

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07833

研究課題名(和文) オキシステロールは小児急性肝不全のバイオマーカーとして有用か？

研究課題名(英文) Oxysterol as a biomarker for pediatric acute liver failure

研究代表者

水落 建輝 (Mizuochi, Tatsuki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20368921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、血清や尿中のオキシステロールが、小児急性肝不全のバイオマーカーとして有用か明らかにすることである。
小児急性肝不全は希少疾患であるため、科学的に検証するための十分な検体数を研究期間に集めることはできなかったが、数例の急性肝不全とコントロールの比較検討を行い、バイオマーカーの候補となるオキシステロールを数種類同定した。今後は検体数を増やし、どのオキシステロールが小児急性肝不全のバイオマーカーとして真に有用か明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性肝不全は稀な疾患であるが、予後不良なことが多い。小児急性肝不全の症例から非侵襲的に取得できる検体を用いて、早期診断や予後予測できるバイオマーカーが見つければ、予後改善に繋がると考えられる。本研究は小児急性肝不全の治療と予後をより良くするために有用な研究と考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify whether serum and urinary oxysterol is a useful biomarker for pediatric acute liver failure.

Unfortunately, we could not collect sufficient number of samples to clarify which oxysterol is useful. However, we identified some oxysterols may have a potential for the biomarker. Next step, we would like to collect more samples of pediatric acute liver failure to clarify which oxysterol is the best biomarker for pediatric acute liver failure.

研究分野：小児消化器肝臓病

キーワード：オキシステロール 小児 肝臓病 急性肝不全

1. 研究開始当初の背景

オキシステロールは酸化コレステロールの総称である。オキシステロールには種々の構造類似化合物が存在し、生体内では異化代謝の中間生成物であるほか、核内レセプターのリガンドとしても機能している。近年では、様々な疾患の病因や体内状態のバイオマーカーとしての可能性が次々と報告されている。オキシステロールは肝疾患のバイオマーカーとしての報告もあるが、それらの対象は成人であり、小児の報告はほとんどない。我々は、2015～17年度の文科省科学研究費基盤研究C(課題名:「小児肝疾患におけるオキシステロールの病態解析とバイオマーカーとしての可能性」、研究番号:15K09704、研究代表者:水落建輝)の補助金を受け、血清と尿検体を用いて7種のオキシステロールを分析する手法を確立した。また、健常小児の年齢(成長)に伴うオキシステロールの動態変化や、尿オキシステロール値が小児肝疾患におけるバイオマーカーとして有用である可能性を見出した。その3年間の研究の中で、急性肝不全昏睡型で生体肝移植になった小児(乳幼児)3例を経験し、血清と尿のオキシステロールを分析したところ、尿中の4種類のオキシステロールで、他の肝疾患群や健常群(コントロールは全て age-matched の小児検体)と比べて有意な上昇を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オキシステロールが小児急性肝不全・肝性昏睡の重症度や肝移植の予後を推測するバイオマーカーとして有用か検討する。小児急性肝不全や肝性昏睡の重症度判定、肝移植適応判断や予後を予測することは難しいため、バイオマーカーの確立が急務である。血清と尿という低侵襲で容易に採取できる検体を用いて、重症度や予後を推測できるバイオマーカーとなれば、臨床現場での実用性や診断・治療に対する貢献は非常に高いと考えられる。

3. 研究の方法

本研究はヒト検体を用いた研究のため、倫理委員会の承認を受け、紙面での同意書を得て行う。また、小児急性肝不全や肝移植となるような症例は当施設だけでは数に限界があるため、多施設研究が必要である。本研究は既に久留米大学倫理委員会の承認を受けている(表題:「小児肝・神経疾患におけるオキシステロールの病態解析とバイオマーカーとしての可能性」、研究番号:15246、研究代表者:水落建輝)。また、小児の急性肝不全や肝移植に至った症例の検体を数多く集めエビデンスを構築するため、本邦で小児肝疾患手術や肝移植を多く行っている施設と共同研究を進める。具体的には、自治医科大学移植外科、九州大学小児外科、東北大学小児外科、名古屋大学小児外科、順天堂大学小児科・小児外科、東京大学小児外科、以上6施設と共同研究(研究代表者:水落建輝)の提携を結び症例と検体を募る。

研究手法としては、対象は18歳未満の小児で、急性肝不全、その他肝疾患、健常児、以上の3群に分け、血清と尿のオキシステロールを分析し、臨床所見・血液検査・肝病理像も含めて比較検討する。サブ解析として、急性肝不全は昏睡型と非昏睡型に分け、その他肝疾患は胆汁うっ滞型と非胆汁うっ滞型に分け、検討する。また、肝移植に至った症例は、移植前後でオキシステロールを分析し、肝移植の予後を予測するバイオマーカーとして有用か検討する。オキシステロールの分析は、共同研究施設である胆汁酸研究所で行い、検体は血清と尿を用い液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)で分析する。4-OH-cholesterol、20(S)-OH-cholesterol、22(R)-OH-cholesterol、22(S)-OH-cholesterol、24(S)-OH-cholesterol、25-OH-cholesterol、27-OH-cholesterol、以上7種のオキシステロールを分析する。

4. 研究成果

小児急性肝不全は稀少疾患のため、各施設の倫理委員会の承認を得て共同研究を行った。急性肝不全の検体数は、その稀少性から研究実施期間では十分に集めることができなかったが、胆汁鬱滞性疾患、特に胆道閉鎖症やその他乳児胆汁うっ滞症(アラジール症候群やシトリン欠損症)の検体を多く集めることができた。研究期間中に本研究に関連したデータでもある、小児健常児の血清と尿中のオキシステロールの発達の推移や小児肝疾患と比較したデータを論文としてまとめ報告できた(図1: Takaki Y, Mizuochi T, et al. Sci Rep 2020)。また、尿中オキシステロールが胆道閉鎖症と他の乳児胆汁うっ滞症を鑑別するバイオマーカーとして有用であるデータを論文としてまとめ報告できた(図2: Konishi K, Mizuochi T, et al. Sci Rep 2021)。急性肝不全のバイオマーカー研究は途中までデータは集まっているが、科学的検証をするにはまだ不十分な検体数のため、今後も検体採取を続け、今までのコントロールデータを用いて比較検討を行う予定である。

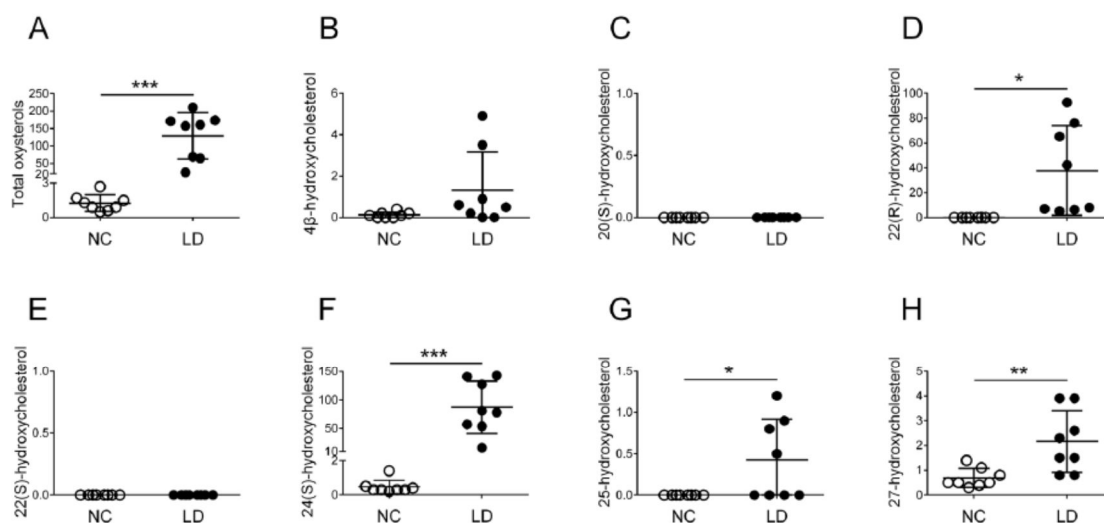


Figure 3. Urinary oxysterols in normal controls and children with liver disease according to an enzymatic hydrolysis method. Horizontal lines represent means; vertical bars are standard deviations. Units are $\mu\text{mol/mol}$ creatinine. (A) total oxysterols, (B) 4 β -hydroxycholesterol, (C) 20(S)-hydroxycholesterol, (D) 22(R)-hydroxycholesterol, (E) 22(S)-hydroxycholesterol, (F) 24(S)-hydroxycholesterol, (G) 25-hydroxycholesterol, and (H) 27-hydroxycholesterol. NC, normal controls; LD, children with liver disease. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

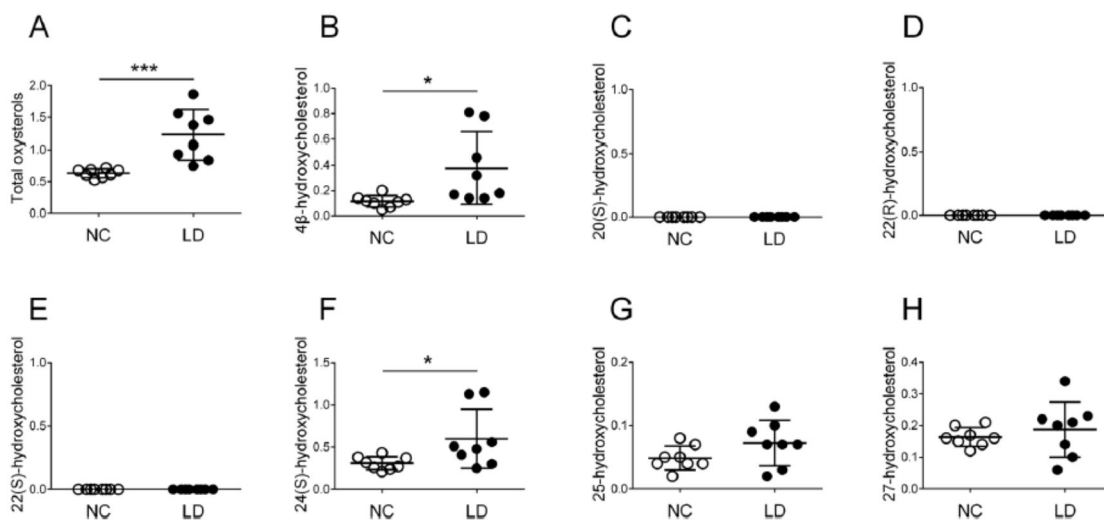


Figure 4. Serum oxysterols in normal controls and children with liver disease according to an alkaline hydrolysis method. Horizontal lines represent means; vertical bars are standard deviations. Units are $\mu\text{mol/L}$. (A) total oxysterols, (B) 4 β -hydroxycholesterol, (C) 20(S)-hydroxycholesterol, (D) 22(R)-hydroxycholesterol, (E) 22(S)-hydroxycholesterol, (F) 24(S)-hydroxycholesterol, (G) 25-hydroxycholesterol, and (H) 27-hydroxycholesterol. NC, normal controls; LD, children with liver disease. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

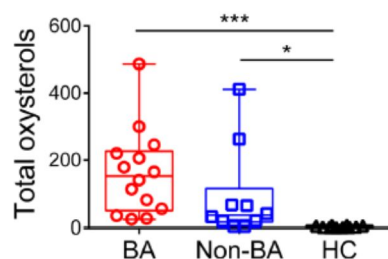


Figure 1. Urinary total oxysterols among BA, non-BA, and HC. Urinary total oxysterols are shown for subjects with biliary atresia (BA) and non-biliary atresia cholestatic controls (non-BA), as well as healthy controls (HC). Units are $\mu\text{mol}/\text{mol}$ creatinine. Horizontal lines in the middle of boxes indicate medians, while tops and bottoms of boxes represent 75th and 25th percentiles, respectively. Whiskers above and below boxes represent maximum and minimum, respectively. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

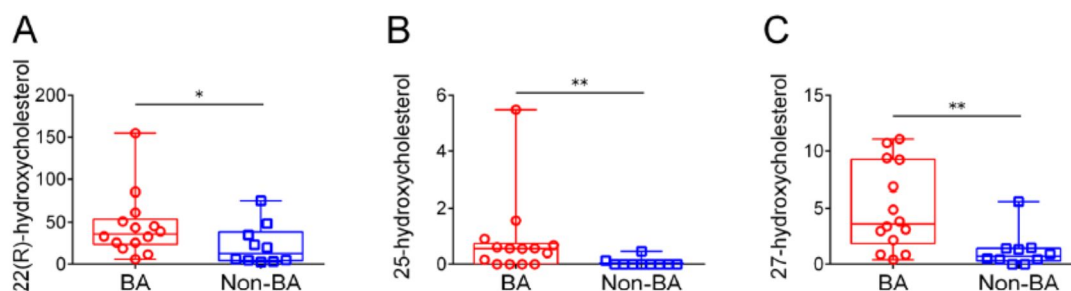


Figure 2. Urinary 22(R)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol: BA vs. non-BA. Urinary 22(R)-hydroxycholesterol (A), 25-hydroxycholesterol (B), and 27-hydroxycholesterol (C) are shown for biliary atresia (BA) and non-biliary atresia cholestatic controls (non-BA). Units are $\mu\text{mol}/\text{mol}$ creatinine. Horizontal lines in the middle of boxes indicate medians, while tops and bottoms of boxes represent 75th and 25th percentiles, respectively. Whiskers above and below boxes represent maximum and minimum, respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

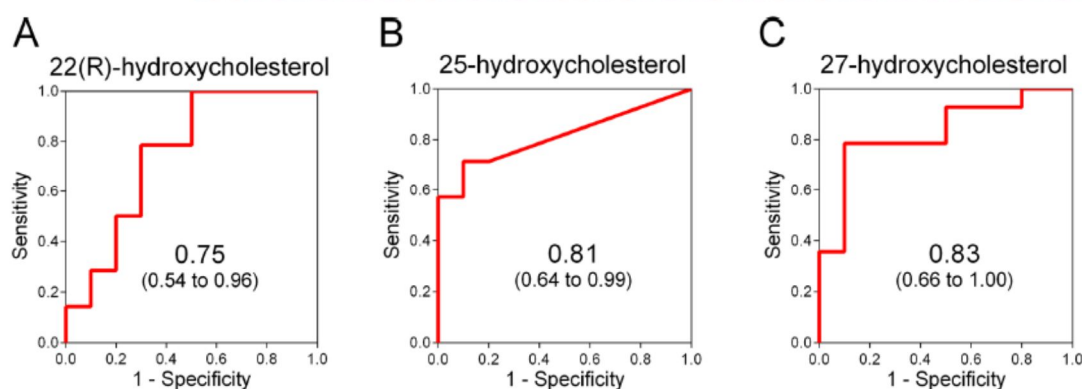


Figure 3. ROC curves for urinary 22(R)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol. Receiver operating characteristic (ROC) curves for urinary 22(R)-hydroxycholesterol (A), 25-hydroxycholesterol (B) and 27-hydroxycholesterol (C) were obtained by plotting sensitivity against 1-specificity. Sensitivity and specificity were calculated using the results from 14 patients with biliary atresia and 10 with non-biliary atresia cholestatic controls. Areas under ROC curves are shown with 95% confidence intervals.

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 2件）

1. 著者名 Takaki Y, Mizuochi T, Takei H, Eda K, Konishi KI, Ishihara J, Kinoshita M, Hashizume N, Yamashita Y, Nittono H, Kimura A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Urinary and serum oxysterols in children: developmental pattern and potential biomarker for pediatric liver disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63758-2	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 Konishi KI, Mizuochi T, Takei H, Yasuda R, Sakaguchi H, Ishihara J, Takaki Y, Kinoshita M, Hashizume N, Fukahori S, Shoji H, Miyano G, Yoshimaru K, Matsuura T, Sanada Y, Tainaka T, Uchida H, Kubo Y, Tanaka H, Sasaki H, Murai T, Fujishiro J, Yamashita Y, Nio M, Nittono H, Kimura A.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Japanese prospective multicenter study of urinary oxysterols in biliary atresia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84445-w	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高木 祐吾
2. 発表標題 オキシステロールは小児肝疾患のバイオマーカーとして有用か？
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西 健一郎
2. 発表標題 胆道閉鎖症におけるオキシステロール及び胆汁酸分析の有用性～a pilot study～
3. 学会等名 第36回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西 健一郎
2. 発表標題 胆道閉鎖症におけるオキシステロール及び胆汁酸分析の有用性～a pilot study～
3. 学会等名 第46回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水落 建輝
2. 発表標題 オキシステロールは小児急性肝不全のバイオマーカーとして有用か？～A Pilot Study～
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西 健一郎
2. 発表標題 オキシステロールは小児急性肝不全のバイオマーカーとなりうるか？： a pilot study
3. 学会等名 第35回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichiro Konishi
2. 発表標題 Oxysterols in pediatric acute liver failure with hepatic encephalopathy: a pilot study
3. 学会等名 ESPGHAN Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水落 建輝
2. 発表標題 胆道閉鎖症におけるオキシステロールのバイオマーカーとしての可能性
3. 学会等名 第47回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenichiro Konishi
2. 発表標題 Urinary oxysterols in biliary atresia: a prospective multicenter study in Japan
3. 学会等名 The Liver Meeting 2020 (Web) (国際学会)
4. 発表年 2020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
連携研究者	木村 昭彦	久留米大学・医学部小児科・臨床教授	
	(Kimura Akihiko)		
	(00211201)	(37104)	

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
---------	---------