

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16850

研究課題名（和文）ケトン性低血糖症の病因としてのPHKA2遺伝子p.G991Aバリエーションの意義

研究課題名（英文）A study revealing that the p.G991A variant of the PHKA2 gene is one of the major causes of ketotic hypoglycemia

研究代表者

堀 友博（HORI, Tomohiro）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90456525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：PHKA2遺伝子のp.G991Aバリエーションがケトン性低血糖症の主因であることを明らかにするため研究を実施した。同バリエーションを有する患者でPhk活性が低下していることをin vitroで証明する発現実験では、ホスホリラーゼbに対するKmの高値や、高温条件下での不安定性が証明できた。全国の原因不明のケトン性低血糖症患者に対し解析を実施したが、研究期間中にp.G991Aを有する患者は同定できなかった。生後1か月児の一般集団2638名（男児1362名、女児1276名）を対象にp.G991Aを解析し、男児4名（全員ヘミ接合性）、女児10名（全員ヘテロ接合性）に同定した。引き続き症例集積と解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケトン性低血糖症の遺伝学的な病因や男児に多い理由は不明である。ケトン性低血糖症がX染色体上にあるPHKA2遺伝子のp.G991Aバリエーションにより引き起こされ、また、同バリエーションの有無が臨床症状や重症度に違いをもたらすとの仮説を立て研究を行った。この仮説が実証されれば、患者の臨床的予後が事前に推察可能となるなど、患者の利益に直結する。本研究の発現実験では、我々の仮説の一部が裏付けられる結果が得られた。今後、実際の一般集団と患者を対象とした症例の集積・アンケート調査・遺伝学的解析により、我々の仮説がさらに裏付けられる可能性がある。引き続きこれらの調査と研究を進め、その成果の論文発表を行う。

研究成果の概要（英文）：We performed the following studies to clarify that the p.G991A variant of the PHKA2 gene is one of the major causes of ketotic hypoglycemia. In our in vitro experiments, we were able to demonstrate that the Phk activity of patients with the p.G991A variant had a higher Km for phosphorylase b and was unstable at elevated temperatures. We examined the presence of the p.G991A variant in patients with ketogenic hypoglycemia of unknown cause in Japan, but no patients with p.G991A could be identified during the study period. We analyzed a general population of 2,638 1-month-olds (1,362 boys and 1,276 girls) and identified the p.G991A variant in 4 boys (all hemizygous) and 10 girls (all heterozygous). We will continue to accumulate patients and analyze them.

研究分野：小児科学、内分泌代謝学、臨床遺伝学

キーワード：ケトン性低血糖症 PHKA2遺伝子 先天代謝異常症 ケトン体代謝異常症 糖原病

1. 研究開始当初の背景

ケトン性低血糖症は、男女比 2 : 1 で男児に多く、健常な小児では低血糖にならない程度の空腹やストレスでケトン陽性の低血糖症をきたす比較的頻度の高い病態である。これまで、ケトン性低血糖症は血糖維持機構が健常者に比べて問題があると考えられていたものの、その遺伝学的な病因は不明であり、なぜ男児に多いのかの理由もわかっていない。生命予後は悪くなく、一般的には思春期年齢以降は低血糖発作を起こさなくなるが、一部の患者では毎回の低血糖発作で QOL を著しく下げる場合や、けいれんを起こすような症例も存在する。また、通常は他の疾患を除外して診断される病態であるが、小児の低血糖を起こす疾患の中には生命の危険を伴うものもあり、その鑑別は容易ではないことも多い。ケトン性低血糖症の病因が判明することは非常にインパクトの大きいことと考えられる。一方、糖原病 IX 型はホスホリラーゼキナーゼ (Phosphorylase kinase, PhK) 欠損症ともよばれ、まれな疾患であるが、小児期に空腹時のケトosis や低血糖をきたすことがあり、ケトン性低血糖症の鑑別すべき疾患の 1 つである。これまでは肝型糖原病 IX 型は肝機能障害や肝腫大が必ず存在するとされており、これらがない患者で肝型糖原病 IX 型が疑われることはなかった。しかし Brown LM らは、肝腫大や肝機能異常のないケトン性低血糖症において糖原病の遺伝子解析を行い、男児の場合、糖原病 IX 型の原因遺伝子 PHKA2 に異常を持つ症例が複数存在することを報告した(文献)。これは、「肝型糖原病 IX 型は肝腫大や肝機能障害が存在する」、「ケトン性低血糖症は原因不明である」という今までの概念を変える発見であると考えられた。

2. 研究の目的

前述の Brown LM らの報告をもとに、当施設において、肝機能障害、肝腫大がないものの低血糖を反復するケトン性低血糖症の男児 14 例を対象に、糖原病 IX 型の責任遺伝子 PHKA2、PHKB、PHKG2 を検索したところ、14 例中 6 例(まったく関連のない 6 家系)において、PHKA2 遺伝子に p.G991A バリエントを同定した。PHKA2 遺伝子は X 染色体上に存在しているため、これが日本における男児のケトン性低血糖症の病因となる主要なバリエントであることを明らかにし、同バリエントの臨床的意義を検討することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 発現実験系:

Wild-type・p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターの構築

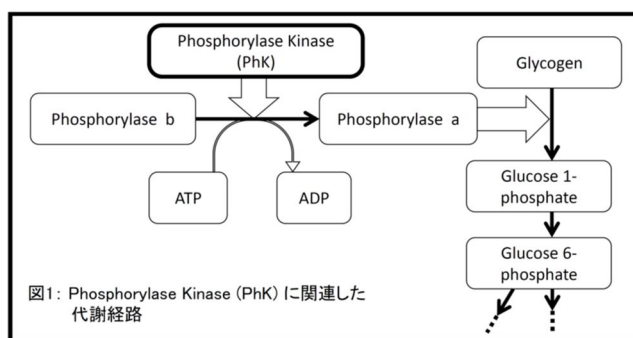
発現ベクターとして pcDNA3.1(+) を用い、wild-type PHKA2 cDNA を挿入し、Wild-type PHKA2 発現ベクターを作成する。このベクターから、KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いて p.G991A 変異を導入し、p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターを作製する。

HEK293T 細胞(ヒト胎児由来腎臓細胞)を培養し、Wild-type・p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターをそれぞれ別の HEK293T に Lipofectamine 2000 を用いて導入する。48 時間後に細胞を回収し、その一部を用いて PHKA2 の発現をイムノプロットで確認する。

PhK 活性の検討

Wild-type・p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターを用い、PhK 活性を検討する。直接的に PhK の活性を測定することが困難であるため、その基質である phosphorylase b と ATP を添加し、生成物である phosphorylase a の活性(量)を測定し、培養に要した時間とともに PhK の活性を計算する(図 1)。

もし活性に差がない場合は、HEK293T 細胞(ヒト胎児由来腎臓細胞)に PHKA2 の内因性発現が問題となる場合がある。その場合は、PHKA2 遺伝子を CRISPR / Caspase 9 法を用いてノックアウト細胞を作成して発現実験を行う。phosphorylase b・ATP の両基質に対する親和性の動態解析や、温度変化に対する安定性についても検討する。



(2) 全国の原因不明のケトン性低血糖症患者に対する調査と PHKA2 遺伝子 p.G991A バリエント解析: 岐阜大学小児科学教室では、原因不明のケトosis をきたす症例について、倫理審査委員会の承認を得て、原因検索として遺伝子パネル解析をおこなっている。代謝異常症の専門家が各施設に呼びかけ、原因不明のケトン性低血糖症例についてさらに症例を集め、PHKA2 遺伝子にバリエントが存在するかどうかを確認し、臨床像との関係を検討する。アンケート結果に基づき、ケトン性低血糖症患者を診療している施設へ変異解析を依頼し、承諾が得られた症例について解析を行い、ケトン性低血糖症患者における PHKA2 遺伝子 p.G991A バリエントを有する

頻度を明らかにする。

(3) 当院と関連の産院施設で遺伝子解析の承諾を得られた生後1か月児の一般集団における p.G991A バリエントの有無の調査： 多数の症例解析となるため、変異を TaqMan 法を用いて簡便に調べられるように準備している。3年で3000例の解析を予定する。本バリエントは日本人の HGV データベースでは男児200名に1名の頻度と推定され、3000名の解析で、男児が半分とすれば7~8名程度が本バリエントのヘミ接合と考えられる。これらの小児がケトン性低血糖症を来したか否かについて、2歳時、4歳時に調査を行う。

4. 研究成果

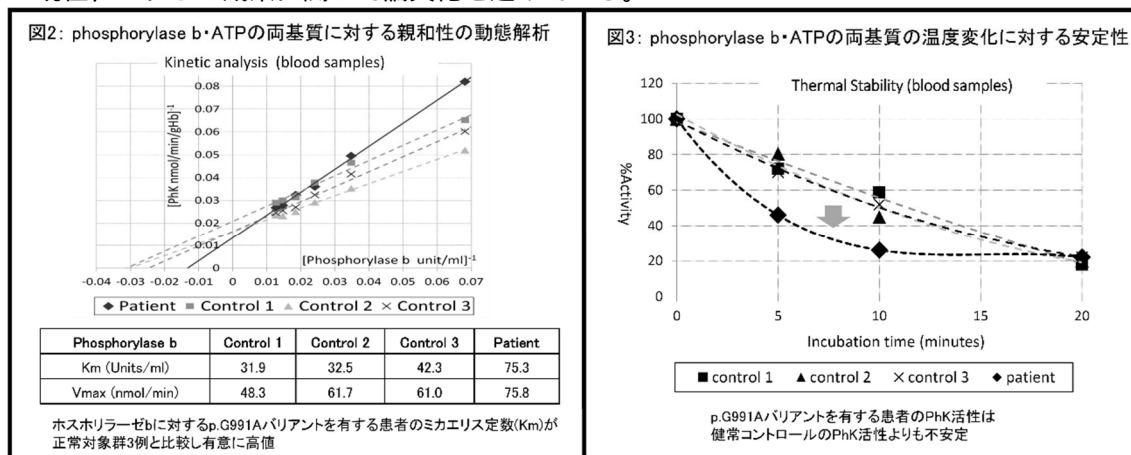
(1) 発現実験系

Wild-type PHKA2 発現ベクターと p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターを作製し、PHKA2 の発現をイムノプロットで確認することができた。

PhK 活性の検討として、Wild-type・p.G991A 変異 PHKA2 発現ベクターを用い、PhK 活性を検討した。本研究期間終了時点では PHKA2 遺伝子の p.G991A バリエントが実際に PhK 活性が低下していることを *in vitro* で有意差をもって証明するには至っていない。しかし、正常対象群の PhK 活性に比し、p.G991A バリエントを有する患者の PhK 活性は、ホスホリラーゼ b に対する Km が高く（すなわち、ホスホリラーゼ b に対する親和性が低い）、ホスホリラーゼ b の濃度が低下すると、グリコーゲンの分解がより抑制される可能性があり、ケトン性低血糖症の病態における PHKA2 遺伝子 p.G991A バリエントの関与を示唆していると考えられる。(図2)

ホスホリラーゼ b・ATP の温度変化に対する安定性を検討した。p.G991A バリエントを有する患者の PhK 活性は、健常コントロールの血液サンプル由来の PhK 活性よりもより高温において不安定であることが確認できた。この温度感受性の特性は、バリエントを持つ児が、特に発熱性感染症に関連して低血糖を呈することがある理由を説明できる可能性がある。(図3)

現在、これらの成果に関して論文化を進めている。



(2) 全国の原因不明のケトン性低血糖症患者に対する調査と PHKA2 遺伝子 p.G991A バリエント解析： 全国の原因不明のケトン性低血糖症患者（糖尿病の疑い例も含む）に対する調査と PHKA2 遺伝子 p.G991A 解析について、本研究期間の3年間で、計10名に何らかの PHKA2 のバリエントが同定されたが、p.G991A は同定できていない。症例集積と解析を引き続き進める。

(3) 当院と関連の産院施設で遺伝子解析の承諾を得られた生後1か月児の一般集団における p.G991A バリエントの有無の調査： 当院と関連の産院施設で遺伝子解析の承諾を得られた生後1か月児の一般集団における p.G991A の有無の調査として、先行研究と本研究期間の3年間で合計2638名（男児1362、女児1276）を解析した。その結果、p.G991A は、男児4名（全員ヘミ接合性）、女児10名（全員ヘテロ接合性）で同定された。これらの対象者のうち、その後のアンケート調査は2歳時点12名、4歳時点5名のアンケートを回収できたが、いずれも低血糖発作のエピソードは確認できていない。引き続き症例集積と解析を進めるとともに、今後、本アンケート調査においてケトン性低血糖症の患者が集積できれば、その臨床症状や重症度（発症年齢、低血糖の頻度など）を解析し、PHKA2 遺伝子の p.G991A バリエント解析で同バリエントを有する患者群と有しない患者群の間での比較検討などを行う予定である。

引用文献

Brown LM, et al. Evaluation of glycogen storage disease as a cause of ketotic hypoglycemia in children. J Inherit Metab Dis. 2015 38:489-93.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀 友博, 笹井 英雄	4. 発行年 2023年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 7
3. 書名 ケトン性低血糖症・アセトン血性嘔吐症（小児科診療ガイドライン－最新の診療指針－（第5版）pp508-514）	

〔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
---------	---------