

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09704

研究課題名(和文) 小児肝疾患におけるオキシステロールの病態解析とバイオマーカーとしての可能性

研究課題名(英文) Oxysterols in children: potential biomarker for pediatric liver disease

研究代表者

水落 建輝 (Mizuochi, Tatsuki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20368921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、健常小児における尿・血清オキシステロールの発達の推移を明らかにすること、オキシステロールが小児肝疾患のバイオマーカーとなりうるか検討する事であった。尿・血清のオキシステロール共に年齢別の変動、つまり小児期の発達の推移を認めた。小児肝疾患の尿・血清オキシステロール値は、健常児に比べいくつもの項目で有意に高値であった。健常小児における尿・血清オキシステロールの発達の推移を明らかにした。オキシステロールは小児肝疾患のバイオマーカーとして有用かもしれないと結論付けた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify whether developmental pattern of oxysterols during childhood are present. We also evaluated whether oxysterols can be a biomarker for pediatric liver disease. There were some significant differences in urinary and serum oxysterols among 5 groups such as Neonate (under 1 month after birth), Infant (1 to 11-month-old), Preschool-age (1 to 6-year-old), School-age (7 to 15-year-old), and Adults (over 18-year-old). In comparing between 8 healthy children and 8 patients with liver disease, total and some kinds of oxysterols in patients with liver disease significantly increased in urine and serum. We clarified that urinary and serum oxysterols have unique developmental pattern during childhood while may be a useful biomarker for pediatric liver disease.

研究分野：小児消化器肝臓病

キーワード：オキシステロール 小児 肝臓病

1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は肝細胞内でコレステロールから合成される最終代謝産物である。我々はこれまで小児の胆汁酸代謝の発達とその生合成異常を起こす疾患を研究してきた。特筆すべきは、小児期に胆汁うっ滞から肝硬変に進行する予後不良な遺伝性疾患である、先天性胆汁酸生合成(代謝)異常症の診断と治療法を本邦で初めて確立した(Mizuuchi et al. *Pediatr Res* 2010, *Liver Transpl* 2011, *J Inherit Metab Dis* 2013)。

これら研究の中で、コレステロールから胆汁酸への代謝経路の中間産物であるオキシステロールに着目した。オキシステロールはコレステロールが酵素的もしくは非酵素的に酸化された、酸化コレステロールの総称である。オキシステロールには種々の構造類似化合物が存在し、生体内では異化代謝の中間生成物であるほか、核内レセプターのリガンドとしても機能している。近年では、様々な疾患の病因や体内状態のバイオマーカーとしての可能性が次々と報告されている。現在までにわかっているオキシステロールの種類、その酸化形式、代謝産物・作用などを表にまとめた。

名		
酸化形式/活性種(酵素名)	各種オキシステロール	代謝産物・作用など
経典		
CYP4A(中脳神経)	25-ヒドロキシコレステロール	アルツハイマー病で上昇
CYP7A1(肝臓)	7- α -ヒドロキシコレステロール	胆汁酸、尿胆素色澤で上昇
		動脈硬化薬で検出
CYP3A4(肝臓)	4- β -ヒドロキシコレステロール	薬物代謝
CYP11A1(副腎)	20- α -ヒドロキシコレステロール	ステロイドホルモン・性ホルモン
	22- α -ヒドロキシコレステロール	
CYP51A1(皮膚)	7- α -ヒドロキシコレステロール	ビタミンD
CYP27A1(全身)	27-ヒドロキシコレステロール	胆汁酸、尿胆素色澤で低下
		アルツハイマー病で上昇
		動脈硬化薬で検出
Cholesterol 25-hydroxylase	25-ヒドロキシコレステロール	動脈硬化薬で検出
フリーラジカル(自動酸化)	7- α -ヒドロキシコレステロール	2型糖尿病で上昇、動脈硬化薬で検出
	7- β -ヒドロキシコレステロール	動脈硬化薬で検出
	5(α , β),6(α , β)-エポキシコレステロール	子宮体癌で上昇
	3,6, α , β -エポキシヒドロキシコレステロール	
二重結合薬	5- α -ヒドロキシコレステロール	

我々は、国内およびヨーロッパとの共同研究で、オキシステロールと小児胆汁うっ滞症、先天性胆汁酸生合成異常症との関連(Liver Transpl 2011, J Inherit Metab Dis 2013)だけでなく、オキシステロールが運動神経に及ぼす影響(J Clin Invest 2014)、成人期フェニルケトン尿症との関連(Clin Chim Acta 2013)を発見し報告してきた。前述のように、オキシステロールに関しては様々な疾患群や体内動態が報告されてきているが、それらの対象は成人であり、小児の報告はほとんどない。健常小児の年齢(成長)に伴うオキシステロールの動態変化、小児肝疾患群との関連性を研究することで、オキシステロールが関与する疾患の発見、その新たな病態解析と治療開発、体内状態のバイオマーカーとしての有用性などへ繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

【Step 1 : 健常小児基準値の作成】

各種オキシステロールの健常小児基準値は明らかになっていないため、まず健常小児の血清と尿を測定し基準値を作成する。胆汁

酸代謝は小児期、特に乳児期は劇的に変化(発達)していくため、年齢別、男女別の基準値を作成する必要がある。具体的には新生児期(生後4週未満)、乳児期(1歳未満)、幼児期(1~6歳)、学童期(7~15歳)の4期に分けて男女それぞれの検体を測定する。健常小児の各種オキシステロール組成と量を明らかにすることで、異常値を示す関連疾患の病態解析に役立つと考えられる。

【Step 2 : 小児肝疾患での測定】

コレステロールの主な代謝臓器で、最終代謝産物である胆汁酸が生合成される肝臓を最初のターゲットとする。成人でオキシステロールの関与が報告されている肝疾患は慢性C型肝炎(Ikegami T, et al. BBRC 2014)など既にいくつかある。今回は胆汁うっ滞性肝疾患、ウイルス性肝炎、脂肪肝を中心に解析する。具体的には、胆道閉鎖症、アラジール症候群、新生児肝炎、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症、先天性胆汁酸生合成異常症、B型・C型ウイルス性肝炎、非アルコール性脂肪肝などである。各疾患でそれぞれオキシステロールの病態関与を解析する。また、同一疾患内での患者による測定値の違いや、同一患者で急性から慢性、また進行性や軽快と増悪を繰り返す際の値を経時的に測定することにより、各疾患の重症度や予後予測のバイオマーカーとなりうるか検討する。具体的には、オキシステロールが肝移植適応の指標になるかなど検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

新生児期(生後4週未満)、乳児期(1歳未満)、幼児期(1~6歳)、学童期(7~15歳)の4期に分けて男女それぞれの検体を測定した。各年齢別の健常小児から検体(血清、尿)を採取した。久留米大学倫理委員会の承認を受けた研究計画書・同意書を用いて説明し、対象者全員から書面による同意を得た。対象は一般ボランティアに加え、久留米大学小児科消化器外来に受診する、母子B型・C型肝炎垂直感染疑いで感染を認めなかった小児群(非感染健常群)とした。次に、肝疾患を有する小児を対象とした検体採取を開始した。具体的な肝疾患としては、研究目的で述べた、胆汁うっ滞性肝疾患、ウイルス性肝炎、脂肪肝などの急性・慢性の肝疾患(肝障害)の診断を受けた小児(15歳以下)。

(2) オキシステロール分析

血清及び尿中のオキシステロール各種を、高速液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)で測定した。測定解析したオキシステロールは、4-OH-cholesterol、20-OH-cholesterol、22(R)-OH-cholesterol、22(S)-OH-cholesterol、24(S)-OH-cholesterol、25-OH-cholesterol、27-OH-cholesterol、以

上 7 種類であった。LC-MS による分析は、研究協力者（入野博）が所属・運営する順伸クリニック胆汁酸研究所(東京)で行った。分析結果の解釈と解析は、研究代表者である水落建輝と連携研究者である木村昭彦の 2 人で行った。

(3) 得られた結果の解析

健常小児に関しては、前述の年齢別 4 期に分け、血清と尿の 7 種オキシステロール値を比較検討して、年齢別の動向（発達の推移）が存在するのかを検討した。

年齢がマッチした健常小児群と肝疾患群の 2 群に分け、血清と尿の 7 種オキシステロールを比較検討して、オキシステロールが小児肝疾患のバイオマーカーとなりうるか検討した。

比較検討には ANOVA や student-t 検定などの統計学的手法を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 健常小児の年齢別推移

分析例は 3 歳から 14 歳の小児(尿 29 例、血清 32 例、各群 5~14 例)に加え、コントロールとしての成人 10 例。

尿中の総オキシステロールは、新生児期が最高値で年齢と共に有意に低下し、成人が最低値であった(新生児 vs 乳児、幼児、学童、成人： $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$)。

血清の総オキシステロールは、新生児期が最低値で、その他の群は有意に増加していた(新生児 vs 乳児、幼児、学童、成人： $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。

7 種のオキシステロールに関しては、尿では、22(R)-OH-cholesterol は、新生児期が他の年齢群に比べて有意に上昇していた。また、27-OH-cholesterol は、乳児期・幼児期が他の年齢群より有意に高かった。

血清では、4-OH-cholesterol は、新生児期から学童期まで徐々に上昇し成人が最も低かった。24(S)-OH-cholesterol は、新生児期から乳児期にかけて上昇し、その後は徐々に低下し成人が最も低かった。25-OH-cholesterol は、成人が他の年齢群より有意に高かった。27-OH-cholesterol は、新生児期が最低値で、年齢と共に徐々に上昇し、成人が最も高かった。以上のように尿では 2 種、血清では 4 種のオキシステロールで年齢別の有意差を認めた。

以上から、オキシステロールは小児期に年齢的な変動、つまり発達の推移を認めることが明らかになった。オキシステロールは小児期に年齢による変化を認めるため、小児疾患のバイオマーカーとして検討する際は、年齢別 (age-matched) の健常コントロールの作成が必須であることが分かった。

(2) 小児肝疾患におけるバイオマーカーとしての可能性

乳幼児肝疾患 8 例と年齢をマッチさせた健常児 8 例の血清と尿のオキシステロールを比較検討した。尿では、総オキシステロール値 ($P < 0.001$) に加え、22(R)-OH-cholesterol ($P < 0.05$)、24(S)-OH-cholesterol ($P < 0.001$)、25-OH-cholesterol ($P < 0.05$)、27-OH-cholesterol ($P < 0.01$)、以上 4 種のオキシステロールが肝疾患群で有意に高値であった。血清では、総オキシステロール値 ($P < 0.001$) に加え、4-OH-cholesterol ($P < 0.05$)、24(S)-OH-cholesterol ($P < 0.05$)、以上 2 種のオキシステロールが肝疾患群で有意に高値であった。

以上の結果から、オキシステロールは小児肝疾患のバイオマーカーとして有用かもしれないと結論付けた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

研究期間中の発表論文や学会発表はないが、現在、研究成果をまとめた英語論文を執筆中で学術誌へ投稿予定である。

また、国内国外の関連学術集会で研究成果を発表予定である。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水落 建輝 (MIZUOCHI, Tatsuki)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：20368921

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

木村 昭彦 (KIMURA, Akihiko)
久留米大学・医学部・臨床教授
研究者番号：00211201

(4)研究協力者

入戸野 博 (NITTONO, Hiroshi)