

Development of Quantitative Method for Apolipoprotein E Isoforms in Human Serum by HRAM-LC-MS/MS

○ 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 メディカルソリューション本部 高度技術分析センター 医薬品分析部)
 ○ Masaki Hoshino, Shin-ichiro Nitta, Hiroki Wakabayashi, Tetsuya Ueda (Bioanalysis Department, Advanced Technology Center, Medical Solution Segment, LSI Medience Corporation)

目的

アポリポロタンE (ApoE) とアルツハイマー病の関連性については1993年のCorderの報告¹⁾以降多くの研究がおこなわれており、APOE遺伝子の ϵ 4アレルはアルツハイマー病の危険因子と広く理解されている。一方で、ApoE関与のメカニズムに関しては、Amyloid β 代謝、Tauリン酸化、脂質代謝、血管の老化などへの関与など様々なメカニズムが提唱されているが確固とした結論は得られていない²⁾。タンパク質を定量的に評価することでアルツハイマー病におけるApoE関与のメカニズムに関する新たな知見が得られる可能性がある。そこで我々は、ヒト血清をアフィニティー精製することなく直接トリプシンを用いて消化断片を作成し、生成されたApoE2, ApoE3, ApoE4及びApoE2~4共通の消化断片をHRAM (High Resolution and Accurate Mass)-LC-MS/MSにより測定する血清中アポリポロタンEアイソフォーム分析法を開発した。また、本分析法は高精度な血清中タンパク質の表現型判定とタンパク質濃度の測定が同時に可能な方法であり、定量分析法としてのバリデーションについても本研究内で実施した。その結果は酵素消化を伴うLC-MS/MS分析法に対して提案されている基準³⁾を満たすものであった。

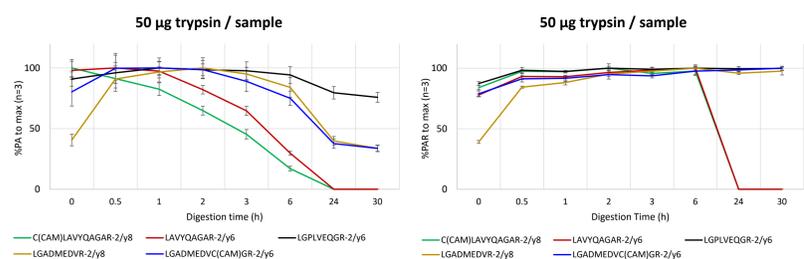
分析法検討

【代替マトリックス選定】

LC-MS/MSによるバイオマーカー測定では代替マトリックスの選択がキーとなる。低分子を測定対象とする場合はいくつか標準的な選択肢がある。一方、トリプシン消化を伴うタンパク質のバイオマーカー測定では常法は存在しない。タンパク質のバイオマーカー測定において、我々はデータベース上のタンパク配列を使用して *in silico* ベースの検索を行い配列の異なるタンパク質を持つ動物種の生体試料を代替マトリックスとして系の構築を行っている。

測定対象	バッファー、水	成分除去マトリックス	他動物種マトリックス	分析対象欠損マトリックス
低分子	○	○	× 種差なし	△ 費用対効果
タンパク質	△ 条件設定が難しい	△ 分析対象除去は難しい	○	△ 費用対効果

【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。特性の異なる5ペプチド断片の同時測定が必要であり、すべてのペプチドで安定な条件とすることは困難であることが想定されたので、両者のバランスから消化時間としては1時間とした。

【LC条件検討】

移動相に使用する試薬はピーク形状とMS感度が相反する傾向がある。我々はバランスを見ながら系の構築を行っている。

条件	ピーク挙動
酸濃度	感度： 低濃度 (0.005%程度まで) > 高濃度 ピーク形状： 高濃度>低濃度
酸の種類	感度： 酢酸>ぎ酸>TFA ピーク形状： TFA>ぎ酸>酢酸 ※酢酸はバックグラウンド上昇しやすい
有機溶媒の種類	感度： メタノール>アセトニトリル ピーク形状： アセトニトリル>メタノール ※メタノールはバックグラウンド上昇しやすい
塩の添加	感度： 塩なし>塩添加 ピーク形状： 塩添加>塩なし ※炭酸水素アンモニウムで感度良好なケースも散見
添加剤	感度不足の場合は検討する。

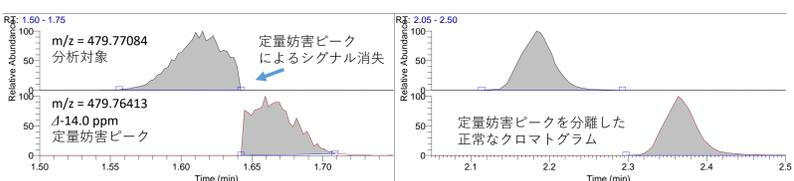
今回の分析条件では高選択性のPRM法を採用し、バックグラウンド上昇の影響は抑制できるため、感度を優先し低濃度酢酸、水とアセトニトリル/メタノールによるグラジエント条件、添加剤無しの条件とした。

【Q Exactive Focusの条件検討における留意点】

通常の四重極MSによる分析条件では定量妨害ピークの存在はバックグラウンド上昇により容易に認識できる。一方、Q Exactive Focusの測定データをThermo Fisher Scientificのソフトウェア (TraceFinder, QuanBrowser等) で定量解析する場合、定量妨害ピークの影響によりシグナル消失が起こる。クロマトグラムのみでの確認では原因がわかりにくいケースが多いので注意が必要となる。

- シグナル強度の大きい定量妨害ピーク (MSで十分分離可)
→Orbitrapへのイオン注入量が自動制御されるため、分析対象イオンの絶対量が減少しシグナルが消失する場合がある。また、測定対象 m/z 近傍の定量妨害成分により測定対象の m/z がずれる場合もある。
- m/z が 10 ppm 程度違いの定量妨害ピーク (共溶出の場合MS分離不可)
→定量妨害ピークと目的のピークが重なりピークトップの m/z がずれてシグナルが消失する場合がある。

我々はクロマトグラムのみではなく、イオンのOrbitrapへの注入時間やスペクトルも念入りに確認し分析条件の構築を行っている。



前処理及び測定条件

Sample Treatment Procedure	LC condition	Nexera X2 system (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, JAPAN)
Human serum or dog serum sample (10 μ L)	Column	Xselect CSH C18 Column, 130 \AA , 2.5 μ m, 2.1 X 50 mm
↓	Column temp.	60°C
Denaturation (Urea)	Mobile phase A	Water / acetic acid
↓	Mobile phase B	Acetonitrile / methanol / acetic acid
Reduction & alkylation (DTT, IAM)	Run time	12.0 min
↓	MS condition	Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
Digestion by trypsin (Sigma-Aldrich T8003, 50 μ g / sample, 37°C, 1 hour)	Ionization mode	ESI
↓	Analysis mode	PRM
Termination (10%TFA)	Detection mode	Positive
↓	Resolution	70,000
LC-MS/MS analysis	Monitoring ions	[M+2H] ²⁺ LGADMEDVC(CAM)GR, LGADMEDVGR, LAVYQAGAR, C(CAM)LAVYQAGAR, LGPLVEQGR And corresponding 5 heavy isotope labeled peptides for IS

今回の検討では測定対象の5ペプチドは文献情報⁴⁾から選択した。

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³⁾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ついては、文献情報⁵⁾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。

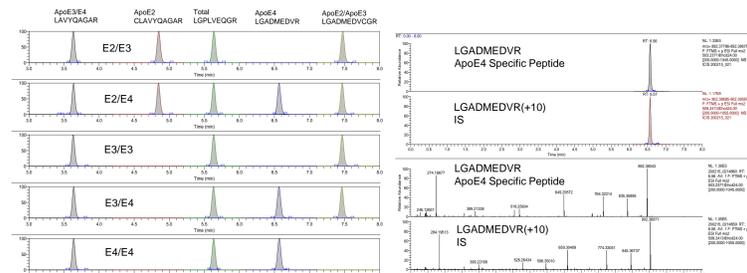
Items	Results
Selectivity for IS Male and female, n=3 each, total n=6	No interfering peak
Matrix Effect Male and female, n=3 each, total n=6	RE: -3.4 to 3.1% CV: 6.1 to 7.9%
Carry-Over n=1, 3 days	No interfering peak
Calibration Curve 1-200 μ g/mL, n=1, 3 days	RE: -10.9 to 13.5%
Intra-Batch Accuracy and Precision 4 (surrogate matrix) and 2 (serum) concentrations, n=5, 3 days	RE: -18.0 to 7.2% CV: 0.7 to 11.5%
Inter-Batch Accuracy and Precision 4 (surrogate matrix) and 2 (serum) concentrations, n=15	RE: -11.7 to 5.3% CV: 2.5 to 9.5%
Stability in an Autosampler for 48 Hours 2 (surrogate matrix) and 2 (serum) concentrations, n=3	RR: 87.9 to 110.4%
Batch Size 60 serum samples (10 samples / individual serum)	CV: 1.3 to 3.7%

【アルツハイマー病患者血清の測定】

性別、進行状況などの属性情報付きアルツハイマー病患者の血清35例を購入し測定を行った。既知の情報の通り、アルツハイマー病患者ではApoE4保有者の割合が高い結果であった (Caucasian全体での ϵ 4アレル頻度は15%⁶⁾)。濃度測定値に関しては、例数が少ないため統計的な評価は実施できなかったが、文献情報⁶⁾と同様の濃度範囲が得られた。

ApoE 表現型	N	頻度 (%)	ApoE濃度 (μ g/mL)			
			Total	ApoE2	ApoE3	ApoE4
E2/E2	0	0.0	-	-	-	-
E2/E3	2	5.7	45.3	29.8	15.4	-
E2/E4	2	5.7	37.1	27.8	-	6.0
E3/E3	14	40.0	37.1	-	37.1	-
E3/E4	15	42.9	35.4	-	27.7	7.7
E4/E4	2	5.7	23.8	-	-	15.6

ヒト血清中ApoE濃度測定結果例



マスククロマトグラムによるヒト血清中ApoE表現型判定結果例

ヒト血清中ApoE消化断片ペプチドスペクトル例

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ロタン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、バリデーションを行い定量分析法として頑健な分析法であることを確認した。また、HRAM-LC-MS/MS法は定性的な評価にも有用なことが確認された。トリプシン消化を伴う複雑なマトリックス中のバイオマーカー測定においても非常に高精度なターゲット同定が可能な点は有用であると考えられる。今後、CSF中のApoE測定に向けた高感度化検討および、アルツハイマー病患者血清サンプルの測定を進めたい。ApoE濃度について、属性情報(進行度/性別/年齢など)との相関の有無を統計的に評価しバイオマーカーとしての有用性を検証したい。

参考文献

- 1) EH Corder *et al.*, *Science*, **1993**, 261, 921-923
- 2) Safieh *et al.*, *BMC Medicine*, **2019**, 17:64
- 3) 橋井則貴ら, *Chromatography* **2018**, 39, 7-19
- 4) Eduardo Martinez-Morillo *et al.*, *J. Proteome Res.* **2014**, 13, 2, 1077 - 1087
- 5) Irene van den Broek *et al.*, *Clinical Chemistry* **2016**, 62:1, 188-197
- 6) Amy L. Heffernan *et al.*, *J Mol Neurosci.* **2016**, 60(3), 316-324.