

始した。また、ミオシンによる抗体染色も陽性であった。電顕による観察ではZバンド、Aバンド、Iバンドが認められるとともに、グリコーゲンの蓄積が認められた。

D. 考察

今回、我々が樹立したポンペ病モデルマウス由来のiPS細胞は多分化能を有しており、かつ生化学的、病理学的にポンペ病の表現型も保持していた。そして、分化誘導したiPS細胞は骨格筋の性格を有していた。従って、本細胞はポンペ病の骨格筋に対する治療法や発症メカニズムを解明する有用なモデルとなると考えられた。

E. 結論

ポンペ病モデルマウスからiPS細胞を樹立し、その有用性を確認した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawagoe S, Ida H. et al: Generation of iPS cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. Mol Genet Metab. 2011;104:566-573

2. 学会発表

リソソーム病に診断と治療-ゴーシェ病とポンペ病を中心に - 井田博幸. 第53回日本小児神経学会総会 (横浜: 2011.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症モデル動物に対する中鎖脂肪酸療法の効果について

研究分担者 裏出良博 大阪バイオサイエンス研究所 第二研究部 部長
鈴木 朗 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 特任研究員

研究要旨

ATGL 遺伝子欠損マウス（以下 ATGL KO マウス）を用いて、そのホモ接合体の寿命や病態について解析した。MCT 食餌療法により、有意な寿命の延長効果、心臓への脂質蓄積の抑制、心機能悪化の抑制を示した。これらの結果は中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）に対する MCT 食事療法の有用性を示すと考える。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)のモデル動物である Adipose triglyceride lipase (ATGL) ノックアウトマウス(以下 ATGL KO マウス)を用いて、現在すでに臨床で検討されている中鎖脂肪酸 (Medium chain triglyceride, MCT)を用いた食餌療法の効果を血液生化学的、組織学的、分子生物学、画像診断学的に分析した。

B. 研究方法

ATGL KO マウスを人工授精(IVF)により作出し、得られたホモ接合体マウスを、MCT 食を与えた群とコントロールとして(Long chain triglyceride, LCT)を与えた群に分け、その病態や寿命への効果を観察した。食餌療法は離乳(生後4週)と同時に開始した。心臓機能や脂肪蓄積の評価のために実験動物用 X 線 CT 撮影装置(Latheta LCT-200)による撮影を行い、心臓機能の指標となる左室駆出率(%EF)や、心筋細胞への脂質の蓄積の程度を左心室壁における CT 値から検討した。また、マウスから各臓器を摘出し組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は大阪大学、大阪バイオサイエンス研究所の審査委員会の許可を得、規程に従って実施した。実験においては動物の苦痛ができるだけ少なくなるような方法、手技に配慮し、最小限の動物数に対して行った。

C. 研究結果

KO マウスは著しい心臓への脂肪蓄積、心肥大を呈し早期に死亡したが、MCT 食を与えた群は LCT 群に対して、有意に寿命が延長した(平均値 LCT:74.5±3.9 日、MCT:90.3±3.2 日 P<0.01 Wilcoxon の順位和検定)。

CT による心機能の評価では、野生型の左室駆出率(EF%) (平均 45.5%) が KO では大きく低下していた(平均 16.9%)が、MCT 群では EF% の悪化が抑えられた(平均 40.5%、p<0.001)。左心室壁 CT 値は KO で大きく低下していた(平均 27HU)が、MCT 群では低下が抑えられた(平均 57HU, p<0.05)。

KO マウスは頸背部に著しい脂肪の蓄積があるが、CT 画像からは、その部分の褐色脂肪細胞の減少が観察され、病理学的検討においても褐色脂肪組織の白色脂肪組織化が観察された。大動脈周囲脂肪組織についても、KO マウスでは褐色脂肪組織の白色脂肪組織化が観察された。

D. 考察

ATGL KO マウスは心不全によって死亡したと思われるが、MCT 食餌療法により寿命の有意な延長が確認されたことから、MCT 食餌療法の有用性が証明できたと考える。寿命の延長をもたらした原因として、心機能悪化の抑制効果を期待していた通り、モデル動物による検討で、MCT 食事療法により左心室収縮率の悪化を抑制することができた。

本来、頸背部に分布している褐色脂肪細胞が KO マウスでは減少しており、脂肪細胞の分化・増殖に異常があると推測されたので、現在、マウスから単離した前駆脂肪細胞を単離し、各種遺伝子の発現量を調べるなどして *in vitro* での解析を行っている。また、MCT 食餌療法による各種遺伝子発現への影響を検討するため、各臓器より RNA を分離し、解析を引き続き進めている。

なし

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症のモデルマウスである ATGL 欠損マウスを用いた検討により、MCT 食餌療法は明らかな寿命の延長効果を示した。その理由としては MCT 食餌療法により心機能の悪化を抑制したためと考えられる。これらの結果は、TGCV に対する MCT 食餌療法の有用性を示したものとする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第1回中性脂肪蓄積心筋血管症

(TGCV) 国際シンポジウム

2011年11月26日 京都大学

Effect of Medium Chain Triglyceride on
Adipose Triglyceride Lipase Knockout Mice

A. Suzuki, S. Yamaguchi, Y. Ikeda,
H. Nakamura, N. Zaima, T. Kimura, Y.
Urade, K. Hirano

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

細胞内中鎖脂肪酸代謝の解析

研究分担者 木原章雄 北海道大学大学院 薬学研究院 生化学研究室 教授

研究要旨

中鎖脂肪酸には中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) 患者の心機能維持効果および病態改善効果が認められている。中鎖脂肪酸の生体内における代謝機構および中鎖脂肪酸の作用機序を明らかにするために、放射ラベル中鎖脂肪酸を用いたトレーサー実験により中鎖脂肪酸の代謝物の解析を行なった。その結果、中鎖脂肪酸は脂肪酸伸長酵素 FAS により長鎖脂肪酸へと伸長された後、リン脂質、スフィンゴ脂質、中性脂質へと代謝されることが明らかとなった。また、中鎖脂肪酸による脂質代謝への影響を解析したところ、コントロールおよび TGCV 患者由来皮膚繊維芽細胞における脂質代謝への影響はみられなかった。

A. 研究目的

MCT oil の添加により長鎖脂肪酸に対して中鎖脂肪酸比率を増加させた食事を摂取することで、adipose triglyceride lipase (ATGL) 遺伝子欠損 TGCV 患者の心機能が正常に維持されるだけでなく肺活量や筋力の増加等の予後の改善効果が認められている。中鎖脂肪酸の生体内での代謝機構および中鎖脂肪酸の作用機序を明らかにするために、コントロール MEF および TGCV 患者由来皮膚繊維芽細胞 (ATGL 欠損 MEF) を用いた中鎖脂肪酸の代謝解析を行なった。

B. 研究方法

中鎖脂肪酸の代謝経路を調べるために、コントロール MEF および ATGL 欠損患者由来皮膚 MEF 細胞を [¹⁴C] オクタン酸 (C8:0) で 4 時間ラベル後、脂質を回収、TLC で展開、BAS-2500 で代謝物を検出した。また、中鎖脂肪酸の脂質代謝への影響を解析するため

に、200 μM オクタン酸存在下において [³H] パルミチン酸で細胞を 4 時間ラベル後、脂質を回収し、TLC で展開、フルオログラフイーにより代謝物を検出した。

C. 研究結果

細胞内に取り込まれた [¹⁴C] オクタン酸は、脂肪酸伸長酵素 FAS によりパルミチン酸へと伸長された後、ホファチジルコリンをはじめとするリン脂質、スフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質やトリグリセリドへと代謝されることが明らかとなった。その際、ATGL 欠損 MEF ではトリグリセリドの蓄積が観察された。また、 [³H] パルミチン酸ラベル実験においても、リン脂質、スフィンゴ脂質、トリグリセリドが代謝物として検出されたが、コントロールおよび ATGL 欠損 MEF のいずれにおいてもオクタン酸存在下での脂質代謝の変化は見られなかった。

D. 考察

中鎖脂肪酸は細胞内へ取り込まれた後、長鎖脂肪酸へと伸長され、様々な脂質に変換されることが示された。中鎖脂肪酸が長鎖脂肪酸に伸長されるにはエネルギーが必要となるため、中鎖脂肪酸が他の脂質に変換されるには長鎖脂肪酸をもとに変換するよりも余分にエネルギーが必要になる。本研究では中鎖脂肪酸の有無にかかわらず、検出した脂質代謝に変化は見られなかったが、中鎖脂肪酸が多量に存在している条件下では、エネルギー代謝量が増加した結果、病態が改善した可能性が考えられる。

近年脂肪酸受容体が発見されており、中鎖脂肪酸特異的な受容体として GPR84 が同定されているが、その機能には不明な点が多い。そのため中鎖脂肪酸の作用機序を解析する上で GPR84 の組織発現や機能解析を行なう必要があると考えられる。また、TGCV 患者の皮膚以外の細胞の取得は困難であるため本解析では皮膚由来 MEF を用いた脂質代謝解析を行なったが、今後更なる中鎖脂肪酸の解析を行なうためには、*ATGL* ノックアウトマウスといったモデル動物における肝臓および心臓や骨格筋等を用いた脂質代謝解析やエネルギー代謝およびそれらに関与する遺伝子発現の変動も解析する必要があると考えられる。

E. 結論

コントロールおよび TGCV 患者由来皮膚繊維芽細胞では、取り込まれた中鎖脂肪酸は長鎖脂肪酸へと伸長され、リン脂質、スフィンゴ脂質、トリグリセリドなどの脂質へと代謝される。また、多量の中鎖脂肪酸存在下において、中鎖脂肪酸は両細胞株の

脂質代謝には影響しない

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症モデル動物（ATGL 欠損マウス）における
男性生殖能に関する検討

研究分担者 木村 正 大阪大学医学系研究科 産婦人科 教授
中村仁美 大阪大学医学部附属病院 生殖医療センター（産婦人科）研究員
正木秀武 大阪大学医学部附属病院 産婦人科 医員

研究要旨

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症の主な原因はATGL遺伝子の変異と考えられている。ATGLはマウスにおいて心筋、脂肪組織、骨格筋だけでなく、精巣においても高い発現が報告されている。ATGL遺伝子の男性生殖器における機能を検討するためにATGL欠損マウスを用いて検討を行った。ATGL欠損マウス精巣では、多数の脂肪滴が認められ、運動性精子が認められなかった。これに対して、4週間の中鎖脂肪酸による長鎖脂肪酸の代替飼料を与える事により、造精能および精子運動能の回復が認められた。ATGL遺伝子が関与する脂質代謝異常により、male reproductive tractに影響を与え、これが造精能および精子の運動能獲得に関与する事が示唆された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV) は adipose triglyceride lipase (ATGL) 遺伝子変異を原因の一つとする心疾患と考えられている。細胞内中性脂肪分解の必須酵素である ATGL はマウスにおいて心筋、脂肪組織、骨格筋、精巣などに高発現している。この事から、ATGL 遺伝子が少なくともオス生殖能に関わる事が示唆され、ATGL KO マウスを用いて、オス生殖能について検討を行った。

B. 研究方法

ATGL 欠損マウスは離乳時（4 週齢）より、長鎖脂肪酸の代わりに飽和脂肪酸である中

鎖脂肪酸 (medium chain triglyceride) を用いた MCT 飼料もしくは、コントロールとして長鎖脂肪酸 (long chain triglyceride) を含む LCT 飼料の 2 群にわけた。8 週齢のオスマウス、精巣上体尾部および精巣を摘出した。精巣上体尾部は、modified HTF (human tubal fluid) medium 中でミンスした後、精子濃度、精子運動率について WHO の基準に従って検討を行った。精巣組織はホルマリン固定の後、組織学的検討を行った。

（倫理面の配慮）

本研究におけるすべての動物実験は大阪大学大学院医学系研究科の動物実験に関する倫理委員会の承認のもとに行われた。組み替え DNA 実験についても、大阪大学

院医学系研究科の承認のもと、この基準に従った。

C. 研究結果

ATGL 欠損マウスの精巣では、脂肪滴が多数認められる。精巣上体尾部において精子は確認されるものの、運動性精子は認められなかった。LCT 飼料を与えた群においては、通常食の群と同様の結果が得られた。一方で、4 週間の MCT 飼料を与えられた群において、精子濃度の上昇が認められ、さらに運動性精子が認められた。

D. 考察

ATGL 欠損マウス雌雄の交配では産仔が得られないが、ヘテロ雌雄の交配により欠損マウスを得る事ができる。つまり、ヘテロマウスの環境において、ATGL 遺伝子を欠損した精子からも産仔が得る事ができる。この事と、4 週間の MCT 飼料によって造精能が向上し、さらに運動性精子が認められるようになった事から、ATGL 遺伝子が雄生殖器官における環境に関与している事、これにより造精能および精子運動能の獲得に影響を与えている事が示唆された。

E. 結論

ATGL 遺伝子が関与する脂質代謝異常により、male reproductive tract に影響を与え、これが造精能および精子の運動能獲得に関与する事が示唆された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Adipose triglyceride lipase (ATGL) 欠損マウスにおける生殖能の検討

正木秀武、中村仁美、熊澤恵一、香山晋輔、筒井建紀、鈴木 朗、山口知是、平野賢一、木村正

第 137 回日本生殖医学会関西支部集談会

第 44 回関西アンドロロジーカンファレンス

(大阪市：2012. 3. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症における侵襲的画像診断

研究分担者 小谷 順一 国立循環器病研究センター 心臓血管内科 医長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症と考えられる症例に対し、日常臨床で使用が可能である侵襲的画像診断法：血管内超音波法（IVUS）と光干渉断層像（OCT）を用いて冠動脈の評価を行った。剖検後の心臓における冠状動脈の観察に対して、造影剤と生理食塩水による持続的灌流を行い良好な画像を得ることが可能であった。得られた画像は、生体内での記録に遜色ないものであった。本症例は、汎発性に内 - 中膜肥厚を有し、極めて特異的な所見を呈していた。

A. 研究目的

いわゆる動脈硬化を基盤とする冠状動脈の疾患は、局所的な炎症に基づく損傷と修復を繰り返すことから、粥腫（プラーク）を形成する。このことから血管病変の画像診断は主に内腔の狭小化が評価の中心であったが、本疾患のように病変の主座が汎発的な“血管壁”そのものである場合は通常用いられる冠動脈造影法では評価ができない。一方、断層像として管腔を評価できる診断機器では血管壁及び内腔の評価が可能である。

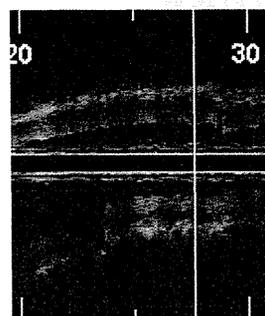
B. 研究方法

症例は 24 歳の症例。関東地方の病院にて心疾患にて他界された症例であり、剖検心としての保存がなされていた。このため、冠状断に割が入っている状態であり、それぞれの冠状動脈は 3-4 つの部位に分断されていた。このため、観察はそれぞれの区域ごととした。また、画像記録を行う間には冠動脈内の空気の排除を行う必要があり、生理食塩水と造影剤の混合液にて灌流し、血管内腔そのものの拡張を保つことを試みた。使用した画像診断機器は、臨床ですでにカテーテル検査施行時に使用されている 45Mhz の血管内超音波カテーテル（View-IT, Terumo）による RF 信号の出力並びに、光干渉断層法（OCT）を用いた。

C. 研究結果

右冠動脈、左冠動脈（回旋枝・前下行枝の同定は困難）の観察が可能であった。それぞれ

は、近位部と遠位部として記録した。本例は若年であり、通常は急性心筋梗塞や不安定狭心症を呈するような局所的なプラークは見られないことが伺われたが、予想に反せずそのような局所的な反応は見られなかった。石灰化に関しても観察できる範囲では認められなかった。ところが、非常に厚い内 - 中膜肥厚が認められた。この所見は、興味深いことに、観察しえたほとんどの部位で同様の所見を呈していた。OCT：RCA 遠位部像を示す（上：断層像、下：長軸像）



D. 考察

通常の動脈硬化性変化では、プラークの形成は集簇の形態を認める。シェアストレスの影響で、時に偏心性に“堆積”した様子が OCT

のような断層像では示されることが多い。ところが、本例のように血管全体に均一な変化を呈する変化はこれらとは大きく異なるものである。OCT 所見から、肥厚した内～中膜の組織性状はほぼ均一であることから、構成組織の heterogeneity は低いと考えられる。

これらの所見は、この肥厚（性変化）は代謝性疾患によるものであることを予想させるものである。しかし、代謝性疾患で若年にて虚血性心疾患を呈する疾患であるホモ接合体家族性コレステロール血症などでは、通常は高度の石灰化を有する。また、糖尿病症例で“狭窄を有さない”が全体的に細い冠動脈造影所見を見ることがある。そのような症例ではこのような汎発性の血管壁の変化を呈している可能性があり、これらの症例との画像・病理所見の対比が今後の課題である。

E. 結論

きわめて特異的な血管壁の肥厚を示す症例の冠動脈を生存当時は存在しなかった画像診断法によって観察しえた。今後は、さらなる病理との対比から組織性状診断による生前診断の確立が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

ATGL 遺伝子変異を伴う中性脂肪蓄積心筋血管症 2 症例における
ミオパチー症状の経過

研究分担者 隅寿恵 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科 助教

研究要旨

ATGL遺伝子変異を伴う中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyopathy, TGCV) では四肢・体幹筋力低下が緩徐に進行すると報告されるが、症例の稀さゆえに臨床像の特徴は不明な部分が多い。今回、比較的ミオパチー症状の軽度であった2症例のミオパチーの経過を解析し、心不全を伴わず重度のミオパチーを呈した症例の臨床像と比較検討した。発症時期は同様ながら、就労活動を継続し活動範囲の広がった症例は、脳梗塞後遺症のためにADL制限を余儀なくされた症例よりも四肢筋力低下の進行は早く、血清CK値も高値であった。日常生活上の運動負荷がミオパチー症状の進行に関与する可能性が示唆された。重症例と共通していた罹患部位は下腿、上肢近位部、上肢遠位部伸筋群であり、本症で侵されやすい骨格筋であると考えられた。

A. 研究目的

ATGL 遺伝子変異を伴う中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyopathy, TGCV) のミオパチー臨床像を明らかにする。

B. 症例の臨床像経過

平成 22 年度の報告書で考察した 3 症例のうち、ミオパチー症状が比較的軽度ながら高度の心不全を有し、心移植を受けた男性 2 症例について、ミオパチー症状の経過を観察し、ミオパチー症状のより目立った女性 Case1 の臨床像と比較した。

Case2 (40 歳代後半男性) 30 歳頃よりつま先立ちがしにくくなった。35 歳頃より右腕を上げにくく、スリッパが脱げやすくなった。41 歳時より階段で手すりを持つよ

うになった。42 歳時に両側眼瞼下垂・複視が出現し眼科にて手術を受けた。四肢筋力低下は徐々に進行するも事務作業を中心とした勤務を現在も継続し、自由に外出できる生活を送っている。47 歳時の診察では、4 年前と比較し、中指と肘屈曲のしにくさ、肩周囲のやせ進行が自覚された。また、寒いと全体に動きが悪く、腰痛が出現した。診察上高度の筋力低下を認めたのは、以前からの前脛骨筋に加えた三角筋であった。両上肢近位筋である上腕二頭筋、手関節の伸筋群、大腿背面筋群にも筋力低下が進行していた。手指伸筋は本人の訴え通り、第 3 手指 (> 第 4 手指) 選択的に高度に筋力が低下しており、手指屈筋の筋力は正常であった。血清 CK 値は入院すると正常化するが外来診察時は 1000・2000 とほぼ高値で

あった。48 歳時、49 歳時における罹患部位の筋力低下は徒手筋力テスト上、徐々に進行していた。

Case3 (40 歳代前半男性) 24 歳頃より高 CK 血症(500~2,000 IU/l)を指摘された。30 歳時、両側腓腹筋の軽度筋力低下と筋萎縮を指摘されたが、自覚的な歩行障害はほとんどなかった。41 歳時に心原性脳塞栓症を併発し、右不全運動麻痺・運動性失語が残存したが、杖を使用すれば平地歩行は自立していた。ADL 上の変化は脳梗塞後遺症による影響以外は自覚なかった。44 歳時の診察では、10 年前と比較し、全身の痩せは目立つものの、左下肢の筋力低下は軽度認められるのみであった。近年の血清 CK 値は 200 以下と正常範囲であった。

D. 考察

ATGL 遺伝子変異による、ミオパチーを伴う中性脂肪蓄積症では 20~30 歳代で発症することが多く、四肢・体幹筋力低下が緩徐に進行するとされる。今回、経過報告した男性 2 症例は同様に 30 歳にて発症したが、顔面罹患を伴いつつも勤務を継続している症例の方が、脳塞栓症のために ADL が低下していた症例よりも、四肢筋力低下の進行が早かった。血清 CK 値も前者にて高く、我々の経験した ATGL 遺伝子変異を有する 3 症例すべてにおいて筋萎縮や画像上の筋変性の程度が右優位であった(平成 22 年度報告書参照)ことから、日常生活上の運動負荷がミオパチー症状の進行に関与する可能性が示唆された。一方で、脳梗塞を引き起こす前から case3 は case2 よりもミオパチー症状は軽度であったので運動以外の要素が経過に元々関与していたことも

十分に考えられる。case2 の四肢筋力低下の分布はミオパチー症状の目立った case1 における筋力低下の分布に近付きつつあった。下腿、上肢近位部、上肢遠位部伸筋群は中性脂肪蓄積による筋線維の障害されやすい部位と考えられた。また、脂質代謝に温度が関与することはよく知られるが、寒さが骨格筋の動きを悪くするという患者の訴えは case2 のみならず case1 から聴取されており、本症におけるミオパチー症状の特徴である可能性は否定できない。今後、多くの症例からの問診内容を検討する重要性が考えられた。

E. 結論

ATGL 遺伝子変異による、ミオパチーを伴う中性脂肪蓄積症におけるミオパチーの特徴を報告した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

心筋及び冠動脈における脂質局在の可視化

研究分担者 瀬藤光利 浜松医科大学 解剖学講座 細胞生物学分野 教授

研究要旨

これまでの研究において、2型糖尿病患者の冠動脈における中性脂肪（TG）の局在異常を質量顕微鏡法によって明らかにした。また、免疫染色法によって、冠動脈の血管平滑筋の分布がTGの分布と一部一致することを見出した。今年度は、心筋におけるTGを可視化するとともに、冠動脈においては、TG以外の脂質成分の可視化を試みた。

A. 研究目的

TGCVは平野班長らのグループが発見した新規の疾患単位であり、心筋と冠動脈における中性脂肪の異常蓄積を特徴とする。平野班班員である財満の研究により、2型糖尿病心不全死症例においてTGCV様のフェノタイプが引き起こされる可能性が示されたため、前年度は冠動脈の脂質局在を質量顕微鏡法によって可視化し、糖尿病患者冠動脈におけるTGの局在異常を見出した。今年度の目的は心筋におけるTGの可視化と冠動脈に存在するTG以外の脂質を可視化することである。

B. 研究方法

クライオスタットで8 μ mの組織切片を作成し、ITO (Indium Thin Oxide) コートしたスライドガラス上に接着させ、DHB (2,5-Dihydroxy benzoic acid) 溶液を塗布し、質量顕微鏡分析に供した。質量顕微鏡分析にはNd:YAGレーザー(波長 355nm、周波数 200Hz)を搭載したUltraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics)を使用した。

脂質局在解析はFlexImagingを用いた。脂質の同定には、MALDI-LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

(倫理面の配慮)

実験は浜松医科大学の生命倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

糖尿病群と非糖尿病群の両群の心筋でTGが検出されたが、検出強度は糖尿病群の方が強かった。また、冠動脈に存在するホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンの分子種を可視化した。これらの脂質種は糖尿病群と非糖尿病群で大きな差はなかった。

D. 考察

心筋TGは糖尿病群の方が強く検出された。このことから、糖尿病群においては心筋でもTGが蓄積していることが示唆された。また、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンの局在には大きな差が観察されなかったことから、糖尿病患者冠動脈に

おいては TG の代謝が特異的に変動している可能性が強く示唆された。

E. 結論

糖尿病患者は冠動脈のみならず、心筋の TG 蓄積にも留意する必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Triglyceride Deposit Cardiomyovascuopathy
Associated with Type 2 Diabetes Mellitus

Nobuhiro Zaima, Yoshihiko Ikeda, Masayuki Mano,

Hatsue Ishibashi-Ueda, Mitsutoshi Setou,

Ken-ichi Hirano

The 1st International Symposium on Triglyceride
Deposit Cardiomyovascuopathy and Neutral
Lipid Storage Disease

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

患者 iPS 細胞を用いた血管平滑筋細胞への分化誘導法および診断法の確立に関する研究

研究分担者 千葉 俊明 琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学講座 准教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症において、血管平滑筋への中性脂肪沈着とその異常増殖による同心円状の硬化病変ができるが、臨床において患者より血管平滑筋を採取することは困難であり、上記の病態を把握する事が困難な状況にある。今回患者皮膚由来のiPS細胞を用いて血管平滑筋を選択的に分化誘導する方法の確立を試みた。また、iPS細胞を介さずに直接血管平滑筋を作製すべく、複数遺伝子群の高効率導入法の開発を目指した。結果として、マウス胚性幹細胞を用いて、血管平滑筋への選択的分化誘導法を確立した。また、テトラサイクリンによる遺伝子発現調整が可能なアデノウイルスを作製し、発現増強効果が確認できた。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症においては心筋のみならず、血管平滑筋の中性脂肪含量が著明に増加しており、病態発症との関連が示唆されている。しかし、現段階においてはその病的状況を解析する方法がないため、生体内環境を模倣するような *in vitro* における実験系および解析・診断方法の確立が急務である。ATGL 欠損患者における血管平滑筋への中性脂肪蓄積の機序および病態生理への理解、その後の診断・治療法を検討するため、血管平滑筋細胞への選択的分誘導法の確立および幹細胞を介さない迅速かつ直接的に血管平滑筋を得るダイレクトリプログラミング法の確立を試みた。

B. 研究方法

まず、マウス胚性幹細胞を用いて浮遊培養を行なうことにより、胚様体を形成し、その後、高濃度 (10 μ M) レチノイン酸を含

む分化誘導培地を用いて4日間浮遊培養を継続。さらに血管壁内では平滑筋層の床を形成するエラスチンを培養皿に塗布し、その上で7日間の付着培養を行なった。分化誘導後の細胞群を血管平滑筋特異的蛋白である α SMA および SMemb の免疫二重染色を行ない分化効率を評価した。また、RT-PCR法にて各種血管平滑筋遺伝子発現を検討した。テトラサイクリン反応性プロモーターを含む遺伝子発現調整可能なアデノウイルスベクターを作製し、Ad293細胞へ感染させることで複数遺伝子（血管平滑筋分化誘導関連遺伝子6種類とATGL欠損を補完する目的でのATGL遺伝子）を発現するアデノウイルスを作製した。また、ヒト皮膚線維芽細胞および血管平滑筋細胞への遺伝子導入を行い、遺伝子発現強度を real time PCR および Western blot 法で確認した。

(倫理面の配慮)

本研究は、琉球大学倫理委員会の認可を受けて行なった。

C. 研究結果

マウス ES 細胞において高率 (40-60%) に α SMA および SMemb を共に発現する血管平滑筋を作製し得る分化誘導法を確立した。

また、それらは MHC、Smoothelin、SM22 α などの血管平滑筋特異的 mRNA を発現している事を RT-PCR 法で確認した。

DYDDDK タグ付加した複数のテトラサイクリン遺伝子発現調整アデノウイルスを作製した。発現強度 (ドキシサイクリン 300ng/ml にて) が正常の血管平滑筋細胞での発現と比較し、約 40 倍以上高く増強し得ることが real time PCR で確認できた。また、Western blot 法でも同様・同程度に蛋白発現が増強できる事が確認された。

D. 考察

本研究にて開発された選択的分化誘導法は患者 iPS 細胞にも適応が可能なように予め設定しており、iPS 細胞での早急な検証ができるものである。供給元での iPS 細胞樹立に問題があり、その使用が遅れたものの、昨今、樹立完了の報告を受けたため、早急に検証したいと考えている。また、アデノウイルスは感染高率が非常によく、非分裂細胞への感染も高度であるために、皮膚線維芽細胞もしくは血液細胞を用いて直接血管平滑筋へ分化誘導する方法としては非常に適していると考えられる。複数ウイルスの同時感染も可能であり、現在そのダイレクトリプログラミングによる分化誘導効果を評価している。

E. 結論

幹細胞から高率に血管平滑筋細胞を分化誘導し得る方法が確立された。また、ダイレクトリプログラミング法の基盤となる遺伝子発現調整アデノウイルスが作製され、その効果・結果が期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

“Establishment of the Induction of Vascular Smooth Muscle Cells from the Patient-specific iPS Cells and the Fibroblasts” Chiba S, Hirano K, Kato S, The 1st international symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease, 2011 Nov. 26th, Kyoto

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

TGCV患者を血球計数装置で検出する方法及び中鎖脂肪酸食の血中脂肪酸分画に及ぼす影響の研究

研究分担者 千葉 仁志 北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究要旨

末梢血の多核白血球の空胞化（Jordan's' 奇形）を血球計数装置で検出できるかについて検討し良好な結果を得た。また、血清中の脂肪酸分画測定を行い、中鎖脂肪酸食の効果を確認した。

A. 研究目的

平成 22 年度において、Jordan's anomaly を血球計数装置で検出するための方法として、シスメックス社製 XE-5000 血球計数装置のパラメータである BASO-WX と BASO-WY が TGCV 患者のスクリーニングに有用である可能性を見出した。平成 23 年度はその可能性の検証を行った。また、中鎖脂肪酸が血中の各脂質分画の脂肪酸組成に与える影響を検討した。

B. 研究方法

シスメックス社製 XE-5000 血球計数装置を用いて、各チャンネルで得られる血球スキャタグラムを観察した。対象は、大阪大学医学部附属病院の TGCV 患者 2 例と脇野沢地区の住民健診検体 53 例とした。脂質分画については、血清総脂質を固相法によりコレステリルエステル、トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質の 4 分画に分け、それぞれに加水分解、メチル化、ガスクロマトグラフィーの操作を行い、脂肪酸組成を決定した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学大学院医学研究科と北海道大学大学院保健科学院の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

大阪大学の 2 例については、BASO-WX、BASO-WY は共に健常コントロールよりも高値であった。脇野沢地区健診検体では、大半は健常者と推測されるが、そこから得られる

BASO-WX、BASO-WY の正規分布曲線よりも、外に大阪大学の患者検体が分布することを確認し、更に、健診検体のなかに 1 例の BASO-WY 異常高値例を検出した。

WBC/BASO スキャタグラム上に、脂肪滴を含む好中球が出現している可能性が示された。BASO-WX と BASO-WY の増大が観察された。また、FRC%高値もスクリーニング検査のためのパラメータとして有望であることが確認された。

脂肪酸分画測定では、中鎖脂肪酸食実施中の患者 1 例では、健常者 7 例と比較して、総脂質、コレステリルエステル、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸の長鎖脂肪酸の重量%が減少し、特に 18:1、18:2 の脂肪酸で減少が顕著であり、また、脂質分画のなかでは FFA が長鎖脂肪酸の重量%減少が顕著であった。

3. エステル型脂質の変化は穏やかである

D. 考察

TGCV 患者のホモ接合体検出に関しては BASO-WX、BASO-WY は特異性に優れたパラメータであると考えられる。また、脂肪酸分画測定では、遊離脂肪酸分画の 18:1、18:2 の重量%の減少が中鎖脂肪酸食の効果や接触状況を判断するのに優れたパラメータであると判断された。エステル脂質の長鎖脂肪酸の減少はおそらく、中鎖脂肪酸が長鎖脂肪酸に替わってエステル化されている可能性が示唆された。

E. 結論

血球計数装置のスキヤタグラムを観察することにより、TGCV患者（ホモ接合体）をスクリーニングできる。脂肪酸分画測定は中鎖脂肪酸食の効果判定に有意義である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症の分子遺伝学的解析

研究分担者 戸田 達史 神戸大学神経内科・分子脳科学 教授

研究要旨

本年度は、脇野沢心臓検診にて受信された住民について、adipose triglyceride lipase (ATGL)遺伝子の既知の変異であるc.475_478dupCTCC (p.Gln160ProfsX19)の検索を行った。53検体のうち、9検体はヘテロ接合、1検体はホモ接合として、合計10例にこの変異を認めた。

A. 研究目的

脇野沢53検体についての、ATGL遺伝子変異の検索

B. 研究方法

脇野沢心臓検診にて受信された住民53検体について、ATGL遺伝子のc.475_478dupCTCC (p.Gln160ProfsX19)変異を、昨年度に確立したPCR直接塩基配列決定法の条件を用いて、検索を行った。
(倫理面への配慮)

本研究は、神戸大学倫理委員会にて承認を得ている遺伝子解析研究である。

C. 研究結果

53検体のうち、9検体でヘテロ接合、1検体でホモ接合として、合計10例でこの変異を認めた。

D. 考察

この合計10例は、ATGL欠損症であると確定診断された。

E. 結論

脇野沢心臓検診にて受信された住民53検体のうち、ATGL遺伝子のc.475_478dupCTCC (p.Gln160ProfsX19)変異が10例で認め、ATGL欠損症であると確定診断された。内1例がホモ接合であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた

中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー
原 康洋 独立行政法人医薬基盤研究所 特任研究員
川崎直子 独立行政法人医薬基盤研究所 技術補助員

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は心筋、冠状動脈に中性脂肪が蓄積することにより重症心不全、不整脈、虚血性心疾患をおこす難病である。TGCVの原因として、これまでにAdipose triglyceride lipase(ATGL)の変異が判明しているが、発病のメカニズムには未だ不明な点が多い。本疾患の病態を理解し治療するためには、発病にいたる根本的な要因となるタンパク質の変化を捕えバイオマーカーを確立することが必須である。今回、TGCVのバイオマーカーとなるタンパク質を見つける目的でTGCV患者から樹立した細胞株を用いたプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を行った。同定されたタンパク質の中からバイオフィオマティクスを駆使しバイオマーカーとして有用なタンパク質の絞り込みを行い、候補として着目したフィラグリンの検証を行った。さらにTGCVモデル動物であるATGL KOマウスの心筋を用いたプロテオーム解析を行い、複数のバイオマーカー候補となるタンパク質を同定した。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy: TGCV)は心筋、冠状動脈に中性脂肪が蓄積する結果、重症心不全、不整脈をおこす難病である。これまでにTGCVの原因として細胞内中性脂肪分解酵素 Adipose triglyceride lipase(ATGL)の機能欠損が明らかになっているが、発症メカニズムには未だ不明点が多い。今後、TGCVの全貌を明らかにしていくために診断法の確立が待たれている。

TGCVの診断法の確立には患者細胞で変化

しているタンパク質、遺伝子の発見が不可欠である。そこで本研究ではTGCVの診断薬、治療薬の開発のために有用なバイオマーカータンパク質の探索およびその検証を目的にTGCV患者由来皮膚線維芽細胞株を用いたプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析によるバイオマーカータンパク質の探索を行った。

次いで本疾患において最も重篤な症状となる心臓に着目し、モデル動物であるATGL KOマウスの心筋で発現が変化しているタンパク質のプロテオーム解析を試みた。

B. 研究方法

1. TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いたプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析によるバイオマーカー候補タンパク質の探索

(1) TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いた SILAC 法によるプロテオーム解析

プロテオーム解析には安定同位体標識したアミノ酸存在下で培養することにより細胞の全タンパク質を代謝標識する SILAC 法を用いた。2 種類の TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株(以下、TGCV 患者細胞株と表記) LC1,LC2 はそれぞれ Medium (Arg+6,Lys+4), Heavy (Arg+10, Lys+8)で標識し、3 種類の健常人由来皮膚線維芽細胞株(以下、健常人細胞株と表記) MSA40,YT41,NF48 は Light (Arg0,Lys0)で標識した。これらの細胞を RIPA バッファーで可溶化し、超遠心で残渣を除いて標識タンパク質抽出液とした。3 種の健常人細胞株から得られたタンパク質抽出液は pool して用いた。これら標識タンパク質サンプルを等量混合した後、SDS-PAGE によって分画し、ゲル内消化法を用いて解析用ペプチドサンプルを調製した。ペプチドサンプルの同定、定量は nanoLC-MS/MS で測定することによって行った。

(2) TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いたマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

TGCV 患者細胞株 LC1,LC2 および健常人細胞株 MSA40, YT41 から total RNA を

精製し、アレイ解析用サンプルとした。2 種の健常人細胞株から精製した total RNA は pool してサンプルとした。アレイによる発現解析はアフィメトリックス社の Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 array により行った。

2. TGCV のバイオマーカー候補タンパク質 フィラグリンの検証

TGCV 患者細胞株で増大していたタンパク質であるフィラグリンに着目し、以下のように発現解析を行った。

フィラグリンの発現検証は TGCV 患者細胞株および健常人細胞株から total RNA を調製し、リアルタイム RT-PCR によって比較することにより行った。

次いでフィラグリンの発現が PPAR γ に調節されている可能性を調べるため、フィラグリン・プロモーターの転写開始点から約 5kb 上流までのゲノム DNA を PCR によって取得し、種々の長さを持ったルシフェラーゼ・リポーターを作製した。それらリポーターを用いて HEK293T 細胞で PPAR γ ,RXR γ の共発現下でのルシフェラーゼ・アッセイを行った。

また、PPAR γ の作動薬である Rosiglitazone の添加による HEK293T 細胞を用いたフィラグリン・プロモーターのルシフェラーゼ・アッセイ、および健常人細胞株を用いたリアルタイム RT-PCR による Rosiglitazone に対するフィラグリン発現応答の解析を行った。

さらに TGCV 患者細胞株と健常人細胞株の total RNA を用い、PPAR γ , RXR γ の発現をリアルタイム RT-PCR によって調べた。