

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390261

研究課題名(和文) 網羅的ペルオキシソーム機能解析による神経・代謝性疾患の病態解明

研究課題名(英文) Clarification of the relation between the pathology of neurometabolic diseases and peroxisomal function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：GC/MSとLC/MSを用いたペルオキシソーム脂質代謝解析システムを確立し、国内ペルオキシソーム病患者診断に応用した。研究期間の3年間に、8例のペルオキシソーム形成異常症、男性患者49例と女性保因者41例の副腎白質ジストロフィーを診断した。さらに患者線維芽細胞を対照との脂質メタボローム比較解析により新規のペルオキシソーム代謝機能の探索と既知の神経代謝病におけるペルオキシソーム代謝異常の解析を進めている。ペルオキシソーム病神経発生異常解明のためにペルオキシソーム欠損症患者細胞よりiPS細胞を樹立し、神経細胞へ分化させ、ペルオキシソームの神経発生への関与について解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have established new analysis system of peroxisomal metabolites, such as VLCFAs, phytanic acid, pristanic acid, and ether lipid derivatives, 1-glycerol-sn-3-phosphates, using combined GC/MS and UPLC/MS/MS, and applied this system to the diagnosis for multiple peroxisomal diseases in Japan. For 3 years of this grant, we identified 98 Japanese patients with peroxisomal diseases, including 8 patients with peroxisome biogenesis disorders (PBD), and 49 male patients and 41 female carriers with adrenoleukodystrophy (ALD). We also identified several increased saturated and unsaturated fatty acids in fibroblasts from PBD patients, using our newly developed system. We induced iPSCs from PBD fibroblasts and further differentiated into neural stem cells and neurons. We are examining the content of above metabolites in iPSCs and differentiated neurons to find out what is specifically affected in the patient neural lineage.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：ペルオキシソーム 脂質代謝異常 発生異常 iPS細胞 モデルフィッシュ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームには脂肪酸 酸化やフィタン酸、プラスマローゲンなど脂質を中心とした生体内で重要な多くの代謝機能を有している。そのペルオキシソームの代謝系に異常を来す疾患群がペルオキシソーム病で、神経発生異常から脱髄、骨・軟骨や精子形成、肝腎まで多彩な症状を来す多くの疾患を有している。代表者は国内唯一のペルオキシソーム病診断拠点を有し、代謝産物の分析から遺伝子解析にて多くの症例を診断し、患者リソースも集積している。またペルオキシソーム形成異常症の病因遺伝子や新たなペルオキシソーム病についても臨床基礎両面から長年、研究を継続している。

2. 研究の目的

代表者らが既に稼働しているペルオキシソーム病診断システムをより高精度、網羅的、そしてハイスループットに進化させることにより、脂質代謝産物を中心としたペルオキシソーム関連メタボローム解析とペルオキシソーム遺伝子の多型と発現を網羅的に解析できるペルオキシソーム機能解析システムを構築する。そのシステムを用いて患者リソースおよびiPS細胞における組織特異的なペルオキシソーム機能を効率的かつハイスループットに解析することにより、ペルオキシソーム病の病態解明、早期診断・早期介入を目指したマススクリーニング法の開発から新たなペルオキシソーム病の発見、さらには病態未解明の神経難病や生活習慣病におけるペルオキシソーム機能の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GC/MS、UPLC/MS、FT-IR 法による、より広範囲かつ迅速なペルオキシソーム関連代謝産物解析法の確立と診断への応用:

現在、ペルオキシソーム病診断スクリーニングとして、GC/MS による脂肪酸一斉分析にて21種類の脂肪酸を同定・定量しているが、新規に導入したUPLC/MSを用いて、プリスタン酸など診断スクリーニング項目を増やすことにより、診断能力を高める。

またUPLC/MSやFT-IR法を用いた極長鎖脂肪酸の大量検体の解析法を開発することにより、ハイリスクスクリーニングからマススクリーニング導入の可能性を検討する。

さらにペルオキシソームの形成異常により全てのペルオキシソーム代謝機能が障害されているZellweger症候群患者の線維芽細胞、血清等を用いて分子種の構造も含めた解析を対照と比較することにより、病態解明から新たなペルオキシソーム機能を解明し、ペルオキシソーム代謝に関わる既知、未知の物質を解析できるシステムを構築し、より広い疾患におけるペルオキシソーム機能の病態に与える影響を明らかにする。

(2) iPS細胞を用いたペルオキシソーム形成異常症における発生異常発症機序の解明:

ペルオキシソーム代謝機能が全般的に障害され、全身の臓器に発生異常を認め、当初は家族性奇形症候群として報告されたZellweger症候群患者細胞より人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立し、神経系などの各臓器の幹細胞に分化させることにより、各臓器における発生段階からのペルオキシソーム異常による影響が解明できるシステムを確立する。

4. 研究成果

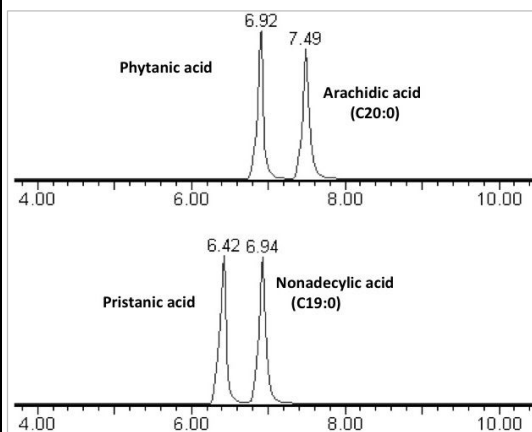
(1) GC/MS、UPLC/MS、FT-IR法による、より広範囲かつ迅速なペルオキシソーム関連代謝産物解析法の確立と診断への応用:

従来のGC/MSにUPLC/MSを追加したペルオキシソーム病の総合診断システムにより、新たにプリスタン酸の測定を可能にするとともに、国内唯一のペルオキシソーム病総合診断施設として3年間に、98例のペルオキシソーム病患者を診断、遺伝子解析にて確定し、適切な診療情報を全国に提供した。

研究期間内にGC/MS + UPLC/MSにて診断した日本人ペルオキシソーム病患者数(H24.4-27.3)

ペルオキシソーム病	症例数
Zellweger 症候群	6
新生児型副腎白質ジストロフィー	1
乳児型Refsum病	1
副腎白質ジストロフィー 男性患者	49
副腎白質ジストロフィー 女性保因者	41

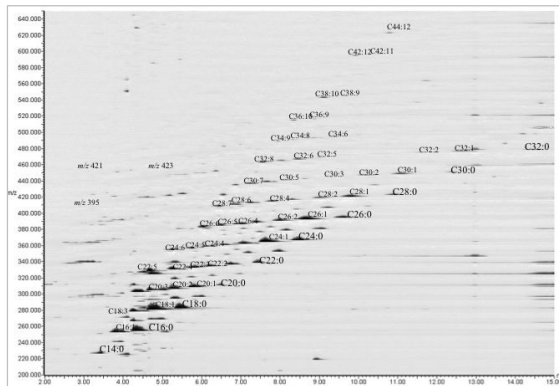
特に下図に示したプリスタン酸の解析法の開発により、ペルオキシソーム形成異常症や酸化系酵素欠損症などのフィタン酸代謝異常の診断精度が向上した。



また患者検体の迅速かつ非破壊的なハイリスクスクリーニング検査の開発を視野に、フーリエ変換赤外分光法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR 分光法)により、血清サンプルを測定して赤外スペクトルを得て、重回帰分析によりペルオキシソーム病の有力な診断バイオマーカーであるC26:0/C22:0比と比較検討し、高い相関を得ることに成功した(Isogawa et al 2014)。

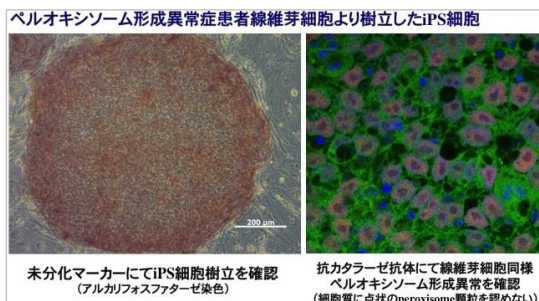
また対照と Zellweger 症候群患者細胞を用いて LC/MS/MS による詳細な解析を行った結果、患者において不飽和脂肪酸を含む新たな脂肪酸蓄積パターンを明らかにした(下図)。

Zellweger 症候群患者線維芽細胞の Map 解析



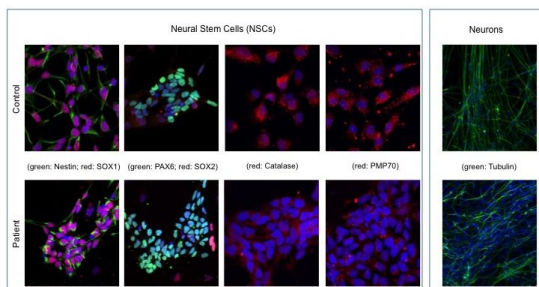
今回の研究成果により、ペルオキシソーム代謝機能をより広く、より詳細に評価可能なシステムが確立したことにより、引き続きペルオキシソーム病の脂質代謝異常による病態を明らかにし、治療法開発に繋げる。

(2) iPS 細胞を用いたペルオキシソーム形成異常症における発生異常発症機序の解明：
3 年間にペルオキシソーム形成異常症患者の線維芽細胞より iPS 細胞の樹立(下図)。



アレイ CGH による精度確認、マウス精巢への移植によるテラトーマ作成による多能性を確認し、神経細胞へ分化させた。

対照、Zellweger 症候群線維芽細胞から iPS 細胞の樹立、神経幹細胞・神経細胞への分化



現在、分化した神経細胞での形態、ペルオキシソーム代謝機能、遺伝子発現等の解析を行っており、ペルオキシソーム病の発生異常の解明から、ヒトの発生過程におけるペルオキシソームの生理的機能についても明らかにする。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 22 件)

Isogawa M, Yoshida S, Shimozawa N. Evaluation of fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of peroxisomal diseases with abnormal very-long-chain fatty acid metabolism. Am J Anal Chem 査読あり 5; 359-366, 2014.

下澤伸行：ペルオキシソーム病 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No28 神経症候群(第 2 版) 査読無 728-736, 2014.

下澤伸行：ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー、ペルオキシソーム形成異常症)小児科診療 2014 年 77 巻増刊号. 小児の治療指針 査読無 548-551, 2014.

Matsui S, Shimozawa N et al (4 人中 4 番目): Newly identified milder phenotype of peroxisome biogenesis disorder caused by mutated PEX3 gene. Brain Dev 査読あり 35: 842-848, 2013.

Iwasa M, Shimozawa N et al (9 人中 9 番目): Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case. Neuropathology 査読あり 33: 292-8, 2013.

Mizuno Y, Shimozawa N et al (27 人中 8 番目): Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. PLoS Genet 査読あり 9(2), e1003286, 2013.

Morita M, Shimozawa N et al (9 人中 7 番目): A novel double mutation in the ABCD1 gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. JIMD Rep 査読あり 10: 95-102, 2013.

Hama K, Shimozawa N et al (12 人中 9 番目): Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome. Lipids 査読あり 48: 1253-67, 2013.

Ohba C, Shimozawa N et al (18 人中 7 番目) Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. Neurogenetics 査読あり 14: 225-32, 2013.

下澤伸行：副腎白質ジストロフィー 先天代謝異常ハンドブック. 査読無 252-253, 2013

Kanzawa N, Shimozawa N et al (12 人中 2 番目): Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata. J Lipid Res 査読あり 53: 653-63, 2012.

Mizumoto H, Shimozawa N et al (8 人中 7 番目): Mild case of D-bifunctional protein deficiency associated with novel gene

mutations Pediatr Int 査読あり 54: 303-4, 2012.

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 査読無 34: 198-203, 2012.

下澤伸行: ペルオキシソーム病 Brain Medical 査読無 24: 261-270. 2012.

下澤伸行: 副腎白質ジストロフィーの診療アップデート 小児内科 査読無 44: 1667-1672. 2012.

下澤伸行: 副腎白質ジストロフィー 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 査読無 418-427. 2012.

下澤伸行: ペルオキシソーム病: 概論 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 査読無 389-397. 2012.

下澤伸行: ツェルウェーger (Zellweger) 症候群 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 査読無 398-404. 2012.

下澤伸行: 新生児型副腎白質ジストロフィー 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 査読無 405-408. 2012.

下澤伸行: ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー)最新ガイドライン準拠 小児科 診断・治療指針 査読無 299-302. 2012.

①鈴木康之、下澤伸行: 副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植法 Annual Review 神経 2012. 査読無 241-245. 2012.

②下澤伸行: ペルオキシソーム病(Zellweger 症候群, 原発性高シュウ酸尿症1型) 別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ No17 腎臓症候群(第2版) 査読無 369-373. 2012.

[学会発表](計 7件)

下澤伸行: 副腎白質ジストロフィー シンポジウム 見逃してはならない治療法のある、あるいは今後期待できる小児神経疾患: 診断と治療の最前線 第56回日本小児神経学会、アクトシティ浜松・静岡・浜松、2014.

下澤伸行: ペルオキシソーム病のアップデート～基礎と臨床の融合 教育講演 第56回日本小児神経学会、アクトシティ浜松・静岡・浜松、2014.

Shimozawa N: Peroxisomal disorder. 招待講演 12th Asian and Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh・Saudi Arabia. 2013.

Shimozawa N: Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases. 教育講演 3rd ACIMD & 56th JSIMD. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート・舞浜・千葉. 2013.

下澤伸行: 副腎白質ジストロフィー 診断・治療の update シンポジウム「神経障害をきたす先天代謝異常症 診断・治療の

update」第54回日本小児神経学会. ロイトン札幌・北海道・札幌. 2012.

下澤伸行: 早期診断・早期介入への現状と診療指針 シンポジウム「副腎白質ジストロフィー診療の現状と提案-診療ガイドラインの作成に向けて」第54回日本先天代謝異常学会. 第11回アジア先天代謝異常学会. じゅうろくプラザ・岐阜・岐阜. 2012.

下澤伸行: ペルオキシソーム病診断システムの確立と病因解明 小児医学川野賞受賞講演. ヤオコー別館・川越・埼玉. 2012.

[図書](計 3件)

下澤伸行: ペルオキシソーム. プロGRESS生命科学 米田悦啓他、編. 60-3. 南山堂 東京 2014.

下澤伸行 監修: 副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック 2013 -ALD患者を支えている関係者の皆様へ- 西濃印刷 岐阜 2013.

下澤伸行: ペルオキシソーム病ハンドブック 2013 -全てのペルオキシソーム病患者の診断治療を目指して- 日本臨床社. 大阪. 2013.

[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

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

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

(3) 連携研究者

高島 茂雄 (TAKASHIMA Shigeo)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号: 50537610