

氏名（本籍）	川 合 裕 規	（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）	
学位授与番号	甲第1221号	
学位授与日付	令和5年2月15日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Development of a system adapted for the diagnosis and evaluation of peroxisomal disorders by measuring bile acid intermediates	
審 査 委 員	（主査）教授	永田 知里
	（副査）教授	下畑 享良 教授 西城 卓也

論文内容の要旨

【背景と目的】

胆汁酸中間代謝産物である $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxycholestanoic acid (THCA) と $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxycholestanoic acid (DHCA) はペルオキシソーム内で代謝され一次胆汁酸となる。Zellweger症候群をはじめとするペルオキシソーム病ではこれらの胆汁酸中間代謝産物の蓄積を認め、特に肝障害の原因となっている。

現在ペルオキシソーム代謝産物として主に極長鎖脂肪酸やフィタン酸、プリスタン酸、プラスマローゲンを測定し、ペルオキシソーム病診断を行っている。例えばZellweger症候群やアシルCoAオキシダーゼ1欠損症などではペルオキシソーム生合成障害または酵素欠損により β 酸化が障害されることから血中の飽和極長鎖脂肪酸が高値となっている。ステロールキャリアプロテインX欠損症および2-メチルアシル-CoAラセマーゼ (AMACR) 欠損症では分岐鎖脂肪酸の β 酸化が障害されることから、極長鎖脂肪酸は正常でフィタン酸、プリスタン酸が増加する。一方でABCD3欠損症やアシル-CoA-オキシダーゼ2欠損症といった一部の疾患は胆汁酸中間体の蓄積が唯一の代謝異常であり、従来の方法では診断困難である。さらにZellweger症候群における肝障害に対する治療法として一次胆汁酸投与が試みられており治療効果判定の指標も必要とする。

本研究ではより広範なペルオキシソーム病の診断、治療効果判定指標として胆汁酸中間代謝産物 (THCAおよびDHCA) の精密定量測定法を検討した。

【対象と方法】

1) 試料：過去に診断した Zellweger症候群 (ZS) 20例、新生児型副腎白質ジストロフィー (NALD) 1例、乳児レフサム病 (IRD) 3例、アシルCoAオキシダーゼ1 (ACOX1) 欠損症2例、D-二頭酵素 (DBP) 欠損症5例を対象とした。対照としてペルオキシソーム病以外の疾患を有する乳幼児および新生児10名を加えた。検量線用に内因性のTHCAおよびDHCAを含まない血清に標準THCA/DHCAを添加し、濃度は1, 5, 10, 50 μ Mとした。本研究および検体の使用については岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会の承認を得て行った (許可番号29-35)。

2) 調整方法：内部標準物質 (IS) として $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxy-5 β -cholanolic acid-D4を添加し、アセトンで除蛋白および抽出した試料を用いた。

3) 液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) における測定条件：AcquityTM超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) システム (WatersTM, Milford, MA, USA) を使用した。エチレン架橋型ハイ

ブリッド C8 カラム (2.1 × 50 mm, 粒子径 1.7 μm, ポアサイズ 130 Å, 内径 2.1 mm) を用いて分離を行った。移動相Aは精製水, 1 mM (0.0077 % w/v) 酢酸アンモニウム, 5.78 mM (0.01 % w/v) アンモニア, 移動相Bはアセトニトリルにて構成した。流速は0.4mL/minとし, カラムの温度は40℃に保った。試料注入量は5μLとした。分離後, エレクトロスプレー法 (ネガティブESI) にてイオン化し, 飛行時間型質量分析計でマススペクトルを取得した。キャピラリー電圧1kV, 脱溶媒温度350℃, 脱溶媒ガス流量1000 L/h, イオン源温度125℃, コーンガス流量60L/hとした。スキャンレンジは100-1000m/z, 時間は0.5秒に設定した。

4) 定量法: 既知濃度におけるTHCA/DHCAのISとのピーク面積比をプロットし検量線を作成した。未知試料でのピーク面積比を検量線に当てはめることで, その濃度を算出した。

【結果】

1) 今回の方法を用いることで, 定量限界 (LOQ) はそれぞれTHCA:0.1652 μM, DHCA:0.2331 μM, 定性限界 (LOD) はTHCA:0.0496 μM, DHCA:0.0699 μMであった。すべての対照検体でのTHCAおよびDHCA濃度はともにLOD以下であることを確認した。

2) ZSの全例で胆汁酸中間代謝産物が顕著に増加していた。IRDの3例はZS群よりも有意に低値であった。1例のZS患者に一次胆汁酸の投与が行われ, 治療開始6か月後の血清ではDHCAの軽度低下が見られた。生体肝移植を受けたIRD患者例ではTHCA/DHCAともに移植後急速に低下し, 6年後の再検査でも検出されなかった。

3) DBP欠損症患者では重症型でのみTHCA/DHCAが検出された。ACOX1欠損症の2例ではTHCA/DHCAはともにLOD以下であった。

【考察】

1) ZS, NALD, IRDは重症度を反映して一連の疾患スペクトラムを形成する。本研究では軽症のIRD患者の血清THCA/DHCA値はわずかに上昇したのみであり, 重症のZS群やNALDよりも有意に低値であった。このことは臨床的重症度とペルオキシソーム代謝異常の程度および血清THCA/DHCA値との相関を示唆し患者の予後予測に有用であると考えられる。

2) DBP欠損症患者では重症型でのみTHCA/DHCAが検出され, 極長鎖脂肪酸値も高値であった。胆汁酸中間体レベルと疾患の重症度には相関があることが示唆された。

3) 一次胆汁酸の投与を行ったZS患者および生体肝移植を行ったIRD患者において血清THCA/DHCA値の変化が観察された。ただし血清THCA/DHCA値と予後との関係を明らかにするためには, さらなる症例の蓄積が必要である。

【結論】

本研究で確立された定量測定法は, 様々なペルオキシソーム病の診断や胆汁酸治療の効果検証に利用可能である。予後予測や治療戦略への適用を検討していく。

論文審査の結果の要旨

申請者 川合 裕規は, 胆汁酸中間代謝産物 THCA, DHCA を測定し, 測定値がペルオキシソーム病の有無や重症度と関連があることを見出した。これにより, この測定法がペルオキシソーム病の診断や治療効果判定の指標となり得ることを示すものであり, 小児科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Hiroki Kawai, Shigeo Takashima, Akiko Ohba, Kayoko Toyoshi, Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Nobuyuki Shimozawa: Development of a system adapted for the diagnosis and evaluation of peroxisomal disorders by measuring bile acid intermediates, Brain and Development (in press), doi: 10.1016/j.braindev.2022.10.001