

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））

総括研究報告書

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25年度の厚生労働省 難治性疾患等克服研究事業では、TGCVの臨床診断法を開発し、その診断基準を作成していくとともに、臨床治験に向けた症例登録システムを開始した。また、医薬品としてカプリン酸製剤を開発するために、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を行った。

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
青江 秀史	大阪大学知的財産センター センター長
南都 伸介	大阪大学先進心血管治療学 教授
内藤 博昭	国立循環器病研究センター病院 病院長
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
小林 邦久	福岡大学医学部筑紫病院 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
長澤 康行	兵庫医科大学腎臓内科 講師
羽尾 裕之	兵庫医科大学病理学 准教授
小谷 順一	大阪大学医学系研究科循環器内科 講師
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
杉村 宏一郎	東北大学大学院 循環器内科 院内講師
高木 敦子	国立循環器病研究センター分子薬理部 室長
中村 浩士	山口大学地域医療推進学 准教授
山田 壮亮	産業医科大学細胞病理学 講師
谷本 昭英	鹿児島大学医学部分子細胞病理学 教授
安井 洋子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 准教授
千葉 俊明	琉球大学医学部 准教授
田嶋 祥子	興和株式会社 製品戦略部

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. カプリン酸製剤の薬物動態の把握のための放射性ラベル体の作製およびカプリン酸代謝経路把握のための小腸灌流実験の実施 (張、間賀田)
我々の開発しているカプリン酸の実際の投与形態であるトリカプリンの C-11 標識体の作成をするための条件検討を行った。マウス小腸灌流系を用いて、カプリン酸の代謝経路の解明を試みた。

2. 血清中カプリン酸の定量的評価法の確立と標準物質の作製 (恵)

カプリン酸の血中濃度モニタリングのために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量的測定系を構築するための標準物質の作成および測定条件の検討を行った。

3. 動物モデルを用いたカプリン酸製剤の有効性評価と非げっ歯類続発性 TGCV モデルの作成 (裏出、谷本)

我々の開発しているカプリン酸製剤の実際の投与形態であるトリカプリンと MCT オイルで原発性 TGCV のモデル動物である ATGL 欠損マウスにおいて有効性に差がみられるかを検討した。また、続発性 TGCV のモデル動物を作成するため、マイクロミニプタのストレプトゾトシンによる糖尿病化を試みた。

4. 動物モデルを用いた ATGL の心血管疾患への関与に関する基礎的検討 (小林、山田)

糖尿病モデルマウスである db/db マウスにおける ATGL 発現について検討した。また、ATGL 欠損マウスに血管障害モデルの一つであるカフモデルを行い、

ATGL 欠損の血管障害に対する影響を検討した。

5. 原発性・続発性 TGCV の診断基準の作成および診断のための検査法の開発 (植田、財満、小谷、内藤、長澤、南都、羽尾、平野)

原発性・続発性 TGCV の診断基準を確立するとともに、スクリーニング検査として有用な検査法を見出すため、各種画像診断法を用いて、TGCV 症例の特徴的所見を見出すことができるかどうかを検討した。また、これらの画像診断による結果と同時に病理学的な検討も行い、各画像検査所見の臨床的な意義について検討した。

6. 原発性 TGCV の国際的な症例登録システムの構築 (平野)

希少疾患である原発性 TGCV の国際的な症例登録システムを構築し、運用を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究に参与するすべてのものは、「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. カプリン酸製剤の実際の投与形態であるトリカプリンの C-11 標識体の作成に成功した。(間賀田)
2. カプリン酸測定系(定性)の開発(恵)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたカプリン酸の定量測定系の開発に成功した。
3. マイクロミニプタに対してストレプトゾ

トシンを投与し、マイクロミニプタを糖尿病化することに成功した。(谷本)ATGL欠損マウスにおいて、トリカプリンは(カプリン酸以外の中鎖脂肪酸を多く含む)MCTオイルと比較し、寿命の延長効果が大きかった。TGCVに対して、トリカプリンがMCTオイルよりも有効性が高いと考えられた。(裏出)

4. 糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにおいて心筋におけるATGL発現(mRNA量および蛋白質量)の減少を認め、ATGL活性の低下が糖尿病状態での糖尿病心筋症の発症に関与している可能性が考えられた。(小林)また、ATGL欠損マウスに血管障害モデルの一つであるカフモデルを行い、ATGL欠損マウスで血管障害の増加を認めた。(山田)

5. ヒト末梢血液由来白血球を用いてのATGL活性の測定系の開発し、その測定系の検証のための抗体作成を開始した。(高木)汎用血球計算機を用い、パラメーターとして、BASO-WX/WYを用いた末梢血白血球への中性脂肪蓄積のスクリーニング検査法を開発した。(平野)¹²³I-BMIPPを用いた心臓核医学検査で、single photon emission computed tomography (SPECT)法により撮像された画像を用いて算出されたwash out rateは、TGCV症例で著明な低下を認めていた。¹²³I-BMIPPを用いた心臓核医学検査がTGCVのスクリーニング検査となりうる可能性が示された。(平野)冠動脈CTデータの3次元解析システムであるNCVCシステムを用いて、少数例のTGCV症例の冠動脈を解析し、冠動脈への脂質成分の蓄積を認めた。(内藤)

6. 原発性TGCVの国際的な症例登録システムを立ち上げ、症例の登録を開始した。(平野)

D. 考察

1. トリカプリンの薬物動態の把握

トリカプリンの C-11標識体の作成に成功したことにより、今後、動物を用いたトリカプリンの薬物動態の把握が可能となると期待される。また、血中カプリン酸の定量的測定法が確立したことにより、将来的な健常人における正常域の決定、TGCV 症例における治療域の決定(至適血中濃度の決定および至適投与量の決定)が可能となった。

2. TGCV 診断法の確立

末梢血由来白血球を用いた ATGL リパーゼ活性測定系、汎用血球計算機による高く白血球への中性脂肪蓄積のスクリーニング法、¹²³I-BMIPP を用いた心臓核医学検査により、従来確定診断のために実施されていた骨格筋生検・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が確立できる可能性が示された。今後、これらの方法について、診断法の開発と並行して、臨床データを蓄積していくことが重要であると考えられた。また、各種画像診断法(冠動脈 CT、冠動脈 OCT、冠動脈内視鏡など)と病理学的診断・質量顕微鏡などの検査法による結果を多数例で比較することで、各種画像診断法の TGCV 診断における有用性について明らかにしていくことができると考えている。

E. 結論

原発性・続発性 TGCV に対する診断法の確立のため、新規検査法を開発するとともに、既存の各種画像検査法による検査結果の検討を行った。将来的な臨床治験の実施に向けて、国際的な症例登録システムの運用を開始した。また、カプリン酸製剤の臨床応用に向けた薬物動態・有効性評価を実施するための予備的な検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, Kobayashi K, Nakamura H, Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, Hui SP, Toda T, Kuroda H, Chiba H, Hirano K

Peripheral leucocytes' anomaly detected with routine automated hematology analyzer sensitive to adipose triglyceride lipase deficiency manifesting neutral lipid storage disease with myopathy/triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.

Mol Genet Metab Rep. doi:

10.1016/j.ymgmr.2014.05.001 2014

Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M

A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.

Neuromuscl Dis doi: 10.1016/j.nmd.

2014.04.001 2014

Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A,

Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K
Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique
J Lipid Res. 55(5) 905-918 2014

Shimizu K, Ogura H, Wasa M, Hirose T, Shimazu T, Nagasaka H, Hirano K
Refractory hypoglycemia and subsequent cardiogenic shock in starvation and refeeding: report of three cases.
Nutrition. in press

Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T
Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovascularopathy
Orphanet J Rare Dis. 8(1) 197 2013

Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M
Genetic mutations in the adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor-gamma in patients with triglyceride deposit cardiomyovascularopathy.
Biochem Biophys Res Commun. 443(2) 574-579 2014

Ikeda Y, Hirano K (equal contribution),

Fukushima N, Sawa Y
A novel type of human spontaneous coronary atherosclerosis with triglyceride deposition
Eur Heart J. 35(13) 875 2014.

Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R
Down regulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice.
Biochem Biophys Res Commun. 438(1) 224-229 2013

Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S, Nakanishi T, Matsumoto H, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Hirano K, Kato S
Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity
Biochem Biophys Res Commun. 434(3) 534-540 2013

Nakamura K, Hirano K, Wu SM
iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases
J Cardiovasc Trans Res. 6(1) 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