

重水素標識脂肪酸を負荷した末梢血単核球を用いた  
脂肪酸酸化障害の評価

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2019-08-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 湯浅, 光織 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10098/10701">http://hdl.handle.net/10098/10701</a>

## 学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	ゆあさ みおり 湯浅 光織
学位論文題目	Evaluation of metabolic defects in fatty acid oxidation using peripheral blood mononuclear cells loaded with deuterium-labeled fatty acids (重水素標識脂肪酸を負荷した末梢血単核球を用いた脂肪酸酸化障害の評価)		
<p><b>【研究の目的】</b></p> <p>パルミチン酸などの長鎖脂肪酸は、細胞内で長鎖アシル-CoA の形になり、Carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I の働きによってカルニチンと結合してアシルカルニチンとなる。アシルカルニチンはミトコンドリア内に取り込まれ、CPT-II によって再びアシル-CoA に変換される。更に Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)、Mitochondrial trifunctional protein (TFP) などの <math>\beta</math> 酸化酵素による反応を経てアセチル-CoA を生成しながら鎖長を減じる過程でエネルギー産生に関わる。</p> <p>これらの酵素が欠損する脂肪酸酸化異常症・カルニチンサイクル異常症は、脂肪酸由来のエネルギー産生不全をきたすため、乳児期に飢餓を契機に低血糖・高アンモニア血症による急性脳症、突然死を引き起こす。根治は不可能であり、早期診断による急性代謝不全の予防が最も重要であるため、タンデムマス法による濾紙血新生児マススクリーニングの対象疾患として位置付けられている。しかし重症度は様々で、軽症例では濾紙血スクリーニング指標の異常は軽度にとどまるため見逃される可能性がある。見逃しを防ぐためにカットオフ値を下げると陽性率が増加し、時間や費用のかかる二次検査(酵素活性測定、遺伝子解析など)を多く要する結果となる。そこでより簡便な診断的検査法が望まれている。本研究の目的は、迅速・非侵襲的で確実な診断的検査法を開発することである。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>CPT-I 欠損症 3 名、CPT-II 欠損症 6 名、VLCAD 欠損症 5 名、TFP 欠損症 3 名(検査時年齢 0-32 歳、中央値 5 歳)と成人健常コントロール 31 名から末梢血全血 5ml を採取した。単核球を分離し、重水素標識パルミチン酸(<math>d_{31}</math>-ヘキサデカン酸)とカルニチンを混合したバッファー内で、2 時間インキュベート(37°C)した。その後、単核球を回収しメタノールに懸濁破碎し、遠心後の上清について、API4000 タンデム質量分析計によるアシルカルニチンプロファイル分析を行った。<math>d_{31}</math>-C16 から <math>d_1</math>-C2 までの各鎖長のアシルカルニチン(以下 <math>d_x</math>-C<math>y</math> と表記する)は、アシル-CoA から CoA が除去されてカルニチンが結合した化合物であり、細胞内のアシル-CoA の分布を反映するため、それらの蓄積や減少によって酵素障害を評価した。なお、CPT-I 欠損症の評価には、<math>d_{31}</math>-ヘキサデカン酸に加えて、CPT-I に依存せずにミトコンドリア内に輸送される中鎖脂肪酸として重水素標識オクタン酸(<math>d_{15}</math>-オクタン酸)を同時に負荷した検討を行った。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>CPT-II 欠損症では <math>d_{27}</math>-C14 から下流のアシルカルニチンが低下し、<math>d_{27}</math>-C14/<math>d_{31}</math>-C16 比・<math>d_{23}</math>-C12/<math>d_{27}</math>-C14 比・<math>d_{23}</math>-C12/<math>d_{31}</math>-C16 比が低下した。VLCAD 欠損症では <math>d_{23}</math>-C12 より下流が低下・上流が蓄積し、<math>d_{27}</math>-C14/<math>d_{31}</math>-C16 比が上昇、<math>d_{23}</math>-C12/<math>d_{27}</math>-C14 比・<math>d_{23}</math>-C12/<math>d_{31}</math>-C16 比が低下した。TFP 欠損症ではヒドロキシアシルカルニチンである <math>d_{29}</math>-C16-OH が蓄積し、<math>d_{29}</math>-C16-OH/<math>d_{31}</math>-C16 比が上昇した。CPT-I 欠損症では、<math>d_{15}</math>-オクタン酸および <math>d_{31}</math>-ヘキサデカン酸同時負荷時の <math>d_7</math>-C4 は <math>d_{31}</math>-ヘキサデカン酸単独負荷時の <math>d_7</math>-C4 と比較し上昇したが、いずれも <math>d_{31}</math>-C16 は低値であった。このため、<math>d_7</math>-C4/<math>d_{31}</math>-C16 比は 2 者負荷時で</p>			

著明に高値を示した。さらに2者負荷時  $d_7\text{-C4}/d_{31}\text{-C16}$  比を1者負荷時  $d_7\text{-C4}/d_{31}\text{-C16}$  比で除した指標は、患者においてコントロールと比較し有意に高値であった。

$d_1\text{-C2}/d_{31}\text{-C16}$  比は、CPT-II 欠損症、VLCAD 欠損症、TFP 欠損症患者においてコントロールと比較して低下した。CPT-II 欠損症で  $d_1\text{-C2}/d_{31}\text{-C16}$  比と  $d_{27}\text{-C14}/d_{31}\text{-C16}$  比、 $d_1\text{-C2}/d_{31}\text{-C16}$  比と  $d_{23}\text{-C12}/d_{31}\text{-C16}$  比に正の相関を認めた。

#### 【考察】

負荷された標識ヘキサデカン酸が単核球細胞内に取り込まれて代謝された結果、障害酵素に対応する標識アシルカルニチンが蓄積または低下し、それぞれの標識アシルカルニチンの比を算出することにより各酵素の障害を評価することが可能であった。CPT-II 欠損症の診断には  $d_{27}\text{-C14}/d_{31}\text{-C16}$  比、 $d_{23}\text{-C12}/d_{31}\text{-C16}$  比の低下が、VLCAD 欠損症の診断には  $d_{27}\text{-C14}/d_{31}\text{-C16}$  比の上昇、 $d_{23}\text{-C12}/d_{27}\text{-C14}$  比の低下が、TFP 欠損症の診断には  $d_{29}\text{-C16-OH}/d_{31}\text{-C16}$  比の上昇がそれぞれ有用と考えられた。CPT-I 欠損症の診断には、 $d_{15}\text{-オクタン酸}$ の同時負荷により CPT-I 障害が反映され、2者負荷時  $d_7\text{-C4}/d_{31}\text{-C16}$  比/1者負荷時  $d_7\text{-C4}/d_{31}\text{-C16}$  比が有用と考えられた。

$\beta$ 酸化系酵素は、一つの酵素が異なる親和性をもつ複数の基質を代謝するという特性をもつ。一般に酵素活性はひとつの代謝段階における基質と生成物の量の変化によって評価されるため、 $\beta$ 酸化系酵素の場合は、特に軽症例において障害酵素の活性全体が正確に評価されない可能性がある。一方、本検査では複数の代謝段階の酵素活性を総合的に評価することが可能であるため、酵素活性測定を補完する検査法として重要と考えられる。

本検査では末梢血を用いるため、過去に報告されている皮膚線維芽細胞を用いた実験系と比較して侵襲性が低い。さらに、検査は1日以内に終了可能であり、新生児マススクリーニングで使用されている検査システムを利用できるため、迅速、簡便、実用的である。また、末梢血単核球はリンパ球や単球などの複数のサブセットから構成され、年齢によって構成比が異なり、検体によって細胞生存率も異なるが、アシルカルニチン指標比を用いることによってそれらの影響を除去することができる。

$d_1\text{-C2}$ -アシル CoA は  $d_{31}$ -ヘキサデカン酸の  $\beta$ 酸化の産物である。本検討で  $d_1\text{-C2}/d_{31}\text{-C16}$  比は CPT-I 欠損症以外の3疾患で低下したことから、 $\beta$ 酸化能全体を反映する指標となり得ると考えられた。本指標と各疾患の診断指標との関連については症例数が少なく評価困難であり、疾患重症度や発症リスクと関連するかどうかについてさらに検討する必要がある。

#### 【結論】

本検査は、脂肪酸酸化異常症・カルニチンサイクル異常症の迅速な診断に有用であり、酵素活性測定および遺伝子解析とともに重要な二次試験になりうると考えられる。今後、この指標が各疾患の重症度や発症リスクと関連するかどうかを明らかにする必要がある。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3 図表は、挿入しないこと。