

リピドミクス手法を活用した脂質代謝変化解析 と生理機能評価

東北大学病院 薬剤部 前川 正充

【目的】ニーマンピック病 C 型 (NPC) は、進行性の中中枢神経異常を伴う重篤な遺伝性疾患である。本疾患ではトランスポータータンパク質の機能欠損により、細胞内にコレステロールが蓄積する。症状が進行すると、寝たきりや呼吸不全となり、まもなく死亡する。また、中枢神経系のみならず、肝脾腫や胆汁うっ滞など全身に多様な症状も認められるうえ、発症時期も新生児から老年までと幅広い。そのため、NPC の診断は難渋し、結果として治療が遅れ、予後不良化につながる。研究代表者はこれまで、NPC 検査法開発を目指し、尿中コレステロール代謝物の液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) 構築とバイオマーカー性能評価 (Steroids 2013;78:967-72.)、さらにマーカー候補分子の探索を進めてきた (Ann Clin Biochem 2015;52:576-87, Mass Spectrom (Tokyo) 2016;5:S0053.)。一方、NPC では、スフィンゴ脂質類の代謝異常も報告されており、リゾスフィンゴミエリン (SPC) が血中バイオマーカーとして報告された (Welford et al., PLoS ONE 2014;9(12):e114669)。その後、NPC 診断に有用な m/z 509 の未知ピークがリゾスフィンゴミエリン様代謝物 Lyso-sphingomyelin-509 (Lyso-SM-509) として報告されたものの (Giese AK, et al., Orphanet J Rare Dis 2015;10:78)、長らく構造決定されていなかった。研究代表者は最近、その構造推定を進め、新規クラス脂質であるとの推定結果を得た。本知見は、脂質代謝と病態生理の生化学的関連を解明する上で重要であり、さらには、脂質代謝の制御に基づく新規治療ターゲットの探索においても重要と考えた。そこで本研究ではまず、その最初の段階としてリピドミクスの解析ストラテジーを活用し、その分子機構解明と脂質類の生理的意義の解明を本研究の目的とした。加えて、脂質分子類の機器分析法を活用した新規検査法の開発も同時に行うこととした。

【方法】

1. リピドミクス解析による新規異常代謝経路探索

NPC 患者血中で著増する Lyso-SM-509 は、これまでに報告のない構造を有する脂質 *N*-palmitoyl-*O*-phosphocholine-serine (PPCS) であること、さらに脂肪酸鎖長の異なる脂質類が存在することを報告した (Int J Mol Sci 2019;20:5018.)。しかしながら、その生合成・代謝経路は不明である。そこで、本疾患における当該脂質類の異常代謝経路を明らかにすべく、NPC 患者血液を LC/MS/MS 分析する。網羅的にピーク検出し、精密質量から化合物推定と判定量を行うグローバルメタボロミクス法を適用した。PPCS の類縁化合物と考えられる物質に

ついて、有機合成し、その定量分析を選択反応モニタリング (SRM) 法を用いて行う。

2. 新規脂質 *N*-palmitoyl-O-phosphocholine-serine および sphingosylphosphorylcholine の同時分析に基づくニーマンピック病の迅速鑑別検査法の開発

申請者は lysosphingomyelin-509 と考えられてきた PPCS の構造決定を行ったが、それによって、定量に基づく化学診断が可能になった。また、PPCS と SPC の同時分析により、ニーマンピック病の発見と A・B 型と C 型の鑑別も同時に可能となる。そこで、PPCS と SPC の同時分析による NPC の迅速検査法を開発した。

【結果・考察】

1. リピドミクスによる新規異常代謝経路探索ならびに新規脂質化合物の合成

グローバルメタボロミクスを用いて、NPC 患者ならびに健常人の血液検体を解析した結果、2 群間で差のあるピークが多く検出された。その後、既存のデータベースを用いて化合物推定を行った。その結果、NPC 患者において、14 個のピークが上昇、16 個のピークが減少し、新規の分子変化が多く認められた。上昇したピークの 1 つである *N*-palmitoyl-serine (PS) が候補としてあげられており、この分子は PPCS のホスホコリン基が脱離したものであることから、その関連代謝物である可能性が考えられた。PS の有機合成を行い、分析条件最適化に基づく PS の選択反応モニタリング (SRM) 検出を行い、同様に検出されることを確認した。

2. 新規脂質 *N*-palmitoyl-O-phosphocholine-serine および sphingosylphosphorylcholine の同時分析に基づくニーマンピック病の迅速鑑別検査法の開発

除タンパク処理と LC/MS/MS による精密分析 (A 法) と迅速分析 (B 法) を構築した。8 分の分析時間にて構築した A 法は分析法バリデーションをいずれも満たした。また、1.2 分の分析時間で構築した B 法も、迅速でありながら、夾雑とのピークとの分離も達成できた。さらに、両方で得られた定量値は相関を示した。PPCS と SPC の同時分析は、NPC 患者と NPA/B 患者の鑑別に有用であり、診断が可能であることが示唆された。

【今後の予定】

感度と選択性に優れる多重反応モニタリングを用いるターゲットメタボロミクス分析法を用いることで、本疾患で亢進する新規異常代謝経路脂質を明らかにする。また、そうした脂質群の有する生理機能についても解析を行う。PPCS と SPC の同時分析法による検査法に関しては、今後症例数を重ね、その有用の検証を続ける。