

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591318
 研究課題名（和文）温度感受性に基づく代謝機能回復因子の網羅的探索と新規治療法の開発
 研究課題名（英文）
 研究代表者
 下澤 伸行（SHIMOZAWA NOBUYUKI）
 岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・教授
 研究者番号：00240797

研究成果の概要（和文）：

ペルオキシソーム代謝異常症患者細胞における培養温度によりペルオキシソームの生合成や代謝機能が正常化または増悪する温度感受性現象をもとに、発熱や酸化ストレス、過食・飢餓などの外的要因が代謝機能に与える影響を細胞、個体レベルで検討した。細胞レベルでは、hypoxia inducible 関連の遺伝子を抽出し、低酸素培養条件下での検討へ繋げている。個体レベルでは高脂肪食投与によるペルオキシソーム代謝機能を検討し、肥満モデルマウスではペルオキシソーム代謝機能が亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the molecular mechanism of a temperature-sensitive (TS) phenotype in peroxisomal biogenesis disorders (PBD), we analyzed the change of gene expression in the fibroblasts from PBD patients at 37°C and 30°C, using micro array method. Several hypoxia inducible genes may be possible to associate with TS phenomenon, therefore, we continue further study at a condition of hypoxia. Furthermore, we demonstrated mice fed on high-fat diet (HFD) induced hepatic gene expression of peroxisomal metabolism, which may provide useful fundamental information to understand the role of the peroxisomal function in obesity and lifestyle-related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：脂質代謝異常・ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症において発熱により発症、重症化する現象は、ミトコンドリア代謝異常症などを中心に知られており、申請者らは脂肪酸β酸化やコレステロール合成など脂質代謝を中心に生体に重要な代謝機能を有し

ているペルオキシソームの形成異常症患者細胞において、培養温度を通常の 37 度から 30 度に下げることによりペルオキシソームの生合成や代謝機能が正常化する温度感受性現象を遺伝子レベルで明らかにしている。これらの患者では発熱を契機に発達の退

行、視力・聴力障害から数年で寝たきりに至る症例もあり、体温変化を含めた外的要因が症状に影響する機序を解明することにより、本症を含めた難治性代謝疾患の発症や重症化予防、さらには治療薬開発へ繋がる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

温度感受性を有するペルオキシソーム形成異常症患者細胞を用いて、以下のプロセスを用いて代謝機能回復因子を同定し、発症・重症化の予防法から治療薬開発へ繋げる。

(1) RNA レベルで温度感受性により代謝機能の回復に関わる転写産物を探索する。

(2) 代謝パスウェイ解析により温度感受性現象の病態を解明する。

(3) 候補化合物スクリーニングにより本症の治療薬を開発する。

さらに外的要因として飢餓や過食によるペルオキシソーム代謝機能への影響もマウスを用いた個体レベルで検討する。

3. 研究の方法

1. 複数のペルオキシソーム形成異常症患者細胞において、温度感受性前後から RNA を抽出し、ヒトゲノムアレイを用いて発現が変動する転写産物の網羅的解析を行う。さらに得られた発現パターンをデータマイニングし、変動する特徴的な転写産物群を探索し、温度感受性現象がどの代謝系に影響を与えているのかを解析する。以上より絞られた候補転写産物群をプローブに、実際の患者細胞での温度感受性前後の RNA を用いてリアルタイム PCR にて発現量変動の再現性を確認する。

2. 1 の結果を踏まえて、発現が減少した因子では RNAi による Knock down、発現が増加した因子では遺伝子導入を行い、代謝機能の回復を実証し同定する。

3. さらに同定した代謝機能回復因子をもとに治療候補化合物を選定し、患者細胞の培養液中に添加して代謝機能の回復を指標にスクリーニングして治療薬の開発に繋げる。

4. 個体レベルでの外的要因の検討については、妊娠 14 日の母体から高脂肪食を投与して肥満モデルマウスを作製し、普通食投与群と比較検討した。

4. 研究成果

本研究ではペルオキシソーム代謝異常症患者における温度感受性現象を契機として、温度、酸化ストレス、過食・飢餓などの外的要因が代謝機能に与える影響を細胞、個体レベルで検討した。その結果、1、2 年目では患者細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析により、温度感受性により有意な変動が確認された hypoxia inducible 関連を含めた複数の遺伝子を抽出し、定量 PCR においてもその変

動を確認し、3 年目の低酸素培養条件下での検討から現在も進行中である。

また高脂肪食投与マウスによるペルオキシソーム代謝機能の検討に関しては、

1. 体重増加、血中レプチン値を確認するとともに、普通食投与群と比較した結果、ペルオキシソーム代謝産物である血中極長鎖脂肪酸の低下とプラスマローゲンの上昇を有意に認めた。

2. 生後 20 週齢時に肝臓におけるペルオキシソーム関連遺伝子産物を比較検討した結果、β酸化系をはじめとしたペルオキシソーム代謝機能が高脂肪食投与群で有意に増加しており、肥満によりペルオキシソーム代謝機能が亢進していることを明らかにした。

さらにペルオキシソーム代謝異常症の診断研究として 3 年間に、国内において約 100 症例の病因を遺伝子レベルで明らかにするとともに、サウジアラビア国立病院、ベトナムハノイ小児病院との共同研究として、ペルオキシソーム病患者の解析支援を行い、その結果を報告している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1) Noriyuki Kanzawa, Nobuyuki Shimozawa, Ronald J.A. Wanders, Kazutaka Ikeda, Yoshiko Murakami, Hans R. Waterham, Satoru Mukai, Morihisa Fujita, Yusuke Maeda, Ryo Taguchi, Yukio Fujiki, and Taroh Kinoshita. Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Lipid Res* 2012;53:653-63. 有 doi: 10.1194/jlr.M021204

2) Kozawa S, Honda A, Kajiwara N, Takemoto Y, Nagase T, Nikami H, Okano Y, Nakashima S, Shimozawa N. Induction of peroxisomal lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *Mol Med Report*. 2011;4: 1157-1162. 有 doi: 10.3892/mmr.2011.560.

3) Shaheen R, Al-Dirbashi OY, Al-Hassnan ZN, Al-Owain M, Makhshed N, Basheeri F, Seidahmed MZ, Salih MAM, Faqih E, Zaidan H, Al-Sayed M, Rahbeeni Z, Al-Sheddi T, Hashem M, Kurdi W, Shimozawa N, Alkuraya FS. Clinical biochemical and molecular characterization of peroxisomal diseases in Arabs. *Clin Genet* 2011;79: 60-70. 有 doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01498.x.

4) Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji

S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 2011;12:41-50. 有
doi: 10.1007/s10048-010-0253-6

5) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, Suzuki Y, Imanaka T. ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Current Drug Targets*. 2011;12: 694-706. 有

6) Shimozawa N, Honda A, Kajiwara N, Kozawa S, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y. X-linked adrenoleukodystrophy: Diagnostic and follow-up system in Japan. *J Hum Genet*. 2011;56:106-109. 有
doi:10.1038/jhg.2010.139

7) Shimozawa N. Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal disease. *Brain Dev*. 2011;33:770-776. 有
doi: 10.1016/j.braindev.2011.03.004.

8) Miyoshi Y, Sakai N, Hamada Y, Tachibana M, Hasegawa Y, Kiyohara Y, Yamada H, Murakami M, Kondou H, Kimura-Ohba S, Mine J, Sato T, Kamio N, Ueda H, Suzuki Y, Shiomi M, Ohta H, Shimozawa N, Ozono K. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocr J*. 2010;57:965-972. 有
doi:10.1507/endocrj.K10E-204

9) Al-Dirbashi OY, Shaheen R, Al-Sayed M, Al-Dosari M, Makhseed N, Safieh LA, Santa T, Meyer BF, Shimozawa N, Alkuraya FS. Zellweger syndrome caused by PEX13 deficiency: Report of two novel mutations. *Am J Med Genet*. 2009;149A:1219-1223. 有
DOI: 10.1002/ajmg.a.32874

(和文)

1) 下澤伸行. ペルオキシソーム代謝異常症. *内分泌・糖尿病・代謝内科* 34(3) 198-203. 無

2) 下澤伸行. ペルオキシソーム形成異常症—Zellweger 症候群—, 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No13 肝・胆道系症候群 (第2版) 2010年: 515-518. 無

3) 鈴木康之, 下澤伸行. 日本先天代謝異常学会 学会賞受賞論文「ペルオキシソーム病との30年: 二人三脚の旅」, 日本先天代謝異常学会雑誌 2010年; 26巻: 2-12. 無

4) 下澤伸行. ペルオキシソーム病を見逃していませんか?, *小児内科* 2010年; 42巻: 1167-1173. 無

5) 下澤伸行. ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー, Zellweger 症候群), *小児科*

診療 2010年: 515-517. 無

6) 下澤伸行. ペルオキシソーム病, *小児内科 小児疾患診療のための病態生理* 2 2009年; 41巻 増刊号: 479-486. 無

7) 下澤伸行. 日本人が発見に関わった疾患遺伝子 ペルオキシソーム病, *小児科 特集「小児疾患における臨床遺伝学の進歩」* 2009年; 50巻 増刊号: 907-913. 無

8) 福原 忍, 水江伸夫, 坂井拓郎, 稲澤奈津子, 池本 亘, 足立憲昭, 下澤伸行. 同一遺伝子異常を持ちながら臨床型が異なる ALD 兄弟例. *小児科臨床* 2009年; 62巻: 457-461. 無

[学会発表] (計2件)

1) 鈴木康之, 下澤伸行. 第51回日本先天代謝異常学会, 第8回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 平成21年11月. 東京. 学会賞受賞講演

2) Shimozawa N. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases. 2010.3 Taipei. Clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal disease; *Plenary Lecture*

[図書] (計9件)

1) 下澤伸行. RCDP type1. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編, 東京: 診断と治療社; 2011年: 152-153.

2) 鈴木康之, 小関道夫, 下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編, 東京: 診断と治療社; 2011年: 149-151.

3) 下澤伸行. Zellweger 症候群. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編, 東京: 診断と治療社; 2011年: 146-148.

4) 下澤伸行. 脳肝腎症候群(ツェルウェーガー症候群): 症候群ハンドブック, 東京: 中山書店; 2011年: 126-127.

5) 下澤伸行. ペルオキシソーム病: 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常, 東京: 中山書店; 2010年: 214-217.

6) 下澤伸行. 極長鎖脂肪酸測定: 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常, 東京: 中山書店; 2010年: 112-115.

7) 下澤伸行, 鈴木康之, 折居忠夫. 出生時からの著明な筋緊張低下, 哺乳不良に特異な顔貌を認めた生後2ヶ月男児: 日本先天代謝異常学会編. 症例から学ぶ先天代謝異常症, 東京: 診断と治療社; 2009年: 220-223.

8) 菊地正広, 下澤伸行. 成績低下, 行動異常から心療内科を受診していた11歳男児: 日本先天代謝異常学会編. 症例から学ぶ先天代謝異常症, 東京: 診断と治療社; 2009年: 216-219.

9) 下澤伸行. ペルオキシソーム病：日本先天代謝異常学会編. Meet the Expert 症例から学ぶ先天代謝異常症, 東京：診断と治療社；2009年：212-215.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

ペルオキシソーム病ホームページ：

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~lsrc/dgr/shimozawa-hp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下澤 伸行 (SHIMOZAWA NOBUYUKI)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター

・教授

研究者番号：00240797