

予備審査の学位論文の要旨
(又は、学位論文の要旨)

No.....

論文題名	
安定同位体基質と LC-MS を用いたキサンチン酸化還元酵素活性測定法の研究	
氏名 村瀬 貴代	〔学籍番号若しくは 所属機関名 株式会社 三和化学研究所〕
主論文	
1. Murase T , Nampei M, Oka M, et al. Xanthine oxidoreductase activity assay in tissues using stable isotope-labeled substrate and liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. <i>J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.</i> 2016;1008:189-197.	
2. Murase T , Oka M, Nampei M, Miyachi A, Nakamura T. A highly sensitive assay for xanthine oxidoreductase activity using a combination of [¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂]xanthine and liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. <i>J Label Compd Radiopharm.</i> 2016;59(5):214-220.	
3. Murase T , Nampei M, Oka M, Miyachi A, Nakamura T. A highly sensitive assay of human plasma xanthine oxidoreductase activity using stable isotope-labeled xanthine and LC/TQMS. <i>J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.</i> 2016;1039:51-58.	

要 旨

第1章 はじめに：SIL 基質と質量分析計を用いた XOR 活性測定法開発の背景

キサンチン酸化還元酵素(Xanthine oxidoreductase; XOR)は、ヒポキサンチン(HX)、キサンチン(Xan)を尿酸(UA)へと代謝する酵素である。ヒトにおいては UA がプリン体の最終代謝産物であり、痛風の原因物質であることから、XOR は痛風治療のターゲットである。XOR には、キサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)とキサンチンオキシダーゼ(XO)という 2 つの型が存在する¹⁻⁴が、反応過程で酸素を消費してスーパーオキシドアニオンや過酸化水素を発生する XO は、生体内での活性酸素(Reactive oxygen species, ROS)発生源のひとつと考えられており、XOR は近年、痛風以外にもメタボリックシンドロームや循環器疾患などさまざまな病態との関連が注目されている。これらの疾患と XOR 酵素の関連を研究する上においては XOR 活性を高精度・高感度に測定することは極めて重要であり、これまで多くの活性測定法が報告されている。主には、比色法、吸光度(UV)法、モノメーター法、蛍光(fluorometry; FL)法、放射性同位体法に分類され、それぞれに課題も存在する。そこで、本研究では複雑な混合物である生体由来試料中の XOR 活性を高感度・高精度に測定するための新しいアプローチを考案し、XOR の内在性基質である Xan と質量数以外の性質が等しい安定同位体ラベル(Stable isotope labeled; SIL)-Xan を基質として、XOR により生成する SIL-UA を質量分析計(Mass spectrometry; MS)で測定する新規 XOR 測定法を確立した。第 2 章では、実験動物として汎用されるマウスの組織を用いて、高分解能(High resolution; HR)MS の特性を生かした XOR 活性測定法確立について述べる。第 3 章では、SIL-Xan と三連四重極(Triple quadrupole)MS を用いた XOR 活性測定の高感度化、第 4 章では、ヒト血漿 XOR 活性への応用、第 5 章では高感度 XOR 活性測定法に関する考察と今後の展望について述べる。

第2章 LC-HRMS を用いた動物由来試料 XOR 活性測定法開発

XOR 酵素は生体内であらゆる組織に遍在していることが知られている⁵。動物実験では、ヒトでは採取困難な臓器の XOR 活性を測定できることから、XOR と病態の関連を研究する上で極めて重要であるが、多種多様な臓器・組織由来の試料を測定するため、試料中に含まれる夾雑物も多岐にわたることが想定される。そこで著者は、動物の XOR 活性を測定する際に使用する質量分析計の種類を検討し、HRMS の特性に注目した。HRMS は質量分解能が数万以上、質量精度が数 ppm 以内と、高分解能、高質量精度での測定が可能な MS である。HRMS は、設定した質量範囲のイオンすべてを Full Scan モードで測定した後、精密質量を元にピーク抽出することで、測定対象それぞれに対するメソッドを組むことなく多成分分析が可能となる。XOR 活性測定では内在性の HX、Xan、UA などが酵素反応に

影響を与える可能性があり、また、測定対象物質である SIL-UA が検出される分子量 200 以下の領域には未知の夾雑物が数多く検出され、測定対象物質の検出を妨害することが想定されることから、HX 等のモニターと、低分子夾雑物との分離を目的として、HRMS と液体クロマトグラフィー(Liquid chromatography; LC)を組み合わせた LC-HRMS を用いることとした。

基質として使用する SIL-Xan は、市販で容易に入手可能な $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を選択し、測定対象物質は $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ とした。条件検討のモデル試料として、マウスの肝臓、腎臓サイトゾルおよび血漿の 3 種類を用いて、酵素量、基質量、反応時間を検討し、最適な条件を設定した。確立した方法を用いて、従来法として最も一般的な LC-UV 法(基質: Xan)と、高感度測定法として近年多くの報告がある LC-蛍光検出(FL)法(基質: プテリン)と比較した。LC-HRMS 法で測定した結果、XOR 活性は肝が最も高く、次いで腎、血漿であった。その比率は、血漿: 腎: 肝 = 1 : 4.1 : 24.4 であった。同一の肝・腎・血漿試料を 5 本ずつ調製し測定を行ったときのばらつきを示す変動係数(Coefficient of Variation, CV)はそれぞれ 2.7%、3.1%、1.8%であり、再現性は良好であった。同じ検体を LC-UV 法で測定した結果、活性値および肝・腎・血漿の活性値比率は LC-HRMS 法とほぼ同等の値であった。一方、LC-FL 法で測定した結果、活性値は LC-HRMS 法、LC-UV 法よりも低くなった。肝・腎・血漿の活性値比率はほぼ同等であった。次に、マウス 10 個体の肝・腎・血漿を LC-HRMS 法と LC-FL 法で測定し、相関係数を求めた。LC-FL 法で測定した活性値は LC-HRMS 法に比べて低いものの、10 個体の結果の相関係数(r)は肝・腎・血漿それぞれ 0.9 以上と良好な相関関係を示した。

高感度な XOR 活性測定法として開発された LC-FL 法(基質: プテリン)であるが、基質として用いるプテリンはキサントシンに比べて XOR に対する反応性が低いことが報告されている⁶。一方、 $[^{15}\text{N}_2]$ キサントシンは分子量以外の化学的性質はキサントシンと同じであるため、XOR 酵素に対する反応性も同等と推定される。実際、本研究において LC-HRMS 法で測定した肝・腎・血漿中の XOR 活性値と LC-UV 法で測定した値はほぼ同等であった。このことは、 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ の酸化反応速度と、Xan の酸化反応速度が同程度であったことを示唆している。一方、LC-FL 法で測定した XOR 活性は 1/8 程度の低い値であり、プテリンの酸化反応速度が低いことを示唆していた。

本方法の最大の利点として挙げられるのは、生体試料中にはもともと含まれる UA の BG 値の差し引きを必要としないことである。BG 値差し引きは反応前後の試料をそれぞれ測定する必要があり、また BG 差し引きは測定精度に悪影響を与える可能性があった。 $[^{15}\text{N}_2]\text{Xan}$ を基質とする方法では、測定対象は生体試料にはほとんど含まれていない $[^{15}\text{N}_2]\text{UA}$ であるため、BG 値の差し引きを必要とせず、従来法よりも精度よく測定することが可能となる。

また、反応前のコントロールサンプルを測定する必要がないため、前処理や測定も半分で済み効率が良い。以上のように、測定感度、測定精度、スループット性、いずれの点においても LC-HRMS 法のほうが LC-UV 法よりも優れていることが示された。

LC-MS 法と従来法である LC-UV 法および LC-FL 法の特徴を以下の表にまとめた。

表 三種の XOR 活性測定法の比較

	LC-HRMS 法	LC-UV 法	LC-FL 法
基質	[¹⁵ N ₂]Xan	Xan	プテリン
測定対象	[¹⁵ N ₂]UA	UA	IXP
検出	精密質量 m/z 171.02969	UV 290 nm	蛍光 (ex 345/em 410 nm)
夾雑物の影響	影響なし	影響あり	影響なし
BG 値差引	必要なし	必要あり	必要なし
検出感度	○	△	◎
酵素との親和性	キサンチンと同等	-	キサンチンより低い
多成分分析	◎	△	×

(第 2 章：主論文 1 で公表)

第3章 LC-TQMS と [¹³C₂, ¹⁵N₂]キサンチンを用いた XOR 活性測定高感度化

第 2 章にてマウスの XOR 活性測定法を確立したが、ヒト血漿 XOR 活性はげっ歯類に比べて数百倍以上低い⁷。また、動物においても、神経や腎臓の糸球体など 1 個体から極少量しか採取できない組織もあり、これらの検体を測定する上では、第 2 章で確立した LC-HRMS/[¹⁵N₂]Xan 法は、感度不足であることが課題であった。そこで第 3 章では、XOR 活性測定法の高感度化検討を実施した。検出感度を向上させるために、質量分析計を HRMS から定量に特化した TQMS に変更することとしたが、低分解能の TQMS と [¹⁵N₂]Xan を用いた方法では、測定対象である [¹⁵N₂]UA が内在性 UA に含まれる SIL-UA と重なり、検出を妨害することが明らかとなった。そこで、SIL 基質の種類も [¹⁵N₂]Xan からさらに同位体ラベルを 2 つ増やした [¹³C₂, ¹⁵N₂]Xan に変更することとなり、基質である [¹³C₂, ¹⁵N₂]Xan、測定対象である [¹³C₂, ¹⁵N₂]UA および内部標準物質である [¹³C₃, ¹⁵N₃]UA の合成を行った。反応工程の最適化により、高収率で目的の SIL 化合物を得た。これらの化合物を用いて XOR 活性測定の条件を設定し、低活性検体のモデル試料としてマウス血漿を段階希釈したものをを用いて XOR 活性を行い、マウス血漿を約 1000 倍希釈した試料で XOR 活性を検出することに成功した。

(第 3 章：主論文 2 で公表)

第4章 高感度 XOR 活性測定法の臨床検体への応用

第3章にて確立した高感度 XOR 活性測定法を用いて、臨床検体のヒト血漿 XOR 活性測定法を検討した。健常人から得たプール血漿を用いた検討により、基質量、血漿量、および反応時間について最適な条件を得た。この方法を用いて、プール血漿の XOR 活性を測定し、日内及び日間の再現性を評価したところ、日内及び日間の精度を表す CV 値はそれぞれ 6.5% (n = 6) と 9.1% (n = 6, 3 日間)と良好な再現性を示した。確立した LC-TQMS 法と、従来法である LC-FL 法を用いて 8 名の個別血漿の XOR 活性を測定し結果を比較したところ、良好な相関関係を示した ($r = 0.991$)。ただし、プテリンと SIL-Xan との XOR に対する反応性の違いにより、IXP 生成量は $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2]$ UA 生成量よりも 1/3~1/6 程度低かった。この結果から、著者が開発した LC-TQMS 法も従来の高感度測定法である LC-FL 法と同等の検出感度を有しながら、より生理的条件を反映した、ヒト血漿 XOR 活性測定に適切な方法であることが示された。最後に、20 名の健常人の血漿 XOR 活性を測定した。全被験者(20 名)、女性(6 名)、男性(14 名)の XOR 活性はそれぞれ 89.1 ± 55.1 , 63.9 ± 34.8 , 99.9 ± 59.6 (pmol/h/mL, 平均 \pm 標準偏差)であり、低いとされる健常人の血漿 XOR 活性をすべての検体で検出することができた。XOR 活性は ALT と強い相関 ($r = 0.8269$) を示し、AST とも中程度の相関 ($r = 0.4879$)を示した。この結果から、特に疾患を持たない健常人においては、血漿 XOR は主に肝臓に由来することが示唆された。

(第4章：主論文3で公表)

第5章 高感度 XOR 活性測定法に関する考察と今後の展望

本論文では、XOR 活性測定法に関するこれまでの課題を明らかにし、SIL 基質と LC-MS を用いた新しい XOR 活性測定法の考案と、反応条件や基質の種類、検出等さまざまな項目について最適な条件を明らかにした。その結果、マウスの組織および血漿 XOR 活性測定法と、高感度ヒト血漿 XOR 活性測定法を確立した。そして、低いとされる健常人 20 名の血漿 XOR 活性の全例検出に成功した。本 XOR 活性測定法は、SIL 基質と LC-MS を組み合わせた世界で最初の研究である。

本測定法の特徴は、

- ① BG 値差し引き不要で、高精度・高感度かつスループット性の良い測定法
- ② 活性に影響する内在性 HX、Xan、UA 等をモニターすることが可能
- ③ 内在性基質 Xan と性質が同じ SIL-Xan の利用により、生理的条件を反映した測定法
- ④ SIL-Xan は安全性が高く、取り扱いが容易

などが挙げられる。

従来法の課題を克服した本測定法は、今後ますます盛んになることが予想される XOR

研究に大いに寄与するものと期待している。すでに現在本測定法は多くの研究で採用され、動物試験及び臨床試験において年間 5000 検体のペースで測定が行われており、さまざまな疾患と XOR 活性との関連が明らかになりつつある⁸⁻¹⁴。しかし、XOR による酸化ストレスの亢進と XOR 活性上昇の関連は未だはっきりと明らかにはなっていない。これは、ひとつには生体試料を用いた酸化ストレス評価が難しいことが要因として挙げられる。また、本方法で測定しているのは XOR つまり XO と XDH を合わせたトータルの活性であるが、酸化ストレスには XO が関与しており、XO と XDH の厳密な測り分けにはいくつかの技術的な課題が残されている。さらに、生検や外科手術で得られたヒト組織の XOR 活性測定や、動物においてごく微量にしか得られない神経や腎系球体などの組織 XOR 活性を測定するためには、本測定法よりも高い検出感度が求められると予想される。測定のスループットを落とすことなくさらなる高感度化を達成すること、XO/XDH の分別活性評価、酸化ストレス評価との組み合わせによる病態の解明などが今後の重要な研究課題である。

文 献

1. Stirpe, F. & Della Corte, E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855–3863 (1969).
2. Della Corte, E. & Stirpe, F. The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett.* **2**, 83–84 (1968).
3. Amaya, Y. *et al.* Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by. *J. Biol. Chem.* **265**, 14170–14175 (1990).
4. Nishino, T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.* **116**, 1–6 (1994).
5. Tsushima, Y. *et al.* Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. *J. Biol. Chem.* **288**, 27138–49 (2013).
6. Beckman, J. S., Parks, D. A., Pearson, J. D., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. A sensitive

- fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 607–615 (1989).
7. Al-Khalidi, U. & Chaglassian, T. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.* **97**, 318–320 (1965).
 8. Kamijo-Ikemori, A. *et al.* Renoprotective effect of the xanthine oxidoreductase inhibitor topiroxostat on adenine-induced renal injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **310**, F1366-76 (2016).
 9. Nakamura, T. *et al.* Effects of topiroxostat and febuxostat on urinary albumin excretion and plasma xanthine oxidoreductase activity in db/db mice. *Eur. J. Pharmacol.* **780**, 224-231 (2016).
 10. Ohata, K. *et al.* Renoprotective effect of the xanthine oxidoreductase inhibitor Topiroxostat under decreased angiotensin II type 1 a receptor expression. *Eur. J. Pharmacol.* **815**, 88–97 (2017).
 11. Otaki, Y. *et al.* Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with severity and clinical outcome in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* **228**, 151–157 (2017).
 12. Fujimura, Y. *et al.* Relationship between plasma xanthine oxidoreductase activity and left ventricular ejection fraction and hypertrophy among cardiac patients. *PLoS One* **12**, e0182699 (2017).
 13. Washio, K. W. *et al.* Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metabolism.* **70**, 51–56 (2017).
 14. Nakatani, A. *et al.* Xanthine oxidoreductase activity is associated with serum uric acid and glycemic control in hemodialysis patients. *Sci. Rep.* **7**, 15416 (2017).