

脂質プロファイリングワークフローによる 白血病細胞中の薬物処置により誘発される 脂質生成中断の解明

Agilent 6546 LC/Q-TOF および MassHunter Lipid
Annotator ソフトウェア

著者

Mark Sartain,
Genevieve Van de Bittner, and
Sarah Stow
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

概要

Agilent 6546 LC/Q-TOF と Agilent MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアを使用した Agilent リポドミクスプロファイリングワークフローを、薬物処置した急性骨髄性白血病 (AML) の細胞の研究に適用しました。分析結果は、これまでに報告された観察を裏付けており、この包括的なワークフローの範囲を拡張することによって、脂質の違いが明白になることが明らかになりました。

はじめに

これまでの研究より、脂質低下薬のベザフィブラート (BEZ) と避妊薬のメドロキシプロゲステロン酢酸エステル (MPA) の混合薬 (BaP) に、悪性度の高い血液がんである AML に対する強力な抗がん性の特質があることが分かっています¹。さらに、脂質分析を含む一連の実験から、脂肪生成酵素の減少によって BaP が新たな脂肪酸とリン脂質の生合成を低速化したことが示され、脂質生成の調節不全が BaP の抗がん性効果の主な誘因であることが示唆されています。

原理証明研究として、リポドミクスプロファイリングワークフローを適用し、BEZ、MPA、BaP 混合薬に反応する AML K562 細胞株内の脂質変化を分析しました。Agilent 脂質分析ワークフローでは、6546 LC/Q-TOF を使用しました。6546 は、広いダイナミックレンジを持ち、同時に取り込みスピードに関係なく優れた分解能を提供する質量分析計です。このワークフローの鍵となるのが MassHunter Lipid Annotator ソフトウェアです。このソフトウェアでは、脂質の MS/MS スペクトルに迅速にアノテーションを付け、検出した脂質の詳細なアノテーション範囲のカスタムライブラリを簡単に生成できます。これらのライブラリは、完全な脂質分析ワークフローの不可欠な要素であり、ターゲットおよびノンターゲットのリポドミクスプロファイリングをサポートします。

実験

細胞培養

AML K562 細胞は RPMI 培地で培養しました。6 ウェルプレートに 2.4×10^5 cells/mL (3 mL/well) を播種して、0.5 mM BEZ、5 mM MPA、BaP (0.5 mM BEZ と 5 mM MPA の混合薬)、溶媒対照群 (1:1 エタノール/DMSO) の 4 つの異なる処置を適用しました。各処置について 4 個の複製ウェルを用意しました。24 時間のインキュベーション後に、細胞を遠心分離で沈殿させ、PBS (-Ca、-Mg、1 mL、4 °C) で洗浄し、再度沈殿させ、急速冷凍して -80 °C で保管しました。図 1 に、細胞培養の手順を示します。

脂質抽出

細胞沈殿物を氷の上で解凍し、改良した Folch 法抽出手順で脂質を抽出しました。メタノール (200 μ L) を 2 mL エッペンドルフチューブ中の各細胞沈殿物に加え、ボルテックスミキサーでチューブを 2 分間混ぜ合わせました。クロロホルム (400 μ L) を加え、ボルテックスミキサーで 2 分間チューブを混ぜ合わせました。相分離するために、120 μ L の水を各サンプルに加えました。次にこの混合物を 2 分間ボルテックスミキサーで混ぜ、4 °C、16,000 \times g で 5 分間遠心分離しました。下部層をガスタイトガラスシリンジで注意深く採

取し、2 つ目のエッペンドルフチューブに移しました。残りの中間層と上部層を再抽出するために、450 μ L のクロロホルム/メタノール/水 (86:14:1 v/v/v) 混合溶液を加え、この混合物をボルテックスミキサーで 2 分間混合し、再度遠心分離しました。

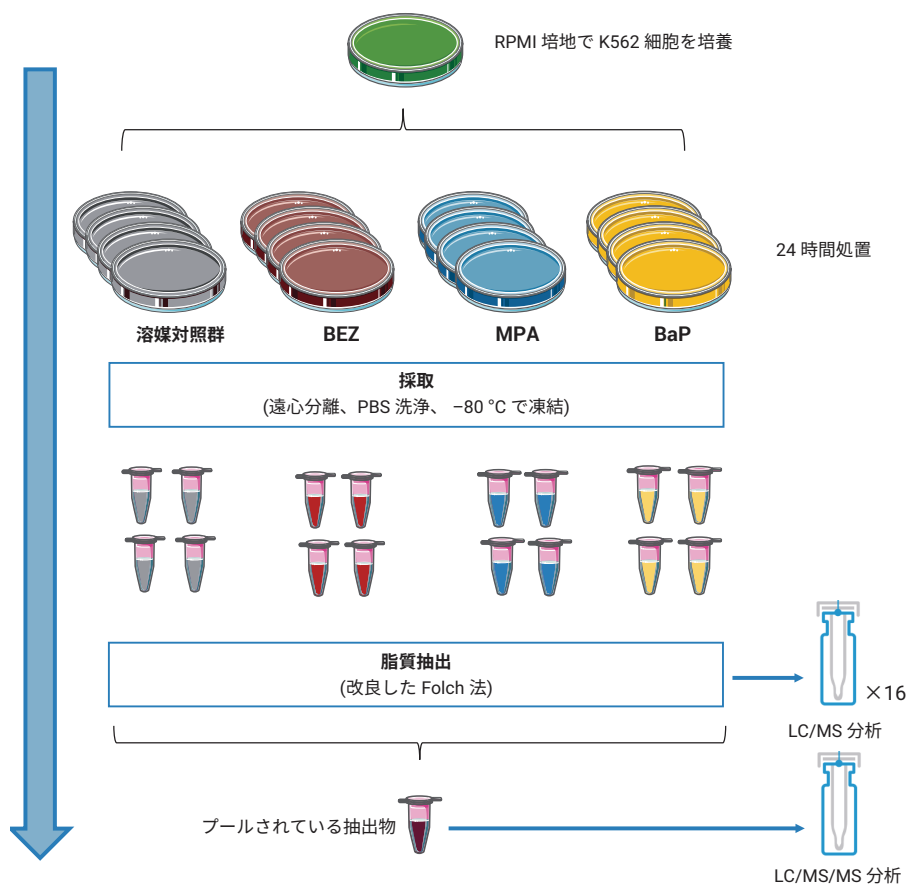


図 1. がん細胞のリポドームに対する薬物処置の効果を調査するための実験計画

下部層を混合し、600 µL のクロロホルム/メタノール/水 (3:48:47 v/v/v) 混合溶液を加え、その後、ボルテックスミキサーで溶液を2分間混合し、遠心分離しました。下部層を新しいエッペンドルフチューブに移し、減圧濃縮器で乾燥させました。200 µL の再溶解溶媒 (メタノール/クロロホルム (9:1 v/v)) を用いて再懸濁し、ボルテックスミキサーで軽く混合しました。抽出物を分割および濃縮して、次に示す LC/MS 取り込みメソッドで分析しました。

• ポジティブイオンモード LC/MS 用サンプルの場合

1. 各抽出物から 50 µL を、個々の繰り返し分析での MS1 データ取り込み用に、不活性化したガラスバイアルインサートに移しました。
2. 各 50 µL サンプルから 10 µL を 1 個のガラスバイアルインサート中で混合しました (16 サンプル = 160 µL)。減圧濃縮器で乾燥させることによって、プールされているサンプルを濃縮し、AutoMS/MS (反復 MS/MS) データ取り込み用に 50 µL の再溶解溶媒で再懸濁しました。

• ネガティブイオンモード LC/MS 用サンプルの場合

1. 残っている各抽出物の 150 µL を、不活性化したガラスバイアルインサートに移して減圧濃縮器で乾燥させました。個々の繰り返し分析での MS1 データ取り込み用に、サンプルを 50 µL の再溶解溶媒で再懸濁しました。

2. 再溶解済みの 50 µL サンプルそれぞれから 10 µL を 1 個のガラスバイアルインサート中で混合しました (16 サンプル = 160 µL)。減圧濃縮器で乾燥させることによって、プールされているサンプルを濃縮し、AutoMS/MS (反復 MS/MS) データ取り込み用に 50 µL の再溶解溶媒で再懸濁しました。

- すべてのサンプルに 5 µL 注入しました。

装置構成

- **LC システム:** Agilent 1290 Infinity II LC (以下の機器で構成)
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II バイアルサンプル、サーモスタット付 (G7129B)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

- **MS システム:** Agilent 6546 LC/Q-TOF (Agilent Jet Stream イオン源搭載)

メソッド

16 サンプル (4 処置条件 × 4 繰り返し分析) に相当するプールされた K562 脂質抽出物を反復 MS/MS で取り込みました。反復 MS/MS は、サンプルが複数回注入される完全に自動化された Q-TOF 取り込みモードであり、前回の注入の MS/MS フラグメンテーションで選択された各プリカーサが、ローリングベースで排除されます。1 つのサンプルから多数の脂質アノテーションを得られるという反復 MS/MS の価値が、以前の研究で示されています²。

クロマトグラフィーおよび AutoMS/MS 質量分析計の詳細な実験メソッドは後述の参考文献²に記載されたものと同じです。表 1 と 2 にパラメータを示します。さらに、各サンプルについて、3 スペクトル/秒の MS 取り込み速度で MS のみのデータを取り込みました。

表 1. クロマトグラフィー条件

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II LC
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm (p/n 695975-302)
ガードカラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 5 mm, 2.7 µm (p/n 823750-911)
カラム温度	50 °C
注入量	5 µL
オートサンプル温度	50 °C
ニードル洗浄	洗浄ポート (50:50 メタノール/イソプロパノール) で 15 秒
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウムの 9:1 水/メタノール溶液 B) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウムの 2:3:5 アセトニトリル/メタノール/イソプロパノール溶液
流量	0.6 mL/min
グラジエントプログラム	時間 (分) %B 0.00 70 1.00 70 3.50 86 10.00 86 11.00 100 17.00 100 17.10 70 19.00 70
ストップタイム	19 分
ポストタイム	なし
実測カラム圧力	170 ~ 330 bar

ソフトウェア

- 6546 LC/Q-TOF の操作には、Agilent MassHunter Q-TOF Data Acquisition バージョン 10.0 を使用しました。
- Agilent MassHunter Lipid Annotator バージョン 1.0 をデフォルトメソッドパラメータで使用しました。ただし、ポジティブイオンモード分析では $[M+H]^+$ と $[M+NH_4]^+$ プリカーサのみを考慮し、ネガティブイオンモード分析では $[M-H]^-$ と $[M+HAc-H]^-$ プリカーサのみを考慮しました。
- エクスポートされたアノテーション付き脂質ライブラリ (PCDL) の管理と編集には、Agilent MassHunter PCDL Manager バージョン B.08 SP1 を用いました。具体的には、 $[M-H]^-$ および $[M+acetate]^-$ 分子イオンのために個別のエントリが観察された 9 個の Cer_NS 脂質の重複を除去するために、PCDL Manager を使用しました。 $[M-H]^-$ Cer_NS エントリが消去され、ネガティブイオンモード PCDL には 653 種類の脂質が残りました。
- フィーチャー抽出法には Agilent MassHunter Profinder バージョン 10.0 を使用しました³。提供された「Profinder - Lipids.m」メソッドを、次の変更を加えたバッチターゲットフィーチャー抽出法に使用しました。
 - ステップ 1:** +H および +NH4 チェック (正)、-H および +CH3COO チェック (負)。シングルイオンまたは電荷状態 $z = 1$ のシングルイオンフィーチャーをレポート: チェック
 - ステップ 2:** MS 同位体アバundanceについて予想されるデータ変動: 12.5 %
 - ステップ 3:** 平滑化機能: 2 次/3 次の Savitzky-Golay 法、ファンクション幅 8、高さフィルタ: チェックなし。最大の制限 (高さ) 最大: 10 ピークまでに制限

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF AutoMS/MS (反復) パラメータ

パラメータ	Agilent 6546 LC/Q-TOF
ガス温度	200 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ (psig)	50
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	12 L/min
VCap	3,500 V (+), 3,000 V (-)
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	150 V
スキマ電圧	65 V
オクタポール RF Vpp	750 V
参照質量	m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-)
MS および MS/MS 範囲	m/z 40 ~ 1,700 (+)
最小 MS および MS/MS 取り込みスピード	3 スペクトル/秒
選択幅	狭い (~ 1.3 m/z)
コリジョンエネルギー	20 eV (+), 25 eV (-)
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	3
プリカーサアバundanceスペースのスキャンスピード	あり、ターゲット 25,000 カウント/スペクトル
MS/MS 累積時間制限を使用	あり
ターゲット TIC に到達できないプリカーサの除去	なし
MS/MS のスレッショールド	5,000 カウントと 0.001 %
アクティブな排除の有効化	あり、1 回繰り返して 0.05 分間排除
純度	厳密性 70 %、カットオフ 0 %
同位体モデル	一般的な有機分子
プリカーサでのソート	1、2、不明
静的排除範囲	m/z 40 ~ 151 (+) m/z 40 ~ 210 (-)
反復 MS/MS 質量誤差許容範囲	20 ppm
反復 MS/MS RT 排除許容範囲	±0.1 分

- ステップ 4:** 変更なし
- ステップ 5:** スコア (Tgt) をチェックしない
- Agilent MassHunter Mass Profiler Professional バージョン 15.1 を差分解析に使用しました。「リビドミクス」実験タイプを用いて 2 つの実験 (ポジティブまたはネガティブイオン) を作成し、該当するプロファインダーアーカイブ (.pfa) をデータソースとして使用しました。パーセントイルシフト正規化アルゴリズム (75 %) を使用し、すべてのサンプルの中央値に対してデータセットをベースライン補正しました。
- Agilent MassHunter ID Browser バージョン 10.0 を MPP で使用して、ノンターゲットワークフローでアノテーションを作成しました。要求基準として ± 5 ppm の質量と ± 0.10 分のリテンションタイムを用いました。

ワークフロー

ターゲットおよびノンターゲットのリビドミクスワークフローの両方を、以前に記述されたように使用しました⁴。

結果と考察

プールされている AML 細胞脂質抽出物を用いた、Lipid Annotator データベースの作成

リポミクスワークフローの最初のステップとして、プールされている AML 細胞抽出物からの 5 回の反復 MS/MS データファイル 2 セットを Lipid Annotator ソフトウェアで解析しました (図 2)。これには、ポジティブイオンモードでアノテーションされた 17 クラスの 430 種類の脂質と、ネガティブイオンモードでアノテーションされた 25 クラスの 653 種類の脂質がありました。脂質アノテーションの結果を PCDL (.cdb) ファイルにエクスポートしました。

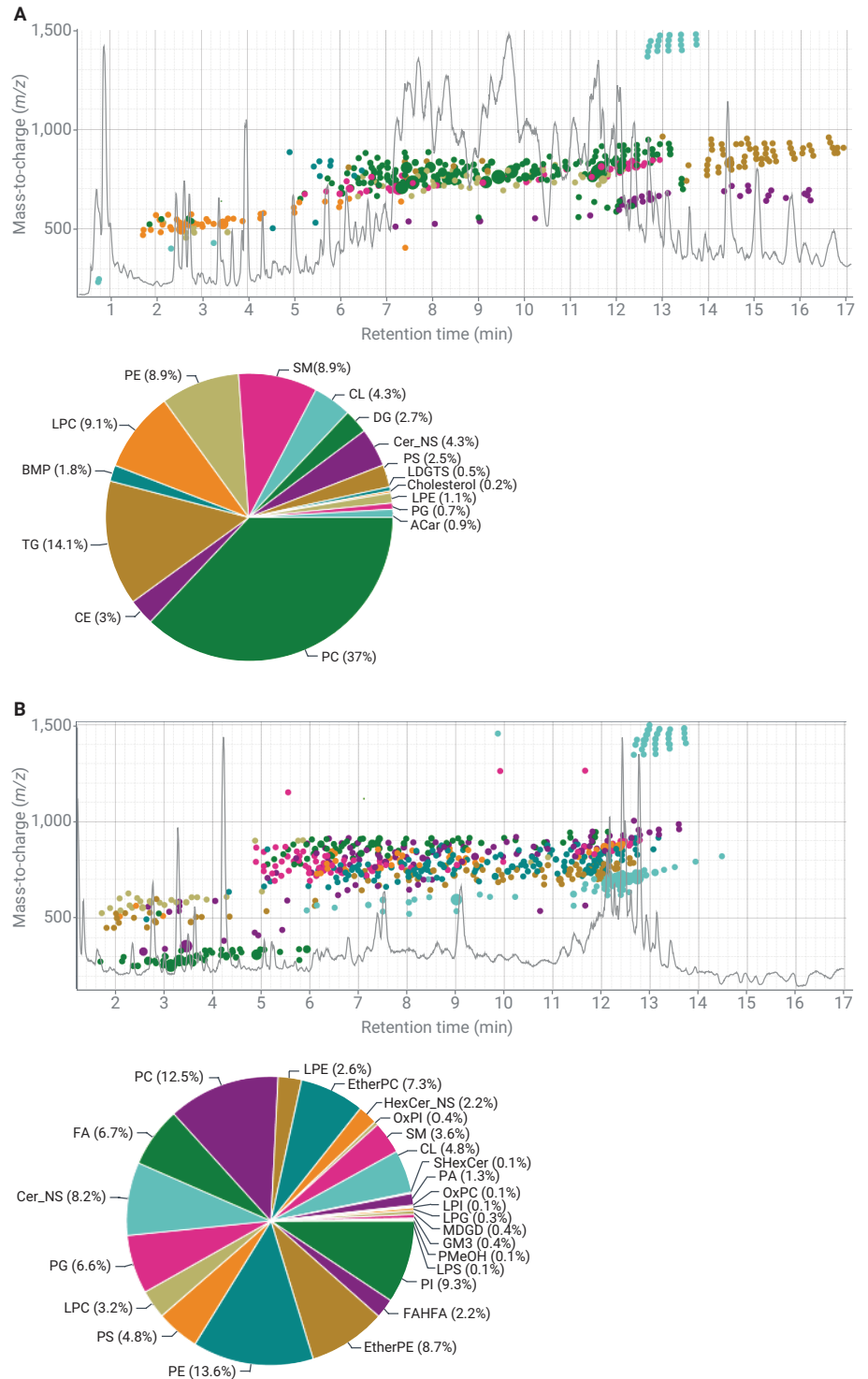


図 2. Lipid Annotator ソフトウェアにおけるポジティブ (A) およびネガティブ (B) イオン化モードでの分析結果。5 回の反復 MS/MS データファイルを各プロジェクトのバッチとして分析しました。説明目的のために、代表的なトータルイオンクロマトグラムを m/z 対リテンションタイムの散布図に重ね合わせています。脂質フィーチャーは、円グラフに対応する脂質クラス別に色分けし、アノテーションされた脂質の数をパーセンテージとして示しています。

薬物処置によって誘発される摂動を 脂質プロファイリングで同定

16 個の MS1 データファイルのそれぞれのバッチについて Profinder のターゲット特性バッチ抽出で PCDL (.cdb) データベースを使用しました。データベースの化合物の分子式とリテンションタイムの両方を必要な基準として使用し、MS1 データファイルを検索し、ターゲット方式で脂質フィーチャーを探しました。得られた化合物は Profinder でレビューし、いくつかのケースではフィーチャーをマニュアルで積分したり、不十分なまたは不明瞭なフィーチャーピーク形状のために除去したりしました。マニュアルキュレーション後、375 種類の化合物と 548 種類の化合物がそれぞれポジティブおよびネガティブイオンモードのデータベース内に残りました。Profinder の結果 (.pfa ファイル) を統計解析のために Mass Profiler Professional (MPP) にインポートし、ポジティブおよびネガティブイオンモードの分離した解析を作成しました。正規化とベースライン補正の後、PCA (主成分分析) プロットは両方の極性で類似しました。エンティティをフィルタリングしない場合 (すべての化合物を保持した場合)、結果は各処置条件内の生物学的複製のタイトなクラスタリングを示し、薬物処置間での明らかな違いが実証されました。BEZ と MPA の両方が、個別に組み合わせさせた BaP の効果に寄与しました (図 3)。主成分 1 に沿ったグループの分離から、リピドームについての薬品の効果が MPA よりも BEZ 処置が組み合わせさせた BaP へ、より寄与することが示唆されました。これらの観察は以前に説明された結果と一致します¹。

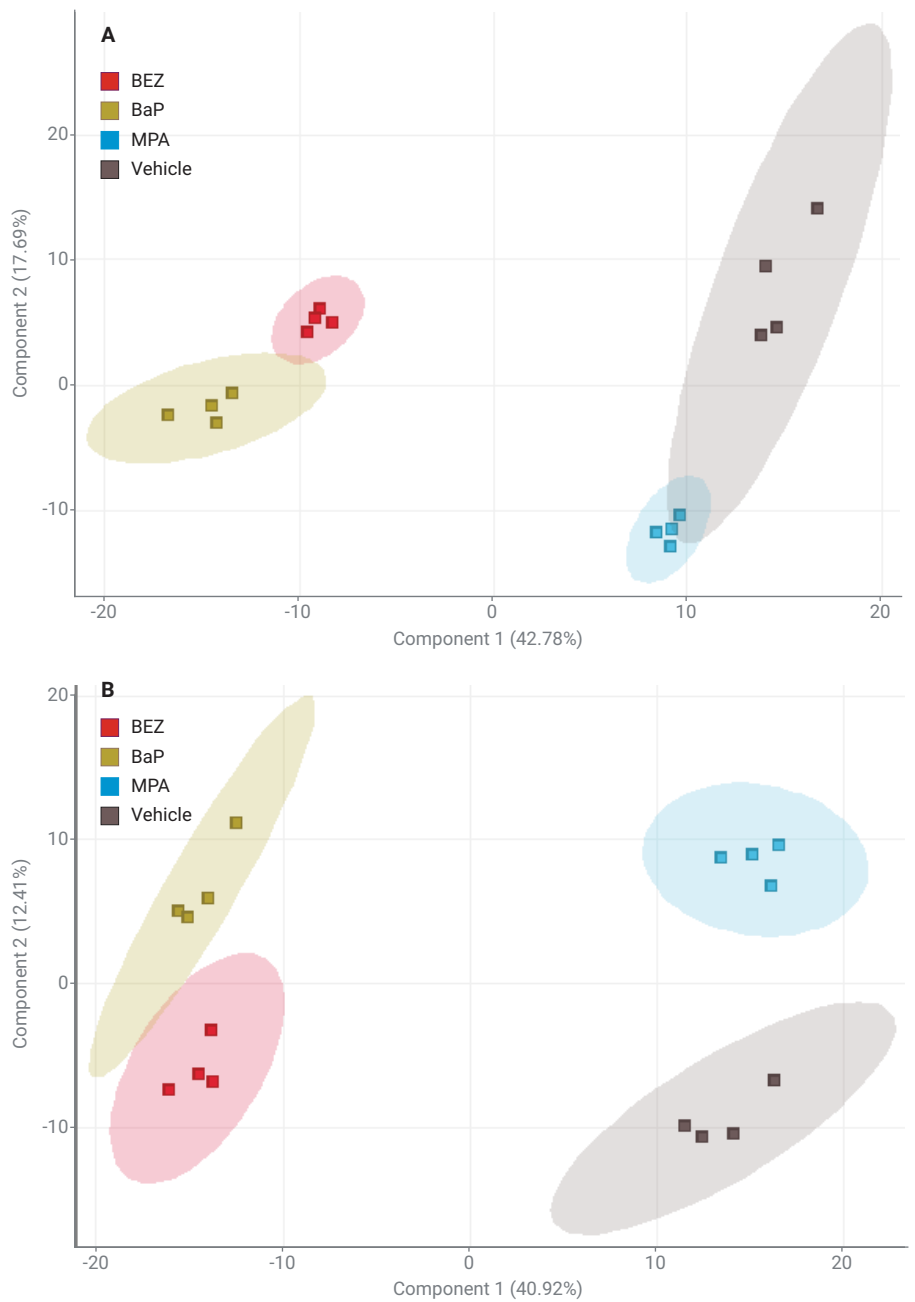


図 3. ポジティブイオン (A) とネガティブイオン (B) のデータセットの PCA プロット

サンプル相関 (図なし) と教師なし階層的クラスタリング (図 4) から、PCA の結果のさらなる裏付けを得られます。各条件内の生物学的複製をグループ化すると、BEZ サンプルは MPA サンプルよりも BaP に近い関係を示しました。このトレンドはアノテーションされた脂質フィーチャーの教師なしクラスタリングからも観察されました。例えば、明らかなパターンを示す領域内のクラスタツリーを調べたところ、多数のトリアシルグリセロール (TG) との関係が強いことが明らかになりました。これらの脂質が MPA および溶媒対照群サンプルに比べて BEZ および BaP 処置で増加しました。

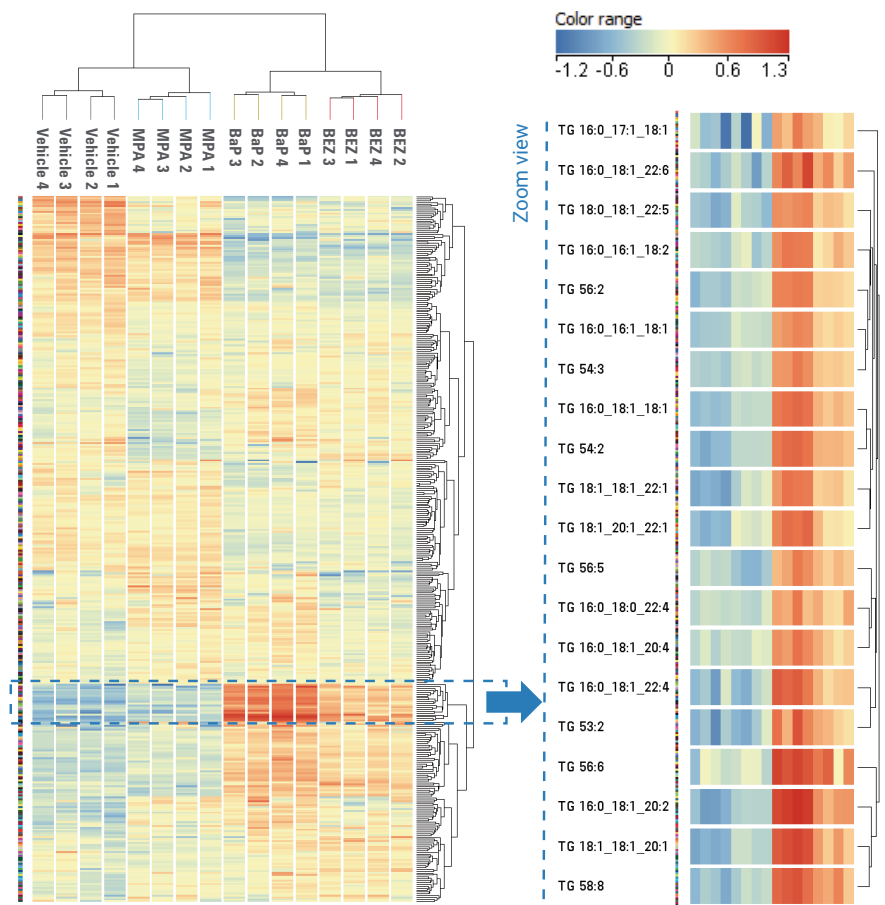


図 4. 化合物 (n = 375) とポジティブイオンデータセット条件に関する結合された教師なし階層的クラスタリングの結果。(右) アノテーションされた TG が追加されたクラスタツリーの拡大図。色の範囲は、log₂ スケールでの各 TG フィーチャーの正規化され変換されたアブundanceを表しています。

脂質プロファイリングが示す、 中断された脂質生成

脂質クラスアバundanceについて詳細に違いを評価するために、MPP でポジティブイオンモードのデータセットから脂質クラスマトリックスプロット (ヒートマップ) を作成しました (図 5)。明らかな違いが観察されました。Southam *et al.*¹ と一致して、BaP では溶媒対照群と比べて TG が増加し、ジアシルグリセロール (DG) が減少しました。DG は新規のリン脂質生成経路における中間生成物であり、著者らは BaP 処置による DG 減少がアルキル鎖付加ステージでのリン脂質合成の中断の結果であると示唆しました。表 3 に、ポジティブおよびネガティブイオンデータセットからアバundanceが大幅に異なる脂質クラスの概要を示します。

先述の報告とは異なり、BaP 処置によるリゾホスファチジルコリン (LPC) またはリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) クラスのアバundanceの大幅な減少は観察されませんでした。正規化と MS 脂質データセットのメソッド処理の違いを含め、いくつかの理由がこの不一致の原因である可能性があります。今回は、前回の研究で報告されていない脂質クラスの大きな違いを観測しました。BaP 処置された細胞と溶媒対照群を比べると、セラミド非ヒドロキシ脂肪酸-スフィンゴシン (Cer_NS) およびヘキサシルセラミド非ヒドロキシ脂肪酸-スフィンゴシン (HexCer_NS) のレベルの増加と、ホスファチジルコリン (PC) のレベルの減少が最も顕著です。前回の研究では、ショットガンリビドミクス手法と脂質クラスの制限されたパネルのためのターゲットスクランを適用しましたが、今回のターゲットワークフローは発見段階から開始して、包括的な *in silico* スペクトルライブラリを検索し、その後これらの結果をターゲットデータマイニングのために使用しました。そのため、今回の手法は制限を受けることなく、こうした脂質クラスの違いを発見できた可能性が高いと考えられます。

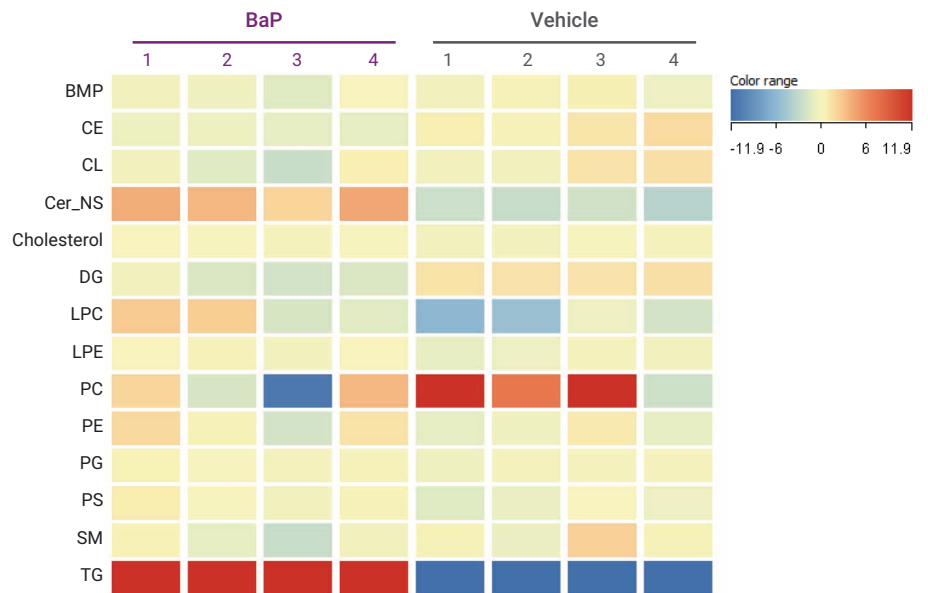


図5. BaP 処置および溶媒対照群のサンプル複製における MPP 脂質クラスマトリックスの総数正規化脂質クラスアバundance。色の範囲は、1 脂質クラス内のすべての脂質フィーチャーの正規化され変換されたアバundanceの合計を表します。

表 3. 脂質クラスのサマリと BaP 処置に誘発された有意差のあるアバundanceレベル

脂質のクラス	略語	BaP 効果	極性 [†]
セラミド非ヒドロキシ脂肪酸-スフィンゴシン	Cer_NS	増加	(+) ^{***} , (-) [*]
ヘキサシルセラミド非ヒドロキシ脂肪酸-スフィンゴシン	HexCer_NS	増加	(-) ^{***}
トリアシルグリセロール	TG	増加	(+) ^{***}
ガングリオシド	GM3	増加	(-) ^{**}
リゾ-ホスファチジルグリセロール	LPG	増加	(-) ^{**}
エーテル結合型ホスファチジルコリン	エーテル PC	増加	(-) [*]
リゾ-ホスファチジルエタノールアミン	LPE	増加	(+) [*]
リゾ-ホスファチジルセリン	LPS	増加	(-) [*]
スルファチド	SHexCer	増加	(-) [*]
ジアシルグリセロール	DG	減少	(+) ^{***}
モノガラクトシルジアシルグリセロール	MGDG	減少	(-) ^{***}
ホスファチジリンノシトール	PI	減少	(-) ^{***}
コレステロールエステル	CE	減少	(+) ^{**}
カルジオリピン	CL	減少	(-) ^{**}
酸化ホスファチジルコリン	OxPC	減少	(-) [*]
酸化ホスファチジリンノシトール	OxPI	減少	(-) [*]
ホスファチジン酸	PA	減少	(-) [*]

[†] 両側 t 検定を使用して溶媒対照群と BaP サンプルグループとの間の有意性を決定しました。

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

各脂質クラス内の個々の脂質フィーチャーにおけるアバダンスの違いを視覚化するために、MPP で脂質マトリックスも作成しました。ホスファチジルコリン (PC) のマトリックスプロットの検査により、BaP 処置によって誘発される飽和脂肪酸アシル鎖付き PC (例えば、PC 16:0_26:0) での減少と多価不飽和脂肪酸アシル鎖付き PC (例えば、PC 18:1_22:6) での増加に見られるような、いくつかの逆パターンが明らかになりました (図 6)。これらの観察も、BaP 処置によって誘発された新しい脂肪酸およびリン脂質合成の減少が原因で、0 ~ 2 個の二重結合を持つ PC が減少することを示唆した Southam *et al.* の解析結果¹ と一致しています。さらに、多価不飽和 PC の増加は、細胞がグルコース以外の外因性の供給源から多価不飽和脂肪酸を得ていることが原因である可能性が高いと仮定しました。

薬物処置による脂質異性体の差分応答

包括的な LC ベースのリピドミクス手法により、同じ合計成分 (つまり、同じ計算精密質量) を持ちクロマトグラフィーで分離される脂質異性体のプロファイリングが可能になりました。データセットにはこのような異性体が非常に多くみられました。ポジティブモードのデータセットでは 430 個のアノテーションされた脂質のうち 94 個が異性体でした。一方、ネガティブモードのデータセットでは 653 個のアノテーションされた脂質のうち 165 個が異性体でした。異性体は、多くのケースで薬物処置に対して大きく異なる応答を示しました。MPP でのセラミド (Cer_NS) マトリックスの検査では、いくつかの異性体ペアにおいて逆の関係が明らかになりました (図 7A)。例えば、部分的に分離された Cer_NS 42:2 異性体のペアの抽出イオンクロマトグラムは、BaP 処置に対する逆応答を裏付けており、BaP 処置では、後で溶出した異性体が先に溶出した異性体よりも減少していました (図 7B)。

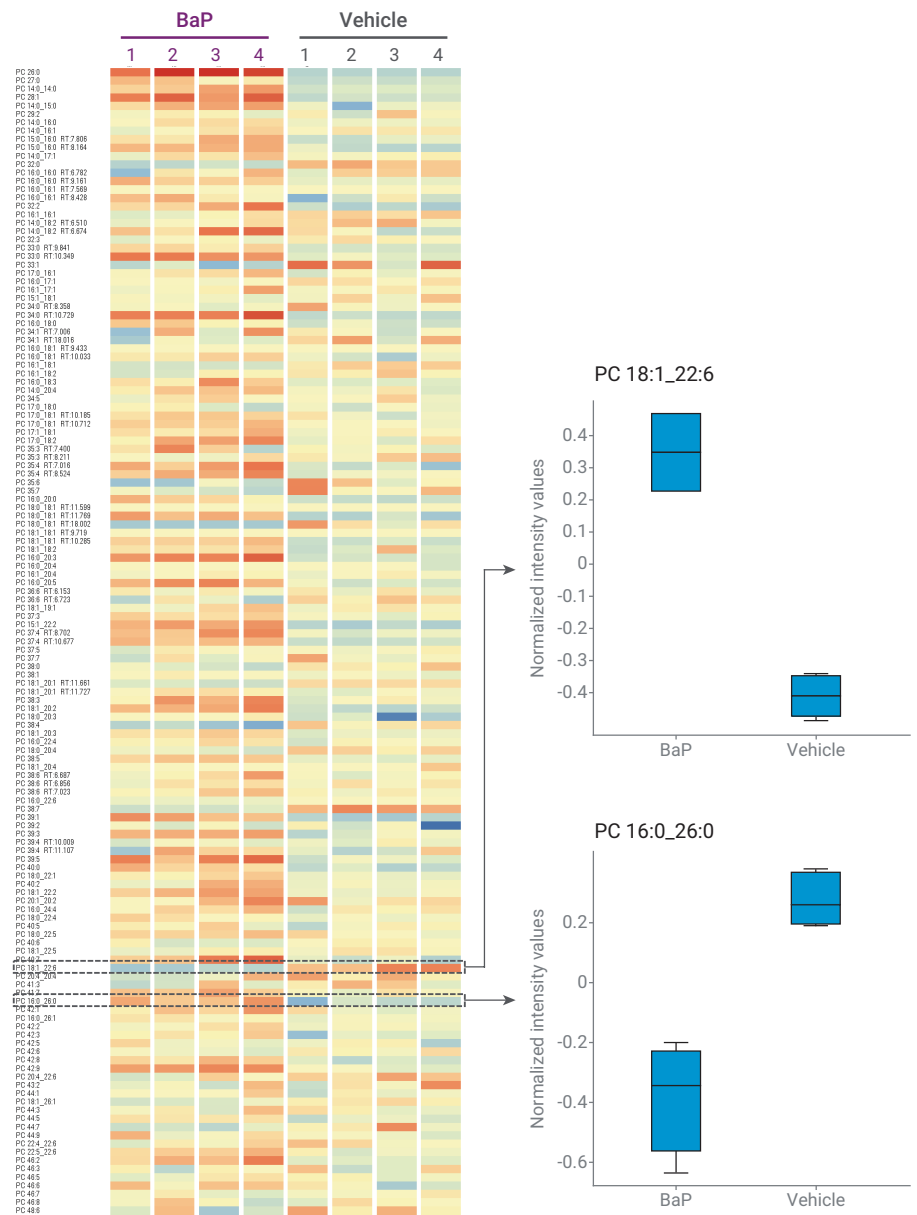


図 6. BaP 処置と溶媒対照群のサンプル複製における MPP 脂質マトリックスの 137 個のホスファチジルコリン (PC) のフィーチャー。右側に 2 個の PC の箱ひげ図を示しています。

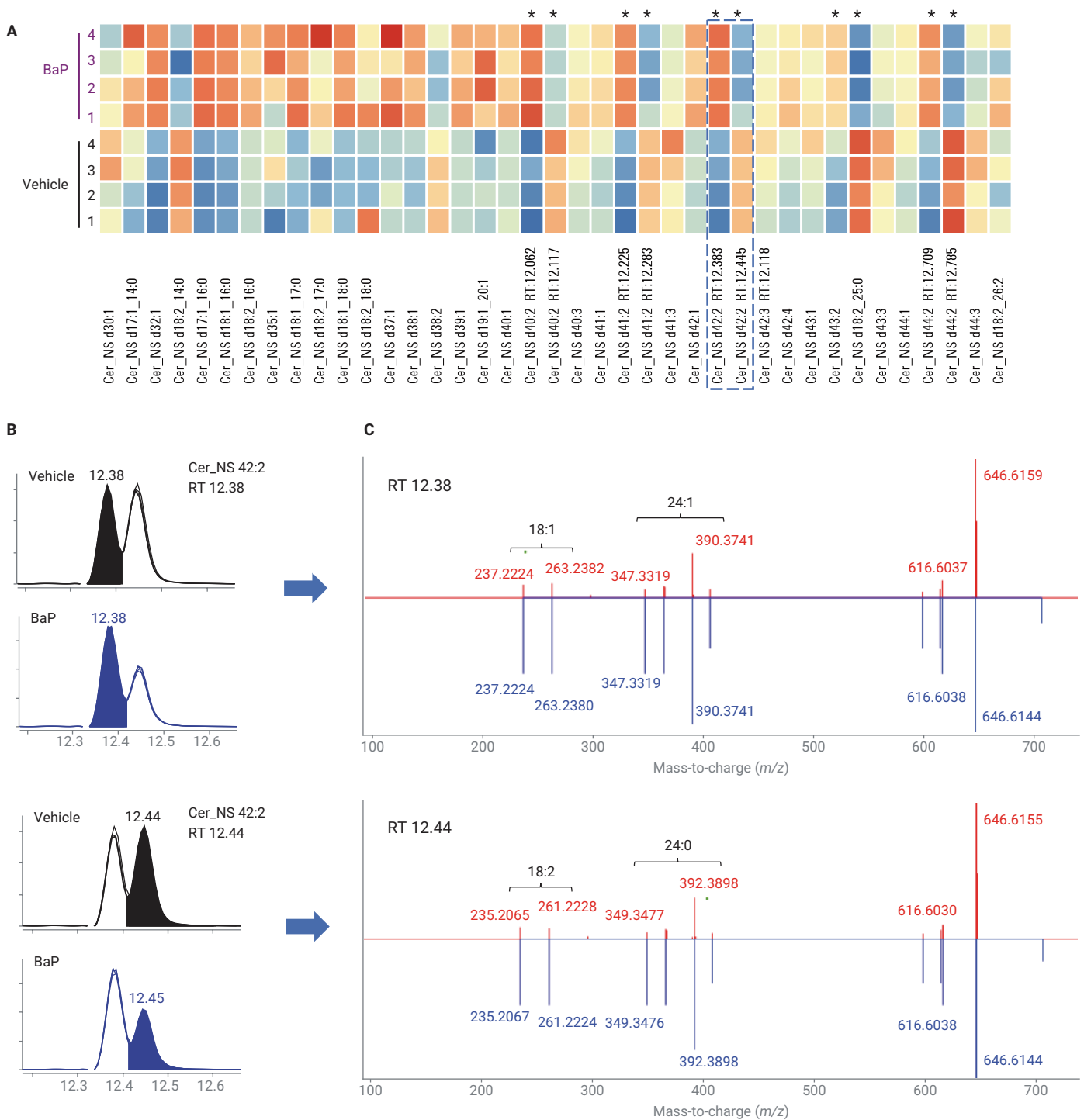


図 7. セラミド非ヒドロキシ脂肪酸-スフィンゴシン (Cer_NS) 異性体の差分応答と構造の解明。(A) BaP 処置と溶媒対照群のサンプル複製を比較した、39 個の Cer_NS フィーチャーの MPP 脂質マトリックス。アスタリスクマークで示した異性体のペアは、同一の質量を持っていますが、リテンションタイムは異なり、逆応答を示しました。(B) 抽出イオンクロマトグラムの重ね合わせ表示により、Cer_NS 42:2 異性体のペアを溶媒対照群 (n = 4) と BaP 処置 (n = 4) で比較しました。(C) Lipid Annotator で生成された、対応するヘッドトゥーテールプロット。主な整合プロダクトイオンのラベルを追加 (測定値が赤、データベース値が青)。2 個のプロット間でのプラスまたはマイナス m/z 2.0156 のプロダクトイオンシフトから、スフィンゴシン塩基およびエステル化された脂肪酸 (ラベル付き) 中の二重結合の数の差の証拠が得られました。測定されたスペクトルが Cer_NS d18:1_24:1 および Cer_NS d18:2_24:0 データベーススペクトルと整合し、Lipid Annotator ソフトウェア内で最も可能性の高い組成として示されました。

これらの異性体には同じ合計成分でアノテーションされていたが、Lipid Annotator の結果を調べたところ、先および後に溶出した異性体がそれぞれ Cer_NS d18:1_24:1 および Cer_NS d18:2_24:0 であったことの有力な証拠が得られました (図 7C)。BaP 処置に対するセラミド異性体の異なる応答の生物学的重要性は知られていませんが、この種の情報はリポミクスプロファイリング手法によってのみ明らかになります。

ノンターゲットリポミクス ワークフローが明らかにする、 特異性の高い非定型脂質

他の文献に記載があるように⁴、ノンターゲットワークフローもサポートされており、前述したターゲットワークフローと同じ PCDL とソフトウェアを使用しています。主な違いは次のとおりです。

- Profinder でノンターゲットフィーチャー抽出法 (再帰的バッチフィーチャー抽出アルゴリズム) を使用すること
- ID Browser ツールを使用して MPP のワークフローにおいて後で脂質アノテーションを実行すること

今回の研究では、Profinder で再帰的バッチフィーチャー抽出アルゴリズムを用いて 16 個のネガティブイオン MS1 データファイルを分析し、2,052 個のフィーチャーを MPP にインポートしました。この結果、先ほど作成した同じネガティブイオン PCDL ライブラリを使用し、2,052 個のフィーチャーのうち 513 個に ID Browser ツールで脂質としてアノテーションされました (RT ±0.10 分を必要な基準として指定しました)。

再現性の高い特徴に関しての差分解析に焦点を当てるために、4 処置条件すべてで要求される CV < 25 % のサンプルのばらつきによってエンティティリストにフィルタをかけました。これにより、リスト全体が 1,377 フィーチャーに減少しました。BaP 処置と溶媒対照群を比較したモデレート t 検定の結果、大きく異なったもの (倍率変化のカットオフ 1.5、p 値 0.05) は 93 エンティティで、このうち 41 エンティティに脂質としてアノテーションが付けられました (図 8A)。最も大きな差異のあるフィーチャーは、溶媒対照群と比較して BaP 細胞で 3.93 倍の増加を示し (p 値 3.54×10^{-5})、エンティティの検査は 4 処置条件で著しい違いを示しました (図 8B)。目的の化合物は、中性質量が 339.2774 Da で、ID Browser はアノテーションを返しませんでした。

この化合物の性質を解明するために、513 個のアノテーション付き脂質と 93 個の異なるエンティティを結合したリストについて、ケンドリックマスディフェクト (KMD) プロットを MPP で作成しました (図 8C)。脂質クラス (X-軸) に対する KMD (Y-軸) のプロットから、それぞれが 2 個の二重結合を持つ 4 つの Cer_NS から成るグループが、目的のフィーチャーに類似した KMD を共有していることが示されました。興味深いことに、4 つのセラミドの質量 (質量 707 ~ 735 Da) は目的のフィーチャー (339 Da) よりもかなり大きな値でした。Lipid Annotator の Lipid Calculator ツールを使用し、仮定上の Cer_NS を生成して m/z 339.2774 に近い結果の質量で合計成分が生成されるかを評価しました。この手法によって、脂質 Cer_NS d18:2_2:0 は観察されたフィーチャー質量の 0.3 ppm 以内の差の質量を示しました。さらに、Qualitative

Analysis ソフトウェアによる分析によって、d18:2 スフィンゴイド骨格に特有の MS/MS プロダクトイオンが示され、候補となる Cer_NS d18:2_2:0 アノテーション (データ提供なし) のさらなる裏付けが得られました。図 8D に示す、Cer_NS d18:2_2:0 の候補となる構造は、C2 セラミドまたは N-アセチルスフィンゴシンとしても知られています。この C2 セラミドは多くの脂質データベース (Lipid Annotator を含む) には存在せず、我々の知る限り、リポミクスの調査においてルーチンで同定されていません。しかし、C2 セラミドは異なる AML 細胞株 (HL-60) 中に生理学的に低レベルで見られました⁵。合成 C2 セラミドは、細胞の増殖を抑制してアポトーシスを誘導する能力を含め、生物学的に活性な特質があることから、研究ツールとして広く使用されています⁶。私たちは、BaP 処置済み細胞中の C2 セラミドの増加が BaP の抗がん効果と関連しているものと推測しており、この情報はがん研究コミュニティにとって興味深いものであると考えています。

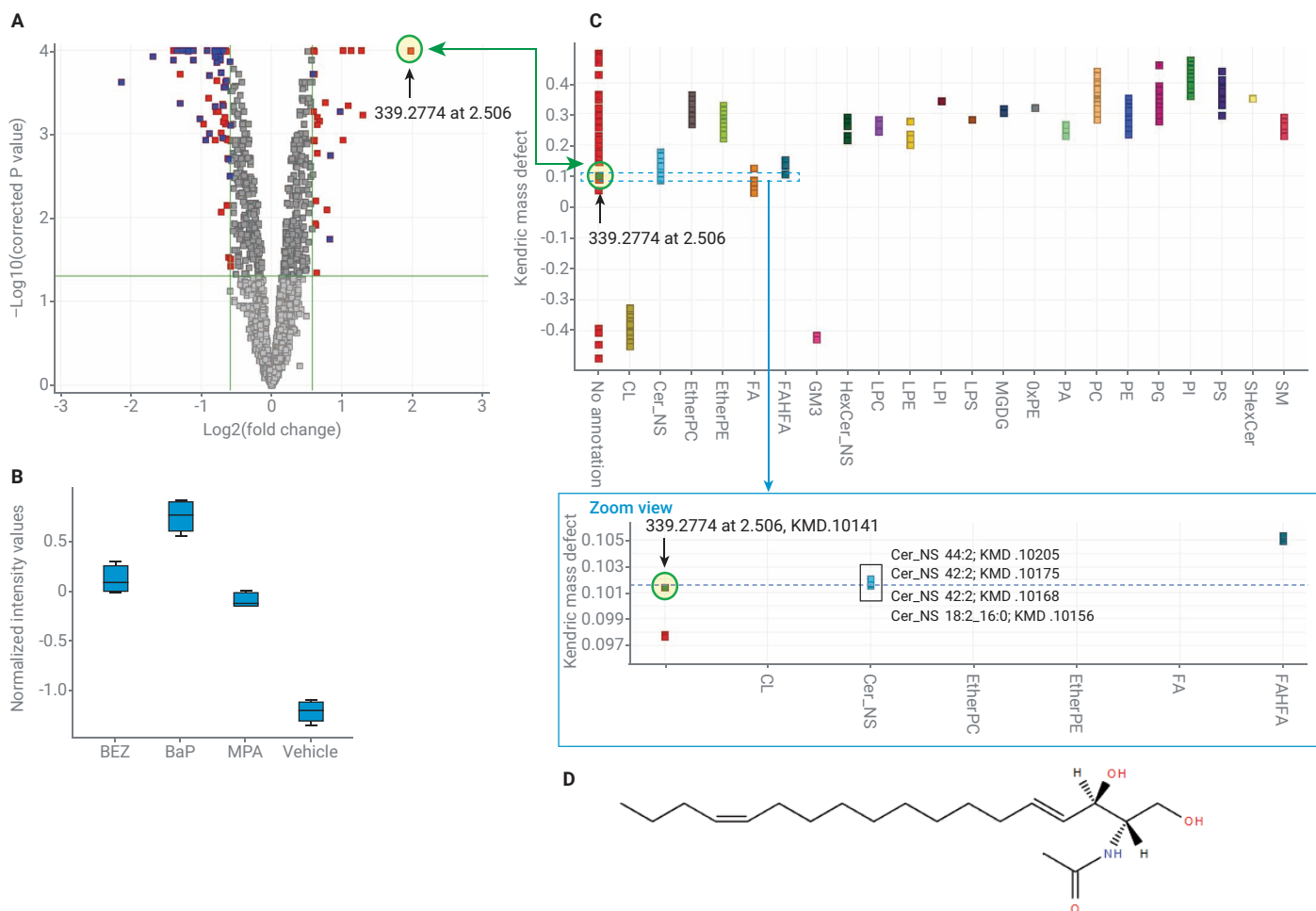


図 8. ノンターゲットワークフローによる未知の差分フィーチャーの解明。(A) BaP 処置と溶媒対照群との比較のためのベンジャミニ-ホックバーク FDR マルチテスト補正を用いてモデレート t 検定から得られた MPP ボルケーノプロット。有意のあるフィーチャー (倍率変化のカットオフ >1.5、p 値 > 0.05) が青色 (アノテーションされた脂質) と赤色 (アノテーションされていないフィーチャー) で色分けされています。目的のフィーチャー (m/z 339.2774 at 2.506) は緑色の円で囲まれています。(B) 4 つの薬物処置条件についての目的のフィーチャーの箱ひげ図。(C) 513 個のアノテーションされた脂質と 93 個の差分フィーチャー ($n = 565$) のリストが結合されたエンティティリストの MPP ケンドリックマスディフェクト (KMD) プロット。PCDL によってアノテーションされていないフィーチャーが赤色の最初の列で示されています。拡大された領域は、目的のフィーチャーの KMD によって並べた Cer_NS のグループです。(D) 目的のフィーチャーの Cer_NS 18:2:2:0 候補構造

結論

このアプリケーションノートでは、Lipid Annotator ソフトウェアを含むリピドミクスプロファイリングワークフローによって、脂質アノテーションと複雑なサンプルの差分解析を大幅に改善できることを実証しました。ターゲットワークフローを適用して、BEZ および MPA 薬品候補の組み合わせに反応する急性骨髄性白血病 K562 細胞株のリピドームの変化を調べました。結果の分析により、薬物処置に反応するいくつかの細胞の変化が明らかになりました。例えば、ジアシルグリセロールの減少、トリアシルグリセロールの増加、脂肪酸アシル成分の相違がありました。総合的に考えると、これらの結果は、BaP 混合薬が脂質生成の中断によって抗がん特性を働かせることを示唆する前回のレポートの裏付けとなります。

この脂質プロファイリングワークフローは、従来のショットガンベースのリピドミクス手法よりもさらに包括的な脂質アノテーションも提供します。特に、これまで報告されていなかった、BaP 処置により誘発される脂質クラスアバンドランス中の有意な相違を同定しました。また、クロマトグラフィー分離され、薬物処置に対して異なる反応を示す脂質異性体の特異的なケースも同定しました。最後に、ノンターゲット手法において、補完ツールを使用することで、アノテーションされていない脂質フィーチャーに候補となるアノテーションを提供できることを示しました。

参考文献

1. Southam, A. D. *et al.* Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids. *Cancer Res.* **2015**, *75*(12), 2530–2540.
2. Sartain, M. *et al.* Improving Coverage of the Plasma Lipidome Using Iterative MS/MS Data Acquisition Combined with Lipid Annotator and 6546 LC/Q-TOF. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0775EN, **2019**.
3. MassHunter Profinder: Batch Processing for High-Quality Feature Extraction of Mass Spectrometry Data. *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-3947EN, **2014**.
4. Lipidomics Analysis with Lipid Annotator and Mass Profiler Professional. *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5994-1111EN, **2019**.
5. Snyder, F. *et al.* Biosynthesis of N-Acetylsphingosine by Platelet-activating Factor: Sphingosine CoA-independent Transacetylase in HL-60 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*(1), 209–217.
6. Hannun, Y. A. *et al.* Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science* **1993**, *259*(5102), 1769–1771.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, October 25, 2019
5994-1356JAJP

