

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461532

研究課題名(和文)ペルオキシソーム病患者血清の新規脂質分子に着目した病態解明と臨床指標への医用展開

研究課題名(英文)Elucidation of peroxisomal disease mechanisms by analyzing novel lipid molecules in the patient's serum and applying them as a biomarker

研究代表者

横山 和明 (Yokoyama, Kazuaki)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：50246021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ペルオキシソーム病の副腎白質ジストロフィーで、病態の解明と診断マーカーへの応用を目指して、病態に応じて変動する脂質分子種を探索する事を目的とした。そのために質量分析計を用いた解析系の構築に取り組み、リン脂質のスフィンゴミエリン、アシルCoA、糖脂質全般の網羅的解析に対する測定系を構築した。本疾患の原因遺伝子ABCD1を欠損したマウスの脳に対してリン脂質の測定系を適用したところ、数十種の極長鎖脂肪酸を含む分子種が増加しており、それらの構造も明らかにした。さらにABCD1を欠損した培養細胞の樹立にも成功し、これらのリン脂質の合成酵素の探索を開始することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify novel lipid molecules whose amounts vary to reflect the status of peroxisomal disease and apply them as a biomarker. We established analysis methods for sphingomyelin and acyl-CoA, as well as a method for comprehensive analysis of glycosphingolipids using mass spectrometry. We analyzed phospholipids from the brain of ABCD1-knockout mice and found an increase in several numbers of species containing very long chain fatty acids. We then determined the molecules' structures. In addition, we have established an ABCD1-knockout cell line. We have started the identification of a responsive enzyme for the synthesis of phospholipid species containing very long chain fatty acids.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リポドミクス メタボローム 極長鎖脂肪酸 副腎白質ジストロフィー ペルオキシソーム 質量分析  
先天代謝異常 リン脂質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞小器官であるペルオキシソームは、活性酸素の分解系に加えて極長鎖脂肪酸の酸化やビニールエーテルリン脂質合成など特徴のある代謝系を有している。ペルオキシソームに関連するヒトの主な遺伝性疾患としては、ABCD1 遺伝子の変異による副腎白質ジストロフィー(ALD)が知られている。各臓器や血液のリン脂質や中性脂質に結合していた極長鎖脂肪酸を加水分解して測定したC26:0/C22:0の比の上昇が診断基準として用いられている。本疾患の主症状は少年期や成人になっての脳神経系の脱髄変性である。発症時期が予測不能であるためリスクの高い骨髄移植の適用を判断するためにも発症の診断マーカーが必要である。

### 2. 研究の目的

微量な患者血液サンプルを用いて 1000 を越えるリン脂質と中性脂質の個々の分子種を対象とする網羅的な定量解析系の構築し、発症に対する診断マーカーという新たな診断基準へ展開することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)解析系の構築は、リン脂質、リゾリン脂質、糖脂質、アシル CoA、中性脂質を主な対象とした。脂質定量解析は選択性と感度に優れたMRM解析を網羅的に行う。次にプロダクトイオンパターンをEPI解析し構造を推定する。必要に応じて、LC-MS/MS/MSを用いたより詳細な解析系を構築する。

(2)リポミクス解析については、まずノックアウト(KO)マウスの脳を用いて定量解析を行い、その結果に基づく構造解析を行う。次にALD患者血液サンプルについても解析する。

(3)ターゲット分子の代謝解析については、各種ヒト細胞を検討した結果、HeLa細胞をベースとしてABCD1の欠損細胞を樹立した。(4)ALD発症前診断マーカーの探索に関しては、患者サンプルの結果を用いて発症と関連する分子種を特定する。

### 4. 研究成果

(1)解析系の構築は、リン脂質、リゾリン脂質、アシル CoA、糖脂質について定量解析系を構築した。特に、スフィンゴミエリンの構造解析については、これまで全体の分子量とMS/MS測定により疎水基のうちのスフィンゴシン塩基を測定し、その差から脂肪酸部分を推定する事が一般的であり、脂肪酸そのものの測定は行われていなかった。そこでMS/MS/MSを用いて脂肪酸そのもののシグナルについて測定する解析系を構築した(投稿中)。糖脂質に関しては高速液体クロマトグラフィーの新規分離系を開発し、質量分析計の条件検討では従来用いられているネガティブイオンモードに加え、ポジティブイオンモードの測定を併用する事の有用性を示

した(学会発表)。アシル CoA の測定系では、溶離液の pH が非常に重要である事を明らかにした(未発表)。

(2)リポミクス解析については、ABCD1 ノックアウト(KO)マウスと正常マウス各 6 例の脳を用いて、各リン脂質クラスについて定量解析を行った。その結果、約 500 のシグナルのうち、KO マウスで選択的に増加しているシグナル数十個が検出され、主に極長鎖脂肪酸を含むホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン分子種であった。一方十数個の減少しているシグナルも検出され、主にホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールの分子種であった(投稿準備中)。患者サンプルに関しては、期間内には予備的な解析を実施するにとどまった(学会発表)。

(3)ターゲット分子の代謝解析については、HeLa細胞をベースとしてABCD1の欠損細胞株を樹立した。本細胞株では、極長鎖脂肪酸含有リン脂質が増加していた。その合成酵素のSiRNA法を用いたスクリーニングを開始した。

(4)ALD発症前診断マーカーの探索に関しては、患者サンプルを用いた解析が予備的な実施にとどまったため、今後の更なる検討が必要である。

### 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0件)

投稿中1件、投稿準備中1件

[学会発表](計19件)

藤原優子、横山和明他、多段階MRMモードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析、第58回日本先天代謝異常学会、2016/10/27-29、京王プラザホテル(東京都新宿区)

濱弘太郎、横山和明他、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、第89回日本生化学会、2016/9/25-37、仙台国際センター(宮城県仙台市)

濱弘太郎、横山和明他、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、第41回日本マススペクトル学会、2016/9/15-16、ウインク愛知(愛知県名古屋市)

黒木秀悟、横山和明他、Abcd1ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析、第17回Pharmaco-Hematologyシンポジウム、2016/9/3-4、帝京大学(東京都板橋区)

濱弘太郎、横山和明他、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、第 58 回日本脂質生化学会、2016/6/9-10、にぎわい交流館 AU (秋田県秋田市)

藤原優子、横山和明他、多段階 MRM モードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析、第 58 回日本脂質生化学会、2016/6/9-10、にぎわい交流館 AU (秋田県秋田市)

Kazuaki Yokoyama 他、Molecular Species of Phospholipids in the Brain of Abcd1-deficient Mice. Lipid Maps Annual Meeting 2016、2016/5/16-17、La Jolla (USA)

笠原美那実、横山和明他、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、日本薬学会第 136 年会、2016/3/27-29、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

藤原優子、横山和明他、糖脂質解析の為に MS 測定条件の最適化の検討、第 57 回先天代謝異常学会、2015/11/12-13、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

濱弘太郎、横山和明他、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、第 57 回先天代謝異常学会、2015/11/12-13、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

濱弘太郎、横山和明他、Abcd1 ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析、第 9 回メタボロームシンポジウム、2015/9/30、三島市民文化会館 (静岡県三島市)

濱弘太郎、横山和明他、Abcd1 ノックアウトマウスの脳の脂質解析、第 40 回医用マススペクトラム学会、2015/9/17-18、アクティ浜松 (静岡県浜松市)

濱弘太郎、横山和明他、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、第 57 回日本脂質生化学会、2015/5/28-29、一橋講堂 (東京千代田区)

藤原優子、横山和明他、糖脂質解析の為に MS 測定条件の最適化の検討、第 57 回日本脂質生化学会、2015/5/28-29、一橋講堂 (東京千代田区)

濱弘太郎、横山和明他 (著者訂正済)、ESI-LC/MS によるリン脂質の分子種別の網羅的解析方法の樹立、第 56 回日本先天代謝異常学会、2014/11/13-15、江陽グランドホテル (宮城県仙台市)

濱弘太郎、横山和明他、副腎白質ジストロフィー患者血漿中リン脂質の網羅的解析、2014/10/15-18、第 87 回日本生化学会、京都

国際会議場 (京都府京都市)

飯塚貴博、横山和明他、ESI-LC/MS によるリン脂質および糖脂質の網羅的解析方法の検討、第 58 回日本薬学会関東支部会、2014/10/4、昭和薬科大学 (東京都町田市)

Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama et al., Molecular Structures of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Peroxisomal Diseases、55th International Conference on the Bioscience of Lipids 2014. 2014/6/23-27、Aberdeen (UK)

Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama et al., Molecular Structures of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Peroxisomal Diseases、LIPID MAPS Annual Meeting 2014. 2014/5/12-13、San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
横山 和明 (YOKOYAMA, Kazuaki)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号：5 0 2 4 6 0 2 1

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
下澤 伸行 (SHIMOZAWA, Nobuyuki)  
今中 常雄 (IMANAKA, Tsuneo)