

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
分担研究報告書

ムコ多糖症 型の診療ガイドラインの策定およびライソゾーム病とペルオキシソーム病の診断マーカーの探索

研究分担者 横山 和明 帝京大学・薬学部・教授

研究要旨:ムコ多糖症 型の診療ガイドラインの策定のためのエビデンスとなる論文リストを作成し、1次スクリーニングを行った。またALDモデルのABCD1ノックアウトマウス(K0)の脳のリン脂質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。ライソゾーム病の病因物質であるスフィンゴミエリンとスフィンゴ糖脂質分子種の網羅的解析をほぼ確立できた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名  
(分担研究報告書の場合は、省略)

委員会の承認のもとに調査研究を行った。

A. 研究目的

ライソゾーム病のうちムコ多糖症 型の診療ガイドラインを策定する。さらに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。

B. 研究方法

診療ガイドラインの策定では、Mindsに基づき、Medlineおよび医中誌を網羅的に検索し、ムコ多糖症 型の診療ガイドラインの策定のためのエビデンスとなる論文リストを作成した。さらにそれを元に1次スクリーニングを行った。

ALDの原因遺伝子ABCD1のノックアウトマウスの脳の凍結切片を用いて、極長鎖脂肪酸を含むリン脂質分子種のC44:1-PCについて、イメージング質量分析計によって、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スフィンゴ糖脂質について分子種ごとに網羅的に定量し構造解析をするため、LC-MSを用いた測定法を検討した。スフィンゴミエリンはネガティブイオンモードでLC-MS/MS/MS測定を行った。糖脂質に関してはキラルカラムを用いた分離系を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト、動物、遺伝子組換え実験に関する学内倫理

C. 研究結果

診療ガイドラインの策定では、クリニカルクエスチョンCQに関するエビデンスを得るため「酵素補充療法」と「造血幹細胞移植」について、さらにバックグラウンドクエスチョンに関する知見を得るため「総説」をキーワードとして、Medlineおよび医中誌を網羅的に検索した。Medlineでは合計650報、医中誌では195報の候補文献が得られた。さらにCQに関して1次スクリーニングを行い、Medlineでは酵素補充療法112報、造血幹細胞移植168報、うち36報は共通で合計候補244報となった。医中誌では酵素補充療法28報、造血幹細胞移植25報、うち2報は共通で合計候補51報となった。

ABCD1のノックアウトマウスの脳ではリン脂質分子種C44:1-PCが白質ではなく灰白質の部分に多かった。

スフィンゴミエリンはネガティブイオンモードでLC-MS/MSで生じるセラミド部分のフラグメントイオンに対して、さらにコリジョンを行いLC-MS/MS/MS測定を行うことで、常法では検出できない脂肪酸残基のシグナルを検出できることがわかった。スフィンゴ糖脂質に関しては、常法の疎水カラムでは同じセラミド疎水基で親水基の糖鎖が異なる分子種はほぼ同時に溶出してしまいが、キラルカラムを用いると異なる保持時間で溶出し分離された。

D. 考察

診療ガイドラインの策定では、Medlineで244報の候補文献が得られた。ただしこれ

らの多くが海外グループの報告であったので、国内症例も重視すると日本語文献を多く収集している医中誌の検索が必要となった。医中誌では51報が候補文献として得られた。ほとんどが本邦の文献であったがその多くが症例報告にとどまっていた。2次スクリーニングを経て推奨文を作成するにあたり、海外報告と国内症例のエビデンスとしての取扱いを十分考慮する必要があると思われた。

ABCD1 ノックアウトマウスはALDのモデル動物ではあるが、ヒトにおける白質の所見がほとんど見られないことが従来指摘されてきた。今回KOマウス脳ではリン脂質分子種C44:1-PCが白質ではなく灰白質の部分に多かったことから、これがヒト所見との違いを生じる一因であると考えられた。

スフィンゴミエリンはネガティブイオンモードでLC-MS/MS測定を行い脂肪酸残基のシグナルを検出することにより、スフィンゴシン塩基と脂肪酸の組合せをニュートラルロスの差分質量ではなく、フラグメントイオンそのもので決定できることが明らかとなった。スフィンゴ糖脂質に関しては、常法の逆相カラムに代えてキラルカラムを用いることで、疎水基だけでなく親水基の糖鎖の違いによる分離が可能であることを見いだした。

## E . 結論

診療ガイドラインの策定では、候補となるのは295報であった。

ABCD1 ノックアウトマウス脳では極長鎖脂肪酸含有リン脂質C44:1-PCが白質ではなく灰白質の部分に多かった。

スフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質の網羅的解析系をほぼ確立した。

## F . 健康危険情報

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

Profiling and imaging of phospholipids in brains of Abcd1-deficient mice. K. Hama, Y.

Fujiwara, M. Morita, F. Yamazaki, Y. Nakashima, S. Takei, S. Takashima, M. Setou, N. Shimosawa, T. Imanaka, K. Yokoyama. *Lipids*. (2018) 53, 85-102. PMID: 29469952 doi: 10.1002/lipd.12022.

Comprehensive quantitation using two stable isotopically labeled species and direct observation of N-acyl moiety of sphingomyelin by LC-MS. K. Hama, Y. Fujiwara, H. Tabata, H. Takahashi, K. Yokoyama. *Lipids*. (2017) 52, 789-799. PMID: 28770378 doi: 10.1007/s11745-017-4279-5.

### 2. 学会発表

Abcd1 ノックアウト細胞における極長鎖脂肪酸 CoA の定量、濱弘太郎、横山和明他、第 59 回日本脂質生化学会、脂質生化学研究 59, p132, 2017

スフィンゴ糖脂質を対象とする網羅的解析の為のキラルカラムによる分離系の検討、藤原優子、横山和明他、第 59 回日本脂質生化学会、脂質生化学研究 59, p151, 2017

Abcd1 ノックアウト細胞における極長鎖脂肪酸 CoA の定量、濱弘太郎、横山和明他、第 42 回日本医用マススペクトル学会、JSBMS Letters 42, p94, 2017

LC-ESI-MS を用いたスフィンゴ糖脂質の網羅的解析の為のキラルカラムによる分離系の検討と生体サンプルへの適用、藤原優子、横山和明他、第 42 回日本医用マススペクトル学会、JSBMS Letters 42, p79, 2017

Quantitative analysis of very long chain fatty acyl-CoA in ABCD1-deficient cells. K. Hama, K. Yokoyama 他、第 59 回日本先天代謝異常学会、日本先天代謝異常学会雑誌 33, p176, 2017

キラルカラム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 59 回日本先天代謝異常学会、日本先天代謝異常学会雑誌 33, p193, 2017

Abcd1 ノックアウト細胞における極長鎖脂肪酸 CoA の定量、濱弘太郎、横山和明他、第 90 回日本生化学会 + 第 40 回日本分子生物学会、2017 年度生命科学系学会合同年次大会プログラム、p428, 2017

キラルカラム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 90 回日本生化学会 + 第 40 回日本分子生物学会、2017 年度生命科学系学会合同年次大会プログラム、p437, 2017

( 発表誌名巻号・頁・発行年等も記入 )

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし