

Title	先天性筋ジストロフィーモデルrmdマウスのマルチオミックス解析
Sub Title	
Author	高藤, 真由子(Takato, Mayuko)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.116- 127
JaLC DOI	
Abstract	先天性筋ジストロフィー(Congenital Muscular Dystrophy : CMD)は生下時から筋力低下を認める遺伝性筋疾患の総称である。1998年, ミトコンドリア異常を伴う新規CMDが発見され, 原因遺伝子のひとつがCholine Kinase β (Chkb)であることが同定された。Choline Kinase β は細胞膜を構成するグリセロリン脂質の一つ, Phosphatidylcholine(PC)の合成経路であるKennedy経路の第一段階を触媒する酵素である。しかしながら, CMDの病態に繋がる代謝機構は解明されておらず, 詳細な発症メカニズムは不明である。本研究は, Chkbを欠損させたCMDモデルマウスであるRostral-to-caudal Muscular Dystrophy mouse : rmdマウス, 健常マウスの大腿四頭筋を対象とし, 代謝物の変動を理解することを目的とする。Chkbの欠損があるCMDでは細胞膜を構成する脂質に代謝変化をもたらす可能性があるため, 脂質メタボローム解析による変動解析と, トランスクリプトーム解析による遺伝子発現量解析を行った。グリセロリン脂質の解析を行った結果, PCはrmdマウスで減少する一方, Phosphatidylethanolamine(PE), Phosphatidylserine(PS)は増加する傾向がある。rmdマウスの筋肉ではPE, PSを基質とするPhospholipase A2の遺伝子発現量が増加しており, リゾリン脂質と共に多価不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid : PUFA)が増えていることが示唆される。また, PUFAの増加に伴って, PUFAの酸化代謝物であるProstaglandin類などの炎症性メディエーターも増加している可能性がある。以上より, CMDの発症に細胞膜のグリセロリン脂質バランスの変化が引き金となる炎症反応の関与が示唆される。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0116

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

先天性筋ジストロフィーモデル*rmd*マウスのマルチオミックス解析

高藤真由子

要旨

先天性筋ジストロフィー (Congenital Muscular Dystrophy : CMD) は生下時から筋力低下を認める遺伝性筋疾患の総称である。1998年, ミトコンドリア異常を伴う新規CMDが発見され, 原因遺伝子のひとつが *Choline Kinase β* (*Chkb*) であることが同定された。Choline Kinase β は細胞膜を構成するグリセロリン脂質の一つ, Phosphatidylcholine (PC) の合成経路であるKennedy経路の第一段階を触媒する酵素である。しかしながら, CMDの病態に繋がる代謝機構は解明されておらず, 詳細な発症メカニズムは不明である。本研究は, *Chkb* を欠損させたCMDモデルマウスであるRostral-to-caudal Muscular Dystrophy mouse : *rmd*マウス, 健常マウスの大腿四頭筋を対象とし, 代謝物の変動を理解することを目的とする。*Chkb*の欠損があるCMDでは, 細胞膜を構成する脂質に代謝変化をもたらす可能性があるため, 脂質メタボローム解析による変動解析と, トランスクリプトーム解析による遺伝子発現量解析を行った。グリセロリン脂質の解析を行った結果, PCは*rmd*マウスで減少する一方, Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylserine (PS) は増加する傾向がある。*rmd*マウスの筋肉ではPE, PSを基質とするPhospholipase A₂の遺伝子発現量が増加しており, リゾリン脂質と共に多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid : PUFA) が増えていることが示唆される。また, PUFAの増加に伴って, PUFAの酸化代謝物であるProstaglandin類などの炎症性メディエーターも増加している可能性がある。以上より, CMDの発症に細胞膜のグリセロリン脂質バランスの変化が引き金となる炎症反応の関与が示唆される。

[Key words] *rmd*マウス, 筋ジストロフィー, グリセロリン脂質, メタボローム, LC-MS

1. 序論

先天性筋ジストロフィー (Congenital Muscular Dystrophy : CMD) は10万人に1人が発症する希少疾患で, 生下時から筋緊張低下, 筋力低下などの症状, 筋生検では筋細胞に変性や萎縮が認められる [1]. CMDは4つ大きなカテゴリーがあり, (1) コラーゲン異常症であるコラーゲンVI 関連筋疾患, ウーリッヒ型, ベスレムミオパチー, (2) メロシン異常症であるメロシン欠損CMD, ラミニン α 関連CMD, (3) ジストログリカンの糖鎖不全による先天性異常症である福山型CMD, Muscle-eye-brain disease, ウォーカー・ワールブルグ症候群と (4) その他の希少疾患に分類される [2]. 1998年 (1)~ (3) に分類されず (4) に属する, 骨格筋繊維内に特徴的なミトコンドリアの異常と重篤な精神遅滞を持つCMDが発見された [3]. 筋生検を見るとミ

トコンドリアが繊維の末梢に肥大して蔓延し、中央は低密度になる形態を示している。血液検査では他の種類と筋ジストロフィーと同様クレアチンキナーゼの値が上昇する [4]。2006年、新しいCMDの原因遺伝子がコリンキナーゼのアイソフォームである*Chkb*であることが同定された [5]。*Chkb*は細胞膜の主要構成成分であるPCを産生するKennedy経路の第一段階を触媒する酵素である。代謝機構は*Chkb*周辺の代謝を含む一部しか解明されていないため、発症する正確なメカニズムはわかっていない。

本研究はCMDのモデルマウスである、*Chkb*の一部を欠失変異させたRostral-to-caudal Muscular Dystrophy mouse (*rmd*マウス)、健常マウスから採取した前後肢の大腿四頭筋を対象とし、ミトコンドリアの異常を伴う新しいCMDの代謝変動メカニズムを解明することを目的とする。*rmd*マウスの前肢は*Chka*が発現しており、後肢には*Chkb*が発現しているため、筋ジストロフィーの症状である筋力低下は後肢のみに起こる。そのため、*rmd*マウスは後肢を引きずるように歩いている [5]。*Chkb*の欠損によって、*rmd*マウスの後肢に含まれるリン脂質のひとつであるPCに変化をもたらすことが先行研究で示されているが、CMDが起こる詳細な発症メカニズムは未だ不明である。今回対象としている*rmd*マウスは*Chkb*の欠損によって、PC分子種が減少することが報告されている。しかしながら、先行研究で測定されたPCは多く存在する分子種の一部であり、その他のPC分子種、およびコリン以外の極性基を持つグリセロリン脂質に変化をもたらす可能性がある。そこで、グリセロリン脂質とその周辺の代謝経路における変化を探索するため、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂質代謝物の網羅的な測定を行い、グリセロリン脂質の変動を理解することを目的とした。加えて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析も組み合わせて行った。*rmd*マウスにおけるマルチオミクス解析の結果、CMDの筋肉中ではグリセロリン脂質のバランスが崩れ、グリセロリン脂質から遊離された脂肪酸を前駆体とする炎症性メディエーターが増加しており、*rmd*マウスの発症に細胞膜脂質代謝が引き金となる炎症反応の関与が示唆された。

2. 対象と手法

2.1 測定対象

8週齢のマウスから採取した前後肢の大腿四頭筋を本解析対象とした (表1)。マウス組織は獨協医科大学生化学講座杉本博之教授より頂いた。組織の破碎は、チューブに液体窒素で凍らせた筋肉組織とメタノール 0.5 mL, Zr beads (3 mm × 5) をチューブに入れ、破碎を行った (1500 rpm, 5 min)。破碎したサンプルは実験開始まで-80°Cで冷凍保存した。

表1. マウスの種類、筋肉組織の重量

Type	ID	Mass (mg)	Type	ID	Mass (mg)	
Hindlimb	H-C1	203.4	<i>rmd</i>	H-R1	59.2	
	H-C2	191.6		H-R2	58.6	
	H-C3	212.2		H-R3	48.6	
	H-C4	52.8		H-R4	59.7	
	Wild	H-C5		59.6	H-R5	57.3
	H-C6	62.6		H-R6	46.7	
Forelimb	F-C1	127.9	F-R1	64.8		
	F-C2	104.2	F-R2	66.8		
	F-C3	143.8	F-R3	37.2		

2.2 脂質メタボローム測定

2.2.1 グリセロリン脂質の測定

破砕したサンプルを遠心分離 (25°C, 2000 G, 5 min) し、上澄みを検体入り破砕液として一層抽出を行った。検体入り破砕液は全てのサンプルで組織が2.5 mg相当になるように重量の補整を行なった。破砕液を遠心濃縮 (5°C, 9100 G, 120 min) して水分を飛ばし、CHCl₃100 µL, Internal Standard (IS) 入りメタノール200 µL, Milli Q20 µLを加え、各試薬を入れるごとに超音波破砕を30 sec後、30 minインキュベートした。遠心 (20°C, 2000 G, 10 min) を行って破砕液の上澄み250 µLをシラン処理済みのガラスチューブに分注し、窒素置換によって破砕液の水分を完全に飛ばした。ドライアップさせた破砕液は、測定前にCHCl₃ : メタノール : Milli Q (1:1:2) の混合溶媒20 µLで再溶解を行った。前処理を行ったサンプルは高速液体クロマトグラフ : UltraPerformance LC®, 四重極飛行時間型質量分析計 : TripleTOF® 5600を用いて測定を行った。質量分析計で測定されたデータはLipid Search ver1.2.17を用いてピークのアノテーション付けを行った。そこから予測された代謝物のRTとm/zからMultiQuant™ ver3.0によってピークのピッキングとピーク面積の算出を行った。同位体の分離の確認はPeak Viewを使用して、MS/MSピークの視認によって行われた。

2.2.2 リゾリン脂質, Acyl CoAの測定

破砕したサンプルを遠心分離 (25°C, 2000 G, 5 min) にかけて、上澄みを検体入り破砕液として使用した。抽出には固相抽出スピンカラム Mono Spin™ C18を使用した。検体入り破砕液は全てのサンプルで組織が18 mg相当になるように重量の補整を行った。洗浄したカラムに0.1%蟻酸入りH₂O350 µL, IS入りメタノール100 µLに溶かした破砕液を入れ、遠心分離 (25 °C, 2000 G, 2 min) によって組織をフィルターに吸着させた。その後、0.1%蟻酸入りH₂O300 µLによってフィルターの洗浄を行った。カラムに受けチューブをつけ0.1%蟻酸入りメタノール100 µLと蟻酸メチル50 µLによって、カラムに吸着している成分の抽出を行った (25°C, 2000 G, 2 min)。抽出された400 µLの回収液をシラン処理済みのガラスチューブに入れ、遠心濃縮を行って水分を飛ばした (15°C, 9100G, 4h)。乾燥させた回収液に External Standard (ES) 50 µL加え、超音波破砕を3 min行った後、攪拌し再溶解を行なった。前処理を行ったサンプルを高速液体クロマトグラフ :

Agilent 1290 Infinity LC, トリプル四重極型質量分析計: QTRAP® 5500を使用し, MRMモードで測定を行った. 測定されたデータはAbfConverterを用いてファイル変換し, 定量解析用ソフトウェアであるMRMPROBS ver1.41 [6] を使用して, ピークの切り出しを行った. ピーク面積はISの値で補正し正規化を行った.

2.3 統計解析

アノテーションのついた代謝物を対象とした. パラメトリック検定であるWelchのt検定はMeV ver4.8を使って解析を行った. その後, 代謝経路へのマッピングを行い*rmd*マウスでどのような代謝の変動が起こっているか考察を行った.

2.4 遺伝子発現量解析

健常マウス, *rmd*マウスから採取した前肢, 後肢 (各n=1) の大腿四頭筋における遺伝子発現量解析を行った. 前処理は株式会社DNAチップ研究所のAgilent社製マイクロアレイ受託解析サービスによって行われ, 前処理と測定のプロトコルはAgilentの標準プロトコルに沿って行われた. 読み取られた発現量のプローブは, コントロールプローブの発現以下は発現量の低いプローブと見なして取り除き, 数値は遺伝子間で補正を行った. 1つの遺伝子につき複数あるプローブは発現量の平均値をとった. 結果, 信頼可能な遺伝子は34938個であった. 以上の行程はRのパッケージlimma [7] を使用した.

3. 結果

3.1 ランズ回路について

3.1.1 グリセロリン脂質について

後肢に含まれるPC, PE, PSの分子種を図に示す. PCは全体的に減少している傾向が見られた. PCでは特に, 16:0や22:5, 22:6など長鎖脂肪酸が含まれているグリセロリン脂質で有意に減少していた (図1a). 一方, PEやPSでは全体的に増加している傾向が見られ, 特に, 16:0, 18:0が含まれるグリセロリン脂質で増加す

る傾向が見られた (図1b, c).

(a) Phosphatidylcholine

	14:0	15:0	16:0	16:0p	16:0e	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2
14:0	0.66	ND	0.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:0	ND	0.76	0.79	2.48	ND	ND	ND	1.28	ND	ND
16:1	ND	ND	0.82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17:1	ND	ND	0.68	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.31
18:1	ND	0.60	0.62	ND	ND	ND	0.80	1.22	ND	ND
18:2	1.33	ND	1.29	ND	2.02	1.19	ND	ND	ND	2.02
18:3	ND	ND	1.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:2	ND	ND	2.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:3	ND	ND	0.95	ND	ND	ND	ND	1.54	ND	ND
20:4	ND	0.85	0.73	ND	ND	1.08	0.77	1.47	ND	1.30
20:5	ND	ND	0.93	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21:5	ND	ND	0.30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:4	ND	ND	0.76	ND	ND	ND	ND	0.63	ND	ND
22:5	ND	ND	0.31	ND	ND	ND	ND	0.50	ND	ND
22:6	ND	0.28	0.23	0.47	0.40	ND	0.21	0.38	0.57	ND

(b) Phosphatidylethanolamine

	14:0	15:0	16:0	16:0p	16:1	17:0	18:0	18:0p	18:1	18:1p	18:2	20:3	20:4	22:4	22:5	22:6
16:0	ND	ND	4.86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:1	ND	ND	4.24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18:1	ND	ND	4.40	2.63	ND	ND	4.45	3.42	ND	2.42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18:2	ND	ND	3.33	6.17	ND	ND	3.44	ND	3.61	ND	3.07	ND	ND	ND	ND	ND
20:3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:4	ND	ND	1.43	3.14	ND	ND	1.59	2.89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:5	ND	ND	1.64	3.16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:4	ND	ND	ND	3.04	ND	ND	1.82	3.17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:5	ND	ND	1.35	2.78	ND	ND	1.12	2.61	ND	2.62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:6	0.61	ND	0.86	2.56	1.31	1.00	ND	2.13	1.57	2.53	1.08	0.74	0.91	0.30	0.33	ND

(c) Phosphatidylserine

	16:0	16:0p	17:0	18:0	18:1	18:2	19:0	22:5
18:2	ND	ND	ND	3.36	3.28	ND	ND	ND
20:4	ND	ND	ND	3.14	ND	ND	ND	ND
22:5	ND	ND	ND	1.28	ND	ND	ND	ND
22:6	0.76	1.60	1.68	1.85	1.45	0.91	0.82	0.43

図1a, b, c. Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserineの分子種における*rmc*マウスと健常マウスの割合

数字は*rmc*マウスと健常マウスにおける後肢のピーク面積値の割合を示す。背景が黒の物質は*rmc*マウスで増加する傾向を示し、白の物質は*rmc*マウスで減少する傾向を示す。NDは検出することができなかった代謝物を示す。

3.1.2 リゾリン脂質の分子種について

後肢に含まれるリゾリン脂質の分子種を図に示す (図2)。Lysophosphatidylcholine (LPC) は22:3, 22:4, 22:5, 22:6など長鎖脂肪酸を含むリゾ体において有意に減少していた。しかしながら、Lysophosphatidylethanolamine (LPE), Lysophosphatidylserine (LPS) では16:0, 18:0, 18:1, 18:2など中鎖脂肪酸を含むリゾ体で増加していた。全体的な傾向を見ると、LPCは減少している傾向、LPE, LPSでは増加し

ている傾向が見られ、逆の傾向が見られた。

	14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	19:0	20:0	20:1	20:2	20:3	20:4	20:5	22:0	22:1	22:2	22:3	22:4	22:5	22:6	24:0	24:1
LPC	1.73	1.35	1.33	1.44	1.42	1.35	1.29	1.37	1.21	1.12	0.94	1.14	0.40	0.82	0.72	1.28	1.42	1.49	1.27	0.46	0.39	0.32	0.40	1.26	ND
LPE	5.11	ND	2.00	2.62	1.74	2.18	2.63	2.13	0.90	0.86	0.73	1.33	1.59	ND	3.08	1.43	6.11	ND	1.00	ND	3.08	3.13	2.17	ND	ND
LPS	ND	ND	2.11	ND	1.53	2.37	2.13	2.80	ND	5.56	2.03	1.48	ND	2.29	2.04	ND	1.89	2.10	0.59	ND	1.13	1.01	1.24	3.02	1.51

図2. リゾリン脂質5種の分子種における*rmd*マウスと健常マウスの割合

数字は*rmd*マウスと健常マウスにおける後肢のピーク面積値の割合を示す。背景が黒の物質は*rmd*マウスで増加する傾向を示し、白の物質は*rmd*マウスで減少する傾向を示す。NDは検出することができなかった代謝物を示す。

3.1.3 脂肪酸について

*rmd*マウスの後肢の筋肉では、飽和脂肪酸や一価、二価不飽和脂肪酸ではほとんど変化はなかった。炭素を伸張させるElongase (*Elovl1*~7)、二重結合を付加するDesaturase (*Scd1*~4, *Fads1*~3,6) のうち、*Scd1*のみ*rmd*マウスで遺伝子発現

その他の遺伝
られな
った。一
方で

Arachidonic
(AA)
Docosahexaenoic
acid (DHA),
Eicosapentaenoic
acid
(EPA) などのPUFAの濃度は

増加していた (図3)。

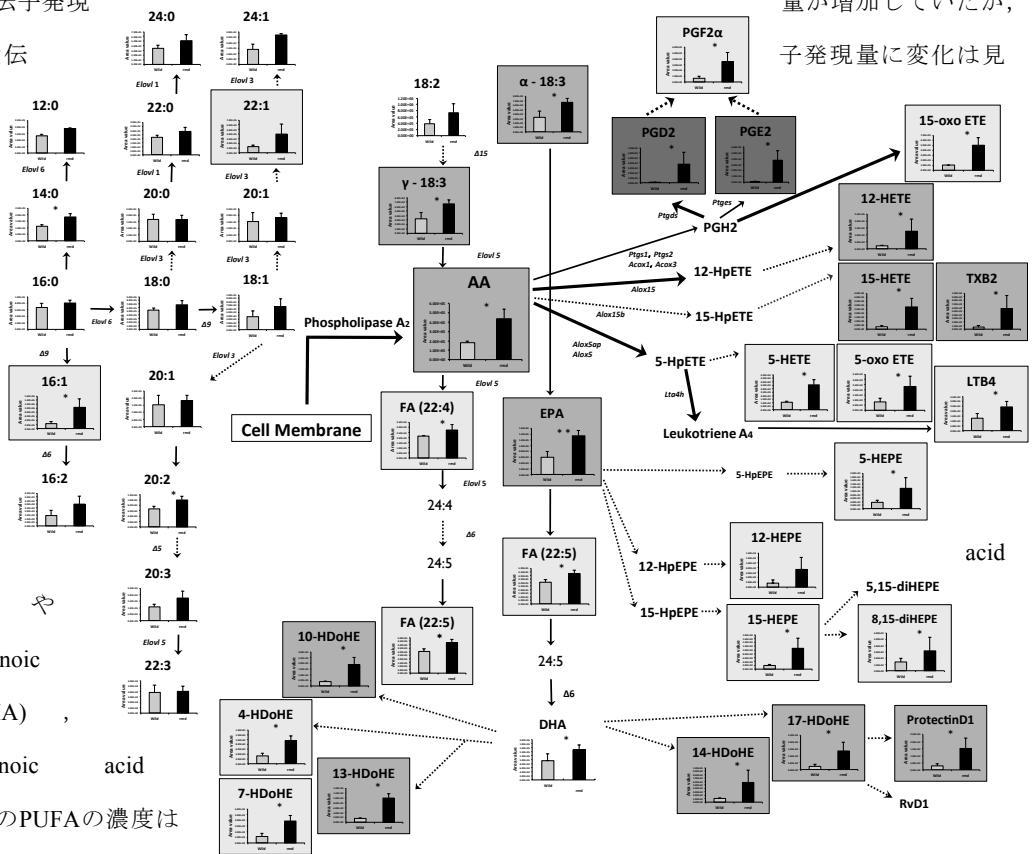


図3. *rmd*マウスの後肢における脂肪酸代謝

横軸の灰色が野生型マウス、黒が*rmd*マウス、縦軸がピーク面積値 (cps)、エラーバーは標準偏差を示す。 *rmd*マウス/野生型マウスのメタボライトの割合は背景の色で表し、 *rmd/wild*の値が高いほど黒、2群間に変化がないものは白になっている。 矢印は遺伝子発現量を意味しており、 Fold Changeの値を示す。 太線が増加、実線は二群の変化がない遺伝子、破線は測定できなかった遺伝子を示す。 *はt検定の p 値 ≤ 0.05 、**は p 値 ≤ 0.01 を示す。

3.1.4 ランズ回路について

AA, EPA, DHAなどをグリセロリン脂質から切り出すPhospholipase A₂ (PLA₂) は I からXIIIまでのグループが存在する。 その中でもグループ II に属するphospholipase A2, group IID (*Pla2g2d*) とphospholipase A2, group IIE (*Pla2g2e*) は*rmd*マウスにおいて発現量が有意に増加していた。 一方で、 PCを含む他のグリセロリン脂質を基質とする他のPLA₂に変化は見られなかった (表2)。 リン脂質とAcyl CoAからグリセロリン脂質をリモデリングするAcyltransferaseはおおむね変化していなかったが、 LPCを基質とする*Agpat9*, LPIを基質とするmembrane bound O-acyltransferase domain containing7 (*Mboat7*) など、一部のAcyltransferaseは発現量が増加していた (表3)。

3.2 脂肪酸代謝について

炎症性メディエーターであるAA由来の代謝物であるHydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), Prostaglandin, Leukotriene, 抗炎症性メディエーターであるEPA由来のHydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE), DHA由来のHydroxydocosahexaenoic acid (HDoHE), Protectinは概ね*rmd*マウスで増加する傾向を示した。 特に、 Prostaglandin D₂, Prostaglandin E₂の濃度は健常マウスと*rmd*マウスを比較して30倍以上増加していた。 AAからProstaglandin H₂を産生するacyl-Coenzyme A oxidase 1 (*Acox1*), acyl-Coenzyme A oxidase 3 (*Acox3*) の遺伝子発現量に変化はないものの、 Prostaglandin H₂からProstaglandin D₂を産生するprostaglandin D2 synthase (*Ptgsd*), hematopoietic prostaglandin D synthase (*Hpgds*) の遺伝子発現量も*rmd*マウスで増加していた。 一方で、 Prostaglandin E₂の合成酵素であるprostaglandin E2 Synthase (*Ptges*), prostaglandin E2 Synthase 2 (*Ptges2*), prostaglandin E2 Synthase 3 (*Ptges3*) に変化は見られなかった (図3)。

表2. PLA₂における前後肢*rmd*/Wildの Fold Change

表中の値は遺伝子発現量のFold changeを示す。 Forelimbは前足、 Hindlimbは後ろ足を示す。

Symbol	GeneName	Substrate	forelimb	hindlimb	Type
			<i>rmd</i> /Wild	<i>rmd</i> /Wild	
<i>Pla2g1b</i>	phospholipase A2, group IB	PE, PS, PG	0.95	1	
<i>Pla2g2a</i>	phospholipase A2, group IIA	PE	0.79	1.33	
<i>Pla2g2c</i>	phospholipase A2, group IIC	unknown	0.87	0.99	
<i>Pla2g2d</i>	phospholipase A2, group IID	PE	1.29	2.36	
<i>Pla2g2e</i>	phospholipase A2, group IIE	PS, PE	1.73	3.03	
<i>Pla2g2f</i>	phospholipase A2, group IIF	PC	0.82	1.39	sPLA ₂
<i>Pla2g3</i>	phospholipase A2, group III	PC	0.98	0.82	
<i>Pla2g5</i>	phospholipase A2, group V	PC	0.87	1.13	
<i>Pla2g10</i>	phospholipase A2, group X	PC	0.95	1.16	
<i>Pla2g12a</i>	phospholipase A2, group XIIA	unknown	0.87	1.21	
<i>Pla2g12b</i>	phospholipase A2, group XIIB	unknown	0.85	0.69	

表3. ランズ経路における前後肢*rmd*/WildのFold Change

表中の値は遺伝子発現量のFold changeを示す。Forelimbは前足，Hindlimbは後ろ足を示す。

Symbol	GeneName	forelimb	hindlimb	Substrate
		<i>rmd</i> /Wild	<i>rmd</i> /Wild	
<i>Agpat9</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	1.83	4.15	
<i>Mboat2</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	0.82	1.3	
<i>Lpcat1</i>	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	1.02	1.24	LPC
<i>Lpcat3</i>	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	1.36	1.58	
<i>Mboat7</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing7	1.41	2.21	
<i>Mboat1</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	1.04	0.94	
<i>Mboat2</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	0.82	1.3	LPE
<i>Agpat9</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	1.83	4.15	
<i>Mboat2</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	0.82	1.3	LPS

4. 議論

4.1 PC の減少について

検出された 41 種の PC 分子種のうち、そのほとんどは *rmd* マウスで減少していることが確認された。検出された PC 分子種は全体的に減少する傾向を示しており (図 1a), 先行研究で調べられた分子種と同様の結果を示している [4]。このような PC の減少は、Kennedy 経路における *Chkb* 欠損の影響を強く受けている

可能性がある。PCを基質とするPLA₂の遺伝子発現量に変化は見られない(表3)。しかし、Acyltransferaseのひとつである1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9 (*Agpat9*)は*rmd*マウスにおいて顕著に増加している(表4)。*Agpat9*はLPC, LPEを主な基質とし、飽和脂肪酸のAcyl CoA, 特に14:0, 16:0を好んで付加する[8]。今回の結果では、飽和脂肪酸を含むPCで若干の増加が見られた。これらの結果は、*Chkb*の欠損によるPCの減少の一部を*Agpat9*が補っている可能性を示唆している。先行研究では、Kennedy経路中でPCを合成するcholine phosphotransferase 1 (*CPT1*, マウスでは*Chpt1*)と*Agpat9*との間に、*Agpat9*が減少すると*CPT1*が増加し、PCの量を一定に保とうとする働きが報告されている[9]。これはPCの*de novo*経路とリモデリング経路との間で互いを調節する関係があることを示しており、今回の結果はその影響が反映されている可能性がある。このため、*Chkb*の欠損によるPCの減少を*Agpat9*のリモデリングだけでは完全補うことができず、*rmd*マウスの筋肉においては全体的にPCが減少している可能性を示している。

4.2 PE, PSの増加について

PEの分子種は*rmd*マウスで有意に増加しており、特に16:0, 18:0, 18:1を含むPEで増加している(図1b)。PSは18:0, 18:1を含む分子種で増加する傾向が見られる(図1c)。PSはPEを基質として、Phosphatidylserine synthase (*Ptdss*)によって合成される[10]。*rmd*マウスで増加したPSは、基質となるPEの増加に伴って増加したことが予測される。先行研究では、*rmd*マウスの筋肉に含まれるPEを薄層クロマトグラフィーによって測定している。Mitsuhashiらによると、PEは増加傾向があるものの有意な差は見られなかった[4]。今回の測定は先行研究と異なる結果が得られたが、我々の研究は質量分析計を用いたより高感度かつ定量的な手法を用いているため、手法の違いがこの差をもたらしたと推測される。そこで、PEが増加した要因について着目する。増加の要因となる可能性として*Agpat9*があげられる。*Agpat9*は4.1で記したように、LPC, LPEを基質として、飽和脂肪酸を積極的に付加する。そのため、今回の測定で明らかとなった16:0, 18:0を含むPE分子種の増加は、*Agpat9*の増加による可能性がある。*Agpat9*はPCの減少を補う働きがあるため[8]、*Chkb*の欠損による*Agpat9*の増加を受けてPEが増加した可能性がある。これらの結果から、*Chkb*の欠損によるPCの減少に伴って、グリセロリン脂質のバランスに変化が起きている可能性を示唆することができた。また*rmd*マウスにおいて、コリン以外の極性基を持つグリセロリン脂質の分子種に変化があることは、新規の知見となる。

4.3 PC, PE, PSとPhospholipase A₂

PLA₂はグリセロリン脂質を基質として脂肪酸を遊離させ、リゾリン脂質を産生する。PEを分子種ごとに見てみると16:0, 18:0を含むものが増加しており、LPEでも同様に16:0や18:0が含まれるものが増加している。また、18:0, 18:1を含むPSの増加に伴って、18:0, 18:1をもつLPSも増加している。一方で、20:4, 22:5, 22:6を含むPCの減少に伴って、20:4, 22:5, 22:6をもつLPCが減少している(図1, 2)。これらの結果から、リン脂質とそれに付随するリゾリン脂質は相関して変化している可能性がある。*rmd*マウスの

筋肉では脂肪酸も全体的に増加していたため (図 3), PLA₂ がグリセリン脂質から脂肪酸を遊離させている可能性がある. マイクロアレイ解析を行った結果, PE, PS を基質とする PLA₂ (*Pla2g2d*, *Pla2g2e*) が症状のある後肢のみで有意に増加している (表 2). 先行研究では, *Pla2g2d* KO マウスにおいて, 抗炎症性脂質メディエーターである resolvin D1 (RvD1), それらの前駆体である DHA が減少していることが報告されている. これは, *Pla2g2d* が抗炎症性脂質メディエーターの前駆体となる PUFA を PE から積極的に遊離させる働きをもつためである [11]. これらのことから *Pla2g2d* は抗炎症性の sPLA₂ であると言われている. 一方で, *Pla2g2e* は PE, PS を基質として, AA を積極的に遊離させる炎症性 sPLA₂ であるとの知見がある. *Pla2g2e* が cytochrome c oxidase subunit 2 (COX2), mPGES (マウスでは *Ptges*) の発現を誘導し, AA, Prostaglandin E₂ の代謝物濃度を増加させる, という報告もあり [12], *Pla2g2e* が炎症のプロセス一部であることが示されている. 今回の測定では, PE, PS の分子種が増加していたため, PLA₂ が増加した PE, PS を基質として, 炎症性メディエーターの前駆体となる脂肪酸を遊離したことが推測される. 以上より *rmd* の筋肉中では, *Chkb* の欠損に伴って増加した PE, PS を基質として, 遺伝子発現量が増加した *Pla2g2d*, *Pla2g2e* が積極的に AA や EPA, DHA などの PUFA を遊離している可能性を示唆することができる.

4.4 脂肪酸代謝について

増加した PUFA は PLA₂ によって細胞膜から切りだされた後, 酸化反応を受けて各種の脂質メディエーターを産出する. AA 由来の炎症性メディエーターは全て *rmd* マウスで有意に増加している傾向が見られ, それらを産生する遺伝子発現量も概ね増加している. また, EPA, DHA 由来の抗炎症メディエーターも全て *rmd* マウスで有意に増加している (図 3). EPA, DHA 由来の代謝物を産生する遺伝子はマイクロアレイのプローブに組み込まれていなかったため, 遺伝子発現量を測定することができなかった. しかし, これまでの先行研究の多くは, Prostaglandin, RvD1 などのメジャーなメディエーターのみに注目が置かれてきたが, 今回の解析結果によって, PUFA を由来とする HETE, HEPE, HDoHE などの中間代謝物も増加していることが新たにわかった. 炎症性メディエーターのひとつである Prostaglandin D₂ は *rmd* マウスの筋肉において, 代謝物レベルでも, 酵素レベル (*Ptgs*, *Hpgds*) でも顕著に増加している. 一方で, Prostaglandin E₂ は代謝物濃度が増加していたものの, 酵素レベル (*Ptgs*, *Ptgs2*, *Ptgs3*) では増加していない. Prostaglandin と筋壊死についての先行研究は既に多く報告されており, ジストロフィン遺伝子を原因とする Duchenne 型筋ジストロフィー患者の筋壊死部分において, Prostaglandin D₂ を合成する酵素である *Hpgds* の遺伝子発現量が増加していることが確認されている [13]. 加えて, Duchenne 型筋ジストロフィー患者の尿中代謝物において, Prostaglandin D₂, E₂ 代謝物である tetranor prostaglandin D metabolite, tetranor prostaglandin E metabolite が増加していることも明らかになっている. 一方, 同じジストロフィン遺伝子を原因とする Becker 型筋ジストロフィーの筋肉においては, *Hpgds* の発現量に変化が見られていない [14]. 筋ジストロフィーは筋肉の壊死と再生を繰り返す疾患であるが, *Hpgds* の発現量で筋壊死を評価できることが先行研究において示唆されている. 実際に, 筋再生が筋壊死を上回っている Becker 型では Prostaglandin 関連の遺

伝子発現量が低く、筋壊死が重篤な Duchenne 型筋ジストロフィーや、筋ジストロフィー以外で筋壊死を引き起こす多発性筋炎の患者では Prostaglandin 産生酵素である *Hpgds* が高発現となっている [15]。CMD モデルマウスである *rmd* マウスは筋生検のヘマトキシリン・エオジン染色の結果から筋肉中で筋壊死と再生が起きていることが確認されている [5]。そのため、*rmd* マウスにおける *Hpgds* の増加は、筋再生と比較して筋壊死が割合的に高くなっていることを示唆する。以上より、*rmd* マウスの筋壊死発症にグリセロリン脂質バランスが引き金となる炎症性脂肪酸酸化代謝の関与が示唆される。

5. 結論

rmd マウスの筋肉では、*Chkb* の欠損によって PC が減少する一方、PE, PS が増加しており、グリセロリン脂質のバランスが崩れた状態にあることがわかった。これらの PE, PS を基質として、遺伝子発現量が増加した *Pla2g2e* が LPE, LPS と共に AA を遊離させた可能性がある。AA の増加に伴って、その下流にある Prostaglandin 類などの炎症性メディエーターも増加している。以上より、CMD の発症に細胞膜のグリセロリン脂質バランスの変化が引き金となる炎症性メディエーター産生の関与が示唆された。

6. 謝辞

本研究に際して、マウスを提供して頂いた獨協医科大学の杉本博之教授に感謝致します。また、測定、解析まで、親身に対応して下さいました妹尾勇弥氏、研究の進め方についてご教授頂いたアドバイザーの池田和貴氏に感謝申し上げます。以上の方々をはじめ、このような自由な研究の場を提供して下さいました富田勝教授に深く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- [1] McMillan J. Congenital muscular dystrophies: New evidence-based guidelines for the diagnosis and management of this evolving group of muscle disorders. *Muscle Nerve*. 2015 Jun;51(6):791–2.
- [2] Kang B, Morrison L, Iannaccone T, Graham J, Bönnemann G, Rutkowski A, Hornyak J, Wang H, North K, Oskoui M, Getchius S, Cox A, Hagen E, Gronseth G and Griggs C. Evidence-based guideline summary: evaluation, diagnosis, and management of congenital muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*. 2015 Mar;84(13): 1369-78.
- [3] Nishino I, Kobayashi O, Goto YI, Kurihara M, Kumagai K and Fujita T. A new congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle and Nerve*. 1998 Aug;21(1):40–7.
- [4] Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T and Aoyama C. A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J*

Hum Genet. 2011 Jun;88(6):845–51.

[5] Sher B, Aoyama C, Huebsch A, Ji S, Kerner J, Yang Y, Frankel N, Hoppei L, Wood A, Vance E and Cox A. A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem*. 2006 Dec;281(8):4938–48.

[6] Tsugawa H, Kanazawa M, Ogiwara A and Arita, M. MRMPROBS suite for metabolomics using large-scale MRM assays. *Bioinformatics*. 2015 Aug;30(16):2379-80.

[7] Ritchie E, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law W, Shi W and Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr;43(7):47.

[8] Yamashita A, Hayashi Y, Matsumoto N, Nemoto Y, Oka S, Tanikawa T and Sugiura T. Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases. *Biology (Basel)*. 2014 Dec;3(4):801-30.

[9] Butler L and Mallampalli K. Cross-talk between remodeling and de novo pathways maintains phospholipid balance through ubiquitination. *J Biol Chem*. 2010 Feb;285(9):6246-58.

[10] Hermansson M, Hokynar K, Somerharju P. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res*. 2011 Feb;50(3):240–57.

[11] Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y, Sato H, Shimo K, Kobayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Kabashima K, Arita M, Arai H, Lambeau G, Bollinger M, Hara S, Gelb H and Murakami M. Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J Exp Med*. 2013 Jun;210(6):1217-34.

[12] Murakami M, Yoshihara K, Shimbara S, Lambeau G, Singer A, Gelb H, Sawada M, Inagaki N, Nagai H and Kudo Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Apr;292(3):689-96.

[13] Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, Sato Y, Kamauchi S and Nagata N. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *Am J Pathol*; 2009 May;174(5):1735–44.

[14] Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J and Urade Y. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. *Acta Neuropathol*. 2002 Jun; 104(4):377–84.

[15] Nakagawa T, Takeuchi A, Kakiuchi R, Lee T, Yagi M and Awano H. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clin Chim Acta*. Mar;423:10–4.