

201231167A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する
中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発
平成 24 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 平野賢一

平成 25 年 (2013 年) 3 月

目 次

I.	平成 24 年度研究班名簿	1
II.	総括研究報告	
	中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発	
	平野 賢一	3
III.	分担研究報告	
1.	高木 敦子	9
	COS1 細胞で発現させた組換えヒト His6-ATGL 蛋白の性格付に基づいた、 脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (Adipose triglyceride lipase: ATGL) 活性測定系の開発	
2.	植田 初江	11
	腎動脈における中性脂肪蓄積型動脈硬化に関する検討	
3.	土井 健史	12
	マウスに対する経口カプリン酸投与試験について	
4.	瀬川 波子	14
	トリカプリン経口投与後の体内動態把握のための試料作成	
5.	恵 淑萍	16
	Orbitrap LC/MS によるカプリン酸含有トリグリセリド検出法の開発	
6.	加藤 良仁	19
	カプリン酸 TG のイヌを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験	
7.	財満 信宏	21
	中鎖脂肪酸投与による代謝変動の可視化	
8.	裏出 良博	23
	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	
9.	間賀田 泰寛	25
	放射性標識脂肪酸誘導体を用いる薬効評価に関する研究	
10.	橋本 守	29
	非線形ラマン散乱顕微鏡による細胞内脂質の検出に関する研究	

1 1. 千葉 俊明	31
TGCV 患者 iPS 細胞を用いた擬人化マウスモデルの作製とモデルによる 評価系の確立	
1 2. 谷本 昭英	33
マイクロミニブタを用いた糖尿病性 TGCV モデルの開発	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	35

〔 I 〕

平成 24 年度研究班名簿

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発班（重点研究分野）

区 分	氏 名	所 属 等	
研 究 代 表 者	平野 賢一	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	助教
研 究 分 担 者	植田 初江	独立行政法人国立循環器病研究センター病理部	部長
	裏出 良博	大阪バイオサイエンス研究所第2研究部分子行動生物学部門	研究部長
	惠 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院	准教授
	間賀田 泰寛	浜松医科大学メディカルフォトンクス研究センター	教授
	橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科	准教授
	千葉 俊明	琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学	准教授
	瀬川 波子	福岡大学医学部	准教授
	財満 信宏	近畿大学農学部応用生命化学科	講師
	高木 敦子	国立循環器病研究センター 分子薬理部	室長
	谷本 昭英	鹿児島大学医学部 分子細胞病理学	教授
	土井 健史	大阪大学大学院薬学研究科	教授
	加藤 良仁	興和株式会社 製品戦略部	課長
研 究 協 力 者	青山 敏明	日清オイリオグループ株式会社	執行役員
	池田 善彦	独立行政法人国立循環器病研究センター病理部	医長
	千葉 仁志	北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学講座	教授
	塚本 幸資	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
	鈴木 朗	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
	長坂 博範	宝塚市立病院 小児科	部長
	山口 知是	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
事 務 局	野村 千秋	大阪大学バイオ関連多目的研究施設 平野研究室 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-3 T E L 06-6872-8215 F A X 06-6872-8219 e-mail office@cnt-osaka.com	秘書
経 理 事 務 担 当 者	川上 政博	大阪大学大学院医学系研究科 研究支援室研究連携係 T E L 06-6879-3075 F A X 06-6879-3070 e-mail i-kenkyurenkei@office.osaka-u.ac.jp	係長

〔Ⅱ〕

総括研究報告

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発

研究代表者 平野 賢一 大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学 助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, 以下TGCV) は、申請者らが我が国の心臓移植症例より見出した新規疾患概念である。原発性TGCVは細胞内中性脂肪分解の必須酵素であるAdipose triglyceride lipase (以下ATGL) の遺伝的な欠損により、心筋及び冠状動脈に中性脂肪が蓄積するため、重症心不全、不整脈、虚血性心疾患が引き起こされる予後不良の疾患である (Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008)。本研究の目的は希少疾患であるTGCVに対してカプリン酸の有用性を検討し、それを主成分とする医薬品を開発することである。

平成24年度の厚生労働省 難治性疾患等克服研究事業では、TGCVのより簡便な診断法を開発していくとともに、医薬品としてカプリン酸製剤を開発するために、カプリン酸の安全性評価を行うとともに、よりbioavailabilityの高い投与形態についても検討を行った。また、投与されたカプリン酸の体内動態を評価するための評価方法の開発も開始した。

研究分担者氏名・所属機関及び所属機関における職名

植田 初江	独立行政法人国立循環器病研究センター病理部 部長
裏出 良博	大阪バイオサイエンス研究所第2研究部分子行動生物学部門 研究部長
恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院 准教授
間賀田 泰寛	浜松医科大学メディカルフォトリクス研究センター 教授
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授
千葉 俊明	琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学 准教授
瀬川 波子	福岡大学医学部 准教授
財満 信宏	近畿大学農学部応用生命科学科 講師
高木 敦子	国立循環器病研究センター 分子薬理部 室長
谷本 昭英	鹿児島大学医学部 分子細胞病理学 教授
土井 健史	大阪大学大学院薬学研究科 教授
加藤 良仁	興和株式会社 製品戦略部 課長

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV) は、心筋及び冠状動脈に中性脂肪が蓄積する結果、青

年～壮年層において重症心不全、不整脈、冠動脈硬化症を来す予後の極めて悪い疾患である。

原発性 TGCV の原因として、細胞内 TG 分解の必須酵素である ATGL の遺伝的欠損が知られているが、その病態形成には心筋細胞内 TG 含量の増加

が関与しているものと考えられている。本研究の目的は、強力な細胞内 TG 含量低下作用を有するカプリン酸を主成分とする医薬品を開発することである。

B. 研究方法

1) TGCV 診断法の開発

i) 血液などのサンプルを用いた ATGL のリパーゼ活性を検出する測定系の開発を行った。(高木)

ii) 糖尿病例に発症する続発性 TGCV の病理学的診断が可能かどうかを検討するため、冠動脈以外の筋型動脈である腎動脈を使用し、動脈硬化巣への中性脂肪の蓄積の有無を検討した。剖検により得られたホルマリン固定標本にて病理学的に検討を行った。(植田)

2) カプリン酸投与方法の検討

i) 有効成分であるカプリン酸の投与方法について検討するため、さまざまな濃度のカプリン酸を含む飼料を用い、カプリン酸添加の摂食に対する影響を検討した。(土井、平野)

ii) 有効成分であるカプリン酸のプロドラッグと考えられるトリカプリンをマウスに経口投与し、小腸灌流法を行い、えられた門脈およびリンパ管灌流液内でのカプリン酸含有 TG を測定することにより、実際にカプリン酸が体循環に入り、全身に供給される可能性があるかどうかを検討した。(瀬川、恵、平野)

3) トリカプリンの安全性の確立

i) ビーグル犬にトリカプリン 150 および 1500mg/kg を 7 日間反復投与実験し、その毒性を検討した。(加藤)

ii) 質量顕微鏡を用いて、カプリン酸投与の生体内脂質代謝に与える影響を検討するため、カ

プリン酸含有食で飼育されたマウスより得られた肝臓組織を質量顕微鏡で観察し、カプリン酸投与の肝臓中性脂肪組成、肝臓リン脂質組成に対する影響の有無を観察した。(財満)

4) カプリン酸の薬物動態に関する検討

i) ラジオアイソトープを用いた脂肪酸のイメージング技術を確立するため、長鎖脂肪酸のトレーサーである [^{123}I] BMIPP を用いて、マウス心のイメージングが可能であるかを検討した。さらに ATGL 欠損マウスを用いて、ATGL 欠損および中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) 投与の [^{123}I] BMIPP によるイメージングに与える変化を観察した。(裏出、平野)

ii) カプリン酸を C-11 でラベルすることにより、カプリン酸のトレーサーである C-11-カプリン酸を作成し、その体内動態を検討した。(間賀田)

iii) 核磁気共鳴及び液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、標準物質を作成し、Orbitrap 質量分析計を用いて、細胞内、組織内、血清中のカプリン酸及びその代謝物のモニタリング系 (定性 LC/MS 法) を構築した。(恵)

iv) 非線形ラマン散乱顕微鏡を用いて、重水素ラベルしたステアリン酸およびカプリン酸を細胞内で観察可能か検討した。(橋本)

5) 続発性 TGCV モデル動物の確立

ヒトと脂肪酸代謝の異なるげっ歯類よりもよりヒトに近い TGCV のモデルを確立するため、以下の2つの研究を行った。

i) ATGL 欠損症患者由来 iPS 細胞および正常 iPS 細胞を NOD/SCID マウスに移植し、奇形腫を形成させ、奇形腫内で ATGL 欠損症例に見られるような TG の心筋・平滑筋への蓄積が再現されているかを検討した。(千葉、平野)

ii) ストレプトゾトシン投与によりマイクロミニブタを糖尿病化することで、糖尿病モデルブタが作成できるかを検討した。(谷本)

6) 原発性 TGCV 国際登録システムの構築

希少難病である原発性 TGCV では、国際臨床試験を視野に入れている。神戸臨床研究情報センターに委託して、登録システムを構築する。

(倫理面への配慮)

本研究に参与するすべてのもの者は、「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2008年ソウル修正版)及び「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日改訂版)に従う。

C. 研究結果

1) TGCV の診断法の開発

i) ATGL リパーゼ活性測定系の開発

³H-トリオレインを含むトリオレイン/リン脂質粒子を基質として、COS1細胞に過剰発現させたヒト His6-ATGL 蛋白活性を検出することができた。

ii) 糖尿病例に発症する続発性 TGCV の病理学的検討

糖尿病患者由来腎動脈内膜において、脂質含有空砲を有し、ズダン B 陽性かつ α -SMA 陽性を示す平滑筋由来の泡沫細胞の優位な浸潤を認めた。

2) カプリン酸投与方法の検討

i) カプリン酸4%含有食では摂食の減少を認めた。

ii) トリカプリン投与マウスの小腸リンパ管灌流液内にトリカプリンおよびカプリン酸と長鎖脂肪酸のキメラ TG を検出することができた。

3) トリカプリンの安全性の確立

i) ビーグル犬へのトリカプリン150および1500mg/kg を7日間反復投与実験では、一般状態、血液学的検査・生化学検査、剖検で異常は認められなかった。

ii) マウス肝臓組織の質量顕微鏡による分析では、食餌へのカプリン酸含有の有無による肝臓中性脂肪組成、肝臓リン脂質組成の差を認めなかった。

4) カプリン酸の薬物動態に関する検討

i) 実験動物用 PET/SPECT/CT 装置を用いてマウスでの [¹²³I] BMIPP 画像診断が可能であった。ATGL 欠損マウスでは、心筋への [¹²³I] BMIPP 集積の増加を認めた。MCT 含有食の摂取により ATGL 欠損マウスでは、心筋への [¹²³I] BMIPP 集積の増加は抑制された。

ii) カプリン酸の α 位を C-11で標識し、その体内での動態をみることに成功した。

iii) LC/MS 法によるトリカプリンおよびカプリン酸含有 TG の検出系を開発した。小腸灌流法により得られたリンパ管・門脈灌流液などのサンプルで、トリカプリンおよびカプリン酸含有 TG を検出することが出来た。

iv) 非線形ラマン散乱顕微鏡では、ATGL 欠損症患者由来皮膚線維芽細胞中の重水素化ステアリン酸の CD₂伸縮振動を観察できたが、重水素化カプリン酸の CD₂伸縮振動は観察できなかった。

5) 続発性 TGCV モデル動物の確立

i) ATGL 欠損症患者由来 iPS 細胞により形成された奇形腫内の平滑筋細胞に中性脂肪蓄積を認め、ヒト ATGL 欠損症の病態が奇形腫内で再現されていると考えられた。

ii) ストレプトゾトシン投与によりマイクロミ

ニブタを糖尿病化するに成功した。

6) 原発性 TGCV 国際登録システムの構築

原発性 TGCV の国際的なレジストリー作成のため、海外の研究者との連絡を開始した。

D. 考察

1) TGCV の診断法の開発

i) ATGL リパーゼ活性測定系の開発

COS1細胞を用いた過剰発現系により発現させた ATGL 蛋白のリパーゼ活性を測定することに成功した。本研究の最終的な目標は、骨格筋生検・心筋生検などの侵襲的検査法やゲノム DNA シーケンシングなどに代わって、より非侵襲的に、より簡易に TGCV の確定診断する方法の開発にある。(原発性 TGCV 症例において Jordans' 奇形の見られる) 多核白血球などを検体として、ATGL のリパーゼ活性を評価できるアッセイ系の開発が可能かどうか検討を行っていく予定である。

ii) TGCV 症例の動脈硬化病変の病理学的検討
続発性 TGCV 症例の腎動脈においても、冠動脈に見られるのと病理学的に類似の平滑筋への中性脂肪の蓄積が認められた。続発性 TGCV において、心臓のみならず、腎臓にも病変を生じうることを示すことができた。

2) カプリン酸投与方法の検討

i) カプリン酸を多く含有する食餌では、摂食の減少を認めたので、カプリン酸そのものを経口で投与するのでは、投与量に制限があり、治療に十分な量を投与出来ないのではないかと考えた。生体への投与を行うには、カプリン酸そのものではなく、トリカプリンの形で投与する、製剤をカプセル化するなどの工夫が必要と考えられた。

ii) 経口投与されたトリカプリンの大部分が口腔内・胃で加水分解され、カプリン酸の形で小腸から門脈に入り、肝臓で β 酸化により消費されることが知られている。今回の研究で、我々は経口投与されたトリカプリンの一部は、トリカプリンおよびカプリン酸含有キメラ TG の形で小腸リンパ管に入っていることを示すことが出来た。小腸リンパ管に入ったトリカプリンおよびカプリン酸含有キメラ TG はリンパ系を介して体循環に入っていきものと想定され、経口投与されたトリカプリンが全身的な効果をもたらさう可能性が示唆された。経口投与されたトリカプリンの一部が、トリカプリンおよびカプリン酸含有キメラ TG の形で小腸リンパ管に入る経路としては、口腔内・胃での加水分解をまぬがれ、トリカプリンの形で吸収され、小腸リンパ管に入ったものと考えている。口腔内・胃での加水分解を免れる工夫として、腸溶性カプセルを利用するなどの方法を用いることによって、さらに小腸リンパ管に吸収される、トリカプリンおよびカプリン酸含有キメラ TG の量が増加し、より bioavailability の高い製剤を開発できるのではないかと考えている。

3) トリカプリンの安全性の確立

i) 今回の検討の結果から、ビーグル犬でのトリカプリンの毒性域は1500mg/kg の7日間反復投与よりは高いものと考えられた。

ii) マウス肝臓組織の質量顕微鏡による分析では、カプリン酸含有食によりマウス肝臓での中性脂肪・リン脂質代謝への影響は認められず、カプリン酸投与による肝臓脂質代謝への影響は、今回の実験の範囲内では、ないものと考えられた。

4) カプリン酸の薬物動態に関する検討

i) ii) 今回の検討により、ラジオアイソトープ標識カプリン酸を用いて、カプリン酸のマウス心筋への取り込みを評価できる可能性を示すことが出来た。今後、標識方法の改善の可否などを検討し、実際にマウスでのカプリン酸の動態のより詳細な把握が可能となるシステムを構築していく予定である。

iii) カプリン酸の定性検出系を構築できたので、今後、カプリン酸、トリカプリン、カプリン酸含有 TG などの定量的測定法を開発し、カプリン酸の薬物動態検査に利用していく予定である。

5) 続発性 TGCV モデル動物の確立

ATGL 欠損マウスなどのげっ歯類では、脂質代謝がヒトと大きく異なっているため、続発性 TGCV のモデル動物の確立が必要と考えられる。我々が検討を開始した、iPS 細胞由来奇形腫・マイクロミニブタの実験系について、さらに検討を進めていく予定である。

6) 原発性 TGCV 国際登録システムの構築

原発性 TGCV は、国内だけでは症例数に限りがあるため、国際的な臨床治験を視野に入れている。国際的なレジストリー作成のため、国内外の研究者を招致した国際会議を開催し、レジストリーの項目の選定を行っていく予定である。国際レジストリーに関しては、臨床研究情報センター（神戸）に委託して、登録システムを構築する予定である。

E. 結論

原発性・続発性 TGCV に対する診断法、治療法を開発し、カプリン酸製剤の臨床応用に向けた安全性・投与方法に関する検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表 平野賢一 中性脂肪蓄積心筋血管症 先端医療シリーズ4 3 循環器疾患の最新医療（永井良三ら 編集）114-7, 2012.

平野賢一、鈴木 朗 ATGL 欠損症 先天代謝ハンドブック（遠藤文夫編集） 394-5, 2012.

平野賢一、鈴木 朗 中性脂肪蓄積心筋血管症 医学のあゆみ 242; 937-41, 2012.

平野賢一 中性脂肪蓄積心筋血管症 循環器内科 71; 576-8, 2012.

平野賢一 長坂博範 脂質異常症と脂質蓄積症 Surgical Frontier 19; 23-8, 2012.

Nakamura K, Hirano K, Wu SM. iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases. *J Cardiovasc Trans Res.* 6; 46-53, 2013.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

〔Ⅲ〕

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

COS1 細胞で発現させた組換えヒト His6-ATGL 蛋白の性格付に基づいた、脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (Adipose triglyceride lipase: ATGL) 活性測定系の開発

研究分担者 高木敦子

独立行政法人 国立循環器病研究センター 研究所 分子薬理部 室長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV) の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL 活性測定系を開発することを目的とする。まず ATGL 活性測定条件を検討するため、アフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である COS1 において発現された組換えヒト His6-ATGL 蛋白の生化学的性格付を行った。この ATGL 至適 pH は pH7 から pH 8.5 であり、ATGL 活性測定条件を決定することができた。決定された条件を用いて、ATGL 測定系開発に向けての臨床検体決定のための検討が可能となった。

A. 研究目的

ATGL 活性測定系を開発し、臨床検体に応用することで、TGCV の早期発見、早期治療を可能とすることを最終目的とする。この目的のため、まず、ATGL 活性測定条件を検討するため、組換えヒト ATGL 蛋白の生化学的性格付を行い、測定条件を確立することを、平成 24 年度の目的とする。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA はヒト白血球から得て、His6 tag を N 末端にもつ pcDNA4/HisMax C ベクター (Invitrogen 社) にクローン化されたものを、小林邦久先生 (福岡大学 筑紫病院 内分泌・糖尿病内科 教授) から譲渡いただいた。

プラスミドはアフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である COS1 にエレクトロポレーション法で導入され、細胞は 2 日間培養された。細胞画分は界面活性剤 Brij 35 で可溶化された。His6-ATGL の部分精製は HisTrap カラムクロマト法にて行った。

リパーゼ活性は ^3H -トリオレインを含むトリオレイン/リン脂質粒子を基質として、ウシ血清アルブミン存在下で測定された。

(倫理面の配慮)

本研究は、一般化した株化動物細胞を利用するものであるため、倫理面の問題は無いと判断した。動物を使用した実験は行っていない。組換え DNA 及び放射性同位体使用の実験の許可は得ている。

C. 研究結果

COS1 に導入された ATGL cDNA のリパーゼ活性は、細胞培養培地中にはなく、COS1 細胞溶解液中に認められた。

この細胞溶解液を粗酵素として、リパーゼ活性を測定したところ、プラスミド導入前から COS1 に存在する pH4.5 を至適 pH とする酸性リパーゼ以外に、pH7 から pH 8.5 を至適 pH とするリパーゼ活性が ATGL cDNA 導入細胞にのみ検出され、His6-ATGL による活性と考えられた。HisTrap カラムでの His6-ATGL 部分精製により、酸性リパーゼを除去でき、至適 pH を測定したところ、pH7 から pH 8.5 を至適 pH とするリパーゼ活性が得られた。

COS1 で発現された組換え His6-ATGL 蛋白を使用して、ATGL 活性測定条件を決定することができた。

D. 考察

今後、臨床検体を測定していくうえで、つねに、上記反応条件で測定されたリパーゼ活性が真に ATGL に由来するものであることを確認するためには、ATGL 抗体の存在下と非存在下での活性を比較する必要がある。HisTrap カラムでの His6-ATGL 精製では、酸性リパーゼを除去することができたが、部分精製標品であるので、抗原として、活性の保持された純化 ATGL 蛋白を得るために更なる精製が必要である。

E. 結論

COS1 で発現された組換え His6-ATGL 蛋白を使用して、ATGL 活性測定条件を決定することができた。

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

The biochemical characterization of human adipose triglyceride lipase (ATGL) and development of its specific measurement system: a property of his6-ATGL expressed in COS1 cells.
Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kuniyoshi Kobayashi, Ken-ichi Hirano
The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit
Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease
(Osaka, JAPAN : 2013. 4. 19-20)

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

腎動脈における中性脂肪蓄積型動脈硬化に関する検討

研究分担者 植田 初江 国立循環器病研究センター 病理部 部長

研究要旨

2型糖尿病を伴う中性脂肪(TG)蓄積型冠動脈病変では、中膜の肥厚に加え内膜において泡沫化した脂質含有空胞を有する平滑筋細胞の増生を認める。冠動脈以外の筋型動脈として腎動脈における中性脂肪蓄積の有無について生化学的ならびに病理組織学的な検討を行った結果、腎動脈の内膜においてもTGを蓄積する平滑筋細胞の増生を認めた。

A. 研究目的

糖尿病性腎症を合併する2型糖尿病を伴う中性脂肪(TG)蓄積型冠動脈病変では、中膜の肥厚に加えて、内膜において泡沫化した脂質含有空胞を有する平滑筋細胞の増生が認められる。今回、冠動脈以外の筋型動脈として、腎動脈における中性脂肪蓄積の有無について検討を行った。

B. 研究方法

冠動脈疾患を伴い糖尿病性腎症を合併する2型糖尿病(diabetes mellitus with coronary artery disease;DM-CAD)4例と冠動脈疾患を伴わない非2型糖尿病(nonDM-nonCAD)3例について、10%中性緩衝ホルマリンにて固定された剖検組織から腎動脈を採取し、それらのパラフィン切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ワンギーソン染色、オイルレッドO染色とともに、 α -smooth muscle actin(α -SMA)、CD68に対する免疫染色とズダンBとの二重染色を施行するとともに、生化学的手法を用いて脂質の定量評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は病理組織学的及び生化学的解析であり、遺伝子解析は施行していない。摘出心については研究実施前に実施計画に関して大阪大学の倫理委員会から文書による承認を得ている。また、剖検症例についての研究協力の同意は、遺族の自由意思で決めていただいた、臓器の一部の医学研究目的使用について承諾され、すでに署名をいただいている剖検承諾書をもって同意とすることについて当センター倫理委員会から文書による承認を得ている。

C. 研究結果

4例とも腎動脈は求心性肥厚を呈し、内膜には脂質含有空胞を有しズダンB陽性 α -SMA陽性を示す平滑筋細胞由来の泡沫細胞が優位に浸潤していた。また、血管のTG含有量では有意差はないものの、DM-CAD群がnonDM-nonCAD群と比較して高い傾向を示した(DM-CAD v. s. nonDM-nonCAD; 15.8 ± 3.2 vs. 9.5 ± 5.1 mg/g of tissue, $p=0.09715$)。

D. 考察

糖尿病性腎症を合併する2型糖尿病例の冠動脈内膜病変においては、TGを含有する平滑筋細胞由来泡沫細胞の浸潤、増生が認められるが、この病態は冠動脈以外の筋型動脈として検索した腎動脈においても認められたことから、2型糖尿病における血管のTG含有量の高値は平滑筋細胞内におけるTG代謝障害の結果生じる可能性が示唆された。

E. 結論

糖尿病性腎症を合併する2型糖尿病においては、冠動脈以外の動脈においても中性脂肪蓄積型動脈硬化を呈していた。

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

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

マウスに対する経口カプリン酸投与試験について

研究分担者 土井健史 大阪大学大学院薬学研究科 生命情報解析学分野 教授

研究要旨

マウスにカプリン酸を経口投与し、その薬効評価を行うにあたり、カプリン酸添加マウス飼料の作成と、飼料中カプリン酸濃度の検討、短期間投与における毒性についての予備実験を実施した。カプリン酸濃度2%飼料では、マウスの摂餌量、体重増加に問題はなかったが、カプリン酸濃度4%、8%飼料では、マウスの摂餌量が低下し、飼料として経口で投与するには不適であった。いずれの濃度においても、肝臓に病理学変化を認めず、毒性は現れなかった。

A. 研究の目的

我々は中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyopathy, TGCV)に対するカプリン酸を用いた食餌療法の効果について、マウスを用いて検証するため、カプリン酸添加飼料の作成方法の検討、カプリン酸添加飼料をマウスが経口摂取できるかの確認、短期投与でのマウスへの毒性の有無、についての予備的検討を行った。

B. 研究方法

1) カプリン酸添加飼料の作成

マウス飼料に、カプリン酸を添加し、飼料を作成する方法を検討した。

粉末マウス飼料(CRF-1)に50℃程度の湯煎で融解したカプリン酸を添加し、乳鉢でよく混和して作成した。カプリン酸濃度を0%、2%、4%、8%(重量%)に設定した。

2) 経口摂取できるかの確認

上記で作成した各濃度のカプリン酸添加飼料を、マウスが経口で摂餌可能かどうかを検討した。C57BL/6Jマウス、8週齢、8匹を4群に分け(各群2匹)、4日間の馴化期間の後、各濃度のカプリン酸添加飼料を7日間、自由摂食にて給餌した。給餌量と残余飼料の量を測定し、摂餌量を評価した。体重の変化も計測した。

3) 短期投与でのマウスへの毒性

カプリン酸を7日間経口摂取したマウスに、毒性が出現しないかどうかを検討した。摂餌期間中の体重測定を行った。期間終了時に剖検し、各臓器に異常がないかをマクロで観察した。肝臓についてはホルマリン固定、パラフィン包埋の後、HE染色標本を作成し、病理学的変化の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

動物実験は大阪大学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

1) カプリン酸添加飼料の作成

マウス飼料にカプリン酸を添加する際、均一に混和できかどうかを危惧していたが、湯煎で液状に融解したカプリン酸を粉末飼料に添加し、乳鉢でよく混和することで、困難なく均一にカプリン酸添加飼料を作成することが可能であった。

2) 経口摂取できるかの確認

カプリン酸8%飼料で飼育したマウスは、給餌開始直後から1日あたりの摂餌量が急激に落ち込み、それに伴って体重も低下した。試験期間

中（7日間）に摂餌量が回復することなく、体重も低下したままであった。4%を給餌したマウスでは、給餌開始直後は摂餌量の低下が見られたが、その後回復し、体重の増加はコントロール群（0%）と同程度であった。2%給餌マウスでは、摂餌量の低下は起こらず、体重の増加も順調であった。

D. 考察

カプリン酸のマウス飼料添加においては、液状融解したカプリン酸を粉末飼料に添加し、よく混和することで、均一な飼料を容易に作成することができた。必要な量の固体カプリン酸を削って秤量するため、精密なカプリン酸濃度を設定してマウス飼料を作成することが可能であることが確認できた。

4%、8%カプリン酸添加飼料では、マウスの摂餌量が低下したが、これはカプリン酸の持つ特有の「刺激味」が原因であると推測される。4%飼料では慣れによる摂餌量の回復が見られたが、8%飼料では体重の減少が続いたことから、経口での投与は不適と思われる。したがって、マウスに十分な量のカプリン酸を経口で投与するためには、カプリン酸の「刺激味」を回避する必要があり、そのための手法として、カプリン酸とグリセロールからカプリン酸トリグリセリド（トリカプリン）を合成し、検討していきたいと考えている。

すべての濃度の被検マウスにおいて、マクロでの異常は起こらなかった。肝臓の組織学的検索においても、まったく異常は認められなかったことから、短期間（7日間）のカプリン酸経口摂取における毒性はなかったと考える。今後は長期的な毒性を検討していく必要がある。

E. 結論

マウスへのカプリン酸の経口投与において、飼料中のカプリン酸濃度4%以上は、マウスの摂餌に影響を及ぼし不適であった。短期間の摂取においては毒性を認めなかった。

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
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（難治性疾患等克服研究事業）

分担研究報告書

トリカプリン経口投与後の体内動態把握のための試料作成

研究分担者 瀬川 波子 福岡大学医学部 生化学 准教授

研究協力者 山口 知是 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

TGCVの治療薬として開発を進めているカプリン酸の前駆物質であるトリカプリンは、経口投与を行うと、胃でカプリン酸に分解され、小腸で吸収され、門脈を経て肝臓で代謝されるため、全身に到達しにくいと考えられているが、その体内での動態は明らかではない。今回、経口投与されたトリカプリンの体内動態を明らかにするため、マウスにトリカプリンを経口投与し、小腸灌流法を行い、リンパ管および門脈灌流液を採取し、得られた灌流液に対して定量的超遠心を行い、灌流液中の各蛋白分画を分離した。

A. 研究目的

TGCVの治療薬として検討しているトリカプリンの経口投与後の体内動態を把握のためのサンプルを作成すること。

B. 研究方法

野生型マウスにトリカプリン 200 μ L (189.8 μ g)、トリカプリン 100 μ L+サラダ油(長鎖脂肪酸) 100 μ L、サラダ油(長鎖脂肪酸) 200 μ Lをそれぞれ強制経口投与し、マウス小腸灌流法を用いて腸管リンパ管および門脈より灌流液を得た。また、同量のトリカプリンおよび/またはサラダ油を投与したマウス(別個体)から静脈血清を採取した。血清、腸管リンパ管及び門脈からの灌流液に対し、定量超遠心法を行った。

(倫理面の配慮)

大阪大学の審査委員会の承認をうけ、規定

に従い研究を実施した。

C. 研究結果

血清、腸管リンパ管および門脈からの灌流液より定量超遠心法を用いて、カイロミクロン(CM)、超低密度リポ蛋白(VLDL)、低密度リポ蛋白(LDL)、高密度リポ蛋白(HDL)などのリポ蛋白分画とリポ蛋白除去血清(LPDS)分画を分離し、回収した。

D. 考察

マウス小腸灌流法を用いて採取した腸管リンパ管および門脈灌流液のリポ蛋白分画の分析により、経口投与されたトリカプリンの体内動態の分析が可能になると考えられる。

E. 結論

血清、腸管リンパ管および門脈からの灌流

液より定量超遠心法を用いて、カイロミクロン (CM)、超低密度リポ蛋白 (VLDL)、低密度リポ蛋白 (LDL)、高密度リポ蛋白 (HDL) などのリポ蛋白分画とリポ蛋白除去血清 (LPDS) 分画を分離した。

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

分担研究報告書

Orbitrap LC/MS によるカプリン酸含有トリグリセリド検出法の開発

研究分担者 惠 淑萍 北海道大学大学院保健科学研究院 准教授

研究協力者 山口 知是 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

本研究班では中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)の治療法として中鎖脂肪酸であるカプリン酸の医薬品開発を行っている。カプリン酸の前駆物質であるトリカプリンは、経口投与を行うと、口腔内・胃でカプリン酸に分解され、小腸で吸収され、門脈を経て肝臓で代謝されるため、全身に到達しにくいと考えられている。したがって、投与したトリカプリンで全身的効果（心臓を含む）を得るためには、カプリン酸が肝臓で代謝されずに体循環に入る必要がある。肝臓での代謝を受けない経路としては、加水分解前のトリカプリンの状態で小腸に到達し、ミセルを形成して、リンパ系に入る経路が想定される。今回、我々は、マウスの門脈およびリンパ管灌流液中のトリカプリンおよびカプリン酸含有トリグリセリドの液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）による検出法を確立し、マウスにてトリカプリン経口投与後にカプリン酸含有トリグリセリドが、リンパ系に入りうることを示すことに成功した。

A. 研究目的

我々は中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）患者の治療法としてトリカプリン(TG10)の経口投与は有効であると証明してきたが、実際に経口投与された TG10 が体循環に入る経路については明らかになっていない。本研究の目的は、経口投与された TG10 が、小腸リンパ管を介して体循環に入りうるかどうかを検討することである。マウス小腸灌流法により得られた小腸リンパ管・門脈から灌流液中に TG10 およびカプリン酸含有トリグリセリド（以下キメラ TG）を検出するかどうかを検討するため、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）による TG10 およびキメラ TG の検出法を確立する

ことを目的とする。

B. 研究方法

トリカプリンを強制投与された野生型マウスリンパ管灌流液および門脈灌流液の定量超遠心法（張らによる報告書参照）により得られたリポ蛋白分画（カイロミクロン（CM）、超低密度リポ蛋白（VLDL）、低密度リポ蛋白（LDL）、高密度リポ蛋白（HDL）、リポたんぱく除去血清（LPDS））を測定試料として用いた。液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）を用いて、各リポ蛋白分画におけるトリグリセリドの分析を行った。