

## メタボローム解析による脂質性ライソゾーム病とペルオキシソーム病ALDの病態解明と 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：ALDモデルのABCD1ノックアウトマウス(KO)の脳のリン脂質について網羅的メタボローム解析を行った。極長鎖脂肪酸を1位に含んだホスファチジルコリンPC分子種が顕著に増加していた。炭素数が奇数のPCは減少していた。C44:1-PC分子種の脳内の分布をイメージング質量分析法で調べたところ、白質ではなく灰白質の部分に多いことがわかった。スフィンゴミエリンと糖脂質の網羅的解析をほぼ確立できた。

### 研究協力者氏名

所属機関名及び所属機関における職名

濱弘太郎・帝京大学薬学部・講師

藤原優子・帝京大学薬学部・助教

### A．研究目的

糖脂質蓄積症などの脂質性のライソゾーム病やペルオキシソーム病である副腎白質ジストロフィー(ALD)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。これにより各疾患の病態を解明するとともに診断マーカーを見いだすことを目的とする。

### B．研究方法

ALDの原因遺伝子ABCD1を破壊したノックアウトマウスの脳からBligh & Dyer法により全脂質を抽出し、ESI-LC-MS/MS法によるメタボローム解析に供した。具体的には定量解析により増加あるいは減少している分子種を同定し、次に個々の分子種を構成している脂肪酸まで含めた分子構造を解析した。このうちノックアウトマウスにおいて最も顕著だった極長鎖脂肪酸を含むリン脂質分子種C44:1-PCについて、凍結切片を用いてイメージング質量計によって、脳内の分布を計測した。

さらにスフィンゴミエリンと各種糖脂質についても網羅的に定量し構造解析をするため、測定法を検討した。スフィンゴミエリンは分離方法は確立しているが、構造解析については、LC-MSで極性基とスフィンゴ

シン塩基を測定し、脂肪酸は推定するのが一般的であったが、ネガティブイオンモードでLC-MS/MS/MS測定を試みた。糖脂質に関しては網羅的な解析のための質量分析計の条件は前年度までにほぼ検討が完了しており、今年度は各種カラムを用いて分離法を検討した。

（倫理面への配慮）

所属機関の動物実験に関す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。今年度はヒトサンプルを用いた結果については発表を行っていない。

### C．研究結果

マウスの脳のリン脂質では野生型を含め、意外にも炭素数が奇数で不飽和結合が1個の脂肪酸を持つホスファチジルコリンが有意に検出された。ABCD1ノックアウトマウスの脳では極長鎖脂肪酸を1位に含んだPC分子種が顕著に増加していた。一方で奇数脂肪酸のPC分子種が減少していた。さらにC44:1-PC分子種の脳内の分布を調べたところ、白質ではなく灰白質の部分に多いことがわかった。

スフィンゴミエリンの構造決定法に関しては、用いた装置に特徴的な第三室のイオントラップ機能を用いてLC-MS/MS/MS法を行ったところ、ネガティブイオンモードで脂肪酸由来のシグナルの検出に成功した。これにより、分子の各部の構造がより確実

に決定できることとなった。糖脂質の分離法に関しては、従来用いられている逆相カラムやHILICカラムではなく、有機化学分野で光学分割の際に用いられるカラムが有用であることが明らかとなった。

#### D. 考察

ALDモデルのABCD1ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析では極長鎖脂肪酸を1位に含んだPC分子種が顕著に増加していた。この結果は以前に報告した、Zellweger症候群患者の繊維芽細胞の結果と同じ傾向であった。一方で奇数脂肪酸のPC分子種が減少していたことが明らかとなった。このことは単に極長鎖脂肪酸の蓄積だけではない代謝のメカニズムの存在を示唆するのとも考えられる。またC44:1-PC分子種の脳内の分布は、白質ではなく灰白質の部分に多く、これはマウスでヒト様の表現型が生じないことの原因であるかもしれない。ただしこれを証明するためには、ヒトでの解析を行って比較する必要がある。

スフィンゴミエリンの構造決定法に関しては、極性基、スフィンゴシン塩基に加え脂肪酸部分も、質量値の差分からの推定ではなく、シグナルから同定できることになり、より確実な決定が可能となった。糖脂質に関しても網羅的解析に適した分離法がほぼ確立した。

#### E. 結論

ALDモデルのABCD1ノックアウトマウスの脳のリン脂質の網羅的定量解析と構造決定によりプロファイルを明らかにした。極長鎖脂肪酸含有PC分子種は灰白質に多く存在した。スフィンゴミエリンと糖脂質の網羅的解析をほぼ確立できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Molecular species of phospholipids in brain of Abcd1-deficient mice (投稿準備中)

Qualitative and quantitative method for sphingomyelin species by liquid chromatography-electrospray ionization

tandem mass spectrometry (投稿準備中)  
Simultaneous analysis of glycosphingolipids using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (執筆中)

##### 2. 学会発表

Molecular Species of Phospholipids in the Brain of Abcd1-deficient Mice. Kazuaki Yokoyama 他、Lipid Maps Annual Meeting 2016、abstract book p93, 2016

Abcd1 ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析、濱弘太郎、横山和明他、第58回日本脂質生化学会、脂質生化学研究 58, p97, 2016

多段階 MRM モードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析、藤原優子、横山和明他、第58回日本脂質生化学会、脂質生化学研究 58, p132, 2016

Abcd1 ノックアウトマウスの脳のリン脂質解析、黒木秀悟、横山和明他、Pharmaco-Hematology 2016

Abcd1 ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析、濱弘太郎、横山和明他、第89回日本生化学会、プログラム集, p113, 2016

らい菌感染マクロファージに蓄積するトリアシルグリセロール分子種の同定、谷川和也、横山和明他、第89回日本生化学会、プログラム集, p168, 2016

Abcd1 ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析、濱弘太郎、横山和明他、第41回日本マススペクトル学会、脂質生化学研究 58, p97, 2016

多段階 MRM モードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析、藤原優子、横山和明他、第58回日本先天代謝異常学会、日本先天代謝異常学会雑誌 32, p181, 2016

( 発表誌名巻号・頁・発行年等も記入 )

G . 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し