

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

メタボローム解析による ALD 等ペルオキシソーム病の発症前診断マーカーの探索

分担研究者：横山 和明（帝京大学薬学部教授）

研究要旨

LC-MS/MS 法を用いてペルオキシソーム病で増減のある血清中リン脂質の網羅的定量測定系の確立を試みた。三連四重極型質量分析計で定量測定に適するとされる MRM (multiple reaction monitoring) 条件を多段同時実施し、代表的な脂質クラスについて網羅的に定量することに成功した。血清脂質を用いたところ、実際に患者血清で極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質の増加が確認された。

研究協力者

下澤伸行（岐阜大学生命科学総合研究支援センター・ゲノム分野 教授）
今中常雄（富山大学大学院医学薬学研究部教授）

（倫理面への配慮）

各所属機関における倫理委員会の審査を受け、承認を受けたうえで実施した。

A. 研究目的

Zellweger 症候群 (ZS) や副腎白質ジストロフィー (ALD) などのペルオキシソーム病において、増加あるいは減少している脂質をメタボローム解析の手法によって定量的に測定し、その構造を決定する。これにより ALD 発症診断マーカーを見いだすことを目的とする。

B. 研究方法

ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析法は数種類のモードがあるが、親イオンを選択して解裂を行い、分子構造に伴う特異的フラグメントイオンを測定する MRM 法が最も感度がよい。通常は数種類の対象物質について測定するのが通例であるが、脂質分子種を網羅的に定量するため、一度の測定で装置の上限に近い 70-80 通りの定量条件を設定し検討した。

次にペルオキシソーム病患者の血清中の脂質を Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出し、この測定系に供した。

C. 研究結果

血清中のリン脂質としてはリポタンパク構成成分のホスファチジルコリンが主要成分とされる。これに加えて、一般の細胞の膜脂質として主要なホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンを今回の解析対象とした。血清脂質は微量であるが、検出可能であった。この中でホスファチジルコリンとスフィンゴミエリンについては極長鎖脂肪酸を含有すると思われる高分子量のピークのシグナル強度が高いことが確認された。さらに予備的測定により、高分子量ではない通常の脂肪酸から構成されるホスファチジルセリンが患者血清で高値である傾向が観察された。

D. 考察

多段同時 MRM 法がリン脂質分子種の網羅的定量に有効であることがわかった。さらに昨年度までの研究で用いていた皮膚繊維芽細胞よりはるかに微量な血清でも、測定可能であることがわかった。ホスファチジルセリンについてはさらに例数を増やして検討する必要がある。

ALD 発症診断マーカーを見いだすために、今後本法で患者血清を用いて検討を重ねていく必要がある。

E. 結論

多段同時 MRM 法がリン脂質分子種の網羅的定量に有効であること、微量な血清でも、測定可能であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotaro Hama, Toru Nagai, Chiho Nishizawa, Kazutaka Ikeda, Masashi Morita, Noriko Satoh, Hiroki Nakanishi, Tsuneo Imanaka, Nobuyuki Shimozawa, Ryo Taguchi, Keizo Inoue, **Kazuaki Yokoyama**. Lipids 48, 1253-1267 (2013)
Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome

2. 学会発表

- 1) 第 55 回日本先天性代謝異常学会、
Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome、
Kazuaki Yokoyama 他、日本先天性代謝異常学会誌、29, 193 (2013)

G. 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