

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11777

研究課題名（和文）脂質代謝に着目した副腎白質ジストロフィーの病態発症機序解明とバイオマーカーの創出

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of X-ALD pathology and the development of novel biomarker

研究代表者

濱 弘太郎 (Kotaro, Hama)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：20534481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：X-ALDは、脱髄を含む進行性の神経症状と副腎の機能不全を主徴とする先天代謝異常症であり、ABCトランスポーター(ABCD1)が原因遺伝子である。ABCD1は炭素数が24以上の極長鎖脂肪酸の代謝に重要であり、X-ALD患者では過剰な極長鎖脂肪酸が細胞内および細胞外に蓄積する。しかし、極長鎖脂肪酸の蓄積とX-ALDの臨床所見との因果関係および機序は殆ど明らかにされていない。また、X-ALDの病態進展と関連するマーカーの開発が望まれている。本研究では、極長鎖脂肪酸がリン脂質に取り込まれるために重要な酵素を同定し、メタボローム解析を用いてX-ALD患者血漿中に蓄積するリン脂質分子種の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X-ALDでは極長鎖脂肪酸の蓄積が顕著であるが、極長鎖脂肪酸の蓄積がどのようにして脱髄や副腎機能の異常などに結びつくかという因果関係は殆ど明らかになっていない。本研究によって極長鎖脂肪酸の代謝機構の一端を担う候補分子が明らかになったことにより、極長鎖脂肪酸の病理的な意義を遺伝子（分子）の観点から解析することが可能になる。また、本研究ではX-ALD患者に蓄積する極長鎖脂肪酸以外のリン脂質分子種を見出した。このリン脂質分子種と臨床症状との相関性を明らかにできれば、新規病態マーカーとして有用である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：X-ALD is an inborn error of metabolism characterized by progressive neurological symptoms including demyelination and adrenal insufficiency. ABCD1 is crucial for very-long-chain fatty acids metabolism. However, the causal relationship and mechanism between the accumulation of very long-chain fatty acids and the clinical manifestations of X-ALD remain largely unknown. Furthermore, although X-ALD is caused by a single causative gene, its progression and clinical manifestations vary widely between each X-ALD patient, which hinders effective diagnosis and treatment of the disease. In the series of this study, we found an enzyme that is involved in the synthetic process of very long-chain fatty acid containing phospholipids. Also, a candidate metabolite that does not contain very long-chain fatty acids and accumulate in plasma from X-ALD patients. These observations contribute to clarify the molecular mechanisms of the X-ALD pathology as well as effective diagnosis of X-ALD.

研究分野：脂質

キーワード：副腎白質ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

指定難病である X-ALD は、脱髄を含む進行性の神経症状と副腎の機能不全を主徴とする先天代謝異常症であり、その原因遺伝子は、トランスポーターである ATP-binding cassette sub-family D1 (ABCD1) である。ABCD1 は細胞内のペルオキシソーム膜上に局在し、内在的に産生される炭素数が 24 以上の極長鎖脂肪酸を、細胞質からペルオキシソーム内へ輸送する。X-ALD 患者ではこの輸送過程に異常が生じる結果、極長鎖脂肪酸がペルオキシソーム内でベータ酸化を受ける効率が低下し、過剰な極長鎖脂肪酸が細胞内および細胞外に蓄積する。

しかし、極長鎖脂肪酸の蓄積と X-ALD の臨床所見との因果関係および機序は殆ど明らかにされていない。さらに、X-ALD は原因遺伝子が 1 つであるにも関わらず、その病態の進展および臨床症状は個人間で大きく異なることが、効果的な診断と治療を行う上で障害となっており、脱髄や副腎機能不全等の病態進展と相関するマーカーの開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、極長鎖脂肪酸の代謝機構を分子レベルで明らかにすることで、極長鎖脂肪酸の蓄積と X-ALD の病態発症の因果関係を明らかにすることである。また、患者検体中に蓄積する X-ALD の新規病態マーカーの候補分子を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) 極長鎖脂肪酸 CoA 合成酵素および極長鎖脂肪酸転移酵素の同定

X-ALD 患者内において、ベータ酸化を免れた活性型の極長鎖脂肪酸 (極長鎖脂肪酸 CoA) は、リン脂質等の様々な脂質分子種に転移された状態で患者体内に蓄積する。本研究では、極長鎖脂肪酸 CoA をリン脂質に導入するアシル基転移酵素を、RNA 干渉法やゲノム編集技術などを用いて同定することを試みた。

(2) X-ALD 患者検体中に蓄積する新規病態マーカーの同定

本研究では、これまでに開発した高速液体クロマトグラフィー-質量分析器 (LC-MS) を用いた網羅的な脂質メタボローム解析法を用いて、X-ALD 患者血漿中の脂質代謝分子を計測し、極長鎖脂肪酸以外の新規脂質代謝産物することを試みた。

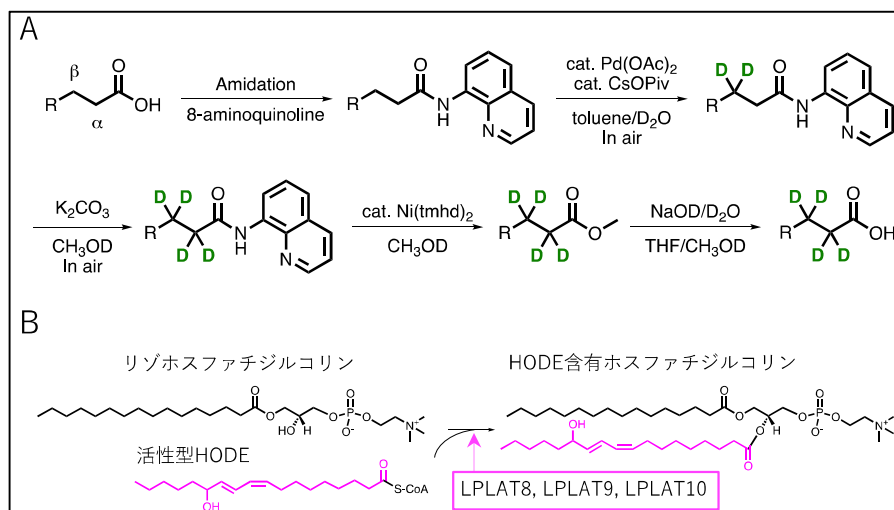
4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術により作出した ABCD1 欠損 HeLa 細胞を用いて、これまでに報告されている約 15 種類のリゾリン脂質アシル基転移酵素について siRNA 法によるスクリーニングを行った。得られた候補分子について、CRISPR/Cas9 法を用いて検証した結果、ABCD1 ノックアウト細胞に比べて、特定のリゾリン脂質アシル基転移酵素と ABCD1 のダブルノックアウト細胞では、有意に極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質量が低下することを見出した。さらに、細胞膜画分を用いて酵素活性を *in vitro* で検証したところ、当該酵素は活性型の極長鎖脂肪酸

をリゾリン脂質の sn-1 位に導入する活性を有することが確認された。本研究で得られた結果は、極長鎖脂肪酸がリン脂質のグリセロール骨格上の sn-1 位に局在するというこれまでの我々の報告と符合していた。今後は、当該酵素の細胞内の機能解析を通じ、生体における極長鎖脂肪酸の機能と、極長鎖脂肪酸の代謝が破綻された際に生じる病理的意義を検証したい。

(2) X-ALD 患者血漿から抽出した総脂質画分に対して、LC-MS を用いた脂質メタボローム解析を行った。特に、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリンについて、想定されるプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせを多数組み込んだ多段階 SRM(selected-reaction-monitoring)方式を用いて半網羅的に解析を行った。その結果、X-ALD 患者に蓄積するリン脂質分子種を見出した。X-ALD は X 連鎖性劣性遺伝であり、女性保因者は殆ど発症しないものの、その血漿中には非患者由来の検体に比べて有意に極長鎖脂肪酸が蓄積する。しかし、本研究によって見出したリン脂質分子種は女性保因者の血漿中ではほぼ検出されなかった。今後は、ヒトと臨床症状の異なる ABCD1 ノックアウトマウスや、症状は類似するものの原因遺伝子が異なるペルオキシソーム病の患者中の当該リン脂質分子種を解析し、病態との相関性を検証したい。

(3) 上述(2)の解析において、新規脂質の代謝過程を LC-MS を用いて解析するために、様々な脂質の安定同位体標識化合物が必要となった。しかし、新規脂質の安定同位体標識化合物は商業的に入手できなかった。そのため、滝田良教授(静岡県立大学・薬)との共同研究により、様々な脂肪酸のアルファ位とベータ位の4つの軽水素を重水素に置換する新たな脂肪酸重水素置換法を開発した(下図A)。実際に、この方法を用いて作製した酸化脂肪酸(hydroxyoctadecadienoic acid, HODE)の重水素標識体を用いて、酸化脂肪酸をリゾリン脂質に導入するアシル基転移酵素の同定に成功した(下図B)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kotaro Hama, Yuko Fujiwara, Kazuaki Yokoyama	4. 巻 6
2. 論文標題 Application of LC-ESI-MS/MS in the analysis of lipid species in samples from patients with X-linked adrenoleukodystrophy, a peroxisomal disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 101-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24508/mms.2022.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Ayako, Hama Kotaro, Watanabe Kohei, Fujiwara Yuko, Yokoyama Kazuaki, Murata Shigeo, Takita Ryo	4. 巻 61
2. 論文標題 Controlled Tetradeuteration of Straight Chain Fatty Acids: Synthesis, Application, and Insight into the Metabolism of Oxidized Linoleic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202202779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202202779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 濱弘太郎, 横山和明, 滝田良	4. 巻 59
2. 論文標題 脂肪酸の選択的重水素化法の開発と脂質・脂肪酸の代謝解析への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Yuko, Hama Kotaro, Shimozawa Nobuyuki, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Glycosphingolipids with Very Long-Chain Fatty Acids Accumulate in Fibroblasts from Adrenoleukodystrophy Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8645 ~ 8645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22168645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yasuhiro, Tsuchiya Kiyoto, Yamamoto Mizuki, Nemoto-Sasaki Yoko, Tanigawa Kazunari, Hama Kotaro, Ueda Yusuke, Tanikawa Takashi, Gohda Jin, Maeda Kenji, Inoue Jun-ichiro, Yamashita Atsushi	4. 巻 95
2. 論文標題 <i>N</i> - (4-Hydroxyphenyl) Retinamide Suppresses SARS-CoV-2 Spike Protein-Mediated Cell-Cell Fusion by a Dihydroceramide 4-Desaturase 1-Independent Mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00807-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee-Okada Hyeon-Cheol, Hama Kotaro, Yokoyama Kazuaki, Yokomizo Takehiko	4. 巻 170
2. 論文標題 Development of a liquid chromatography?electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous analysis of free fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 389 ~ 397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hama Kotaro, Fujiwara Yuko, Hayama Tamuro, Ozawa Tsuyoshi, Nozawa Keijiro, Matsuda Keiji, Hashiguchi Yojiro, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Very long-chain fatty acids are accumulated in triacylglycerol and nonesterified forms in colorectal cancer tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85603-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hama Kotaro, Fujiwara Yuko, Takashima Shigeo, Hayashi Yasuhiro, Yamashita Atsushi, Shimosawa Nobuyuki, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Hexacosenoyl-CoA is the most abundant very long-chain acyl-CoA in ATP binding cassette transporter D1-deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 523 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.P119000325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Yuko, Hama Kotaro, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 490
2. 論文標題 Mass spectrometry in combination with a chiral column and multichannel-MRM allows comprehensive analysis of glycosphingolipid molecular species from mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 107959 ~ 107959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2020.107959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 濱弘太郎, 藤原優子, 渡辺順子, 高島茂雄, 滝田良, 下澤伸行, 横山和明
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィー患者血漿内の酸化脂肪酸含有リン脂質の同定と産生機構の探索
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原優子, 濱弘太郎, 下澤伸行, 横山和明
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィー患者由来線維芽細胞における極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱弘太郎, 藤原優子, 林康広, 山下純, 下澤伸行, 横山和明
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質の産生機構の解析
3. 学会等名 第63回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、林康広、高島茂雄、山下純、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 ABCD1欠損条件下における極長鎖脂肪酸脂肪酸CoA の代謝機構解析
3. 学会等名 第62回 日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原優子、濱弘太郎、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィー患者由来線維芽細胞における極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析
3. 学会等名 第62回 日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原優子、濱弘太郎、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィー患者由来線維芽細胞における極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、横山和明
2. 発表標題 リピドミクスに基づくALDの脂質代謝異常の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原優子、濱弘太郎、横山和明
2. 発表標題 3.キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS-斉分析系によるマウス脳におけるセラミド部分の分子種別の定量解析
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kotaro Hama, Yuko Fujiwara, Shigeo Takashima, Atsushi Yamashita, Yasuhiro Hayashi, Nobuyuki Shimozawa and Kazuaki Yokoyama
2. 発表標題 Hexacosenoyl-CoA is the most abundantly accumulated very long chain fatty acyl-CoA and increased by bezafibrate in ABCD1-deficient cells
3. 学会等名 60th international conference on the bioscience of lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Fujiwara, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama
2. 発表標題 A novel LC-MS/MS method for the comprehensive quantitative analysis of molecular species of glycosphingolipids using a chiral column
3. 学会等名 60th international conference on the bioscience of lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Naoki Matsumoto, Takanori Koizumi, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama, Atsushi Yamashita
2. 発表標題 Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage
3. 学会等名 60th international conference on the bioscience of lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazunari Tanigawa, Koichi Suzuki, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama, Yasuhiro Nakamura, Ayako Harada, Ken Karasawa, Keizo Inoue.
2. 発表標題 M. leprae infection induced GPAT3 expression and accumulated TAG species in host macrophages.
3. 学会等名 60th international conference on the bioscience of lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 BezafibrateはABCD1欠損条件下において極長鎖脂肪酸CoAを上昇させる
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋賢一、武田剛寛、濱弘太郎、横山和明、厚味徹一
2. 発表標題 エライシン酸の存在下で分化させた脂肪細胞におけるAkt の細胞内分布とリン脂質分子種の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 キラルカラムを用いたLC-MS法によるスフィンゴ糖脂質一斉分析系の構築
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質一斉分析系によるヒドロキシ脂肪酸分子種の解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 キラルカラムを用いたLC-MS一斉分析系によるマウス脳スフィンゴ糖脂質の解析
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 細胞内の極長鎖脂肪酸脂肪酸CoA量を上昇する薬剤の検証
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Lorenzo's oilとBezafibrateの極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAに対する影響
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS一斉分析系によるマウス脳の解析
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hama K, Fujiwara Y, Yokoyama K.,	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 279
3. 書名 Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂肪酸類の位置および数選択的重水素化標識化合物の製造方法	発明者 滝田良, 渡辺順子, 渡邊康平, 濱弘太郎, 横山和明	権利者 国立大学法人 東 京大学, 学校法 人 帝京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-538046	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------