

201128069B

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22年度～23年度 総合研究報告書

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22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 宮崎 徹

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

|      |   |         |
|------|---|---------|
| I.   | 総合研究報告  |         |
| i.   | 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<br>宮崎 徹                    | -----3  |
| ii.  | 代謝マーカー解析：GC/MSとタンデムマスを応用したプロピオン酸血症の<br>生化学診断マーカーの超高度分析<br>山口 清次 | -----13 |
| II.  | 研究成果の刊行に関する一覧   | -----23 |
| III. | 研究成果の刊行物・別刷   | -----31 |

# I. 総合研究報告

(i)

## 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)

注：研究分担者・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。

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-/-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】

**22年度:** (1) 胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率の検討、(2) 補填した酵素遺伝子の発現持続性の検討、(3) 疾患効果・安全の検討。

**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。

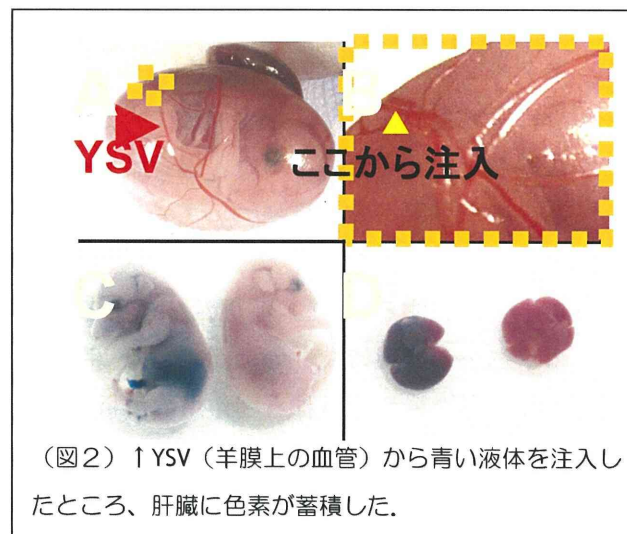
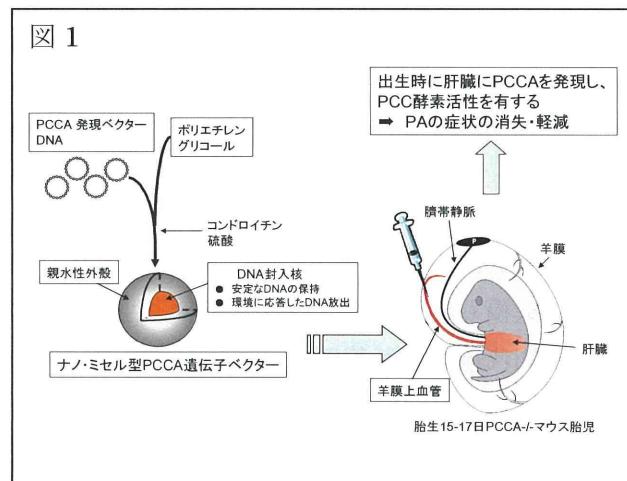
**3. 出生前治療:** 近年のマスクリーニングの進歩による胎生期診断と胎児治療を組み合わせた出生前治療が期待できる。また、ナノ・ミセルを経門脈的に肝臓に注入する出生後治療も検討し、出生後に診断された患者の治療に応用する。

**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1, 2)。



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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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（糸宮体変化、尿細管拡張、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ールを確立する。

（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 22 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製せず、代表者（宮崎）のものとひとまとめにして報告する。片岡博士の刊行物や学会発表については、別個一覧に記載してある。

### 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：

22 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。23 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：

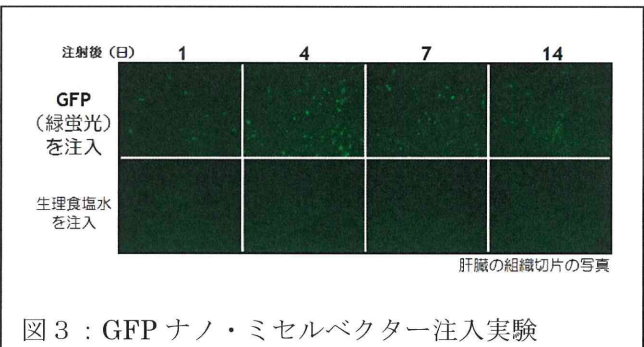


図 3：GFP ナノ・ミセルベクター注入実験

A. 22～23 年度前半に 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を行った。GFP ナノ・ミセルベクターを E17 マウス胎児に羊膜上血管より注入した。注入後肝臓での GFP 発現を組織学的に解析した結果、この方法でほぼ肝臓特異的にナノ・ミセルベクターを取り込ませる事ができ、さらに GFP の発現は出生後 2 週間以上維持されることを確認した（図 3）。

B. 次に、PCC<sup>-/-</sup>マウスコロニーの拡大による recipient の確保した後、上記条件に従って、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 によるジェノタイプ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 $-/-$ 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 $-/-$ 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 $-/-$ 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、2 2 年度の研究結果から、(1) 羊膜上血管よりナノ・ミセルを注入すると、効率よく胎児肝臓に集積させることができること、(2) 注入後 1 日で、すでにナノ・ミセルで包埋したベクターからのタンパク質発現が起こること。すなわち、出生前遅くとも一日前に注入処置を行えば治療目的に使用可能であること、(3) ナノ・ミセル由来のタンパク質発現は、本来のナノ・ミセルベクターの特徴である“徐放性”を反映し、長期に渡って認められること、(4) ナノ・ミセル注入による副作用(胎児の死亡や肝臓障害、母体への影響など)は現在のところ認められないこと、が明らかになり、PCC 発現ベクターDNA を包埋したナノ・ミセルは PA 治療に応用可能であることが示唆された。それに基づき、2 3 年度に、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 $-/-$ 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 $-/-$ 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。そのため、研究期間内に治療効果解析を遂行するまでに至らなかった。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

2 2-2 3 年度で、ナノ・ミセルを用いた、胎児肝臓に対する遺伝子デリバリーの条件検討を中心に基礎的な予備実験によって移入条件の最適化を行い、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. 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, 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)
  - 4) Mori M, Kitazume M, Ose R, Kurokawa J, Arai S, Miyazaki T. Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. J. Clin. Invest. 121:318-327(2011)
  - 5) Kurokawa J, Arai S, Nakashima K, Nagano H, Nishijima A, Miyata K, Ose R, Mori M, Kubota N, Kadowaki T, Oike Y, Koga H, Febbraio M, Iwanaga T, Miyazaki T. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. Cell Metab. 11:479-492(2010)
  - 6) Kurabe N, Mori M, Kurokawa J, Taniguchi K, Aoyama H, Atsuda K, Nishijima A, Odawara N, Harada S, Nakashima K, Arai S, Miyazaki T. The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and support their stability. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391:1708-1713(2010).
  - 7) Matsushima H, Ogawa Y, Miyazaki T, Tanaka H, Nishibu A, Takashima A. Intravital imaging of IL-1beta production in skin. J. Invest. Dermatol. 130: 1571-1580 (2010).
  - 8) 新井郷子, 宮崎徹 注目される用語の解説 「AIM」, 動脈硬化予防 9(3):117-119 (2010)
  - 9) 新井郷子, 宮崎徹 メタボリック症候群における AIM の機能, 病理と臨床 28(9):932-939 (2010)
  - 10) 新井郷子, 宮崎徹 メタボリックシンドロームと炎症: 脂肪融解タンパク質 AIM の機能, 細胞工学 29(8):753-758 (2010)
- ## 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：(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
- 13) 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
- 14) 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 regulation in Division & Arrest, Okinawa, 2011.10.25
- 15) 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
- 16) 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、名古屋、2011年7月9日
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 宮崎徹：(講演) AIMing at Metabolic Syndrome-AIMによるメタボリックシンドローム制圧への新たなアプローチ、第7回 TOP (Target Organ Protection) フォーラム、東京、2011年2月26日
- 20) Miyazaki T. : Keystone Symposia Meeting, Type2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolic Dysfunction, AIMing at Metabolic Syndrome-Metabolic disorder as a chronic inflammatory disease and its regulation via modulation of macrophage-derived AIM-, United States (Colorado), 2011.1.14~17
- 21) Miyazaki T.(Guest Speaker) : Infection, Immunity & Transplantation(IIT) Seminar Series, AIMing at Metabolic Syndrome–Metabolic disorder as a chronic inflammatory disease and its regulation via modulation of macrophage-derived AIM–, United States (Ohio), 2011.1.10
- 22) 宮崎徹：(特別講演) AIMing at Metabolic Syndrome-AIMを標的としたメタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けて、Advans 研究会 2010、千葉、2010年12月23日
- 23) 宮崎徹：(特別講演) 現代の難病克服のため新しい治療戦略–遺伝病と生活習慣病などに対する新規アプローチ、島根大学医学部小児科セミナー講演、島根、2010年12月14日
- 24) 宮崎徹：(特別講演) AIMing at Metabolic Syndrome-AIMを標的としたメタボリックシンドロームの新規治療法開発に向けて、Atherosclerosis & Cardiovascular Research Conference、東京、2010年12月11日
- 25) 宮崎徹：(講演) メタボリックシンドローム、第82回発生工学・疾患モデル研究会、東京、2010年10月29日
- 26) 宮崎徹：(特別講演) AIMとメタボリックシンドローム、第7回東京トリグリセリド研究会、

東京、2010年10月20日

- 27) 宮崎徹：(講演) Impacts of AIM of obesity and beyond、第31回日本肥満学会シンポジウム、前橋、2010年10月2日
- 28) Miyazaki T. : Cell Symposia (Session 4 – Metabolism) Impact on macrophage-derived AIM on the metabolic syndrome, Portugal, 2010.9.28
- 29) 宮崎徹：(特別講演) 疾患モデルマウスを用いて初めて明らかになった AIM の新しい機能—メタボリックシンドロームの新規治療法開発の可能性—、第24回モロシヌス研究会、熊本、2010年9月17日
- 30) 宮崎徹：(講演) 脂肪細胞の機能と異常、第15回アディポサイエンス研究会シンポジウム、大阪、2010年8月21日
- 31) 宮崎徹：免疫/炎症/動脈硬化、第42回日本動脈硬化学会学術集会、岐阜、2010年7月15日
- 32) 宮崎徹：(特別講演) AIM を標的としたメタボリックシンドロームの根本的治療法開発に向けて、第14回小児分子内分泌研究会、函館、2010年7月4日
- 33) 宮崎徹：動脈硬化と炎症とアポトーシス、第54回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム、神戸、2010年4月24日
- 34) 宮崎徹：炎症性マクロファージとメタボリックシンドローム、第107回日本内科学会講演シンポジウム、東京、2010年4月9日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

# I.総合研究報告

(ii)

代謝マーカー解析

GC/MS とタンデムマスを応用したプロピオン酸血症の  
生化学診断マーカーの超高感度分析

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科 教授）

分担研究課題

代謝マーカー解析

GC/MS とタンデムマスを用いたプロピオン酸血症の生化学診断マーカーの超高感度分析

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

プロピオン酸血症は、乳児期早期に急性の経過をとって死に至るケースも多い代表的な有機酸代謝異常症である。現在のカルニチン療法や食事療法では不十分なことが多く、治療に難渋することが多い。患者家族の QOL 向上にも配慮した新規の治療法開発のために、通常行なわれている診断法よりもより高感度の分析法を検討した。通常有機酸代謝異常の生化学診断は、GC/MS による尿中有機酸分析とタンデムマスによるアシルカルニチン分析が行なわれる。マウスの尿は微量しか取れないため、20  $\mu$  L の尿のメチルクエン酸を安定同位体希釈法を応用した GC/MS(SIM モード)による高感度分析によってマウスにおける基準値を作成した。マウスとヒトの基準値は若干差があるものの同じオーダーであり、ヒトの患者で有意にかけ離れた値をとることが確認されたため、マウスにも応用できると思われる。もう一つの分析法であるタンデムマスによるアシルカルニチン分析でも、尾静脈から採取した 1 滴の血液ろ紙からメタノール抽出した液をブチル誘導体化することによって、より感度の良い分析が可能になった。マウスの血中アシルカルニチンの基準値を作成し、ヒトと比較したところ類似したオーダーで検出できることがわかった。本研究の成果は、新規治療の効果を評価する方法として有用であり、微量の検体しか採取できない動物実験への応用も期待できる。

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）

一般検査ではケトアシドーシス、高アンモニア血症などを認める。早期診断によって、食事療法、カルニチン療法などによって障害予防、あるいは障害軽減が期待できる疾患であるが、重症度によって予後はかなり異なる。さらに全身状態は不安定で、治療効果も十分でない症例が多い。

本症の生化学診断は、図 1 に示すように蓄積するプロピオニル-CoA 由来の異常代謝産物を、GC/MS による尿中有機酸分析とタンデムマスによるアシルカルニチン分析で検出する。有機酸分析所見は図 2 に例示するように、3-ヒドロキシプロピオン酸、プロピオニルグリシン、メチルクエン酸等の増加が検出される。またタンデムマスによる血中アシルカルニチン分析では、図 3 に例示するように、C3（プロピオニルカルニチン、すなわ

A. 緒言

プロピオン酸血症は図 1 に示すように、イソロイシンの中間代謝過程にあるプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (PCC) の先天的欠損のために、筋緊張低下、多呼吸、意識障害、けいれんなどを起こして乳児期早期に死亡したり、発達遅滞などをきたす常染色体性劣性遺伝疾患である。

ち炭素鎖3つのアシルカルニチン)の上昇が検出される。

以上のような診断技術の発達に伴い、プロピオン酸血症の新生児マススクリーニングが普及しつつあり、発見される患者数が増えることが予想される。発見された患者に対して障害予防を目的として治療が行われるが、現時点では多くの症例で治療や生活指導に難渋することが多い。患者家族にとって QOL の高い治療法の開発が望まれ

ている。

ナノテクノロジー (ナノミセル型 PCC ベクター) を応用した新規治療が開発されつつある。実験動物を用いてその効果を評価するためには、生化学的な面からの評価が不可欠である。そこで、マウスの血液、尿を用いる高感度分析法を確立し、マウスにおける本症の診断マーカーの基準値を作成した。

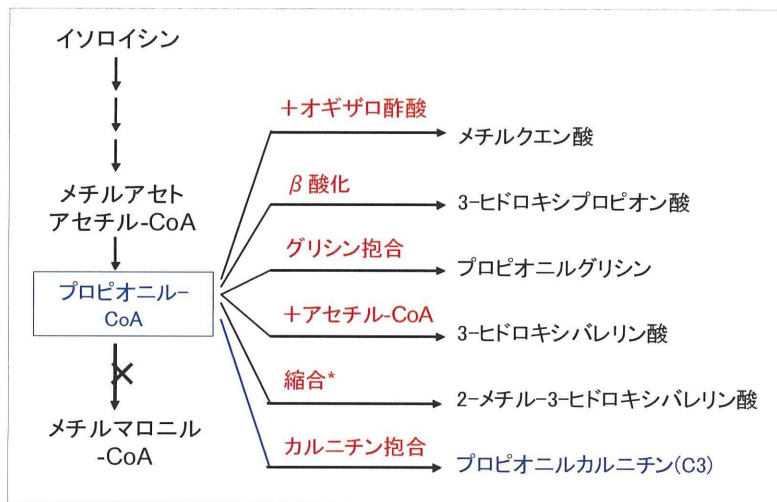


図1. プロピオニル-CoA 由来の異常代謝産物 (プロピオン酸血症)

略字: +オギザロ酢酸=TCA 回路のクエン酸合成酵素反応; +アセチル-CoA=アセチル-CoA との縮合: 縮合\*: プロピオニル-CoA が2分子縮合。

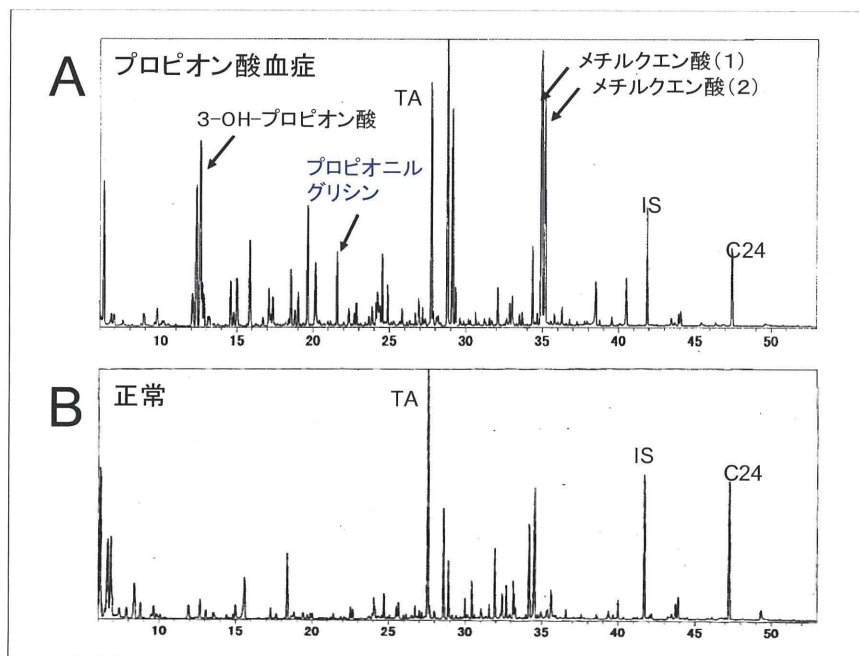


図2. プロピオン酸血症の GC/MS 有機酸分析 (TMS 誘導体化)

A:プロピオン酸血症、B:正常コントロール。各ピークは、内部標準IS（ヘプタデカン酸）に対する相対面積で定量する。略字：TA=トロパ酸；C24=テトラコサン

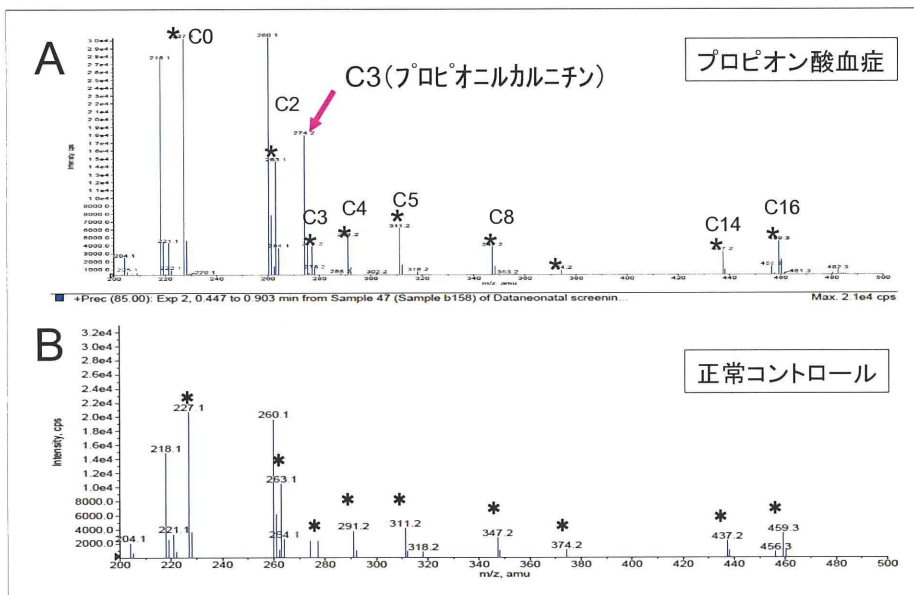


図 5. プロピオン酸血症患者の血中アシルカルニチンプロファイル（タンデムマス分析）  
A:プロピオン酸血症、B:正常コントロール。\*印:内部標準として加えた安定同位体ラベル下アシルカルニチン。C3（炭素鎖3のプロピオニルカルニチン）の上昇が検出されている。

## B. 本研究の目的

マウスのような小動物から、血液、あるいは尿を採取することは容易ではない。ごく微量の検体を分析するために超高感度分析法を確立することと、それを用いてマウスの基準値を作ることとを目的として研究を行った。

## C. 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) 安定同位体法によるメチルクエン酸の GC/MS 分析

マウスの尿 20uL を 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 のバイアルビンに試料 0.1ml をとり、尿中に含まれる尿素を分解することを目的として、ウレアーゼ水溶液（1 ユニット/1μL）を 2μL 添加して 37°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 μmol/ml）10uL と d3-methylcitrate（10nmol/ml）を 50uL 添加した。さらに自然の内部標準として tropate（10 μg/ml）10 μL と heptadecanoate（10 μg/ml）を 5 μL 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°C で 1 時間反応させて TMS 誘導体化したのち、その 2 μL を GC/MS 分析した。d3-creatinine を内部標準としてクレアチニンを

測定し、メチルクエン酸濃度を  $\mu\text{ mol/mmol Cre}$  で表した。

### c) マウス血液ろ紙中アシルカルニチン分析 (タンデムマス法)

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(アシルカルニチン、d3-C0、d3-C2、d3-C4、d3-C6、d3-C8、d3-C14、および d3-C16) をそれぞれ 100 nmol 添加した。冷メタノールで除タンパク後乾固し、ブチル誘導体化した試料をタンデムマス (ESI-MS/MS) 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。アシルカルニチンはペアレントスキャン法、アミノ酸はニュートラルロススキャン法で測定した。

## C. 研究結果

表 1 にマウスの血液ろ紙中アシルカルニチンと尿中メチルクエン酸測定値を示している。同時にヒトの正常基準値と患者の測定値を例示した。

マウスとヒトで測定値のオーダーは類似していた。ヒトの患者での異常値からみて、マウスのプロピオン酸実験動物も生化学診断が可能であると思われる。

プロピオン酸血症の診断マーカーとして関連するものとして、C0 濃度はマウスで  $27.4 \pm 2.9\text{ nmol/mL}$  (22.0~31.1) で、ヒトでは 10~60 nmol/mL である。C3 (プロピオニルカルニチン) は、マウスで  $1.01 \pm 0.23\text{ nmol/mL}$  (0.65~1.40) であったが、ヒトでは 0.4~4.2 nmol/mL である。表 1 に示した 2 名のヒトのプロピオン酸血症患者 (2 名) のアシルカルニチンプロファイルを見ると、血中 C0 4.43 と 7.21 と低下し遊離カルニチン欠乏状態を示唆した。C3 は 15.2 と 26.0 と有正常に比べ意な上昇がみられた。

尿中有機酸分析で、メチルクエン酸濃度は、マウスで  $6.2 \sim 21.5\ \mu\text{ mol/mmol Cre}$  で、ヒトでの基準値は  $2.26\ \mu\text{ mol/mmol Cre}$  以下である。これに対しヒトの患者 2 例の値をみると、35.9、61.9 と有意な上昇がみられている。今回作成したマウスの基準値は、治療評価に使えるものと思われる。

表 1. マウスとヒトのプロピオン酸血症診断マーカー

|      | マウス (C57BL6 マウス) |                             | ヒト      |                           |
|------|------------------|-----------------------------|---------|---------------------------|
|      |                  | 正常                          | 正常      | 患者 (例)                    |
| 血液ろ紙 | C0               | $27.4 \pm 2.9$ (22.0~31.1)  | 10~60   | <u>4.43</u> 、 <u>7.21</u> |
|      | C2               | $26.8 \pm 3.9$ (20.9~30.8)  | 5~45    | 5.86、6.19                 |
|      | C3               | $1.01 \pm 0.23$ (0.66~1.40) | 0.4~4.2 | <u>15.2</u> 、 <u>26.0</u> |
|      | C3/C2            | $0.04 \pm 0.01$ (0.03~0.05) | 0.2 以下  | <u>2.6</u> 、 <u>4.2</u>   |
| 尿    | メチルクエン酸          | $13.8 \pm 4.1$ (6.2~21.5)   | 2.26 以下 | <u>35.9</u> 、 <u>61.9</u> |

単位：アシルカルニチン、nmol/mL；尿中有機酸、 $\mu\text{ mol/mmol Cre}$ 。下線は異常値。

## D. 考察

プロピオン酸血症の生化学診断法として、質量分析法によるプロピオニル-CoA の代謝産物の測



定が行なわれる。通常は(1) GC/MS による尿中有機酸分析、および(2) タンデムマスによるアシルカルニチン分析が行なわれる。マウスの検体採取量は少なく、微量検体の高感度分析が要求される。我々は、マウスの尿 20  $\mu$  L で安定同位体希釈法を用いる GC/MS 分析 (SIM モード) で、プロピオニル-CoA 由来のメチルクエン酸を正常コントロールでも検出できることを確認し、マウスの基準値を作成した。またタンデムマス分析は、通常非誘導体化法によって多量検体をスクリーニングされることが多いが、我々は血液ろ紙から抽出した液をブチル誘導体化して分析によって、診断マーカーの C3(プロピオニルカルニチン)のマウスの基準値を作成した。誘導体化法は、分子量が大きくなりイオン化効率が良いためより感度が良いと考えられている。

マウスにおけるメチルクエン酸、プロピオニルカルニチンも人のそれと類似した量であることがわかり、ヒト患者では有意に高い値をとることを確認した。プロピオン酸血症の新規治療の効果を評価するために、実験動物であるマウスの体液中の代謝産物を測定できることが確認されたことは、今後これ以外の有機酸血症の治療薬開発にも応用できる可能性が高い。

## E. 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検体の分析のために、安定同位体希釈法を導入した GC/MS 分析の感度向上を確認した。タンデムマス分析でもブチル誘導体化を採用して、より感度の良い分析法によって、マウスでの基準値を作成した。新規治療の評価に役立つものと思われる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi T: Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS.. *Journal of Chromatography B* 878(13-14): 942-948, 2010 (April)
- 2) Fukao T, Nguyen HT, Nguyen NT, Vu DC, Can NT, Pham AT, Nguyen KN, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui TP, Niezen-Koning KE, Wanders RJ, de Koning T, Nguyen LT, Yamaguchi S, Kondo N.: A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 100: 37-41, 2010 (May)
- 3) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development* 32: 409-411, 2010 (May)
- 4) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial  $\beta$ -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development* 32: 362-370, 2010 (May)
- 5) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S.: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010 (Jun)

- 6) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N: Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221(3): 191-195, 2010 (Jun)
- 7) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates Mitochondrial  $\beta$ -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Disorders. *Journal of Chromatography B* 878(20): 1669-1672, 2010 (Jun)
- 8) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. *Journal of Chromatography B* 878: 3113-3118, 2010 (November)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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変化. *日本小児科学会雑誌* 115(5): 956-960, 2011 (5月)
2. 学会発表
- 1) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic diseases. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases, Seminar. Fukuoka, March 2010
- 2) Yamaguchi S: Heat Stress and Acute Encephalopathy in Childhood due to Inherited Organic and Fatty Acid Disorders. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases. Taipei, Taiwan, March 2010
- 3) Yamaguchi S: Japan MS/MS Pilot: How to turn Pilot to NBS program. Annual Newborn Screening Seminar 2010, Turku, Finland, June 2010
- 4) Yamaguchi S: Yinchuan Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) in FAO disorders: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. SSIEM, Istanbul, August 31– September 3, 2010.
- 5) Yamaguchi S: Pediatric Emergency and Inborn Metabolic Diseases, and Prevention of Children from Impairments. China (Ningxia) -Japan

- Inherited Metabolic Disease Meeting, Yinchuan, China, September, 2010
- 6) Yamaguchi S: Pediatric emergency and nutritionally treatable inborn errors of metabolism. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Lecture. Indonesia, Indonesia, October 2010
  - 7) Yamaguchi S: Expanded newborn screening in JAPAN, and the benefit for collaboration with developing countries.. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Symposium. Indonesia, Indonesia, October 2010
  - 8) Yamaguchi S: Organic acidemia and its treatment in JAPAN. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Symposium. Indonesia, October 2010
  - 9) 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
  - 10) 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
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) 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
  - 15) 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
  - 16) 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
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 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
  - 20) 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
  - 21) 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

22) 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: ベザフィブラート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

23) 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

#### H. 知的財産の出願状況

該当なし