

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10196

研究課題名(和文) 脳グリコーゲン代謝と新生児仮死の神経学的予後予測：バイオマーカー探索と臨床応用

研究課題名(英文) Neurological Prognostic Prediction in relation with Brain Glycogen Metabolism and Neonatal Asphyxia: Biomarker Discovery and Clinical Application

研究代表者

杉江 秀夫 (SUGIE, Hideo)

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：60119980

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)：新生児仮死に起因する神経学的後遺症の発症病態を、脳グリコーゲン代謝に注目して検討した。満期産児で5分後アプガースコア7以下の症例41例において後に神経学的後遺症(主に脳性麻痺)を残したCP群(23例)と定型発達のTD群(18例)に分類し、グリコーゲンホスホリラーゼ遺伝子の多型を2群間で比較した。またホスホフルクトキナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼについてもあわせて検討した。対象とした遺伝子に遺伝子バリエーションを複数認めしたが、CP群TD群で比較したところ、PYGL、PFKPに統計学的に有意なgenotypeの差が( $p<0.05$ )認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳性麻痺は医療の進歩にも関わらずその発生頻度に顕著な改善はない。未熟児医療の進展に伴って超未熟児の生存予後が改善したことで、皮肉にも重症児の割合が増加している。新生児仮死は周生期の脳損傷の原因の一つで、低酸素、脳虚血による神経細胞の非可逆的損傷を引き起こす。今回満期産新生児仮死におけるCP群とTD群で解糖系酵素遺伝子の一部に有意な遺伝子型の差が認められたことから、これが神経学的予後のリスクを予測する一つのバイオマーカーとなる可能性が考えられる。新生児仮死児で本バリエーションを有する個体に対して、早期の医療的介入(リハビリテーションなど)を開始する目安となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of neurological sequelae caused by neonatal asphyxia was examined by focusing on brain glycogen metabolism. In 41 cases with a 5-minute Apgar score of 7 or less in term infants, they were classified into a CP group (23 cases) with a neurological sequelae (mainly cerebral palsy) and a TD group with typical development (18 cases), and glycogen phosphorylase (brain type; PYGB, muscle type; PYGM, liver type; PYGL) gene polymorphism was examined between the two groups. In addition, we also examined phosphofructokinase (muscle type; PFKM, liver type; PFKL, platelet type; PFKP) and phosphorylase kinase, which are glycolytic key enzymes expressed in the brain. Multiple gene variants were found in the target genes, but when compared in the CP group and the TD group, a statistically significant genotype difference was found in PYGL and PFKP ( $p<0.05$ ).

研究分野：小児科学、小児神経学、先天代謝異常症

キーワード：新生児仮死 神経後遺症 脳性麻痺 脳グリコーゲン代謝 グリコーゲンホスホリラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年発達障害児に関する関心の高まりとともに、基礎研究および臨床研究による病態解明が進んでいる。「受胎から新生児期(生後4週間以内)までの間に生じた脳の非進行性病変に基づく、永続的なしこり変化しうる運動および姿勢の異常である。その症状は満2歳までに発現する。進行性疾患や一過性運動障害または将来正常化するであろうと思われる運動発達遅滞は除外する」(厚生省脳性麻痺研究班 1968)と定義される脳性麻痺(cerebral palsy 以下 CP)は、小児神経学領域の重要な疾患の一つであるが、新生児医療の進歩にもかかわらず、その発生頻度に顕著な改善はなく、極小未熟児の生存率の改善とともに神経症状の重篤な重症児の頻度が増加している(表1)

しかしながら新生児仮死児の発達フォローアップの中で、同程度の新生児仮死を経験している児で神経後遺症を認める例と、一方定型発達を示す例が混在している事を経験してきた。本研究では同程度の仮死に暴露されながら神経予後が異なる症例の存在に着目し、この2群にどのような個体差があるかを、低酸素における生体の緊急エネルギー供給機構であるグリコーゲン代謝に着目して検討した。この病態の解明ができれば、新生児仮死児の神経学的予後リスクを推定するうえでのバイオマーカーとして、早期介入などの診療的な面での判断にも活用できる。

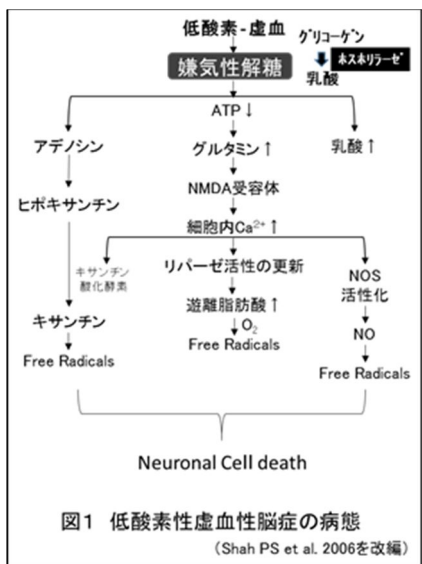
年齢(歳)	男児		女児	
	人数	人口千対	人数	人口千対
0	1270	2.38	988	1.94
1	1284	2.34	987	1.90
2	1304	2.44	1052	2.06
3	1402	2.62	1054	2.07
4	1477	2.69	1086	2.07
5	1417	2.59	1126	2.16
6	1385	2.55	1048	2.02
7	1381	2.55	1020	1.97
8	1449	2.58	1015	1.89
9	1420	2.48	1013	1.86

表1. 脳性麻痺の発生数  
(小林ら、科研費研究成果報告書平成28年)

### 2. 研究の目的

脳のグリコーゲン含量は肝臓・骨格筋に比較すると極めて少量であり、その生理学的な存在意義は十分に解明されていなかった。近年一過性の低酸素、虚血などの緊急時において、脳代謝の補助的エネルギー供給分担機構として、neuroprotection に寄与している事が注目されている。つまり新生児仮死のような急性の低酸素状態に陥った児に対して、嫌気状態で短期間の脳エネルギーレスキューの一端を担っているのではないかと推定される(図1)。

一方新生児仮死児の予後を見ると、同程度の仮死状態に暴露されながら、定型発達から重篤な脳障害を残す一連の障害 spectrum が認められる。今回の研究では嫌気状態に対応する脳グリコーゲン代謝機構の key enzyme であるグリコーゲンホスホリラーゼの isoform(脳型、筋型、肝型)の機能変化が一部の新生児の予後を左右しているのではないかと「仮説」を出発点としこれを明らかにすることが目的である。



### 3. 研究の方法

#### (1)症例の収集と対象:

対象は満期で出生した新生児で、5分後 Apgar score が7点以下のもので、検体採取に保護者の同意を得たもの。また新生児フォローアップ外来において3年以上経過観察中で、神経後遺症(けいれん、知的障害、運動障害など)を残した群(CP群)と残さなかった群(TD群)それぞれ約20例。性別は問わない。なお脳奇形、染色体異常、先天性代謝異常、子宮内感染、胎便吸引症候群、呼吸窮迫症候群、頭蓋内出血など明らかな基礎疾患を有する者は除外した。対象児の評価と診断は小児神経専門医、新生児専門医によって行った。なお本研究は各施設における研究倫理委員会での承認を得た。

#### (2)検体収集、周生期の臨床検査データの収集、神経学的評価:

対象の特性から採血などの侵襲的な検体採取を避け、唾液を採取して試料とした。Oragene社製のDNA採取キットを用いて唾液を試料としてgenomic DNAを抽出し、グリコーゲンホスホリラーゼアイソフォーム(PYGB;脳型、PYGL;肝型、PYGM;筋型)の翻訳領域およびプライムサイト近傍を含めてPCR法で増幅し、直接シーケンシング法で塩基配列を明らかにした。得られた遺伝子バリエーションについてSNP database、ExAC-EASのアリル頻度を参考にして評価した。

#### (3)CP群とTD群における遺伝子バリエーションについて:

予備研究においてCP群とTD群との間でPYGBエクソン12(rs2227891:A/G),14(rs2227892:T/C)多型の差が認められたので、症例を増やすことで統計学的に明らかな偏りがないかどうかを検討した。またグリコーゲンホスホリラーゼのisoformであるPYGL,PYGMについても範囲を広げて検索した。

(4) 治療的側面に関する検討：

本研究で両群の間に、グリコーゲンホスホリラーゼ遺伝子のバリエーションの機能変化が認められた場合は、グリコーゲンホスホリラーゼの補酵素であるビタミン B6 を用いて、急性期の低酸素状態における脳保護の一治療法としてその可能性を検討する予定である。

4. 研究成果

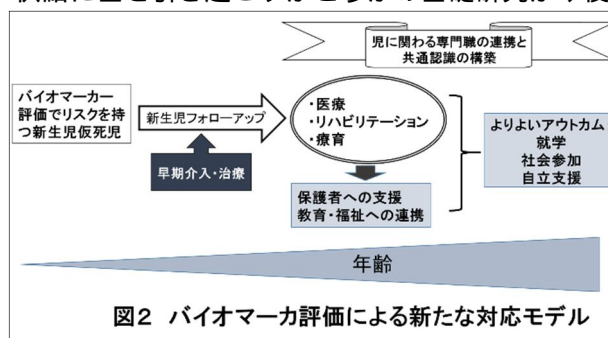
(1) CP 群と TD 群における遺伝子バリエーションについて：

5 分後アプガースコア 7 以下の満期産児の症例 41 例が収集でき、内訳は CP 群 23 例、TD 群 18 例であった。現在は満期産での新生児仮死児という今回の研究対象の条件に沿う例数は少なくなりつつあり、症例の収集には若干の時間を要した。

グリコーゲンホスホリラーゼ（脳型；*PYGB*、筋型；*PYGM*、肝型；*PYGL*）遺伝子のすべての多型を 2 群間で検討した。また追加検索として脳に発現する解糖系の key enzyme であるホスホフルクトキナーゼ（*PFKP*）についても追加検討した。遺伝子バリエーションは *PYGB* 27 か所、*PYGM* 16 か所、*PYGL* 10 か所にみとめられた。CP 群および TD 群で遺伝子バリエーションに差異が認められるかどうか統計学的に比較したところ、*PYGL* のイントロン 15 のスプライスサイトのバリエーション ( $p < 0.05$ )、*PFKP* のイントロン 7 のスプライスサイトのバリエーション ( $p < 0.05$ ) および *PFKP* のエクソン 9 の synonymous variant ( $p < 0.01$ ) に両群で有意差が認められた。このバリエーションの相違が実際仮死状態において嫌気性解糖によるエネルギー供給に差を引き起こすかどうかの基礎研究が今後必要である。

(2) バイオマーカーとしての臨床応用アルゴリズムについて：

統計学的に有意差を認めた上記 3 バリエーションが新生児仮死児の神経学的予後リスクのバイオマーカーになりうるとした場合、図 2 に示すようなアルゴリズムが提案できる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 武中優, 関口兼司, 関谷博顕, 大野欽司, 杉江秀夫, 松本理器	4. 巻 60
2. 論文標題 神経筋接合部異常が示唆された phosphoglucomutase 1 欠損症の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床神経学	6. 最初と最後の頁 152-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Yokoi K, Nakajima Y, Ohye T, Inagaki H, Wada Y, Fukuda T, Sugie H, Yuasa I, Ito T, Kurahashi H	4. 巻 43
2. 論文標題 Disruption of the Responsible Gene in a Phosphoglucomutase 1 Deficiency Patient by Homozygous Chromosomal Inversion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JIMD	6. 最初と最後の頁 85-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/8904_2018_108	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 Iijima H, Iwano R, Tanaka Y, Muroya K, Fukuda T, Sugie H, Kurosawa K, Adachi M	4. 巻 13
2. 論文標題 Analysis of GBE1 mutations via protein expression studies in glycogen storage disease type IV: A report on a non-progressive form with a literature review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ymgmr.2018.09.001	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 杉江秀夫, 杉江陽子	4. 巻 別冊
2. 論文標題 遺伝的要因による神経発達障害 遺伝性代謝病 糖質代謝異常症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨床. 2017.03; 別冊(精神医学症候群I)	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田冬季子、漆畑伶、林泰壽、石垣英俊、平出拓也、高橋正紀、鈴木ゆめ、石毛美夏、杉江秀夫
2. 発表標題 進行性筋力低下を示す糖原病3型の予後についての調査研究 成人症例の解析
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武中優、関谷博顕、立花久嗣、千原典夫、上田健博、関口兼司、西野一三、大野欽司、杉江秀夫、戸田達史
2. 発表標題 反復刺激試験で神経筋接合部異常が示唆されたPhosphoglucomutase 1欠損症の一例
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉江秀夫（分担執筆）	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 2534
3. 書名 内科学（第11版）：糖原病、糖代謝異常症	

〔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	福田 冬季子  (FUKUDA Tokiko)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	杉江 陽子  (SUGIE Yoko)		
研究協力者	河野 由美  (KONO Yumi)		
研究協力者	平澤 恭子  (HIRASAWA Kyoko)		