

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659492

研究課題名(和文)多角的アプローチによる副腎白質ジストロフィーの脱髄発症・病型規定因子の同定

研究課題名(英文)Clarification of the pathology of adrenoleukodystrophy

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：副腎白質ジストロフィー(ALD)の迅速診断システムを確立して全国の患者を診断するとともに、集積した患者リソースと病因遺伝子であるABCD1遺伝子欠損マウスを用いて、genotypeに相関しない本症の多様な病型を規程する因子の特定を目指した。本研究期間内に小児大脳型21例、思春期大脳型2例、成人大脳型6例、AMN6例、小脳脳幹型2例、アジソン型4例、発症前男性患者8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。さらに病型の異なる患者間やモデルマウスの解析より、ABCD1欠損による基本病態や、病型に関連する複数の因子を抽出し、患者多検体による検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have established diagnostic system for the patients with adrenoleukodystrophy (ALD), using combined GC/MS and UPLC/MS, and diagnosed 49 male patients with ALD, including 21 with childhood cerebral form, 2 with adolescent cerebral form, 6 with adult cerebral form, 6 with adrenomyeloneuropathy, 2 with cerebello-brainstem form, 4 with Addison form and 8 with presymptomatic, and 41 female carriers. In order to elucidate the regulatory factors of various phenotypes in ALD, we have established multiple analysis system, which consists of lipidomics by LC/MS/MS and transcriptomics by microarray, using bio-resource from different phenotypes of ALD patients and ABCD1-deficient mice. We identify several factors related to phenotypes, and verify the relation, using a large number of samples from the patients.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：副腎白質ジストロフィー 脱髄 副腎機能不全 疾患モデル マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィー (ALD) は最も頻度の高い白質変性症で、病因遺伝子 *ABCD1* は同定されたものの、その機能不全による病態、特に脱髄の発症や多彩な病型を規定する因子は遺伝要因か環境要因かも含めて全く不明である。大脳型の唯一の治療法である発症早期の造血細胞移植も、発症後診断例では推奨する適応基準内での移植は難しい一方で、発症前診断例でも予後の予測が困難なことから移植のリスクより、基本的には発症後に施行されているのが現状である。また *ABCD1* 機能不全による直接の影響と考えられる副腎不全や脊髄障害もその病態や極長鎖脂肪酸蓄積との関連も不明である。

従って、ALD における *ABCD1* 機能不全による分子病態の解明から、副腎、脊髄障害の発症機序、そして何より大脳型の発症・病型規定因子の探索は臨床現場より強く求められている本症克服への喫緊の課題である。

申請者は長年、ALD の国内診断施設として、発症前も含めた多くの患者を診断、介入するとともに、多くの ALD 患者リソース並びに病因である *ABCD1* 遺伝子改変ノックアウトマウスも系統維持し、本萌芽研究への準備は整っている状態にある。

2. 研究の目的

本課題では、以下に示す3つのアプローチにより、難病に指定されている ALD の病態解明研究を通じて、本症の克服に繋がる萌芽研究を目指す。

(1) 唯一の診断マーカーである極長鎖脂肪酸の検出システムの高機能化による診断能力の向上と、集積した患者検体を用いた脂質メタボローム解析による病態に直結するバイオマーカーの探索

(2) *ABCD1* 遺伝子欠損モデルマウスによる非大脳型の発症機序の解明

(3) 病型の異なる患者群のゲノム・トランスクリプトーム解析による大脳型発症・病型規定因子の探索

統合して得られた知見は多検体の患者リソースを用いて検証し、本症の病態解明から疾患克服に繋げる。

3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS を用いた脂肪酸分析による高機能診断システムの開発と病態に直結する新規バイオマーカーの探索:

ALD の診断は現在、GC/MS を用いた患者血清または血漿の極長鎖脂肪酸分析により行っているが、UPLC/MS を用いて少量の血液による迅速な診断法及び、髄液、細胞を用いた脂肪酸分析法を開発する。さらに ALD 患者由来の培養皮膚線維芽細胞と対照細胞を比較した LC/MS/MS による脂質メタボローム解析により、*ABCD1* 機能不全による分子病態に関連する極長鎖脂肪酸以外の脂質バイオマーカーを探索する。

(2) *ABCD1* 欠損マウスを用いた副腎機能異常の病態解明:

ALD 患者副腎では他臓器に比べて著明な極長鎖脂肪酸の蓄積や、電顕で副腎皮質細胞の細胞質内に層板状の封入体を認めている。また多くの患者では副腎機能異常を示すものの、その病態は解明されていない。*Abcd1* 欠損マウス副腎でも極長鎖脂肪酸の著明な蓄積を認めており、欠損マウス副腎皮質より培養細胞を樹立し、細胞レベルで解析可能な系を確立する。

(3) 病型の異なる患者間での遺伝子発現比較解析による大脳型発症因子の探索:

同胞例での大脳型、非大脳型患者由来の培養線維芽細胞より、RNA を抽出し、アレイ解析により比較検討し、パスウェイ解析等を用いて大脳型発症に関連する遺伝子群を抽出する。得られた遺伝子群は多サンプルによるリアルタイム定量 PCR や該当するタンパクの ELISA 法により検証する。

4. 研究成果

(1) LC/MS/MS を用いた脂肪酸分析による診断システムの開発とバイオマーカーの探索:

従来の GC/MS を用いた脂肪酸分析に UPLC/MS

による診断システムを補充することにより、全国の医療機関より診断依頼され、研究期間の3年間に ALD 男性患者 49 例と、女性保因者 41 例を診断し、*ABCD1* 遺伝子変異も確定した上で、診療情報とともに結果を提供した。さらにこれらのうち、倫理委員会の承認のもと、同意の得られた患者サンプルについては、本研究のリソースとして集積した。

副腎白質ジストロフィー国内診断実績	
平成24-26年度(3年間)	
男性患者	49
小児大脳型	21
思春期大脳型	2
成人大脳型	6
AMN	6
小脳脳幹型	2
Addison型	4
発症前	8
女性保因者	41
男女計	90

ALD 患者由来の培養細胞と対照細胞を用いた脂質メタボローム比較解析では、MAP 解析にて患者で特異的に増加する脂質分子種が抽出され、MS/MS 解析の結果、リン脂質の1つであることが特定された。現在、ゲノム編集技術を用いて対照細胞の *ABCD1* 遺伝子を欠失させて、解析結果の再現性を検証中である。

(2) *ABCD1* 欠損マウスを用いた ALD 患者における副腎機能不全の病態解明:

野生型および欠損マウスより摘出した副腎皮質より初代培養細胞を樹立し、ACTH 負荷によるコルチコステロン分泌反応が低下していることを明らかにし(次ページ図参照)

患者における副腎不全の病態を反映するモデル系を確立した。今後、この系を用いてALDにおける副腎不全発症の病態解明から創薬研究に繋げていく。

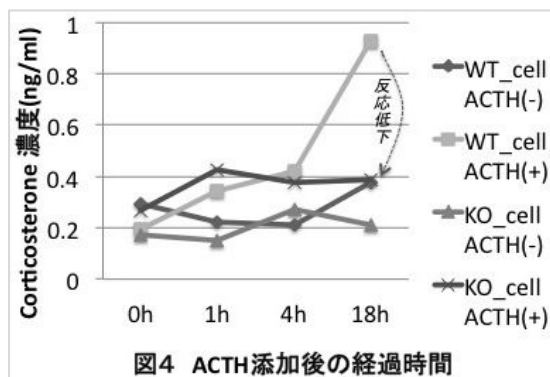


図4 ACTH添加後の経過時間

(3) 病型の異なる患者間での遺伝子発現比較解析による大脳型発症の探索：

大脳型と非大脳型患者由来の線維芽細胞によるマイクロアレイ解析、パスウェイ解析により、炎症性サイトカインに関連する遺伝子の変動が抽出された。現在、患者多検体を用いたリアルタイム定量PCRやELISA法により該当遺伝子を検証中である。

以上の3つのアプローチによる萌芽研究で集積したALD患者リソースと、確立した解析系により、ABCD1機能不全による基本病態の解明から大脳型発症因子の探索研究が加速され、今後、本症の克服に向けた研究を推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10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.

Ohkuma Y, Shimozawa N et al (12人中12番目) Retinal Ganglion Cell Loss in X-linked Adrenoleukodystrophy with an ABCD1 Mutation (Gly266Arg). *Neuro Ophthalmology* 査読あり 38(6): 331-335, 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.

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.

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.

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.

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（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.

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.

〔学会発表〕(計3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：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.

〔図書〕(計1件)

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.

〔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

<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