

高分解能 GC/Q-TOF を用いた心不全患者の代謝プロファイルの差異検出

著者

Luis Valdiviez and Oliver Fiehn
West Coast Metabolomics
Center, University of
California, Davis, CA

Sofia Nieto and
Andrew McEachran
Agilent Technologies, Inc.

概要

心血管疾患やその他の疾患の代謝基盤を研究することは、疾患生物学や潜在的な介入療法の影響をより深く理解するために不可欠です。この際に重要になるのは、分子に関する深い知見を提供できるワークフローを開発することです。このアプリケーションノートでは、化合物の同定にアジレントの精密質量メタボロミクスパーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) およびユニットマスライブラリを使用した GC/Q-TOF ノンターゲットメタボロミクスワークフローについて説明します。また、新しいライブラリ管理ソフトウェアツールである Agilent ChemVista を使用して、サードパーティライブラリをスクリーニングワークフローに統合しています。本研究は、心不全 (HF) 患者の代謝プロファイリングを行い、この病態の根本的なメカニズムを明らかにすることで、効果的な治療法の開発に役立てます。まとめると、ここに示したワークフローにより、疾患の分子メカニズムを理解しようとする研究者に対して 1 つの例を提供します。

はじめに

心不全 (HF) は、生活の質と寿命に重大な影響を及ぼす臨床症状であり、世界中で 2300 万人が罹患する世界的な公衆衛生上の主要な問題です¹。HF 症例の約半数は左室駆出率の低下 (HFrEF) を示しており、残りの半数は駆出率が保たれている (HFpEF) のが特徴です²。どちらの病態も罹患率や死亡率は同程度ですが、HFpEF に対する有効な治療法は存在しません²。健常者と比較した HF 患者の代謝プロファイルをより深く理解することにより、潜在的な治療法が明らかになる可能性があります。そこで、将来的に HF に対する適切な治療法の開発を促進するために、健常者および HFrEF と HFpEF の患者の血漿代謝プロファイリングに関する実験を実施しました。

代謝プロファイリングに GC/MS を使用する利点の 1 つは、再現性の高い膨大な数の電子イオン化 (EI) スペクトルが含まれている GC/MS ライブラリを利用できるため、迅速かつ効率的に化合物を同定できることです^{3~6}。化合物の同定をさらに迅速化し、その信頼性を高めるために、EI スペクトルライブラリには通常、次のような特性情報が含まれていることが望まれます。つまり、多数の化合物同定に役に立つ数多くのスペクトル、汎用性を高めるためのリテンションインデックス (RI)、高分解能機器の場合は、精密質量スペクトルの情報が偽陽性率を効率的に低下させます。

そのため、今回の実験では、化合物同定の可能性を最大限にするために、さまざまな GC/MS EI ライブラリを使用しました。この中には、精密質量メタボロミクス PCDL、NIST23、および ChemVista ソフトウェアにより PCDL にエクスポートされた MassBank of North America (MassBank.us)⁷ のスペクトルが含まれています。

このアプリケーションノートで使用している精密質量メタボロミクス PCDL には、生体マトリクスで一般的に検出される代謝物や生体異物を含む誘導体化物等、900 を超える精査されたスペクトルが含まれています⁸。また、標準的な Fiehn メタボロミクスメソッドの RT と、脂肪酸メチルエステル (FAME) とアルカンの両方に基づいた RI も含まれています⁹。このワークフローに精密質量メタボロミクス PCDL を統合することにより、複数の確認ポイントを通して高精度の化合物アノテーションが得られました。

今回の実験では、メタボロミクス用精密質量ライブラリ、ユニットマスライブラリ、MassBank.us、および NIST23 と SureMass 精密質量デコンボリューションを組み合わせることが、代謝物の同定に不可欠であることが証明されました。サンプル群間で相当数の代謝物が同定され、HF 患者と健常者の間で統計学的差異が観察できました。このワークフローとその結果を組み合わせることにより、HF の代謝シグネチャを理解できるようになります。

実験手法

サンプル前処理

HFrEF 群と HFpEF 群の被験者、および健常者から血漿を採取しました (グループごとに 10 サンプル)。文献で説明されているように、各血漿サンプル 30 μ L を 1 mL のアセトニトリル：イソプロパノール：水 (3:3:2) で抽出し、抽出液 450 μ L を乾燥させ、O-メトキシ化により誘導体化した後、MSTFA + 1 % TMCS でトリメチルシリル化しました⁹。

データ取り込みとデータ処理

データの取り込みには、精密質量、高分解能 Agilent 7250 GC/Q-TOF システムを使用しました。文献で説明されているとおり、GC メソッドは、d₂₇ ミリスチン酸を使用してリテンションタイムロッキングを行いました¹⁰。70 eV、低エネルギー EI モードおよび化学イオン化 (CI) モードでデータを取り込みました。さらに、未知化合物の構造解析には、MS/MS を使用しました。データ取り込みメソッドの詳細を表 1 に示します。

表 1. データ取り込みパラメータ

イオン化モード	EI	CI
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF	
GC	Agilent 8890 GC	
カラム	Agilent DB-5ms ウルトラライナート、30 m \times 0.25 mm、0.25 μ m、デュラガード付き、10 m	
注入口	スプリット/スプリットレス注入口、4 mm Agilent ウルトラライナート注入口ライナ、シングルテーパ	
注入量	0.2 μ L	0.5 μ L
注入モード	スプリットレス	
注入口温度	280 $^{\circ}$ C	
オープン温度プログラム	50 $^{\circ}$ C で 0.5 分間、10 $^{\circ}$ C/min で 325 $^{\circ}$ C まで昇温、10 分間保持	
キャリアガス	ヘリウム	
カラム流量	1 mL/min 定流量モード	
トランスファーライン温度	290 $^{\circ}$ C	
四重極温度	150 $^{\circ}$ C	
イオン源温度	200 $^{\circ}$ C	280 $^{\circ}$ C
イオン化エネルギー	70 eV (標準 EI)、15、12、10 eV (低エネルギー EI)	60 eV
イオン化電流	5 μ A (標準 EI)、0.4~0.8 μ A (低エネルギー EI)	30 μ A
スペクトル採取レート	5 Hz	
質量範囲	m/z 50~1,200	

Agilent SureMass デコンボリューションおよびライブラリ検索は、Agilent MassHunter Unknowns Analysis 11.1 で実行しました。ChemVista 1.0 を使用して、サードパーティのデータベース (この場合は、MassBank of North America (massbank.us)) から GC/MS スペクトルをエクスポートしました。まず、化合物同定には、精密質量メタボ

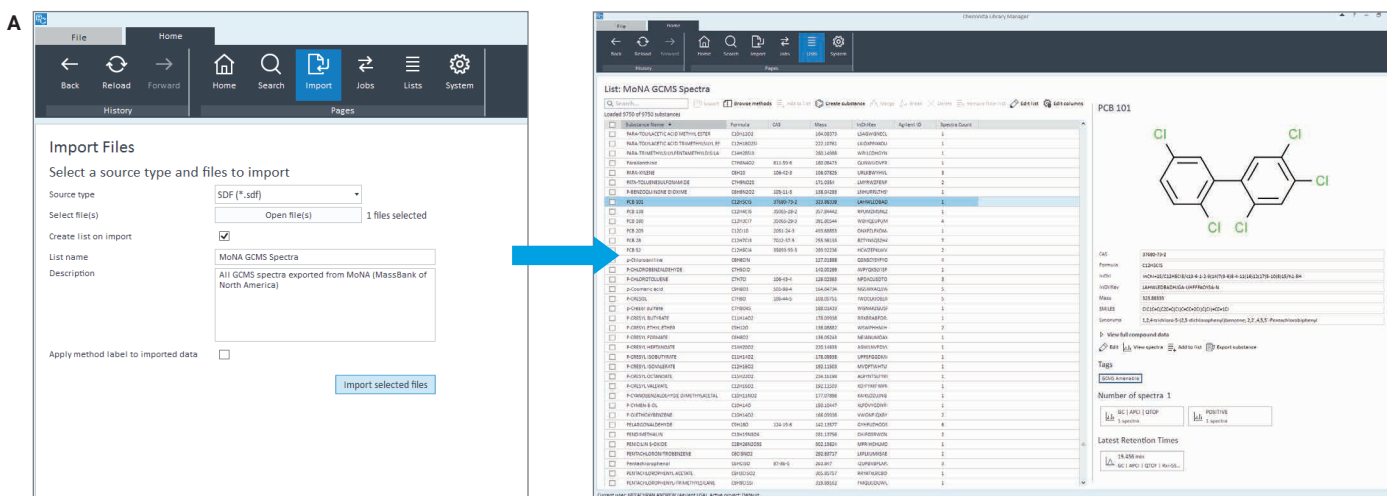
ロミクス PCDL、ユニットマス Fiehn メタボロミクスライブラリ、NIST23、および MassBank.us を使用しました。化合物同定の確認には、すべてのライブラリのアルカンおよび FAME のリテンションインデックスを使用しました。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 15.1 で統計解析を実施しました。構造解析は、Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator (MSC) 8.2 ソフトウェアを使用して、フラグメントを提案された部分構造にマッピングしました。

結果と考察

ChemVista によるメタボロミクスワークフローへのサードパーティライブラリの組み込み

ChemVista は、スタンドアロンのソフトウェアアプリケーションで、ワークフローにサードパーティライブラリを組み込むことで、メタボロミクス研究で得られた化合物同定の結果を補完することができます。ChemVista は、スペクトル、RT/RI 情報、その他の化合物のメタデータを管理することができ、SDF や PCDL を含む複数のデータフォーマットに対応しています¹¹。また、化合物の構造や識別子を追加するPCDL の作成プロセスでも使用できます。

本研究では、サードパーティのライブラリスペクトルを使用するため、すべての GC/MS スペクトルデータ (18,000 を超えるスペクトルを含む) を、MassBank.us のホームページから SDF フォーマットでダウンロードし、ChemVista にインポートしました (図 1A)。インポートしたデータを、EI スペクトルのみが含まれるように絞り込みし、下流のワークフローでさらに使用するために PCDL フォーマットでエクスポートしました。新たに作成された MassBank.us PCDL には、9,000 を超える EI GC/MS 化合物のスペクトルが含まれていました (図 1B)。ChemVista 出力の 1 つの化合物エンティティには、異なる GC/MS 分析装置で得られたものを含む複数のスペクトルを含めることができるため、データの取り込みに使用する機器を柔軟に選択できます。図 1C は、図 1B に示した同じ化合物 (キヌレン酸) の GC/Q-TOF 精密質量メタボロミクス PCDL のスペクトルを比較のために示しています。



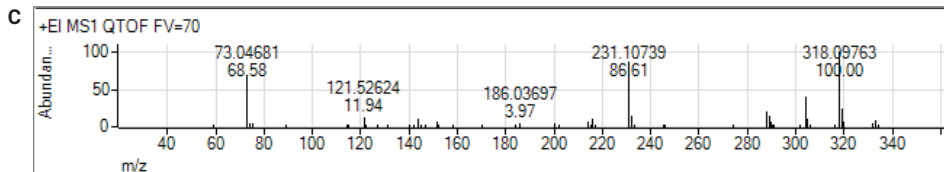
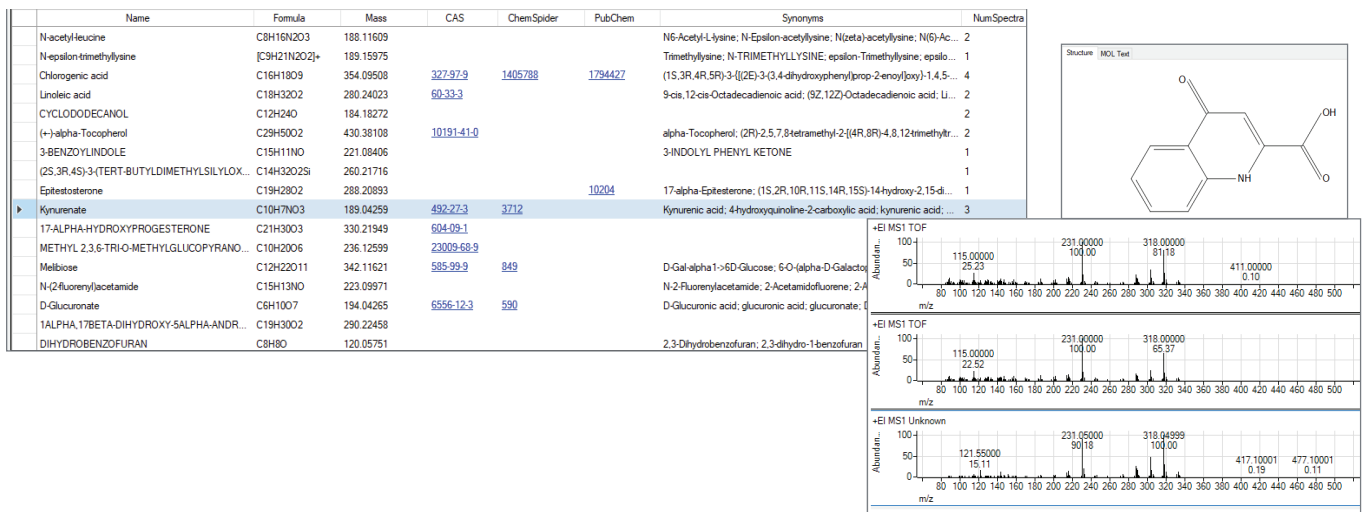


図 1. メタボロミクスワークフローへのサードパーティライブラリの追加 (A) MassBank.us からの GC/MS EI スペクトルとメタデータの抽出 (B) EI スペクトルが含まれている MassBank.us の Agilent ChemVista 出力 (C) Agilent 精密質量メタボロミクス PCDL からの同じ化合物 (キヌレン酸 2TMS) の GC/Q-TOF スペクトル

精密質量ライブラリとユニットマスライブラリを組み合わせた代謝プロファイリング

HF の病態生理学に關与している代謝物を同定するために、7250 GC/Q-TOF を使用して、HF 被験者および健康者のノンターゲット代謝血漿プロファイリングを実施しました。プロファイルデータに基づいて、複雑で高分解能の精密質量 EI データ用に特別に最適化された SureMass アルゴリズムを使用して、クロマトグラフィーデコンボリューションを実行することにより、高感度を実現し、デコンボリューションしたスペクトルのダイナミックレンジと質量精度を向上させました。

すべてのライブラリは、Unknowns Analysis メソッド内で同時に使用しており、最適な結果を得るために、ライブラリごとにライブラリ検索パラメータを個別に選択できます。

NIST のようなユニットマスライブラリを使用して検索する場合は、Unknowns Analysis の ExactMass ツールを使用することにより、取り込まれたデータの精密質量とライブラリヒットの分子式に基づいて、偽陽性の数を大幅に低減することができます。このツールは、デコンボ

リューションしたスペクトルのイオンに、ヒットの分子式のサブセットである式を割り当て、フラグメントイオンの質量誤差を計算します。図 2 に 2 つの例を示します。NIST ヒットの 1 つである 2,3,4-トリヒドロキシ酪酸 4TMS のライブラリー一致スコアは 91.8 で、分子式のサブセットに割り当てられたフラグメントイオンすべてで低い質量誤差を示し (図 2A)、精密質量情報を用いて ID を確認しました。しかし、ライブラリー一致スコアが 89.1 のもう 1 つのヒットであるメタクリルアミドでは、10 ppm の質量誤差以内で分子式と一致するイオンはありませんでした (図 2B)。このことから、ライブラリヒットが偽陽性であったことを示しており、精密質量 GC/MS がスペクトルヒットを精査するのに有利であることが明らかになりました。GC/Q-TOF スペクトルは、他の精密質量分析計のような過剰なフラグメンテーション特性を示さないため、GC シングル四重極スペクトルに基づいた NIST や他のライブラリとのスペクトルライブラリ照合に優れています。



図 2. Agilent MassHunter Unknowns Analysis の ExactMass 機能を使用したユニットマスのライブラリヒットの精密質量による確認 (A) デコンボリュートした化合物の精密質量スペクトルは、NIST ライブラリヒットの式と一致分子式のサブセットに 10 ppm 以内で一致する各イオンの質量誤差が ExactMass テーブルに示されており、ミラープロット内で化合物イオンが強調表示されています。(B) 矢印は、空の ExactMass テーブルに基づいて容易に認識できる偽陽性を指し示しています。

NIST23 とメタボロミクス PCDL はともに、ExactMass (NIST の場合) または Unknowns Analysis に組み込まれている精密質量許容機能 (精密質量 PCDL の場合) のいずれかを使用して、ブランク減算と偽陽性の除去を行った後、サンプルあたり 100 を超えるヒットを生成しました。MassBank.us でデータを検索した場合は、サンプルあたりのヒット数は平均で 100 をわずかに下回りました (表 2)。ライブラリー一致スコアのカットオフとして、NIST とメタボロミクス PCDL では 70 を使用し、MassBank.us では 75 を使用しました。後者の場合にライブラリー一致スコアのカットオフを高くした理由は、MassBank.us の大半の化合物にはリテンションインデックスが含まれておらず、その分子式には誘導体化が反映されていないことが多いため、偽陽性をフィルタリングすることがより困難になるためです。

表 2. ブランク減算および偽陽性の除去後に各ライブラリーで個別に検出されたヒット数最後の 2 列は、NIST またはメタボロミクス PCDL のいずれかのみで同定された重複しないヒット数

サンプル	ライブラリ				
	NIST23	PCDL	MoNA	NIST 独自	PCDL 独自
C1	140	130	95	52	43
C4	124	117	88	46	42
C5	126	115	85	46	37
D5	128	125	74	47	43
D6	138	126	92	55	42
D8	130	118	95	47	35

相当の割合の化合物が NIST または PCDL で一意的に同定されたことで (表 2)、メタボロミクス研究において複数のライブラリーを使用する利点があることが強く示唆されており、複数のソースからのスペクトルを統合できる ChemVista のようなソフトウェアの優位さが明らかになりました。

健常者と心不全患者の血漿代謝物を比較する差分解析

MPP ソフトウェアで統計解析を行い、HF 被験者と健常者間の差異を評価しました。主成分分析 (PCA) プロット (図 3) で確認できるように、HF 被験者と健常者の代謝プロファイルと比較すると、2 種類の HF の病態の被験者からのサンプルと対照 (健常者) とは完全に異なるクラスターを形成してグループ化されました。

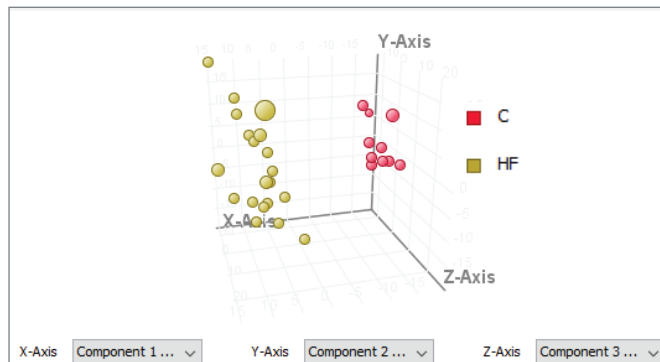


図 3. HF 患者 (HF) と健常者 (C) の血漿サンプルのクラスター間の明確な分離を示す PCA プロット

ボルケーノプロット (図 4) で視覚化した倍数変化解析を使用すると、健常者と比較して HF 被験者の代謝プロファイルに顕著な差異が観察されました。

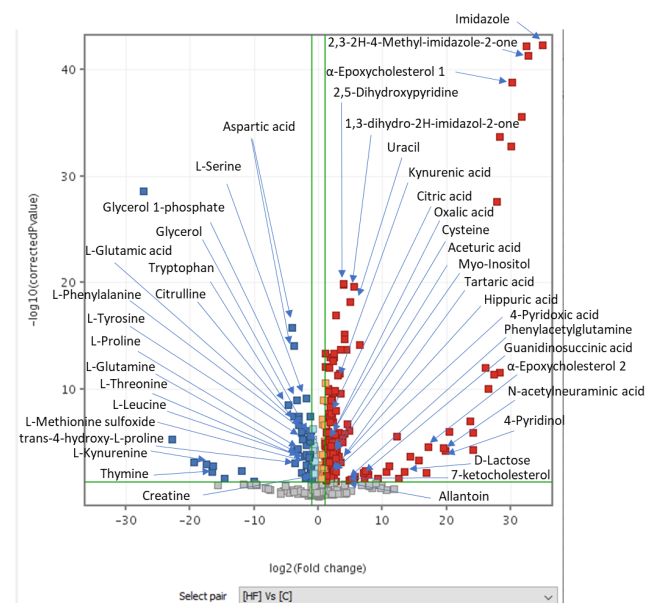


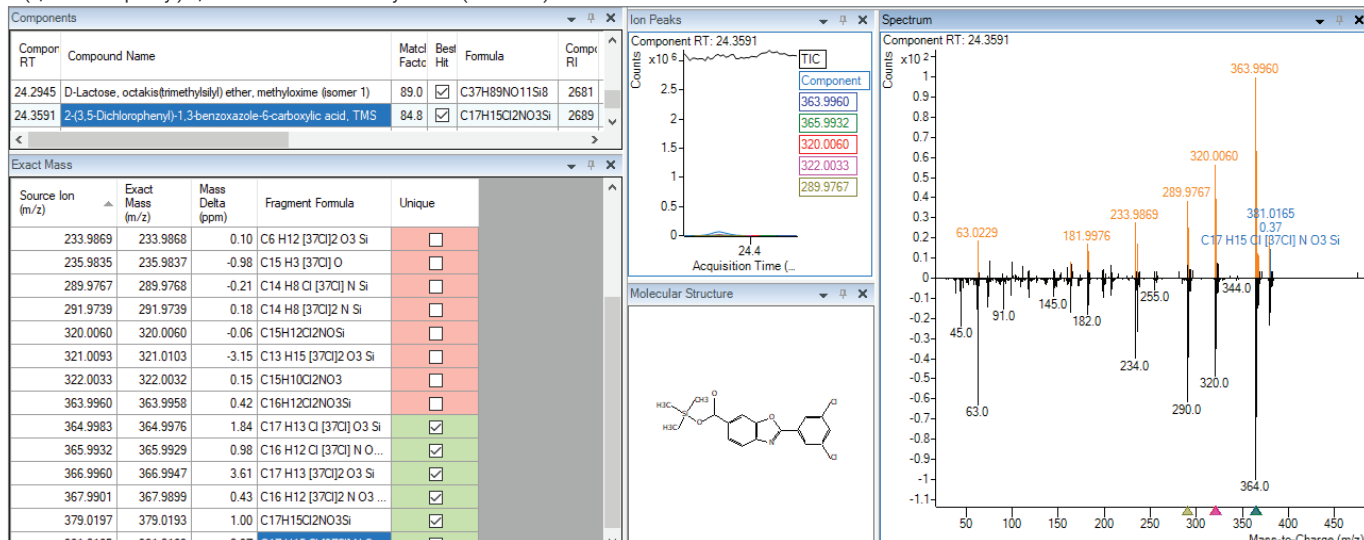
図 4. HF 被験者と健常者の倍率変化 (カットオフ 2) の対数と p 値 (カットオフ 0.05) の対数を示すボルケーノプロット

ここで注目すべき点は、対照検体で高濃度で同定された代謝物は、主にタンパク質構成アミノ酸であったのに対し、HF 被験者の血漿サンプル中で高濃度で同定された代謝物の中には、有機酸、ステロール、窒素含有化合物が含まれており、その一部はイミダゾール系薬剤の代謝物である可能性があったことです。

また、一部の HF 被験者の血漿中には、他の被験者では同定されなかった数種類の生体異物が同定されました。その2つの例を図5に示します。抗心筋症薬であるタマフィディスが D5 被験者の血漿中で同定され (図5A)、2-(4-クロロフェノキシ)酢酸 (除草剤) が D6 被験者の血漿中で検出されました (図5B)。

これらの例は、GC/Q-TOF システムと高度な精密質量ソフトウェアツールおよび複数のライブラリを組み合わせるノンターゲット分析の利点を示すもので、研究の範囲を拡大する機能を提供し、潜在的に関心のある対象化合物を時間効率よく高い信頼性で確実に同定できることを示しています。

A 2-(3,5-Dichlorophenyl)-1,3-benzoxazole-6-carboxylic acid (tafamidis)



B 2-(4-Chlorophenoxy)acetic acid

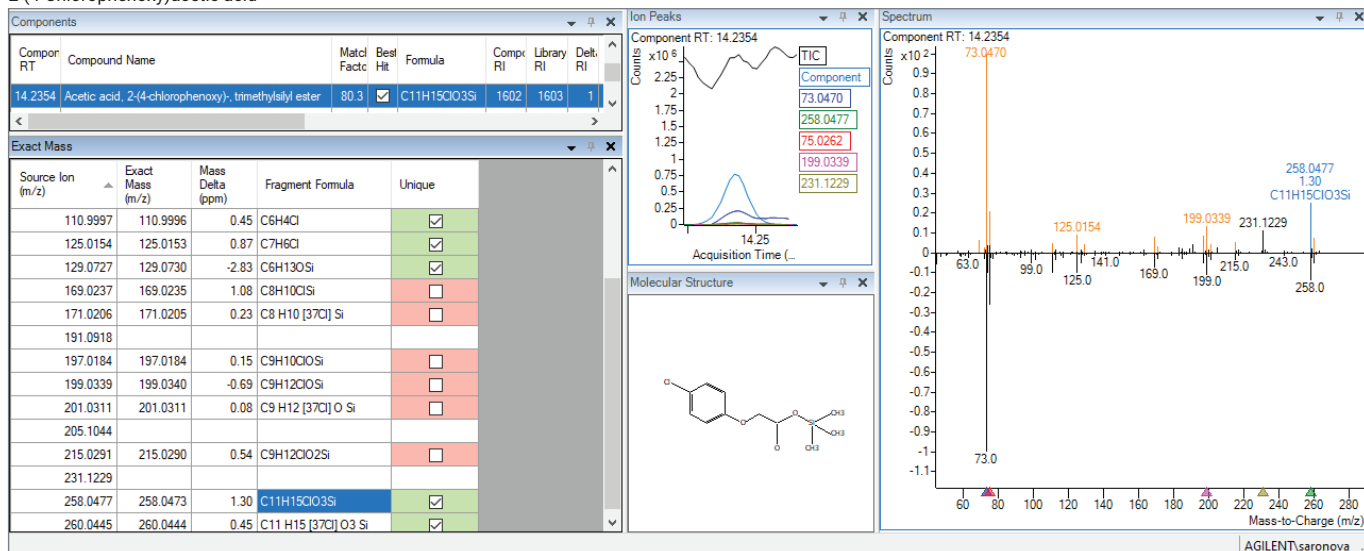


図5. 一部の HF 患者で同定された生体異物の例 (A) 2-(3,5-ジクロロフェニル)-1,3-ベンゾオキサゾール-6-カルボン酸 (タファミジス) (B) 2-(4-クロロフェノキシ)酢酸

未知代謝物の同定

同定ワークフローで複数のライブラリを使用したにもかかわらず、HF 群と健常者対照群との間で異なる濃度で存在するいくつかの化合物は未知のものでした。そのため、これらの化合物の構造解析を行うために、さまざまなツールや手法を使用しました。構造解析の最初のステップとして、健常者と比較して HF 患者の血漿中に高濃度で存在する未知代謝物の 1 つについて、分子イオンを同定するために、低電子エネルギーを

使用しました。この代謝物の 70 eV スペクトル、低エネルギー 15 eV、12 eV、10 eV で得られたスペクトルを図 6 に示します。スペクトル中の m/z イオンの 1 つである 344 の相対アバンダンスが徐々に増加していることが観察されており、70 eV と 10 eV の間で約 19% から 100% まで増加していました。この相対アバンダンスの変化は、 m/z 344 のイオンが分子イオンであることを示している可能性があります。

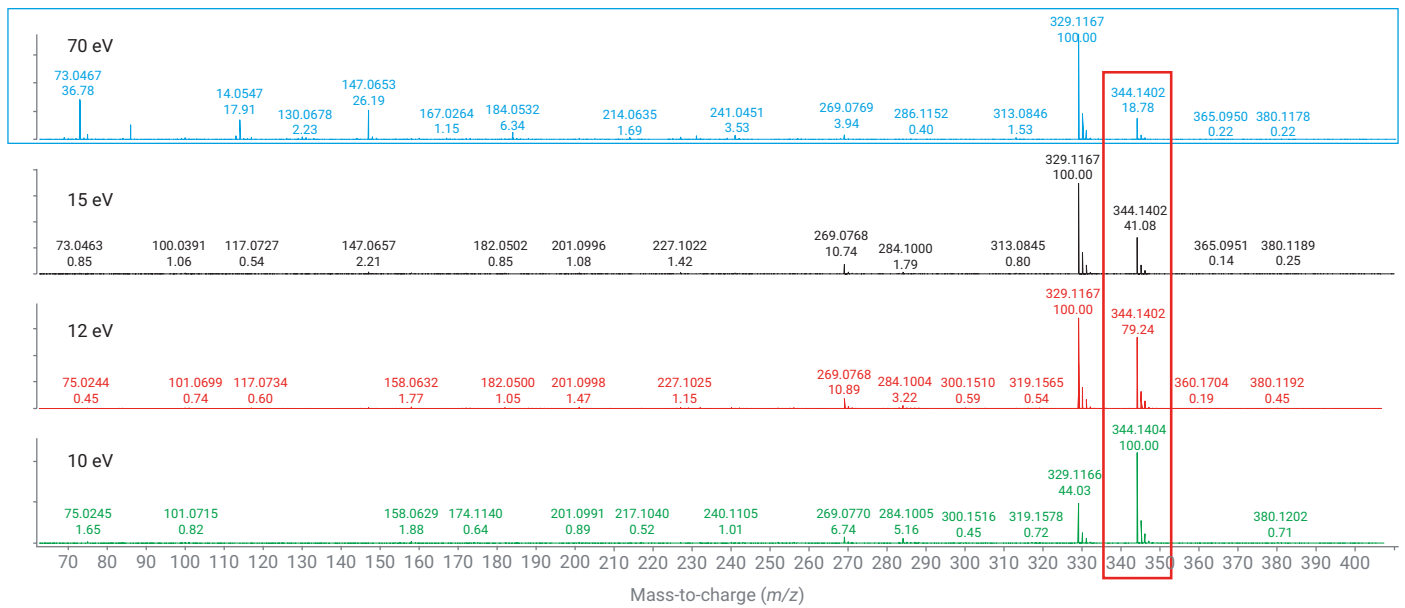


図 6. 低電子エネルギーによる分子イオンの同定

低エネルギーデータと一致し、試薬ガスとしてメタンを使用したポジティブ CI により、 $[M+H]^+$ および $[M+C_2H_5]^+$ 付加体の存在から、未知化合物の分子イオンであることを確認しました (図 7)。

未知化合物の分子イオンを確認した後、MSC ソフトウェアを使用して構造解析を行いました。このアプローチは、EI MS/MS データに基づいており、候補となる分子イオンをプリカーサとして使用し、精密質量 MS/MS フラグメンテーションパターンを、分子構造の情報源である ChemSpider などのスペクトルデータベースと照合します (図 8)。血漿

のような複雑なマトリクスを持つサンプルの MS/MS スペクトルは、クロマトグラフィーでは完全には分離されない可能性のある他のスペクトルが発生するノイズが大幅に低いため、フルスペクトル取り込み EI データよりも未知化合物の構造解析に有利であり、未知化合物の同定プロセスが容易になります。

MSC スコアと文献の参照数に基づいて上位に入った構造の 1 つは、ピリミジン-2,4,6-トリオール の TMS 誘導体化体でした。

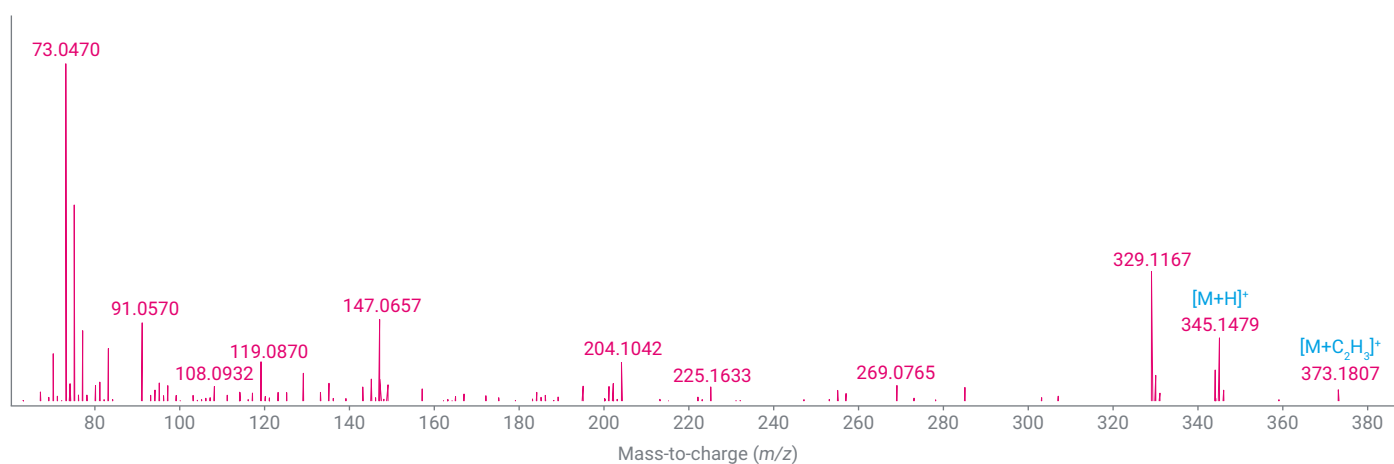
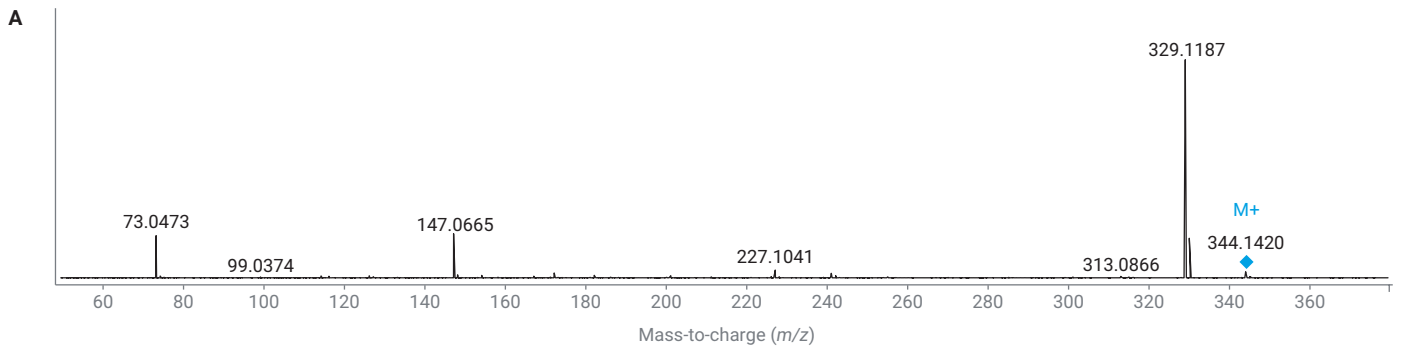


図 7. 低エネルギー分子イオンが確認された未知代謝物のポジティブ CI スペクトル



B

48 structures found for $rt=14.408:ce20$

Sort by # Reference: Show structures for

Structure #1 -- elucidated: 75.0% ions, 98.2% Weight Display Filter

	Mass	Intensity	Weight(%)	No. of candid.	Best score
▶ 1	329.1187	50455.72	78.7	2	90.7
2	147.0665	10204.34	3.2	4	42.2
3	73.0473	9762.28	0.7	1	98.6
4	330.1197	9215.45	14.5	2	55.4
5	227.1041	1790.00	1.3	0	0.0
6	172.0981	1129.09	0.5	0	0.0
7	241.0467	1073.97	0.9	2	95.0
8	148.0672	707.77	0.2	1	66.9

Penalty=1.0 dM=-5.9ppm F.D.S.=91.0 Of 9 Penalty=9.5 dM=-5.9ppm F.D.S.=91.0

C12H26N2O3Si3-H Score=90.7 C12H30N2O3Si3-5H Score=65.1

C13H28N2O3Si3; 461809

Scores MFG=90.6 MSC=

ChemSpider:

C13H28N2O3Si3; 481642

Scores MFG=90.6 MSC=

ChemSpider:

C13H28N2O3Si3; 481658

Scores MFG=90.6 MSC=

ChemSpider:

図 8. EI MS/MS データに基づいた Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator ソフトウェアでの未知化合物の構造解析 (A) 暫定的に同定された分子イオンをブライカーサとして使用した、未知化合物の EI MS/MS スペクトル (B) ChemSpider データベースを使用した MSC の結果。最も可能性のある候補の 1 つを示しています。

結論

このアプリケーションノートでは、HF の代謝シグネチャを理解する際の実際の効果を示しました。また、Agilent 7250 GC/Q-TOF を使用して、新しい Agilent 精密質量メタボロミクス PCDL や、Agilent ChemVista ソフトウェアで管理されるサードパーティライブラリなど、複数のライブラリによりメタボロミクス研究を実施するアプローチについて説明しました。今回の実験は、心不全 (HF) の病態の基となるメカニズムを理解するために実施した代謝プロファイリングに注目したのですが、他の多くの健康状態や疾病状態にも容易に応用できます。アミノ酸、有機酸、ステロールを含む 40 を超える代謝物が、HF 患者と健常者の差異の原因となる可能性があるものとして同定されました。この手法により、この分野の研究者は、疾患と疾患介入が代謝に及ぼす影響を理解するためのより良い手法を利用できるようになるため、将来の介入療法を合理的に設計できる可能性があります。

参考文献

1. Funk, M. Epidemiology of Heart Failure. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* **1993**, *5*(4), 569–73. PMID: 8297547.
2. Borlaug, B. A.; Paulus, W. J. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*(6), 670–679. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq426
3. Beale, D. J.; Pinu, F. R.; Kouremenos, K. A.; Poojary, M. M.; Narayana, V. K.; Boughton, B. A.; Kanojia, K.; Dayalan, S.; Jones, O. A. H.; Dias, D. A. Review of Recent Developments in GC-MS Approaches to Metabolomics-Based Research. *Metabolomics* **2018**, *14*(11), 152. DOI: 10.1007/s11306-018-1449-2
4. Grapp, M.; Maurer, H. H.; Desel, H. Systematic Forensic Toxicological Analysis by GC-MS in Serum Using Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System. *Drug Test. Anal.* **2016**, *8*(8), 816–825. DOI: 10.1002/dta.1848
5. Schauer, N.; Steinhauser, D.; Strelkov, S.; Schomburg, D.; Allison, G.; Moritz, T.; Lundgren, K.; Roessner-Tunali, U.; Forbes, M. G.; Willmitzer, L.; et al. GC-MS Libraries for the Rapid Identification of Metabolites in Complex Biological Samples. *FEBS Letters* **2005**, *579*(6), 1332–1337. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.029
6. Stein, S. Mass Spectral Reference Libraries: an Ever-Expanding Resource for Chemical Identification. *Anal. Chem.* **2012**, *84*(17), 7274–7282. DOI: 10.1021/ac301205z
7. Wohlgemuth, G.; Mehta, S. S.; Mejia, R. F.; Neumann, S.; Pedrosa, D.; Pluskal, T.; Schymanski, E. L.; Willighagen, E. L.; Wilson, M.; Wishart, D. S.; et al. SPLASH, a Hashed Identifier for Mass Spectra. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 1099–1101. <https://massbank.us/>
8. Valdiviez, L.; Wang, S.; Sandhu, W.; Ye, H.; Fiehn, O.; Nieto, S. Comprehensive Accurate Mass Metabolomics Library and Its Evaluation in Targeted and Nontargeted Data Analysis Workflows. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5832EN, **2023**.
9. Fiehn, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the Combination of Targeted and Untargeted Profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2016**, *114*, 30.4.1–30.4.32. DOI: 10.1002/0471142727.mb3004s114
10. Agilent GC/Q-TOF PCDL User Guide. *Agilent Technologies user guide*, publication number D0030675. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/D0030675%20GC-QTOF%20PCDL%20User%20Guide.pdf>
11. Agilent ChemVista Library Manager. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-5924EN, **2023**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45230.6108564815

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, November 15, 2023

5994-6858JAJP