

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15389

研究課題名(和文)ペルオキシソーム病患者幹細胞・疾患モデル生物を用いた発生異常・病態解明と創薬研究

研究課題名(英文)Research on elucidation of pathology and drug discovery in peroxisomal diseases using stem cells and diseased model organisms

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：3年間の研究成果として、ゲノム編集技術により重症型と軽症型の2つのタイプの Zellweger症候群モデルフィッシュの作成に成功した。そのうち重症型では、極長鎖脂肪酸を含めたペルオキシソーム代謝機能異常を認め、成長障害、運動機能の低下から早期に死亡する患者の病態を反映する所見が再現された。さらに発生早期から脂肪肝を認めることも確認された。本萌芽研究成果により確立されたモデルフィッシュを用いた病態解析法は、ペルオキシソーム病から脂質代謝異常に基づく生活習慣病である非アルコール性脂肪肝の病態解明、治療法開発研究の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：As a result of 3 years of research, we succeeded in creating two types of Zellweger syndrome model fish, severe type and mild type, by genome editing technique. In severe form, there were abnormal peroxisomal metabolic functions and phenotypes reflecting the pathology of patients including early death, failure to thrive and declining motor function. It was also confirmed that fatty liver was recognized earlier. Currently, pathological examination of the central nervous system and microarray analysis are underway. The pathophysiological analysis method using the model fish established by the results of this research may elucidate the pathology of a life-related disease based on abnormal lipid metabolism and develop the therapeutic research, as well as peroxisomal diseases.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ペルオキシソーム病 モデルフィッシュ ゲノム編集 Zellweger症候群 脂肪肝 極長鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

指定難病であるペルオキシソーム病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に異常をきたす先天代謝異常症で、中枢神経の発生異常から骨・軟骨や精子形成、肝腎まで多彩な症状を来す。代表者は国内唯一のペルオキシソーム病診断拠点として、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。一方で、脂質代謝異常によるペルオキシソーム病患者の各臓器障害の発症機序は未解明なため、その病態解明から治療法開発に繋げることが課題である。また近年の生化学、遺伝学的手法の進歩により、ペルオキシソーム病の疾患概念も拡大しており、患者由来のiPS細胞や疾患モデル生物の開発と新たな診断システムの開発はペルオキシソーム病研究領域を臨床基礎両面から新たな展開に導く萌芽研究として期待される。

2. 研究の目的

(1) ペルオキシソーム病の極型である Zellweger 症候群患者の iPS 細胞と疾患モデルフィッシュを作成して、ペルオキシソーム代謝異常に基づく発生異常と臓器障害の病態を解明する。

(2) 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し、国内未診断のペルオキシソーム病を効率的、迅速に診断する。

以上よりペルオキシソーム病の病態解明から新たなペルオキシソーム病の発見、さらには脂質代謝異常が関わる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して、その成果を社会に還元することを目的とする。

3. 研究の方法

(1-1) iPS 細胞を用いたペルオキシソーム形成異常症における神経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、当初は脳肝腎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代謝異常と病態との関連を解明する。

(1-2) ペルオキシソーム欠損モデルフィッシュを用いた臓器障害発症機序の解明：ゲノム編集技術を用いてペルオキシソーム形成異常症の病因である PEX 遺伝子を欠損したゼブラフィッシュを作成して、発生初期から症状、生化学的、形態学的異常を解析して病態解明に繋げる。

(2)次世代ペルオキシソーム病診断・解析システムの確立：GC-MS と LC-MS/MS の2つの質量分析装置によるペルオキシソーム代謝産物の脂質解析と細胞を用いた生化学的解析に、全エクソーム解析を組み合わせた効率的かつ網羅的な診断システムを構築し、より正確な診断を迅速に提供するとともに、病態に関わる新たな脂質分子種を探索する。さらに(1)で作成した病態解明モデルを本システムで解析することにより、ペルオキシソーム代謝に関わる既知、未知の物質を解析し、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。

4. 研究成果

(1-1) iPS 細胞を用いたペルオキシソーム形成異常症における神経発生異常発症機序の解明：3年間でペルオキシソーム形成異常症患者の線維芽細胞より iPS 細胞の樹立し、神経幹細胞への分化を確認した。ペルオキシソーム形成異常症の神経幹細胞の性質を確認し、現在、対照細胞 iPS 細胞から分化させた神経幹細胞とのマイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現の比較解析を進めている。

(1-2) ペルオキシソーム欠損モデルフィッシュを用いた臓器障害発症機序の解明：3年間の研究成果として、ゲノム編集技術により重症型と軽症型の2つのタイプの Zellweger 症候群モデルフィッシュの作成に成功した。そのうち重症型では、極長鎖脂肪酸を含めたペルオキシソーム代謝機能異常を認め、成長障害、運動機能の低下から早期に死亡する患者の病態を反映する所見が再現された。さらに発生早期から脂肪肝を認めることも確認された(投稿準備中)。現在、さらに中枢神経系の病理学的検討と、マイクロアレイ解析を進めている。

(2) 次世代ペルオキシソーム病診断・解析システムの確立：GC-MS による 21 種類の脂肪酸を同定・定量システムと LC-MS/MS による脂肪酸一斉分析システムを組み合わせることにより、ペルオキシソーム代謝産物の迅速なスクリーニング解析と詳細な探索・比較解析システムを確立した(Takashima et al)。さらに従来は細胞レベルでの生化学的解析に全エクソーム解析情報を組み合わせることにより、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、ペルオキシソーム形成異常症典型例 6 例、非典型例 5 例、二頭酵素欠損症 1 例、アシル CoA オキシダーゼ欠損症 2 例、肢根型点状軟骨異形成症 2 例、ヒポカタラセミア 1 例、副腎白質ジストロフィー 77 例の計 94 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。このうち 8 例は非典型的な未診断例において、全エクソーム解析を組み合わせた次世代診断システムで診断確定に至っている。

また質量分析による脂肪酸代謝産物の解析においても患者や疾患モデルの検体を用

いた比較解析において病態に関連する分子種の探索検討を継続している。

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、ペルオキシソーム脂質代謝異常による病態解明から治療法開発への展開が可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Hama K, Shimozawa N et al (11 人中 9 番目) Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice. *Lipids* 査読あり 53: 85-102, 2018.

Tsuboi T, Shimozawa N et al (6 人中 5 番目) Highly asymmetric and subacutely progressive motor weakness with unilateral T2-weighted high intensities along the pyramidal tract in the brainstem in adrenomyeloneuropathy. *J Neurol Sci* 査読あり 381: 107-109, 2017.

Morita M, Shimozawa N et al (9 人中 8 番目) T. Effect of Lorenzo's Oil on Hepatic Gene Expression and the Serum Fatty Acid Level in abcd1-Deficient Mice. *JIMD Rep* 査読あり 2017 May 31.

Horikawa Y, Shimozawa N et al (7 人中 2 番目) A first case of adrenomyeloneuropathy with mutation Y174S of the adrenoleukodystrophy gene. *Neuro Endocrinol Lett* 査読あり 38: 13-18, 2017.

Yamashita T, Shimozawa N et al (16 人中 3 番目) Ataxic form of autosomal recessive PEX10-related peroxisome biogenesis disorders with a novel compound heterozygous gene mutation and characteristic clinical phenotype. *J Neurological Sciences* 査読あり 375: 424-429, 2017.

Shigeo Takashima, Nobuyuki Shimozawa et al (9 人中 9 番目) Detection of unusual very-long-chain fatty acid and ether lipid derivatives in the fibroblasts and plasma of patients with peroxisomal diseases using liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* 査読あり S1096-7192: 30180-9, 2017.

下澤伸行. ペルオキシソーム病: 小児内科 48 増刊号, 小児疾患診療のための病態生理 3, 2016 年: 139 - 148.

下澤伸行. ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー). 小児内科 特集 慢性疾患児の一生を診る 2016 年; 48: 1431 - 1434.

下澤伸行. ペルオキシソーム病 診断と治療の最前線 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー - : 日本小児科学会雑誌 2016 年; 120: 1308 - 1319.

Motobayashi M, Shimozawa N et al (7 人中 6 番目) Serial Monitoring of Plasma

Levetiracetam Levels in a Child With Epilepsy Undergoing Cord Blood Transplantation. *Pediatric Neurology* 査読あり 64: e5-6, 2016.

Masashi Morita, Nobuyuki Shimozawa et al (10 人中 9 番目) A novel method for determining peroxisomal fatty acid -oxidation. *J Inherit Metab Dis* 査読あり 39: 725-31, 2016.

Matsunami M, Shimozawa N et al (7 人中 2 番目) Living-donor liver transplantation from a heterozygous parent for infantile Refsum disease. *Pediatrics* 査読あり 137: e20153102, 2016.

Komatsuzaki S, Shimozawa N et al (8 人中 2 番目) First Japanese case of Zellweger syndrome with a mutation in PEX14. *Pediatr Int* 査読あり 57:1189-1192, 2015.

〔学会発表〕(計 8 件)

下澤伸行: 第 271 回 日本小児科学会東海地方会. 平成 29 年 10 月, 岐阜, 小児で鑑別すべき重要な代謝性神経疾患 - 副腎白質ジストロフィーとペルオキシソーム病 -

下澤伸行: 第 20 回 広島先天代謝異常研究会. 平成 29 年 2 月, 広島, ペルオキシソーム病 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー -

下澤伸行: 第 21 回 日本ライソソーム病研究会. 平成 28 年 10 月, 東京, 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン作成に向けて

下澤伸行: 第 13 回 九州先天代謝異常研究会. 平成 28 年 7 月, 福岡, ペルオキシソーム病 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー -

下澤伸行: 第 119 回 日本小児科学会学術集会. 平成 28 年 5 月, 札幌, 分野別シンポジウム「先天代謝異常症の早期診断・治療に向けた診療ネットワーク」ペルオキシソーム病の診療ネットワーク.

Shimozawa N: The 1st International Plasmalogen Symposium. 2016 Nov, Fukuoka. Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases in Japan.

下澤伸行: 第 57 回 日本先天代謝異常学会・第 13 回 アジア先天代謝異常症シンポジウム. 平成 27 年 11 月, 大阪, シンポジウム「脳を標的とした先天代謝異常症の治療戦略」副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植療法の現状と問題点

下澤伸行: 日本薬学会第 135 年会. 平成 27 年 3 月, 神戸, シンポジウム「ペルオキシソームと難治性疾患」ペルオキシソーム機能・代謝異常と疾患

〔図書〕(計 4 件)

厚生労働省難治性疾患等政策研究事業「ライソソーム病(ファブリー病を含む)に関する

る調査研究班」監修. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン 2017. 東京: 日本臨床社; 2017 年.

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 37 精神医学症候群(第2版) 東京: 日本臨床社; 2017 年: 190 - 195.

下澤伸行. ペルオキシソーム病: 尾崎承一編. 難病辞典, 東京: 学研メディカル秀潤社; 2015 年: 490 - 492.

厚生労働省難治性疾患等政策研究事業「ライソソーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班」編. ライソソーム病・ペルオキシソーム病 診断の手引き. 診断と治療社, 東京: 2015 年.

〔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

(2) 研究分担者

なし

(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