

脂質由来ラジカル・酸化リン脂質の検出と構造解析

山田 健一

最近、酸化リン脂質が注目されている。リン脂質内の不飽和脂肪酸は、容易に酸化され酸化リン脂質を生成する。あまりにも容易に酸化されるため、これらは単なる副生成物、あるいは不飽和脂肪酸は酸化反応に対する単なるバッファーとも考えられてきた。しかし、最近になって、酸化リン脂質およびその代謝産物が炎症反応などに関与している可能性が報告され、特に、2012年に提唱された細胞死「フェロトーシス」の原因分子として考えられたことで、ますます注目されている。しかしながら、これら酸化リン脂質は反応性が高いために適切に測定する技術が制限されていた。研究を加速するには、やはり分子そのものの検出が必要不可欠であろう。そこで本稿では、脂質過酸化反応の連鎖反応中心である脂質由来ラジカルの検出と構造解析、ならびに酸化リン脂質に対する構造解析技術について記載する。

1. はじめに

リン脂質やその代謝産物は、生体内で細胞膜の構成成分として、さらには代謝、シグナル伝達調節に関わる因子などとして、生体内機能維持に重要な役割を果たしている。一方で、リン脂質内に含まれる多価不飽和脂肪酸は、二重結合に挟まれたメチレン基を有するために、細胞小器官で発生する活性酸素や、細胞外のさまざまな要因により容易に酸化され、酸化リン脂質 (oxPLs) を生成する。これまで、不飽和脂肪酸があまりにも容易に酸化されることから、酸化リン脂質は酸化障害の結果生じた単なる副生成物、あるいは不飽和脂肪酸は酸化障害のバッファーであるとも考えられてきた。しかし最近になって、これら酸化リン脂質やその代謝産物が炎症反応やさまざまな疾患の原因分子として作用することが報告され始めている。たとえば、脂質過酸化反応依存的な新たな細胞死機序「フェロトーシス」が2012年に報告された¹⁾。本細胞死は、脂質過酸化物と遊離鉄の蓄積が原因であり、虚血性再灌流障害²⁾や神経変性疾患³⁾などさまざまな疾患への関与も指摘されてい

る。一方で、酸化型 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine がマクロファージと樹状細胞の免疫応答の調節⁴⁾に、エポキシ化 ω 3脂肪酸がアレルギー⁵⁾に関係していることも報告された。また、酸化リン脂質の主要な成分である脂肪酸アルデヒドを持つリン脂質 (リン脂質アルデヒド) は、酸化LDL中で生成しマクロファージに認識される⁶⁾。後述するが、リン脂質アルデヒドは、酸化反応による酸素分子の結合と脂肪酸鎖の切断による鎖長の短縮反応の過程で生成される。そのため、脂肪酸部位全体としての水溶性が増す。その結果、水溶性環境 (細胞表面) に移行しやすくなり、CD36 などスカベンジャー受容体に認識⁷⁾されるという、「lipid whisker model」⁸⁾も提唱されている。また、これら脂肪酸アルデヒド、リン脂質アルデヒドは、タンパク質中のアミノ酸 (リシンやヒスチジンなど) と容易に反応して複合体を形成する。たとえば、複合体である ω -(2-carboxyethyl)pyrrole は、血管新生の誘導因子⁹⁾として滲出型加齢黄斑変性患者網膜組織¹⁰⁾で検出されている。

このように、最近になって酸化リン脂質が炎症や細胞死などに関与することが明らかになりつつあるものの、酸化脂質そのものと生体内成分との反応性が高く、あるいは生成量が微量であり、かつ種類が多様であるため、測定できる手法は限られている。そこで、本稿では、我々の最近の知見を中心に酸化脂質の測定法について記載する。

2. 脂質過酸化反応

検出方法について述べる前に、脂質過酸化反応について簡単に記載する。不飽和脂肪酸は、酸化反応を受けや

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)
Detection and structural analysis of lipid-derived radicals and oxidized phospholipids

Ken-ichi Yamada (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940329

© 2022 公益社団法人日本生化学会

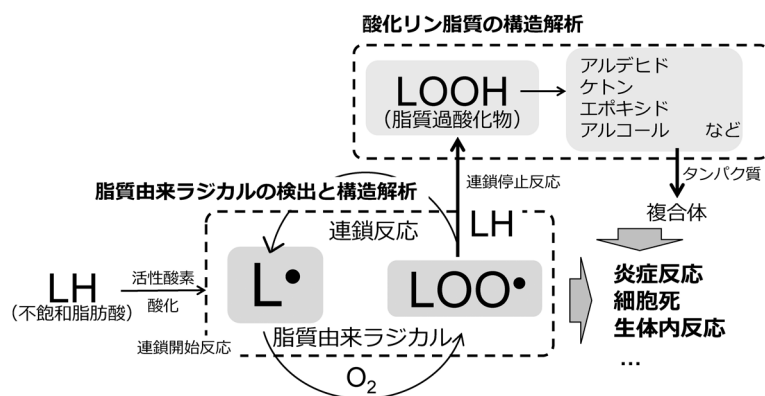


図1 脂質過酸化反応およびその代謝産物

不飽和脂肪酸は、活性酸素などにより容易に酸化され、脂質由来ラジカルが生成する。また、脂質過酸化物やタンパク質との反応により複合体が生成し、これらが、炎症反応や細胞死誘発などに関与しているとの報告が相次いでいる。

すい。これは、不飽和脂肪酸内 bis-allylic carbons の水素原子の結合乖離エネルギーが、一般的なアルキル基の C-H 結合 (約 100 kcal/mol) に比べて小さいことによる¹¹⁾。そのため、以下のような脂質過酸化連鎖反応が生じる (図1)。

- (1) 不飽和脂肪酸 (LH) から水素原子が引き抜かれ「脂質由来炭素中心ラジカル (L•)」が生成し、連鎖反応が開始。
- (2) 生成した L• は、直ちに溶存酸素分子と反応し ($k_{perox} = 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹²⁾、脂質ペルオキシラジカル (LOO•) を生成。
- (3) LOO• は、周囲の不飽和脂肪酸から水素原子を引き抜き、脂質ペルオキシド (LOOH) と L• を生成し、酸化障害が伝搬する ($k_p = 10^{1-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹³⁾。
- (4) その後、LOOH は脂質ペルオキシラジカルやアルコキシラジカルなどの酸素中心ラジカルに開裂し、フリーラジカル反応が広範に伝播する。さらに、生成した脂質由来酸素中心ラジカルは、4-ヒドロキシ-2-ノネナールなどのアルデヒド体、またケトンやエポキシド体などへと分解される。

このように不飽和脂肪酸はひとたび酸化されると、脂質由来ラジカルが常に存在している状態となり、脂質過酸化代謝産物が大量に生成されることになる。加えて、リン脂質は生体内において、疎水性相互作用により密集 (凝集) し存在することから、これら連鎖的伝搬反応は急激に拡大する。また、位置異性体、立体異性体、などを考慮すると、酸化リン脂質の数は数百種類存在するであろう¹⁴⁾。さらに、反応性が高く、それ自身が細胞毒性や変異原性を有する。加えて、アルデヒド体は、活性酸素種よりも生体内半減期が長く、細胞内外へ拡散できる。近年では、これらアルデヒド体とタンパク質との複合体が疾患と密接に関連することも報告されている。

このように、脂質過酸化反応は脂質由来ラジカル形成という質的变化の一点に端を発するが、脂質分子の機能障害、過酸化物の蓄積、さらにはタンパク質複合体形成など多様な病態ステージに影響を及ぼしていることになる。こ

れら脂質過酸化物やその代謝産物と疾患との関連を解析するためには、やはり検出技術開発が不可欠である。これまで、脂質過酸化物やその代謝産物であるアルデヒド体およびそのタンパク質複合体については、質量分析装置を用いた検出^{15, 16)} や抗原抗体反応を利用した方法¹⁷⁾ など、有用な手法が数多く報告されている。そこで、脂質由来ラジカルおよび脂質過酸化産物の測定などについて述べる。

3. 脂質由来ラジカルの測定

1) スピントラップ法

L• や LOO• などの脂質由来ラジカルは、脂質過酸化連鎖反応の中心であり、反応性がきわめて高い。現在報告されている代表的な測定法としては、1) スピントラップ法、2) 蛍光プローブ法、の二つがあげられる。1) スピントラップ法とは、ラジカル種を安定な反応付加体へと誘導体化を行う方法である。たとえば、*N*-tert-butyl- α -phenylnitrone (PBN) や α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butyl-nitrone (POBN) といったニトロ化合物は、特に炭素中心ラジカル種と反応し、より安定なラジカル付加体を形成する。これら付加体を、電子スピン共鳴装置にて検出し、さらに liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) を組み合わせることで、脂質由来ラジカルの構造解析が可能となる。実際に、Qian らは、 ω 6 系不飽和脂肪酸のリノール酸とアラキドン酸、あるいは ω 3 系のリノレン酸とドコサヘキサエン酸の、酵素酸化反応において生成する脂質由来炭素中心ラジカルの検出に成功している^{18, 19)}。

2) 蛍光プローブ法: BODIPY 骨格のプローブ

近年では、抗酸化分子の高い酸化還元応答性を利用した脂質由来ラジカル検出蛍光プローブの開発も進められている。このプローブでは、先のスピントラップ法と LC/MS/MS の組み合わせで得られるような脂質由来ラジカルの構造情報を得ることはできない。しかし、高感度な蛍光分析法であり、細胞イメージングも可能であることから、幅広く

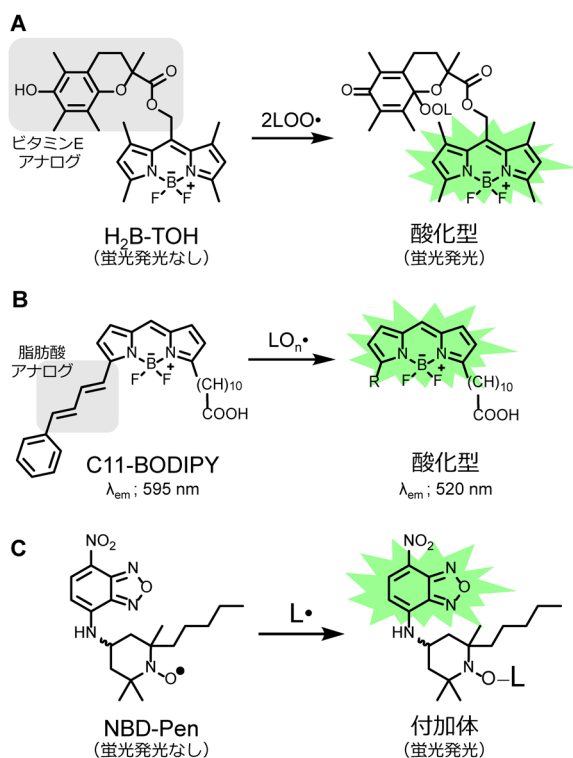


図2 脂質由来ラジカル検出蛍光プローブ

(A) $\text{H}_2\text{B-TOH}$, (B) C11-BODIPY , (C) NBD-Pen . それぞれのプローブは、脂質由来ラジカル（炭素中心ラジカル、アルコキシルラジカル、ペルオキシルラジカル）などと反応し、蛍光がTurn-On, あるいは波長が変化する。

応用されている。

Krumovaらは、フェノール性抗酸化分子〔chromanol（ビタミンEの活性部位）〕の酸化還元電位が脂質由来ラジカル（特に $\text{LOO}\cdot$ ）と反応前後で大きく変化することに着目し、これらを蛍光スイッチとした脂質由来ラジカル検出蛍光（BODIPY based）プローブ、 $\text{H}_2\text{B-TOH}$ を開発した^{20, 21)}（図2A）。本プローブは、通常、抗酸化分子部位からBODIPYへの光誘起電子移動（PeT）により消光しているが、反応後抗酸化分子部位のHOMOレベルが低下するため、PeTが起こらず発光する²⁰⁾。また、蛍光プローブの特徴を生かし、培養細胞内脂質由来ラジカルの蛍光イメージング²²⁾や、脂質由来ラジカルと抗酸化分子との反応の速度論的解析²³⁾も進められている。

一方、Drummenらは、抗酸化分子であるカロテノイドとBODIPYを連結させたratio metric蛍光プローブ C11-BODIPY を報告した²⁴⁾（図2B）。本プローブは、カロテノイドとBODIPY部位との π 電子共役が、ラジカル反応により切断されることで、励起蛍光波長が大きくシフトする〔595 nm（非酸化型）/520 nm（酸化型）〕。このような光応答性を利用することで、培養細胞中の脂質由来ラジカルの解析も可能である。この C11-BODIPY とペルオキシルラジカルとの反応速度は、 $6.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と推定されている²⁵⁾。一方、本プローブは、近年精力的に研究が進められているフェロトキシス¹⁾の研究分野において広く利用されてお

り、培養細胞中脂質由来ラジカルの蛍光イメージングも可能である^{26, 27)}。さらに最近では、これら上記のプローブに、ミトコンドリア移行性を付与した蛍光プローブも開発されている^{28, 29)}。

3) 蛍光プローブ法：NBD-Pen

上述した手法は非常に有用であり、多くの研究に利用されている。一方で、動物実験などへの応用研究、また脂質由来ラジカルの構造情報などについては、さらなる改良が必要である。そこで我々は、脂質由来ラジカルを直接捉え、かつ蛍光イメージング可能な検出プローブの開発を進めた。まず、着目したのが、分子内に安定な不対電子を有する有機スピン化合物、ニトロキシド化合物である。このニトロキシド内の不対電子は、水溶液中でも安定に存在する（代表的なニトロキシドであるTempolは、少なくとも数か月間水溶液中で安定に存在している）。ニトロキシドと炭素中心ラジカルとの反応は、主にlaser flash photolysisや熱分解性アゾイニシエーターを用いて速度論的解析が進められている³⁰⁾。一般的にニトロキシド化合物は、特に炭素中心ラジカルときわめて高い反応性（拡散律速反応に近い速度、 $k = 10^{8-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ）³⁰⁻³²⁾を有し、スピントラップ剤と炭素中心ラジカルとの反応（ $k = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度）^{33, 34)}に比べてはるかに大きく、酸素分子³⁵⁾とほぼ同程度の反応性である。また、ニトロキシド内のラジカルと炭素中心ラジカルとの反応は、ラジカル-ラジカルカップリング反応であり、より安定なアルコキシルアミン付加体を形成する³⁶⁾。こうした反応特性より、ポリマー化学の研究分野における光安定剤（ヒンダードアミン光安定剤の活性種）をはじめ³⁷⁾、生物物理学におけるスピンプローブ、有機化学における合成反応中間体の解析、さらには抗酸化物質などとしても応用されている³⁸⁾。

代表的なニトロキシド化合物であるTEMPOは、炭素中心ラジカル種に対して高い反応性を示す一方で、アスコルビン酸などの抗酸化分子とも反応し^{39, 40)}、非常磁性的のヒドロキシルアミンへと還元される（ $k = 10^{1-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ）。これら抗酸化分子はラジカル分子よりも生体内に多く存在するため、ラジカル解析の障害となりえる。そこで我々は、ベリジン系ニトロキシドの α 位への置換基修飾合成法を開発し⁴¹⁾、脂質由来ラジカルに対して高い反応選択性を有するニトロキシド誘導体を開発した⁴²⁾。また、ニトロキシドは周囲に存在する蛍光原子団をスピン交換や光誘起電子移動により消光させる⁴³⁻⁴⁵⁾ことから、酸化還元物質に対する蛍光プローブの発光制御部位としても活用されている⁴⁶⁾。

以上の点を踏まえ、我々は、脂質由来ラジカルと反応し付加体形成することで蛍光発光するプローブ「NBD-Pen」を開発した⁴⁷⁾（図2C）。本プローブは、過酸化水素や、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素とは、ほとんど反応しない（図3A）。一方で、リノール酸（LA）、 α リノレン酸（ALA）、アラキドン酸（AA）などを

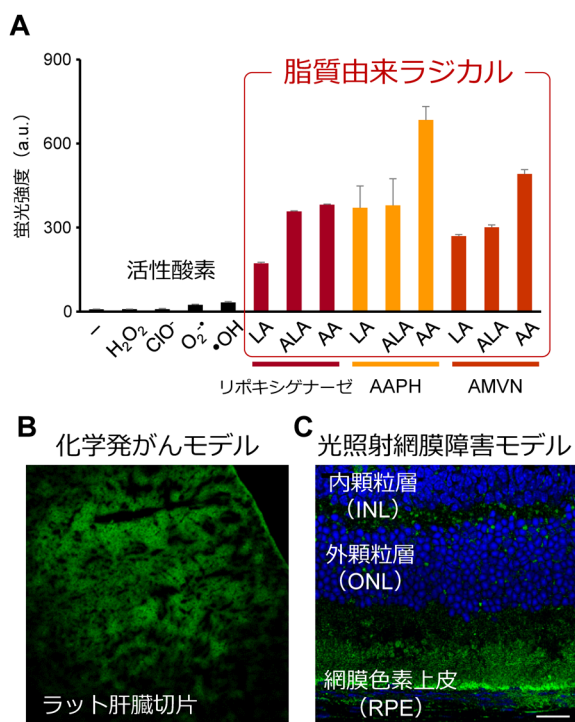


図3 脂質由来ラジカル検出蛍光プローブ (NBD-Pen) の(A)反応性および (B, C) 疾患モデルへの応用

(A) NBD-Penは、脂質由来ラジカルと反応すると蛍光消光が解除され、蛍光を発光するようになる。このNBD-Penは活性酸素とは反応せず、リボキシゲナーゼあるいはアゾ化合物刺激により生成した脂質由来ラジカルと反応し蛍光強度が上昇した。H₂O₂: 過酸化水素、ClO₂⁻: 次亜塩素酸、O₂⁻: スーパーオキシド、·OH: ヒドロキシルラジカル、LA: リノール酸、ALA: αリノレン酸、AA: アラキドン酸、AAPH, AMVN: アゾ化合物。(B) ジエチルニトロソアミン誘発肝がんモデル動物の肝臓切片、(C) 光照射網膜障害モデル動物の網膜組織切片。それぞれの疾患モデル動物にNBD-Penを投与し、組織切片を蛍光観察した。

基質とし、リボキシゲナーゼや、AAPHやAMVNなどアゾ化合物の刺激により生成した脂質由来ラジカルと反応し、蛍光発光する (図3A)。このとき、NBD-Pen蛍光強度は、ほぼAA>ALA>LAの順であったが、これはおそらく基質である不飽和脂肪酸内の二重結合の数の差によるためであろう。

では、NBD-Penは、本当に脂質由来ラジカルと反応して蛍光発光しているのだろうか？ 本プローブの n -オクタノール/水分配係数 ($\log P_{o/w}$) は2.46であり⁴⁷⁾、用いた蛍光団NBD基は環境応答性蛍光団である。以上から、本プローブの大部分は、少なくとも脂溶性環境下に存在していると考えられる。一方で、本プローブは、10μMまでの濃度でHepG2細胞などに対して毒性を示さない。さらに本プローブの特徴は、動物モデルの組織切片中での蛍光イメージングが可能である点である。以下、実際に疾患動物モデルで脂質由来ラジカルを検出した結果を示す。

化学発がん物質であるジエチルニトロソアミンは、シトクロムP450で代謝され、その際に炭素中心ラジカルが生成することが報告されている^{48, 49)}。このジエチルニトロソアミンを動物に投与し、1時間後にNBD-Penを腹腔内投与

した。その後肝組織切片を作成し、蛍光イメージングを行ったところ、蛍光強度が有意に増加し (図3B)、P450阻害剤であるSKF525Aの投与で蛍光強度は減弱した。さらに、別の疾患モデル動物として、網膜障害モデルでの例を示す。眼、特に網膜組織ではドコサヘキサエン酸などの不飽和脂肪酸が多く存在する⁵⁰⁾。さらに網膜組織は酸素消費量が高く⁵¹⁾、常に光を浴びており、網膜障害への酸化脂質の関与が想定されている。そこで、光照射網膜障害モデル動物を作製し、NBD-Penを投与したところ、網膜切片中での蛍光強度が上昇し (図3C)、脂質由来ラジカル阻害剤の投与で蛍光強度は有意に減弱した⁵²⁾。このことから、脂質由来ラジカルは確かに疾患モデル動物でも生成しているといえる。その他、酸化LDL中での検出も可能であった⁵³⁾。

4) 脂質由来ラジカルは疾患発症の原因か？

では、生体内で生成した脂質由来ラジカルは、疾患を誘発、あるいは進展する原因分子なのであるだろうか？ それとも結果として生成した産物なのだろうか？ もし、原因であれば、脂質由来ラジカルの捕捉により、疾患発症や進展は軽減されるはずである。そこで、NBD-Penの蛍光団を外した脂質由来ラジカル捕捉剤OH-Pen (化合物1)、あるいは脂質由来ラジカルとの反応性をブロックしたOH-PenNOMe (化合物2) を新たに合成した⁴⁷⁾。先に述べたように、ジエチルニトロソアミン投与1時間後に脂質由来ラジカルが生成していることを、NBD-Penを用いて示した (図3B)。そこで、ジエチルニトロソアミン投与1時間後にNBD-Penの代わりにOH-Penを動物に投与したところ、ジエチルニトロソアミン投与で上昇した肝組織中の酸化脂質由来アルデヒド体であるマロンジアルデヒド、4-ヒドロキシ-2-ノネナール、アクロレイン、また炎症や細胞死のマーカーである8-OHdG, ALT, TUNEL, PCNA, IL-6、いずれも有意に減少した⁴⁷⁾ (図4)。しかしながら、脂質由来ラジカルと反応性を持たないOH-PenNOMeの投与では、抑制効果はまったくなかった。さらに、ジエチルニトロソアミン投与1時間後にOH-PenあるいはOH-PenNOMeを一度投与し、そのまま3か月間動物を飼育したところ、ジエチルニトロソアミン投与で上昇した肝foci数は、OH-Pen投与で有意に減少した (図5A)。一方で、OH-PenNOMeでは効果はまったくなかった。興味深いことに、NBD-Penで蛍光強度の上昇がみられなかったジエチルニトロソアミン投与24時間後にOH-Penを投与しても肝foci数はほとんど変わらない。以上の結果は、ジエチルニトロソアミン投与初期に脂質由来ラジカルが生成し、何らかの経路により肝発がんの原因になりうることを示すものである。また、同様の検討を先の光照射網膜障害モデル動物でも実施し、脂質由来ラジカル捕捉剤の投与で網膜障害を有意に軽減することも明らかにしている⁵²⁾ (図5B)。

これまで脂質過酸化反応の連鎖反応の起点である脂質由来ラジカルが疾患に関与していることが想定されていた。

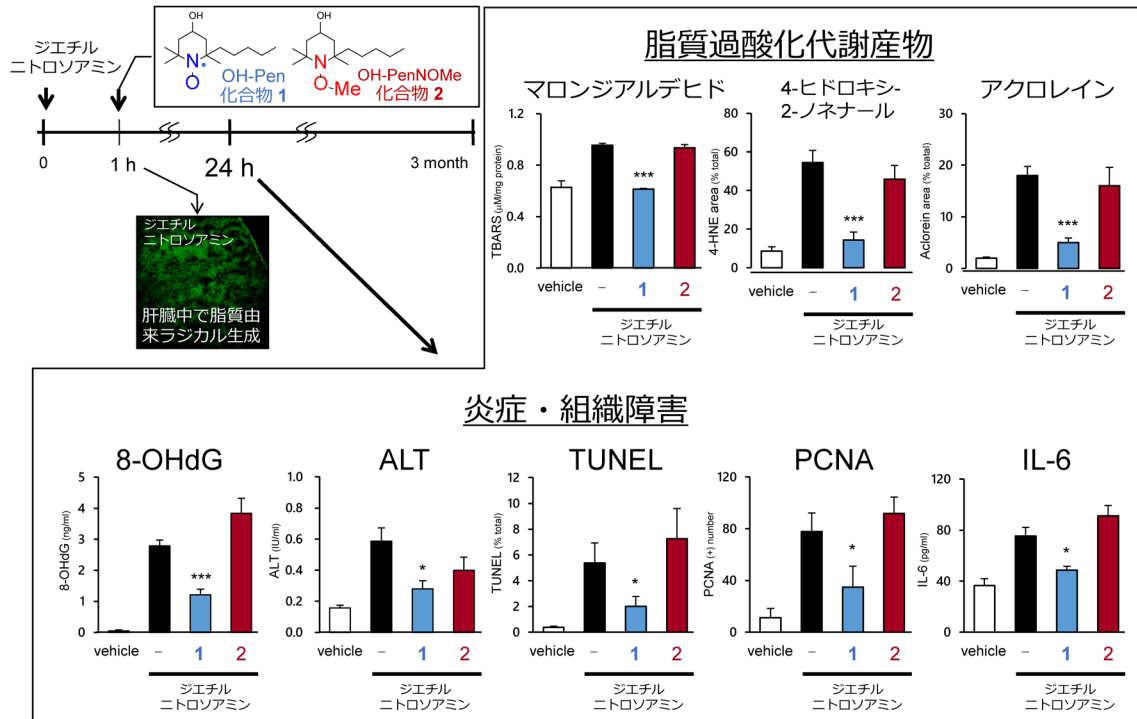


図4 ジエチルニトロソアミン誘発肝障害に対する脂質由来ラジカルの関与
脂質由来ラジカルが生成していたジェチルニトロソアミン投与1時間後に、脂質由来ラジカル捕捉剤OH-Pen（化合物1）、あるいは捕捉作用がないOH-PenNOMe（化合物2）、をジェチルニトロソアミン投与1時間後に注射し、24時間後の脂質過酸化代謝産物および炎症・組織障害指標を測定した。8-OHdG：8-ヒドロキシデオキシグアノシン（DNA酸化の指標）、ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ、TUNEL：TUNEL染色（DNA断片化を検出）、PCNA：proliferating cell nuclear antigen。

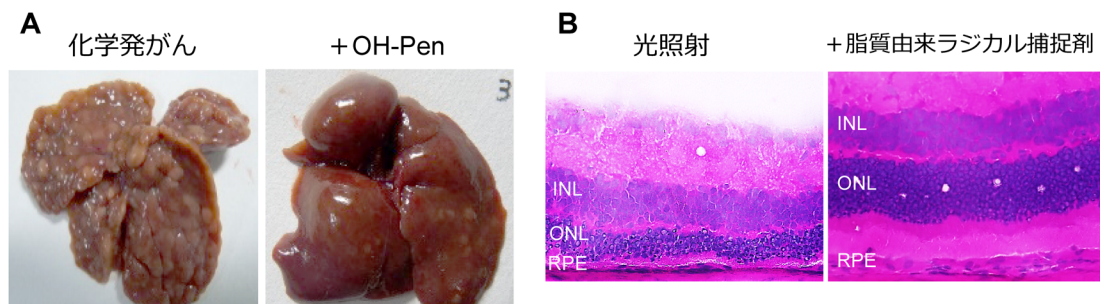


図5 脂質由来ラジカル捕捉剤による疾患抑制効果
(A) ジエチルニトロソアミン誘発肝がん。ジェチルニトロソアミン投与3か月後の肝臓。OH-Pen投与により肝foci数は有意に減少した。(B) 照射後、7日目の網膜組織。網膜細胞が減少した。脂質由来ラジカル捕捉剤（CPC-Pen）投与により網膜細胞減少を有意に抑制した。INL：内顆粒層、ONL：外顆粒層、RPE：網膜色素上皮細胞。

しかし、それを証明する適切な手法は、特に動物実験では制限されていたように思われる。今回、脂質由来ラジカルが生成している時期に阻害剤を投与すれば疾患発症を軽減できることがわかり、脂質由来ラジカルの疾患発症への関与、あるいは阻害剤投与タイミングに関する情報が得られたのではないかと考えている。なお、今回OH-Penを用いた検討を紹介したが、蛍光プローブでも同様に疾患の発症を軽減できる。

5) 脂質由来ラジカルの構造解析

脂質由来ラジカルが化学発がんや光照射網膜障害モデル

ル動物の発症に関与することがわかった。では、それら疾患に関与すると考えられる脂質由来ラジカルの構造情報はどのようなものであろうか？ NBD-Penの開発コンセプトは、脂質由来ラジカルとラジカル-ラジカル反応により共有結合を形成するということである⁴⁷⁾。そのため、NBD-Pen内の不対電子が消失し、蛍光発光する。すなわち、NBD-Penは、脂質由来ラジカルと反応し蛍光性付加体を形成する。このことは、この付加体を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分離し蛍光検出にて保持時間を確定、その保持時間で質量分析を行えば、結合した脂質由来ラジカルの構造を解析できるはずである⁵⁴⁾（図6）。そ

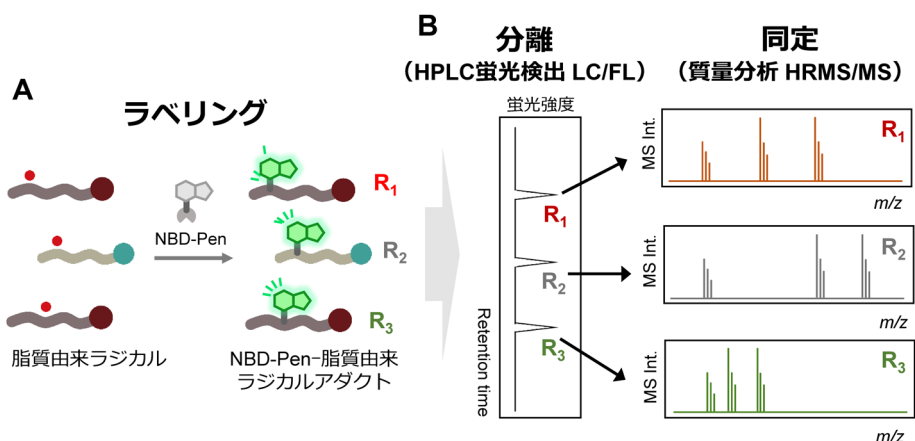


図6 NBD-PenとHPLC蛍光検出質量分析 (LC/FL/HRMS/MS) システムによる不飽和脂肪酸由来ラジカルの構造解析 (A) NBD-Penは脂質由来ラジカルを効率的に捕捉し、安定なNBD-Pen-脂質由来ラジカルアダクトを生成する。(B) 蛍光プローブとLC/FL/HRMS/MSの組合わせにより、クロマトグラムの蛍光ピークの保持時間で質量情報を取得する。

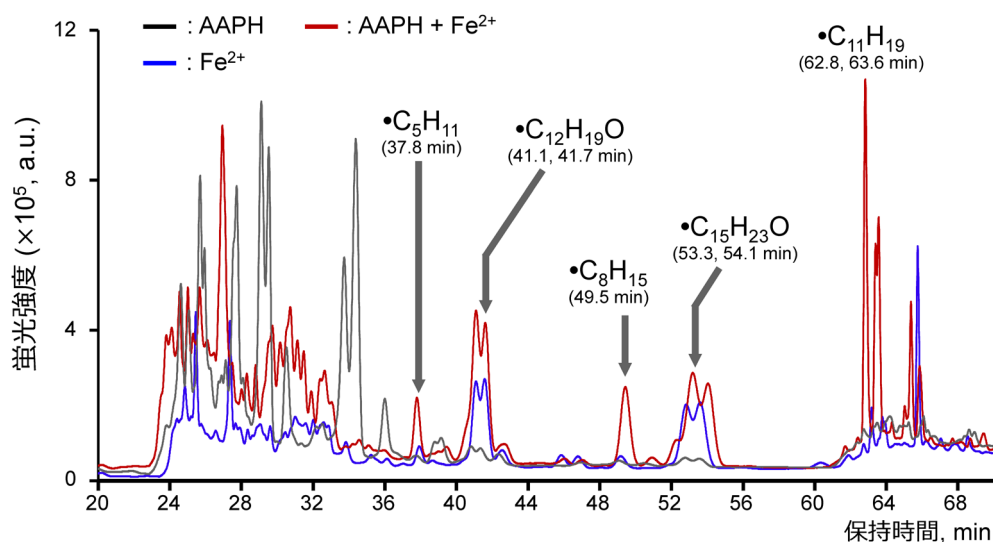


図7 NBD-Penと脂質由来ラジカル付加体の蛍光クロマトグラム アラキドン酸を、AAPH、二価鉄、あるいはAAPH+二価鉄で刺激し、NBD-Penにて脂質由来ラジカルを捕捉し、LC/FL/HRMS/MSシステムにて解析した。断片化ラジカルが生成しており、刺激の種類によってNBD由来の蛍光強度は大きく異なった。

こで、先の実験と同様に、NBD-Penをアラキドン酸／リポキシゲナーゼと反応させ、HPLCにて蛍光検出したところ、クロマトグラムのうちに複数の蛍光ピークが観察された。このピークは、リポキシゲナーゼの濃度依存的に上昇した。また、リポキシゲナーゼ阻害剤の添加により有意に減弱した。そこで、刺激の種類により蛍光ピークの強度が変わるどうかを検討した。アゾ化合物であるAAPH、あるいは二価鉄、さらにその組合わせで刺激したところ、クロマトグラム中の蛍光ピーク強度が刺激の種類によって大きく変動した(図7)。そして、蛍光強度が上昇した保持時間で溶出される物質に対して質量分析を行ったところ、 $\bullet C_5H_{11}$ や $\bullet C_{12}H_{19}O$ など炭素鎖が短い断片化ラジカル体が複数生成していることがわかった。

では、基質であるアラキドン酸からどのようにして炭素鎖が短い断片化ラジカルが生成したのであろうか？こ

れまで、たとえば、 β 切断ではアルキルラジカルが、またジオキセタン開裂やホック開裂では、オキソアルケニルラジカルが生成するなど、生成機構がいくつか報告されている⁵⁵⁾(図8)。さらに、用いる基質としてアラキドン酸の代わりに $\omega 3$ 系のドコサヘキサエン酸などを用いた場合には、二重結合の位置が異なるため、生成する断片化ラジカルの質量が水素2個分違うことが想定される。そこで、これらの開裂パターンから、生成するであろう断片化ラジカルパターンを推測し、質量分析を行った⁵⁴⁾。また、重水素化した脂肪酸も利用した。その結果、たとえばリノール酸やアラキドン酸などの $\omega 6$ 系では、 $\bullet C_5H_{11}$ や $\bullet C_9H_{15}O$ が、一方 α リノレン酸やドコサヘキサエン酸などの $\omega 3$ 系では、 $\bullet C_5H_9$ や $\bullet C_9H_{13}O$ などの質量が水素2個小さい脂質由来ラジカルが生成していた(図9)。またMSピークエリアから生成したラジカル量を半定量すると、刺激の種類によって

ヒド、カルボン酸など、構造が多様な物質へと分解される(図1)。しかしながら、実際に動物モデルや臨床試料から検出される内因性oxPCsの数は、予想よりもはるかに少ない。現在、脂質データベースであるLIPID MAPS (www.lipidmaps.org/)に登録されているoxPCsは、53種類である。この報告されている酸化リン脂質の数の少なさは、酸化リン脂質が複雑なラジカル反応を経て生成した微量物質であり、そのためその化学構造の推定が難しく、測定が困難なことに起因する。しかし、酸化脂質の生成機構を考えると、その数が非常に多いことが容易に想像できる。また、脂質過酸化連鎖反応の起点である脂質由来ラジカルが少なくとも132種類検出できた⁵⁴⁾ことを考えても、多くの酸化リン脂質が生成しているのは間違いない。実際に、Anthonymuthuらは、既知の脂質構造から生成しうる総数と比較して、同定された酸化脂質の数はごくわずかであると述べている⁵⁸⁾。

これら酸化脂質の測定には、質量分析装置が用いられているが、酸化リン脂質の構造情報を獲得するには、質量電荷比(m/z)値やフラグメンテーションパターンによる各分子のタンデム質量分析(MS/MS)パラメータが必要である。そこで、我々はこれら課題を解決するため、質量分析によるノンターゲット分析に着目した。本手法は、構造未知の化合物の同定に有用である。さらに、近年の高分解能質量分析計(HRMS)やデータ処理技術の発展により、

膨大な数のMSMSピークを包括的にアノテーションすることが可能となっている。

そこで我々は、まず、PC16:0/PUFAをAAPHまたはAAPH+heminで酸化し、試料から脂質を抽出した後、両方の抽出液を混合し、HPLCと高分解能質量分析計を組み合わせ(LC/HRMS)分析した⁵⁹⁾(図10)。そして、HRMSスペクトルの中からoxPCs由来のピークを選択するために、酸化(O)/非酸化(N)の強度比が2.0を超えるシグナルを選択した。その後、HRMS/MSスペクトルにPC基と二つの脂肪アシル基に由来する三つの典型的なプロダクトイオンを確認し、酸化リン脂質とした。その結果、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸の3種類のPC16:0/PUFAに由来する155種のoxPCsを同定した⁵⁹⁾。その中で、意外にも103種のoxPCは、これまでに報告のない新規のoxPCsであった。また、酸化型PC16:0/PUFAの構造情報をもとに、酸化型PC18:0/PUFAおよび酸化型PC18:1/PUFAの構造として、最終的に465種のoxPCsのMS/MSライブラリーを構築した。また興味深いことに、oxPCsの生成量および種類は、用いる刺激の種類によってかなり変動するようである。これまで、酸化剤が異なれば生成している酸化物の種類が違うことは想定されていた。今回の結果を踏まえても、用いる酸化剤や基質が異なれば、細胞や動物実験で結果が違うのは当然かもしれない。

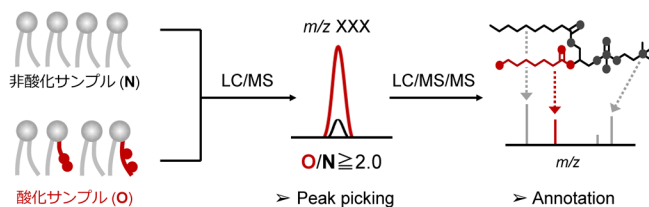
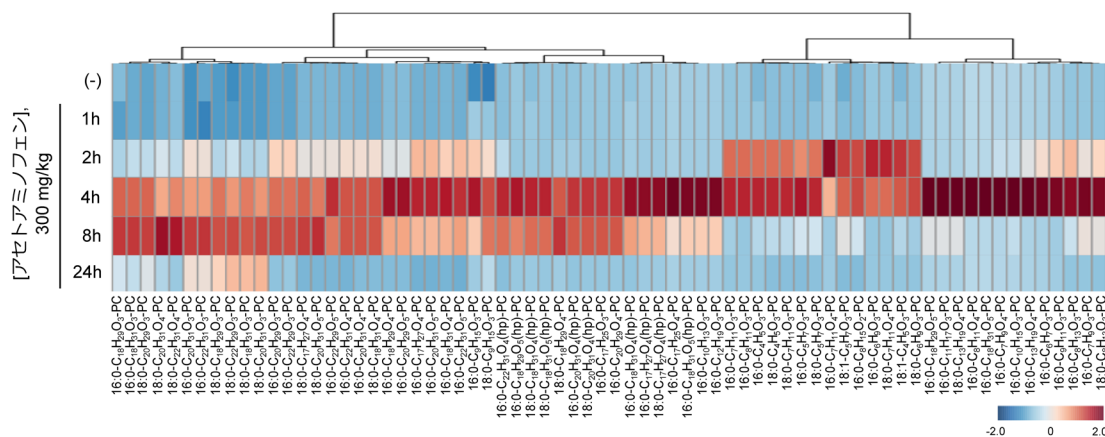


図10 酸化脂質のノンターゲット解析

酸化脂質サンプル(O)と非酸化脂質サンプル(N)をLC/MSにて測定し、O/Nが2以上のものをピッキング。その後、LC/HRMS/MS解析を行う。



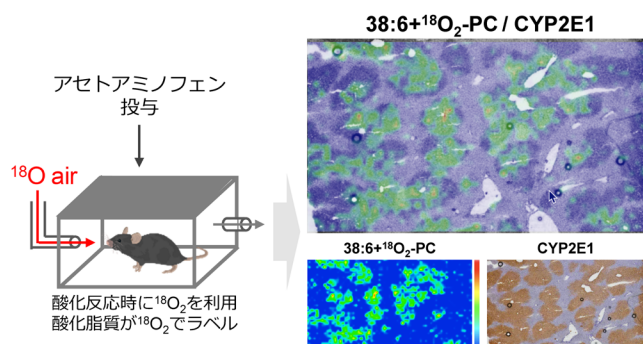


図12 MALDI-MS/MS/MSIと ^{18}O 標識による内因性oxPCsの可視化

マウスは、アセトアミノフェン投与後2時間 $^{18}\text{O}_2$ を含む空気下で飼育したのち、質量イメージングを行った。酸化脂質の生成部位とアセトアミノフェン代謝酵素CYP2E1の発現部位（免疫組織化学染色）がよく一致した。

2) 疾患モデルでの酸化リン脂質の解析

先の脂質由来ラジカルの場合と同様に、動物モデルでも酸化リン脂質は検出できるだろうか？ 解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンは、肝シトクロムP450 2E1 (CYP2E1) の作用により代謝され、通常グルタチオン抱合系により無毒化される。しかし、過剰摂取により肝毒性を示す。最近の研究では、脂質過酸化物がアセトアミノフェン誘発性の肝細胞死に関与していることも報告されている⁶⁰⁾。

実際に、アセトアミノフェンを動物に投与すると、70種類のoxPCsが生成していることが、先の酸化リン脂質ライブラリーをもとに明らかになった⁵⁹⁾ (図11)。また、このoxPCsは、酸化酵素の阻害剤投与により、顕著に減少した。興味深いことに、アセトアミノフェン投与後の時間によって、生成するoxPCsの種類および量が大きく変動していた。さらに、一部のoxPCsがALT値の増加前に上昇していることは、その後の肝細胞死に対するoxPCsの関連性を示唆している。

3) 酸化リン脂質の質量イメージング

では、oxPCsは肝臓のどの部位で生成しているのだろうか？ 近年、質量イメージング (MALDI-MS/MS/MSI) の開発や応用が積極的に進められている⁶¹⁻⁶³⁾。特に、酸化リン脂質のような低分子や、抗体を作製できないような分子の位置情報を明らかにするには、質量イメージングがきわめて有効であろう。MALDI-MS/MS/MSIではレーザーを利用するが、oxPCsの可視化を行う際、レーザー照射によりリン脂質が酸化されることが判明した。これは、質量イメージングを行う上で重大な問題である。すなわち、酸化アーチファクトとしてのoxPCsが、本来生体内で生成したoxPCsかを区別できない可能性がある。しかし、酸化反応が生じている間 ^{18}O 含有空気 (N_2 79.5%, $^{18}\text{O}_2$ 20%, CO_2 0.5%) を利用すると、酸化反応時には ^{18}O が利用され、レーザー照射による酸化アーチファクトとしての大気中 ^{16}O とは区別できる。実際に *in vitro* の実験で、 ^{18}O 標識により、MALDI-MS/MS/MSIによるoxPCsの検出および画像化の際に生じる酸化アーチファクトを除外できた⁵⁹⁾。

そこで、アセトアミノフェンを投与後、マウスを2時間 $^{18}\text{O}_2$ 空気にさらした (図12)。その結果、バックグラウンドノイズが少なく、内因性のoxPCの分布を可視化することに成功した。この生成量は、 $^{18}\text{O}_2$ 空気吸入の時間によって変化した。また、生成部位は、アセトアミノフェンの代謝酵素であるCYP2E1が高発現している静脈領域、グルタチオンの枯渇部位とよく一致していた。

以上より、構築したoxPCsのHRMS/MSライブラリーと *in-vivo* ^{18}O ラベル化により、アーチファクトとしてのバックグラウンドノイズを軽減し、oxPCsを選択的に可視化することが可能となったといえる。また実際に、疾患モデル動物の組織におけるoxPCs形成部位に関する重要な情報を提供することも可能となった。

5. おわりに

脂質由来ラジカルや脂質過酸化物などの酸化リン脂質は、疾患の発症や進展への関与が指摘されている。また、近年では脂質過酸化反応依存的な細胞死であるフェロトーシスが新たに提唱され、酸化リン脂質研究がさらに盛んになっている。一方で、反応性に富み生体内寿命がきわめて短いことや、脂溶性環境下で生成するものであることから、その測定には制限があったといえる。本稿では、脂質過酸化反応の起点である脂質由来ラジカルに対する蛍光プローブを開発し、蛍光検出とその構造解析、またノンターゲット分析にて酸化リン脂質の構造解析を行った我々の最近の知見を中心に紹介した。実際に、これまでに報告例がない100種類を超える新規の構造を明らかにし、データベース化も進めている。今後は、これら酸化リン脂質の詳細な分子構造に加え、どのように疾患の発症や進展に関与しているのか、など、脂質の酸化という質と量の変化に着目し、生理的および病理学的意義の理解を深めていきたいと考えている。

謝辞

本稿は、著者の研究室の研究成果を中心にまとめたものです。これまで一緒に研究を進めていただいた研究室メン

バー, ならびに共同研究者の方々に深く感謝いたします。

文 献

- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012) Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149**, 1060–1072.
- Chen, Y., Fan, H., Wang, S., Tang, G., Zhai, C., & Shen, L. (2021) Ferroptosis: A novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 688605.
- Reichert, C.O., de Freitas, F.A., Sampaio-Silva, J., Rokita-Rosa, L., Barros, P.L., Levy, D., & Bydlowski, S.P. (2020) Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9902.
- Zhivaki, D. & Kagan, J.C. (2021) Innate immune detection of lipid oxidation as a threat assessment strategy. *Nat. Rev. Immunol.*, **22**, 322–330.
- Shimanaka, Y., Kono, N., Taketomi, Y., Arita, M., Okayama, Y., Tanaka, Y., Nishito, Y., Mochizuki, T., Kusuhara, H., Adibekian, A., et al. (2017) Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation. *Nat. Med.*, **23**, 1287–1297.
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., & Salvayre, R. (2008) Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 6–20.
- Xu, S., Chaudhary, O., Rodríguez-Morales, P., Sun, X., Chen, D., Zappasodi, R., Xu, Z., Pinto, A.F.M., Williams, A., Schulze, I., et al. (2021) Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8(+) T cells in tumors. *Immunity*, **54**, 1561–1577.e7.
- Greenberg, M.E., Li, X.M., Gugiu, B.G., Gu, X., Qin, J., Salomon, R.G., & Hazen, S.L. (2008) The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **283**, 2385–2396.
- West, X.Z., Malinin, N.L., Merkulova, A.A., Tischenko, M., Kerr, B.A., Borden, E.C., Podrez, E.A., Salomon, R.G., & Byzova, T.V. (2010) Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*, **467**, 972–976.
- Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., et al. (2002) Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14682–14687.
- Pratt, D.A., Mills, J.H., & Porter, N.A. (2003) Theoretical calculations of carbon-oxygen bond dissociation enthalpies of peroxy radicals formed in the autoxidation of lipids. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5801–5810.
- Maillard, B., Ingold, K.U., & Scaiano, J.C. (1983) Rate constants for the reactions of free-radicals with oxygen in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5095–5099.
- Xu, L., Davis, T.A., & Porter, N.A. (2009) Rate constants for peroxidation of polyunsaturated fatty acids and sterols in solution and in liposomes. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13037–13044.
- Niki, E. (2014) Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 809–817.
- Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N.A., & Serhan, C.N. (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.*, **201**, 713–722.
- Reis, A. (2017) Oxidative Phospholipidomics in health and disease: Achievements, challenges and hopes. *Free Radic. Biol. Med.*, **111**, 25–37.
- Uchida, K. (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.*, **42**, 318–343.
- Qian, S.Y., Yue, G.H., Tomer, K.B., & Mason, R.P. (2003) Identification of all classes of spin-trapped carbon-centered radicals in soybean lipoxygenase-dependent lipid peroxidations of omega-6 polyunsaturated fatty acids via LC/ESR, LC/MS, and tandem MS. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 1017–1028.
- Qian, S.Y., Guo, Q., & Mason, R.P. (2003) Identification of spin trapped carbon-centered radicals in soybean lipoxygenase-dependent peroxidations of omega-3 polyunsaturated fatty acids by LC/ESR, LC/MS, and tandem MS. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 33–44.
- Krumova, K., Oleynik, P., Karam, P., & Cosa, G. (2009) Phenol-based lipophilic fluorescent antioxidant indicators: a rational approach. *J. Org. Chem.*, **74**, 3641–3651.
- Oleynik, P., Ishihara, Y., & Cosa, G. (2007) Design and synthesis of a BODIPY-alpha-tocopherol adduct for use as an off/on fluorescent antioxidant indicator. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1842–1843.
- Khatchadourian, A., Krumova, K., Boridy, S., Ngo, A.T., May-singer, D., & Cosa, G. (2009) Molecular imaging of lipid peroxy radicals in living cells with a BODIPY-alpha-tocopherol adduct. *Biochemistry*, **48**, 5658–5668.
- Krumova, K., Friedland, S., & Cosa, G. (2012) How lipid unsaturation, peroxy radical partitioning, and chromanol lipophilic tail affect the antioxidant activity of alpha-tocopherol: direct visualization via high-throughput fluorescence studies conducted with fluorogenic alpha-tocopherol analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 10102–10113.
- Drummen, G.P., van Liebergen, L.C., Op den Kamp, J.A., & Post, J.A. (2002) C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (Micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 473–490.
- Yoshida, Y., Shimakawa, S., Itoh, N., & Niki, E. (2003) Action of DCFH and BODIPY as a probe for radical oxidation in hydrophilic and lipophilic domain. *Free Radic. Res.*, **37**, 861–872.
- Gao, M., Yi, J., Zhu, J., Minikes, A.M., Monian, P., Thompson, C.B., & Jiang, X. (2019) Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Mol. Cell*, **73**, 354–363.e3.
- Tarangelo, A., Magtanong, L., Bieging-Rolett, K.T., Li, Y., Ye, J., Attardi, L.D., & Dixon, S.J. (2018) p53 suppresses metabolic stress-induced ferroptosis in cancer cells. *Cell Rep.*, **22**, 569–575.
- Krumova, K., Greene, L.E., & Cosa, G. (2013) Fluorogenic alpha-tocopherol analogue for monitoring the antioxidant status within the inner mitochondrial membrane of live cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 17135–17143.
- Prime, T.A., Forkink, M., Logan, A., Finichiu, P.G., McLachlan, J., Li Pun, P.B., Koopman, W.J., Larsen, L., Latter, M.J., Smith, R.A., et al. (2012) A ratiometric fluorescent probe for assessing mitochondrial phospholipid peroxidation within living cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 544–553.
- Bagryanskaya, E.G. & Marque, S.R. (2014) Scavenging of organic C-centered radicals by nitroxides. *Chem. Rev.*, **114**, 5011–5056.
- Bowry, V.W. & Ingold, K.U. (1992) Kinetics of nitroxide radical trapping. 2. Structural effects. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4992–4996.
- Beckwith, A.L.J., Bowry, V.W., & Ingold, K.U. (1992) Kinetics of nitroxide radical trapping. 1. Solvent effects. *J. Am. Chem.*

- Soc.*, **114**, 4983–4992.
- 33) Schmid, P. & Ingold, K.U. (1978) Kinetic applications of electron-paramagnetic resonance spectroscopy. 31. Rate constants for spin trapping. 1. Primary alkyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2493–2500.
 - 34) Maeda, Y. & Ingold, K.U. (1979) Kinetic applications of electron-paramagnetic resonance spectroscopy. 34. Rate constants for spin trapping. 2. Secondary alkyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4975–4981.
 - 35) Yin, H., Xu, L., & Porter, N.A. (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.*, **111**, 5944–5972.
 - 36) Chateaneuf, J., Luszyk, J., & Ingold, K.U. (1988) Absolute rate constants for the reactions of some carbon-centered radicals with 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl. *J. Org. Chem.*, **53**, 1629–1632.
 - 37) Allen, N.S. (1986) Recent advances in the photooxidation and stabilization of polymers. *Chem. Soc. Rev.*, **15**, 373–404.
 - 38) Kocherginsky, N. & Swartz, H.M. *Nitroxide spin labels: Reactions in biology and chemistry*, (CRC Press, Boca Raton, 1995).
 - 39) Kinoshita, Y., Yamada, K., Yamasaki, T., Sadasue, H., Sakai, K., & Utsumi, H. (2009) Development of novel nitroxyl radicals for controlling reactivity with ascorbic acid. *Free Radic. Res.*, **43**, 565–571.
 - 40) Matsuoka, Y., Ohkubo, K., Yamasaki, T., Yamato, M., Ohtabu, H., Shirouzu, T., Fukuzumi, S., & Yamada, K. (2016) A pro-fluorescent nitroxide probe for ascorbic acid detection and its application to quantitative analysis of diabetic rat plasma. *RSC Advances*, **6**, 60907–60915.
 - 41) Sakai, K., Yamada, K., Yamasaki, T., Kinoshita, Y., Mito, F., & Utsumi, H. (2010) Effective 2,6-substitution of piperidine nitroxyl radical by carbonyl compound. *Tetrahedron*, **66**, 2311–2315.
 - 42) Yamasaki, T., Ito, Y., Mito, F., Kitagawa, K., Matsuoka, Y., Yamato, M., & Yamada, K. (2011) Structural concept of nitroxide as a lipid peroxidation inhibitor. *J. Org. Chem.*, **76**, 4144–4148.
 - 43) Green, S.A., Simpson, D.J., Zhou, G., Ho, P.S., & Blough, N.V. (1990) Intramolecular quenching of excited singlet-states by stable nitroxyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7337–7346.
 - 44) Ishii, K., Hirose, Y., Fujitsuka, H., Ito, O., & Kobayashi, N. (2001) Time-resolved EPR, fluorescence, and transient absorption studies on phthalocyaninatosilicon covalently linked to one or two TEMPO radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 702–708.
 - 45) Colvin, M.T., Giacobbe, E.M., Cohen, B., Miura, T., Scott, A.M., & Wasielewski, M.R. (2010) Competitive electron transfer and enhanced intersystem crossing in photoexcited covalent TEMPO-perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) dyads: Unusual spin polarization resulting from the radical-triplet interaction. *J. Phys. Chem. A*, **114**, 1741–1748.
 - 46) Blinco, J.P., Fairfull-Smith, K.E., Morrow, B.J., & Bottle, S.E. (2011) Profluorescent nitroxides as sensitive probes of oxidative change and free radical reactions. *Aust. J. Chem.*, **64**, 373–389.
 - 47) Yamada, K., Mito, F., Matsuoka, Y., Ide, S., Shikimachi, K., Fujiki, A., Kusakabe, D., Ishida, Y., Enoki, M., Tada, A., et al. (2016) Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals. *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 608–613.
 - 48) Hebels, D.G., Briede, J.J., Khampang, R., Kleinjans, J.C., & de Kok, T.M. (2010) Radical mechanisms in nitrosamine- and nitrosamide-induced whole-genome gene expression modulations in Caco-2 cells. *Toxicol. Sci.*, **116**, 194–205.
 - 49) Yamada, K., Yamamiya, I., & Utsumi, H. (2006) In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 2040–2046.
 - 50) Acar, N., Berdeaux, O., Grégoire, S., Cabaret, S., Martine, L., Gain, P., Thuret, G., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., & Bretillon, L. (2012) Lipid composition of the human eye: Are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? *PLoS One*, **7**, e35102.
 - 51) Ye, X., Wang, Y., & Nathans, J. (2010) The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol. Med.*, **16**, 417–425.
 - 52) Enoki, M., Shinto, S., Matsuoka, Y., Otsuka, A., Kaidzu, S., Tanito, M., Shibata, T., Uchida, K., Ohira, A., Yamato, M., et al. (2017) Lipid radicals cause light-induced retinal degeneration. *Chem. Commun. (Camb.)*, **53**, 10922–10925.
 - 53) Ishida, Y., Okamoto, Y., Matsuoka, Y., Tada, A., Janprasit, J., Yamato, M., Morales, N.P., & Yamada, K.I. (2017) Detection and inhibition of lipid-derived radicals in low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.*, **113**, 487–493.
 - 54) Matsuoka, Y., Izumi, Y., Takahashi, M., Bamba, T., & Yamada, K.I. (2020) Method for structural determination of lipid-derived radicals. *Anal. Chem.*, **92**, 6993–7002.
 - 55) Spickett, C.M. & Pitt, A.R. (2015) Oxidative lipidomics coming of age: Advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology. *Antioxid. Redox Signal.*, **22**, 1646–1666.
 - 56) Riely, C.A., Cohen, G., & Lieberman, M. (1974) Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation. *Science*, **183**, 208–210.
 - 57) Broza, Y.Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A., & Haick, H. (2015) Hybrid volatilomics and disease detection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 11036–11048.
 - 58) Anthonymuthu, T.S., Kim-Campbell, N., & Bayır, H. (2017) Oxidative lipidomics: Applications in critical care. *Curr. Opin. Crit. Care*, **23**, 251–256.
 - 59) Matsuoka, Y., Takahashi, M., Sugiura, Y., Izumi, Y., Nishiyama, K., Nishida, M., Suematsu, M., Bamba, T., & Yamada, K.I. (2021) Structural library and visualization of endogenously oxidized phosphatidylcholines using mass spectrometry-based techniques. *Nat. Commun.*, **12**, 6339.
 - 60) Yamada, N., Karasawa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Komada, T., Kamata, R., Sampilvanjil, A., Ito, J., Nakagawa, K., Kuwata, H., et al. (2020) Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure. *Cell Death Dis.*, **11**, 144.
 - 61) Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., & Setou, M. (2011) Imaging mass spectrometry for lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1811**, 961–969.
 - 62) Iwama, T., Kano, K., Saigusa, D., Ekroos, K., van Echten-Decker, G., Vogt, J., & Aoki, J. (2021) Development of an on-tissue derivatization method for MALDI mass spectrometry imaging of bioactive lipids containing phosphate monoester using phos-tag. *Anal. Chem.*, **93**, 3867–3875.
 - 63) Takeo, E., Sugiura, Y., Uemura, T., Nishimoto, K., Yasuda, M., Sugiyama, E., Ohtsuki, S., Higashi, T., Nishikawa, T., Suematsu, M., et al. (2019) Tandem mass spectrometry imaging reveals distinct accumulation patterns of steroid structural isomers in human adrenal glands. *Anal. Chem.*, **91**, 8918–8925.

著者寸描

●山田 健一（やまだ けんいち）

九州大学大学院薬学研究院教授，博士（薬学）。

■略歴 1994年九州大学薬学部卒業，99年同大学院薬学研究科博士課程修了，博士（薬学）。99～2002年米国NCI-NIH博士研究員，02年九州大学大学院薬学研究院助手，05年同助教授（後に准教授）。13～17年JSTさきがけ「疾患代謝」。16年同大学教授。17～23年AMED-CREST「脂質」研究開発代表者。

■研究テーマと抱負 酸化脂質が，疾患にどのように関わっているか，またその創薬研究に興味を持っている。一緒に研究をしてくれる若手を募集中。

■ウェブサイト <http://bukka.phar.kyushu-u.ac.jp/>

■趣味 スポーツ観戦，旅行