

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16306

研究課題名(和文) 新生児晩期循環不全の発症予測を目的とした関連遺伝子多型の解析

研究課題名(英文) Analysis of gene polymorphism and steroid profile to predict the development of neonatal late-onset circulatory collapse in preterm infants.

研究代表者

下澤 弘憲 (Shimozawa, Hironori)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70570399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：早産児139名516サンプルの副腎皮質ホルモンを最も精度の高いLCMSMS法で測定し副腎皮質の成熟過程を調べた。在胎32週未満の早産児の副腎皮質は生後2週間までは在胎期間が小さいほど未熟だったが、生後4週時には在胎期間に関わらず成熟した。糖質コルチコイドの代謝経路において未熟性と強く関わったのはCYP21A2だったが、電解質コルチコイドの代謝経路で未熟性と関連したのはCYP21A2ではなくCYP11B1だった。新生児晩期循環不全の発症と副腎皮質ホルモンの基礎値との間に相関性は認められなかった。遺伝子多型と新生児晩期循環不全の発症や副腎皮質の未熟性との関連は解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

在胎32週未満の早産児の副腎皮質機能は、修正週数ではなく出生後日齢を重視することでより正確に評価できることがわかった。超早産児は生後早期の副腎皮質機能が低下しているにも関わらずコルチゾールの必要量が多い可能性が示唆され、生後早期のステロイド補充療法の有効性を支持する根拠の1つかもしれない。ステロイド補充療法前後でのステロイドホルモン値の変化を解析することで、ステロイド補充量の過不足を検討することができる。更に新生児晩期循環不全と関連する遺伝子多型が同定された場合は、過不足のない予防的なホルモン補充療法により、晩期循環不全を予防することで超早産児の神経学的予後を改善することができる。

研究成果の概要(英文)：The maturation process of the adrenal cortex was examined by measuring adrenocortical hormones in 516 samples from 139 preterm infants using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMSMS) which is the most accurate measurement method. The adrenal cortex of preterm infants born at less than 32 weeks of gestation was more immature the smaller the gestation period until 2 weeks of age, but matured at 4 weeks of age regardless of gestation age. CYP21A2 was strongly associated with immaturity in the glucocorticoid pathway, but CYP11B1, not CYP21A2, was associated with immaturity in the mineralocorticoid pathway. No correlation was found between the development of neonatal late-onset circulatory collapse and basal corticosteroid levels. The association of genetic polymorphisms with the development of neonatal late-onset circulatory collapse and adrenocortical immaturity is under analysis.

研究分野：新生児医学

キーワード：副腎皮質ホルモン 早産 新生児晩期循環不全 CYP21A2 CYP11B1 タンデムマス質量分析

1. 研究開始当初の背景

新生児晩期循環不全は、2000 年以降本邦において報告が急速に増えた早産児の合併症であり、出生体重が 1000g 未満の早産児の約 12%に合併するとされ、約 73%が脳性麻痺を合併する重篤な合併症である。グルココルチコイド投与が有効であることなどから相対的副腎不全と考えられているが、詳細な病態は解明されておらず、危険因子が明らかになっていない。また興味深いことに、海外では一過性副腎不全として出生直後のカテコラミン不応性低血圧が報告されているが、生後 1 2 週後に発症する晩期循環不全という概念はない。

2. 研究の目的

新生児晩期循環不全の危険因子となりうる遺伝子多型を解析する。同時にステロイドプロファイルを測定して早産児の副腎皮質の未熟性と成熟過程を調べる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子多型解析：

在胎 22 週以上在胎 30 週未満の早産児を対象とした。3 HSD 活性に重要なミトコンドリア膜輸送蛋白遺伝子の 1 つである TIMM50 遺伝子についてダイレクトシーケンス法で調べた。

(2) ステロイドプロファイル：

在胎 22 週以上 33 週未満の早産児および在胎 33 週以上の出生体重 1500g 未満の極低出生体重児を対象とした。液体クロマトグラムタンデムマス質量分析計を用いて、臍帯静脈血、日齢 7、日齢 14、日齢 28、修正 37 週ないし 40 週時の血清で 13 種類

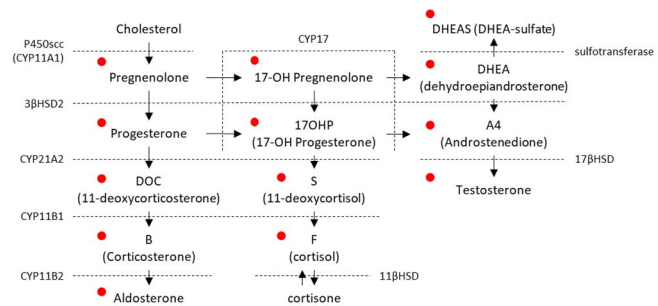


図1. ステロイド代謝マップと本研究での測定項目 (●)

のステロイドホルモンを測定した (図 1)。酵素活性は産生物を前駆体で除した数で評価した。

4. 研究成果

(1) 対象：2017 年 12 月 5 日から 2023 年 2 月 28 日の期間中に研究に同意した対象は、遺伝子多型解析対象者が 63 名、ステロイドプロファイル対象者が 139 名だった。

(2) 遺伝子多型解析：63 名中 53 名で全血あるいはリンパ球から DNA を抽出した。53 名中、新生児晩期循環不全の発症は 11 名、それ以外で出生後ステロイド治療を受けたのは 11 名だった。TIMM50 遺伝子の全エクソンおよび 5'隣接領域を目標としてプライマーを設計し、DNA シーケンスを外部検査機関に委託し現在解析中である。

(3) ステロイドプロファイル：139 名から計 516 の血清を得た。出生後ステロイド治療をしていない血清と治療前の血清を用いて副腎皮質の未熟性と成熟過程を解析した。

生後日齢とステロイドホルモンとの関係：

<糖質コルチコイド>

F は日齢 14 を除いて在胎期間と相関しなかったが、前駆体の 17OH プレグネロン、17OHP および S は日齢 14 まで在胎期間と有意な負の相関を示した。酵素活性では CYP21A2 のみが日齢 7 と 14 で在胎期間と正の相関を示した (図 2)。以上から日齢 14 までは早産であるほど F の需要が多いが、CYP21A2 の活性が低いため前駆体が増加していると考えられた。S は日齢 28 まで在胎期間と負の相関を認めており、糖質コルチコイド系の成熟度の指標となりうると考えられた。

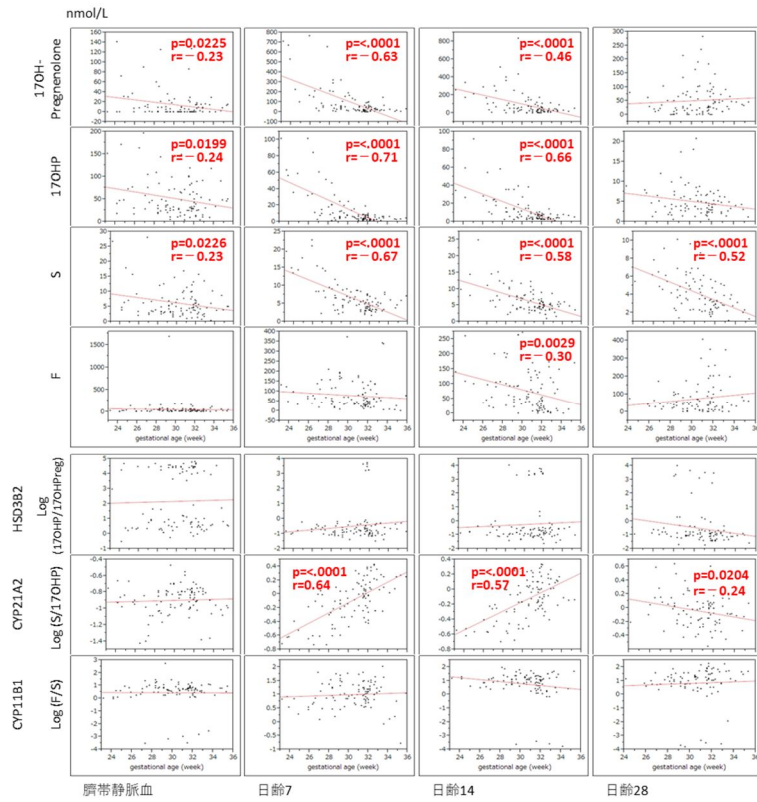


図 2 生後日齢と糖質コルチコイドと酵素活性との関連

<アンドロゲン>

胎児副腎では DHEA を DHEAS に変換するスルフォトランスフェラーゼ活性 (DHEAS/DHEA) が高いと予想されたが、本研究では在胎期間と正の相関を示した。DHEA および A4 は日齢 14 まで在胎期間と負の相関を示し、在胎 32 週で最低値となった。スルフォトランスフェラーゼおよび HSD3B2 は日齢 14 まで在胎期間と正の相関を認めた。コルチゾール産生の指標として算出した F/DHEA は、日齢 7 で在胎期間と正の相関性があった (図 3)。

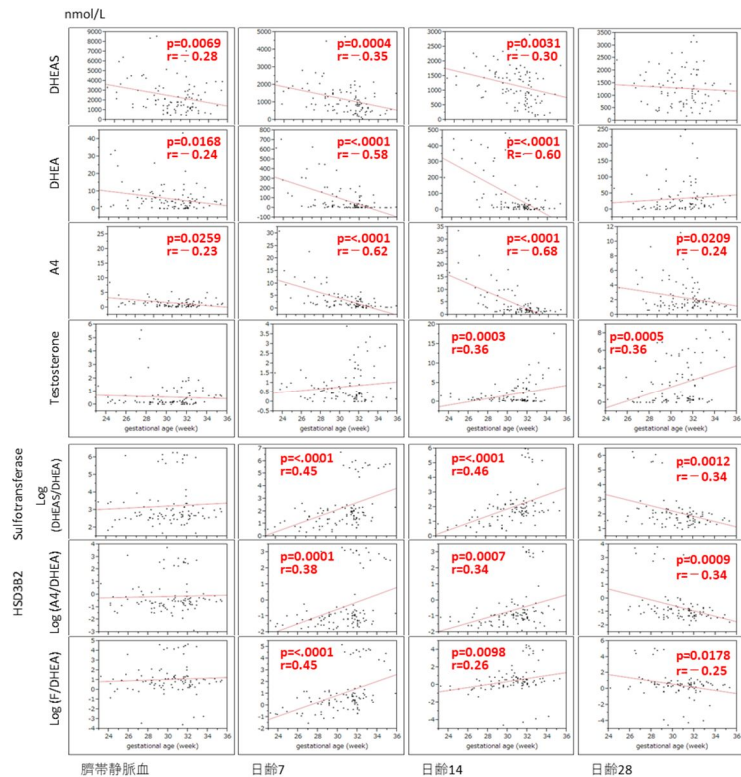


図 3 生後日齢とアンドロゲンと酵素活性の関連

<電解質コルチコイド>

アルドステロンは日齢 7 から 28 にかけて在胎期間と強い負の相関を示した。前駆体のプレグネノロン、プロゲステロンおよびDOCも在胎期間と負の相関を認めたが、在胎 32 週で最低値となった。酵素活性はCYP11B1が日齢7から28にかけて在胎期間と正の相関を示した(図3)腎組織における電解質コルチコイド受容体の発現が在胎24週以降に一旦減少することでアルドステロンの需要は多く、さらにCYP11B1の活性が低いいため前駆体が増加していると考えられた。DOCとCYP11B1が電解質コルチコイド系の成熟度の指標となりうる。

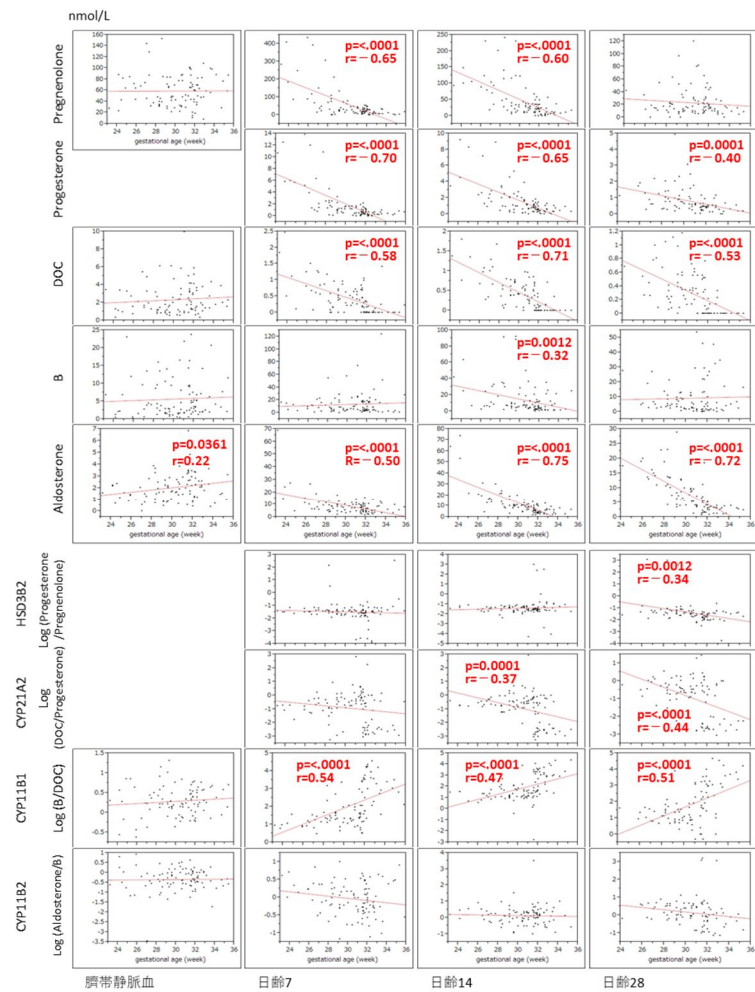


図4 生後日齢と電解質コルチコイドと酵素活性の関連

<まとめ>

前駆体の多くは在胎32週で最低値となり、在胎31週以下の早産では胎児副腎が多く残存した状態で出生する。糖質コルチコイドとアンドロゲンの産生は日齢28までに成熟し、日齢28にはコルチゾール需要量が減少すると考えられた。アルドステロンは日齢28においても需要が減少しなかったが、修正37週ないし40週ではアルドステロンを含む3系統全てのホルモンが在胎期間との負の相関を認めなかった。

出生後ステロイド治療の有無とステロイドホルモンとの関係:

在胎30週未満の早産児において、新生児晚期循環不全を含めて出生後ステロイド治療を受けた群26名と治療を受けなかった群36名においてステロイドホルモン値を比較した。在胎期間(26.0 ± 1.9週 vs. 28.0 ± 1.6週, $p < 0.001$)と出生体重(784 ± 234g vs. 1010 ± 254g, $p < 0.001$)は治療群の方が早く小さかったが、出生前ステロイドの治療率に差はなかった(50% vs 67%)。臍帯静脈血のステロイドホルモン値は群間差を認めなかったが、日齢7と日齢14では糖質コルチコイドと電解質コルチコイドで有意差のある項目を複数認めた。治療群において糖質コルチ

コイドでは日齢7のCYP21A2が低値であり上流のSおよび17OHPが高値だが、Fに有意差はなかった。同様に電解質コルチコイドではCYP11B1が低値であり、上流のプレグネロンとプロゲステロンが高値だった。日齢14では17OHPとDOCが低値だが酵素活性には有意差が認められなかった。アルドステロンは治療群で高値だった(表1)。

表1 在胎30週未満児における出生後ステロイドの有無とステロイドホルモン値

	出生後ステロイド治療				p 値
	なし		あり		
日齢7					
17OHP	10.5	(5.4, 21.5)	34.6	(13.3, 58.1)	0.019
S	6.6	(4.4, 9.0)	13.8	(6.5, 16.9)	0.035
Log (S/17OHP)	- 0.16	(- 0.50, - 0.05)	- 0.46	(- 0.63, - 0.23)	0.020
Pregnenolone	42.1	(17.4, 93.1)	103.1	(32.1, 274.8)	0.041
Progesterone	1.5	(0.9, 2.5)	5.4	(1.4, 9.5)	0.027
Log (B/DOC)	1.41	(1.12, 1.68)	1.01	(0.91, 1.36)	0.048
日齢14					
17OHP	13.3	(7.8, 26.7)	34.4	(22.2, 59.3)	0.048
DOC	0.6	(0.4, 0.8)	1.4	(1.0, 1.7)	0.003
Aldosterone	13	(10.1, 19.2)	21.6	(19.7, 53.4)	0.006

*n (%), median (IQR)

在胎期間の影響を強く受けているため、在胎28週未満の早産児(出生後ステロイド治療群10名と無治療群10名)で再解析した。在胎期間、出生体重と出生前ステロイド治療率に群間差はなかった。日齢14のDOCが治療群で高値であり、DOCは未熟性だけでなく出生後ステロイド治療の必要性の予測因子となる可能性があると考えられた。

表2 在胎28週未満児における出生後ステロイドの有無とステロイドホルモン値

	出生後ステロイド治療				p 値
	なし		あり		
臍帯静脈血					
Log (17OHP/ 17OHPregnenolone)	0.38	(0.33, 1.10)	2.97	(0.65, 4.57)	0.047
Pregnenolone	74.0	(56.4, 108.5)	42.6	(29.8, 72.9)	0.024
日齢14					
DOC	0.7	(0.4, 1.1)	1.4	(1.1, 1.7)	0.010

*n (%), median (IQR)

以上の結果から、多くのステロイドホルモン基礎値は日齢14までは在胎期間と関連するため、ステロイドホルモン値を用いて新生児晩期循環不全の発症を予測するためには在胎期間で層別化した解析が重要であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下澤 弘憲
2. 発表標題 液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）で解析した超早産児の糖質コルチコイド産生能の成熟過程
3. 学会等名 日本周産期新生児医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------