

Method Development of an LC-MS/MS Method to Determine Apolipoprotein E Isoforms in Human Serum

○ 星野 雅輝、新田 真一郎、若林 弘樹、上田 哲也 (株式会社 L S I メディエンス)

○ Masaki Hoshino, Shin-ichiro Nitta, Hiroki Wakabayashi, Tetsuya Ueda (LSI Medience Corporation)

目的

APOE 遺伝子の $\epsilon 4$ アレルはアルツハイマー病の危険因子とされている。既に遺伝子検査が一般的に行われているが、定量的な評価は難しい。今回、LC-MS/MSを用いて生体試料中でのタンパク質濃度としてのアポリポプロテイン E (ApoE) の主要な3アイソフォーム (ApoE2, ApoE3, ApoE4) の分離定量が可能な分析法の構築を目的として検討を行った。質量分析計としては高分解能精密質量 (HRAM) 分析が可能な Q Exactive Focus を使用し、定量と定性を兼ね備えた分析法を構築することとした。汎用試薬を使用し、多量のサンプル測定でも効率的に測定できる分析時間とするなど、頑健な分析法を構築するための条件を検討した。

分析法検討

【分析対象ペプチドおよび代替マトリックス選定】

既報¹⁾をもとに主要アレル箇所を含む4ペプチド断片と各アイソフォームに共通の1ペプチド断片を測定する手法とした。

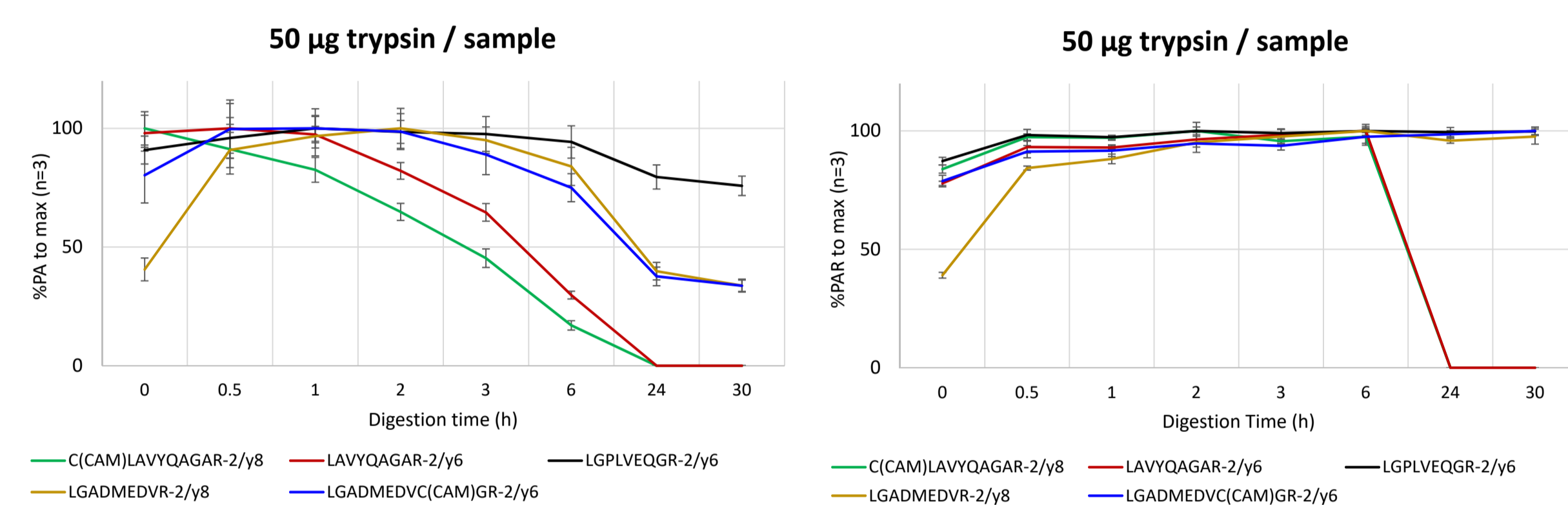
また、リコンビナントタンパク質を標準物質として検量線を作成するために代替マトリックスを *In silico* ベースで検討し、イヌの血清を検量線作成用の代替マトリックスに選定した。

定量用の標準物質としては ApoE2 及び ApoE4 のリコンビナントタンパク質を使用し、内標準物質としては各ペプチド断片の安定同位体標識体を使用した。

Dog_ApoE	···RLRADMEDVNRRL···RRLAVYKAGVRE···RLWPLLEQARE···
Rat_ApoE	···RLGADMEDLRNRL···KRLAVYKAGAQE···RLGPLVEQGRQ···
Human_ApoE3	···RLGADMEDVCGRL···KRLAVYQAGARE···RLGPLVEQGRV···
Human_ApoE2	···RLGADMEDVCGRL···KRLAVYQAGARE···RLGPLVEQGRV···
Human_ApoE4	···RLGADMEDVGRRL···KRLAVYQAGARE···RLGPLVEQGRV···

ApoE4 Specific ApoE2 Specific Common

【酵素消化時間検討】



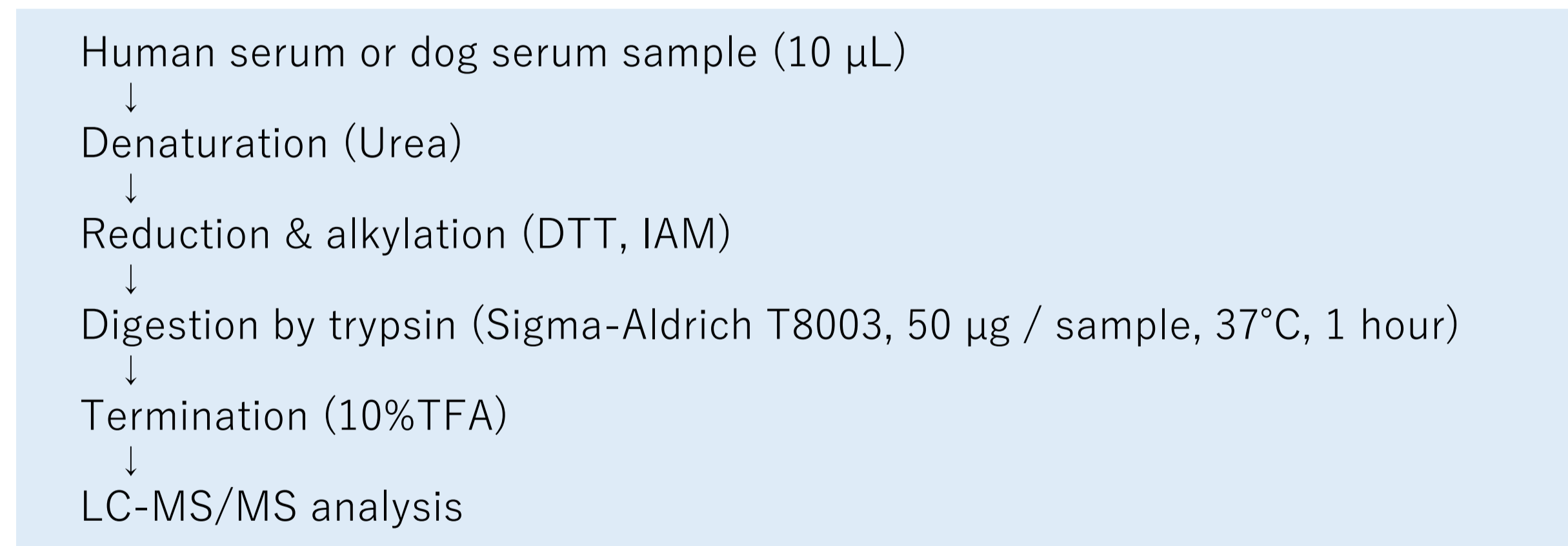
事前の検討で E2/E3, E3/E4 の表現型を示していた 2 例の血清をプールし酵素消化時間を評価した。1時間から6時間までピーク面積としては減少、ピーク面積比としては微増の傾向を示した。両者のバランスから消化時間としては 1 時間を採用した。

前処理、測定条件

【標準物質および試薬】

ヒト血清は Biopredic International (Saint Grégoire, FRANCE)、イヌ血清は北山ラベス (山口、日本)、ApoE2 および ApoE4 リコンビナントタンパク質は PEPROTECH (NJ, USA)、内標準物質用の安定同位体ペプチドは Bio-Synthesis (TX, USA)、トリプシン(Product Code T8003)は Sigma-Aldrich (東京、日本) のものを購入した。その他試薬は各社より特級以上のグレードの試薬を購入した。また、Milli-Q水を使用した。

【前処理条件】



【測定条件】

LC condition	Nexera X2 system (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, JAPAN)
Column	Xselect CSH C18 Column, 130 Å, 2.5 µm, 2.1 X 50 mm (Waters, MA, USA)
Column temp.	60°C
Mobile phase A	Water / acetic acid
Mobile phase B	Acetonitrile / methanol / acetic acid
Run time	12.0 min

MS condition	Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
Ionization mode	ESI
Analysis mode	PRM
Detection mode	Positive
Resolution	70,000
Monitoring ions	[M+2H] ²⁺ LGADMEDVC(CAM)GR, LGADMEDVR, LAVYQAGAR, C(CAM)LAVYQAGAR, LGPLVEQGR And corresponding 5 heavy Isotope labeled peptides for IS

Software	TraceFinder 4.1 & Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
Product Ions for quantification	LGADMEDVC(CAM)GR: $m/z = 735.30901$ (y_6^+) LGADMEDVR: $m/z = 892.38291$ (y_8^+) LAVYQAGAR: $m/z = 665.33655$ (y_6^+) C(CAM)LAVYQAGAR: $m/z = 835.44208$ (y_8^+) LGPLVEQGR: $m/z = 701.39406$ (y_6^+) IS: corresponding fragments of heavy isotope labeled peptides
Window	±5 ppm
Method	Internal standard method
Model	$Y = aX + b, 1/X^2$ weighting

結果

【分析法バリデーション】

本分析法は前処理で酵素消化を行うタンパク質のLC-MS/MSによる分析法であり、同様に酵素消化を伴う抗体医薬品のLC-MS/MSによる分析法に対して文献²⁾等で提案されている基準を用いて分析法バリデーションを実施した。

なお、標準溶液の安定性についてはメーカーの添付文書引用とし評価対象外とした。マトリックス中の安定性に関しては、文献情報³⁾もあることと、倫理的な観点からもボランティア採血による新鮮血を用いた評価は本バリデーション内では評価対象外とした。

また、前処理ヒト血清サンプル60本の分析を行いバッチ耐久性を確認した。

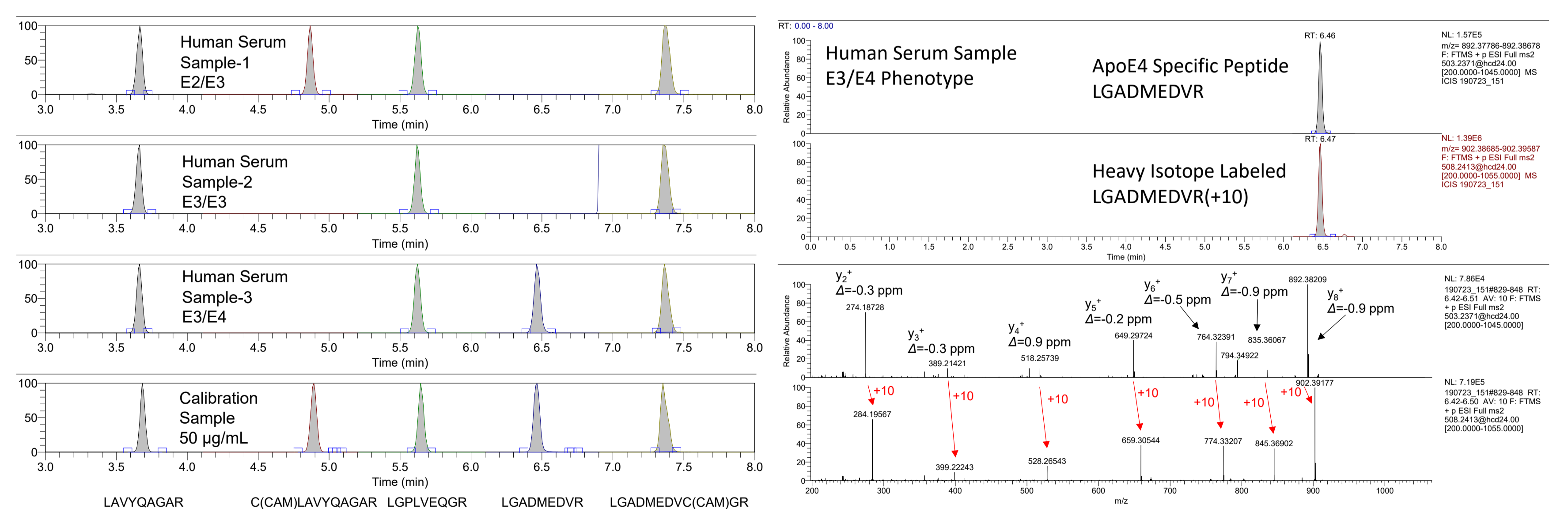
すべての測定結果は設定した基準を満たした。

Items	Descriptions	Criteria	Results
Selectivity	6 individual human serum	IS: PA in IS-non-spiked sample \leq 5.0% of PA in IS-spiked sample	No interfering peak
Matrix Effect	6 individual human serum Intact and spiked (50 µg/mL each for ApoE2 and ApoE4)	-20.0% \leq RE \leq 20.0% CV \leq 20.0%	RE: -3.4 to 3.1% CV: 6.1 to 7.9%
Carry-Over	Surrogate matrix (dog serum) blank sample injection after calibration curve injection 3 days	Analyte: PA in blank sample \leq 20.0% of PA in LLOQ sample IS: PA in blank sample \leq 5.0% of PA in LLOQ sample	No interfering peak
Calibration Curve	Surrogate matrix (dog serum) 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 µg/mL n=1, 3 days	-20.0% \leq RE \leq 20.0% (LLOQ: -25.0% \leq RE \leq 25.0%) 6 points or higher (Including LLOQ/ULOQ)	RE: -10.9 to 13.5%
Intra-Batch Accuracy and Precision	Surrogate matrix (dog serum) 1, 3, 20, 160 µg/mL Human serum 0 (intact), 50 µg/mL n=5, 3 days	-20.0% \leq RE \leq 20.0% (No criterion for 0 µg/mL sample) (LLOQ: -25.0% \leq RE \leq 25.0%) CV \leq 20.0% (LLOQ: CV \leq 25.0%)	RE: -18.0 to 7.2% CV: 0.7 to 11.5%
Inter-Batch Accuracy and Precision	Surrogate matrix (dog serum) 1, 3, 20, 160 µg/mL Human serum 0 (intact), 50 µg/mL n=15 (whole results of intra-batch)	-20.0% \leq RE \leq 20.0% (No criterion for 0 µg/mL sample) (LLOQ: -25.0% \leq RE \leq 25.0%) CV \leq 20.0% (LLOQ: CV \leq 25.0%)	RE: -11.7 to 5.3% CV: 2.5 to 9.5%
Stability in an Autosampler for 48 Hours	Surrogate matrix (dog serum) 3, 160 µg/mL Human serum 0 (intact), 50 µg/mL n=3 48 hours in an autosampler set at 4°C	80.0% \leq RR \leq 120.0%	RR: 87.9 to 110.4%
Batch Size	6 individual human serum Preparation: n=1 Injection: n=10/sample (total 60)	Determined values for each serum CV \leq 20.0% Visual inspection on each peak	CV: 1.3 to 3.7% No issues on each peak

PA: Peak area

【定性分析法としての評価】

各アイソフォーム定量と同様に表現型判定もApoE分析法に要求される事項の一つである。クロマトグラムによる表現型判定は既報¹⁾などと同様に問題なく実施可能である。また、Q Exactive Focusを用いているため各ペプチド断片のMS/MSスペクトルでの同定が可能である。特にApoE4の有無は機微な情報であるため、より高精度な同定が可能なのは本分析法の大きな利点である。



考察

我々は、ApoE2およびApoE4のリコンビナントタンパク質を標準品に使用したヒト血清中のアポリポプロテインEの各アイソフォームの分離定量可能な分析法を開発した。本分析法はペプチド断片を標準品とした場合と比べて酵素消化の影響についても補正が可能となる利点がある。また、ヒト血清自体を標準品に使用する場合はロットごとに各ApoEの濃度差が生じうるが、リコンビナントタンパク質を標準品に使用することで常に一定の濃度の標準品の使用が可能となる。分析法には汎用的な試薬のみで実施可能な前処理法を採用し、得られた結果は設定した基準を満たした。定性分析法としても問題ない分析法である。以上、目的であった頑健な分析法の開発に成功した。

今後、アルツハイマー病研究における長期の経時的なApoE濃度評価などの応用に活用したい。

参考文献

- 1) Eduardo Martínez-Morillo *et al.*, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 2, 1077–1087
- 2) 橋井則貴ら, *Chromatography* **2018**, *39*, 7-19
- 3) Irene van den Broek *et al.*, *Clinical Chemistry* **2016**, *62*:1 188-197