

ペルオキシソームにおける脂質代謝の  
生理学的機能に関する研究

2020

森戸 克弥

## 目次

緒言.....	2
第 1 章.....	5
1. 1. 序論.....	6
1. 2. 実験方法.....	8
1. 3. 結果.....	12
1. 4. 考察.....	22
第 2 章.....	25
2. 1. 序論.....	26
2. 2. 実験方法.....	28
2. 3. 結果.....	34
2. 4. 考察.....	45
総括.....	49
参考文献.....	51
謝辞.....	61

## 緒言

ペルオキシソーム (peroxisome) は一重膜で囲まれた直径 0.1~1.5  $\mu\text{m}$  程度の細胞内小器官であり、酵母からヒトまで、真核生物に広く保存されている。1954 年の Rhodin によるペルオキシソームの形態学的な発見以降、1960 年代初期までに尿酸オキシダーゼや D-アミノ酸オキシダーゼ、L- $\alpha$ -ヒドロキシ酸オキシダーゼなどの過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を生成するオキシダーゼ群と、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を分解するカタラーゼが局在することが明らかとなった。de Duve らは、この細胞内小器官の機能的名称としてペルオキシソームと命名し[1]、今日この名称が広く用いられている。しかしながら、ペルオキシソームの発見当初は特記すべき代謝系が見出されず、進化の過程で取り残された化石顆粒と呼ばれていた。その後、出生直後より筋緊張低下や顔貌異常、重度の精神運動発達遅滞などを呈し、肝機能障害が進行して生後数ヶ月で死亡する Zellweger 症候群患者においてペルオキシソームが欠損していることが報告され[2]、ペルオキシソームの重要性、すなわちペルオキシソームにおける物質代謝反応がヒトにおいて必須であると考えられるようになった。

1976 年、Lazarow と de Duve がラット肝臓から単離したペルオキシソームにミトコンドリアとは異なる脂肪酸  $\beta$  酸化系が存在すること[3]を報告したことを皮切りにペルオキシソームは再び注目を集め、高等動物ペルオキシソームの機能研究が大きく進展した。ペルオキシソームにおける脂肪酸  $\beta$  酸化はミトコンドリアのそれとは異なり、エネルギー生成には関与せず中鎖から短鎖 (C4~C6) へと酸化したところで停止する。また、基質に対する選択性が広く、極長鎖脂肪酸 (VLCFA)、エイコサノイド、ジカルボン酸、分枝脂肪酸、及びある種の生体異物のようなミトコンドリアでは代謝されにくいカルボン酸化合物が代謝される[4-7]。

ペルオキシソームの  $\beta$  酸化における第 1 ステップ (酸化) は 2 種類のアシル CoA オキシダーゼ、ACOX1 (acyl-CoA oxidase 1) 及び ACOX2 によってなされる。ACOX1 は直鎖脂肪酸に対して、ACOX2 は分枝脂肪酸に対して、それぞれ作用する。第 2、第 3 ステップの加水と酸化は DBP (D-bifunctional protein) または LBP (L-bifunctional protein) が触媒する。DBP が専ら D 体の 3-ヒドロキシアシル CoA に作用するのに対し、LBP はジカルボン酸に作用することが報告されており[8]、これらは  $\alpha$ - $\beta$  炭素間の不飽和結合への水和反応と引き続く  $\beta$ -ヒドロキシ基のケト基への酸化反応を行うことから、二頭酵素と呼ばれる。最後の開裂は 3-ケトアシル CoA チオラーゼである pTH1 (peroxisomal thiolase 1) 及び pTH2 が担っており、pTH1 は直鎖脂肪酸のみに作用する一方で pTH2 は直鎖、分枝、両脂肪酸に作用する[5, 6, 9, 10] (Fig. 1)。

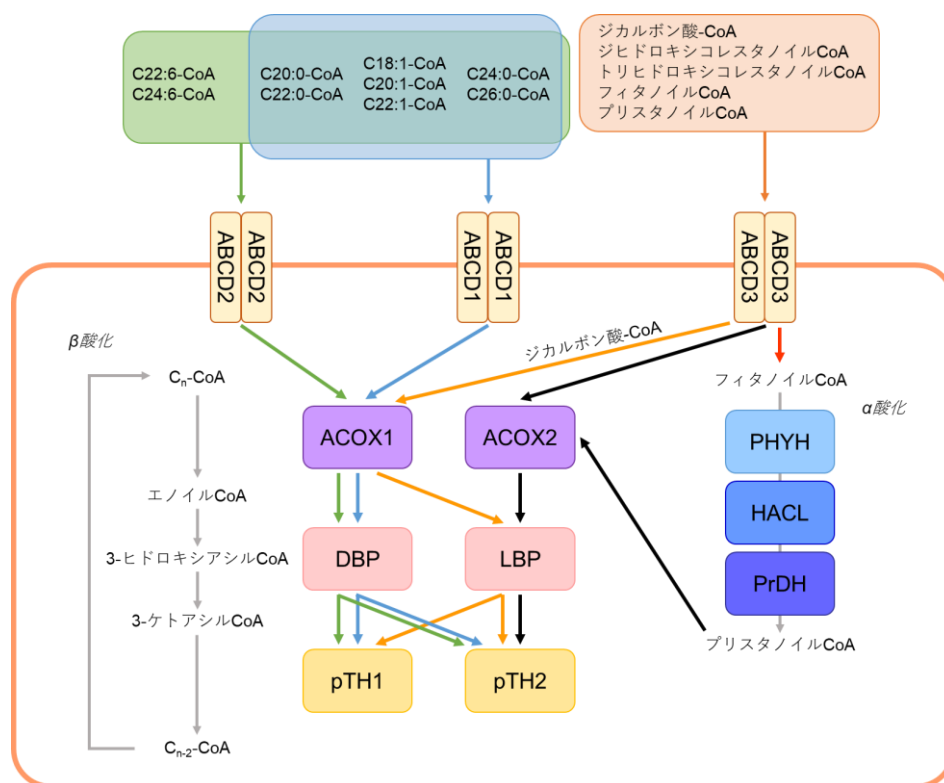


Fig. 1. ペルオキシソームに局在する脂肪酸トランスポーター及び脂肪酸β酸化に関する酵素  
 ペルオキシソーム膜に存在する3種のABCトランスポーター（ABCD1、2、または3）は二量体を形成し、アシルCoAをペルオキシソーム内へ輸送する。取り込まれたアシルCoAは、アシルCoAオキシダーゼ（ACOX1または2）、二頭酵素（DBPまたはLBP）、及び3-ケトアシルCoAチオラーゼ（pTH1または2）が連続的に作用して鎖長短縮される（β酸化）。フィタン酸は、α酸化によってプリスタン酸へと分解され、その後、他の基質と同様にβ酸化によって炭素鎖が切断される。ABCD: ABC transporter subfamily D, ACOX: acyl-CoA oxidase, DBP: D-bifunctional protein, HACL: 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, LBP: L-bifunctional protein, PHYH: phytanoyl-CoA 2-hydroxylase, PrDH: pristanal dehydrogenase, pTH: peroxisomal thiolase。図は[11]から一部改変して引用。

以上のペルオキシソーム局在性酵素群によって分解、鎖長短縮される基質は、基質特異性の異なる3種類のABCトランスポーター（ATP-binding cassette transporter）であるABCD1、ABCD2、及びABCD3依存的にペルオキシソーム内へと輸送される[12]。ABCD1とABCD2は一部重複した基質特異性を持ち、長鎖から極長鎖型のアシルCoAをペルオキシソーム内に輸送する。ABCD1がC24:0-CoAやC26:0-CoAのような飽和型極長鎖アシルCoAを基質として好むのに対して、ABCD2はC20:0-CoAやC22:0-CoAにより親和性がある。また、ABCD2はC22:6-CoAやC24:6-CoAのような多価不飽和型極長鎖アシルCoAも基質として認識する。一方、ABCD3はジカルボン酸-CoAや分枝脂肪酸-CoA、ならびに胆汁酸前駆体の輸送に関与する[12-16]（Fig. 1）。多くのトランスポーターが12回膜貫通型のタンパク質

であるのに対して、ABCD1、2、及び3は6回膜貫通型であり、ホモダイマーまたはヘテロダイマーとして機能すると考えられている[12, 17, 18]。

ペルオキシソームに局在するタンパク質の欠失やペルオキシソーム形成異常によって引き起こされる疾患は、ペルオキシソーム病と呼ばれる。ペルオキシソーム病は、ペルオキシソームの機能全般が障害されるペルオキシソーム形成異常症と、ペルオキシソームに局在する個々のタンパク質が欠損する単独酵素欠損症に分類される。Zellweger 症候群は代表的なペルオキシソーム形成異常症であり、前述のように生後数ヶ月で死に至る最も重篤なペルオキシソーム病である。単独酵素欠損症としては、ABCD1 欠損症である X 連鎖性副腎白質ジストロフィー (X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) や ABCD3 欠損症、ACOX1 欠損症、ならびに DBP 欠損症などが知られ、いずれも中枢神経系異常をはじめ多彩な臨床像を呈する[5, 6, 10, 16]。このうち、X-ALD は最も発生頻度の高いペルオキシソーム病であり、出生男児およそ 17,000 人に 1 人の割合で発症する[19]。生化学的な所見としてはリグノセリン酸 (C24:0 FA) やセロチン酸 (C26:0 FA) などの VLCFA 増加が認められる。X-ALD には中枢神経障害を呈する小児大脳型 (childhood cerebral type; CC) (30~35%) や思春期大脳型 (4~9%)、成人期大脳型 (20%)、小脳脳幹型 (8%) の他、脊髄障害を呈する副腎脊髄ニューロパチー (adrenomyeloneuropathy; AMN) (25%) や副腎不全のみを示す Addison 型など多彩な臨床型がある。ABCD1 遺伝子変異はすでに 732 種類がデータベース (<http://www.x-ald.nl>) に掲載されているが、この遺伝子変異と臨床型との間には相関がなく、多彩な臨床型は ABCD1 の遺伝子変異型では説明できない。また、VLCFA の蓄積度合と臨床型の重症度も相関せず、大脳型病変部で観察される脱髄に VLCFA がどのように関わっているかも明確ではない[20]。

以上より、ペルオキシソームにおける脂肪酸代謝不全は多くの場合、神経細胞の移動および軸索を取り巻く髄鞘の形成や維持を困難とし、致命的な障害をもたらすと思われる。しかしながら、現在に至るまでペルオキシソームの欠損またはペルオキシソームにおける脂肪酸  $\beta$  酸化機能不全による疾患発症機構の詳細は不明なままであり、ペルオキシソームの機能に関するより詳細な研究が必要とされている。そこで本研究では、ペルオキシソームの生理的、病態生理的役割の解明を目的として種々の検討を行った。本論文は2章から構成されており、第1章ではペルオキシソームが担う脂肪酸代謝の解析、第2章では X-ALD 患者におけるスフィンゴ脂質レベルの変化とそれに伴う細胞機能変化の解析を行った。第1章で著者は、乳酸菌が産生するヒドロキシ脂肪酸がペルオキシソームの  $\beta$  酸化によって代謝されること及びペルオキシソームの脂肪酸酸化消去活性を増大させることを明らかとした。第2章で著者は、X-ALD 患者血漿において飽和型 VLCFA 含有セラミド (ceramide; CER) が有意に増加すること及びこの CER が動物細胞をアポトーシスから回避させることを明らかとした。

## 第1章

腸内細菌が産生するヒドロキシ脂肪酸の  
動物細胞における代謝に関する研究

## 1.1. 序論

ペルオキシソームはすべての真核生物が有する細胞内小器官であり、脂肪酸代謝に関わっている。ペルオキシソームが代謝消去する炭化水素鎖はミトコンドリアのそれよりも幅広い。例えば、VLCFA やエイコサノイド、ジカルボン酸、分枝脂肪酸、及びある種の生体異物などは、ペルオキシソームで専ら酸化消去される炭化水素である[4-7]。これらに加えて、裸子植物に含まれるポリメチレン中断型多価不飽和脂肪酸 (polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acid; PMI-PUFA) もペルオキシソームで鎖長短縮を受ける[21, 22]。例えば、C20 の PMI-PUFA は、ペルオキシソームで2サイクルの $\beta$ 酸化を受けたのち小胞体において鎖長伸長され、リノール酸や $\alpha$ -リノレン酸といった必須脂肪酸へと変換される。すなわちペルオキシソームは、動物にとって一般的でない構造を有する脂肪酸を動物が使用可能な形(必須脂肪酸)にする代謝系に参与する。このようにペルオキシソームにおける脂質代謝は、高等動物の脂質分子の質と量の維持に重要な役割を果たしている。

腸内細菌は宿主が摂取した食物由来の成分を発酵させることで、様々な化合物を腸内で産生することが知られている。これらの発酵産物には宿主の細胞に作用するものもある[23, 24]。例えば、食物繊維の発酵によって産生される酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、FA 特異的な G タンパク質共役型受容体 (GPR) 43 を介して宿主の免疫応答[25]や肥満[26]に影響を与えることが報告されている。また、腸内細菌は脂肪酸も発酵の対象として用いることが知られており、例えばリノール酸 (C18:2 FA) などの多価不飽和脂肪酸は飽和化反応を受けてオレイン酸 (C18:1 FA) へと変換される。Kishino らは最近、乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* AKU1009a がリノール酸をオレイン酸へと変換する過程で、リノール酸の二重結合部分にヒドロキシ基が導入された 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) や 10-hydroxy-octadecanoic acid (HYB) などのヒドロキシ脂肪酸 (hydroxy fatty acids; HFAs) や、カルボニル基が導入された 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA) や 10-oxo-octadecanoic acid (KetoB) などのオキソ脂肪酸 (oxo fatty acids; OFAs) を相当量産生することを報告した (Fig. 2)。HFAs は消化管から吸収され、循環血中においても検出可能な濃度で存在していた[27]。これら腸内細菌によって産生される脂肪酸の、生体や細胞に対する作用について精力的な研究がなされている。例えば、HYA が GPR40 を介して腸管バリア機能を改善すること[28]や KetoA が  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性非選択性カチオンチャネルの transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) を活性化してマウスのエネルギー消費を増大させること[29]、同じく KetoA がペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ ) の活性化を介して脂肪細胞の分化を誘導すること[30]、そして HFAs や OFAs が sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) mRNA 発現を減少させることによって脂質合成に関与するタンパク質の遺伝子発現を減弱させること[31]などが報告されている。これら一連の研究から、腸内細菌が産生する脂肪酸は消化管管腔から生体内、細胞外から細胞内へ

と移行してその作用を発揮しうることが示唆されるが、細胞内に取り込まれた後の代謝的な運命については全く分かっていなかった。

本研究で著者は、腸内細菌が産生する脂肪酸の動物細胞内における代謝について調べることを目的とした。腸内細菌が産生する脂肪酸のうち HFAs は、小腸や大腸だけでなく血中においても検出可能な濃度で存在することが、マウスを用いた実験で明らかとなっている [27]。そこで本研究では HFAs の代謝経路に焦点を当て、種々の実験を行った。

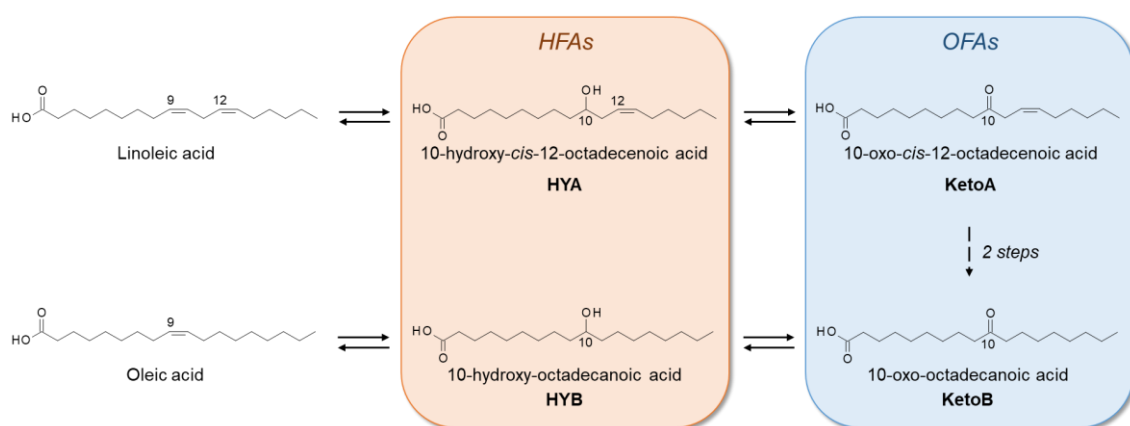


Fig. 2. 腸内細菌によるリノール酸の飽和化反応の概略

乳酸菌などの腸内細菌はリノール酸の $\Delta 9$ 位の二重結合を水和してHYAを産生する。続いて、HYAのヒドロキシ基が酸化されてKetoAとなり、KetoA中の $\Delta 12$ 位の二重結合が飽和化されてKetoBが産生される。KetoBのカルボニル基が還元されてHYBとなり、最終的に脱水されてオレイン酸へと変換される。なお、HYBはオレイン酸の水和反応によっても産生される。HFAs: hydroxy fatty acids, OFAs: oxo fatty acids。



## 1. 2. 実験方法

### 1. 2. 1. 実験試薬

HYA 及び HYB は既報[27]に従い酵素合成した。リノール酸及び 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) は和光純薬工業 (大阪) から購入した。ウシ血清アルブミン (fatty acid-free) (BSA) 及びマルガリン酸 (C17:0 FA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。1,2-Diarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DAPC) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。抗 peroxisomal membrane protein (PMP) 70 抗体 (ab3421)、抗 ACOX1 抗体 (ab184032)、及びヤギ抗ウサギ IgG (Alexa Fluor® 488) (ab150077) は Abcam (Cambridge, UK) から入手した。マウス抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (5174) は Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) 結合ヤギ抗ウサギ IgG (A24531) は Novex® by Life Technologies (Rockville, MD, USA) から、それぞれ購入した。その他の試薬は特級グレードの試薬を使用した。

### 1. 2. 2. 細胞培養及び脂肪酸の添加方法

野生型チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary; CHO) 細胞 (CHO-K1)、MKN74 ヒト胃がん細胞、及び Caco-2 ヒト結腸がん細胞は RIKEN セルバンク (つくば) より入手した。ペルオキシソーム欠損型 CHO 細胞 (CHO-zp102) は既報[21, 22, 32, 33]に従い、peroxisome targeting signal-1 receptor をコードする *Pex5* 遺伝子を欠失させることにより作出した。CHO 細胞は Ham's F-12 培地、MKN74 細胞は RPMI1640 培地、及び Caco-2 細胞は MEM 培地を用いて培養した。10%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS) (Biowest (Noaillé, France)) 及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)) 含有培地に懸濁した各細胞を  $5 \times 10^5$  cells/60-mm dish で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養、実験に使用した。細胞の接着を確認後、種々の濃度の HFAs またはリノール酸を BSA 複合体として培地に添加した。添加する脂肪酸と BSA のモル比が 3:1 となるように調製した[33]。

### 1. 2. 3. 脂質の抽出と分析

培養上清または培養細胞中の脂質は Bligh & Dyer 法[34]により抽出した。抽出時、一定量の DAPC を内部標準物質として加えた。抽出した脂質を 1 mL の 5%塩酸-メタノール試薬に溶解して 100°C で 1 時間加熱し、脂肪酸メチルエステル (FAME) を調製した。得られた FAME はガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。以下に分析条件を示す。

分析機器： Shimadzu GC-15A (島津製作所、京都)  
カラム： DB-225 (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness)  
(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)  
昇温プログラム： 100°C for 0.5 min

100-195°C at 25°C/min  
195-205°C at 3°C/min  
205-240°C at 8°C/min  
240°C for 10 min  
導入部温度： 200°C  
検出器： 水素炎イオン化検出器, 200°C  
キャリアーガス： He, 60 mL/min

一部の実験では薄層クロマトグラフィー (TLC) により脂質を分画した。トリアシルグリセロール (TG) 及び遊離脂肪酸の分画には石油エーテル:ジエチルエーテル:酢酸 = 80:20:1 (v/v/v)を、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 及びホスファチジルコリン (PC) の分画にはクロロホルム:メタノール:28%アンモニア水 = 60:35:8 (v/v/v)を、展開溶媒としてそれぞれ用いた。単離した脂質は上述のように FAME へと変換し、GC で分析した。各脂肪酸量は、内部標準物質として加えた DAPC に由来するアラキジン酸 (C20:0 FA) のピークエリアとそれぞれの脂肪酸のピークエリアの比を取るにより算出した。

#### 1.2.4. 細胞からの HFAs 消失

50 µM の HFAs またはリノール酸で 3 時間細胞を処理した後、培地を脂肪酸不含培地へと交換し、さらにインキュベートした。一定時間後に培地を除去して 0.3% BSA 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、細胞を回収した。上述のように細胞から脂質を抽出し、FAME 調製後、GC 分析を実施した。

#### 1.2.5. HYA 代謝物の同定

50 µM の HYA で 24 時間処理した細胞とその培養上清から脂質を抽出し、上述のように FAME へと変換した。これを石油エーテル:ジエチルエーテル:酢酸 = 80:20:1 (v/v/v)を展開溶媒として TLC で分離した。0.01% プリムリン溶液を TLC プレートに噴霧して UV 下で FAME のバンドを確認し、それぞれのバンドをかきとった後にメタノールで抽出した。溶媒を窒素気流下で留去し、得られた FAME を Sylon BTZ (Sigma-Aldrich) を用いてトリメチルシリル化した。このトリメチルシリル化 FAME を GC-質量分析 (GC-MS) に供した。GC-MS は既報[35]に従い実施した。以下に分析条件を示す。

分析機器： ガスクロマトグラフ；GC-17A (島津製作所、京都)  
質量分析計； GC-MS QP5050 (島津製作所、京都)  
カラム： DB-225 (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness)  
(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)  
昇温プログラム： 100°C for 0.5 min  
100-195°C at 25°C/min

195-205°C at 3°C/min

205-240°C at 8°C/min

240°C for 10 min

導入部温度： 250°C

イオン源温度： 250°C

イオン化法： 電子イオン化法 (70 eV)

キャリアーガス：He, 60 mL/min

#### 1.2.6. 蛍光免疫染色及び共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

細胞を 35-mm のガラスボトムディッシュに  $2 \times 10^5$  cells で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で接着するまで維持した。溶媒、50 µM HYA、または 50 µM リノール酸で 3、6、または 24 時間処理した細胞は、4%パラホルムアルデヒド溶液で 37°C、20 分処理して固定した。1% BSA 含有 PBS で 3 回洗浄した後、固定した細胞を透過処理するために 1% BSA-0.1% Triton X-100 含有 PBS を加え、37°C で 20 分インキュベートした。1% BSA 含有 PBS で洗浄後、抗 PMP70 抗体 (1:600、1% BSA 含有 PBS で希釈) で 37°C で 1 時間処理した。1% BSA 含有 PBS で 3 回洗浄した後、Alexa Fluor® 488 標識化ヤギ抗ウサギ抗体 (1:500、1% BSA 含有 PBS で希釈) でさらに 37°C で 1 時間処理した。再度 1% BSA 含有 PBS で 3 回洗浄した後、DAPI (1 µg/mL in PBS) で 37°C、15 分処理して核を染色し、PBS で洗浄したものをサンプルとして観察した。観察は 63 倍の油浸対物レンズを搭載した共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 700) により実施した。

#### 1.2.7. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは溶媒、50 µM HYA、または 50 µM リノール酸で 24 時間処理した細胞可溶化液を用いて実施した。細胞の可溶化は、lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1% Triton X-100、2 µg/mL aprotinin、2 µg/mL leupeptin、2 µg/mL pepstatin A、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で行い、可溶化液のタンパク質濃度は bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて定量した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は一定量のタンパク質を含むように調製した細胞可溶化液と 10%アクリルアミドゲルを用いて実施した。その後、セミドライ転写装置を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を polyvinylidene difluoride 膜に転写した。転写後の膜は、3% BSA-0.1% Tween 20 含有 20 mM Tris-buffered saline (TTBS、pH 7.4) で 1 時間振盪してブロッキングした。ブロッキングした膜を抗 ACOX1 抗体 (1:600、TTBS で希釈) に浸し、4°C で一晩振盪した後、TTBS で 3 回洗浄した。続いて、膜を抗 GAPDH 抗体 (1:1000、TTBS で希釈) に浸して 1 時間室温で振盪し、再度 TTBS で 3 回洗浄した。HRP 結合ヤギ抗ウサギ抗体 (1:20,000、TTBS で希釈) に浸して室温で 1 時間振盪した。十分に TTBS で洗浄した膜を ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Waukesha,

WI) で処理し、Fuji LAS-4000 imaging system (富士フィルム、東京) によってバンドを検出した。バンドの強度は ImageJ によって定量し、GAPDH 量をローディングコントロールとして補正した。

#### 1.2.8. 細胞の脂肪酸酸化消去活性に及ぼす HYA の効果

MKN74 細胞を 50  $\mu$ M HYA または 50 $\mu$ M リノール酸で 24 時間処理し、その後 50  $\mu$ M マルガリン酸含有培地に交換した。0、3、18、または 24 時間後に細胞とその培養上清を別々に回収し、上述のように脂質抽出、脂肪酸メチルエステルへの変換を行った。細胞または培養上清中のマルガリン酸量を GC で定量した。

#### 1.2.9. 統計解析

2 群間の比較は Student の *t* 検定で行った。3 群間以上の場合は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に Tukey の方法で多重比較を行った。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. HFAs 処理した CHO 細胞の細胞内 HFA レベル

CHO 細胞を 50  $\mu$ M リノール酸 (250 nmol/dish) と共に 24 時間インキュベートすると、野生型細胞 (CHO-K1)、ペルオキシソーム欠損型細胞 (CHO-zp102) とともに顕著にリノール酸を蓄積した (Fig. 3A)。このとき、両細胞間で蓄積したリノール酸量に差はみられなかった (Fig. 3D)。一方、HFAs と共に 24 時間インキュベートした場合、両細胞共にリノール酸ほどは HFA を蓄積しなかった (Fig. 3B, C)、このとき、細胞間で比較すると、ペルオキシソーム欠損型細胞の方が野生型細胞よりも有意に HFA を蓄積した (Fig. 3E, F)。

CHO 細胞に取り込ませた脂肪酸の脂質クラス分布を調べたところ、リノール酸は PC や PE、及び TG にアシル化されており、このうち TG に最も多く分布した (Fig. 3G) 一方で、HFAs は PC 及び PE にのみアシル化されており、TG へのアシル化や遊離脂肪酸としての存在は確認されなかった (Fig. 3H, I)。なお、TLC 分画の際に TG のバンドが検出されたのはリノール酸で処理した細胞由来の脂質のみであり、HFA で処理した細胞由来の脂質中 TG は検出限界未満だった。野生型細胞の PC 及び PE にアシル化された HFAs 量と比較して、ペルオキシソーム欠損細胞のそれらは有意に多かった (Fig. 3H, I)。これらの結果から、細胞内に取り込まれた HFA の代謝経路がリノール酸のそれとは異なること、ペルオキシソーム欠損細胞の方が野生型細胞よりも HFA を蓄積することが示唆された。

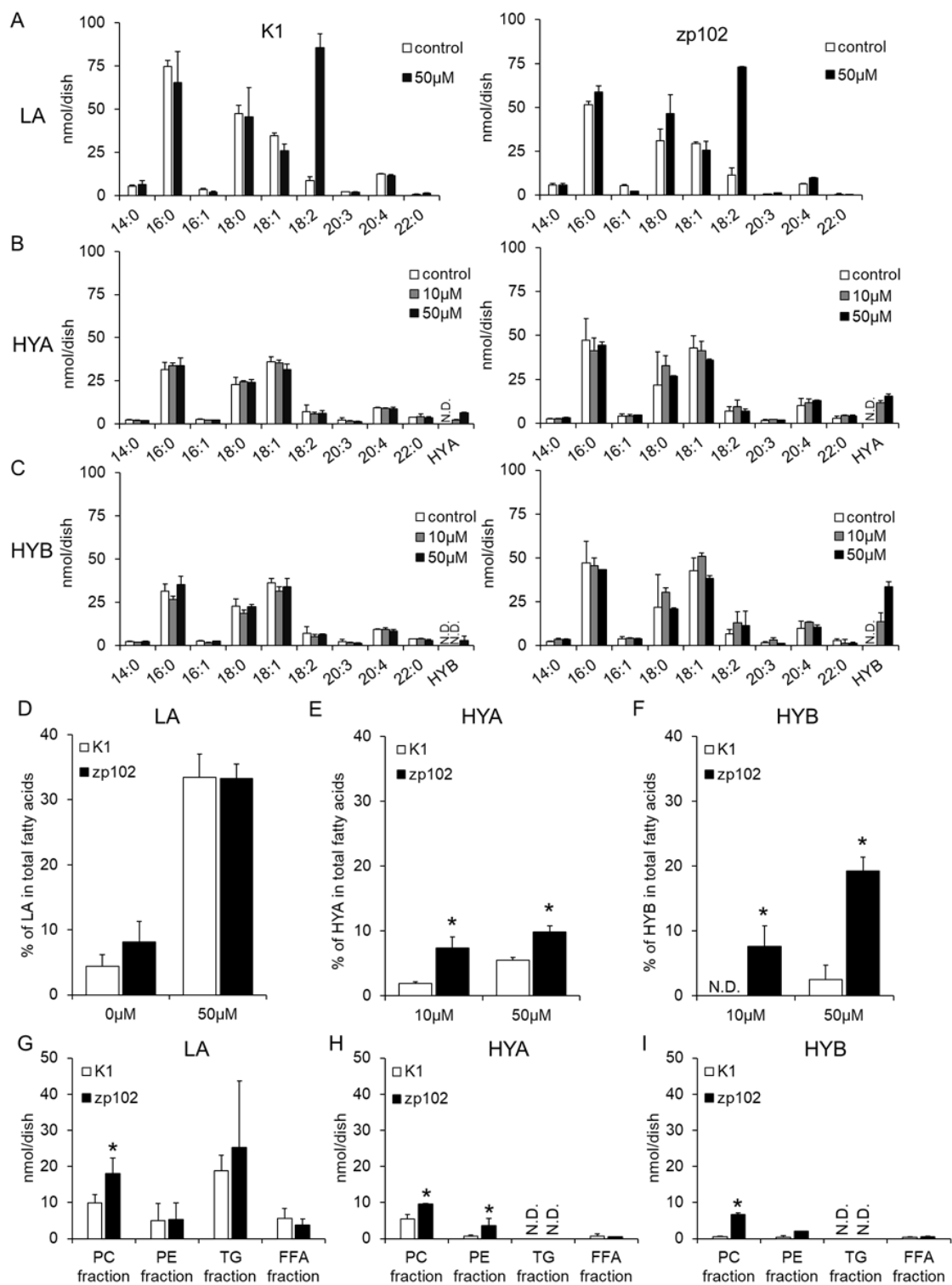


Fig. 3. リノール酸、HYA、または HYB 処理した細胞中脂質の脂肪酸プロファイル

野生型 (CHO-K1) 及びペルオキシソーム欠損型 (CHO-zp102) 細胞を種々濃度のリノール酸 (A)、HYA (B)、または HYB (C) とともに 24 時間インキュベートした。細胞脂質の脂肪酸組成を GC によって定量した。(D-F) 細胞脂質由来総脂肪酸に対するリノール酸 (D)、HYA (E)、または HYB

(F) の割合。(G-I) TLC を用いて分画した脂質クラスごとのリノール酸 (G)、HYA (H)、または HYB (I) 量。PC; phosphatidylcholine, PE; phosphatidylethanolamine, TG; triacylglycerol, FFA; free fatty acid, N.D.; not detected。

グラフは平均値±標準偏差 ( $n=3$ ) で示し、 $P$  値は Student の  $t$  検定で算出した。アスタリスク (\*) は対応する CHO-K1 細胞の値に対して  $P<0.05$  であることを意味する。

### 1.3.2. CHO 細胞におけるペルオキシソーム依存的な HFAs の消失

野生型及びペルオキシソーム欠損型細胞に脂肪酸を取り込ませ、その後の細胞からの消失を追跡した。野生型細胞を  $50 \mu\text{M}$  のリノール酸 ( $250 \text{ nmol/dish}$ ) で 3 時間処理した時の細胞内に蓄積したリノール酸は、約  $15 \text{ nmol/dish}$  だった。この細胞をリノール酸不含培地でさらに 24 時間まで培養した時、細胞内のリノール酸レベルはほとんど変化しなかった。同様の結果がペルオキシソーム欠損細胞を用いた実験からも得られた (Fig. 4A)。対照的に、3 時間の  $50 \mu\text{M}$  HYA 処理によって野生型細胞に蓄積した HYA (約  $2.2 \text{ nmol/dish}$ ) は、18 時間で約 80% が消失した。しかしながら、ペルオキシソーム欠損細胞の場合、3 時間の前培養中に取り込んだ HYA ( $2.5 \text{ nmol/dish}$ ) は、24 時間後も変わらず残存していた (Fig. 4B)。同様の結果が HYB を用いた実験でも得られた (Fig. 4C)。すなわち、リノール酸とは異なり、HFAs はペルオキシソーム依存的に代謝消去されることが示唆された。

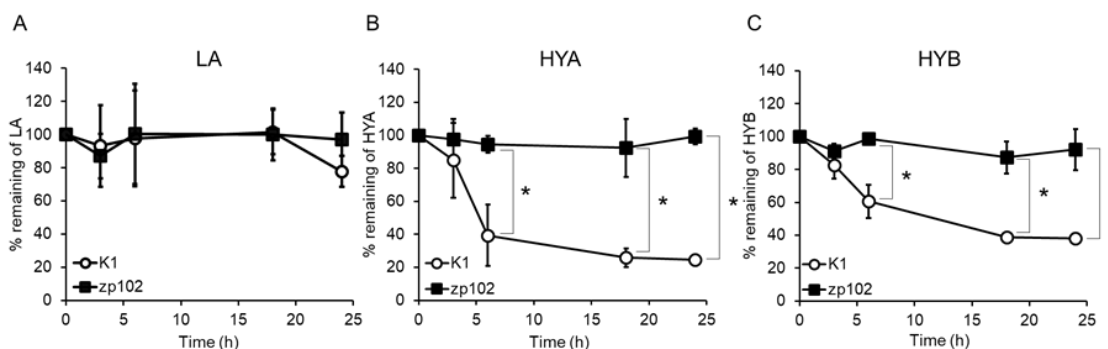


Fig. 4. CHO 細胞が取り込んだ脂肪酸の時間依存的な変動

野生型 (CHO-K1) 及びペルオキシソーム欠損型 (CHO-zp102) 細胞を  $50 \mu\text{M}$  のリノール酸 (A)、HYA (B)、もしくは HYB (C) 含有培地で 3 時間インキュベートし、これらの脂肪酸を取り込ませた。その後、脂肪酸不含培地に交換してさらに 24 時間までインキュベートした。グラフの横軸と縦軸の起点はそれぞれ、脂肪酸不含培地に交換した時間、3 時間のインキュベートで蓄積した脂肪酸量に対する相対値とした。

各点は平均値±標準偏差 ( $n=3$ ) で示し、 $P$  値は Student の  $t$  検定で算出した ( $*P<0.05$ )。

### 1.3.3. CHO 細胞の培養系中からのペルオキシソーム依存的な HFAs の消失

CHO 細胞内外における HFAs の量的変化を調べるため、CHO 細胞の培地に脂肪酸を添加し、一定時間後の細胞または培養上清中の脂肪酸を分析した。野生型 CHO-K1 細胞にリノール酸を添加した時、インキュベート時間依存的に培地からリノール酸が消失した。この減少量は細胞内で増加したリノール酸量と一致し、結果として、24 時間のインキュベーションで培養系中から完全に消失したリノール酸量は添加量 (250 nmol) の約 5% だった (Fig. 5A, ○)。同様の結果がペルオキシソーム欠損型 CHO-zp102 細胞を用いた実験でも得られ (Fig. 5A, ■)、両細胞間でリノール酸の挙動に差はなかった。すなわち、Fig. 5 でも観察されたように、リノール酸の主要な代謝運命は細胞脂質へのアシル化であると思われる。培養上清からの HFAs の減少の推移は、野生型とペルオキシソーム欠損型間で大きく異なっていた。HYA を添加したペルオキシソーム欠損細胞において、24 時間後の培地からの減少量と細胞内の増加量はそれぞれ、40 nmol と 15 nmol だった。すなわち、培養系中からの完全な消失量は 25 nmol であり、これは添加した HYA (250 nmol) の 10% に相当する (Fig. 5B, ■)。一方、野生型細胞の培養系からの消失量は 110 nmol であった。すなわち添加した HYA の約 44% が培養系中から完全に消失していた。これは、細胞内の蓄積量 (10 nmol 以下) と培地からの減少量 (120 nmol) の不釣り合いに基因する (Fig. 5B, ○)。HYB を用いた実験からも同様の結果が得られた (Fig. 5C)。これらの結果からも、腸内細菌が産生する HFAs がペルオキシソーム依存的に消去されることが示唆される。驚くべきことに、培地から消失した HYA 量 (120 nmol) は細胞脂質を構成する脂肪酸の総量 (118 nmol, Fig. 5B) とほぼ同等であった。すなわち、この実験条件下では細胞内総脂肪酸量に相当する HFAs がペルオキシソーム依存的に消去されたことになる。



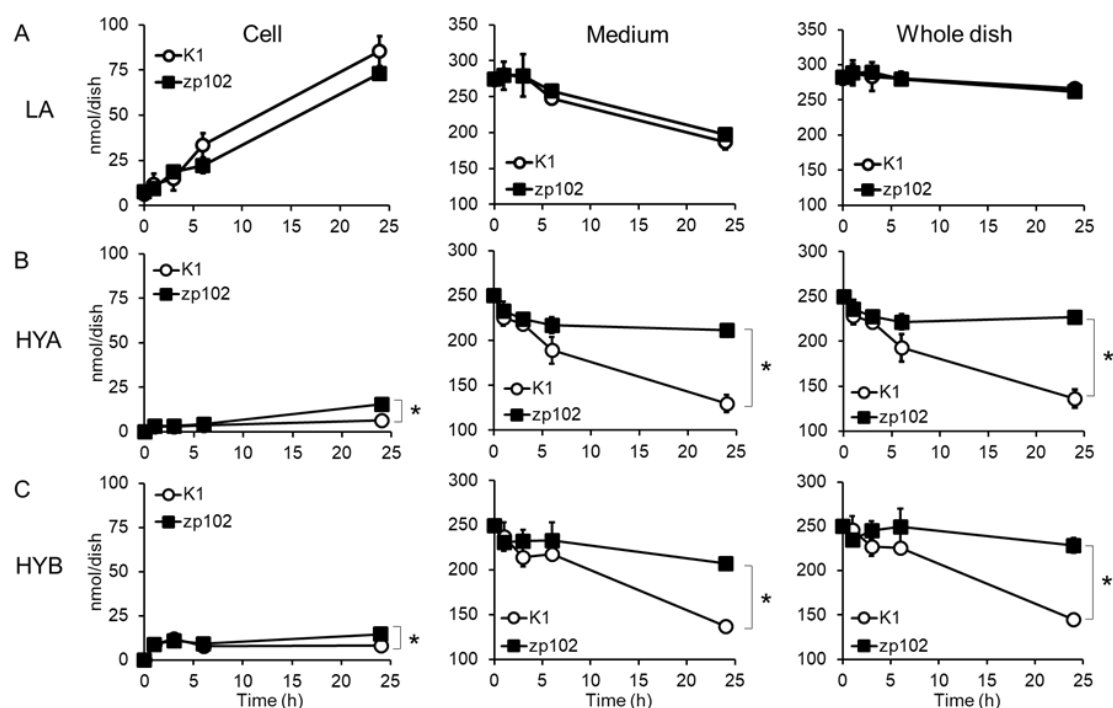


Fig. 5. CHO 細胞内及び培養上清中 HFAs 量の時間依存的な変動

野生型 (CHO-K1) 及びペルオキシソーム欠損型 (CHJO-zp102) 細胞を 50  $\mu$ M のリノール酸 (A)、HYA (B)、もしくは HYB (C) 含有培地でインキュベートした。細胞と培養上清を別々に回収して脂質を抽出し、脂肪酸分析に供した。右の列 (Whole dish) は、各点における細胞内外の脂肪酸量の和である。

各点は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) で示し、 $P$  値は Student の  $t$  検定で算出した (\* $P<0.05$ )。

### 1.3.4. CHO 細胞における HYA 代謝物の同定

HYA は乳酸菌が示すリノール酸飽和化反応における第一産物であり、動物体内においても最も豊富に存在する HFA である[27]。したがって、以降の実験では HYA を腸内細菌が産生する HFAs の代表として使用することとした。

HYA を添加して一定時間後の CHO 細胞とその培養上清から別々に FAMES を調製した。HYA 代謝物を探索するためにこの FAMES を TLC に供したところ、野生型 CHO-K1 細胞の培養上清から調製した FAMES においてのみ、HYA メチルエステルのバンドの直下に 2 本のバンドが検出された (Fig. 6A)。この 2 本のバンド (upper 及び lower) 及び HYA メチルエステルのバンドから脂質を回収し、トリメチルシリル誘導体化後に GC-MS で分析した。トリメチルシリル化 HYA メチルエステルのマススペクトル (Fig. 6C) は既報[36]と一致した。特徴的なフラグメントイオンはヒドロキシ基が結合した炭素の両隣で開裂したイオンであり、 $\omega$  末端を含むフラグメント ( $m/z$  213)、カルボン酸末端を含むフラグメント ( $m/z$

273)、及びその脱メトキシ体 ( $m/z$  169) として帰属可能である。TLC で上部に位置する upper バンドのマススペクトルでは  $m/z$  245 及び  $m/z$  141 が (Fig. 6E)、lower バンドのマススペクトルでは  $m/z$  217 及び  $m/z$  113 が (Fig. 6G)、それぞれ  $m/z$  213 に加えて検出された。 $m/z$  273 と  $m/z$  245 及び  $m/z$  169 と  $m/z$  141 の差は 28、 $m/z$  273 と  $m/z$  217 及び  $m/z$  169 と  $m/z$  113 の差は 56 であり、この質量数は C2-、C4-メチレンユニットに相当する。したがって upper バンド中のマススペクトルは 8-hydroxy-cis-10-hexadecenoic acid、lower バンド中のそれは 6-hydroxy-cis-8-tetradecenoic acid とそれぞれ帰属できる。これらは HYA が 1 及び 2 サイクルの  $\beta$  酸化を受けたときに産生される化合物に相当する。これらは野生型 CHO-K1 細胞の培養上清においてのみ検出され、ペルオキシソーム欠損型 CHO-zp102 細胞の培養上清や両細胞の細胞脂質からは全く検出されなかった (データ非掲載)。以上より、HYA はペルオキシソームにおいて少なくとも 1~2 サイクルの  $\beta$  酸化を受けており、その一部は細胞外へ放出されることが明らかとなった。

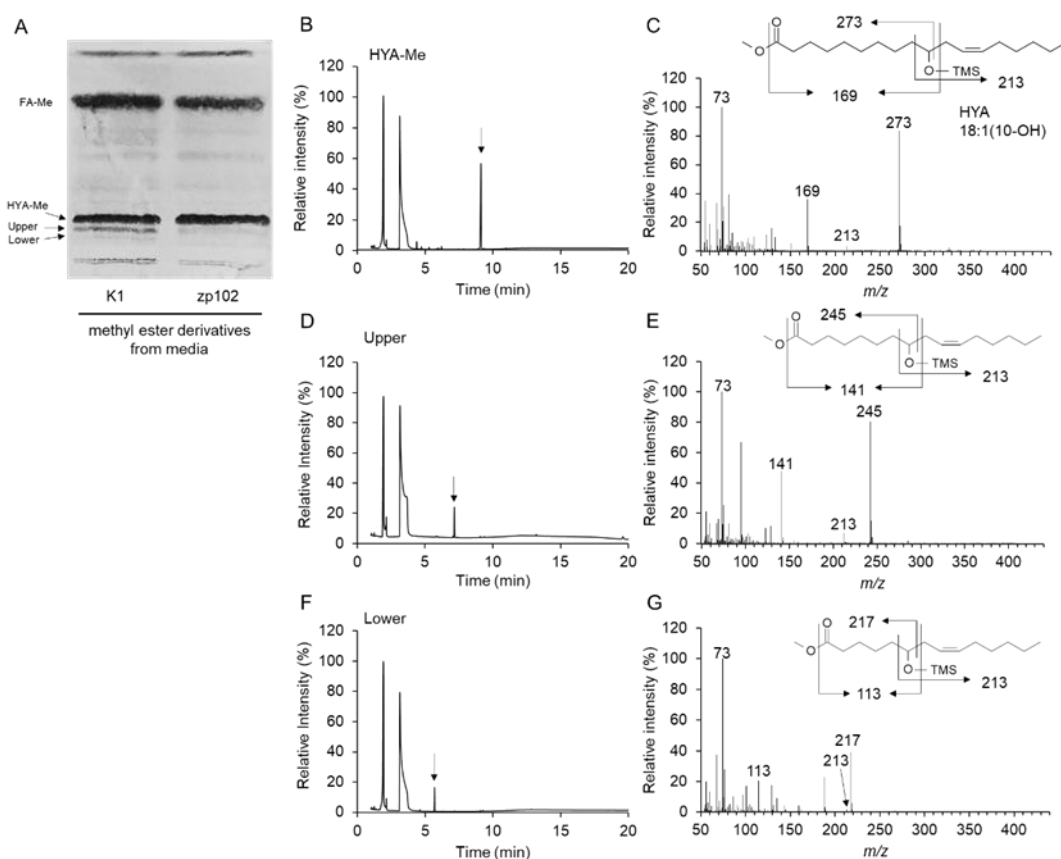


Fig. 6. HYA 代謝物の TLC と GC-MS

野生型 (CHO-K1) 及びペルオキシソーム欠損型 (CHO-zp102) 細胞に HYA を添加し、一定時間経過後の培養上清から脂質を抽出、FAMES を調製した。これを TLC に供し (展開溶媒; 石油エーテル:ジエチルエーテル:酢酸=80:20:1)、HYA メチルエステルとその直下の 2 本のバンド (upper と lower) を別個にかきとり、メタノールで抽出した。これらをトリメチルシリル誘導体化して GC-

MSで分析した。(A) 代表的な TLC 画像。TLC から単離してトリメチルシリル誘導体化した HYA メチルエステル (B,C)、upper (D,E)、及び lower (F,G) のトータルイオンクロマトグラムと矢印で示したピークのマススペクトル。それぞれのマススペクトル上部にフラグメントイオンから推定される構造式を示した。なお、5分より手前に検出されたピークはトリメチルシリル化試薬に由来するピークである。

### 1.3.5. HFA 処理が CHO 細胞のペルオキシソームの数に及ぼす作用の解析

Fig. 5 において、HFAs の消失速度は前半 (0~6 時間) と後半 (6~24 時間) で異なっており、後半においてその消失が加速しているように思われた。この所見から HFAs 処理によってペルオキシソーム数が増加するのではないかと考え、その可能性を検証した。ペルオキシソーム膜に局在するトランスポータータンパク質の PMP70 に特異的な抗体を用いて蛍光免疫染色を実施したところ、HYA 処理した野生型細胞においてペルオキシソーム数 (緑のドット) が増加したように思われた。この増加は特に、細胞核近傍で顕著であった (Fig. 7A-D)。本研究で使用したペルオキシソーム欠損型細胞 (CHO-zp102) は PMP70 を含有するがペルオキシソーム機能を有さない膜構造物、いわゆるペルオキシソームゴーストを有することが報告されている [32, 37]。本研究においても CHO-zp102 細胞は PMP70 陽性の構造体を有していたが、これらの数は HYA 処理によって変化しなかった (Fig. 7F-I)。野生型 CHO-K1 細胞のペルオキシソーム数に対するリノール酸の作用は、HYA の作用と比較して弱かった (Fig. 7E)。また、ペルオキシソーム欠損 CHO-zp102 細胞におけるペルオキシソームゴーストの数は、リノール酸処理においても変化しなかった (Fig. 7J)。これらの結果から、HFAs はペルオキシソームの生合成を増強することが示唆された。

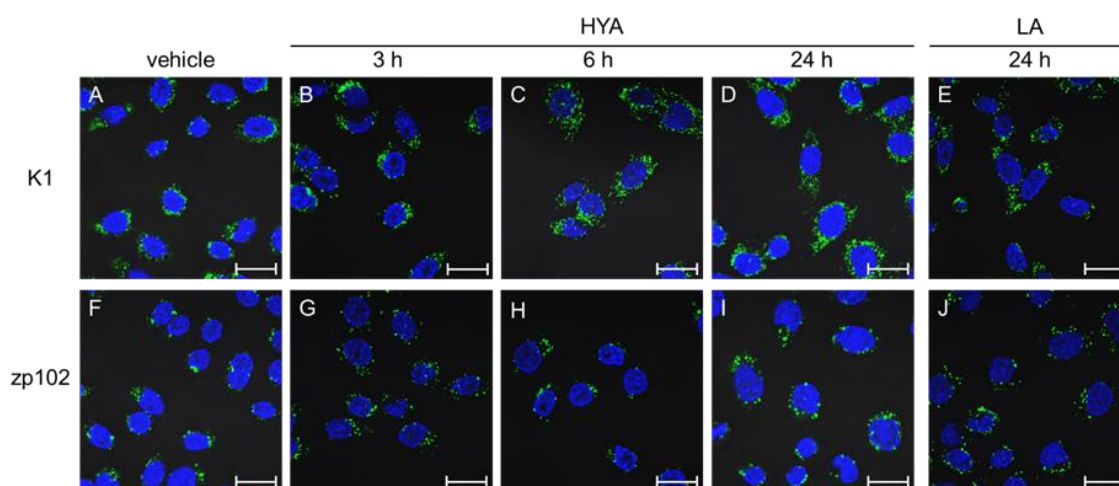


Fig. 7. CHO 細胞のペルオキシソーム数に対する脂肪酸の作用

野生型 (CHO-K1) 及びペルオキシソーム欠損型 (CHO-zp102) 細胞を溶媒 (A, F)、50  $\mu$ M HYA (B-D, G-I)、または 50  $\mu$ M リノール酸 (E, J) で示した時間処理した。ペルオキシソームは、その

局在タンパク質の PMP70 に特異的に結合する抗体を用いて染色した (緑)。核は DAPI で染色した (青)。スケールバー：20  $\mu\text{m}$

### 1.3.6. ヒト消化管細胞の培養系中からのペルオキシソーム依存的な HFAs の消失

腸内細菌が放出する HFAs が最初に接触するのは消化管上皮細胞である。ヒト消化管細胞における HFA の代謝を調べるため、ヒト消化管由来の培養細胞のうち、中分化型管状胃腺がん由来 MKN74 細胞及び結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて実験を行った。MKN74 細胞の培地にリノール酸を添加した時、リノール酸の培地からの減少量と細胞内の増加量はほぼ一致しており、添加後 24 時間で培養系中から完全に消失したリノール酸量は添加量の 8% だった (Fig. 8A, ○)。一方、HYA はリノール酸と同様に培地から消失していったが、細胞内にはほとんど蓄積せず、24 時間のインキュベート時間中に培養系から完全に消失した HYA は添加量の 41% になった。これはリノール酸消失量の 5 倍量である (Fig. 8A, ●)。同様の結果が Caco-2 細胞を用いた実験からも得られた (Fig. 8B)。これより、げっ歯類細胞 (CHO-K1) だけでなくヒト消化管細胞においても、HFAs の代謝にはペルオキシソームでの  $\beta$  酸化が主として寄与することが明らかとなった。

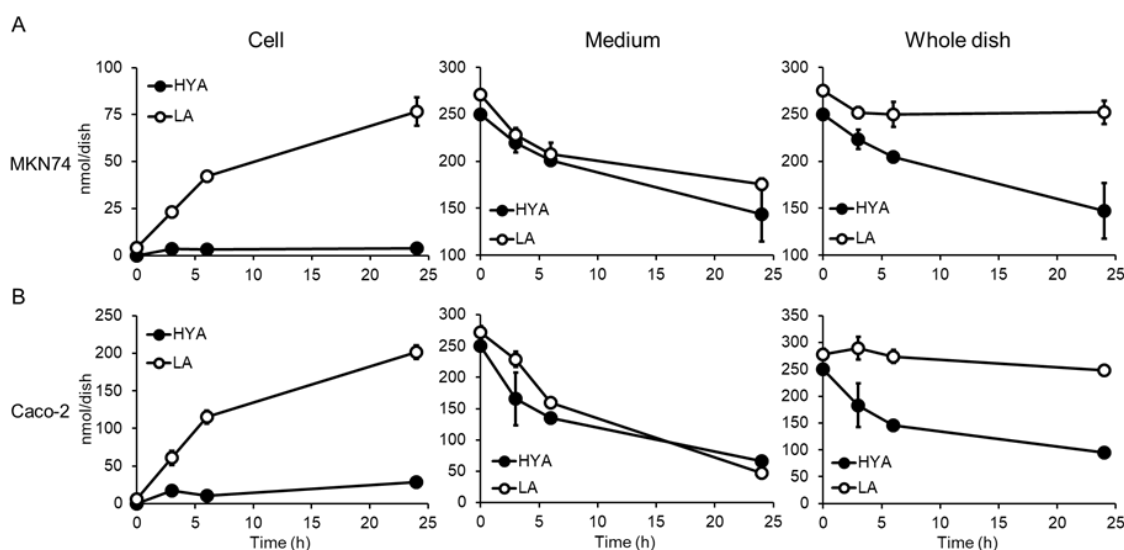


Fig. 8. ヒト消化管由来細胞の細胞内及び培養上清中 HFAs 量の時間依存的な変動

MKN74 (A) 及び Caco-2 (B) 細胞を 50  $\mu\text{M}$  HYA またはリノール酸で処理し、一定時間後に細胞と培養上清を別個に回収した。それらから脂質を抽出し、メチルエステルへと変換後、GC に供した。右の列 (Whole dish) は、各点における細胞内外の脂肪酸量の和である。各点は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) で示した。

### 1.3.7. HFA 処理がヒト消化管由来細胞のペルオキシソーム数に及ぼす作用の解析

MKN74 細胞及び Caco-2 細胞の PMP70 (ペルオキシソームマーカー) を、特異的抗体を用いて蛍光免疫染色した。CHO-K1 細胞の時と同様に、消化管細胞においても、HYA 処理によって PMP70 に由来する蛍光、すなわちペルオキシソームの数が時間依存的に増加した。また、リノール酸処理ではペルオキシソーム数に変化はなかった (Fig. 9)。よって、HFAs はヒト消化管細胞においてもペルオキシソームの生合成を活性化させることが示唆された。

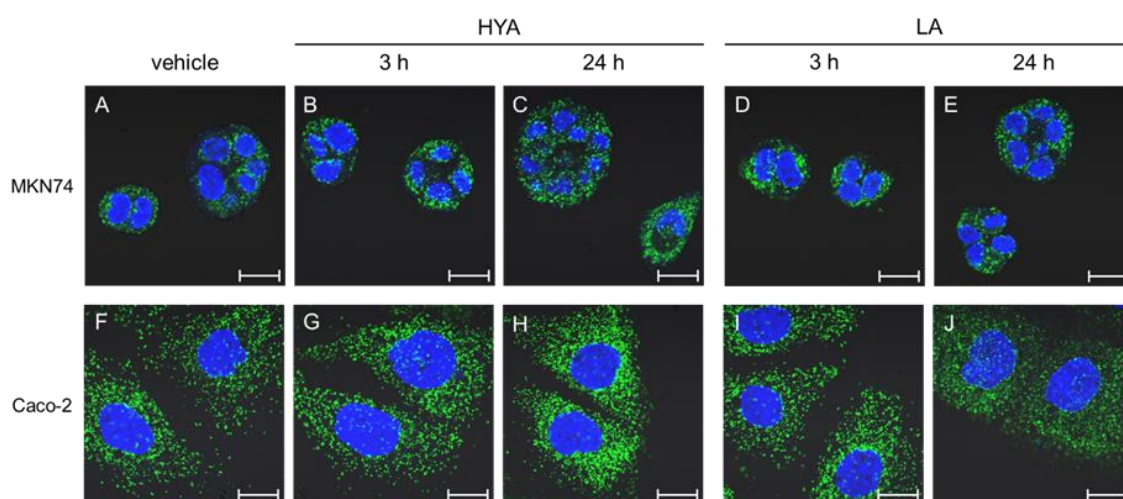


Fig. 9. ヒト消化管由来の細胞のペルオキシソームに対する脂肪酸の作用

MKN74 細胞及び Caco-2 細胞を溶媒 (A, F)、HYA (B, C, G, H)、またはリノール酸 (D, E, I, J) で3または24時間処理した。ペルオキシソームは、その局在タンパク質の PMP70 に特異的に結合する抗体を用いて染色した (緑)。核は DAPI で染色した (青)。スケールバー：20  $\mu\text{m}$

### 1.3.8. ヒト消化管細胞のペルオキシソームにおける脂肪酸 $\beta$ 酸化活性に及ぼす HFAs の影響

アシル CoA オキシダーゼ 1 (ACOX1) はペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化の律速酵素である。Fig. 9 において、ヒト消化管細胞のペルオキシソーム数が HYA 処理によって増加したことから、HYA が ACOX1 タンパク質を増加させるのかウェスタンブロッティングにより確認した。その結果、HYA で24時間処理した時、両細胞において ACOX1 タンパク質量が有意に増加した。一方、リノール酸処理と溶媒処理間では ACOX1 量に差はなかった (Fig. 10A-D)。さらに、HYA 処理によって脂肪酸代謝活性が増強されるかを、HYA またはリノール酸で前処理した MKN74 細胞で調べた。培養上清からのマルガリン酸減少量は、HYA、リノール酸どちらで処理した細胞でも同程度であった。しかしながら、HYA で前処理した細胞では、細胞内マルガリン酸量がリノール酸で前処理した細胞のそれと比較して約半分だった (Fig. 10E)。マルガリン酸の鎖長伸長物は若干量検出されたが、両細胞間で有

意な差は観察されなかった（データ非掲載）。以上より、HYA はペルオキシソーム生合成を増強して脂肪酸  $\beta$  酸化活性を増大させることが明らかとなった。

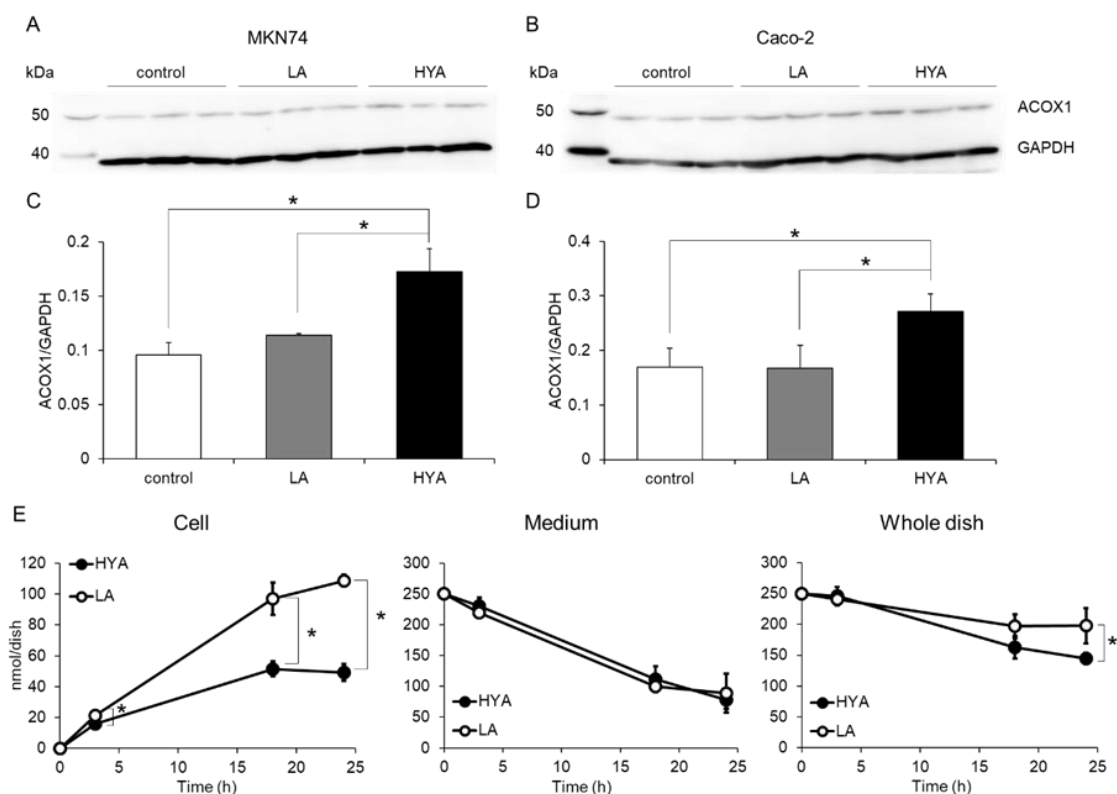


Fig. 10. ヒト消化管細胞におけるアシル CoA オキシダーゼタンパク質量及び脂肪酸酸化除去活性に対する HYA の作用

溶媒、50  $\mu$ M リノール酸、または HYA で 24 時間処理した MKN74 及び Caco-2 細胞を可溶化し、ウェスタンブロッティングに供した。(A, B) MKN74 (A) 及び Caco-2 (B) 細胞可溶化液を用いて実施したウェスタンブロッティングの代表的な画像。(C, D) MKN74 (C) 及び Caco-2 (D) 細胞の ACOX1 量。それぞれの ACOX1 のバンド強度を GAPDH のそれで除することにより補正した。各群の値は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$  for MKN74,  $n = 6$  for Caco-2) で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した ( $*P < 0.05$ )。(E) MKN74 細胞の細胞内及び培養上清中マルガリン酸量の時間依存的な変動。50  $\mu$ M HYA またはリノール酸で 24 時間前処理した細胞に 50  $\mu$ M マルガリン酸を添加し、一定時間後に細胞と培養上清を別個に回収した。それらから脂質を抽出して FAMES へと変換後、GC に供した。右の列 (Whole dish) は、各点における細胞内外の脂肪酸量の和である。各点は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) で示し、 $P$  値は Student の  $t$  検定で算出した ( $*P < 0.05$ )。

#### 1.4. 考察

腸内細菌の一種である乳酸菌の *Lactobacillus plantarum* は、不飽和脂肪酸の二重結合を単結合へと変換、すなわち飽和化する過程で HFAs を相当量産生する[27]。HFAs は GPR40 [28, 38]や GPR120[39]のリガンドとして作用し、哺乳類細胞の機能に影響を与えることが示されている。本研究で著者は、HFAs の動物細胞における代謝経路について調べた。

HFAs がペルオキシソームの  $\beta$  酸化によって専ら代謝されることを、著者は明らかとした。本結論は以下の知見により導かれる。すなわち、1) 野生型 CHO-K1 細胞が HFAs を細胞内に保持しなかったのに対し、ペルオキシソーム欠損型 CHO-zp102 細胞は保持したこと (Fig. 3, 4)、2) 添加した HYA の培養系中からの消失量は野生型細胞と比べ、ペルオキシソーム欠損細胞で著しく減弱していること (Fig. 5)、及び 3) HYA の C2、C4 鎖長短縮物が野生型細胞においてのみ検出されたことである (Fig. 6)。ペルオキシソームは VLCFA やジカルボン酸、分枝脂肪酸、及びある種の生体異物を酸化消去することが知られている[4-7]。さらに、プロスタグランジン類[40, 41]やトロンボキササン B<sub>2</sub>[42]、ロイコトリエン類[43, 44]、ヒドロキシエイコサテトラエン酸[45]、及び PMI-PUFA[21, 22]などもまた、ペルオキシソーム依存的に代謝される。本研究で著者は初めて、腸内細菌が産生する HFAs がペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化によって鎖長短縮を受けることを証明した。

細胞内に取り込まれた HFAs は TG や遊離脂肪酸としてではなく、PC や PE にアシル化されていた一方で、取り込まれたリノール酸の大部分が TG にアシル化されていた。PC や PE は細胞膜を構成する主要なリン脂質であることから、HFAs がこれらにアシル化されることで膜の性質や、そこに局在する酵素の活性などに影響を及ぼすかどうか、調べていく必要がある。

$\alpha$  酸化及び  $\beta$  酸化は、ペルオキシソームにおける脂肪酸分解経路として機能する。本研究で著者は、HYA が C2-及び C4-メチレンユニット分鎖長短縮を受けた代謝物を、野生型 CHO-K1 細胞の培養上清から同定した。この時、奇数鎖長の HYA 代謝物は検出されなかったことから、HFAs はペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化によって鎖長短縮されると考えられる。野生型細胞において検出された HYA の C2、C4 鎖長短縮物量は、培地から完全に消失した HYA の約 20%であった (データ非掲載)。その他の代謝物の構造は明らかとできなかったが、これらはさらにペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化を受けて鎖長短縮されるのかもしれない。過去に、哺乳類におけるリノール酸代謝物の一つとして、tetrahydro-2,5-furan-diacetic acid が報告されている[46]。リノール酸 (12-hydroxy-cis-9-octadecenoic acid) は HYA の位置異性体なので、類似の構造を有する代謝物が HYA から作られると予想した。しかしながら、当該または類似化合物の検出を目的として実施した質量分析からは、良好な結果は得

られていない。動物細胞における HYA の最終代謝産物を決定づけるにはさらなる研究を必要とする。

培養系中から消失した総脂肪酸量のうち、ペルオキシソームによって酸化消去された脂肪酸量はペルオキシソーム欠損細胞と野生型細胞間での消失量の比較により推定可能である。本研究において、24 時間のうちにペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化によって消去された HFAs 量は細胞脂質に含まれる脂肪酸量と同等であった (Fig. 5)。このように大量の HFAs が急速に消去された要因の一つは、ペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化活性の増強であると思われる。この結論は、1) HYA 処理した細胞内でペルオキシソーム生合成が誘導されたこと (Fig. 7, 9) 及び 2) ACOX1 タンパク質量や脂肪酸酸化消去活性が HYA 処理によって増大したこと (Fig. 10) から導かれる。本研究ではペルオキシソーム及びその関連酵素量の増加メカニズムについては明らかとできていないものの、HYA は PPAR[30]や TRPV1[29]のリガンドとして作用すること、これら受容体活性化の下流でペルオキシソームの  $\beta$  酸化が増強されること[47, 48]から、HYA は PPAR や TRPV1 に作用することで脂肪酸酸化活性を増強させたと考えられる。

Specific pathogen free 条件下で無菌飼料を摂餌させたマウスの血漿における HYA 濃度は、およそ 50 nM であると報告されている[27]。したがって、本研究で用いた 10  $\mu$ M 及び 50  $\mu$ M の HFA は、かなり高濃度であるかもしれない。しかしながら、食物の消化を司る胃や腸の上皮細胞は、より高濃度の微生物代謝物に曝露していると思われる。我々は、1 日に約 13 g のリノール酸を食事から摂取しており[49]、そのうちの 25%が HFAs へと変換される[35]。また、消化管管腔への外分泌液及び食事からの水分摂取量の総和がおおよそ 10 L/day であること[50]を考慮すると、消化管管腔におけるリノール酸や HFAs 濃度はサブ mM 程度まで到達する可能性がある。

脂質異常症は心血管疾患の重大なリスクファクターである。血中 TG 値を改善する戦略の一つとして、ペルオキシソーム機能増強が挙げられる。フィブラート系化合物[47]に加え、エイコサペンタエン酸[51]やドコサヘキサエン酸[52]を含有する魚油がペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化活性を増強することが知られており、実際、これらは脂質異常症治療薬として広く用いられている。本研究で著者は、腸内細菌が産生する HFAs で消化管細胞や動物細胞を刺激することにより、ペルオキシソームでの  $\beta$  酸化活性が増強されることを示した。また、この効果により外因性 HFAs だけでなく、内因性飽和脂肪酸の  $\beta$  酸化による消去が亢進することも示した。消化管に存在する細菌はこのような化合物放出を介し、我々の脂質代謝能に影響を与えている可能性がある。

本研究をまとめると、腸内細菌が産生する HFAs がペルオキシソームでの  $\beta$  酸化によって



鎖長短縮されること、及び HFA 処理によってペルオキシソームの  $\beta$  酸化活性が増強されることを、著者は明らかとした (Fig. 11)。今後さらに研究が進むことにより、腸内細菌由来脂肪酸が脂質異常症予防や治療薬へ応用されることが期待される。

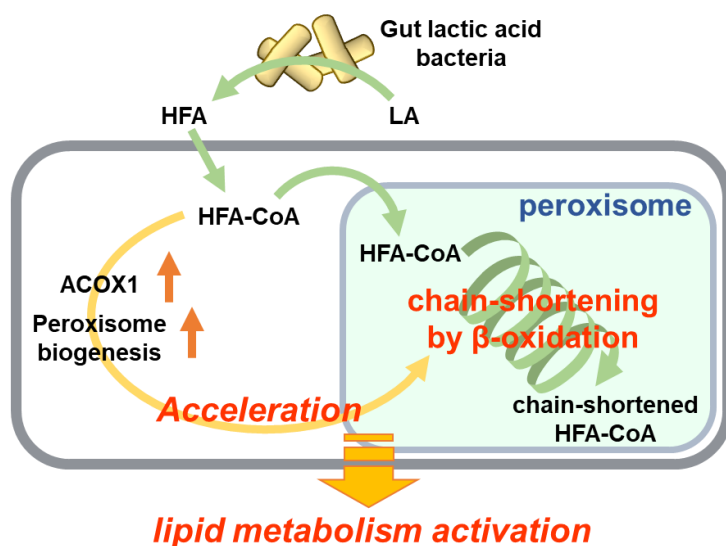


Fig. 11. 腸内細菌が産生するリノール酸代謝物の細胞内における分解経路と脂質代謝増強作用の概略図

乳酸菌などの腸内細菌は食事性に摂取されたリノール酸から HFA を産生する。これらは細胞に取り込まれた後、ペルオキシソームで鎖長短縮を受ける一方でペルオキシソームの数及び脂肪酸代謝関連酵素量を増大させる。結果として、HFA の代謝が促進されるとともに他の脂肪酸酸化消去活性も増強され、宿主の脂質代謝能が向上すると予想される。

## 第2章

X連鎖性副腎白質ジストロフィー患者血漿における  
セラミド種の分析とその主要分子種の細胞に与える  
影響に関する研究

## 2.1. 序論

炭素数 22 以上の脂肪酸は極長鎖脂肪酸 (VLCFA) と呼ばれ、炭素数 12 以上の長鎖脂肪酸の中でも別のカテゴリーとして認識されている。哺乳類における主要な VLCFA はリグノセリン酸 (C24:0 FA) 及びネルボン酸 (C24:1 FA) であり[53]、これらの多くは、ほとんどの組織においてスフィンゴ脂質の *N*-アシル基として存在する。例えば、ヒトの脳白質中スフィンゴミエリン (SphM) の約 3 分の 1 が C24:0 FA または C24:1 FA を含有する。また、脳白質のガングリオシドやセレブロシドなど、その他のスフィンゴ脂質も VLCFA を豊富に含むことが知られている[54]。

動物細胞内において、VLCFA はペルオキシソームによって分解される[4-7]。緒言で述べたように、VLCFA はミトコンドリアでは代謝されずペルオキシソームでのみ酸化分解されるので、ペルオキシソーム形成異常症や VLCFA 代謝に関与するタンパク質の欠損症 (単独酵素欠損症) では全身性に VLCFA が蓄積する。また、VLCFA の蓄積との関連は明確ではないが、多くのペルオキシソーム病では中枢神経系異常が見られる[5, 6, 10, 16]。

ペルオキシソーム病の中で最も発生頻度が高いものとして X 連鎖性副腎白質ジストロフィー (X-ALD) が挙げられる。X-ALD もまた、血漿や組織中 VLCFA 値、とりわけ C24:0 FA やセロチン酸 (C26:0 FA) の増加[55]や、中枢/末梢神経における脱髄及び副腎不全によって特徴づけられる[19, 20, 56, 57]。このことから、ペルオキシソームにおける VLCFA 代謝は神経機能の維持において重要な役割を担うことが容易に想像されるが、VLCFA 蓄積によって引き起こされる脱髄/神経変性の詳細なメカニズムは明らかとなっていない[20]。また、X-ALD には様々な臨床型が知られており、最も予後不良の小児大脳型 (CC) と比較的軽症で病状の進行も緩徐な副腎脊髄ニューロパチー (AMN) が主要な臨床型であるが、VLCFA 蓄積量と臨床型、その症状の進行に相関性がなく [58]、臨床型や予後の決定要因は不明である。すなわち、脂質クラスごとの VLCFA レベルと臨床症状間の関連について、より詳細に調べる必要があると考えられる。これまでにグリセロ型脂質を対象とした詳細な分析はいくつか行われている[59-61]。しかしながらスフィンゴ脂質を対象としたこのような検討は、つい最近 Lee ら[62]が X-ALD 患者由来線維芽細胞の詳細な脂質分析を報告するまでは、Pettus らの非常に限られた分子種のみを分析した研究[63]にとどまっていた。

前述のように、スフィンゴ脂質は VLCFA を *N*-アシル鎖として豊富に含有する脂質群である。セラミド (ceramide; CER) はスフィンゴ脂質代謝の中心に位置する[64-67]一方、細胞周期の停止や分化、及びアポトーシスなどに関与する細胞内シグナル伝達分子としても機能する[68, 69]。最近の研究から、異なる鎖長の *N*-アシル鎖を有する CER は、異なる (病態) 生理学的役割を果たすことが明らかとなってきた[70]。すなわち、X-ALD のような

VLCFA の代謝異常は CER 分子種組成の変化を介し、細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では VLCFA 含有脂質の中でも CER に着目し、健常人や X-ALD 患者の血漿中 CER の解析と、VLCFA やそれを含有する CER (VLC-CER) のアポトーシスに与える影響の解析を行った。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 実験試薬

*N*-lauroyl-*D*-erythro-sphingosine (C12:0 CER)、*N*-palmitoyl-*D*-erythro-sphingosine (C16:0 CER)、*N*-lignoceroyl-*D*-erythro-sphingosine (C24:0 CER)、*N*-lauroyl-ceramide-1-phosphate (C12:0 C1P)、*N*-palmitoyl-ceramide-1-phosphate (C16:0 C1P)、*N*-lignoceroyl-ceramide-1-phosphate (C24:0 C1P)、及び *N*-[11-(dipyrrometheneboron difluoride)undecanoyl]-*D*-erythro-sphingosine (C11 TopFluor<sup>®</sup> Ceramide) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。fatty acid-free BSA、マウス抗 CER モノクローナル抗体 (MID 15B4)、アガロース、及びアラキジン酸 (C20:0 FA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。パルミチン酸 (C16:0 FA) 及びステアリン酸 (C18:0 FA) は東京化成 (東京) から、オレイン酸 (C18:1 FA) はナカライテスク (京都) から、リノール酸 (C18:2 FA) 及び 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) は和光純薬工業 (大阪) から、それぞれ購入した。C24:0 FA 及び C24:1 FA はフナコシ (東京) から入手した。C26:0 FA は Chem-Implex international (Wood Dale, IL) から得た。プロテイナーゼ K、RNase、100bp DNA ラダー、BlueJuice<sup>™</sup> Gel Loading Buffer は Invitrogen (Carlsbad, USA) より購入した。ヤギ抗マウス IgG (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ab150117) は Abcam (Cambridge, UK) から入手した。その他の試薬は特級グレード、HPLC グレード、もしくは LC-MS グレードの試薬を使用した。

### 2.2.2. 血漿及び血清の調製

本研究の内容はヘルシンキ宣言に従い、徳島大学 (No. 2653 for healthy subject, No. 2726 for X-ALD patients) 及び岐阜大学 (No. 27-143) の倫理委員会で審議され承認を得て行われたものである。すべての健常人、患者、またはその後見人より同意を得て血液を採取した。健常人の血液は、徳島大学病院感染制御部にて採血した。血漿分離には EDTA・2K 顆粒入りの採血管 (NP-EK0405, ニプロ (大阪)) を、血清分離には血清分離剤入りの採血管 (NP-SP1016, ニプロ (大阪)) をそれぞれ用いた。採取した血液は、直ちに (血漿用) または約 30~60 分間室温で放置後に (血清用)、遠心分離 (3000 rpm, 5 min, 3°C) を行った。それぞれの採血管の上清をコニカルチューブに分取し、実験に使用するまで -80°C で保管した。X-ALD 患者の血漿は、岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野 下澤伸行教授より頂いた。健常人及び X-ALD 患者の平均年齢を Table 1 に示す。なお、患者血漿の分析は盲検的に実施し、すべての分析終了後に患者の臨床タイプが開示された。

Table 1. 健常人及び X-ALD 患者の被験者数及び平均年齢

年齢は平均値 ± 標準偏差で示す。CC; childhood cerebral, AdolC; adolescent cerebral, AMN; adorenomyeloneuropathy

	Healthy		X-ALD			
	Male	Female	CC (male)	AdolC (male)	AMN (male)	Carrier (female)
<i>n</i>	6	4	4	1	5	1
Age (year)	32.0 ± 11.4	24.3 ± 2.2	6.8 ± 1.3	14	50.6 ± 19.5	79

### 2.2.3. ヒト血漿または血清からの脂質抽出

ヒト血漿または血清 0.1 mL からの脂質抽出は Bligh & Dyer 法[34]により実施した。簡潔に示すと、血漿または血清 0.1 mL に 1.0 mL のクロロホルム、2.0 mL のメタノール、及び 0.7 mL の KCl 水溶液 (40 mg/mL) を加え、10-20 秒超音波処理した。ここに 50 pmol の C12:0 CER を内部標準物質として加え、さらにクロロホルムと蒸留水 (以下 H<sub>2</sub>O) をそれぞれ 1.0 mL ずつ加えた。5 M HCl を用いて水層の pH を 2-3 に調整し、1,100×g で 5 分間の遠心分離を行った。有機層を回収し、残りの水層に 2.0 mL のクロロホルムを加え再度遠心分離を行った。回収した有機層を先の有機層と合わせ、窒素気流下で留去した。得られた残渣を 800 μL のメタノールに溶解し、非極性フィルター (クロマトディスク 4N, 0.2 μm, クラボウ (大阪)) でろ過した。このろ液を窒素気流下で留去して得られた残渣に 100 μL の 5 mM ギ酸アンモニウム含有メタノール:ギ酸=99:1 (v/v) を加え、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 用サンプルとした。

### 2.2.4. 細胞培養と処理

CHO-K1 細胞は、1. 2. 2. で示した方法で維持した。細胞は 35-mm プラスチックディッシュ (CELLSTAR® Advanced TC™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)) またはガラスボトムディッシュ (IWAKI (東京)) に  $2 \times 10^5$  cells/dish で播種し、その翌日に種々の濃度の CER または脂肪酸を培地に添加した。脂質は 0.3% BSA 含有 PBS に溶解させて培地に添加した。細胞を 0.3% BSA 含有 PBS で洗浄し、細胞表面に付着している脂質を除去した後、種々の実験に使用した。

### 2.2.5. 培養細胞の脂質分析

2. 2. 3. と同様の方法により、細胞から脂質を抽出し LC-MS/MS 分析に供した。CER の取り込みを調べる実験では細胞から脂質を抽出する際、50 pmol C12:0 CER に加えて 50 pmol C12:0 C1P も内部標準物質として加えた。TopFluor® CER の取り込み実験は 3 μM の C11 TopFluor® CER 存在下、37°C または 4°C で 1、6、もしくは 18 時間細胞をインキュベートした。この細胞から抽出した脂質を TLC にアプライし、1-ブタノール:酢酸:H<sub>2</sub>O=60:20:20 (v/v/v)

を展開溶媒として分離した。TopFluor<sup>®</sup>基を有する脂質は、UV ランプ下で可視化した。C24:0 FA 取り込み実験では 0、15、30、60、または 180 分間 10  $\mu$ M C24:0 FA とともに細胞をインキュベートした。この細胞から脂質を抽出し、1. 2. 3. に示した方法で GC を行った。

## 2. 2. 6. LC-MS/MS 分析

2. 2. 3. または 2. 2. 5. で調製したサンプルは以下の条件で LC-MS/MS に供した。また、多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring; MRM) モードでスフィンゴ脂質の各分子種を検出するために設定したパラメーターを Table 2 に、プロダクトイオンの構造を Fig. 12 に示す。

オートサンプラー :	HTS PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland)
LC :	Agilent 1100 Series HPLC Value System (Agilent Technologies)
カラム :	Cadenza CD-C18 (50 $\times$ 2 mm, 3 $\mu$ m particle, Imtakt (京都)), 42 $^{\circ}$ C
移動相 :	5 mM ギ酸アンモニウム含有メタノール:ギ酸=99:1 (v/v)
流速 :	300 mL/min.
MS :	4000 QTRAP LC/MS/MS System (AB SCIEX)
イオン化法 :	エレクトロスプレーイオン化法
分析法 :	MRM、陽イオンモード

Table 2. 各スフィンゴ脂質分子種を測定するために設定したパラメーター

N-acyl moiety		Precursor ion/product ion (m/z)	Declustering potential (eV)	Collision energy (eV)
CIP	C12:0 (I.S.)	562.42/264.40	81	41.0
	C16:0	618.49/264.40	81	43.5
	C24:0	730.61/264.40	81	56.0
CER	C12:0 (I.S.)	482.46/264.40	40	35.0
	C16:0	538.52/264.40	40	40.0
	C18:0	566.55/264.40	40	42.5
	C20:0	594.58/264.40	40	45.0
	C22:0	622.61/264.40	40	48.0
	C24:0	650.65/264.40	40	50.0
	C24:1	648.63/264.40	40	50.0
	C26:0	678.68/264.40	40	52.5
C26:1	676.66/264.40	40	52.5	

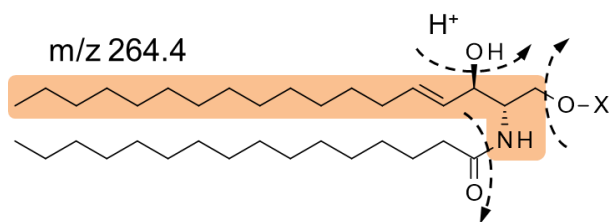


Fig. 12. スフィンゴ脂質のプロダクトイオンの構造

C16:0をN-アシル基として有するスフィンゴ脂質の構造を例として示している。衝突誘起解離エネルギーの印加によって破線矢印で示した箇所が切断され、オレンジで囲ったプロダクトイオン  $m/z$  264.4 が生成する。図中の  $X=H$  の時 CER、 $X=H_2PO_3$  の時 C1P となる。

### 2.2.7. 検出効率の補正に用いる検量線の作成

内部標準物質 C12:0 CER の濃度 1.0 に対してそれぞれ 0.25、0.5、1.0、または 2.0 の濃度で混合後 2.2.6. のように測定し、それらのピーク面積値を得た。各点のピーク面積比を縦軸、モル比を横軸にプロットして検量線を作成した (Fig. 13)。検量線は C16:0 CER、C16:0 C1P、C24:0 CER、C24:0 C1P について作成した。

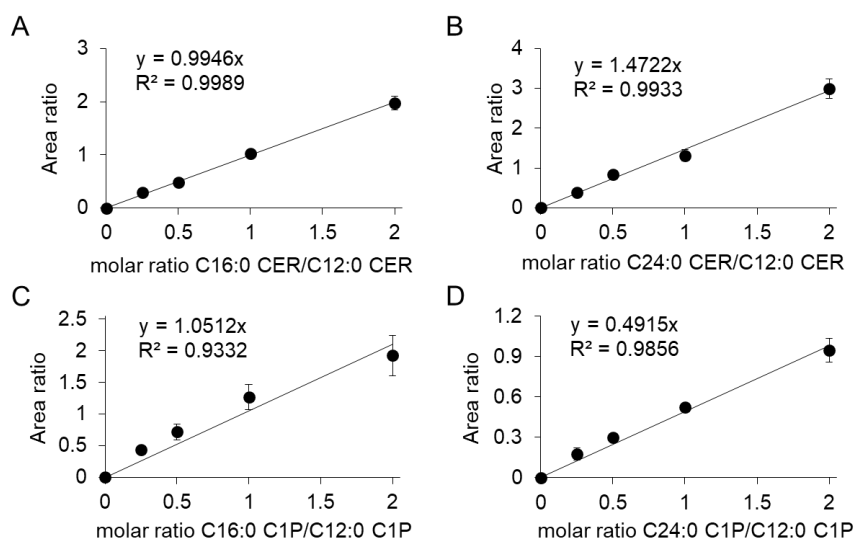


Fig. 13. 検出効率の補正のための検量線

C16:0 CER と C12:0 CER (A)、C24:0 CER と C12:0 CER (B)、C16:0 C1P と C12:0 C1P (C)、及び C24:0 C1P と C12:0 C1P (D) との間で検量線を作成した。各点は平均値±標準偏差 ( $n=3$ ) で示す。

### 2.2.8. LC-MS/MS によるスフィンゴ脂質の定量的解析

2.2.6. の分析により得られた各分子種のピーク面積値と内部標準物質のそれを用いてス



フィンゴ脂質レベルを定量した。長鎖型 (*N*-アシル鎖長 < C22) 分子種の検出効率の補正には C16:0 分子種の検量線の傾き、極長鎖型 ( $\geq$  C22) 分子種の補正には C24:0 分子種の検量線の傾きをそれぞれ用いた。計算式を以下に示す。

$$lipid = \frac{n \times \frac{Area(lipid)}{f \times Area(I.S.)}}{V}$$

*lipid* : 目的の脂質レベル

*n* : 内部標準物質の添加量

*Area* : ピーク面積値

*f* : 検量線の傾き

*V* : 脂質抽出に用いた血漿/血清の量または細胞のタンパク質量

### 2.2.9. 細胞の染色及び共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

細胞を 35-mm のガラスボトムディッシュに  $2 \times 10^5$  cells で播種した翌日、溶媒、3  $\mu$ M C24:0 CER、または 3  $\mu$ M C11 TopFluor® CER を添加し、37°C または 4°C で種々の時間インキュベートした。その後の染色方法は 1. 2. 6. と基本的には同じだが、抗 CER 抗体は 50 倍希釈、Alexa Fluor® 488 標識化ヤギ抗マウス抗体は 500 倍希釈でそれぞれ用いた。

### 2.2.10. UV 誘導性アポトーシス

細胞を 35-mm プラスチックディッシュに  $2 \times 10^5$  cells で播種した翌日、培地を無血清培地に交換し、6 時間インキュベートした。培地を PBS に交換し、細胞に UV を 15 mJ/cm<sup>2</sup> の強度で照射した。その後速やかに溶媒、種々濃度の脂肪酸、または CER 含有無血清培地を添加し、さらに 2 時間インキュベートした。一部の実験では、細胞を C24:0 CER で 6 時間処理した後 UV 照射した。

#### 核の形状の観察

PBS で洗浄後に 4%パラホルムアルデヒド溶液を加え 37°C で 20 分処理することにより、細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄した後、DAPI (1  $\mu$ g/mL in PBS) で 37°C 条件下、15 分処理して核を染色した。この細胞を蛍光顕微鏡 (Zeiss Axio Vert. A1, Germany) を用いて観察し、1 枚のディッシュにつき最低でも 8 点の画像を取得した。凝集または断片化した核を有する細胞をアポトーシス細胞、インタクトな核を有する細胞を生存細胞とし、1 画像中の生存細胞の割合を基に、以下のようにスコア化した ; 0 = 0~20%、1 = 20~40%、2 = 40~60%、3 = 60~80%、4 = 80~100%。

#### DNA 断片化アッセイ

UV 照射 2 時間後の細胞と培養上清を回収し、2100 rpm で 5 分間遠心分離を行った。得られた細胞ペレットに lysis buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.5)、5 mM エチレンジアミン四酢酸

(EDTA)、0.2 M NaCl、0.2%ドデシル硫酸ナトリウム、0.2 mg/mL プロテイナーゼ K) を 330  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。さらにプロテイナーゼ K を 10  $\mu$ L 加え、50°C で 30 分インキュベートして完全に細胞を可溶化した。これに 141  $\mu$ L の 5 M NaCl 及び 471  $\mu$ L の 100%エタノールを加え、-80°C で 30 分静置した。この溶液を 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離して得られた沈査に 20  $\mu$ L の 10 mM Tris-HCl (pH 7.2)及び 2  $\mu$ L の RNase を加え、37°C で 30 分インキュベートして RNA を分解した。これを DNA 溶液として 1.5%アガロースゲルに負荷し、Tris-酢酸-EDTA buffer (40 mM Tris-酢酸/1 mM EDTA (pH 8.3)) を泳動 buffer として電気泳動を行った。泳動終了後、GelRed<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, CA) でゲルを染色し、Fuji LAS-4000 imaging system (富士フイルム、東京) によってバンドを検出した。

#### カスパーゼ3 活性測定

上述のように細胞を回収、可溶化し、一定量を caspase-3 colorimetric assay kit (Abcam, Cambridge, UK) に供した。可溶化液のタンパク質濃度を bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて定量し、カスパーゼ3 活性を補正した。

### 2.2.11. 統計解析

1.2.9.に示した方法で行った。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 健常人血漿または血清における CER レベル

ヒト血漿由来脂質抽出物を LC-MS/MS で分析したところ、C12:0 (内部標準物質)、C18:0、C20:0、C22:0、C24:0、C24:1、C26:0、及び C26:1 CER が単一のピークとして検出された (Fig. 14)。C16:0 CER については 2 本のピークが検出されたが、C16:0 CER 標準品との比較により 1.8 分付近に検出された 2 本目のピークを C16:0 CER と帰属した。これらのピーク面積値と内部標準物質のピーク面積値を基に各 CER 分子種の血漿中濃度を算出した結果、C24:0 CER が最も豊富で約 4.5  $\mu\text{M}$ 、次いで C24:1 CER (2.0  $\mu\text{M}$ )、C22:0 CER (1.0  $\mu\text{M}$ ) となり、ヒト血漿中 CER は極長鎖型に富んだ組成となっていることが分かった (Fig. 15A)。この CER 組成は短期の絶食 (朝食摂取の有無) (Fig. 15A) や性差 (Fig. 15B) に関係なく、ほぼ一定の値を示した。また、血清中 CER 組成と濃度もまた、血漿中 CER のそれとほぼ同じだった (Fig. 15C)。これらの結果は過去の報告[71]と一致しており、本研究における測定系が正しく機能することを支持した。これらの結果に基づき、X-ALD 患者血漿を用いて LC-MS/MS を行うこととした。

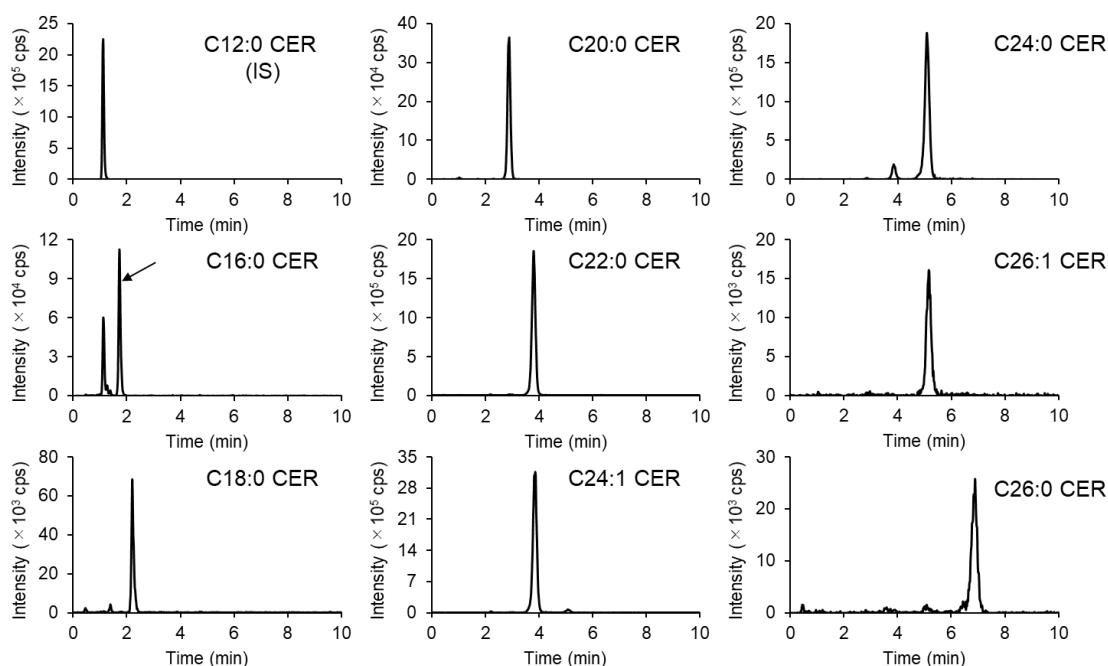


Fig. 14. ヒト血漿中 CER 各分子種の代表的なクロマトグラム

C16:0 CER のクロマトグラムでは 2 つのピークが検出されたが、標準品との比較から矢印で示した方を C16:0 CER であると決定した。IS; internal standard

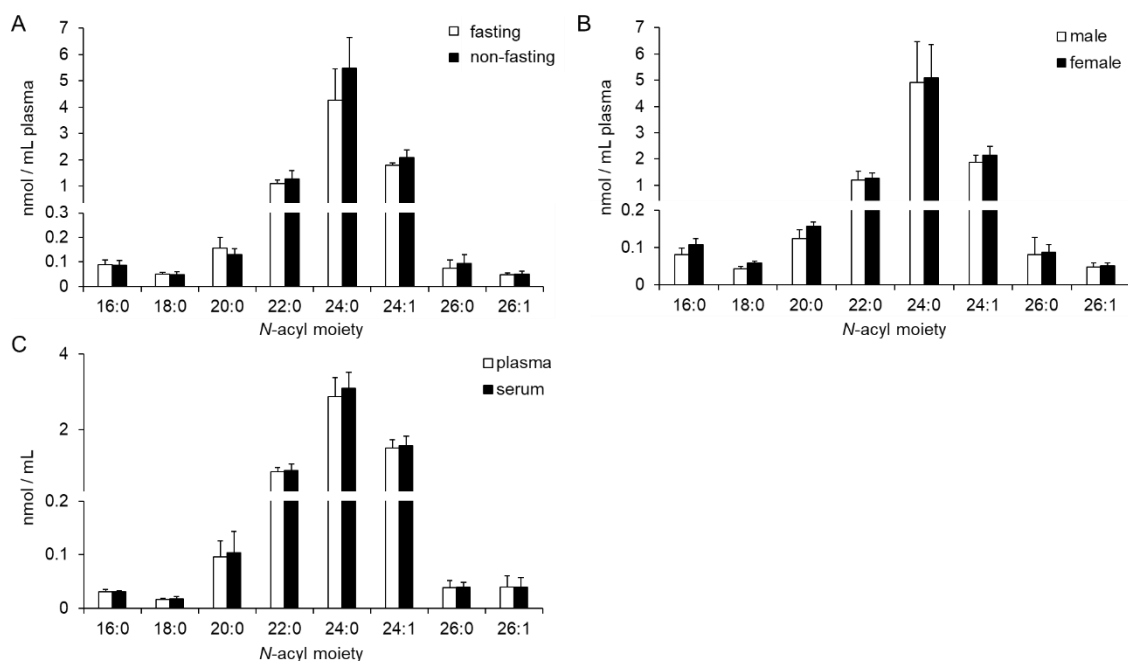


Fig. 15. ヒト血漿または血清中の CER プロファイル

健康人の血漿または血清から脂質を抽出し、LC-MS/MS で各 CER を測定した。(A) 食事 (朝食) 非摂取群 (fasting,  $n = 5$ ) 及び摂取群 (non-fasting,  $n = 6$ ) の血漿中 CER プロファイル。(B) 男性 (male,  $n = 7$ ) 及び女性 (female,  $n = 3$ ) の血漿中 CER プロファイル。(C) 血漿 (plasma,  $n = 5$ ) 及び血清 (serum,  $n = 5$ ) 中の CER プロファイル。グラフはいずれも平均値±標準偏差で示す。

### 2.3.2. X-ALD 患者血漿中の CER レベル

健康人 ( $n=10$ ) 及び X-ALD 患者 ( $n=11$ ) 個々の血漿中 CER 値を Fig. 16A に示す。各群を平均して比較すると、患者血漿の CER 分子種は健康人のそれと大きく異なっていた (Fig. 16B)。X-ALD 患者血漿における C24:0、C26:0、及び C26:1 CER の濃度はそれぞれ、健康人血漿の 1.5 倍、4.3 倍、及び 3.3 倍と有意に高値を示した。一方、X-ALD 患者血漿における C20:0、C22:0、及び C24:1 CER の濃度を健康人と比較すると、0.66 倍、0.67 倍、及び 0.62 倍と、わずかではあるが有意に低値を示した。臨床現場において用いられる X-ALD の診断パラメーターとして、血漿由来総脂質中 C24:0 FA/C22:0 FA 比または C26:0 FA/C22:0 FA 比がある [72]。この方法論を CER にも適用したところ、各グループ内でのばらつきが抑えられ、X-ALD 患者における極長鎖型 CER (VLC-CER) の増加傾向がより顕著になった (Fig. 16C)。平均値間の比較では、X-ALD 患者における C24:0、C26:0、及び C26:1 CER は、健康人の 2.4 倍、6.3 倍、及び 4.7 倍となった (Fig. 16D)。なお C16:0 CER は VLC-CER 種ではないものの、Fig. 16B 及び D いずれにおいても、X-ALD 患者血漿において有意な増加を示した。

続いて、X-ALD 患者を臨床的重症度で分類して健康人と比較した。X-ALD の臨床型のう

ち小児大脳型 (CC) は最も重症型であり、思春期大脳型 (AdolC) は発症時期が異なるものの CC と類似の症状を示す。一方、副腎脊髄ニューロパチー (AMN) は比較的軽症である。したがって、本研究では AMN 患者と女性保因者を AMN グループ、CC 患者と AdolC 患者を大脳型 (Cerebral) グループとし、これらと健常人グループ間で比較をした。Fig. 16E に示すように、Cerebral、AMN 両グループにおける C24:0 及び C26:0 CER のような飽和型 VLC-CER は、健常人よりも高値を示したが、予想外に AMN 患者においてより顕著に増加していた。一方、Cerebral 患者における C24:1 及び C26:1 CER のような一価不飽和 VLC-CER は、健常人と差がないかまたは有意に減少していた。しかしながら、AMN 患者における C26:1 CER は他の 2 群よりも有意に増加していた。C22:0 CER に対する相対値についても同様の解析を行うと、Cerebral 患者と健常人及び AMN 患者と健常人の間の飽和型 VLC-CER レベルの差がより明らかとなった (Fig. 16F)。Cerebral 患者における一価不飽和型 C24:1 及び C26:1 CER の C22:0 に対する相対値は、健常人のそれらとほぼ同じだった。絶対値の解析と同様に、AMN 患者における C26:1 CER/C22:0 CER 値は健常人のものより有意に高値を示した。まとめると、AMN 患者における飽和型 VLC-CER レベルの上昇は Cerebral 患者と比較してより明らかであり、Cerebral 患者における不飽和型 VLC-CER レベル AMN 患者ほど上昇しないか、むしろ減少傾向を示すようである。

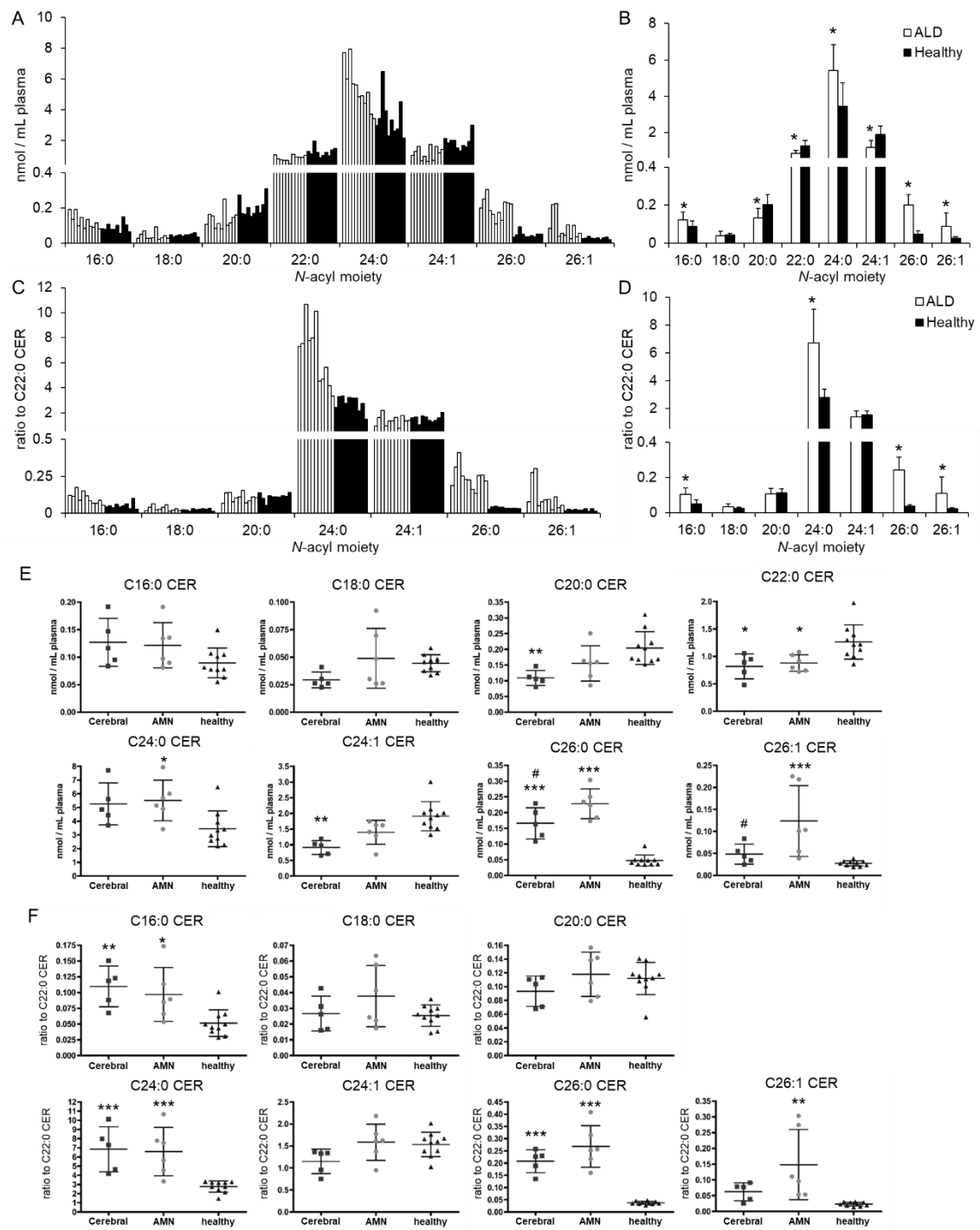


Fig. 16. X-ALD 患者または健康人血漿中の CER プロファイル

健康人の血漿または血清から脂質を抽出し、LC-MS/MS で各 CER を測定した。(A) X-ALD 患者 (ALD,  $n = 11$ ) 及び健康人 (Healthy,  $n = 10$ ) 個々の血漿中 CER 濃度。(B) A の平均値。(C) C22:0 CER に対する各 CER 種の相対値。各 CER の濃度を C22:0 CER の濃度で除した。(D) C の平均値。(E) Cerebral 患者、AMN 患者、及び健康人グループの各 CER 分子種濃度。(F) Cerebral 患者、AMN 患者、及び健康人グループの C22:0 CER に対する各 CER 種の相対値。

各群の値は平均値±標準偏差で示し、*P* 値は Student の *t* 検定 (B, D: \**P*<0.05) または one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した (E, F: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.005 vs. healthy、#*P*<0.05 vs. AMN)。

### 2.3.3. 外因的に加えた脂肪酸または CER の CHO 細胞への細胞傷害性作用

X-ALD が VLCFA 代謝不全を示す遺伝性疾患であることを考慮すると、血液だけでなく体細胞内でも VLC-CER が増加していると考えerことは妥当である。加えて、X-ALD 患者では血漿中の飽和型 VLC-CER が増加している (Fig. 16) ことから、体細胞は循環血液からの VLC-CER 供給が増強され、より VLC-CER に富んだ状況になりうる。VLC-CER が細胞に与える影響を評価するため、C24:0 FA や C24:0 CER の細胞傷害性を調べた。Fig. 17B に示すように、C24:0 FA は 10 μM まで細胞傷害性を示さなかった。これは X-ALD 患者血漿において報告されている C24:0 FA の濃度[73]の 2-3 倍高い値であり、それよりも高濃度の 30 μM で細胞を処理した時、微弱ながらも細胞傷害性が観察された。この細胞傷害性は同濃度の C16:0 FA で見られたものよりも弱かった (Fig. 17A, B)。続いて、細胞を C16:0 CER または C24:0 CER で処理して細胞傷害性を評価した。結果として、C16:0 CER が濃度依存的に強力な細胞傷害活性を示した (Fig. 17C) 一方で、C24:0 CER は 30 μM までまったく細胞傷害性を示さなかった (Fig. 17D)。

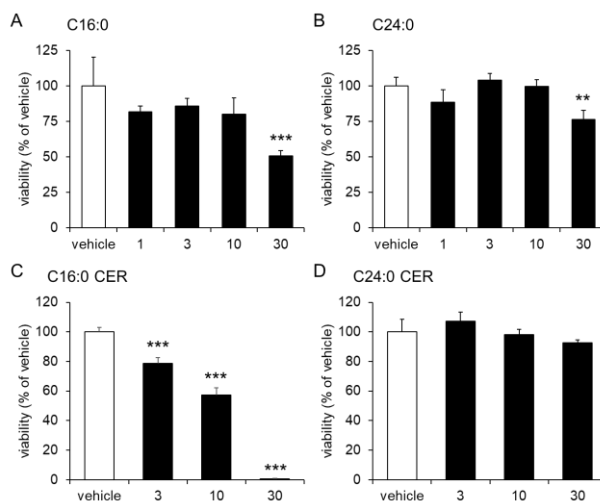


Fig. 17. CHO 細胞に対する脂肪酸または CER の細胞傷害性作用

CHO-K1 細胞を C16:0 FA (A)、C24:0 FA (B)、C16:0 CER (C)、または C24:0 CER (D) とともに無血清培地で 48 時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理して剥がし、トリパンブルー排除試験に供した。溶媒処理を 100%としたときの各群の相対的生存率を示している。各群の値は平均値±標準偏差 (いずれも *n*=3) で示し、*P* 値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した (\*\**P*<0.01, \*\**P*<0.005 vs. vehicle)。

### 2.3.4. CHO 細胞において VLCFA 及び VLC-CER は抗アポトーシス作用を示す

著者は CHO 細胞を用いた一連の研究の過程で、VLCFA や VLC-CER が細胞傷害性ではなく、UV 誘導性アポトーシスに対する抑制作用を示すことを見出した。細胞に UV を照射後速やかに種々の脂肪酸や CER で 2 時間処理した時、C24:0 FA や C26:0 FA のような飽和型 VLCFA (Fig. 18F, H)、及び C24:0 CER (Fig. 19B) は濃度依存的に UV 誘導性アポトーシスを抑制した。C16:0 FA などの長鎖脂肪酸や C24:1 FA (Fig. 18A-E, G)、及び C16:0 CER (Fig. 19A) は抗アポトーシス作用を示さないか、または示してもわずかなものであった。C24:0 FA と C24:0 CER が示す抗アポトーシス作用については、核の形状からの評価 (Fig. 19A, B) に加えて DNA 断片化アッセイ (Fig. 18I, Fig. 19C) 及びカスパーゼ 3 活性測定 (Fig. 18J) での評価も実施し、いずれによってもこれらが抗アポトーシス性に作用することを支持する結果が得られた。C24:0 FA 及び C24:0 CER の抗アポトーシス活性は 3  $\mu$ M から観察され、これは X-ALD 患者血漿における濃度域と一致する。また、UV 照射の 6 時間前から C24:0 CER で処理した細胞でも UV 誘導性アポトーシスが抑制された (Fig. 19D) ことから、細胞に取り込まれた C24:0 CER が UV 照射によって活性化するアポトーシスシグナルを阻害することが示唆される。

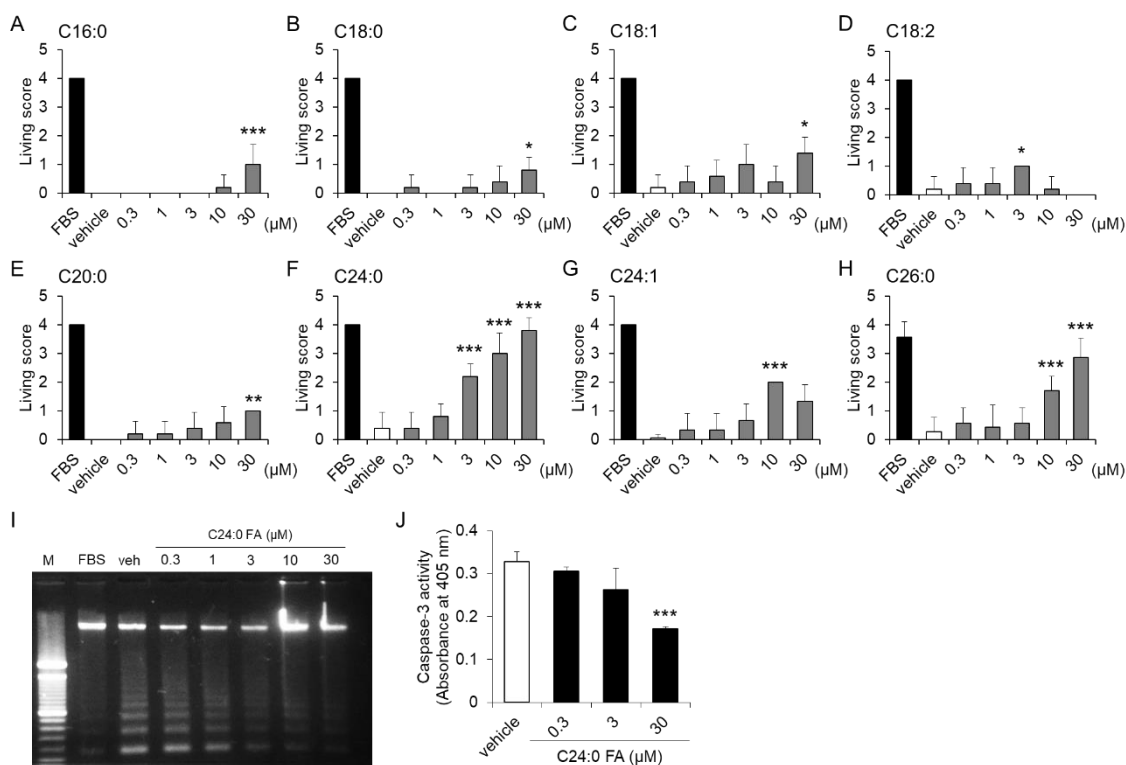


Fig. 18. CHO 細胞の UV 誘導性アポトーシスに対する脂肪酸の作用

UV 照射後 2 時間、C16:0 FA (A)、C18:0 FA (B)、C18:1 FA (C)、C18:2 FA (D)、C20:0 FA (E)、C24:0 FA (F) C24:1 FA (G)、または C26:0 FA (H) で CHO-K1 細胞を処理した。FBS 処理細胞をポジティブコントロールとして用いた。細胞を固定して核を DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡下で観



察した。スコア化の方法は 2.2.10.に記載した通りである。(I) UV 照射した細胞から単離した DNA の代表的な 1.5%アガロースゲル電気泳動画像。UV 照射後に FBS、溶媒、または種々濃度の C24:0 FA で 2 時間 CHO-K1 細胞を処理した。DNA の単離方法及び可視化方法は 2.2.10. に記載した通りである。(J) UV 照射された細胞のカスパーゼ 3 活性。UV 照射後 2 時間、溶媒または種々濃度の C24:0 FA で処理した。細胞可溶化液を用いてカスパーゼ 3 活性を測定した。各群の値は平均値±標準偏差 (いずれも  $n=3$ ) で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.005$  vs. vehicle)。

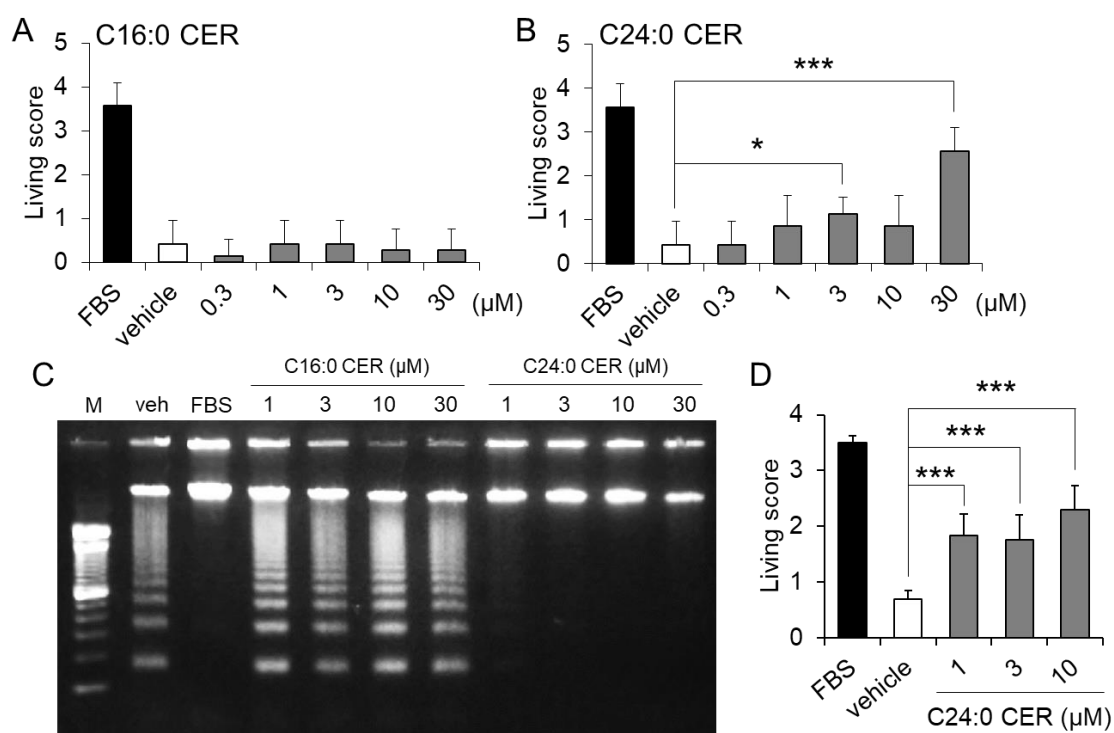


Fig. 19. CHO 細胞の UV 誘導性アポトーシスに対する CER の作用

UV 照射後に種々濃度の C16:0 CER (A) または C24:0 CER (B) で処理した。FBS 処理細胞をポジティブコントロールとして用いた。細胞を固定して核を DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡下で観察した。スコア化の方法は 2.2.10.に記載した通りである。(C) UV 照射した細胞から単離した DNA の代表的な 1.5%アガロースゲル電気泳動画像。UV 照射後に FBS、溶媒、C16:0 CER、または C24:0 CER で 2 時間 CHO-K1 細胞を処理した。DNA の単離方法及び可視化方法は 2.2.10.に記載した通りである。(D) 細胞を C24:0 CER 含有無血清培地で 6 時間インキュベートした後、UV 照射した。UV 照射後は無血清培地で 2 時間維持した。以降の操作は A, B と同様である。

各群の値は平均値±標準偏差 (いずれも  $n=3$ ) で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した ( $*P<0.05$ ,  $***P<0.005$ )。

### 2.3.5. CHO 細胞による細胞外 CER 取り込みの解析

培地に添加した C24:0 CER または C16:0 CER は時間依存的に細胞内に移行した。細胞内 C24:0 CER レベルは 1 時間以内に最大に達し、その後緩やかに減少していった (Fig. 20A、左)。対照的に、細胞内 C16:0 CER レベルは 6 時間まで持続的に増加していった (Fig. 20A、右)。ただし、C16:0 CER と C24:0 CER の最大蓄積量は同程度であり (Fig. 20A、■)、C24:0 CER は約 84 pmol/dish、C16:0 CER は約 96 pmol/dish だった。この蓄積量は培地に添加した CER 量 (6000 pmol/dish) の 1.5% に相当する。この取り込みと蓄積の過程において、両 CER ともにセラミド 1-リン酸 (C1P) への変換は観察されなかった (Fig. 20A、○)。C24:0 CER の細胞内移行は 4°C 条件下では完全に抑制された (Fig. 20B)。抗 CER 抗体を用いて染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した実験でも同様に、4°C (Fig. 20C、右) ではなく 37°C (Fig. 20C、真ん中) 条件下で C24:0 CER が細胞内に移行する結果が得られた。37°C でインキュベートした際、細胞内に取り込まれた C24:0 CER は点状に分散していた (Fig. 20C、真ん中)。さらに、蛍光標識化 CER (TopFluor® CER) を用いた実験からも、細胞外の CER が細胞内に移行することを支持する結果が得られた (Fig. 21A)。Fig. 20A と一致して、細胞に取り込まれた TopFluor® CER も、一部は SphM へと変換されていたが大部分は CER そのものとして蓄積していた。6 時間のインキュベートでは C1P やグルコシルセラミド (GluCer) へは変換されておらず、18 時間インキュベートしたときにこれらへの変換が観察された (Fig. 21B)。すなわち、細胞に取り込まれた C24:0 CER は大部分が C24:0 CER そのものとして細胞内へ蓄積していくことが明らかとなった。

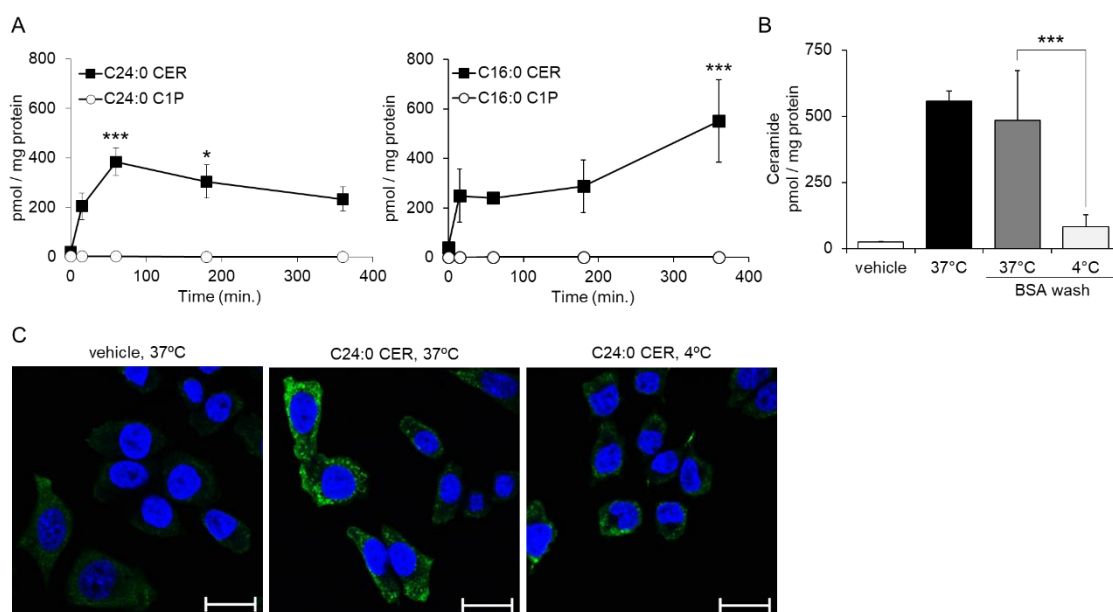


Fig. 20. CHO 細胞における CER の取り込み

(A) CHO-K1 細胞を 3  $\mu$ M C24:0 CER (左) または 3  $\mu$ M C16:0 CER (右) の存在下 0~360 分ま

でインキュベートした。細胞に取り込まれず、細胞表面に付着しているだけの脂質を 0.3%BSA 含有 PBS で洗い流してから細胞を回収した。この細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MS に供した。各点の値は平均値±標準偏差（いずれも  $n=3$ ）で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した（\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.005$  vs. 0 min.）。(B) CHO-K1 細胞を溶媒または  $3\ \mu\text{M}$  C24:0 CER とともに 1 時間、 $37^\circ\text{C}$  または  $4^\circ\text{C}$  でインキュベートした。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄してから回収した細胞、または洗浄せずに回収した細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MS により細胞内 C24:0 CER を定量した。各群の値は平均値±標準偏差（いずれも  $n=3$ ）で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した（\*\*\* $P<0.005$ ）。(C) 溶媒または  $3\ \mu\text{M}$  C24:0 CER 存在下、CHO-K1 細胞を  $37^\circ\text{C}$  または  $4^\circ\text{C}$  で 6 時間インキュベートした。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄した細胞を 0.4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。抗 CER 抗体を用いて CER を染色した（緑）。核は DAPI で染色した（青）。スケールバー：20  $\mu\text{m}$

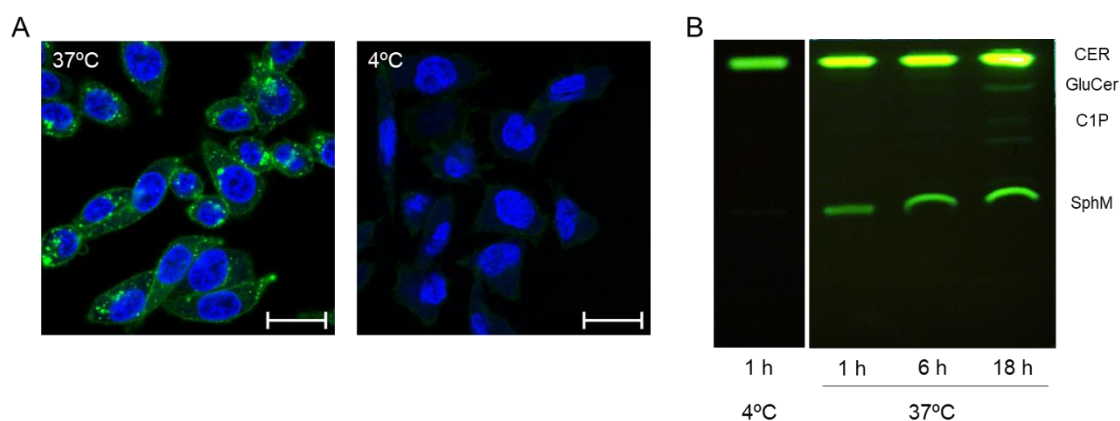


Fig. 21. CHO 細胞における TopFluor<sup>®</sup>標識化 CER の取り込み

(A) CHO-K1 細胞を 3  $\mu$ M C11 TopFluor<sup>®</sup> CER で 1 時間、37°C (左) または 4°C (右) 条件下で処理した。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄した細胞を 0.4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。核は DAPI で染色した (青)。スケールバー：20  $\mu$ m (B) CHO-K1 細胞を 3  $\mu$ M C11 TopFluor<sup>®</sup> CER で 1、6、または 18 時間、37°C (左) または 4°C (右) 条件下で処理した。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄した細胞から脂質を抽出し、TLC に供した。GluCer; glucosylceramide, C1P; ceramide 1-phosphate, SphM; sphingomyelin。

### 2.3.6. UV 照射された CHO 細胞内における CER 組成の変化

細胞に UV 照射した時、細胞内の長鎖型 C14:0 CER、C16:0 CER、極長鎖型 C22:0 CER、及び C24:1 CER レベルが、非照射細胞と比較して約 2 倍に増加した (Fig. 22A)。これは UV 照射によるアポトーシス誘導時に CER 産生が起こることを意味する。UV 照射後に 3  $\mu$ M C24:0 CER を添加すると、細胞内の C24:0 CER レベルが顕著に増大した (Fig. 22B)。C24:0 CER の増加は、UV 照射後に 10  $\mu$ M C24:0 FA を添加した時にも観察された (Fig. 22E)。この時の C24:0 CER 増加率は、UV 照射後に溶媒処理した細胞 (Fig. 22A) や UV 照射せず 10  $\mu$ M C24:0 FA 処理した細胞 (Fig. 22D) よりも大きかった。しかしながら、10  $\mu$ M C24:0 FA で細胞を処理したときの細胞内 C24:0 FA 増加量 (Fig. 22C) よりも小さかった。すなわち、細胞に取り込まれた C24:0 FA の一部が、アポトーシス刺激によって活性化する *de novo* CER 産生に用いられると思われる。以上より、UV 照射によって細胞内で特定の CER 種が増加すること、C24:0 CER や C24:0 FA が存在することで細胞内 CER 組成が変化することが明らかとなった。

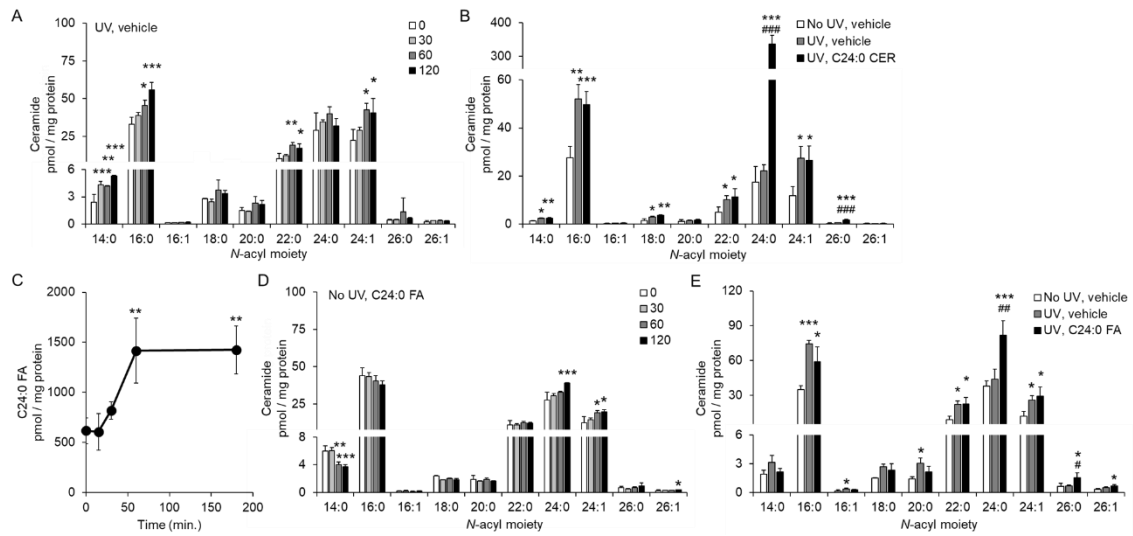


Fig. 22. UV 照射された CHO 細胞の内在性 CER 組成の変化

(A) CHO-K1 細胞に UV を 15 秒間照射し、無血清培地で維持した。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄後に回収した細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MS に供した。(B) UV 照射後の細胞を溶媒または 3  $\mu\text{M}$  C24:0 CER とともに 2 時間インキュベートした。以降の操作は A と同じである。(C) CHO-K1 細胞を 10  $\mu\text{M}$  C24:0 FA 存在下で 180 分までインキュベートした。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄後に回収した細胞から脂質を抽出して脂肪酸メチルエステルへと変換後、GC にて C24:0 FA 量を測定した。(D) CHO-K1 細胞を 10  $\mu\text{M}$  C24:0 FA 含有無血清培地で維持した。0.3%BSA 含有 PBS で洗浄後に回収した細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MS に供した。(E) UV 照射後の細胞を溶媒または 10  $\mu\text{M}$  C24:0 FA とともに 2 時間インキュベートした。以降の操作は A と同じである。各群及び各点の値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (いずれも  $n=3$ ) で示し、 $P$  値は one-way ANOVA 後に Tukey の方法で算出した (A, C, D: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.005$  vs. 0 min., B, D: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.005$  vs. No UV, vehicle, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.005$  vs. UV, vehicle)。

## 2.4. 考察

VLCFA は主にスフィンゴ脂質に *N*-アシル化されており、この反応はセラミド合成酵素 2 (ceramide synthase 2, CerS2) によって触媒される[74-77]。VLC-CER を含む VLCFA 含有スフィンゴ脂質は神経線維の髄鞘に豊富に含まれており[78]、実際に CerS2 が髄鞘形成にとって重要であることが報告されている[78-80]。また、加齢[81, 82]やアルツハイマー型認知症[79, 80, 83]、うつ病[84, 85]、及び多発性硬化症[86]など、神経機能が低下する状況において血中や組織中の CER 組成が変化することが報告されており、厳密な CER 組成制御が神経組織の健全性に重要であることが明らかになりつつある。本研究では X-ALD の臨床型別に血漿中 CER 組成を比較し、重症型の Cerebral 患者に特徴的な変化の有無を調べた。

本研究で著者は初めて、X-ALD 患者血漿中の CER 組成と濃度を LC-MS/MS により分析した。健常人血漿と比較すると、Cerebral 患者、AMN 患者の血漿ともに飽和型 VLC-CER が増加していたが両群間で差はなかった。一方、AMN 患者では不飽和型 VLC-CER のうち、C26:1 CER は顕著に増加していたが、Cerebral 患者では変化がなかった。また、AMN 患者の C24:1 CER は健常人と差がないが、Cerebral 患者ではより減少傾向を示し、不飽和型 VLC-CER はいずれも Cerebral 患者の方が AMN 患者よりも低値を示す傾向にあった。脳のスフィンゴ脂質は C24:1 FA を *N*-アシル鎖として最も豊富に含むこと[54, 87]や、ロレンツォオイル（継続的な投与によって血中飽和 VLCFA 値は低下するが疾患に対する有効性は確立されていない）を添加した細胞で C24:1 SphM レベルが上昇する[88]こと、及び CC 患者の脳では C26:0 SphM が増加する一方で C24:1 SphM は顕著に減少すること[89]が、これまでに報告されている。これらの知見と本研究結果を考慮すると、Cerebral 患者血漿における CER 組成の変化（飽和型 VLC-CER の増加と不飽和型 VLC-CER の減少）は Cerebral 患者脳でのスフィンゴ脂質組成の変化を反映している可能性があり、脳における C24:1 CER 量の低下が CC 発症と関連があるかもしれない。この仮説を証明するためには、より多くの患者サンプルの解析を含めたさらなる検討が必要である。

患者血漿の解析において、Cerebral 患者と AMN 患者間で飽和型 VLC-CER レベルに差はなかったことから、飽和型 VLC-CER が増加するという変化がそれ単独で脳での急速な脱髄を引き起こすとは考えられない。*abcd1* ノックアウトマウスも血漿や組織で顕著な VLCFA 蓄積を示すものの大脳型には至らず、老齢期にヒトの AMN に相当する歩行障害にとどまる[90-93]。また、女性保因者も 60 歳までに半数以上が AMN 類似の抹消神経症状を呈するが大脳型に至ることはない[56]。これらのことから、ABCD1 機能不全、すなわち VLCFA の蓄積による基本病態は AMN であり、X-ALD 患者ではそこに何らかの因子が加わることで大脳型に進展すると考えられている[58]。飽和型 VLC-CER の蓄積はそれ単独で大脳型の発症要因とはならないが、AMN の発症要因の 1 つになるかもしれない。

X-ALD 患者血漿の分析結果に基づき、著者は C24:0 FA や C24:0 CER が豊富に存在する状況における細胞機能への影響を調べた。その結果、外因的に加えた C24:0 CER は、細胞毒性ではなくむしろ細胞死を回避させるように作用することが明らかとなった。細胞外に添加した CER は細胞に取り込まれ、C1P や GluCer、SphM などにはそれほど変換されず、しばらくは CER そのものとして細胞内に蓄積した。これより、C24:0 CER 代謝物ではなく C24:0 CER それ自体の細胞内増加が、アポトーシス抑制に寄与すると考えられる。また、細胞外に添加した C24:0 FA も抗アポトーシス作用を示した。C24:0 FA による抗アポトーシス作用の機序は、細胞内の C24:0 CER 増加によって説明が可能である。C24:0 FA は確実に細胞内に移行し、UV 刺激によって C24:0 FA から C24:0 CER への変換が増強され、結果的に CER 組成が大きく変化した。これより、UV 照射によって CerS2 活性が上昇し、C24:0 FA から C24:0 CER への変換が増強されたことが示唆される。実際、電離放射線照射された HeLa 細胞では CerS2 活性が増大することが報告されている[94]。加えて、*N*-アシル鎖長の異なる CER は、細胞内で異なる作用を示すことが明らかになってきている[70]。CerS の過剰発現またはサイレンシングによって細胞内の CER 組成を強制的に変化させた研究[94 - 98]や種々アポトーシス刺激に伴う CER 組成の変化の解析[98 - 101]から、長鎖型 CER はアポトーシス促進性であり、VLC-CER は反対にアポトーシス抑制性であると考えられている。本研究で示したように、VLCFA の蓄積を特徴とする X-ALD 患者の細胞では、C24:0 CER のような飽和型 VLC-CER を産生しやすい状況にあると推察される。細胞内 CER 組成の変化によって細胞の性質が変化し、本来アポトーシスすべき状況においてもアポトーシスを回避するようになるのかもしれない。この細胞の変化と X-ALD の基本病態である AMN との関連を明らかにするためにはより詳細な検討が必要である。

CER がアポトーシスシグナルを活性化するメカニズムとして、一つはがん抑制因子のプロテインホスファターゼ 2A[102]や p53[103]、並びにプロテインキナーゼ C $\zeta$ [104]などのタンパク質との相互作用が挙げられるが、もう一つはミトコンドリア外膜におけるチャンネル（ポア、孔）形成による透過性亢進作用[105, 106]である。このチャンネル形成には CER の *N*-アシル鎖の単一性が重要であると言われており、C16:0 CER によるチャンネル形成は C24:0 CER の共存下で抑制される。すなわち、C24:0 CER はミトコンドリア外膜透過性亢進を抑制する[107]。このことから、ミトコンドリア外膜での CER チャンネル形成には厳密な CER 組成制御が必要なようである。本研究では C24:0 CER によるアポトーシス抑制の詳細なメカニズムについては調べられていないが、C24:0 CER 処理によってアポトーシス刺激時の CER 組成が変化していた。これによってミトコンドリア膜での CER チャンネル形成が攪乱され、アポトーシスが抑制されたのかもしれない。X-ALD のように C24:0 FA が豊富に存在する状況下では、これらの C24:0 CER への変換によって細胞内 CER 組成が変化し、アポトーシスを含む細胞機能の変調が起こっているのかもしれない。

本研究では、細胞外に添加した CER が 1 時間以内に細胞内に移行することを明らかとした。これまでに C6 CER[108]や C8 CER[109]といった短鎖 CER の取り込みについては調べられており、10  $\mu$ M で添加した C6 CER は 7.5 pmol/ $10^3$  cells、C8 CER は 7.2 pmol/ $10^3$  cells 程度取り込まれるようである。これらと比較すると 3  $\mu$ M で添加した C24:0 CER の取り込み量 (0.88 pmol/ $10^3$  cells) は低い値であるが、その理由の一つは膜透過性の違いであると考えられる。CER を外部から添加する実験では、CER の細胞内移行性を高めるために C8 以下の短鎖 CER が用いられてきた。これら短鎖 CER は適度な脂溶性のために受動拡散により細胞膜を通り抜けることができるが、VLC-CER は疎水性が大きすぎるために受動拡散できないとの考えが一般的である。本研究において C24:0 CER の細胞内移行は 37°C 下でのみ観察され、4°C では完全に抑制された。すなわち、C24:0 CER の細胞内移行には受動拡散は関与せず、細胞外 CER を細胞内へ輸送する何らかの機構が存在すると思われる。今後、C24:0 CER の取り込み機構について、より詳細に調べる必要がある。

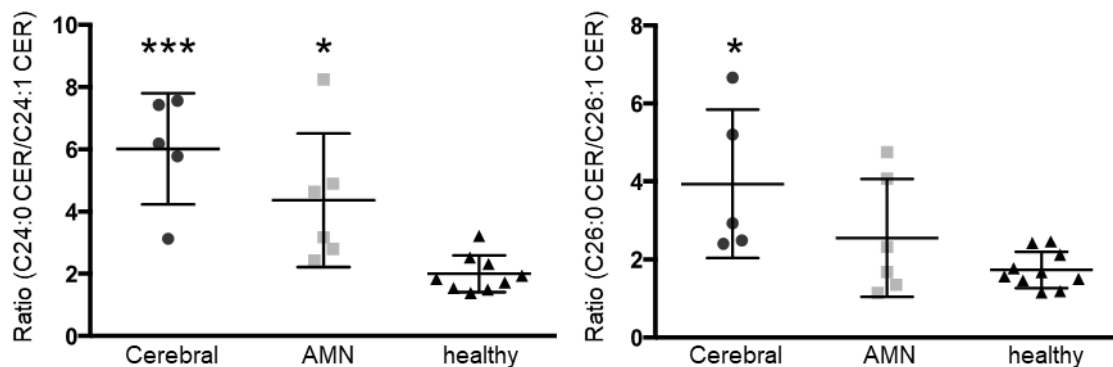


Fig. 23. X-ALD 患者血漿の VLC-CER の飽和/不飽和比  
 血漿中 24:0 CER/24:1 CER 比は健常人が 2 前後で個人差は小さい。Cerebral 患者では 5 名中 4 名が 5.8-7.7 と高い値を示す。AMN 患者で高い値を示す患者は 6 名中 1 名しかいない。

まとめると、本研究では健常人及び X-ALD 患者血漿中 CER を測定し、患者において顕著に増加する C24:0 CER がアポトーシスを抑制することを明らかとした。血漿中 C24:0 CER の増加からは臨床型を区別することはできなかったため、この増加は両臨床型に共通する危険因子の一つと考えられる。一方、不飽和型 VLC-CER は AMN 患者とは異なり、Cerebral 患者で減少傾向にある。VLC-CER 分子種の飽和/不飽和バランスの崩れ (Fig. 23) は大脳型の発症に関係があるかもしれない。今回、明らかになった飽和型 VLC-CER の抗アポトーシスと脱髄との関係は不明であるが、アポトーシスを回避するようになった細胞は、正常なターンオーバーをしなくなるという可能性がある。神経細胞を含む体細胞は、ターンオーバー



(老化/劣化細胞のアポトーシスと幹細胞/前駆細胞の分化やリクルート)を繰り返すことで組織を正常に保っている[110 - 112]。X-ALDにおいてC24:0 FAやC24:0 CERが増加するという変化[54, 73, 113]は、中枢/末梢神経系を構成する細胞の細胞死傾向を狂わせている可能性があり、そのような状況が脱髄の引き金を引いているのかもしれない。これまで行われてきたX-ALDの脱髄要因に関する研究の多くは、VLCFA蓄積そのものが細胞毒性を示すとの仮説に基づき実施されている。しかしながら、マウスオリゴデンドロサイトやラットグリオーマ細胞を用いた先行研究[73]や本研究結果から、C24:0 FAが細胞傷害性を示すには20~40  $\mu\text{M}$ の高濃度が必要であり、患者血漿中C24:0 FA濃度(高くても約4  $\mu\text{M}$ )からは大きく乖離している。すなわち、VLCFAの蓄積は直接的に細胞死をもたらすのではなく、スフィンゴ脂質組成変化による細胞機能の変調を介して組織形成/維持に悪影響を及ぼしている可能性がある。VLCFA蓄積を伴うペルオキシソーム病では、神経細胞移動の異常や髄鞘化の遅延(Zellweger症候群、DBP欠損症)、脱髄や白質異常(X-ALD、ACOX1欠損症)などが見られる[20]。髄鞘形成や再ミエリン化および脱髄の過程におけるスフィンゴ脂質の役割やその組成変化の影響を調べることで、治療薬開発のために重要かもしれない。

## 総括

ペルオキシソームは真核細胞に広く分布し、脂肪酸の  $\beta$  酸化や  $\alpha$  酸化に加えてプラスマローゲンやドコサヘキサエン酸、胆汁酸の生合成など、脂質代謝において重要な役割を担っていると言える[9, 114]。これらのペルオキシソーム機能が障害されると遺伝性の致死性疾患をもたらすことが判明し、このオルガネラが生体機能において不可欠であると考えられるに至っている。本研究ではペルオキシソームにおける脂質代謝の生理学的役割のより良い理解を目指し、第 1 章ではペルオキシソームで代謝される新規脂肪酸の探索を、第 2 章ではペルオキシソーム病患者におけるスフィンゴ脂質組成の変化及びそのような状況での細胞機能の変化の解析を、それぞれ実施した。

第 1 章では、乳酸菌などの腸内細菌によって産生される HFAs がペルオキシソームにおける  $\beta$  酸化によって酸化消去されることを明らかとした。また、HFAs はペルオキシソームの数及び酵素量を増大させ、脂肪酸消去活性を向上させることを明らかとした。近年、腸内細菌叢組成と生活習慣病の関連性を示唆する報告[23, 26]が増加している一方で、腸内細菌がどのようにして宿主の健康に影響を与えるのかについては不明な点が多い。本研究結果は腸内細菌が HFAs の放出を介してペルオキシソーム機能を亢進させることで宿主の脂質代謝能に影響を与えることを示唆しており、腸内細菌と宿主の健康を結ぶメカニズムの一端を解明できたと考える。

第 2 章では、ペルオキシソームにおける脂肪酸代謝が障害される疾患、すなわちペルオキシソーム病の中で最も患者数の多い X-ALD に着目して研究を行った。X-ALD 患者の血漿中 CER を LC-MS/MS を用いて測定し、重症 (Cerebral; CC 及び AdolC 患者) と軽症 (AMN; AMN 患者及び AMN 様症状を呈する女性保因者) 間で比較した結果、飽和型 VLC-CER はともに健常人よりも増加している一方、不飽和型 VLC-CER は Cerebral 患者においてのみ健常人と同等または減少傾向を示した。ヒト血漿に最も豊富に含まれ、かつ X-ALD 患者で有意に増加した C24:0 CER の細胞死に与える影響を調べた結果、この CER は細胞に取り込まれて抗アポトーシス性に作用することが明らかとなった。アポトーシスは組織の恒常性を維持するうえで重要な機構である[110-112, 115]。興味深いことに、VLCFA や VLC-CER はネクロトーシスの遂行に機能的に関与する可能性が報告されている[116]。ネクロトーシスが、組織のターンオーバーにおいて必要なアポトーシスに取って代わることで脱髄が起こるのかもしれない。この仮説を証明するためには、より多くのヒト検体解析を含め、さらなる研究の必要がある。

以上、本論文で著者はペルオキシソームにおける脂質代謝の生理的役割のより良い理解を目指し、種々の検討を実施した。脂質異常症治療薬のフィブラート系化合物[48]やエイコ

サペンタエン酸[52]、ドコサヘキサエン酸[53]はペルオキシソーム機能を増強して脂質代謝を改善することが知られているし、アルツハイマー病患者においてペルオキシソーム機能が減弱しているという報告もある[117, 118]。乳酸菌が産生する HFAs はこれらの治療や予防に応用可能かもしれない。また、X-ALD のみならず、アルツハイマー病を含む種々の神経変性疾患で血中または組織中 CER 組成が変化している[63, 80, 81, 84 - 86]ことから、VLC-CER が豊富に存在する状況は神経変性疾患の基礎病態と捉えることができるかもしれない。本研究により得られた成果が、生活習慣病やペルオキシソーム病の新たな疾患概念の確立及び新規治療薬開発につながることを期待する。

## 参考文献

1. de Duve, C. & Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles)., *Physiol. Rev.*, 46, 323-357.
2. Goldfischer, S., Powers, J. M., Johnson, A. B., Axe, S., Brown, F. R., & Moser, H. W. (1983) Striated adrenocortical cells in cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome., *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 401, 355-361.
3. Lazarow, P. B., & de Duve, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2043-2046.
4. 須賀哲弥. (1990) ペルオキシソームの機能 (1) 脂質代謝, *蛋白質 核酸 酵素*, 35, 1408-1417.
5. Wanders, R. J. A. (2004) Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders., *Mol. Genet. Metab.*, 83, 16-27.
6. Wanders, R. J. A., Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jansen, G. A., Waterham, H. R., van Roermund, C. W. T., & van Grunsven, E. G. (2001) Peroxisomal fatty acid  $\alpha$ - and  $\beta$ -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases., *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 250-267.
7. van Veldhoven, P. P. (2010) Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J. Lipid Res.*, 51, 2863-2895.
8. Ferdinandusse, S., Denis, S., van Roermund, C. W. T., Wanders, R. J. A., & Dacremont, G. (2004) Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids., *J. Lipid Res.*, 45, 1104-1111.
9. Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P. A. W., Zhang, Z., Reddy, J. K., Spector, A. A., & Wanders, R. J. A. (2001) Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid., *J. Lipid Res.*, 42, 1987-1995.
10. Kemp, S., & Wanders, R. J. A. (2007) X-linked adrenoleukodystrophy: Very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment., *Mol. Genet. Metab.*, 90, 268-276.
11. Waterham, H. R., Ferdinandusse, S., & Wanders, R. J. A. (2016) Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1863, 922-933.
12. Morita, M., & Imanaka, T. (2012) Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease., *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 1387-1396.
13. Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S., & Osumi, T. (1999) Characterization of the 70 kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter., *J. Biol. Chem.*, 274, 11968-11976.
14. van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. A. (2011)

- Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation., *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 148-152.
15. van Roermund, C. W., Ijlst, L., Wagemans, T., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2014) A role for the human peroxisomal half transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids., *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 563-568.
  16. Ferdinandusse, S., Jimenez-Sanchez, G., Koster, J., Denis, S., van Roermund, C. W., Silva-Zolezzi, I., Moser, A. B., Visser, W. F., Gulluoglu, M., Durmaz, O., Demirkol, M., Waterham, H. R., Gokcay, G., Wanders, R. J. A., & Valle, D. (2015) A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3., *Hum. Mol. Genet.*, 24, 361-370.
  17. Baker, A., Carrier, D. J., Schaedler, T., Waterham, H. R., van Roermund, C. W., & Theodoulou, F. L. (2015) Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism., *Biochem. Soc. Trans.*, 43, 959-965.
  18. Geillon, F., Gondcaille, C., Charbonnier, S., van Roermund, C. W., Lopez, T. E., Dias, A. M. M., de Barros, J.-P. P., Arnould, C., Wanders, R. J. A., Trompier, D., & Savary, S. (2014) Structure-function analysis of peroxisomal ATP-binding cassette transporters using chimeric dimers., *J. Biol. Chem.*, 289, 24511-24520.
  19. Bezman, L., Moser, A. B., Raymond, G. V., Rinaldo, P., Watkins, P. A., Smith, K. D., Kass, N. E., Moser, H. W. (2001) Adrenoleukodystrophy: Incidence, new mutation rate, and results of extended family screening., *Ann. Neurol.*, 49, 512-517.
  20. 下澤伸行. (2013) ペルオキシソーム病ハンドブック 2013, 日本臨牀社.
  21. Tanaka, T., Morishige, J., Iwawaki, D., Fukuhara, T., Hamamura, N., Hirano, K., Osumi, T., Satouchi, K. (2007) Metabolic pathway that produces essential fatty acids from polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids in animal cells. *FEBS J.*, 274, 2728-2737.
  22. Tanaka, T., Uozumi, S., Morito, K., Osumi, T., & Tokumura, A. (2014) Metabolic conversion of C20 polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids to essential fatty acids. *Lipids*, 49, 423-429.
  23. Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 242-249.
  24. Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401-1412.
  25. Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.*, 12, 5-9.
  26. Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, 26, 26191.
  27. Kishino, S., Takeuchi, M., Park, S. B., Hirata, A., Kitamura, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Iwamoto, R., Isobe, Y., Arita, M., Arai, H., Ueda, K., Shima, J., Takahashi, S., Yokozeki, K.,

- Shimizu, S., & Ogawa, J. (2013) Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 17808-17813.
28. Miyamoto, J., Mizukure, T., Park, S. B., Kishino, S., Kimura, I., Hirano, K., Bergamo, P., Rossi, M., Suzuki, T., Arita, M., Ogawa, J., & Tanabe, S. (2015) A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J. Biol. Chem.*, 290, 2902-2918.
  29. Kim, M., Furuzono, T., Yamakuni, K., Li, Y., Kim, Y. I., Takahashi, H., Ohue-Kitano, R., Jheng, H. F., Takahashi, N., Kano, Y., Yu, R., Kishino, S., Ogawa, J., Uchida, K., Yamazaki, J., Tominaga, M., Kawada, T., & Goto, T. (2017) 10-Oxo-12(*Z*)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *FASEB J.*, 31, 5036-5048.
  30. Goto, T., Kim, Y. I., Furuzono, T., Takahashi, N., Yamakuni, K., Yang, H. E., Li, Y., Ohue, R., Nomura, W., Sugawara, T., Yu, R., Kitamura, N., Park, S. B., Kishino, S., Ogawa, J., & Kawada, T. (2015) 10-Oxo-12(*Z*)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 459, 597-603.
  31. Nanthirudjanar, T., Furumoto, H., Zheng, J., Kim, Y. I., Goto, T., Takahashi, N., Kawada, T., Park, S. B., Hirata, A., Kitamura, N., Kishino, S., Ogawa, J., Hirata, T., & Sugawara, T. (2015) Gut microbial fatty acid metabolites reduce triacylglycerol levels in hepatocytes. *Lipids*, 50, 1093-1102.
  32. Tsukamoto, T., Bogaki, A., Okumoto, K., Tateishi, K., Fujiki, Y., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., & Osumi, T. (1997) Isolation of a new peroxisome-deficient CHO cell mutant defective in peroxisome targeting signal-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 402-406.
  33. Tanaka, T., Morishige, J., Takimoto, T., Takai, Y., & Satouchi, K. (2001) Metabolic characterization of sciadonic acid (5*c*,11*c*,14*c*-eicosatrienoic acid) as an effective substitute for arachidonate of phosphatidylinositol. *Eur. J. Biochem.*, 268, 4928-4939.
  34. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
  35. Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., & Shimizu, S. (2001) Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1246-1252.
  36. Hirata, A., Kishino, S., Park, S.-B., Takeuchi, M., Kitamura, N., & Ogawa, J. (2015) A novel unsaturated fatty acid hydratase toward C16 to C22 fatty acids from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Lipid Res.*, 56, 1340-1350.
  37. Yamasaki, M., Hashiguchi, N., Fujiwara, C., Imanaka, T., Tsukamoto, T., & Osumi, T. (1999)

- Formation of peroxisomes from peroxisomal ghosts in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant upon complementation by protein microinjection. *J. Biol. Chem.*, 274, 35293-35296.
38. Ohue-Kitano, R., Yasuoka, Y., Goto, T., Kitamura, N., Park, S. B., Kishino, S., Kimura, I., Kasubuchi, M., Takahashi, H., Li, Y., Yeh, Y. S., Jheng, H. F., Iwase, M., Tanaka, M., Masuda, S., Inoue, T., Yamakage, H., Kusakabe, T., Tani, F., Shimatsu, A., Takahashi, N., Ogawa, J., Satoh-Asahara, N., & Kawada, T. (2018)  $\alpha$ -Linolenic acid-derived metabolites from gut lactic acid bacteria induce differentiation of anti-inflammatory M2 macrophages through G protein-coupled receptor 40. *FASEB J.*, 32, 304-318.
  39. Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, K., Karaki, S., Mukoyama, H., Kishino, S., Li, X., Ichimura, A., Irie, J., Sugimoto, Y., Mizutani, T., Sugawara, T., Miki, T., Ogawa, J., Drucker, D. J., Arita, M., Itoh, H., & Kimura, I. (2019) Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat. Commun.*, 10, 4007.
  40. Fauler, J., Tsikas, D., Mayatepek, E., Keppler, D., & Frölich, J. C. (1994) Impaired degradation of prostaglandins and thromboxane in Zellweger syndrome. *Pediatr. Res.*, 36, 449-455.
  41. Diczfalusy, U. & Alexson, S. E. H. (1988) Peroxisomal chain-shortening of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *J. lipid Res.*, 29, 1629-1636.
  42. Diczfalusy, U., Vesterqvist, O., Kase, B. F., Lund, E., & Alexson, S. E. H. (1993) Peroxisomal chain-shortening of thromboxane B<sub>2</sub>: evidence for impaired degradation of thromboxane B<sub>2</sub> in Zellweger syndrome. *J. lipid Res.*, 34, 1107-1113.
  43. Jedlitschky, G., Huber, M., Völkl, A., Müller, M., Leier, I., Müller, J., Lehmann, W. D., Fahimi, H. D., & Keppler, D. (1991) Peroxisomal degradation of leukotrienes by  $\beta$ -oxidation from the  $\omega$ -end. *J. Biol. Chem.*, 266, 24763-24772.
  44. Mayatepek, E., Lehmann, W. D., Fauler, J., Tsikas, D., Frölich, J. C., Schutgens, R. B., Wanders, R. J., & Keppler, D. (1993) Impaired degradation of leukotrienes in patients with peroxisome deficiency disorders. *J. Clin. Invest.*, 91, 881-888.
  45. Gordon, J. A., Figard, P. H., & Spector, A. A. (1990) Hydroxyeicosatetraenoic acid metabolism in cultured human skin fibroblasts. Evidence for peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *J. Clin. Invest.*, 85, 1173-1181.
  46. Hagenfeldt, L., Blomquist, L., & Midtvedt, T. (1986) Epoxydicarboxylic aciduria resulting from the ingestion of castor oil. *Clin. Chim. Acta*, 161, 157-163.
  47. Lakhia, R., Yheskel, M., Flaten, A., Quittner-Strom, E. B., Holland, W. L., & Patel, V. (2018) PPAR $\alpha$  agonist fenofibrate enhances fatty acid  $\beta$ -oxidation and attenuates polycystic kidney and liver disease in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 314, F122-F131.
  48. Baboota, R. K., Murtaza, N., Jagtap, S., Singh, D. P., Karmase, A., Kaur, J., Bhutani, K. K., Boparai, R. K., Premkumar, L. S., Kondepudi, K. K., & Bishnoi, M. (2014) Capsaicin-induced transcriptional changes in hypothalamus and alterations in gut microbial count in high fat diet fed

- mice. *J. Nutr. Biochem.*, 25, 893-902.
49. Kalmijn, S., van Boxtel, M. P., Ocké, M., Verschuren, W. M., Kromhout, D., & Launer, L. J. (2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology*, 62, 275-280.
  50. Cheng, H. M., Secretion of Digestive Juices, in: H. M. Cheng (Eds.), *Physiology Question-Based Learning*, Springer, Singapore, 2016, pp. 137-148.
  51. Aarsland, A., Lundquist, M., Børretsen, B., & Berge, R. K. (1990) On the effect of peroxisomal  $\beta$ -oxidation and carnitine palmitoyltransferase activity by eicosapentaenoic acid in liver and heart from rats. *Lipids* 25, 546-548.
  52. Willumsen, N., Hexeberg, S., Skorve, J., Lundquist, M., & Berge, R. K. (1993) Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J. Lipid Res.*, 34, 13-22.
  53. Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.*, 152, 387-395.
  54. O'Brien, J. S., & Sampson, E. L. (1965) Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.*, 6, 545-551.
  55. Kemp, S., Berger, J., & Aubourg, P. (2012) X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 1465-1474.
  56. Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B. M., Wanders, R. J., Aubourg, P., & Poll-The, B. T. (2012) X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet. J. Rare Dis.*, 7, 51.
  57. Ferrer, I., Aubourg, J. P., & Pujol, A. (2010) General Aspects and Neuropathology of X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Brain Pathology. Brain Pathol.*, 20, 817-830.
  58. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン作成委員会 (編) .(2017) 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン 2017, 診断と治療社.
  59. Hama, K., Nagai, T., Nishizawa, C., Ikeda, K., Morita, M., Satoh, N., Nakanishi, H., Imanaka, T., Shimozawa, N., Taguchi, R., Inoue, K., & Yokoyama, K. (2013) Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. *Lipids*, 48, 1253-167.
  60. Hama, K., Fujiwara, Y., Morita, M., Yamazaki, F., Nakashima, Y., Takei, S., Takashima, S., Setou, M., Shimozawa, N., Imanaka, T., & Yokoyama, K. (2018) Profiling and imaging of phospholipids in brains of Abcd1-deficient mice. *Lipids*, 53, 85-102.
  61. Hubbard, W. C., Moser, A. B., Liu, A. C., Jones, R. O., Steinberg, S. J., Lorey, F., Panny, S. R., Vogt, R. F., Macaya, D., Turgeon, C. T., Tortorelli, S., & Raymond, G. V. (2009) Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): Validation of a combined liquid chromatography–tandem mass spectrometric (LC–MS/MS) method. *Mol. Genet. Metab.*, 97,



212-220.

62. Lee, D.-K., Long, N. P., Tae, J. J., Kim, J., Na, E., Kang, Y. P., Kwon, S. W., & Jang, J. (2019) Integrative lipidomic and transcriptomic analysis of X-linked adrenoleukodystrophy reveals distinct lipidome signatures between adrenomyeloneuropathy and childhood cerebral adrenoleukodystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 508, 563-569.
63. Pettus, B. J., Baes, M., Busman, M., Hannun, Y. A., & van Veldhoven, P. P. (2004) Mass spectrometric analysis of ceramide perturbations in brain and fibroblasts of mice and human patients with peroxisomal disorders. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 1569-1574.
64. Deng, X., Yin, X., Allan, R., Lu, D. D., Maurer, C. W., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Shaham, S., & Kolesnick, R. (2008) Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science*, 322, 110-115.
65. Yu, Z. F., Nikolova-Karakashian, M., Zhou, D., Cheng, G., Schuchman, E. H., & Mattson, M. P. (2000) Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J. Mol. Neurosci.*, 15, 85-97.
66. Smith, E. L., & Schuchman, E. H. (2008) The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J.*, 22, 3419-3431.
67. Jin, J., Hou, Q., Mullen, T. D., Zeidan, Y. H., Bielawski, J., Kraveka, J. M., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., & Hsu, Y. T. (2008) Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondria in NT-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 283, 26509-26517.
68. Kolesnick, R. (2002) The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J. Clin. Invest.*, 110, 3-8.
69. Pettus, B. J., Chalfant, C. E., & Hannun, Y. A. (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta*, 1585, 114-125.
70. Grösch, S., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2012) Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.*, 51, 50-62.
71. Hammad, S. M., Pierce, J. S., Soodavar, F., Smith, K. J., Al Gadban, M. M., Rembiesa, B., Klein, R. L., Hannun, Y. A., Bielawski, J., & Bielawska, A. (2010) Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J. Lipid Res.*, 51, 3074-3087.
72. Wiesinger, C., Eichler, F. S., & Berger, J. (2015) The genetic landscape of X-linked adrenoleukodystrophy: inheritance, mutations, modifier genes, and diagnosis. *Appl. Clin. Genet.*, 8, 109-121.
73. Baarine, M., Ragot, K., Athias, A., Nury, T., Kattan, Z., Genin, E. C., Andreoletti, P., Menetrier, F., Riedinger, J. M., Bardou, M., & Lizard, G. (2012) Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF- $\alpha$  on oligodendrocytes and astrocytes. *Neurotoxicology*, 33, 212-228.

74. Laviad, E. L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill Jr., A. H., & Futerman, A. H. (2007) Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 283, 5677-5684.
75. Levy, M., & Futerman, A. H. (2010) Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*, 62, 347-356.
76. Mullen, T. D., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2012) Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.*, 441, 789-802.
77. Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010) An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 688, 1-23.
78. Imgrund, S., Hartmann, D., Farwanah, H., Eckhardt, M., Sandhoff, R., Degen, J., Gieselmann, V., Sandhoff, K., & Willecke, K. (2009) Adult Ceramide Synthase 2 (CERS2)-deficient Mice Exhibit Myelin Sheath Defects, Cerebellar Degeneration, and Hepatocarcinomas. *J. Biol. Chem.*, 284, 33549-33560.
79. Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., & Mattson, M. P. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2070-2075.
80. Couttas, T. A., Kain, N., Suchowerska, A. K., Quek, L.-E., Turner, N., Fath, T., Garner, B., & Don, A. S. (2016) Loss of ceramide synthase 2 activity, necessary for myelin biosynthesis, precedes tau pathology in the cortical pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 43, 89-100.
81. Khayrullin, A., Krishnan, P., Martinez-Nater, L., Mendhe, B., Fulzele, S., Liu, Y., Mattison, J. A., & Hamrick, M. W. (2019) Very long-chain C24:1 ceramide is increased in serum extracellular vesicles with aging and can induce senescence in bone-derived mesenchymal stem cells. *Cells*, 8, 37.
82. Mielke, M. M., Venkata, V., Bandaru, R., Han, D., An, Y., Resnick, S. M., Ferrucci, L., & Haughey, N. J. (2015) Demographic and clinical variables affecting mid- to late-life trajectories of plasma ceramide and dihydroceramide species. *Aging Cell*, 14, 1014-1023.
83. Jazvinščak Jembrek, M., Hof, P. R., & Šimić, G. (2015) Ceramides in alzheimer's disease: key mediators of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and A $\beta$  accumulation. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015, 346783.
84. Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C. P., Tischbirek, C. H., Groemer, T. W., Tabatabai, G., Becker, K. A., Tripal, P., Staedtler, S., Ackermann, T. F., van Brederode, J., Alzheimer, C., Weller, M., Lang, U. E., Kleuser, B., Grassmé, H., & Kornhuber, J. (2013) Acid sphingomyelinase–ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat. Med.*, 19, 934-938.
85. Dinoff, A., Herrmann, N., & Lanctôt, K. L. (2017) Ceramides and depression: a systematic review.

- J. Affect. Disord.*, 213, 35-43.
86. Kim, S., Steelman, A. J., Zhang, Y., Kinney, H. C., & Li, J. (2012) Aberrant upregulation of astroglial ceramide potentiates oligodendrocyte injury. *Brain Pathol.*, 22, 41-57.
  87. Wilson, R., & Sargent, J. R. (1993) Lipid and fatty acid composition of brain tissue from adrenoleukodystrophy patients. *J. Neurochem.*, 61, 290-297.
  88. Sassa, T., Wakashima, T., Ohno, Y., & Kihara, A. (2014) Lorenzo's oil inhibits ELOVL1 and lowers the level of sphingomyelin with a saturated very long-chain fatty acid. *J. Lipid Res.*, 55, 524-530.
  89. Paintlia, A. S., Gilg, A. G., Khan, M., Singh, A. K., Barbosa, E., & Singh, I. (2003) Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.*, 14, 425-439.
  90. Forss-Petter, S., Werner, H., Berger, J., Lassmann, H., Molzer, B., Schwab, M. H., Bernheimer, H., Zimmermann, F., & Nave, K.-A. (1997) Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J. Neurosci. Res.*, 50, 829-843.
  91. Lu, J.-F., Lawler, A. M., Watkins, P. A., Powers, J. M., Moser, A. B., Moser, H. W., & Smith, K. D. (1997) A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9366-9371.
  92. Kobayashi, T., Shinnoh, N., Kondo, A., & Yamada, T. (1997) Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 631-636.
  93. Pujol, A., Hindelang, C., Callizot, N., Bartsch, U., Schachner, M., & Mandel, J. L. (2002) Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 499-505.
  94. Mesicek, J., Lee, H., Feldman, T., Jiang, X., Skobeleva, A., Berdyshev, E. V., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., & Kolesnick, R. (2010) Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. *Cell. Signal.*, 22, 1300-1307.
  95. Koybasi, S., Senkal, C. E., Sundararaj, K., Spassieva, S., Bielawski, J., Osta, W., Day, T. A., Jiang, J. C., Jazwinski, S. M., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., & Ogretmen, B. (2004) Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *J. Biol. Chem.*, 279, 44311-44319.
  96. White-Gilbertson, S., Mullen, T., Senkal, C., Lu, P., Ogretmen, B., Obeid, L., & Voelkel-Johnson, C. (2009) Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene*, 28, 1132-1141.
  97. Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Ogretmen, B. (2010) Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C<sub>16</sub>-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J.*, 24, 296-308.

98. Hoeflerlin, L. A., Fekry, B., Ogretmen, B., Krupenko, S. A., & Krupenko, N. I. (2013) Folate stress induces apoptosis via p53-dependent *de novo* ceramide synthesis and up-regulation of ceramide synthase 6. *J. Biol. Chem.*, 288, 12880-12890.
99. Kroesen, B.-J., Pettus, B., Luberto, C., Busman, M., Sietsma, H., de Leij, L., & Hannun, Y. A. (2001) Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via *de novo* generated C16-ceramide and involves mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 276, 13606-13614.
100. Siskind, L. J., Mullen, T. D., Romero Rosales, K., Clarke, C. J., Hernandez-Corbacho, M. J., Edinger, A. L., & Obeid, L. M. (2010) The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 285, 11818-11826.
101. Osawa, Y., Uchinami, H., Bielawski, J., Schwabe, R. F., Hannun, Y. A., & Brenner, D. A. (2005) Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 280, 27879-27887.
102. Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., & Hannun, Y. A. (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A: activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 274, 20313-20317.
103. Fekry, B., Jeffries, K. A., Esmailniakooshkghazi, A., Szulc, Z. M., Knagge, K. J., Kirchner, D. R., Horita, D. A., Krupenko, S. A., & Krupenko, N. I. (2018) C16-ceramide is a natural regulatory ligand of p53 in cellular stress response. *Nat. Commun.*, 9, 4149.
104. Müller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., & Pfizenmaier, K. (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF- $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.*, 14, 1961-1969.
105. Siskind, L. J., Kolesnick, R. N., & Colombini, M. (2002) Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.*, 277, 26796-26803.
106. Colombini, M. (2017) Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 49, 57-64.
107. Stiban, J., & Perera, M. (2015) Very long chain ceramides interfere with C<sub>16</sub>-ceramide-induced channel formation: A plausible mechanism for regulating the initiation of intrinsic apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1848, 561-567.
108. Li, R., Blanchette-Mackie, E. J., & Ladisch, S. (1999) Induction of endocytic vesicles by exogenous C<sub>6</sub>-ceramide. *J. Biol. Chem.*, 274, 21121-21127.
109. Younes, A., Kahn, D. W., Besterman, J. M., Bittman, R., Byun, H. S., & Kolesnick, R. N. (1992) Ceramide is a competitive inhibitor of diacylglycerol kinase in vitro and in intact human leukemia (HL-60) cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 842-847.
110. Yeung, M. S. Y., Zdunek, S., Bergmann, O., Bernard, S., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Brundin, L., Druid, H., & Frisé, J. (2014) Dynamics of oligodendrocyte

- generation and myelination in the human brain. *Cell*, 159, 766-774.
111. Cerghet, M., Skoff, R. P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., & Ghandour, M. S. (2006) Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *J. Neurosci.*, 26, 1439-1447.
112. Ando, S., Tanaka, Y., Toyoda, Y., & Kon, K. (2003) Turnover of myelin lipids in aging brain. *Neurochem. Res.*, 28, 5-13.
113. Igarashi, M., Schaumburg, H. H., Powers, J., Kishimoto, Y., Koilodny, E., & Suzuki, K. (1976) Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.*, 26, 851-860.
114. 今中常雄. (2018) ペルオキシソームの形成・機能と遺伝病：ABC トランスポーターを中心に, *YAKUGAKU ZASSHI*, 138, 1067-1083.
115. Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D. R., Bedford, J. S. & Li, C.-Y. (2010) Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal.*, 3, ra13.
116. Parisi, L. R., Li, N., & Atilla-Gokcumen, G. E. (2017) Very long chain fatty acids are functionally involved in necroptosis. *Cell Chem. Biol.*, 24, 1445-1454.
117. Kou, J., Kovacs, G. G., Höftberger, R., Kulik, W., Brodde, A., Forss-Petter, S., Hönigschnabl, S., Gleiss, A., Brügger, B., Wanders, R., Just, W., Budka, H., Jungwirth, S., Fischer P., & Berger J. (2011) Peroxisomal alterations in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol.*, 122, 271-283.
118. Lizard, G., Rouaud, O., Demarquoy, J., Cherkaoui-Malki, M., & Iuliano, L. (2012) Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *J. Alzheimers Dis.*, 29, 241-254.

## 謝辞

本研究の遂行に際し、終始適切な御指導御鞭撻を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域（生物資源産業学部）食料科学分野（前徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）衛生薬学分野 准教授） 田中保教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御協力、御助言を頂きました徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）衛生薬学分野 小暮健太郎教授、福田達也助教、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究室 小川順教授、岸野重信准教授、北村苗穂子氏、朴時範氏、岐阜大学科学研究基盤センターゲノム研究分野 下澤伸行教授、徳島大学病院感染制御部 東桃代先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、経済的助成をいただきました公益財団法人三島海雲記念財団様に感謝申し上げます。

また、本研究を通じ御協力を頂きました徳島大学薬学部衛生薬学分野の同志、卒業生、ならびに在校生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、終始にわたり応援し、協力してくださいました家族に心より感謝いたします。

2020年1月