

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08218

研究課題名(和文) リピドミクス解析で得られたペルオキシソーム病新奇脂質の構造と発症機構に関する解析

研究課題名(英文) Structure and the functions of novel glycosphingolipids identified in peroxisome disease by lipidomics analysis

研究代表者

横山 和明 (Yokoyama, Kazuaki)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：50246021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム病の副腎白質ジストロフィー(ALD)では、極長鎖脂肪酸を含有する各種脂質分子種が蓄積し、大脳白質での後天的な炎症性脱髄により発症する。糖脂質について(1)ALD患者剖検脳で見出された4種のうち3種の新奇スフィンゴ糖脂質の構造解析を完了し、(2)ALD患者線維芽細胞では極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質6種を同定した。リン脂質について(3)極長鎖脂肪酸含有ホスファチジルコリン合成を担うアシルトランスフェラーゼをほぼ同定し、(4)ALD患者血漿に特有な酸化リン脂質分子種を同定した。さらに(5)ALD患者剖検脳白質に特定のコレステロール脂肪酸エステル分子種が局在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソーム病の副腎白質ジストロフィー(ALD)では、極長鎖脂肪酸を含有する各種脂質分子種が蓄積し、大脳白質での後天的な炎症性脱髄により発症する。極長鎖脂肪酸含有脂質分子種の発症への関与が疑われており、その合成酵素の解明に向けて大きく進展した。一方でALD患者剖検脳での新奇スフィンゴ糖脂質の構造解析とコレステロール脂肪酸エステルの蓄積の発見は、極長鎖脂肪酸以外にも脂質代謝系に異常が生じていることを示唆しており、ALD発症機構の一翼を担っている可能性が示された。発症機構の解明を進めることにより、創薬ターゲットの確立に道を開くものである。

研究成果の概要(英文)：In adrenoleukodystrophy (ALD), a peroxisome disease, various lipid species containing very long chain fatty acids (VLCFAs) accumulate in tissues throughout the body and acquired inflammatory demyelination occurs in the cerebral white matter. In this study, we performed structural analysis of three out of four novel glycosphingolipids found in autopsy brains of ALD patients. We also identified six species of glycosphingolipids containing VLCFAs in ALD patient fibroblasts. An acyltransferase responsible for the synthesis of phosphatidylcholine containing VLCFAs was identified, and oxidized phospholipid species specific to ALD patient plasma were detected. Furthermore, we found that a specific cholesterol fatty acid ester species was localized in the white matter of an autopsy ALD patient brain.

研究分野：脂質生化学

キーワード：副腎白質ジストロフィー 質量分析 網羅的解析 スフィンゴ糖脂質 ペルオキシソーム 極長鎖脂肪酸 酸化リン脂質 コレステロールエステル

1. 研究開始当初の背景

細胞小器官であるペルオキシソームは、活性酸素の分解系に加えて極長鎖脂肪酸の酸化やビニールエーテルリン脂質合成など特徴のある代謝系を有している。ペルオキシソームに関連する主なヒトの遺伝性疾患としては、ペルオキシソーム欠損症である Zellweger 症候群と、ペルオキシソーム機能異常症である副腎白質ジストロフィー(ALD)が挙げられる。前者はペルオキシソーム形成に関わる PEX 遺伝子群のいずれかの変異があり、出生時から重篤で余命は長くなく効果的な治療法は見出されていない。一方後者は X 染色体にコードされペルオキシソーム内への極長鎖脂肪酸の輸送を担うとされているペルオキシソーム膜の ATP-binding cassette タンパク D1 (ABCD1) 遺伝子の変異が原因である。ABCD1 欠損により極長鎖脂肪酸の酸化による分解が起こらず、各臓器で極長鎖脂肪酸レベルの上昇を起こす。臨床病型は多様で、副腎症状のみのアジソン病、脊髄での神経障害を生じる adrenomyeloneuropathy、大脳白質変性をきたす ALD 大脳型が知られている。発症は後天的で小児期から壮年期まで個人によりまちまちであり時期の予測は不能である。このうち大脳型の病態は脳神経系の炎症性脱髄変性であり、進行すると寝たきりに至る重篤な神経症状を起こす。ALD では血中の極長鎖脂肪酸レベルが上昇するため、臨床診断基準は脂肪酸組成における極長鎖脂肪酸 C26:0/C22:0 の比と、陽性の場合には遺伝子診断が用いられているが、いずれも重篤度とは関連していない。現状で有効な治療法はリスクの高い造血幹細胞の早期移植であり、その適用の判断のためにも発症機構の解明と発症診断マーカーの開発は急務である。

ALD 大脳型の進行機構としては活性酸素や NO の関与が報告されている。一方で発症そのものの機構は、極長鎖脂肪酸の関与が推測されているものの未だに不明である。剖検切片で大脳の病変部位への免疫・炎症性細胞の集積や、各種炎症性サイトカイン等のタンパクが検出されたことから免疫・炎症性の脱髄であることは明らかである。そこで申請者は何らかの抗原性が高い物質 (= 発症規定因子) が発現し、一定レベル以上に達した時に免疫・炎症系が刺激され発症するのではないかと想定するに至った。ここで ABCD1 欠損マウスには明瞭な大脳病変が発現せず、これが発症機構解明が進まない大きな原因となっているが、この発症規定因子の発現に種差があるとすれば説明される。そこでヒトの臨床サンプルの詳細な脂質メタボローム解析 = リピドミクス解析により得られた特異な脂質分子種が発症規定因子なのではないか、というのが本研究の核心的な「問い」である。

2. 研究の目的

難治性の先天代謝異常症である ALD 大脳型について、発症規定因子を明らかにすることを本研究の第一の目的とする。発症規定因子としては、極長鎖脂肪酸を蓄積するという病態から脂質性の分子が想定される。これまでの科研費による研究で、脂質メタボローム解析によりヒト ALD 大脳剖検サンプルから発症規定因子の候補として新奇スフィンゴ糖脂質と極長鎖脂肪酸をグリセロール 1 位に含有するリン脂質を見出している。(A)新奇スフィンゴ糖脂質については、1) 発現分布、2) 構造解析、3) 病原性の解析を行う。(B)極長鎖脂肪酸含有リン脂質については、1) 合成系、2) 病原性、3) 合成酵素阻害剤について解析する。

3. 研究の方法

(A)新奇スフィンゴ糖脂質

1) 発現分布

患者線維芽細胞、発症前保因者血漿、発症患者血漿、可能であれば別のヒト大脳サンプルなどで、LC-MS スフィンゴ糖脂質網羅的解析を行う。

2) 構造解析

高速液体クロマトグラフィー溶出液の分画と nano flow による注入が可能である超微量持続注入装置 (TriVersa NanoMate) を、フーリエ変換 Orbitrap 型質量分析計を組み合わせることにより、その超高分解能の質量精度を生かして断片化したイオンの元素組成を求め、新奇スフィンゴ糖脂質分子種の構造を決定する。

3) 病原性の解析

新奇スフィンゴ糖脂質分子種群を LC にて分取し、ドットプロットの手法により患者血清中に反応性を示す抗体がないかを解析する。

(B)極長鎖脂肪酸含有リン脂質

1) 合成系

ALD モデル細胞である ABCD1 欠損細胞に対して、研究開始時点で候補となっている 4 種のアシル基転移酵素を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法によりさらに欠損させ、極長鎖脂肪酸含有リン脂質の蓄積量の減少を指標として合成酵素であるか否かを検討する。

2) 病原性

極長鎖脂肪酸含有リン脂質について LC にて分取し、ドットプロットの手法により患者血清中に反応性を示す抗体がないかを解析する。

3) 合成酵素阻害剤

合成酵素の強制発現細胞株を作製し、これを酵素源として、東京大学創薬機構化合物ライブラリーなどを用いて、同定した合成酵素の阻害薬をスクリーニングする。

4. 研究成果

(A) 新奇スフィンゴ糖脂質

1) 発現分布

X-ALD 患者剖検脳の凍結標本で見出した新奇スフィンゴ糖脂質分子種群の分布を、X-ALD 患者由来線維芽細胞、発症患者血漿、モデル動物である ABCD1-KO マウス脳において LC-MS を用いて網羅的に定量解析したが、いずれからも検出されなかった。新奇スフィンゴ糖脂質分子種群が ALD という疾患に特異的であるかを明らかにするには対照試料での解析が必要である。ホルマリン処理した本疾患でないヒト大脳剖検資料が入手可能となったが、ホルマリン自体の化学的反応性のため一般に脂質解析ではホルマリン処理試料は用いない。そこでホルマリン処理マウス脳試料を調製し、ここからの糖脂質抽出法を検討し、LC-MS 網羅的に定量解析の適用可能性について検討したところ、実用上可能であることを確認できた。一方、X-ALD 患者由来線維芽細胞では 6 つのスフィンゴ糖脂質クラス Hex-Cer, 2Hex-Cer, NeuAc-2Hex-Cer, NeuAc-HexNAc-2Hex-Cer, 3Hex-Cer, HexNAc-3Hex-Cer、およびスフィンゴミエリンで極長鎖脂肪酸を含有する分子種が健常者に比べ有意に増加していることを見出し、論文として発表した。

2) 構造解析

X-ALD 患者剖検脳の凍結試料を用いたスフィンゴ糖脂質の網羅的定量解析により見出した新奇スフィンゴ糖脂質分子種群について、構造解析を行った。分子種群のうち m/z 1270~1360 の 3 個のシグナルはスフィンゴイド塩基が d18:1 でヘキソース 3 個と N-アセチルヘキソサミン 1 個を有し、それぞれ脂肪酸が異なるスフィンゴ糖脂質であることがわかった。一方 m/z 1260 台のシグナルはスフィンゴイド塩基が d18:1 で C24:1 の脂肪酸とシアル酸を 1 個有することが明らかとなったが、糖鎖の部分については解析中である。

3) 病原性の解析

大脳剖検試料以外で新奇スフィンゴ糖脂質が検出されなかったことから、計画したドットプロット法を実施することができなかった。当初計画以外の成果として、血漿ではスフィンゴ糖脂質が超微量であるため、新生児マススクリーニングで頻用されるろ紙血を用いて血球成分も含めた解析法を検討した。その結果効果的なスフィンゴ糖脂質抽出法が判明した。

(B) 極長鎖脂肪酸含有リン脂質

1) 合成系

ABCD1 欠損細胞に対して、アシル基転移酵素遺伝子を欠損させ、極長鎖脂肪酸含有リン脂質の蓄積量の変化を LC-MS 法により解析した。その結果ある酵素遺伝子を欠損させた場合に、ABCD1 欠損細胞に蓄積してくる VLCFA 含有リン脂質が減少することを見出した。本酵素を細胞に強制発現させたホモジネートを酵素源として基質特異性を調べたところ、ある種の VLCFA に対して高い選択性を示した。

2) 病原性

極長鎖脂肪酸含有リン脂質について LC にて分取精製を試みたが、非常に微量であった。以前に分裂酵母の脂肪酸合成酵素変異株中に同様の極長鎖脂肪酸含有リン脂質が蓄積することを報告しているため、この株を用いて必要な極長鎖脂肪酸含有リン脂質を調製している。ドットプロットによる解析には至っていない。

3) 合成酵素阻害剤

上記で見出した酵素の発現・精製系を構築している段階であり、阻害剤のスクリーニングには至っていない。

4) 当初計画以外の成果

2 つの成果が得られた。1 つは X-ALD の発症患者血漿と対照者の血漿について網羅的なリン脂質解析を行い、X-ALD の発症患者血漿中でのみ有意に蓄積するリン脂質分子種を見出した。この分子種は女性保因者および ABCD1 ノックアウトマウス由来の血漿では蓄積していなかった。このリン脂質分子種について、LC-MS を用いて構造解析を行ったところ、通常のリン分子種より質量数が 16 大きく、不飽和脂肪酸部分に酸素が結合した酸化した分子種であることが明らかとなった。もう 1 つは、ホルマリン処理ヒト対照脳試料について網羅的なリン脂質解析を行い、X-ALD 患者剖検脳の凍結試料と比較した。その結果 X-ALD 患者由来の剖検脳試料でのみ蓄積が認められる脂質分子種群を見出した。LC-MS を用いて構造解析を行ったところ、リン脂質ではなく複数のコレステロールの脂肪酸エステル分子種であることが明らかとなった。質量イメージングを用いて脳内の分布について解析したところ、X-ALD 患者剖検脳中の白質領域に分布がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

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(1~19)
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 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 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 e202202779.1-11
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 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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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 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、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、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-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 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（招待講演）
4. 発表年 2020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、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
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 重水素化標識化合物およびその製造方法	発明者 滝田良、渡辺順子、 渡邊康平、濱光太 郎、横山和明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-124674	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 重水素化標識化合物およびその製造方法	発明者 滝田良、渡辺順子、 渡邊康平、濱光太 郎、横山和明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/027395	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------