

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K01691

研究課題名(和文)先天性代謝異常疾患の診断マーカーと新規治療ターゲットの創出

研究課題名(英文) The development of diagnostic marker and therapeutic target for inherited metabolic disorders

研究代表者

濱 弘太郎 (Hama, Kotaro)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ABCトランスポーター(ABCD1)は、副腎白質ジストロフィー(X-ALD)の原因遺伝子である。脂肪酸は脂肪酸CoAとして活性化され様々な代謝反応に供されるが、脂肪酸CoA自体について定量的な解析が進んでいなかった。我々は脂肪酸CoA各分子種を測定する方法を検証し、X-ALD患者由来の線維芽細胞とABCD1欠損HeLa細胞について、細胞内の各種脂肪酸CoA分子種を解析し、26:1-CoAが最も高濃度に蓄積する極長鎖脂肪酸CoAであることを見出した。さらに重水素標識脂肪酸を用いた解析では、極長鎖脂肪酸CoAを含む各種脂肪酸CoAは、ABCD1の有無にかかわらずほぼ同様の半減期で代謝されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎白質ジストロフィーの患者間では、その発症時期、症状の程度に大きな違いが存在し、治療を難しくしている。副腎白質ジストロフィーのすべての亜型では極長鎖脂肪酸が上昇しているものの、その亜型特異的な特徴は見出されていない。現在臨床上用いられている極長鎖脂肪酸の測定方法は、脂肪酸の総量を測定するものであり、生体内の存在様式は反映されない。申請者は今回、活性化状態として存在する脂肪酸、および、生体内に存在する極長鎖脂肪酸含有複合脂質を定量した。極長鎖脂肪酸含有脂質の産生代謝および輸送過程を制御することができれば、新しい創薬対象が見出される可能性があり、本研究はその基礎的な情報として重要である。

研究成果の概要(英文)：VLCFA are transported by ABCD1 into the peroxisome where they are degraded by β -oxidation. ABCD1 is the causative gene of X-ALD. Fatty acyl-coenzyme A (acyl-CoA) is an active form and serves as metabolic intermediates of fatty acids. Acyl-CoA is composed of both a hydrophobic fatty acyl moiety and a hydrophobic CoA joined with a thioester linkage. The intracellular pool of each acyl-CoA ester has not yet been fully analyzed. In this study, we profiled the acyl-CoA species in fibroblasts from X-ALD patients and in ABCD1-deficient HeLa cells. We found that hexacosenoyl (26:1)-CoA was the most abundantly concentrated among the VLCFA-CoA species in these cells. We also show that 26:1-CoA is mainly synthesized from oleoyl-CoA, and the metabolic turnover rate of 26:1-CoA was almost identical to that of oleoyl-CoA in both wild-type and ABCD1-deficient HeLa cells. The findings of our study provide quantitative and metabolic information of each acyl-CoA species in living cells.

研究分野：脂質生物学

キーワード：副腎白質ジストロフィー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常疾患であるペルオキシソーム病 (Zellweger 症候群・副腎白質ジストロフィー等) は、ペルオキシソームの形成不全あるいは機能不全により、種々の代謝異常が観察され、重篤になると神経系の症状を呈する。特に本疾患の生化学的特徴として、通常の生体にはほとんど検出されない極長鎖脂肪酸が脳神経系や副腎白質などに蓄積していることが知られており、疾患マーカーとして临床上利用されている。この極長鎖脂肪酸は、病態の発症や重篤化に大きく関与するものと考えられているが、その分子機序は殆ど明らかにされていない。極長鎖脂肪酸は、主に複合脂質として存在する。従来、極長鎖脂肪酸の総量が測定されているが、極長鎖脂肪酸を含む様々な複合脂質について詳細に解析されていない。それ故、極長鎖遊離脂肪酸あるいは極長鎖脂肪酸を含む他の複合脂質のうちのいずれが病態に関与するかという点も未だ不明である。よって、ペルオキシソーム病の病態発生機序を明らかにするためには、病態に直接寄与する極長鎖脂肪酸の構造を明らかにし、その産生代謝過程を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、1. ペルオキシソーム病の一つである副腎白質ジストロフィー患者の極長鎖脂肪酸含有リン脂質およびその合成中間産物・代謝産物を分子種別に詳細に定量し、副腎白質ジストロフィーの亜型分類あるいは臨床症状と相関する疾患マーカーを発見すること、2. 副腎白質ジストロフィー患者における極長鎖脂肪酸含有脂質の産生代謝過程を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では患者の臨床症状に相関する新規マーカーの発見および副腎白質ジストロフィーの病態進展に寄与する脂質の産生、代謝過程を明らかにする為に以下2つの方法を採用した。

(1) 副腎白質ジストロフィー患者の極長鎖脂肪酸含有脂質の詳細な解析

副腎白質ジストロフィー患者由来の検体中の極長鎖脂肪酸含有リン脂質およびその合成中間体、代謝産物について、マスマスペクトロメトリーを用いて定量し、統計分析を行った。

(2) 副腎白質ジストロフィー患者における極長鎖脂肪酸含有脂質の産生代謝過程の解明

ゲノム編集技術により作出された副腎白質ジストロフィーモデル培養細胞を用いて、極長鎖脂肪酸含有脂質の産生、代謝に関わる遺伝子を明らかにした。

4. 研究成果

1. 副腎白質ジストロフィー患者由来の線維芽細胞について、リン脂質分析を行った。副腎白質ジストロフィーは、その病態に応じて小児大脳型、adrenomyeloneuropathy (AMN) 型などの亜型にさらに分類される。本研究では小児大脳型副腎白質ジストロフィー患者の線維芽細胞と、それ以外の亜型の患者の線維芽細胞の比較も併せて行った。その結果、小児

大脳型患者では、対照群と比べて、11 種類のホスファチジルコリン分子種が上昇しており、特に極長鎖脂肪酸を含有する分子種が顕著に増加していた。一方、AMN 型患者を含む患者では、対照群と比べてホスファチジルコリン分子種は顕著に変動していなかった一方、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴミエリン分子種が顕著に増加していた。

- 2 . 生体内で脂肪酸は脂肪酸 CoA として活性化され、リン脂質等の複合脂質に組み込まれる。我々は、脂肪酸 CoA を簡便に測定する方法を検討し、副腎白質ジストロフィー患者由来の線維芽細胞中の各種脂肪酸 CoA 分子種を定量した。その結果、Hexacosenoyl-CoA (26:1-CoA) が最も高濃度に蓄積する極長鎖脂肪酸 CoA であることが明らかになった。従来の研究では、極長鎖脂肪酸として、飽和型の Hexacosanoyl acid (FA 26:0) が最も高濃度に蓄積することが報告されていたことから、活性化型脂肪酸である脂肪酸 CoA は、異なる細胞内動態を示すことが示唆された。
- 3 . 上記で見られた現象が、副腎白質ジストロフィーの原因遺伝子である ABCD1 依存性であるかを検証する為に、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、ABCD1 欠損 HeLa 細胞を作出した。このノックアウト細胞を用いて細胞内のリン脂質および脂肪酸 CoA 分子種を分析したところ、線維芽細胞とほぼ同様の結果が得られた。これらの結果から、ABCD1 の欠損により、極長鎖脂肪酸代謝に異常が生じ、極長鎖脂肪酸を含有するホスファチジルコリンあるいはスフィンゴミエリン分子種が蓄積することが明らかになった。
- 4 . 脂肪酸 CoA は、活性化脂肪酸として複合脂質に組み込まれる、あるいは、酸化をうけて分解されるなどの各種代謝作用を受ける。しかし、脂肪酸 CoA 各分子が、細胞内にどの程度蓄積するかという解析は進んでいなかった。我々は、各脂肪酸 CoA 分子種の細胞内動態を明らかにするために、ABCD1 ノックアウト HeLa 細胞に重水素標識脂肪酸を添加して、各種脂肪酸 CoA 分子種への変換速度を解析した。その結果、FA 26:0 を添加した場合、添加後 24 時間にわたって、ゆっくりと 26:0-CoA が細胞内で合成される一方、FA 18:1 を添加した場合は、添加後 1 時間以内に急激に 18:1-CoA が合成され、その後急激に減少することがわかった。次に FA 18:1 を一定時間添加して、パルスチェイス実験を行った。その結果、18:1-CoA から脂肪酸伸長反応によって生ずる大部分の各種脂肪酸 CoA や、脂肪酸の不飽和化反応によって生じる二重結合を二個有する脂肪酸 CoA のいずれも、添加後急激に減少し、半減期も脂肪酸 CoA 各分子種間で類似していた。各種脂肪酸 CoA は、ABCD1 欠損下では、積極的に各種複合脂質に組み込まれることが示された。今後は、各種脂肪酸 CoA の動態に関する分子機構が副腎白質ジストロフィーの病態と如何に関与するかを検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Hayashi Yasuhiro, Nemoto-Sasaki Yoko, Matsumoto Naoki, Hama Kotaro, Tanikawa Takashi, Oka Saori, Saeki Tadaaki, Kumasaka Tatsuya, Koizumi Takanori, Arai Seisuke, Wada Ikuo, Yokoyama Kazuaki, Sugiura Takayuki, Yamashita Atsushi	4. 巻 293
2. 論文標題 Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17505 ~ 17522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002048	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, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative and Qualitative Method for Sphingomyelin by LC-MS Using Two Stable Isotopically Labeled Sphingomyelin Species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	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) 10.3791/57293	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, Morita Masashi, Yamazaki Fumiyoshi, Nakashima Yuko, Takei Shiro, Takashima Shigeo, Setou Mitsutoshi, Shimozawa Nobuyuki, Imanaka Tsuneo, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 85 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12022	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, Tsukahara Makoto, Izumi-Tsuzuki Ryosuke, Nagai Toru, Ohe-Yamada Mihoko, Inoue Keizo, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Acyl Chain Preference in Foam Cell Formation from Mouse Peritoneal Macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00610	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 K, Fujiwara Y, Tabata H, Takahashi H, Yokoyama K.	4. 巻 52
2. 論文標題 Comprehensive Quantitation Using Two Stable Isotopically Labeled Species and Direct Detection of N-Acyl Moiety of Sphingomyelin.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 789-799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11745-017-4279-5	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 K, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 85-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12022	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 Y, Hama K, Tsukahara M, Izumi-Tsuzuki R, Nagai T, Ohe-Yamada M, Inoue K, Yokoyama K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Acyl Chain Preference in Foam Cell Formation from Mouse Peritoneal Macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 86-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00610.	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 Nishioka T, Arima N, Kano K, Hama K, Itai E, Yukiura H, Kise R, Inoue A, Kim SH, Solnica-Krezel L, Moolenaar WH, Chun J, Aoki J.	4. 巻 6
2. 論文標題 ATX-LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 23433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep23433.	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21件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kotaro Hama, Yuko Fujiwara, Atsushi Yamashita and Kazuaki Yokoyama
2. 発表標題 Quantitation of each acyl-CoA species in ABCD1-deficient cells
3. 学会等名 59th international conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、山下純、横山和明
2. 発表標題 ロレンツォオイル添加時の各種極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAの定量
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、山下純、横山和明
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質を対象とする網羅的解析の為にキラルカラムによる分離系の検討
3. 学会等名 第59回脂質生化学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 ABCD1ノックアウト細胞における極長鎖脂肪酸CoAの定量
3. 学会等名 第59回脂質生化学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、山下純、横山和明
2. 発表標題 LC-ESI-MSを用いたスフィンゴ糖脂質の網羅的解析の為のキラルカラムによる分離系の検討と生体サンプルへの適用
3. 学会等名 第42回日本医用マススペクトル学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明
2. 発表標題 LC-ESI-MSを用いたスフィンゴ糖脂質の網羅的解析の為のキラルカラムによる分離系の検討と生体サンプルへの適用
3. 学会等名 第42回日本医用マススペクトル学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、山下純、横山和明
2. 発表標題 ABCD1欠損細胞中の極長鎖脂肪酸CoAの定量
3. 学会等名 第59回先天代謝異常学会
4. 発表年 2017年～2018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生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析
3. 学会等名 第59回先天代謝異常学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、山下純、横山和明
2. 発表標題 ABCD1ノックアウト細胞における極長鎖脂肪酸CoAの定量
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年～2018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生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Abcd1ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析
3. 学会等名 第58回脂質生化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Abcd1ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析
3. 学会等名 第41回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Abcd1ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 濱弘太郎
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィーの患者およびAbcd1マウスにおけるリン脂質の網羅的解析
3. 学会等名 第1回ベルオキシソーム病研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 谷川和也、Luo Yuqian, 鈴木幸一, 濱弘太郎, 横山和明, 中村康宏, 原田史子, 唐澤健
2. 発表標題 らい菌感染マクロファージに蓄積するトリアシルグリセロール分子種の同定
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 谷川和也、Luo Yuqian, 鈴木幸一, 濱弘太郎, 横山和明, 中村康宏, 原田史子, 唐澤健
2. 発表標題 らい菌は宿主マクロファージのGPAT3の発現を促しトリアシルグリセロールを蓄積する
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、松本隼、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 多段階MRMモードを用いたABCD1ノックアウトマウスの脳の脂質解析
3. 学会等名 第57回脂質生化学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Abcd1ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析
3. 学会等名 第40回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 Abcd1ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析
3. 学会等名 第9回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 濱弘太郎、藤原優子、守田雅志、今中常雄、下澤伸行、横山和明
2. 発表標題 ESI-LC/MSを用いたAbcd1ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析
3. 学会等名 第57回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 笠原美那実, 笠松瞳, 豊島永莉, 前田絵里加, 南佳那, 渡邊里奈, 濱弘太郎, 藤原優子, 下澤伸行, 守田雅志, 今中常雄, 横山和明
2. 発表標題 LC-MS/MSによるAbcd1ノックアウトマウス脳の極長鎖脂肪酸含有リン脂質分子種の解析と糖脂質解析法の検討
3. 学会等名 日本薬学会 136年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----