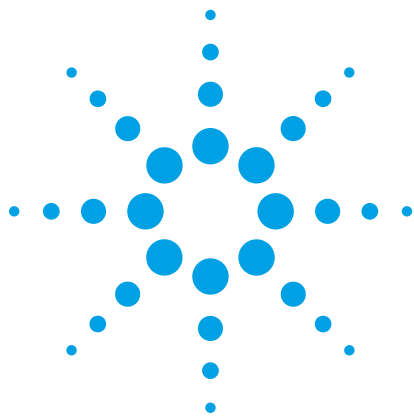




ターゲット・エクスポソミクス： 尿有機酸プロファイリング

アプリケーションノート

臨床化学、新オミックス技術

著者

Anthony Macherone, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
Visiting Scientist, Johns Hopkins
University School of Medicine

概要

エクスポソーム (個人の生涯にわたる総曝露量) の測定では、慢性疾患における因果経路 (曝露生物学) や反応経路 (システム生物学) の特定や区別をすることで、曝露反応の関連性 (生物学的疫学) に関する新たな知見を得ることができます。マーカー探索を目的とするオミックス研究とターゲット手法でのエクスポソーム測定を応用すれば、エクスポソミクスにより、新たな疾患バイオマーカーの特定や曝露を軽減する手法の開発が可能になり、より患者個人に応じた医療介入が実現します。ベンゼンやトルエンといった揮発性有機溶媒への曝露は、一次的および二次的疾患特性につながる曝露バイオマーカー (因果疾患経路) の一例で、そうした疾患特性は尿有機酸プロファイルの変動 (反応疾患経路) により明らかになります。このアプリケーションノートでは、GC/MS とターゲットライブラリ検索によるクロマトグラフデコンボリューションを用いて、尿有機酸エクスポソームを測定するトップダウン型のターゲットアプローチを紹介します。



Agilent Technologies

はじめに

エクスポソーム

エクスポソームとは、個人の生涯における曝露の生体蓄積 (胎児期を含む) の総量を指し、外因的曝露 (食品、空気、水、電離放射、ライフスタイルの選択など) だけでなく、内因的曝露 (代謝プロセス、生体異物、腸内微生物叢の活性など) も含まれます。内因的生化学に関しては、自然に存在する化学物質でも、恒常性が維持されない場合には有害な影響を及ぼす可能性がある点に留意する必要があります。そのわかりやすい例が、メーブルシロップ尿症 (MSUD) です。この疾患では、タンパク質合成に関連する 3 つのアミノ酸が適切に代謝されないため、血流内で有害なレベルにまで蓄積します。米国の一般的な新生児が MSUD を発症するケースは稀ですが (18 万人に 1 人)、アーミッシュやメノナイトの集団では、その発症率は 1000 倍にのぼります。多くの州では、生後 24 時間以内に有機酸 (MSUD などの疾患のバイオマーカー) の臨床スクリーニングをおこなうことを義務づけています [1]。

エクスポソミクス

エクスポソミクスとは、オミックス手法 (クロマトグラフィー、質量分析、分光分析、バイオインフォマティクスなど) を応用して、エクスポソームの測定や、ゲノムや環境、発病などのデータとの関連性の特定をおこなう研究分野を指します。Stephen M. Rappaport [2] はそうした目的に適したものとして、環境 (空気、水など) をモニタリングして曝露の潜在的リスクを測定するボトムアップ型のアプローチではなく、血液、尿などの生体液や組織のバイオモニタリングによりエクスポソームを測定するトップダウン型のアプローチを推奨しています。

トップダウン型のターゲットエクスポソミクスの一例が、シングル四重極質量分析とデータ採取後の各種ツールを用いた尿有機酸のバイオモニタリングです。それらのツールとしては、質量スペクトルデコンボリューション、リテンションタイムロック質量スペクトルライブラリによる同定、統計解析などが用いられます。

有機酸尿

有機酸尿は、両親から 1 つずつ欠陥遺伝子を受け継いで生じる、典型的な常染色体劣性疾患です。子どもが両親から 2 つの欠陥遺伝子を受け継ぎ、疾患を発症する確率は、25 % です。固有の有機酸尿プロフィールを持つ代謝異常としては、60 種類以上が知られています。MSUD の場合、以下の尿バイオマーカーがあります: 2-オキシソカブロン酸、2-ヒドロキシソカブロン酸、2-ヒドロキシイソ吉草酸、2-オキシイソ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル吉草酸、2-オキシ-3-メチル吉草酸。

ほとんどの有機酸尿は遺伝子異常に直接関連していますが、外因性および医原性要因や腸内毒素症により引き起こされるケースも多く見られます。たとえば、キシレン異性体 (塗料用溶剤に一般的に使用) への曝露は、安息香酸メチルと馬尿酸メチルの増加につながります [3]。一般的な抗けいれん薬であるバルプロ酸の投与は、尿中の 3-ヒドロキシイソ吉草酸、5-ヒドロキシヘキサノ酸、7-ヒドロキシオクタン酸、p-ヒドロキシフェニルピルビン酸、ジカルボン酸の医原性増加につながることがあります [4]。腸内毒素症では、尿中のシトラマル酸、5-ヒドロキシ-メチル-フロン酸、酒石酸が増加します。これらの物質の増加は、それぞれ腸内のサッカロミセス、アスペルギルス、カンジダの過剰増殖により引き起こされます。腸内での酵母の過剰増殖により生じる酒石酸尿については、自閉症に似た症状が現れることが、少なくとも 1 件の双生児の兄弟の研究で報告されています [5]。こうした例からもわかるように、有機酸尿は内因性および外因性の両方の要因から生じます。要因や曝露量は時間とともに変化するため、ライフステージのさまざまな段階で得た試料を分析すれば、複合的なエクスポソームの測定が可能です [2]。そうしたことから、出生時に測定した基本となる尿有機酸レベルは、エクスポソームの 1 つのケモタイプとなります。これを生涯にわたってモニタリングすれば、比較分析や疾患の関連性の研究が可能になります。

尿有機酸エクスポソームの測定

Chen 氏らの論文では、シングル四重極 GC/MS を用いた尿有機酸 (UOA) 分析手法が紹介されています。この手法では、リテンションタイムロック (RTL)、Agilent デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS)、バックフラッシュキャピラリーフローテクノロジー (CFT) が用いられています [6]。2013 年に、Agilent MassHunter ソフトウェアプラットフォームで稼働する Agilent 7890B GC と Agilent 5977A シリーズ GC/MSD が発表されたことで、このメソッドを新たなシステムおよびソフトウェアプラットフォームに導入し、感度の向上と新システムの独自機能により改善することが可能になりました。Chen 氏のメソッドでは、30 m × 0.25 mm、0.25 μm Agilent HP-5MS カラムと Agilent QuickSwap CFT 装置を用いることで、分析後のバックフラッシュおよびベントなしでのカラム交換およびメンテナンスを可能にしています。

アジレントは現在、シリンジ、セプタム、ライナ、カラムなどのウルトライナー (UI) 消耗品群を提供しています。これにより、フローパス活性が生じる可能性を低減し、クロマトグラフィー性能を高めることが可能になります。ウルトライナー消耗品群は、現在ではイナートフローパス Agilent 7890B GC だけでなく、旧世代の n890 GC シリーズでも使用できます。また、この例のように、HP-5MS カラムに代わって HP-5MSUI カラムを使用することも可能です。自動 RTL などのおなじみのツールの導入も容易です。7890B は、高度な電子圧力制御とソフトウェアウィザード

により、CFT を分析メソッドに組み込めるように設計されています。これにより、適切に構成されたメソッドに、迅速にバックフラッシュを追加することができます。また、メソッド開発および変換を支援するニューマティックカリキュレーターも備えています。

アジレントは QuickSwap 装置を段階的に廃止しています。現在では、より柔軟性の高いパージド Ultimate ユニオン (圧力制御ティー (PCT) と呼ばれることもあります) を提供しています。QuickSwap 装置では分析後バックフラッシュしか設定できませんでしたが、PCT を使えば、ポストカラムバックフラッシュ以外の構成も可能になります。PCT は、プレ分析カラム、ミッドカラム、ポストカラムの各種構成で使用することができます。プレ分析カラム構成とミッドカラム構成については、同時バックフラッシュ条件 (同時バックフラッシュおよびデータ採取) を導入すれば、標準的な分析後バックフラッシュよりもサイクルタイムを短縮し、生産性を高めることが可能です。完全な不活性経路、エクストラクションイオン源、高性能ターボ分子ポンプ、トリプルアクシスディテクタを備えた 5977A シリーズ GC/MSD は、過去最高の感度と堅牢性を備えた質量分析計です。シグナル/ノイズ比仕様の改良により、検出下限が引き下げられています。MassHunter ソフトウェアプラットフォームで稼働する採取ソフ

トウェアでは、MSD Productivity ChemStation Acquisition と同じレイアウトと使用感が採用されているため、GC/MS メソッドの効率的な作成、更新、使用が可能です。また、MassHunter Data Analysis を使用することも、従来の MSD ChemStation Data Analysis を使用することもできます。MassHunter では、MassHunter Quantitative または Qualitative パッケージのいずれかで有機酸尿酸データ解析を管理することができます。内蔵のデコンボリューションアルゴリズムにより、ユーザーの作成したカスタム RTL スペクトルライブラリを検索することが可能です。従来の MSD ChemStation Data Analysis を使えば、同じ RTL スペクトルライブラリを用いた DRS の導入が可能です。いずれの場合でも、精密かつ堅牢な UOA の同定、定量、レポート作成が実現します。測定データを Agilent Mass Profiler または Mass Profiler Professional (MPP) にエクスポートすれば、標準化、アラインメント、統計解析、経路解析が可能です。MPP は、分散分析 (ANOVA)、主成分分析 (PCA)、クラスターリング、ボルケーノプロット、階層的クラスターリング、濃縮、クラス予測などの統計テクニックにより、各種サンプルに存在する UOA の種類や相対量、プロフィールにおける重要な違いの特定を円滑化します。図 1 に、7 つのヒトサンプルの PCA 分析と、定義された化学空間におけるケモタイプのクラスターリングを示しています。

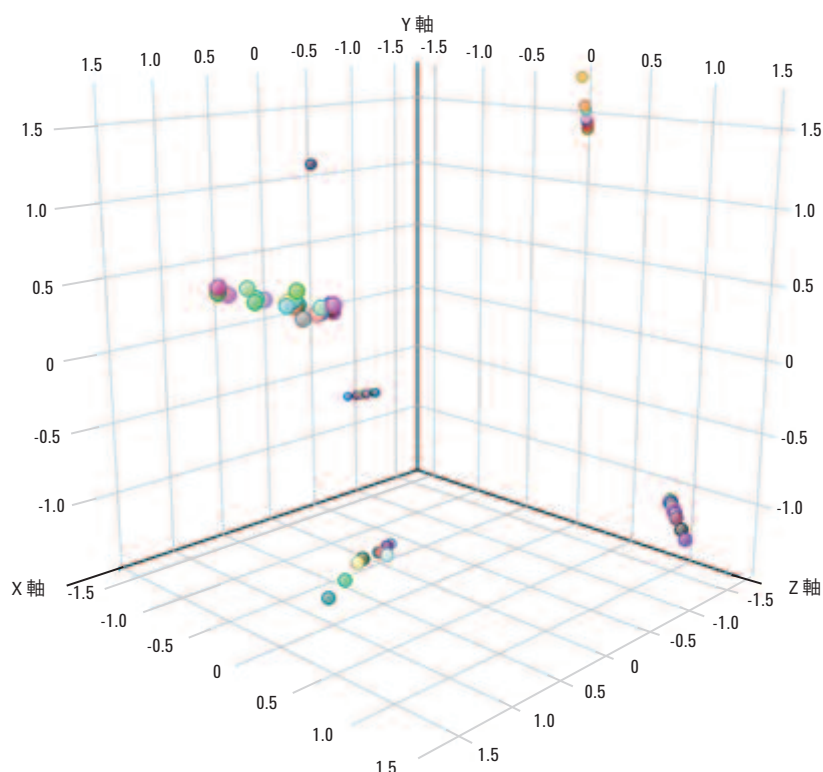


図 1. MPP を用いた PCA 分析

結論

ヒトの慢性疾患の 70~90 % は環境要因に起因し、固有の遺伝的変異性によるものではないと推定されています [7,8]。シングル四重極 GC/MS を用いた尿有機酸のプロファイリングでは、有機酸尿の同定および定量をおこない、あらゆるライフステージにおける UOA エクスプロームのプロフィールを構築することができます。出生時にベースラインデータを採取すれば、のちのデータと比較し、疾患の発症や進行をモニタリングすることが可能です。統計解析を用いて、個人曝露エクスプロームに関する大規模なコホート研究を評価および比較し、新たな UOA バイオマーカーを測定することもできます。UOA などの化学物質のエクスプロームのモニタリングは、ヒトの疾病率や死亡率に影響を与える疾患の研究において、リスク要因や新たなバイオマーカーの特定を円滑化します。このモデルは、疾患におけるゲノムと環境の関連性の研究にも役立ちます。

参考文献

1. Learn.Genetics.The University of Utah, Retrieved March 12, 2013 from, <http://learn.genetics.utah.edu/content/disorders/whataregd/msud/>
2. S.M.Rappaport, *J. Expo.Sci.Environ.Epidemiol.*(2011) **21**, 5–9
3. R.S.Lord and J. Alexander Bralley, *Alt.Med.Rev.* (2008) **13**, 205-215
4. A. Kumps, P. Duez, and Y. Mardens, *Clin.Chem.*(2002) **48**, 708–717
5. W. Shaw, E. Kassen and E. Chaves, *Clin.Chem.*(1995) **41**, 1094-1104
6. J. Chen, C-K. Meng, S.B.Narayan, *et al.*, *Clin.Chim.Acta*, (2009) **405**, 53-59
7. P. Lichtenstein, N.V.Holm, P.K.Verkasalo, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*(2000) **343**, 78–85.
8. T.A.Manolio, F.S.Collins, N.J.Cox, *et al.*, *Nature* (2009) **461**, 747–753.

詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

November 22, 2013

5991-3541JAJP



Agilent Technologies