

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09593

研究課題名(和文) 脂肪酸酸化障害に基づく小児急性脳症の発症機序解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Study of pathophysiology of acute encephalopathy in childhood due to fatty acid oxidation disturbance and development of new treatments

研究代表者

山口 清次 (Yamaguchi, Seiji)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任教授

研究者番号：60144044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性酸化異常症は、急性脳症、乳児突然死を起こすことが多い。小児急性脳症の原因は、感染、中毒、環境因子、あるいは代謝障害などがあるが、その機序として酸化能の異常を介している可能性を検討した。

温度環境：高温下では酸化系は抑制され(特に長鎖脂肪酸)低温下では異常が緩和された。食中毒の一部の毒素による酸化系全般の抑制が観察された。薬剤(解熱剤)：サリチル酸は酸化を抑制し、一方アセトアミノフェンでは影響はみられなかった。サイトカイン：IL1とTNFは酸化を抑制し、INFとIL6は影響を示さなかった。小児の急性脳症の発生に、酸化系機能を介した何らかの関与が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児は、成人に比べ急性脳症を起こしやすい。急性脳症を起こす要因として考えられている感染、中毒、環境因子、代謝障害などが、酸化系の障害を介して起こる可能性が示された。小児で急性脳症の起こりやすい要因として酸化系の未発達、脆弱性も考えられる。今回検討した各種要因を今後さらに拡大して酸化抑制作用、保護作用の強さを検討する価値が十分にある。

急性脳症の予防、治療開発の方向性として、各病態における酸化系抑制を防止する対策、すなわち、高温にさらさないこと、解熱剤の選択に注意を払うこと、また特定のサイトカインの抑制薬の開発、酸化系保護剤の開発などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Acute encephalopathy or sudden infant death are relatively often noted in children with fatty acid oxidation (FAO) disorder. On the other hand, acquired encephalopathy can be caused by infection, intoxication, environmental factor, or metabolic diseases. In this study, relation between the encephalopathy and disturbance of FAO was studied. The results are as follows: 1) heat stress may inhibit FAO, while low temperature might alleviate the FAO disturbance; 2) A toxin of food intoxication may possibly inhibit FAO function; 3) an antipyretic, salicylate (Aspirin), inhibited FAO, while acetaminophen did not; 4) Some cytokines, IL1 or TNF $\alpha$  had an inhibitory effect to FAO, while INF $\gamma$  or IL6 did no effects. It is concluded that acute encephalopathy in childhood could occur through an inhibition of FAO in a considerable number of cases. These findings may be helpful to develop new approaches for prevention or treatments.

研究分野：小児科学

キーワード：小児急性脳症 酸化障害 環境温度 感染毒素 解熱剤 サイトカイン タンデムマス in vitro probe assay

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はミトコンドリア脂肪酸 酸化 (FAO)異常症の病因・病態について研究して来た。FAO 異常症は、エネルギー産生不全に陥りやすく、安定期は無症状でも感染などを契機に急性脳症や乳幼児突然死を起こすことで有名である。一方小児期には熱性疾患、感染、薬物中毒などによって急性脳症を起こすことが少なくない。FAO 異常症の急性脳症の発症形態と類似性があるため、種々の急性脳症と FAO 異常の関連性を検討することを計画した。

## 2. 研究の目的

小児急性脳症の引き金となりうる病態として、熱性疾患、感染、薬物（解熱剤）、およびサイトカインストーム（インフルエンザ脳症）などが知られている。そこで、培養細胞を用いて高温環境、感染毒素添加、解熱剤存在下、特定のサイトカイン存在下での 酸化能抑制作用の有無について検討した。

## 3. 研究の方法

in vitro probe (IVP) assay：培養細胞とタンデムマスを用いる 酸化能の評価法である。FAO 異常症とそれ以外の小児（代謝異常以外）由来の培養皮膚線維芽細胞を用いて、培養環境を変えながら、酸化能を評価した。

(1) 環境温度：FAO 異常症の細胞を用いて 41（高温）、37、および 33（低温）で培養して IVP assay を行った。

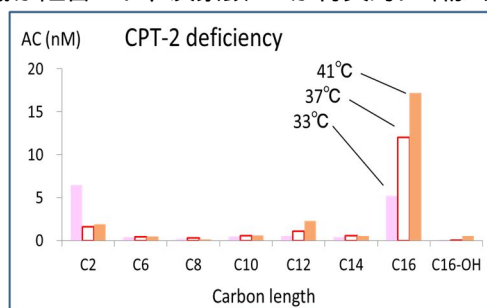
(2) 感染毒素：食中毒による乳児死亡の報告されたセレウス菌の毒素セレウリドを培養液に添加して IVA assay を行った。

(3) 薬物（解熱剤）：ライ症候群発症例の報告のあるアスピリン（サリチル酸）、およびジクロフェナク、アセトアミノフェンを培養液に添加して IVP assay を行った。

(4) サイトカイン：インフルエンザ脳症の機序としてサイトカインストームが考えられている。特定のサイトカイン（IL1、INF、IL6、TNF）を培養液に添加して IVP assay を行った。

## 4. 研究成果

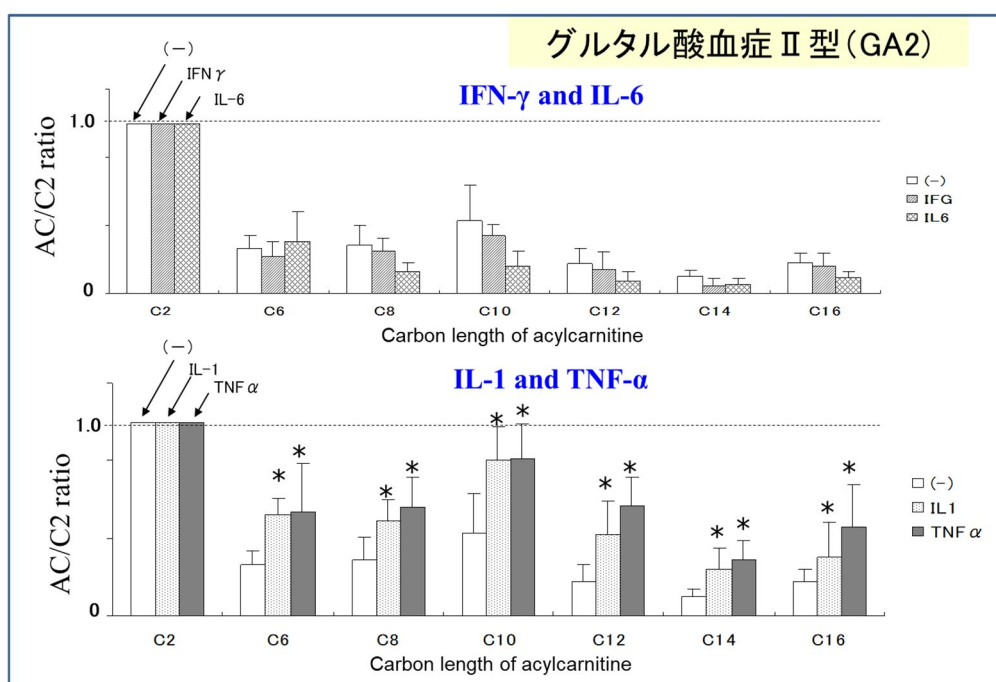
(1) 環境温度：FAO 機能への影響をより増強してみるために先天性 酸化異常症の細胞を用いて実験を行った。CPT2 欠損症は長鎖脂肪酸の代謝が阻害され、炭素鎖 16 が特異的に増加する疾患である。37 の環境と比較すると、FAO 異常症でみられる異常代謝産物から判断すると、41（高温）では特に長鎖脂肪酸の異常代謝産物が増加する傾向がみられた。一方低温下（33）では、FAO 異常症の異常代謝産物の蓄積は緩和されることが観察された。すなわち熱性疾患は長鎖脂肪酸の代謝能を抑制する可能性がある。



(2) 感染毒素：感染毒素セレウリドを培養液に添加したところ、酸化系全般（短鎖～長鎖）が抑制されることが分かった。成人では脳症を発症しなくても、酸化系の未発達な乳児であれば急性脳症に発展するものと推測された。

(3) 薬物（解熱剤）：アスピリン（サリチル酸）は酸化を抑制する作用を最も強く、ついでジクロフェナクであった。一方アセトアミノフェンは、酸化能への影響は見られなかった。現在小児の熱性疾患に対するアスピリンは原則禁忌、アセトアミノフェンが安全とされている臨床的観察と一致する。

(4) サイトカイン：4種類のサイトカインを添加して酸化能を調べたところ、TNF と IL1 は酸化能を抑制する傾向があり、INF と IL6 は酸化能に影響はみられなかった。サイトカインストームの疑われているインフルエンザ脳症の病態に、特定のサイトカインがかかわっている可能性があることを示す。



\* 優位に増加。グルタル酸血症Ⅱ型は広範に酸化が障害される先天代謝異常。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計30件)

- 1) Yamada K, Shiraishi H, I, Oki E, Ishige M, Fukao T, Hamada Y, Sakai N, Ochi F, Watanabe A, Kawakami S, Kuzume K, Watanabe K, Sameshima K, Nakamagoe K, Tamaoka A, Asahina N, Yokoshiki S, Miyakoshi T, Ono K, Oba K, Isoe T, Hayashi H, Yamaguchi S, Sato N: Open-label clinical trial of bezafibrate treatment in patients with fatty acid oxidation disorders in Japan. Mol Genet Met Rep 15: 55-63, 2018 (Feb) DOI: 10.1016/j.ygm.2018.02.003

- 2) Watanabe K, Yamada K, Sameshima K, Yamaguchi S: Two siblings with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency suffered from rhabdomyolysis after L-carnitine supplementation. *Mol Genet Met Rep* 15: 121-123, 2018 (Feb) DOI: 10.1016/j.ymgmr.2018.03.007
- 3) Shibata N, Hasegawa Y, Yamada K, Kobayashi H, Purevsuren J, Yang YL, Dung VC, Khanh NN, Verma IC, Bijarnia-Mahay S, Lee DH, Niu DM, Hoffmann GF, Shigematsu Y, Fukao T, Fukuda S, Taketani T, Yamaguchi S.: Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: selective screening vs. expanded newborn screening. *Mol Genet Met Rep* 16: 5-10, 2018. [doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.05.003)
- 4) Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Jamiyan P, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Hata I, Niida Y, Shigematsu Y, Iijima K, Yamaguchi S: Clinical and molecular investigation of 14 Japanese patients with complete TFP deficiency: a comparison with Caucasian cases. *J Human Genet* 62: 809-814, 2017. DOI: 10.1038/jhg.2017.52
- 5) Tajima G, Hara K, Tsumura M, Reiko Kagawa R, Satoshi Okada S, Nobuo Sakura N, Maruyama S, Noguchi A, Awaya T, Ishige M, Ishige N, Musha I, Ajihara S, Ohtake A, Naito E, Hamada Y, Kono T, Asada T, Hideo Sasai H, Fukao T, Fujikip R, Ohara O, Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takayanagi M, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Newborn screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency using (C16 + C18:1)/C2: Evaluation of additional indices for adequate sensitivity and lower false-positivity. *Molecular Genetics and Metabolism* 122, Issue 3, Pages 67-75 2017 (November) DOI 10.1016/j.ymgme.2017.07.011.
- 6) Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Purevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Efficacy of bezafibrate on fibroblasts of glutaric acidemia type II patients evaluated using an in vitro probe acylcarnitine assay. *Brain & Development* 39(1): 48-57, 2017 (January) DOI: 10.1016/j.braindev.2016.08.004

〔学会発表〕(計 50 件)

- 1) Yamaguchi S: How to Biochemically Approach Neuromuscular Disorders with Biochemical and Mass spectrometric Procedures. Asia-Oceania Conference of Child Neurology (AOCCN), Fukuoka, 2017 (May 11)
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects: A causative muscular disease detectable by mass spectrometric procedure (GC/MS and MS/MS). 15th Asian and Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting 2016. Hsinchu, Taipei, May 2016 (2016.5.26-29, Yuh-Jyh Jong)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ <https://ped-shimane-u.jp/>

## 6．研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：山田 健治

ローマ字氏名：(YAMADA, Kenji)

研究協力者氏名：古居 みどり

ローマ字氏名：(FURUI, Midori)