

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究総合報告書

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

Zellweger 症候群患者由来繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸含有脂質の構造を解析したところ、従来の指標である C26:0 以外の多数の極長鎖脂肪酸の存在が確認された。極長鎖脂肪酸含有するホスファチジルコリンの構造を解析したところ、グリセロール 1 位に含まれるものが多かった。これら分子種は患者間で個体差を認めた。

次に臨床応用を念頭に置き、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網羅的定量測定系の確立することに成功した。

研究協力者氏名：

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）

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

ペルオキシソーム病患者の皮膚生検により得られた繊維芽細胞を、大量に培養し、回収して Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出した。これを ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析に供し、極長鎖脂肪酸を含む分子種の構造を明らかにした。

さらに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。

（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

C．研究結果

（平成 23 年度）ZS と ALD の検体を ESI-LC-MS 法で解析したところ、両者ともリン脂質画分で通常では検出されない大きな分子量で疎水性の高いスポットが多数検出された。特に ZS で著しく、ZS を優先して行うこととした。次に、各スポットの MS/MS 解析を行うことにより、リン脂質の分子種、すなわち極性部と脂肪酸の構成を調べたところ、ホスファチジルコリン(PC)には、臨床指標として通常用いられている C26:0 以外の、多様な極長鎖脂肪酸が含まれていることが明らかとなった。炭素数としては 32 個までのものが

あり、加えて二重結合 6 個までの高度不飽和のものも検出された。

(平成 24 年度)ホスファチジルコリン(PC)の MS/MS フラグメントイオン解析を行った。各ピークとも極長鎖脂肪酸のシグナルと通常の脂肪酸を 1 本ずつ含んでいた。さらにこの解析ではグリセロール 2 位の脂肪酸のシグナルが強くなるが、ほとんどの分子種で極長鎖脂肪酸ではないシグナルの方が強かった。この結果から極長鎖脂肪酸を含有する PC の大部分の分子種では、極長鎖脂肪酸 1 本をグリセロール 1 位に結合することがわかった(表 1)。さらに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にも極長鎖脂肪酸が含まれることが明らかとなった。

異なる患者由来のサンプルを比較したところ、意外にも共通するシグナルは半数以下であり、共通する分子種よりも異なる分子種が多いことがわかった(表 1)。

(平成 25 年度)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

ZS 繊維芽細胞では多様な極長鎖脂肪酸が存在することから、臨床指標について再検討の余地があるものと考えられた。ただし個体差にも十分留意する必要があることがわかった。

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。さらに微量な血清でも、測定可能であることがわかった。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

ペルオキシソーム病のうち少なくとも ZS 患者繊維芽細胞では、これまでに臨床指標に用いられている C26:0 以外の極長鎖脂肪酸が多数存在し、PC に含まれていることが明らかとなった。これら PC の分子種の構造を特定したところ、患者間で個体差があった。

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 Shimosawa, 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)
- 3) 極長鎖脂肪酸含有脂質の定量解析による2つのペルオキシソーム病の比較、西澤千穂、濱弘太郎、永井徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明、第133回日本薬学会、ファルマシア 49巻号、2013年3月
- 4) ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質定量の試み、西澤千穂、永井徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明、第84回日本生化学会、京都、生化学、83巻8号、158項及びCD、2011年

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種

炭素数32の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
Signals	M/z	<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	Molecular Species	Zellweger 1	Zellweger 2
C50:7-PC	1030	<b>C32:6</b>	C18:1	C32:6-C18:1-PC	+	
C50:6-PC	1032	<b>C32:5</b>	C18:1	C32:5-C18:1-PC	+	+
C48:3-PC	1010	<b>C32:3</b>	C16:0	C32:3-C16:0-PC	+	
C48:2-PC	1012	<b>C32:2</b>	C16:0	C32:2-C16:0-PC		+
C48:2-PC	1012	<b>C32:1</b>	C16:1	C32:1-C16:1-PC	+	
C48:1-PC	1014	<b>C32:1</b>	C16:0	C32:1-C16:0-PC		+
C48:0-PC	1016	<b>C32:0</b>	C16:0	C32:0-C16:0-PC		+
炭素数30の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C50:7-PC	1030	<b>C30:3</b>	C20:4	C30:3-C20:4-PC	+	
C46:3-PC	982	<b>C30:3</b>	C16:0	C30:3-C16:0-PC	+	+
C50:6-PC	1032	<b>C30:2</b>	C20:4	C30:2-C20:4-PC	+	+
C48:3-PC	1010	<b>C30:2</b>	C18:1	C30:2-C18:1-PC	+	+
C46:2-PC	984	<b>C30:2</b>	C16:0	C30:2-C16:0-PC	+	
C48:3-PC	1010	<b>C30:1</b>	C18:2	C30:1-C18:2-PC		+
C48:2-PC	1012	<b>C30:1</b>	C18:1	C30:1-C18:1-PC	+	+
C48:1-PC	1014	C18:0	<b>C30:1</b>	C18:0-C30:1-PC		+
C46:1-PC	986	<b>C30:1</b>	C16:0	C30:1-C16:0-PC		+
C48:1-PC	1014	<b>C30:0</b>	C18:1	C30:0-C18:1-PC		+
C48:0-PC	1016	C18:0	<b>C30:0</b>	C18:0-C30:0-PC		+
C46:0-PC	988	<b>C30:0</b>	C16:0	C30:0-C16:0-PC		+
炭素数28の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C46:6-PC	976	<b>C28:5</b>	C18:1	C28:5-C18:1-PC		+
C44:6-PC	948	<b>C28:5</b>	C16:1	C28:5-C16:1-PC	+	
C44:5-PC	950	<b>C28:5</b>	C16:0	C28:5-C16:0-PC	+	
C48:8-PC	1000	<b>C28:4</b>	C20:4	C28:4-C20:4-PC		+
C46:5-PC	978	<b>C28:4</b>	C18:1	C28:4-C18:1-PC	+	
C48:7-PC	1002	<b>C28:3</b>	C20:4	C28:3-C20:4-PC		+
C46:4-PC	980	<b>C28:3</b>	C18:1	C28:3-C18:1-PC	+	
C48:6-PC	1004	<b>C28:2</b>	C20:4	C28:2-C20:4-PC		+
C46:3-PC	982	<b>C28:2</b>	C18:1	C28:2-C18:1-PC	+	+
C44:2-PC	956	<b>C28:2</b>	C16:0	C28:2-C16:0-PC	+	
C50:6-PC	1032	<b>C28:1</b>	C22:5	C28:1-C22:5-PC	+	
C50:6-PC	1032	C22:5	<b>C28:1</b>	C22:5-C28:1-PC		+
C48:5-PC	1006	<b>C28:1</b>	C20:4	C28:1-C20:4-PC	+	
C46:2-PC	984	<b>C28:1</b>	C18:1	C28:1-C18:1-PC	+	
C46:1-PC	986	C18:0	<b>C28:1</b>	C18:0-C28:1-PC		+
C44:2-PC	956	C16:1	<b>C28:1</b>	C16:1-C28:1-PC		+
C44:1-PC	958	<b>C28:1</b>	C16:0	C28:1-C16:0-PC	+	+
C48:4-PC	1008	<b>C28:0</b>	C20:4	C28:0-C20:4-PC	+	
C46:1-PC	986	<b>C28:0</b>	C18:1	C28:0-C18:1-PC		+
C46:0-PC	988	C18:0	<b>C28:0</b>	C18:0-C28:0-PC		+
C44:1-PC	958	<b>C28:0</b>	C16:1	C28:0-C16:1-PC		+
C44:0-PC	960	<b>C28:0</b>	C16:0	C28:0-C16:0-PC		+
C42:0-PC	932	C14:0	<b>C28:0</b>	C14:0-C28:0-PC	+	

表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種 ( 続き )

炭素数26の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C44:6-PC	948	C18:0	<b>C26:6</b>	C18:0-C26:6-PC	+	
C42:7-PC	918	<b>C26:6</b>	C16:1	C26:6-C16:1-PC		+
C46:9-PC	970	<b>C26:5</b>	C20:4	C26:5-C20:4-PC		+
C44:7-PC	946	<b>C26:5</b>	C18:2	C26:5-C18:2-PC		+
C44:6-PC	948	<b>C26:5</b>	C18:1	C26:5-C18:1-PC	+	
C42:6-PC	920	<b>C26:5</b>	C16:1	C26:5-C16:1-PC		+
C42:5-PC	922	<b>C26:5</b>	C16:0	C26:5-C16:0-PC		+
C48:8-PC	1000	<b>C26:4</b>	C22:4	C26:4-C22:4-PC		+
C46:8-PC	972	<b>C26:4</b>	C20:4	C26:4-C20:4-PC	+	
C44:6-PC	948	<b>C26:4</b>	C18:2	C26:4-C18:2-PC	+	
C44:5-PC	950	<b>C26:4</b>	C18:1	C26:4-C18:1-PC	+	
C42:5-PC	922	<b>C26:4</b>	C16:1	C26:4-C16:1-PC		+
C42:4-PC	924	<b>C26:4</b>	C16:0	C26:4-C16:0-PC		+
C46:7-PC	974	<b>C26:3</b>	C20:4	C26:3-C20:4-PC	+	
C44:4-PC	952	<b>C26:3</b>	C18:1	C26:3-C18:1-PC	+	
C42:3-PC	926	<b>C26:3</b>	C16:0	C26:3-C16:0-PC	+	+
C40:3-PC	898	C14:0	<b>C26:3</b>	C14:0-C26:3-PC	+	
C46:6-PC	976	<b>C26:2</b>	C20:4	C26:2-C20:4-PC		+
C44:3-PC	954	<b>C26:2</b>	C18:1	C26:2-C18:1-PC	+	+
C42:3-PC	927	<b>C26:2</b>	C16:1	C26:2-C16:1-PC		+
C42:2-PC	928	<b>C26:2</b>	C16:0	C26:2-C16:0-PC	+	+
C40:2-PC	900	C14:0	<b>C26:2</b>	C14:0-C26:2-PC	+	
C48:6-PC	1004	<b>C26:1</b>	C22:5	C26:1-C22:5-PC		+
C46:5-PC	978	<b>C26:1</b>	C20:4	C26:1-C20:4-PC	+	
C46:3-PC	982	<b>C26:1</b>	C20:2	C26:1-C20:2-PC		+
C44:3-PC	954	<b>C26:1</b>	C18:2	C26:1-C18:2-PC	+	+
C44:2-PC	956	<b>C26:1</b>	C18:1	C26:1-C18:1-PC	+	+
C44:1-PC	958	C18:0	<b>C26:1</b>	C18:0-C26:1-PC		+
C42:2-PC	928	<b>C26:1</b>	C16:1	C26:1-C16:1-PC		+
C42:1-PC	930	<b>C26:1</b>	C16:0	C26:1-C16:0-PC	+	+
C40:1-PC	902	C14:0	<b>C26:1</b>	C14:0-C26:1-PC	+	+
C46:4-PC	980	<b>C26:0</b>	C20:4	C26:0-C20:4-PC	+	
C44:1-PC	958	<b>C26:0</b>	C18:1	C26:0-C18:1-PC	+	+
C44:0-PC	960	C18:0	<b>C26:0</b>	C18:0-C26:0-PC		+
C42:0-PC	932	<b>C26:0</b>	C16:0	C26:0-C16:0-PC	+	+
C40:0-PC	904	C14:0	<b>C26:0</b>	C14:0-C26:0-PC	+	
C24:1-PC	930	<b>C26:0</b>	C16:1	C26:0-C16:1-PC		+

表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種 (続き)

炭素数24の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C42:7-PC	918	C24:6	C18:1	C24:6-C18:1-PC		+
C44:9-PC	942	C24:5	C20:4	C24:5-C20:4-PC		+
C42:6-PC	920	C24:5	C18:1	C24:5-C18:1-PC		+
C42:5-PC	922	C18:0	C24:5	C18:0-C24:5-PC		+
C40:6-PC	892	C24:5	C16:1	C24:5-C16:1-PC	+	
C40:5-PC	894	C24:5	C16:0	C24:5-C16:0-PC	+	
C46:9-PC	970	C24:4	C22:5	C24:4-C22:5-PC		+
C44:8-PC	944	C24:4	C20:4	C24:4-C20:4-PC		+
C44:7-PC	946	C24:4	C20:3	C24:4-C20:3-PC		+
C44:6-PC	948	C20:2	C24:4	C20:2-C24:4-PC	+	
C44:5-PC	950	C20:1	C24:4	C20:1-C24:4-PC	+	
C42:6-PC	920	C24:4	C18:2	C24:4-C18:2-PC		+
C42:5-PC	922	C24:4	C18:1	C24:4-C18:1-PC		+
C42:4-PC	924	C18:0	C24:4	C18:0-C24:4-PC		+
C40:4-PC	896	C24:4	C16:0	C24:4-C16:0-PC	+	
C44:7-PC	946	C24:3	C20:4	C24:3-C20:4-PC		+
C42:4-PC	924	C24:3	C18:1	C24:3-C18:1-PC		+
C42:3-PC	926	C18:0	C24:3	C18:0-C24:3-PC		+
C40:3-PC	898	C24:3	C16:0	C24:3-C16:0-PC	+	+
C44:6-PC	948	C24:2	C20:4	C24:2-C20:4-PC	+	
C42:3-PC	926	C24:2	C18:1	C24:2-C18:1-PC	+	+
C40:2-PC	900	C24:2	C16:0	C24:2-C16:0-PC	+	+
C42:2-PC	928	C24:1	C18:1	C24:1-C18:1-PC	+	+
C40:1-PC	902	C24:1	C16:0	C24:1-C16:0-PC	+	+
C42:1-PC	930	C24:0	C18:1	C24:0-C18:1-PC	+	+
C42:0-PC	932	C18:0	C24:0	C18:0-C24:0-PC	+	+
C40:0-PC	904	C24:0	C16:0	C24:0-C16:0-PC	+	
極長鎖脂肪酸を含有するPE分子種						
C44:5-PE	848	C26:5	C18:0	C26:5-C18:0-PE		+
C44:4-PE	850	C18:0	C26:4	C18:0-C26:4-PE		+
C44:3-PE	852	C26:2	C18:1	C26:2-C18:1-PE		+
C42:3-PE	824	C26:2	C16:1	C26:2-C16:1-PE	+	
C44:2-PE	854	C26:1	C18:1	C26:1-C18:1-PE	+	
C42:2-PE	826	C26:1	C16:1	C26:1-C16:1-PE	+	
C44:1-PE	856	C26:0	C18:1	C26:0-C18:1-PE	+	
C42:4-PE	822	C18:0	C24:4	C18:0-C24:4-PE		+
C42:3-PE	824	C18:0	C24:3	C18:0-C24:3-PE	+	+
C42:3-PE	824	C24:2	C18:1	C24:2-C18:1-PE	+	
C42:2-PE	826	C24:1	C18:1	C24:1-C18:1-PE	+	
C44:3-PE	852	C20:3	C24:0	C20:3-C24:0-PE		+
C42:1-PE	828	C24:0	C18:1	C24:0-C18:1-PE	+	
極長鎖脂肪酸を含有するPS分子種						
C42:2-PS	870	C24:1	C18:1	C24:1-C18:1-PS	+	