

学位論文題名

変形性関節症病態評価のための
生体バイオマーカー濃度測定法の開発

学位論文内容の要旨

【序論】

変形性関節症 (OA) はII型コラーゲン代謝酵素である MMP-13 の異常亢進に主に起因する軟骨の変性・破壊を伴う慢性疾患である。しかし、OA の治療薬としては、鎮痛薬や抗炎症剤などの症状を緩和する薬剤が用いられているのが現状であり、軟骨破壊を抑制することで病変の進行を遅らせる MMP-13 阻害薬は治療に大きく貢献すると考えられている。OA のような慢性疾患では、病態が長期に渡って進行するために薬効評価に時間がかかり、開発時間が長期化してしまうという欠点があるが、新薬開発を迅速に実施するためには、効率的な薬効評価試験が必要になっている。近年、薬効の指標となる生体内バイオマーカーの研究が注目されているが、病態の肉眼的所見が発現する前に生体内バイオマーカーを定量的に分析し、モニターすることができれば、OA のような慢性疾患の新薬開発において、効率化や期間の短縮が可能となることから非常に有用であると考えられる。

MMP-13 の異常亢進により破壊された関節軟骨中の II 型コラーゲンは比較的大きなペプチド断片を経て、コラーゲン特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリン (Hyp) やそれを含む小さなペプチド断片にまで分解され、尿中に排泄される。尿中や関節液中の Hyp、尿中ネオエピトープは、MMP-13 活性に相関して増減することが知られており、OA の病態評価や治療薬の薬効評価に貢献することが期待されている。本研究の目的は、ラットにおける OA の病態を正確に評価することにより治療薬の薬効を効率的に評価し、これらコラーゲン代謝異常に起因する病態マーカー候補の生体試料中濃度測定法を開発することである。

【結果と考察】

1. ルテニウム錯体化学発光-HPLC 法によるラット尿中 Hyp 定量法の開発

OA 薬効評価モデル動物であるラットにおける尿中 Hyp 濃度測定法を構築した。Hyp は蛍光誘導体化する分析手法が一般的であったが、誘導体化処理が煩雑であるという欠点があった。そこで、誘導体化を必要とせず、2級または3級アミンを選択的に検出することが可能であるルテニウム錯体化学発光-HPLC 法を検討した。本法は Ru (II) をオンラインで Ru (III) に電解酸化させ、励起錯体と Hyp が反応し、励起錯体が基底状態に戻る際に発生する 620 nm の発光を検出する分析法である。Hyp は逆相クロマトグラフィーにおいて保持が弱く、生体成分由来のプロリン等との分離が困難であるため、移動相条件として、イオンペア試薬である 1-オクタンスルホン酸と銅イオンの混合移動相を用いた。また、生体成分由来の妨害ピークとの分離を達成するために、カラ

ムスイッチング法を採用し、二段階で Hyp を分離した。Hyp は尿中でフリー体若しくはペプチド断片として存在しているため、塩酸でフリー体に加水分解した尿をサンプルとして用いた。前処理法は、加水分解のために強酸性にした尿試料を中和し、フィルターろ過するという簡便な方法である。定量限界濃度は 30 nmol/mL、分析時間は 25 分であった。また、本法により OA 病態モデルラット尿サンプル中の Hyp が定量可能であり、ラットの OA 病態評価に適用可能であった。

2. 親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるラット尿中 Hyp 定量法の開発

バイオマーカー評価においては、より疾患部位に近い生体試料中濃度をモニターすることで精度の高い薬効評価予測が可能になると考えられるため、OA における関節内での Hyp 濃度を把握するために、ラット関節洗浄液中 Hyp 濃度測定法を開発した。関節洗浄液中に含まれる Hyp は尿中濃度と比較して微量であり、より高感度な分析法の構築が必要である。そこで、LC/MS/MS による検討を試みた。クロマトグラフィー条件は、ESI のイオン化効率と HPLC 分離における保持を増大させるために、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を用いた。Hyp の保持及び感度は、移動相の有機溶媒濃度が上がるにつれ指数関数的に上昇した。定量条件を最適化することにより、化学発光法と比較して感度が約 15 倍向上し、分析時間を 1/3 以下に短縮し選択性の高い測定が可能であった。本法の定量性は良好であり、薬効評価に適用可能であった。

3. Online immunoaffinity LC/MS/MS 法によるラット尿中 3 種ネオエピトープ迅速定量法の開発

MMP-13 によって切断されたネオエピトープはヒトやイヌにおいては 21~47 mer の比較的大きな断片が主である。一方で、OA のモデル動物として汎用されているラットにおいては、短断片化した 14 mer が主であると報告されているが、さらに短断片化した 9 mer, 8 mer も存在していることが明らかされた。ネオエピトープの測定方法として、ELISA が知られているが、抗体認識能や特異性や感度の面で適用が不可能であった。そこで、LC/MS/MS を用いたラット尿中 14 mer, 9 mer, 8 mer の迅速・高感度同時定量法の開発を試みた。

3 種ネオエピトープは逆相カラムへの保持が弱く、通常用いられている前処理法では生体由来成分との分離が困難であるため、イオン化が妨害され検出することができない。そこで、ネオエピトープを認識する抗体を固定化させたカラムを用いて、尿サンプルを直接注入後、オンライン上で精製し、カラムスイッチングにより分析カラムで高速分離して質量分析装置で検出する測定系を構築した。前処理は尿サンプルに内標準溶液を添加するだけという極めて簡便な方法である。抗体カラムへのネオエピトープの保持・洗浄には 50 mM 酢酸アンモニウム、抗体カラムからの溶出には 0.1%ギ酸水溶液を用いることでほぼ 100%抗体カラムから回収されることを確認した。抗体カラム溶出後の分離は、カラム温度を高温に設定する高温クロマトグラフィーを適用した。カラム温度を高温に設定することで、移動相の粘度が低下し、カラム圧が低下するために、限られた装置耐圧の範囲内で使用できるカラムや流速の選択肢が拡大する。また、流速を上げて理論段数の低下が少なくなるため、分離を維持したまま分析時間を短縮することが可能である。カラム温度を 70°C に設定することで、40°C の場合と比べてカラム圧が約 35%低下し、逆相分離の分析時間を約半分に短縮することが可能であった。分析カラムのサイズには 1.5 × 50 mm、粒子径 2.7 μm を採用した。内径が 1.5 mm のカラムは一般的に用いられている 2.1 mm に比べ、半分の流速で同等の線流速が得られ、カラムへの濃縮効果や ESI のイオン化効率の上昇により、約 2 倍の感度向上が可能であった。測定時間は一サンプルあたり 3.9 分であり、迅速な分析が可能であった。開発した分析法について、検量線の直線性、真度及び精度は良好であった。本法を用いて 4~29 週齢のラット尿を測定したところ、加齢に応じたネオエピトープ濃度の減衰を確認でき、病態評

価モデルとして用いる高週齡ラット尿における微量なネオエピトープ量を定量可能であった。

以上、3法のOAバイオマーカー測定法の開発により、ラットにおけるOAの病態評価、薬効評価が可能になった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	三浦	敏明
副査	教授	菅原	満
副査	准教授	武隈	洋

学位論文題名

変形性関節症病態評価のための 生体バイオマーカー濃度測定法の開発

変形性関節症 (OA) は主に II 型コラーゲン代謝酵素である MMP-13 の異常亢進に起因する軟骨の変性・破壊を伴う慢性疾患である。現在, OA の治療には対処療法薬が用いられているが, 軟骨破壊を抑制し病変の進行を遅らせる MMP-13 阻害薬は治療に大きく貢献すると考えられている。OA のような慢性疾患では, 病態が長期に渡って進行するために薬効評価に時間がかかるが, 新薬開発を迅速に実施するには, 効率的な薬効評価試験が必要となる。近年, 薬効の指標となるバイオマーカーが注目されている。病態の肉眼的所見が発現する前にバイオマーカーの定量的分析とモニターができれば, OA のような慢性疾患の新薬開発で効率化や期間の短縮が可能となる。

本研究の目的は, モデル動物ラット OA の病態を正確に評価し, 治療薬の薬効評価に繋げるために, コラーゲン代謝異常に起因する病態マーカー候補の生体試料中濃度測定法を開発することである。

1. ルテニウム錯体化学発光-HPLC 法によるラット尿中 Hyp 定量法の開発

ラット尿中のヒドロキシプロリン (Hyp) 濃度測定法を開発した。従来は蛍光誘導体化が一般的であったが煩雑さが欠点であった。そこで, 誘導体化を必要としないルテニウム錯体化学発光-HPLC 法を検討した。本法は Ru (II) をオンラインで Ru (III) に電解酸化し, 励起錯体と反応させ, 発生する 620nm の発光を検出する方法である。Hyp は逆相クロマトグラフィーの保持が弱く, 生体成分由来のプロリン等との分離が困難であるため, 1-オクタンスルホン酸と銅イオンの混合移動相を用いた。また, 生体成分由来の妨害ピークとの分離を達成するためにカラムスイッチング法を採用し, 二段階で Hyp を分離した。ラット尿を塩酸で加水分解した後, 中和, フィルターろ過して分析した。定量限界濃度は 30 nmol/mL, 分析時間は 25 分であった。また, 本法により OA 病態モデルラット尿サンプル中の Hyp が定量可能であり, ラットの OA 病態評価に適用可能であった。

2. 親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるラット尿中 Hyp 定量法の開発

バイオマーカー評価は、疾患部位に近い生体試料中濃度をモニターすることで精度の高い薬効評価予測が可能になる。そこで、OA 関節内での Hyp 濃度を把握するために、ラット関節洗浄液中の Hyp 濃度測定法を開発した。関節洗浄液中に含まれる Hyp は尿中濃度と比較して微量であり、より高感度な分析法が必要である。そこで、LC/MS/MS により検討した。クロマトグラフィー条件は、ESI のイオン化効率と HPLC 分離における保持を増大させるために、親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた。Hyp の保持及び感度は、移動相の有機溶媒濃度が上がるにつれ上昇した。定量条件の最適化により、化学発光法より感度が約 15 倍向上し、分析時間を 1/3 以下に短縮でき、薬効評価に適用可能であった。

3. Online immunoaffinity LC/MS/MS 法によるラット尿中 3 種ネオエピトープ迅速定量法の開発

MMP-13 によって切断されるネオエピトープはラットでは断片化した 8-9 mer および 14 mer である。その測定法として、LC/MS/MS を用いる迅速・高感度同時定量法を開発した。

8-9 mer, 14 mer は逆相カラムへの保持が弱く、通常の前処理法では生体由来成分との分離が困難であった。そこで、ネオエピトープ抗体カラムに尿サンプルを直接注入後、オンライン上で精製し、カラムスイッチングにより分析カラムで高速分離して質量分析装置で検出する測定系を構築した。前処理は尿サンプルに内標準溶液を添加し、抗体カラムの保持・洗浄には 50 mM 酢酸アンモニウム、溶出には 0.1%ギ酸水溶液で定量的に抗体カラムから回収できた。溶出後の分離は、高温クロマトグラフィー (70°C) を使用することで分離時間を約半分に短縮した。本法を用いて 4~29 週齢のラット尿を測定した。加齢に応じたネオエピトープ濃度の減衰を確認でき、病態評価モデルとして用いる高週齢ラット尿における微量なネオエピトープ量も定量可能であった。

以上、3 法の OA バイオマーカー測定法の開発により、ラット OA の病態評価、薬効評価が可能になった。

論文発表に続いて発表内容とその関連の専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、池原達矢氏を博士 (生命科学) の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。