, R. Taguchi, *Anal Chem* 80 (2008) 9226.
- [54] M. Ishida, M. Imagawa, T. Shimizu, R. Taguchi, *J. Mass Spectrom.*

- Soc. Jpn. 53 (2005) 217.
- [55] R.A. Johanson, G.T. Berry, *Methods Mol Biol* 579 (2009) 189.
  - [56] U. Sommer, H. Herscovitz, F.K. Welty, C.E. Costello, *J Lipid Res* 47 (2006) 804.
  - [57] H. Ogiso, T. Suzuki, R. Taguchi, *Anal Biochem* 375 (2008) 124.
  - [58] K.T. Myint, T. Uehara, K. Aoshima, Y. Oda, *Anal Chem* 81 (2009) 7766.
  - [59] T. Nakamura, K.T. Myint, Y. Oda, *J Proteome Res* 9 (2010) 1385.
  - [60] L.A. Briand, T.E. Robinson, S. Maren, *Learn Mem* 12 (2005) 553.
  - [61] S.N. Duffy, K.J. Craddock, T. Abel, P.V. Nguyen, *Learn Mem* 8 (2001) 26.
  - [62] H.G. Gratzner, *Science* 218 (1982) 474.
  - [63] M. Walton, B. Connor, P. Lawlor, D. Young, E. Sirimanne, P. Gluckman, G. Cole, M. Dragunow, *Brain Res Brain Res Rev* 29 (1999) 137.
  - [64] J.C. Yin, T. Tully, *Curr Opin Neurobiol* 6 (1996) 264.
  - [65] G.Y. Diau, A.T. Hsieh, E.A. Sarkadi-Nagy, V. Wijendran, P.W. Nathanielsz, J.T. Brenna, *BMC Med* 3 (2005) 11.
  - [66] C.T. Chen, D.W. Ma, J.H. Kim, H.T. Mount, R.P. Bazinet, *J Lipid Res* 49 (2008) 147.
  - [67] J.A. Hamilton, K. Brunaldi, *J Mol Neurosci* 33 (2007) 12.
  - [68] P.J. Robinson, J. Noronha, J.J. DeGeorge, L.M. Freed, T. Nariai, S.I. Rapoport, *Brain Res Brain Res Rev* 17 (1992) 187.
  - [69] R.P. Bazinet, M.T. Weis, S.I. Rapoport, T.A. Rosenberger, *Psychopharmacology (Berl)* 184 (2006) 122.
  - [70] D.G. Mashek, L.O. Li, R.A. Coleman, *J Lipid Res* 47 (2006) 2004.
  - [71] J.T. Green, S.K. Orr, R.P. Bazinet, *J Lipid Res* 49 (2008) 939.
  - [72] N. Salem, Jr., B. Litman, H.Y. Kim, K. Gawrisch, *Lipids* 36 (2001) 945.

- [73] N.G. Bazan, *Mol Neurobiol* 32 (2005) 89.
- [74] H.Y. Kim, *J Biol Chem* 282 (2007) 18661.
- [75] J.S. Rao, R.N. Ertley, H.J. Lee, J.C. DeMar, Jr., J.T. Arnold, S.I. Rapoport, R.P. Bazinet, *Mol Psychiatry* 12 (2007) 36.
- [76] J.J. DeGeorge, T. Nariai, S. Yamazaki, W.M. Williams, S.I. Rapoport, *J Neurochem* 56 (1991) 352.
- [77] M.C. Garcia, H.Y. Kim, *Brain Res* 768 (1997) 43.
- [78] C.R. Jones, T. Arai, S.I. Rapoport, *Neurochem Res* 22 (1997) 663.
- [79] R.A. Gibson, M. Makrides, *Acta Paediatr* 87 (1998) 1017.
- [80] M. Neuringer, W.E. Connor, D.S. Lin, L. Barstad, S. Luck, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 4021.
- [81] F. Calon, G.P. Lim, F. Yang, T. Morihara, B. Teter, O. Ubeda, P. Rostaing, A. Triller, N. Salem, Jr., K.H. Ashe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, *Neuron* 43 (2004) 633.
- [82] A.J. Sinclair, D. Begg, M. Mathai, R.S. Weisinger, *Asia Pac J Clin Nutr* 16 Suppl 1 (2007) 391.
- [83] M. Soderberg, C. Edlund, K. Kristensson, G. Dallner, *Lipids* 26 (1991) 421.
- [84] A. Ariel, C.N. Serhan, *Trends Immunol* 28 (2007) 176.
- [85] J.M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, C.N. Serhan, *Nature* 447 (2007) 869.
- [86] S. Holguin, Y. Huang, J. Liu, R. Wurtman, *Behav Brain Res* 191 (2008) 11.
- [87] J.D. Runyan, A.N. Moore, P.K. Dash, *J Neurosci* 24 (2004) 1288.
- [88] C. Mulder, L.O. Wahlund, T. Teerlink, M. Blomberg, R. Veerhuis, G.J. van Kamp, P. Scheltens, P.G. Scheffer, *J Neural Transm* 110 (2003) 949.
- [89] A. Walter, U. Korth, M. Hilgert, J. Hartmann, O. Weichel, K. Fassbender, A. Schmitt, J. Klein, *Neurobiol Aging* 25 (2004) 1299.

- [90] B.Z. Ngwenya, N. Yamamoto, *Cancer Immunol Immunother* 21 (1986) 174.
- [91] N. Yamamoto, B.Z. Ngwenya, *Cancer Res* 47 (1987) 2008.
- [92] H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, T. Wyss-Coray, *Neurobiol Aging* 21 (2000) 383.
- [93] T. Wyss-Coray, *Nat Med* 12 (2006) 1005.
- [94] B.M. Ross, A. Moszczynska, J. Erlich, S.J. Kish, *J Neurochem* 70 (1998) 786.
- [95] K. Talbot, R.A. Young, C. Jolly-Tornetta, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, B.A. Wolf, *Neurochem Int* 37 (2000) 17.
- [96] P. Gamba, G. Testa, B. Sottero, S. Gargiulo, G. Poli, G. Leonarduzzi, *Ann N Y Acad Sci* 1259 (2012) 54.
- [97] O. Ghribi, *J Alzheimers Dis* 15 (2008) 673.
- [98] G. Di Paolo, T.W. Kim, *Nat Rev Neurosci* 12 284.
- [99] L. Puglielli, R.E. Tanzi, D.M. Kovacs, *Nat Neurosci* 6 (2003) 345.
- [100] J. Kim, J.M. Basak, D.M. Holtzman, *Neuron* 63 (2009) 287.
- [101] R.M. Evans, S. Hui, A. Perkins, D.K. Lahiri, J. Poirier, M.R. Farlow, *Neurology* 62 (2004) 1869.
- [102] G. Bu, *Nat Rev Neurosci* 10 (2009) 333.
- [103] H. Kolsch, R. Heun, F. Jessen, J. Popp, F. Hentschel, W. Maier, D. Lutjohann, *Biochim Biophys Acta* 1801 (2010) 945.
- [104] I. Bjorkhem, D. Lutjohann, U. Diczfalusy, L. Stahle, G. Ahlborg, J. Wahren, *J Lipid Res* 39 (1998) 1594.
- [105] D. Lutjohann, I. Bjorkhem, S. Locatelli, C. Dame, J. Schmolling, K.

- von Bergmann, H. Fahnenstich, *Acta Paediatr* 90 (2001) 652.
- [106] A. Cohen, H.S. Hertz, J. Mandel, R.C. Paule, R. Schaffer, L.T. Sniegoski, T. Sun, M.J. Welch, E.t. White, *Clin Chem* 26 (1980) 854.
- [107] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalusy, *Anal Biochem* 225 (1995) 73.
- [108] H.S. Ahmida, P. Bertucci, L. Franzo, R. Massoud, C. Cortese, A. Lala, G. Federici, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 842 (2006) 43.
- [109] Z. Zhang, D. Li, D.E. Blanchard, S.R. Lear, S.K. Erickson, T.A. Spencer, *J Lipid Res* 42 (2001) 649.
- [110] B. Ruan, W.K. Wilson, J. Pang, N. Gerst, F.D. Pinkerton, J. Tsai, R.I. Kelley, F.G. Whitby, D.M. Milewicz, J. Garbern, G.J. Schroepfer, Jr., *J Lipid Res* 42 (2001) 799.
- [111] J. Lembecke, U. Ceglarek, G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, J. Thiery, *J Lipid Res* 46 (2005) 21.
- [112] J.G. McDonald, B.M. Thompson, E.C. McCrum, D.W. Russell, *Methods Enzymol* 432 (2007) 145.
- [113] I. Bjorkhem, T. Miettinen, E. Reihner, S. Ewerth, B. Angelin, K. Einarsson, *J Lipid Res* 28 (1987) 1137.
- [114] B.J. Koopman, J.C. van der Molen, B.G. Wolthers, J.B. Vanderpas, *J Chromatogr* 416 (1987) 1.
- [115] P.B. Hylemon, E.J. Studer, W.M. Pandak, D.M. Heuman, Z.R. Vlahcevic, J.Y. Chiang, *Anal Biochem* 182 (1989) 212.
- [116] B. Ruan, N. Gerst, G.T. Emmons, J. Shey, G.J. Schroepfer, Jr., *J Lipid Res* 38 (1997) 2615.
- [117] T. Saldanha, A.C. Sawaya, M.N. Eberlin, N. Bragagnolo, *J Agric Food Chem* 54 (2006) 4107.
- [118] H. Farwanah, J. Wohlrab, R.H. Neubert, K. Raith, *Anal Bioanal Chem* 383 (2005) 632.
- [119] B.J. Pettus, B.J. Kroesen, Z.M. Szulc, A. Bielawska, J. Bielawski, Y.A.

- Hannun, M. Busman, *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 577.
- [120] E. Razzazi-Fazeli, S. Kleineisen, W. Luf, *J Chromatogr A* 896 (2000) 321.
- [121] M. Ando, T. Kaneko, R. Watanabe, S. Kikuchi, T. Goto, T. Iida, T. Hishinuma, N. Mano, J. Goto, *J Pharm Biomed Anal* 40 (2006) 1179.
- [122] B. Lindenthal, A.L. Holleran, T.A. Aldaghlis, B. Ruan, G.J. Schroepfer, Jr., W.K. Wilson, J.K. Kelleher, *FASEB J* 15 (2001) 775.
- [123] C. Wu, I. Miloslavskaya, S. Demontis, R. Maestro, K. Galaktionov, *Nature* 432 (2004) 640.
- [124] D.W. Smith, L. Lemli, J.M. Opitz, *J Pediatr* 64 (1964) 210.
- [125] G. Xu, R.J. Servatius, S. Shefer, G.S. Tint, W.T. O'Brien, A.K. Batta, G. Salen, *Metabolism* 47 (1998) 878.
- [126] D. Kritchevsky, W.L. Holmes, *Biochem Biophys Res Commun* 7 (1962) 128.
- [127] R. Fumagalli, R. Paoletti, *Life Sci* 5 (1963) 291.
- [128] S. Couillard-Despres, B. Iglseider, L. Aigner, *Gerontology* 57 559.
- [129] S. Jinno, *J Comp Neurol* 519 451.
- [130] N.J. Spann, L.X. Garmire, J.G. McDonald, D.S. Myers, S.B. Milne, N. Shibata, D. Reichart, J.N. Fox, I. Shaked, D. Heudobler, C.R. Raetz, E.W. Wang, S.L. Kelly, M.C. Sullards, R.C. Murphy, A.H. Merrill, Jr., H.A. Brown, E.A. Dennis, A.C. Li, K. Ley, S. Tsimikas, E. Fahy, S. Subramaniam, O. Quehenberger, D.W. Russell, C.K. Glass, *Cell* 151 (2010) 138.