

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07798

研究課題名(和文) ビタミンB6依存性てんかんの早期診断体制構築に向けたバイオマーカーの測定と探索

研究課題名(英文) Biomarker analysis and exploration for early diagnosis of vitamin B6-dependent epilepsies

研究代表者

秋山 倫之 (Akiyama, Tomoyuki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：10379737

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)：VB6依存性てんかんの早期診断体制構築のため、測定可能な診断バイオマーカーの追加、遺伝子・酵素診断の手法の整備、バイオマーカーが未発見のPLPBP欠損症におけるバイオマーカー探索を試みた。その成果として、既存のVB6測定系の拡張を行い、分析条件をほぼ決定できた。現在、バリデーションを行っているところである。ALDH7A1欠損症のバイオマーカーに関しては分析条件が確定した。遺伝子診断の体制は問題なく整えることができた。酵素活性測定に関しては、ALDH7A1欠損症についての測定条件の設定がほぼ整った。メタボローム解析用のPLPBP欠損症患者の臨床検体は、目下収集中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VB6測定系の拡張とALDH7A1欠損症の新規バイオマーカーの測定条件が整ったため、本邦では今まで行えなかったPNPO欠損症の生化学診断や、ALDH7A1欠損症のより正確な生化学診断への糸口がつかめた。また、ALDH7A1欠損症に関しては、遺伝子バリエーションの機能解析体制の準備が進んだ。これらの成果によりVB6依存性てんかんの早期診断が可能になれば、早期治療による発作・発達予後の改善が期待され、患者のQOL向上が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In order to establish an early diagnosis system for VB6-dependent epilepsies, we attempted to add measurable diagnostic biomarkers, improve genetic/enzyme diagnosis methods, and search for biomarkers for PLPBP deficiency, for which no biomarker has yet been discovered.

As a result, we expanded the existing VB6 measurement system and were able to almost determine the analysis conditions. It is currently undergoing validation. The analytical conditions for the biomarker of ALDH7A1 deficiency have been established. We were able to set up a system for genetic diagnosis. Regarding enzyme activity assays, the measurement conditions for ALDH7A1 protein have almost been determined. Clinical specimens from patients with PLPBP deficiency are currently being collected for metabolome analysis.

研究分野：小児神経学

キーワード：ビタミンB6依存性てんかん バイオマーカー 遺伝子解析 酵素活性測定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

VB6 依存性てんかんは治療可能な稀少疾患であり、主に新生児期に発病する。通常の臨床検査では異常が乏しく、年長での発病や VB6 がすぐ効かない非典型例があるため、早期診断が難しい。

また、早期診断・早期治療が行えた事例であっても発達面の問題を遺すことが多く、より効果の高い治療手段の開発が望まれている。

原疾患は4つ (ALDH7A1 欠損症、PNPO 欠損症、PLPBP 欠損症、高プロリン血症 II 型) あり、PLPBP 欠損症を除き診断バイオマーカーが見つかった。

しかし、診断バイオマーカーが測れる施設は世界的に少ない。また、バイオマーカーが未発見の PLPBP 欠損症では、髄液中ピリドキサルリン酸の低下が報告されたものの、特異度が低く信頼性が不十分であった。

これらの疾患は遺伝子解析でも診断可能であるが、PLPBP 欠損症については、現時点では遺伝子解析以外に確定診断の手段がない。なお、VB6 依存性てんかんの遺伝子解析体制も本邦では未だ十分に整ってはいない。

このように、生化学的知見や遺伝学的知見の進歩は見られているものの、VB6 依存性てんかんの早期診断への制約が大きい状況が依然として続いている。

2. 研究の目的

本研究では、VB6 依存性てんかんの早期診断体制の基盤構築のため、測定できるバイオマーカーを増やし、遺伝子・酵素診断の手法を整備し、各バイオマーカーの感度・特異度を確認する。

また、乾燥ろ紙血でのバイオマーカーが新生児マススクリーニングに足る安定性を備えているか検討する。

さらに、バイオマーカーが未発見の PLPBP 欠損症におけるバイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

より多くの VB6 化合物を測れるよう、既存の VB6 測定系を拡張する。ピリドキシン依存性てんかん、高プロリン血症 II 型のバイオマーカーの同時測定系を作成する。

全エクソーム解析、サンガー法を用いた遺伝子診断の体制を整える。また、臨床検体や発現蛋白を用いた酵素活性の測定系を開発する。

全国より臨床検体を収集し、バイオマーカーの感度・特異度を明らかにする。乾燥ろ紙血上でのバイオマーカーの安定性を評価する。

PLPBP 欠損症患者の臨床検体に対してメタボローム解析を行い、変動のある代謝物を探索する。

4. 研究成果

(1) VB6 測定系の拡張

VB6 測定系の拡張を行い、LC/MS での分析条件はほぼ決定できた。現在、バリデーションを行っているところである。リン酸化化合物 (ピリドキサルリン酸など) はイオン化効率が悪く、回路への吸着もみられるため、感度面などの課題を残している。

(2) 新規バイオマーカー

ALDH7A1 欠損症の新規バイオマーカーである 6-オキソピペコリン酸に関しては、従来のバイオマーカーとの同時測定条件がほぼ確定し、バリデーションを行っているところである。高プロリン血症 II 型のバイオマーカーについては、まだ着手できていない。

(3) 遺伝子診断の体制整備

遺伝子診断の体制に関しては、サンガー法、全エクソーム解析、全ゲノム解析による診断体制を問題なく整えることができ、新規患者数名での診断を行うことができた。

(4) 酵素活性測定体制整備

酵素活性測定に関しては、ALDH7A1 蛋白についての測定条件の設定がほぼ整った。他の酵素に関しては未着手である。

- (5) 乾燥ろ紙血でのバイオマーカー安定性評価
乾燥ろ紙血上のバイオマーカーの安定性は充分評価できていない。
- (6) PLPBP 欠損症のバイオマーカー探索
メタボローム解析用の PLPBP 欠損症患者の臨床検体は、目下収集中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akiyama T, Kuki I, Kim K, Yamamoto N, Yamada Y, Igarashi K, Ishihara T, Hatano Y, Kobayashi K	4. 巻 63
2. 論文標題 Folic acid inhibits 5-methyltetrahydrofolate transport across the blood-cerebrospinal fluid barrier: clinical biochemical data from two cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JIMD Rep	6. 最初と最後の頁 529-535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmd2.12321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hyodo Y, Akiyama T, Fukuyama T, Mimaki M, Watanabe K, Kumagai T, Kobayashi K	4. 巻 534
2. 論文標題 Simultaneous assay of urine sepiapterin and creatinine in patients with sepiapterin reductase deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2022.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	多田 宏子 (Tada Hiroko)		
研究協力者	才津 浩智 (Saitsu Hiroto)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	三枝 大輔 (Saigusa Daisuke)		

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