

---



---

原 著

---



---

Adrenoleukodystrophy における脂肪酸鎖長延長活性の  
役割ならびに単価不飽和脂肪酸による  
治療効果のメカニズムについて

新潟大学脳研究所神経内科 (主任: 宮武 正教授)

小池 亮子

Physiological Significance of Fatty Acid  
Elongation System in Adrenoleukodystrophy

Ryoko KOIKE

*Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University*

*(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)*

The metabolism of radioactive fatty acids in cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and Zellweger syndrome (ZS) were studied to clarify the physiological significance of the fatty acid elongation system in the accumulation of very long chain fatty acids (VLFA) in ALD. A substantial amount of radioactive C26:0 was synthesized from [ $18-^{14}C$ ] stearic acid by ALD and ZS fibroblasts, whereas radioactive C26:0 was not detected in control fibroblasts. Kinetic studies demonstrated that the production of radioactive C24:0 and C26:0 in ALD fibroblasts is higher than that of ZS fibroblasts, which suggests that the fatty acid elongation activity plays an important role for the accumulation of VLFA in ALD, in addition to the decreased VLFA oxidation activities. The addition of monounsaturated fatty acids including oleic acid and erucic acid specifically lowered the formation rate of VLFA without any significant effect on degradation activities of VLFA both in ALD and control fibroblasts. The result suggest that the mechanism of decrease of VLFA by administration of monounsaturated fatty acids is based on the inhibition of fatty acid elongation activity.

---

Key words: Adrenoleukodystrophy, very long chain fatty acids, Unsaturated fatty acids, fatty acid elongation system

副腎白質ジストロフィー, 極長鎖脂肪酸, 不飽和脂肪酸, 脂肪酸鎖長延長系

---

Reprint requests to: Ryoko KOIKE,  
Department of Neurology, Brain,  
Research Institute, Niigata University,  
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,  
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所神経内科部門

小池 亮子

Adrenoleukodystrophy (ALD) は伴性劣性遺伝形式をとる脱髄疾患である。本症では各組織で炭素数23以上の極長鎖飽和脂肪酸 (VLFA) が増加している<sup>1)2)3)4)</sup>。

VLFA は主としてペルオキシソームのβ酸化系により分解されるが ALD においてはこの分解活性が低下しており<sup>5)6)7)</sup> ペルオキシソームβ酸化系の最初の酵素である lignoceroyl CoA ligase の欠損が本症における primary defect ではないかと考えられている<sup>8)9)</sup>。しかしながら酵素の精製は未だなされておらず、その病態生化学的機序は十分には解明されていない。一方 VLFA 生成系に関しては培養皮膚線維芽細胞を用いた代謝実験の結果、正常コントロールではほとんど検出されない、ステアリン酸 (C18:0) から内在性の C26:0 の生成が ALD において増加していること<sup>10)</sup>、ミクロソーム分画において鎖長延長活性が亢進していること<sup>11)</sup> が明らかとなってきた。

近年オレイン酸 (C18:1)、エルカ酸 (C22:1) 等の単価不飽和脂肪酸の投与により培養系および ALD 患者において VLFA 組成が低下することが報告され、本症の治療に有用と考えられている<sup>12)13)14)15)</sup>。しかしながら不飽和脂肪酸の作用メカニズムに関しては、十分な検討がなされていなかった。

従来の報告から次の2点が疑問点として浮かび上がった。

第一には ALD の VLFA の増加に対して脂肪酸鎖長延長活性の亢進がどのように関与しているのかという点、第二には単価不飽和脂肪酸が VLFA を低下させるのはどのようなメカニズムによるのか—脂肪酸鎖長延長活性を抑制するのか、それとも VLFA 分解活性を増加させるためなのか、という点である。

これらの点を明らかにする目的で、皮膚線維芽細胞培養系を用い、ペルオキシソームが欠損するために VLFA 分解系が完全欠損する Zellweger 症候群 (ZS) と ALD を比較し、分解系の影響を考慮にいれながら脂肪酸鎖長延長活性の検討を行った。

## 方 法

### 1) 培養皮膚線維芽細胞における脂肪酸 pool size の測定

ALD, control, ZS 各3例の線維芽細胞は通常の方法にて培養した。confluent となったところで細胞を集め、Lowry 法<sup>16)</sup>にて蛋白量を測定した。内標準として 1 μg/μg prot. の C30:0 を加えた。総脂質を Bligh-Dyer 法<sup>17)</sup>により抽出した後2.5%塩酸メタノールに

て85℃で5時間メチル化を行い、脂肪酸メチルエステルの組成をガスクロマトグラフィーにて分析した。

### 2) 飽和脂肪酸鎖長延長活性の検討

ALD, control, ZS 各3例の線維芽細胞を 75 cm<sup>2</sup> のフラスコにて培養した。細胞数は各フラスコ当り 1×10<sup>6</sup> となるようにした後、7×10<sup>-6</sup>M のアルブミン結合 [18-<sup>14</sup>C] C18:0 (2 GBq/mmol) を加え37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で1, 2, 4, および7日間培養後総脂質を抽出し、1)と同様の方法にてメチルエステルを得た。細胞に取り込まれた放射活性は液体シンチレーションカウンターにて測定した。総脂質中の <sup>14</sup>C 標識脂肪酸の組成は1% OV-1 を液相とするガラスカラムを用いたラジオガスクロマトグラフィーにて測定し、その経時的変化をみた。

### 3) 不飽和脂肪酸添加の VLFA 生成に及ぼす影響

ALD 細胞を 50 μM の C18:1, C20:1, C22:1, C18:2, C18:3 を各々添加した培地で48時間培養し [18-<sup>14</sup>C] C18:0 からの VLFA 生成に及ぼす影響を調べた。

### 4) 極長鎖脂肪酸分解活性の測定

ALD および control の線維芽細胞に α-cyclodextrin で可溶化した [1-<sup>14</sup>C] C24:0 (1.85 GBq/mmol) を 5 μM 加え2時間反応させた後過剰アルブミンと過塩素酸にて反応を止め、培養液遠心上清を得、未反応の脂肪酸を Folch の分配法にて除き、上層を脂肪酸の分解産物とした。その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

## 結 果

### 1) 培養系における [18-<sup>14</sup>C] C18:0 の代謝

初めに ALD, ZS, control 細胞の脂肪酸組成を分析した。ALD において C26:0 の量は control の約8倍と著しく増加していた。それに対して C26:1 の量の増加は見られなかった。一方 ZS 細胞においては C26:0, C26:1 共に著しく増加しており、両者の間で明かな相違が見られた (Table 1)。

培地に加えた [18-<sup>14</sup>C] C18:0 の50~60%が最初の24時間で細胞内に取り込まれた。細胞内の放射活性は最初の4日間はほぼ不変であった。細胞内への <sup>14</sup>C 標識脂肪酸の取り込みに関しては ALD, ZS, control 三者間で明かな差を認めなかった (Fig. 1)。

[18-<sup>14</sup>C] C18:0 存在下で2日間培養後の総脂質中の脂肪酸メチルエステルのラジオガスクロマトグラムを

**Table 1** Pool sizes of very long chain fatty acids in total lipids of control, ALD and Zellweger fibroblasts.

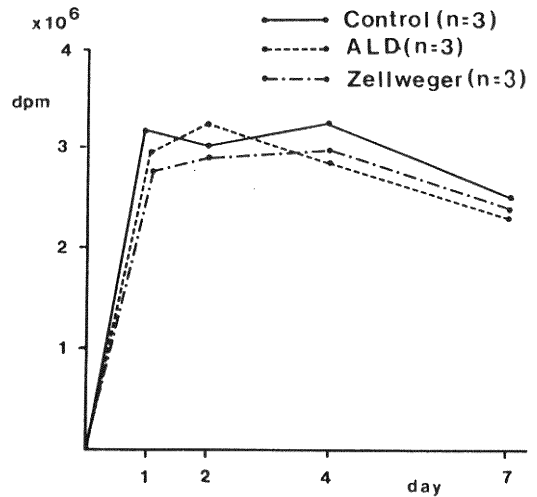
	Control(n=3)	ALD(N=3)	Zellweger(n=3)
C22:0 (%)	1.28 ±0.48	1.18 ±0.18	0.74±0.03
C24:0	1.81 ±0.12	2.23 ±0.15	1.99±0.23
C24:1	2.53 ±0.53	2.13 ±0.33	2.35±0.15
C26:0	0.064±0.027	0.48 ±0.14	0.73±0.056
C26:1	0.093±0.025	0.060±0.024	0.65±0.050
C24:0	1.22 ±0.29	1.48 ±0.32	1.60±0.35
C26:0	0.046±0.024	0.32 ±0.11	0.59±0.12
( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )			

Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=3)

示す (Fig. 2). ALD および ZS においては C18:0 からの C26:0 の生成が明かに認められたが, control 細胞ではほとんど検出されなかった. さらに, ALD 細胞における C24:0 の生成量は ZS に比して多量であった.

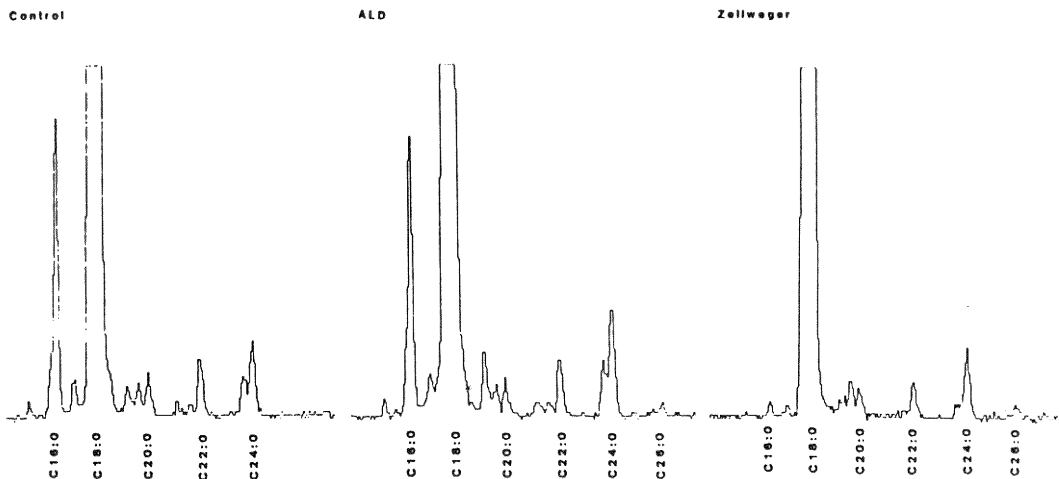
一方 ZS 細胞においては ALD および control と比較して C18:0 からの C16:0 の生成がほとんどみられず, 大きな相違が見られた.

脂肪酸の生成を経時的に見ると, ALD および ZS 細胞において C26:0 は培養2日目より検出され, 以後次第に増加する傾向を示したのに対し, control では7日間の培養の後もほとんど生成が見られなかった. ALD



**Fig. 1** Time course of total radioactivities of control, ALD and Zellweger syndrome fibroblasts during the incubation in the presence of  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid. Values on the ordinate are expressed as total radioactivities (dpm) incorporated into fibroblasts per each flask. (average of three different cell lines)

において C26:0 の生成量は7日目までの追跡で, ZS のそれより高い傾向を示した (Fig. 3). 次に C24:0 の生成に関してみると, ALD 細胞における C24:0 の



**Fig. 2** Representative radio-gas-liquid chromatograms of fatty acid methyl esters of total lipids from control, ALD and Zellweger fibroblasts after 2 days of incubation in the presence of  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid.

**Table 2** Effect of oleic acid on the synthesis of radioactive fatty acids from [ $^{18-14}\text{C}$ ] C18:0. Control (n=4) and ALD (n=4) fibroblasts were incubated in the medium containing [ $^{18-14}\text{C}$ ] C18:0 with (+) or without (-) 50  $\mu\text{M}$  of C18:1.

C18:1	Control		ALD	
	(-)	(+)	(-)	(+)
C16:0	6.8%	4.2	5.0	1.9
C17:0	2.7	2.4	2.8	2.1
C18:1	10.6	6.0	7.3	3.9
C18:0	75.0	85.0	77.7	88.5
C20:0	0.8	0.6	1.3	0.8
C22:0	1.6	0.9	1.8	0.9
C24:0	2.4	1.0	3.8	1.7
C26:0	n.d.	n.d.	0.7	0.3
C20 <	4.8	2.5	7.5	3.6
C24 <	2.4	1.0	4.4	2.0

Values are expressed as mean of percentage in total radioactive fatty acids.

**Table 3** Effect of unsaturated fatty acids on the incorporation of [ $^{18-14}\text{C}$ ] C18:0 into the ALD fibroblasts.

Fatty acid	$\times 10^4$ dpm
(-)	110 $\pm$ 17 (n=3)
18:1	115 $\pm$ 27 (n=3)
18:2	126 $\pm$ 62 (n=3)
18:3	116 $\pm$ 23 (n=3)
20:1	124 $\pm$ 20 (n=3)
22:1	119 $\pm$ 48 (n=3)

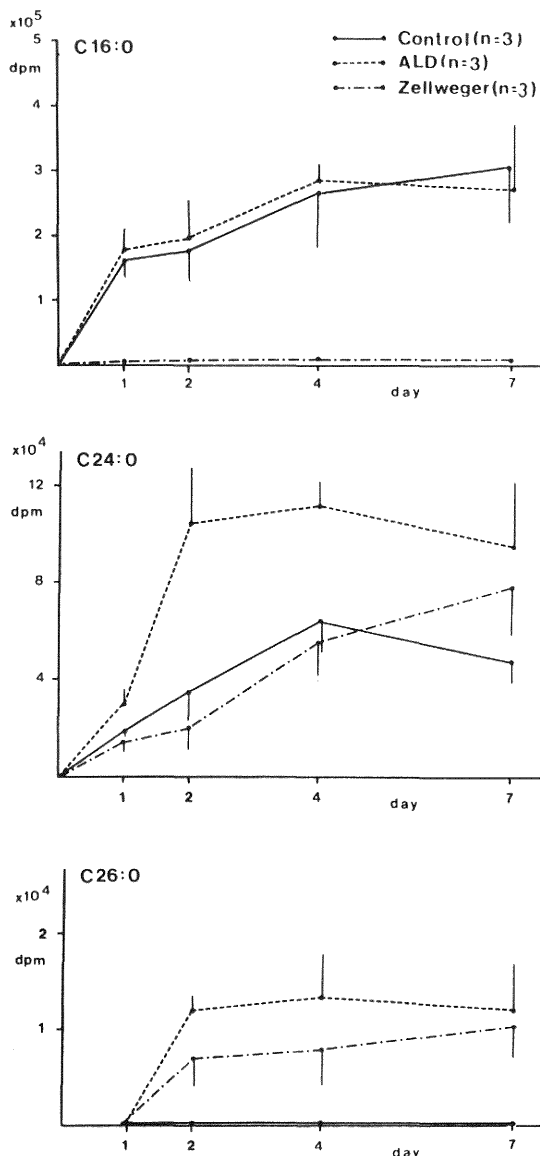
Values are expressed as mean dpm/flask  $\pm$  S.E.M. (n=3)

**Table 4** Effect of oleic acid on the oxidation of [ $^{1-14}\text{C}$ ] C24:0 to water soluble products.

	Control (n=3)	ALD (n=3)
C18:1 (-)	11648 $\pm$ 2970	4334 $\pm$ 683
(+)	10073 $\pm$ 1988	4518 $\pm$ 816

Values are expressed as mean dpm/h/mg protein  $\pm$  S.E.M. (n=3)

生成は ZS および control と比較して明かに増加していた。control と ZS 間では C24:0 の生成量に明かな差を認めなかった。



**Fig. 3** Time course of the synthesis of radioactive fatty acids from [ $^{18-14}\text{C}$ ] stearic acid (C18:0).

Values on the ordinate are expressed as total radioactivities per each flask (dpm), and vertical bars at each point represent S.E.M.

一方 C16:0 の生成量についてみると、ZS において著しく低下していたのに対して ALD と control 間ではパターンに明かな差異は認めなかった。

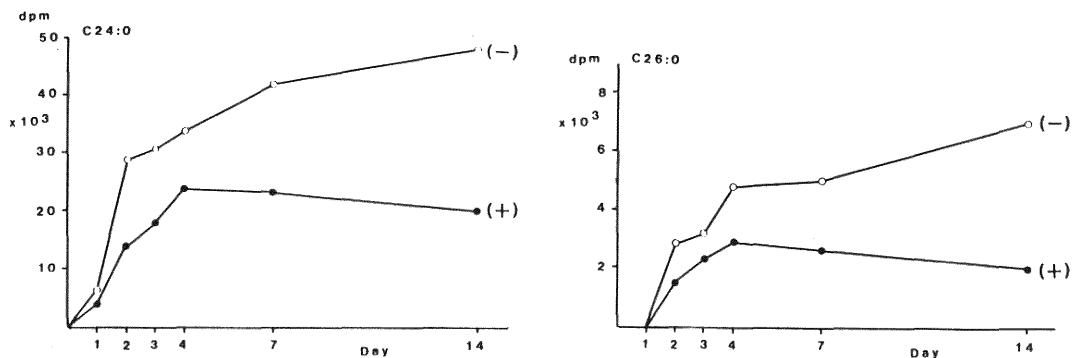


Fig. 4 Effect of oleic acid (C18:1) on the elongation of  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid in ALD fibroblasts.

ALD fibroblasts were incubated in the presence or absence of  $50\mu\text{M}$  oleic acid in the medium containing  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid. The medium was changed to the fresh medium containing  $50\mu\text{M}$  oleic acid but not  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid at day 7.

Values on the ordinate are expressed as total radioactivities per flask.

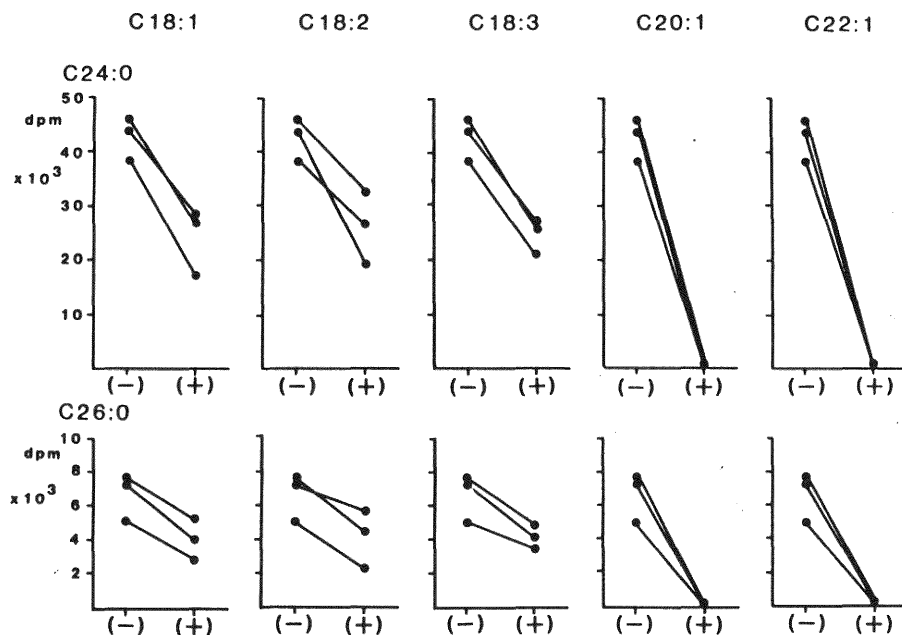


Fig. 5 Effect of unsaturated fatty acid on the synthesis of VLFA. Three different cell lines were cultured with (+) or without (-)  $50\mu\text{M}$  unsaturated fatty acids and formation of C24:0 and C26:0 from  $[18-^{14}\text{C}]$  stearic acid were measured. Values are expressed as total radioactivities per flask.

## 2) 不飽和脂肪酸の VLFA 代謝に及ぼす影響について

オレイン酸、エルカ酸等の単価不飽和脂肪酸を ALD 患者に投与した際に血中の VLFA が低下する機序を明かにするために、不飽和脂肪酸添加による VLFA の生成および分解におよぼす影響について、培養皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

まず、Control および ALD 細胞を 50  $\mu$ M のオレイン酸を含む培地にて48時間培養し、オレイン酸無添加の培地での VLFA の生成量と比較した。その結果、C 24:0、C 26:0 の生成量は ALD および control においていずれも約50%低下した (Table 2)。

次いで ALD 細胞に 50  $\mu$ M のオレイン酸および 2  $\mu$ M の [ $^{18-^{14}}$ C] C18:0 を加えた後1~14日間培養を続け VLFA 生成の time course をみた。オレイン酸無添加の際には C24:0 および C26:0 の生成は14日目まで徐々に増加する傾向を示していたがオレイン酸添加によりこの VLFA の生成増加を抑制することが可能であった (Fig. 4)。

いずれの種類の不飽和脂肪酸が最も高い VLFA 生成抑制効果を持つのかをみるため、鎖長および不飽和度の異なる各種脂肪酸を培地に添加し、同様の方法で VLFA の生成を測定した (Fig. 5)。図に示すごとくいずれの不飽和脂肪酸も VLFA 生成抑制効果は見られたが、特に C20:1、C22:1 において顕著で、これらは C20:0 以上の脂肪酸の生成をほぼ完全に抑制した。一方これらの不飽和脂肪酸は細胞内への [ $^{18-^{14}}$ C] C18:0 の取り込みには明かな影響を与えなかった (Table 3)。

オレイン酸添加により [ $^{1-^{14}}$ C] C24:0 の分解活性は増加も減少もみられず、分解系には影響がないことが明かとなった (Table 4)。

## 考 案

Peroxisome が欠損するために VLFA 分解活性が完全欠損する Zellweger 症候群に比べて、ALD においては VLFA 分解活性はある程度残存している<sup>5)</sup>。にもかかわらず ALD において ZS よりも VLFA が多く生成されたことは、この期間における放射活性をもった VLFA の生成量のほとんどが分解系の低下によるものではなく、一部は VLFA 生成活性を反映していることが考えられた。ALD においてミクロソーム分画における飽和脂肪酸鎖長活性が増加しているという従来の報告<sup>11)</sup>を考慮すると、この結果は ALD における VLFA の蓄積には分解系の低下のみならず、鎖長延長活性の亢

進による VLFA 生成の増加が重要な役割を演じていることを示唆しているものと思われる。

一方 ZS においては C18:0 からの C16:0 の生成が著明に低下していた。これは C18:0 等の長鎖脂肪酸の chain shortening についても主にペルオキシソームがその役割を担っていることを示す結果であった。

次に ALD の治療について考えると、分解系の基質である C26:0 の摂取を制限する食餌療法では血中の VLFA 値を低下させることは困難であり、オレイン酸 (C18:1)、エルカ酸 (C22:1) 等の単価不飽和脂肪酸の投与を併用することにより、はじめて低下させることができた。現在これらによる食餌療法が広く行われるようになり、ALD の進行防止や神経症状発症予防に対する効果が期待されている<sup>13)14)15)</sup>。しかしながらその作用メカニズムについての理論的根拠は乏しかったが、本研究において不飽和脂肪酸が選択的に脂肪酸鎖長延長活性を抑制することを明らかにした。C22:1の方が C18:1 よりも VLFA 抑制効果が強かったことは両者の臨床効果の差と対応する結果であった。

Saitoh らはブタ脳のミクロソーム分画を用いた実験において、脂肪酸鎖長延長系の最初のステップである C20:0-CoA の condensation が C20:1-CoA により非競争的に阻害されることを報告している<sup>19)</sup>。したがって単価不飽和脂肪酸による飽和脂肪酸抑制効果は、この鎖長延長活性の最初の段階を抑制するものと考えられた。

ALD における脂肪酸鎖長活性亢進のメカニズムについては明かではない。ペルオキシソームにおける lignoceroyl CoA ligase の欠損による二次的現象である可能性は否定できない。しかしながら ALD においては飽和脂肪酸鎖長延長活性が VLFA 蓄積において重要な役割を演じており、治療はこの亢進した鎖長延長活性を選択的に抑制していることは確実である。またこの実験系は今後 ALD の新たな治療薬の効果を培養系にて検討することが可能であり、有用な実験系であると考えられた。

稿を終えるにあたり終始御指導を賜りました宮武正教授に心から感謝の意を表します。また直接ご指導いただきました、辻 省次助手、大野 司先生に深く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) Igarashi, M., Schaumburg, H.H., Powers, J.M.,

- Kishimoto, Y., Kolodny, E. and Suzuki, K.:** Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy, *J. Neurochem.*, **26**: 851~860, 1976.
- 2) **Kawamura, N., Moser, A.B., Moser, H.W., Ogino, T., Suzuki, K., Schaumburg, H.H., Mulunski, A., Murphy, J. and Kishimoto, Y.:** High concentration of hexacosanoate in cultured skin fibroblasts lipids from adreno leukodystrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**: 114~120, 1978.
- 3) **Tsuji, S., Suzuki, M., Ariga, T., Sekine, M., Kuriyama, M. and Miyatake, T.:** Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy, *J. Neurochem.*, **36**: 1046~1049, 1981.
- 4) **Moser, H.W., Moser, A.B., Frayer, K.K., Chen, W., Schulman, J.D., O'Neili, B.P. and Kishimoto, Y.:** Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids, *Neurology*, **31**: 1241~1249, 1981.
- 5) **Singh, I., Moser, A.E., Goldfischer, S. and Moser, H.W.:** Adrenoleukodystrophy: lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: Implication for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4203~4207, 1981.
- 6) **Singh, I., Moser, A.B., Moser, H.W. and Kishimoto, Y.:** Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts and amniocytes, *Pediatr. Res.*, **18**: 286~289, 1984.
- 7) **Tsuji, S., Sano-kawamura, T., Ariga, T. and Miyatake, T.:** Metabolism of [17, 18-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>] hexacosanoic acid and [15, 16-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>] lignoceric acid in cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN), *J. Neurol. Sci.*, **71**: 359~367, 1985.
- 8) **Hashimi, M., Stanley, W. and Singh, I.:** Lignoceryl-CoASH ligase: Enzyme defect in fatty acid  $\beta$ -oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy, *FEBS Lett.*, **196**: 247~250, 1986.
- 9) **Lazo, O., Contreras, M. and Singh, I.:** Topographical localization of peroxisomal acyl-CoA ligases: differential localization of palmitoyl-CoA and lignoceryl-CoA ligases, *Biochemistry*, **29**: 3981~3986, 1990.
- 10) **Tsuji, S., Sano, T., Ariga, T. and Miyatake, T.:** Increased synthesis of hexacosanoic acid (C26:0) by cultured skin fibroblasts from the patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN), *J. Biochem.*, **90**: 1233~1236, 1981.
- 11) **Tsuji, S., Ohno, T., Miyatake, T., Suzuki, A. and Yamakawa, T.:** Fatty acid elongation activity in fibroblasts with adrenoleukodystrophy (ALD), *J. Biochem.*, **96**: 1241~1247, 1984.
- 12) **Rizzo, W.B., Watkins, P.A., Phillips, M.W., Cranin, D., Campbell, B. and Avigan, J.:** Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22~26 fatty acids, *Neurology*, **36**: 357~361, 1986.
- 13) **Rizzo, W.B., Phillips, M.W., Dammann, A.L., Leshner, R.N., Jennings, S.S., Avigan, J.L. and Proud, V.K.:** Adrenoleukodystrophy: Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels, *Ann. Neurol.*, **21**: 232~239, 1987.
- 14) **Rizzo, W.B., Leshner, R.N., Odone, A., Dammann, A.L., Craft, D.A., Jensen, M.E., Jennings, S.S., Davis, S., Jaitly, R. and Sgro, J.A.:** Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy, *Neurology*, **39**: 1415~1422, 1989.
- 15) **Moser, A.E., Borel, J., Odone, A., Naidu, S., Cornbath, D., Sanders, D.B. and Moser, H.W.:** A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients, *Ann. Neurol.*, **21**: 1141~1146, 1987.
- 16) **Lowry, O., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275, 1951.
- 17) **Bligh, E.G. and Dyer, W.J.:** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911~917, 1959.
- 18) **Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H.:** A simple method for the isolation and purification

of total lipids from animal tissues, J. Biol.  
Chem., **226**: 497~509, 1957.

swine cerebral microsomes, Biochim. Biophys.  
Acta, **960**: 410~416, 1988.

- 19) **Saitoh, T., Yoshida, S. and Takeshita, M.:**  
Inhibitory effect of verylong-chain fatty acid in

(平成3年4月16日受付)

---