

論文の内容の要旨

論文題目 HPLC-タンデムマススペクトロメトリーによるリン脂質膜フリーラジカル酸化
反応由来のエイコサノイド産出に関する研究

氏名 中村 立二

1. 序論

プロスタグランジン、ロイコトリエン(leukotriene, LT)、hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)などエイコサノイドはリン脂質よりホスホリパーゼ A₂により遊離したアラキドン酸が酵素的に酸化されることによって生合成される一連の化合物で、リピッドメディエーターとして強力かつ多様な生理活性を有している。近年、生体内において生成されたフリーラジカルによってアラキドン酸がリン脂質にエステル結合した状態で酸化され、イソプロスタン(isoprostane)、イソロイコトリエン(isoleukotriene)と呼ばれるプロスタグランジンおよびロイコトリエンの異性体が生成されると言う報告がなされている。これらのリン脂質酸化物は脂質過酸化の指標となるだけでなく生理活性を有している点で非常に興味深い。

エレクトロスプレー・タンデムマススペクトロメトリー(ESI-MS/MS)はその選択性と感度の高さからエイコサノイドやリン脂質の測定に非常に有効な手段と考えられる。しかも ESI は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と連結する事によって、分離された試料を直接測定できる特長を有している。本研究ではこの方法を用い、いくつかの脂質過酸化のモデルシステム中におけるエイコサノイドの網羅的な測定を試みることによって、生理活性を有する他のエイコサノイドは存在するか、最も多量に産出される分子種は何か検討を行なった。

2. ヒト赤血球リン脂質膜の酸化による HETE および EET の生成

ヒト赤血球膜中にラジカル反応で産出したアラキドン酸の酸化物、HETE および epoxyeicosatrienoic acid(EET)を ESI-MS 法によって検出した。6 種の HETE および 4 種の EET 同位体は ESI によってすべてのカルボキシアニオン $[M-H]^-$: m/z 319 に相当する強度の強いピークを与えた。このピークの MS/MS スペクトルはすべての化合物に共通の脱水イオンおよび脱水+脱二酸化炭素イオンの他、それぞれの位置同位体に特徴的なプロダクトイオンからなっていた。この特徴的なプロダクトイオンを選択的にモニターすれば (multiple reaction monitoring: MRM)、示すように特異性高くこれらの化合物の定量が行える事を意味している。本法を用いる事によって、フリーラジカルによって引き起こされる脂質過酸化反応によって HETE および EET を脂肪酸残基として含むリン脂質がヒト赤血球中において増加している事が判った。即ち、ヒト赤血球をフリーラジカル酸化反応のイニシエーターとして第三ブチルヒドロペルオキシド (*tert*-BuOOH) で処理後リン脂質を抽出、順相 HPLC にてホスホエタノールアミン(GPE)、ホスホコリン(GPC)および、ホスホセリン(GPS)にリン脂質のクラス別けを行った。それぞれのリン脂質クラスから遊離のアラキドン酸酸化物を得るために加水分解した後、サンプルを逆相 HPLC に on-line で接続した ESI-MS/MS で測定した。MRM 法により、HPLC だけでは分離できずしかも全て同じ質量の 10 種の HETE および EET を同時に測定する事が出来た(図)。

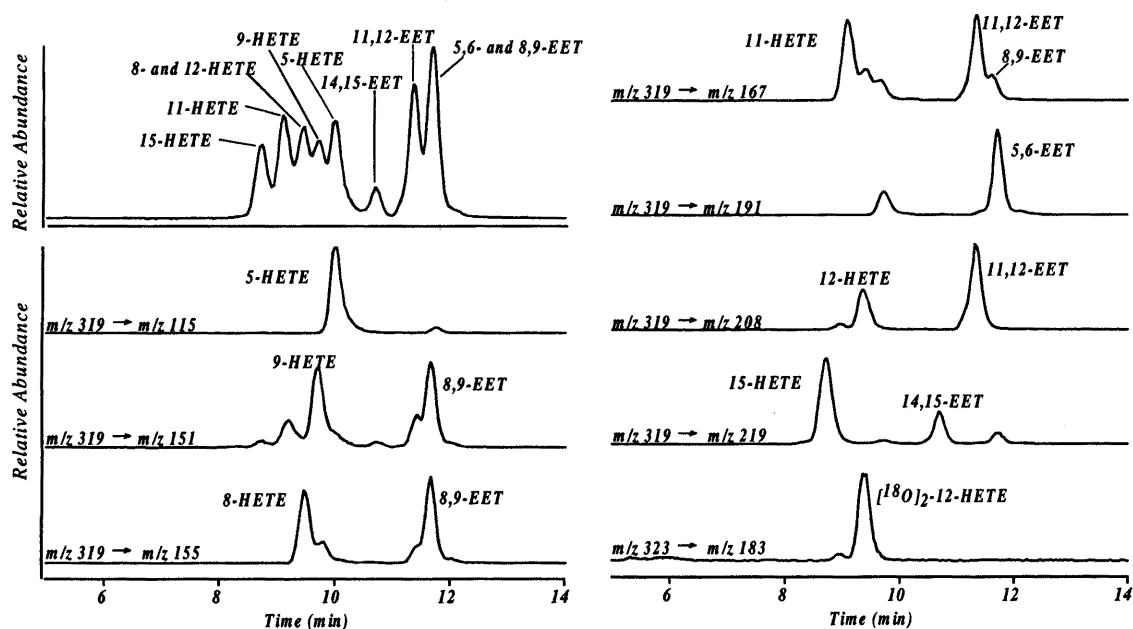


図) *tert*-BuOOH 処理したヒト赤血球リン脂質加水分解サンプルの逆相 HPLC-MS/MS クロマトグラム

特に EET は GPE、GPS および GPC の各クラスで未処理群と比べそれぞれ、49, 34, 59 倍もの存在量が認められた。本知見は非酵素的に EET が生成する事をはじめて示した例であり、その他の生理活性を有したエイコサノイドがフリーラジカル反応によって生成する可能性を示唆するものであった。

3. マウス肺組織内リン脂質のアラキドン酸酸化物の分析

肺は常に高濃度の酸素分子に暴露され、しかも多量のアラキドン酸を脂肪酸残基として有するリン脂質を含んでいるため、フリーラジカルによる過酸化を受けやすい臓器であると考えられる。そこでマウスに *tert*-BuOOH を気管内投与 (36 mg/kg) 後、肺を摘出し、脂質を抽出後、固相抽出カートリッジによって遊離脂肪酸分画とリン脂質分画に分離した。トリチウム標識体による回収率検討の結果、 $[^3\text{H}]\text{LTB}_4$ 、 $[^3\text{H}]\text{5-HETE}$ およびリン脂質の肺組織からの抽出率は良好であった。リン脂質と遊離の脂肪酸酸化物の分離には順相の固相抽出カートリッジが最適で、エーテル・酢酸混液中に遊離脂肪酸が、次のメタノール分画中リン脂質が回収された。遊離脂肪酸分画はそのまま、リン脂質分画は加水分解後、遊離脂肪酸として逆相 HPLC-MS/MS による定量分析したところ、*tert*-BuOOH 処置群においては、リン脂質フラクション内のすべての HETE 異性体の存在量が増加していた。最も存在量の大きなリン脂質由来 15-HETE を逆相 HPLC にて単離後、メチルエステルとして光学活性カラムにて光学分割し、必要な誘導体化後 GC-MS 分析したところ、*tert*-BuOOH 未処理群および処理群における R/S 比はそれぞれ 0.96 と 1.10 であった。この結果より、HETE がリン脂質フリーラジカル過酸化反応によって生成されたものである事が支持された。

4. ヒト頸動脈硬化におけるプラーク不安定性と HETE および F_2 -イソプロスタンの関係

これまでに酸化ストレスと動脈硬化との関連が報告されているが、そのストレスと動脈硬化巣の進展を関連付ける報告はない。そこで 30 人の頸動脈狭窄を起こしているボランティアのプラーク内のアラキドン酸酸化物の分析を試みた。ボランティアを 12 人の脳虚血発症群 (不安定プラーク) と 18 人の無症候群 (安定プラーク) に分け、頸動脈内膜切除術によって摘出したプラークから脂質分画を抽出し、加水分解後、酸化ストレスの指標となる 6 種の HETE、4 種の EET、3 種の *keto*eikosatetraenoic acids、 F_2 -イソプロスタンを HPLC-ESI-MS/MS によって測定した。対照群としては、正常の動脈組織を用いた。対照群ではこれらエイコサノイドのうち HETE のみが測定されたのに対してプラーク内では測定した全てのエイコサノイドが観察され、しかもこれらエイコサノイドのうち特に HETE の増加量が著しかった。また、表に示す如く興味深い事に不安定プラークと安定プラークではトータルの HETE の存在量が有意差のある値となり、これは他のエイコサノイドには見られないものであった。

ヒト動脈硬化巣における全 HETE 異性体および F_2 -イソプロスタノ量

	Asymptomatic plaques (<i>n</i> = 18) (pmol/ μmol lipid phosphorus)	Symptomatic plaques (<i>n</i> = 12) (pmol/ μmol lipid phosphorus)	
Total HETE	1002 \pm 107	1738 \pm 247	<i>P</i> < 0.01
Total F_2 -イソプロスタン	50 \pm 11	63 \pm 21	N.S.*

*Not Significant

HETEのうちもっとも生成量の多いものは、酵素的に生成しない9-HETEであった事から、これらHETEが非酵素的な脂質過酸化によって生成していると考えられた。以上の結果は、従来より動脈硬化の進行に強く関与している言われている脂質過酸化によって、プラークの不安定化、延いては脳内虚血疾患が惹起されているという事を示唆するものである。

5. 5-リポキシゲナーゼ非依存性のロイコトリエン生成

ロイコトリエンは気道、血管の平滑筋収縮、炎症、免疫反応に関する強力なメディエーターで、その生成には5-リポキシゲナーゼ(5-LO)が中心的な役割を演じている。即ちPLA₂によってリン脂質から遊離されたアラキドン酸は5-HPETE、引き続いてLTA₄へと変換されるが、5-LOはこの二つの酵素活性を有している。LTA₄はその後、酵素的に加水分解を受けLTB₄に、またはグルタチオンの付加を受けてLTC₄へと変換される。近年15-LOもまた5-HPETEをLTA₄へと変換させる活性を有している事が報告された。この事は即ち非酵素的な5-HPETEの生成経路があれば、5-LO非依存性のロイコトリエンの生成が見られる可能性を示唆している。そこで5-LOノックアウトマウスの腹膜マクロファージにZymosanを作用し、食作用を引き起こさせた後反応溶液中のエイコサノイドの測定を行なったところ、LTC₄由来のピークを確認できた。次にこのマクロファージと5-HPETEをインキュベートした後に反応液中のエイコサノイドを測定したところ、やはりLTC₄の生成が認められた。以上の結果は食作用によって生じたスーパーオキシドアニオンからフリーラジカル反応によって5-HPETEが生成し、15-LOおよびLTC₄合成酵素の作用によってLTC₄が生成した事を強く示唆している。

6. 結語

HPLC-ESI-MS/MSはリン脂質過酸化反応から生成された類似構造を有する多種のエイコサノイドの定性的、定量的な測定に非常に有効な手段であった。これまでの報告ではリン脂質膜フリーラジカル反応によって生成される生理活性化合物とはプロスタグランジンの異性体であるイソプロスタン類、またはロイコトリエン異性体の一つイソロイコトリエン類であるとされていた。しかしながら本研究によってここにHETEもまたその主たる生成物であると言う事を明らかにした。また、EETが非酵素的なフリーラジカル反応によっても生成している事を示すと共に、動脈硬化巣にフリーラジカル反応由来のエイコサノイドが蓄積し、特にHETEの蓄積量が不安定プラークにおいて増加している事を捉えた。更にロイコトリエンが5-リポキシゲナーゼ非依存的に生成している可能性を示唆する結果が得られた。以上の事から、炎症、動脈硬化など病変部においては、脂質過酸化反応によってHETEをはじめとする多種のエイコサノイド異性体が生成し、生理活性を示している可能性が示唆された。