

201128069A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ナノ・テクノロジーを用いたプロピオン酸血症の新規治療法の開発  
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎 徹

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ナノ・テクノロジーを用いたプロピオン酸血症の新規治療法の開発  
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎 徹

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

I.	総括研究報告	
	ナノ・テクノロジーを用いたプロピオン酸血症の新規治療法の開発に関する研究 (研究代表者：宮崎 徹) . . . . .	3
II.	分担研究報告	
	1. ナノ・ミセルベクターの調整 (分担：片岡 一則) . . . . .	11
	2. 代謝マーカー解析 プロピオン酸血症の生化学診断マーカーのマウスの正常値の作成 (分担：山口 清次) . . . . .	13
III.	研究成果の刊行に関する一覧 . . . . .	21
IV.	研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	27

## I. 総括研究報告書

ナノ・テクノロジーを用いたプロピオン酸血症の新規治療法の開発  
に関する研究

研究代表者 宮崎徹 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

## ナノ・テクノロジーを用いたプロピオン酸血症の新規治療法の開発に関する研究

研究代表者 宮崎徹（東京大学大学院医学系研究科 教授）

### 研究要旨

小児の先天性代謝疾患であるプロピオン酸血症（PA）は、Propionyl-CoA carboxylase（PCC）が欠損もしくは機能が低下する劣性遺伝病である。特定のアミノ酸・脂肪酸の代謝不全により中間代謝産物が蓄積するため、出生後ミルク摂取によりケトアシドーシスを呈し最悪の場合死に至る。PA の治療法はカルニチンを併用した栄養制限療法が主であるが、低栄養による様々な副作用の併発などにより予後は必ずしも良くない。最近肝移植が一定の効果をあげているが、長期的予後の判定は今後の課題であり、患者にとり侵襲は小さくない。従って、新たな根治的治療法の開発が望まれる。私たちは PCCa 鎖（PCCA）遺伝子をノックアウトすることにより、PA モデルマウスを確立した。さらに、このマウスの肝臓に正常の 10-15% の PCC 酵素活性を戻すことにより症状が著しく改善することを証明した。この成果をもとに本申請研究では、非ウイルス性のナノ・ミセルを用い、患者胎児の肝臓に PCC 遺伝子をデリバリーする胎児治療法を提案し、その効果と安全性についてモデルマウスを用い実証する。そのために、2 年間で以下の研究項目を学内生命倫理委員会における承認等、生命倫理・安全対策に対する十全な取り組みを行った上で研究する：（1）胎児治療による酵素補填の効率、（2）ナノ・ミセルにより補填した酵素遺伝子の発現持続性の検討、（3）生存率、PA 症状、臨床データの改善効果の検討・判定、（4）毒性等考えられる副作用の解析と安全性の検討、（5）出生後の遺伝子デリバリー（経門脈など）の可能性の検討（6）食餌療法との併用効果の検討。この研究が完遂すれば、(i) 患者は出生時から PCC 酵素活性を有するため食餌療法に対する依存性を軽減することができ、予後の著しい改善が期待される；(ii) ウイルスを使わない安全な遺伝子治療が可能である；(iii) 食餌療法の問題点である高価な医療費を大幅に削減できる；といった成果が期待でき、その社会的貢献度は極めて大きいと考えられる。

### 研究分担者

山口清次（島根大学医学部小児科・教授）  
片岡一則（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学科・教授）

であるが低栄養による副作用により予後は良くない。また肝移植については長期的予後が不明であり患者への侵襲も大きい。新たな根治的治療法の開発は、患者並びに患者家族によって切望されている。

### A. 研究目的

本研究は、プロピオン酸血症（PA）に対し、ナノ・ミセルを用い、患者胎児の肝臓に欠損している PCC 遺伝子を補填する胎児治療法を提案し、その効果と安全性についてモデルマウスで実証することを目的とする。PA 治療法は栄養制限療法が主

#### 【研究の学術的背景】

1. PA モデル動物の確立と肝臓を標的とした治療：我々は、PCC 遺伝子ノックアウト（PCC<sup>-/-</sup>）により PA のモデルを確立した。このマウス肝臓に 10-15% の PCC を補填すると、PA の症状は軽減し生存率（PCC<sup>-/-</sup>で 0%）は 100%となった。

2. ナノ・バイオロジーによる遺伝子デリバリー：片岡博士（研究分担者）により、無害なポリエチレングリコールで DNA や薬剤を包むナノ・ミセルが開発され、既に癌の治療や組織の再生への治験が行われている。

### 【研究の目標】

23年度：(1) 注入量・速度などによる胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率・補填した酵素遺伝子の発現持続性上昇の検討、(2) PCC-/-胎児への PCC 遺伝子デリバリーの施行・効果の検討 (3) 食餌療法との併用効果の検討を行う。

### 【研究の特色・独創性】

1. 従来の治療法の問題点の克服：根治的治療を目標とするため、現在主流である栄養制限療法に伴う副作用の克服が期待される。

2. 非ウイルスベクターによる遺伝子治療の危険性の克服：従来の遺伝子治療は主にウイルスによるものだが、ナノ・ミセルはウイルスに起因する癌化等の危険性がなく、患者側にとっても心理的に安心である。

3. 出生前治療：近年のマスクリーニングの進歩による胎生期診断と胎児治療を組み合わせた出生前治療が期待できる。また、ナノ・ミセルを経門脈的に肝臓に注入する出生後治療も検討し、出生後に診断された患者の治療に応用する。

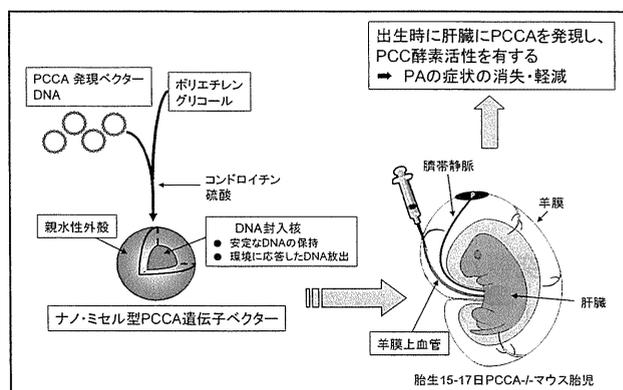
4. 他の疾患治療への応用の可能性：当治療戦略が完成すれば、他の遺伝性代謝疾患の治療にも応用できる。

## B. 研究方法

### (1) ナノ・ミセル型遺伝子ベクター作製・最適化

遺伝子発現プラスミド DNA をポリエチレングリコールの外殻で被ったものがナノ・ミセルベクターの基本形である (図参照)。DNA とポリエチレングリコールの量比、コンドロイチン硫酸 (細胞取り込み効率を上昇すると言われている) の必要性、他の親水性外殻の使用の検討など本使用目的へ

の最適化を行う。



### (2) GFP 発現ベクターを用いた胎児肝臓での発現に関する予備実験

妊娠メスマウスを麻酔下で腹側より子宮を露出し子宮壁を一部切開する。羊膜上血管 (Yolk-sac vessel) を確認後、GFP 発現ベクター DNA を封入したナノ・ミセルベクターを注入する。注入後肝臓での GFP 発現を組織学的に解析する。結果をもとに、低毒性で、出生時に十分な発現があり、多くの肝細胞で長期間にわたり発現する条件を決定し、プロトコルを最適化する。

### (3) PCC-/-マウスの胎児治療法確立

上記 GFP を用いた予備実験によって、最適化された条件により、PCC-/-マウス胎児に PCC 発現ベクターを封入したナノ・ミセルを導入し、PA の治療効果を判定する。

▶ 発現解析：出生後 24 時間毎に、導入した PCC の発現を肝臓の免疫染色、RT-PCR によって解析する。また、肝臓における PCC 酵素活性を測定する。

▶ 治療効果解析：血液・尿 (血中アシルカルニチン、尿中 3-OH-propionate、Methylcitrate、ケトン体)、組織学的解析：肝臓 (グリコーゲン、脂肪酸沈着)、腎臓 (糸球体変化、尿管拡張、ヒアリン小体沈着)、脳 (アポトーシス)；生存率、体重、体長。

以上の解析結果から、PA 胎児治療の最適プロトコルを確立する。

(倫理面への配慮) 組換え DNA 実験に対しては、東京大学「医学部組換え DNA 実験安全委員会」において、承認がおりている。動物実験に際しては、学内動物実験審査委員会において承認されてい

る。また、実験動物に与える苦痛を最小限にするなど、動物愛護上の配慮等を十分に行う。

### C. 研究結果

以下、各研究項目について平成 23 年度中の研究結果を記載する。なお、研究分担者である片岡一則博士の研究役割は、代表者（宮崎）とともに以下の 1）を執り行うことであるため、別個に研究報告書を作成せず、代表者（宮崎）のものひとまとめにして報告する。

1) 胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率・導入した遺伝子の発現持続性上昇の検討：前年度に、研究分担者である片岡一則博士と共に、DNA とポリエチレングリコールの量比、コンドロイチン硫酸の濃度等の検討により、ナノ・ミセルベクターの条件検討を行い、PCC<sup>-/-</sup>マウス胎児治療のための最適化ベクターの条件を見出した。今年度はさらに、GFP 発現 DNA を包埋したナノ・ミセルベクターの、羊膜上血管からの注入する量を、10 $\mu$ l~300 $\mu$ l（DNA 濃度に換算して 1mg/ml に固定してある）で検討し、肝臓における GFP の発現で検討した。また、注入速度については 100 $\mu$ l/分~1ml/分で検討した。その結果、量は 100~150 $\mu$ l、速度は 150~200 $\mu$ l/分が、デリバリー効率と導入した遺伝子の発現持続性への効果と、およびレシピエント胎児に対するダメージの少なさの面で、最適であることが確認された。

2) PCC<sup>-/-</sup>胎児への PCC 遺伝子デリバリーの施行・効果の検討：上記条件によって、PCC ナノ・ミセルベクター（CAGGS-PCCA ベクターをナノ・ミセルに包埋したもの）を、PCC<sup>+/-</sup>オスと交配した PCC<sup>+/-</sup>メス子宮中の E17 マウス胎児に、羊膜上血管より注入した。注入後、腹壁を縫合し、E19.5 まで飼育したのち、帝王切開法にて胎児を摘出し、仮親に飼育させた。確率上、1/4 の割合で新生児中に PCC<sup>-/-</sup>が存在するはずである。

通常 PCC<sup>-/-</sup>マウスは出生後 36 時間以内に重度のケトアシドーシスを発症し死亡する。ナノ・ミセルベクターを移入した胎児について観察したところ、2 腹から生まれた計 13 匹のうち、3 匹が 48 時間以内に死亡した（2 匹が 36 時間前後、1 匹が 48 時間）。これらのマウスにつ

いて、尾 DNA によるジェノタイピングと肝臓における PCC 酵素 $\alpha$ 鎖の発現を肝臓での発現を RT-PCR 法により確認した。その他のマウスについては、そのまま観察を続けたが、脂肪はしなかった。

これら生存したマウスは、生後 2 週間の時点で尾 DNA を解析したところ、PCC<sup>-/-</sup>マウスではなかった。死亡した 3 匹について確認したところ、3 匹とも PCC<sup>-/-</sup>であり、死亡の時点での肝臓での PCC の発現は、正常肝のそれぞれ、0.2、0.3、（以上 36 時間で死亡したもの）、および 2.3%（48 時間で死亡したもの）であり以前トランスジェニックマウスで検討したレスキューラインの 10%に到達できていなかった。なお、PCC<sup>-/-</sup>以外のマウスに移入した PCC の発現は、内在性の PCC の存在のため確認できなかった。

### D. 考察

以上の様に、本年度中に得られた上記実験結果から、昨年度に検討したナノ・ミセルベクターの作製法に続き、その移入法に関して条件検討を行い、胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率と導入した遺伝子の発現持続性、それに加え胎児へのダメージを最小限に止める最適化した条件を確立した。しかし、その条件で実際に PCC<sup>-/-</sup>の胎児で PCC 酵素活性の補填を試みたが、正常の内在性酵素活性の 10%という目標には届かず、結果、2.3%まで補填できた新生児が通常の PCC<sup>-/-</sup>より 12 時間前後長く生存したが、致死率を改善するには至らなかった。PCC 酵素活性を補填することが可能であることは、今回の実験で明らかになったので、今後その補填効率を上昇させる必要がある。可能性としては、（1）現在の E17 より早期、まだ肝細胞の増殖が強い時期に注入し、ナノ・ミセルの取り込み率を向上できないか、（2） $\alpha$ 鎖だけでなく $\beta$ 鎖の発現ベクターも同時に移入して酵素活性を向上できないか、（3）発現ベクターのプロモーターを変更する必要はないか、（4）新生児期に全身性に静注し発現にブーストをかけられないか、など検討する余地が残っている。今後これらを検討し、補填する酵素活性を向上させ、

PA の胎児治療の完成を目指したい。

## E. 結論

本年度は、ナノ・ミセルの胎児肝臓導入法の最適化を昨年に続き行い、PA のモデルマウスに対して胎児治療を試みた。残念ながら致死率改善までは到達できなかったが、PCC 酵素活性の補填にある程度成功することが出来た。今後さらに検討を重ね、補填効率を高め、PA の胎児治療法完成を目指したい。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iwamura, Y., Mori, M., Nakashima, K., Mikami, T., Muratama, K., Arai, S., Miyazaki, T. Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(In Press)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.018> (2012).
- 2) Miyazaki, T., Jun Kurokawa, J., Arai, S. AIMing at Metabolic Syndrome –Towards the Development of Novel Therapies for Metabolic Diseases via Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)- *Circulation Journal* 75:2522-2531 (2011)
- 3) Kurokawa, J., Nagano, H., Ohara, O., Kubota, N., Kadowaki, T., Arai, S. & Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *PNAS* 108:12072-12077(2011)

### 2. 学会発表

- 1) 宮崎徹：(講演) Anti-Metabolic Syndrome

Protein, Apoptosis Inhibitor of Macrophage、第 76 回日本循環器学会学術集会、福岡、2012 年 3 月 18 日

- 2) 宮崎徹：(講演) AMing at Metabolic Syndrome and Beyond、Kagawa Expert Meeting、香川、2012 年 2 月 29 日
- 3) 宮崎徹：(講演) 様々な生活習慣病を統一的に制御する AIM とそれによる新規治療戦略、小山地区医師会学術講演会、栃木、2012 年 2 月 28 日
- 4) 宮崎徹：(講演) 様々な生活習慣病を統一的に制御する AIM とそれによる新規治療戦略、第 17 回 Osaka Bay Diabetes Forum(DBDF)、大阪、2012 年 2 月 25 日
- 5) 宮崎徹：(講演) モデルマウスを用いて初めて明らかになった AIM の新規機能とメタボリックシンドロームの新しい治療法開発の可能性、第 8 回生命資源研究・支援センターシンポジウム、熊本、2012 年 2 月 24 日
- 6) 宮崎徹：(講演) 生活習慣に起因する代謝・循環器・免疫疾患を繋ぐ AIM とそれによる新規治療戦略、第 6 回神戸生活習慣病研究会、神戸、2012 年 2 月 18 日
- 7) 宮崎徹：(講演) 生活習慣に起因する代謝・循環器・免疫疾患を繋ぐ AIM とそれによる新規治療戦略、循環器疾患懇話会、愛媛、2012 年 2 月 15 日
- 8) 宮崎徹：(講演) 脂肪融解タンパク AIM がひも解くメタボリックシンドロームの実態 メカニズムと新規診断・治療法の可能性、第 9 回長崎糖尿病・合併症研究会、長崎、2012 年 2 月 8 日
- 9) 宮崎徹：(講演) AIM が紐解くメタボリックシンドロームの病態生理と新規治療法の可能性、第 21 回循環・代謝セミナー、札幌、2011 年 11 月 18 日
- 10) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝・循環器・消化器疾患 –病態解明と新規治療法に向けた新しい視点-、第 18 回新世界・静岡糖尿病研究会、静岡、2011 年 11 月 16 日

- 11) 宮崎徹：(特別講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝・循環器・消化器疾患 -病態解明と新規治療法に向けた新しい視点-, Global FU Seminar、福岡、2011年11月15日
- 12) 宮崎徹：(講演) AIMing at Metabolic Syndrome and Beyond-病態解明と新規治療法に向けた新しい視点-, 第7回愛媛ハートクラブ、松山、2011年11月11日
- 13) 宮崎徹：(特別講演) AIM が紐解くメタボリックシンドロームの病態生理と新規治療法の可能性、第9回千代田線代謝懇話会、東京、2011年11月10日
- 14) 宮崎徹：(特別講演) AIM が紐解くメタボリックシンドロームの病態メカニズムと新規治療法の可能性、第18回動脈硬化若手研究会、京都、2011年11月5日
- 15) Miyazaki T.: (Guest speaker) AIMing at Metabolic Syndrome-Towards development of novel therapies for modern metabolic diseases via AIM-, Immunology Seminar Series of the Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany, 2011.11.2
- 16) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝疾患-メタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けた新しい視点-, Metabolic Hypertension Meeting 2011、名古屋、2011年10月28日
- 17) Miyazaki T.: (Guest speaker) AIMing at Metabolic Syndrome-Towards development of novel therapies for modern metabolic diseases via AIM-, The 5<sup>th</sup> International Workshop on Cell Regulations in Division & Arrest, Okinawa, 2011.10.25
- 18) Miyazaki T. (Guest speaker) AIMing at Metabolic Syndrome-Towards development of novel therapies for modern metabolic diseases via AIM-, Seminar at Department of Pathology and Immunology University of Geneva, Geneva, Switzerland, 2011.10.21
- 19) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝・消化器疾患-病態メカニズムの解明と新規治療法開発に向けた新しい視点-, 第1回群馬心血管代謝と炎症を考える会、群馬、2011年10月18日
- 20) Miyazaki T.: Cell-size regulator DEDD is an essential element for maintenance of early pregnancy, Cold Spring Harbor Conferences Asia-Developmental control of sex, growth, and cellular fate-, Shanghai, China, 2011.10.12
- 21) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝・循環器・消化器疾患-メタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けた新しい視点-, 京都循環器先進医療ネットワーク、京都、2011年9月20日
- 22) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝・消化器疾患-病態メカニズムと治療法開発への新しい視点-, 第3回北陸 PD Forum、金沢、2011年9月17日
- 23) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝疾患-メタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けた新しい視点-, 日本麻酔科学会関東甲信越・東京支部第51回合同学術集会、千葉、2011年9月10日
- 24) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝・循環器・消化器疾患、糖尿病セミナーUp-To-Date、岡山、2011年8月25日
- 25) 宮崎徹：(特別講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝・肝臓疾患-病態メカニズムと治療法開発への新しい視点-, 第7回肝免疫・ウイルス・フロンティア (LIVER2011)、名古屋、2011年7月9日
- 26) 宮崎徹：(特別講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝疾患-病態メカニズムと治療法開発への新しい視点-, 長崎糖尿病セミナー、長崎、2011年7月8日
- 27) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と代謝疾患-メタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けた新しい視点-, 第10回福岡糖尿病先端医療研究会、福岡、2011年6月10日
- 28) 宮崎徹：(講演) 脂肪代謝、第58回日本実験

動物学会総会ワークショップ III 「疾患モデル動物表現型解析指南」、東京、2011年5月27日

29) 宮崎徹：(特別講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝疾患-メタボリックシンドロームの新治療法開発に向けた新しい視点-、Nordiscience Forum 2011、京都、2011年5月14日

30) 宮崎徹：(特別講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝・消化器疾患 -病態メカニズムと治療法開発への新しい視点-、第1回肥満と消化

器疾患研究会、東京、2011年5月13日

31) 宮崎徹：(講演) AIM が繋ぐ免疫と循環器・代謝疾患-病態メカニズムと治療法開発への新しい視点-、愛媛インスリン抵抗性研究会、松山、2011年4月22日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## II. 分担研究報告書

### 1. ナノ・ミセルベクターの調整

研究分担者 片岡一則 (東京大学大学院工学系研究科 教授)

注：平成 23 年度における分担者片岡一則博士の役割は、代表者（宮崎）とともに  
ナノ・ミセル型遺伝子ベクター作製・最適化を執り行うことであるため、  
個別の分担報告書は作成せず、代表者（宮崎）のものと一緒に纏めて報告するものとする。  
(参照：総括報告書 C. 研究結果)

## II. 分担研究報告書

### 2. 代謝マーカー解析

プロピオン酸血症の生化学診断マーカーのマウスの正常値の作成

研究分担者 山口清次 (島根大学医学部小児科 教授)

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科 教授）

## 研究要旨

先天性有機酸血症であるプロピオン酸血症の新規治療の効果を評価する目的で、マウスの体液（血液、尿）中の代謝産物測定法を確立し、基準値を作成した。診断マーカーとして、蓄積したプロピオニル-CoA に由来する尿中メチルクエン酸と血中プロピオニルカルニチン（C3）を測定した。マウス（体重 20 g、12 匹）の尿中メチルクエン酸は、安定同位体希釈法による GC/MS 分析で行い、平均  $13.84 \pm 4.06$  nmol/mmol Cre (6.20~21.53) であった。ヒト尿中メチルクエン酸の基準値は  $2.26 \mu\text{mol/mmol Cre}$  以下であり、プロピオン酸血症患者のそれは  $33.9 \sim 678 \mu\text{mol/mmol Cr}$  であった。マウスではヒトよりもやや高いが、患者レベルの病的な上昇は評価できると思われる。一方血中アシルカルニチン分析では、マウスの C3 値は  $1.01 \pm 0.23$  nmol/mL (0.65~1.40) であった。ヒトの血中 C3 は、0.4~4.2 nmol/mL (カットオフは 3.6 nmol/mL) である。プロピオン酸血症患者（2 名）の血中 C3 アシルカルニチンは 12.2 nmol/mL と 16.5 nmol/mL であった。マウスの C3 が人に比べやや低いものの、アシルカルニチンのオーダーはヒトと同程度であり、マウス実験動物の治療評価に使えるものと思われる。

## 研究協力者

長谷川有紀（島根大学医学部小児科）

山田健治（島根大学医学部小児科）

安部真理子（島根大学医学部小児科）

中川勝博（島津製作所）

川名修二（島津製作所）

## A. 緒言

プロピオン酸血症マウスモデルを作成して、新規治療法を開発する過程で、治療評価をするためにはマウスの体液中（血液や尿）の診断マーカーの基準値を作る必要がある。しかし、マウスから尿を採取することは容易ではない。また血液、尿を採取するにしても微量しかとれない。そこで、安定同位体を内部標準とした超微量検体を分析するための高精度分析法を確立し、マウスの基準値

を作成した。

## B. 研究方法

### a) マウス

体重約 20 g の C57BL6 マウス 12 匹を用いた。尾静脈から血液ろ紙を採取し室温で乾燥させて乾燥血液ろ紙を作成しアシルカルニチン分析に用いた。尿は、尾静脈を穿刺する際に排出した尿をスポイドで採取した（1 回約 20~40 uL）。

### b) マウス尿中有機酸分析（通常法）

尿 20uL を取り、0.1ml のミリ Q 水で希釈した（全量が 20uL 以下の尿はその全量にミリ Q 水 0.1ml を加えて希釈した）。1.5ml のバイアルピンに希釈した尿試料を 0.1ml をとり、尿中に大量に含まれる尿素を分解するために、ウレアーゼ水

溶液 (1 ユニット/1 $\mu$ L) を 2 $\mu$ L、添加して 37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。安定同位体ラベル内部標準 (IS) として、d3-creatinine (10  $\mu$ mol/ml) 10 $\mu$ L と d3-methylcitrate (10nmol/ml) を 50 $\mu$ L 添加した。さらに自然の内部標準として tropate (10  $\mu$ g/ml) 10  $\mu$ L と heptadecanoate (10  $\mu$ g/ml) を 5  $\mu$ L を添加した。この溶液に冷エタノールを 1.0 ml 加え、3,000 rpm で 1 分間遠心分離した。上清 (エタノール相) 0.8 mL を 1.5 ml バイアル瓶に移し、窒素ガスで乾固した。トリメチルシリル (TMS) 化剤 (BSTFA+1%TMCS) を 0.1 ml 添加し、80 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させて TMS 誘導体化したのち、その 2  $\mu$ L を GC/MS 分析した。

#### c) マウス血液のタンデムマス分析 (アシルカルニチン)

乾燥血液ろ紙の 3mm パンチを 96 穴マイクロプレートにとり、マニュアルに従ってタンデムマス分析した。CIL 社製の安定同位体内部標準キットを加えて、ブチル誘導体化して ESI-MS/MS (タンデムマス) で分析した。使用したタンデムマスは、ABSciex 社製 API 3000 を用いた。アシルカルニチンの他に参考としてアミノ酸も分析した。

### C. 研究結果と考察

#### a) マウス尿のメチルクエン酸濃度

GC/MS 分析スキャン法で分析し (図 1)、メチルクエン酸の出現を確認した。そして、図 2 に示すように、選択イオンモニタリング法 (SIM モード) で再度分析してメチルクエン酸を精密測定した。m/z 287 と m/z 290 (IS) の組み合わせ(A) と、m/z 479 と m/z 482 (IS) の組み合わせ(B) で分析し測定値を比較した。表 1 に示すように、組み合わせ(A)を用いた方では、組み合わせ (B) に比べ濃度自体は低い値を示した。しかし組み合わせ(A)の方がピーク夾雑物ピークの重なりが少なくないため、組み合わせ (A) を定量値を採用することとした。

マウスの尿中メチルクエン酸濃度は、表 1 に示

すように 13.84 $\pm$ 4.06  $\mu$  mol/mmol creatinine (6.20~21.53) であった。前年度に測定したヒト尿中メチルクエン酸は、正常者では 2.26  $\mu$  mol/mmol Cre 以下で、プロピオン酸血症患者のそれは 33.9~678  $\mu$  mol/mmol Cr であった。正常コントロールに関しては、マウスとヒトでメチルクエン酸濃度は大きくちがわないことが予想される。

#### b) マウス血中アシルカルニチン

表 2 にマウスの血液ろ紙中のいくつかのアシルカルニチン (およびアミノ酸) 測定値を示している。診断マーカーとして関連するものとして、マウスの C0 濃度は 27.4 $\pm$ 2.9 nmol/mL (22.0~31.1) で、これに対しヒトでは、C0 は 20~60 nmol/mL である。マウスの C3 (プロピオニルカルニチン) は、1.01 $\pm$ 0.23 nmol/mL (0.65~1.40) であったが、ヒトの C3 は 0.4~4.2 nmol/mL で C3 のカットオフは 3.6 nmol/mL である。プロピオン酸血症患者 (2 名) の血中 C3 アシルカルニチンは 12.2 nmol/mL と 16.5 nmol/mL であった。マウスのモデル動物でもアシルカルニチンのオーダーはヒトと同程度ということがわかった。今回作成したマウスの標準値は、治療評価に使えるものと思われる。

### D. 結論

プロピオン酸血症のモデルマウスのようにごく微量しか検体が採取されない条件のもとで、血液ろ紙の 3 mm パンチでアシルカルニチンを分析でき、また 20 $\mu$ L 程度の尿サンプルで、尿中有機酸分析、メチルクエン酸濃度を測定できることが確認された。

### E. 健康危険情報

該当なし

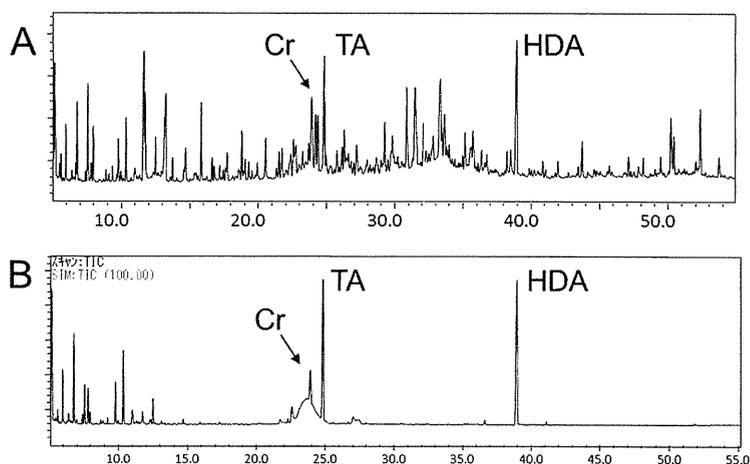


図 1. マウス尿中有機酸所見 (total ion chromatogram)

A: マウス尿、B: 内部標準として加えた標準化合物。Cr:クレアチニン、TA:トロパ酸、HAD:ヘプタデカン酸。

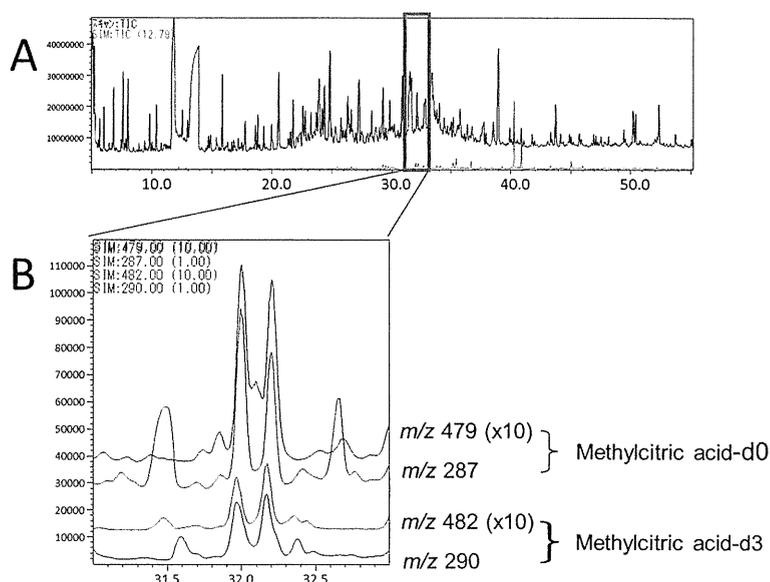


図 2. マウス尿の有機酸クロマトグラムとメチルクエン酸の選択イオンクロマトグラム (SIM)

A: total ion chromatogram、B: メチルクエン酸測定のための選択イオンマスマフラグメントグラム (SIM)。SIM のイオンは、m/z 287 (尿中にあるメチルクエン酸) と m/z 290 (内部標準として加えた安定同位体ラベルのメチルクエン酸)

表 1. マウス尿中メチルクエン酸基準値 (N=12)

	m/z 287、290 を用いた場合		m/z 479、482 を用いた場合	
	平均±SD	range	平均±SD	range
メチルクエン酸 (1)	15.08±5.76	(7.10~17.92)	24.81±7.54	(12.12~36.17)
メチルクエン酸 (1)	12.60±3.50	(5.29~16.91)	16.68±4.60	(8.22~23.88)
(1)と(2)の平均値*	13.84±4.06	(6.20~21.53)	20.75±5.97	(10.17~30.03)

\* 平均値を代表値とする。m/z 287,290 を用いた場合、夾雑物ピークの重なりが少なくなり、m/z 479,482 を用いた場合に比べ低い濃度となった。このため m/z 287,290 を用いた定量値を採用する。単位は  $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$ 。

表 2. マウス血中アシルカルニチン基準値 (N=12)

アシルカルニチン	C0	C2	C3	C3/C2	C8	C16
nmol/mL	27.4±2.9	26.8±3.9	1.01±0.23	0.04±0.01	0.05±0.01	1.32±1.19
range	22.0~31.1	20.9~30.8	0.65~1.40	0.03~0.05	0.03~0.06	0.93~1.44
アミノ酸	Ala	Gly	Met	Phe	Tyr	Val
nmol/mL	255±50	198±22	69±11	75±13	104±22	211±39
range	184~347	157~218	50~82	60~102	68~140	158~282

上段に、プロピオン酸血症に関連するアシルカルニチン（抜粋）を示し、下段には本症の診断マーカーではないが、いくつかのアミノ酸測定値も示している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. *Molecular Genetics and Metabolism* 102(3): 343-348, 2011 (March)
- 2) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R: Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening.. *Molecular Genetics and Metabolism* 102(4): 399-406, 2011 (April)
- 3) Yagi M, Lee T, Awano H, Tsuji M, Tajima G, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takeshima Y, Matsuo M: A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the HADHB gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence. *Molecular Genetics and Metabolism* 104(4): 556-559, 2011 (December)
- 4) 虫本雄一, 山口清次: 新生児突然死とその予防. *産婦人科治療* 102(4): 317-321, 2011 (4月)
- 5) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. *日本先天代謝異常学会雑誌* 27(1): 36-41, 2011 (8月)
- 6) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀友博, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2欠損症のろ紙血血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的变化. *日本小児科学会雑誌* 115(5): 956-960, 2011 (5月)

### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T, Fukuda S: A hypolipidemic drug, bezafibrate, can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Denver, USA, April 2011
- 2) 長谷川有紀, 虫本雄一, 山田健治, 小林弘典, 小野浩明, 坂野堯, 山口清次: 新生児突然死

- の家族歴を持ち尿素サイクル異常症と判明した新生児例. 第 17 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会. 出雲, 2011 年 3 月
- 3) 星野正也, 大竹明, 原嶋宏子, 山崎太郎, 山内秀雄, 雨宮伸, 高田綾, 齊藤一之, 増谷聡, 重松陽介, 長谷川有紀, 山口清次: 乳幼児突然死と脂肪酸代謝異常症: 死後胆汁を用いたタンデムマス分析の有用性. 第 17 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会. 出雲, 2011 年 3 月
  - 4) 山口清次: ベザフィブレードのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する治療 -in vitro probe assay による評価-. 第 53 回日本小児神経学会総会. 横浜, 2011 年 5 月
  - 5) 山口清次: GC/MS 有機酸分析で発見される小児の後天性ビタミン欠乏症:B1 欠乏, ビオチン欠乏, カルニチン欠乏. 日本ビタミン学会第 63 回大会 シンポジウム. 広島, 2011 年 6 月
  - 6) 山口清次, 御牧信義: 新生児タンデムマス・スクリーニングで発見される母親の無症候性代謝異常. 第 47 回日本周産期・新生児医学会. 札幌, 2011 年 7 月
  - 7) 山口清次: タンデムマス導入にともなう新しい体制作り. 第 114 回日本小児科学会学術集会 シンポジウム. 東京, 2011 年 8 月
  - 8) 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: タンデムマス法によるアシルカルニチン測定値の安定性の検討. 第 38 回日本マス・スクリーニング学会. 福井, 2011 年 10 月
  - 9) 長谷川有紀, 高橋知男, 佐野葉子, 中田節子, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 長沼邦明, 山口清次: 軽度の多呼吸を契機に GC/MS とタンデムマス・スクリーニングで診断された 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症の新生児例. 第 38 回日本マス・スクリーニング学会. 福井, 2011 年 10 月
  - 10) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニング・キックオフ. 第 63 回中国四国小児科学会 会長講演. 松江, 2011 年 11 月
  - 11) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニング: 新生児科医の知っておくべき知識. 第 56 回日本未熟児新生児学会講演. 東京, 2011 年 11 月
  - 12) 山田健治, 小林弘典, 虫本雄一, プレブスレン ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: グルタル酸尿症 2 型に対するベザフィブレードの効果: in vitro probe assay による評価. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 千葉, 2011 年 11 月
  - 13) 虫本雄一, プレブスレン ジャミヤン, 小林弘典, 長谷川有紀, 山田健治, 山口清次: In vitro probe assay によるカルニチントランスポーター機能評価法: 原発性カルニチン欠乏症の酵素診断. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 千葉, 2011 年 11 月
  - 14) 小林弘典, 山田健治, プレブスレン ジャミヤン, 虫本雄一, 高橋知男, 長谷川有紀, 伊藤道徳, 山口清次: ベザフィブレードが有効であった遅発型グルタル酸尿症 2 型の男児例. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 千葉, 2011 年 11 月
  - 15) 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン ジャミヤン, 川名修一, 中川勝博, 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症の出生前診断の経験. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 千葉, 2011 年 11 月

#### G. 知的財産の出願状況

該当なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwamura, Y., Mori, M., Nakashima, K., Mikami, T., Muratama, K., Arai, S., & Miyazaki, T.	Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes.	Biochemical and Biophysical Research Communications	印刷中		2012
Miyazaki, T., Kurokawa, J., & Arai, S.	AIMing at Metabolic Syndrome –Towards the Development of Novel Therapies for Metabolic Diseases via Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)-	Circulation Journal	75 (11)	2522-2531	2011
Kurokawa, J., Nagano, H., Ohara, O., Kubota, N., Kadowaki, T., Arai, S. & Miyazaki T.	Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue	Proceedings of the National Academy of Sciences	108 (29)	12072-12077	2011
S. Uchida, K. Kataoka et al.	PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses.	Molecular Therapy.	印刷中		2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Q. Chen, K. Kataoka et al.	Homo-cationer integration into PEGylated polyplex micelle from block-cationer for systemic antiangiogenic gene therapy for fibrotic pancreatic tumors.	Biomaterials	33 (18)	4722-4730	2012
K. Osada, K. Kataoka et al.	Enhanced gene expression promoted by the quantized folding of pDNA within polyplex micelles.	Biomaterials	33 (1)	325-332	2012
S. Uchida, K. Kataoka et al.	Combination of chondroitin sulfate and polyplex micelles from Poly(ethylene glycol)-poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} block copolymer for prolonged in vivo gene transfection with reduced toxicity.	Journal of Controlled Release	155 (2)	296-302	2011
H. Uchida, K. Kataoka et al.	Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of N-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles.	Journal of the American Chemical Society	133 (39)	15524-15532	2011
T. Nomoto, K. Kataoka et al.	In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy.	Journal of Controlled Release	151 (2)	104-109	2011
Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S	Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1	Molecular Genetics and Metabolism	102(3)	343-348	2011