

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17355

研究課題名（和文）脂肪酸酸化能検査法を応用した長鎖脂肪酸酸化異常症の重症度・治療有効性判定法の確立

研究課題名（英文）Estimation for severity and treatment efficacy of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency via fatty acid loading test

研究代表者

杉原 啓一（Sugihara, Keiichi）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・医員

研究者番号：40835766

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）：VLCAD欠損症の臨床的重症度は、従来の診断方法では予測することが困難であった。VLCAD欠損症患者と健常者それぞれから得た末梢血単核球での炭素13標識脂肪酸負荷検査で、患者群ではカルニチン比の有意な減少がみられた。各比率の値は臨床的重症度スコア（CSS）と有意な相関があり、疾患の重症度を予測できることが示唆された。さらにU-13C-ステアリン酸負荷試験において13C-C16/13C-C18比が13C-C14/13C-C18比より高い患者はCSSが有意に高くより重症であると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検査法がVLCAD欠損症の臨床的重症度を予測する上で有用であり、重症化リスクを有する患者の同定に使用できることが示唆された。また本測定結果をもとに、代謝発作リスクが低いと考えられる患者に対し、過剰な治療や生活制限を回避することで、より効率的な管理を行うことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Clinical severity of VLCAD deficiency has been difficult to predict using conventional diagnostic methods; a carbon-13-labeled fatty acid load test on peripheral blood mononuclear cells from VLCAD deficiency patients and healthy subjects, respectively, showed a significant decrease in carnitine ratio in the patient group. The value of each ratio was significantly correlated with the clinical severity score (CSS), suggesting that it can predict disease severity. Furthermore, patients with a 13C-C16/13C-C18 ratio higher than the 13C-C14/13C-C18 ratio in the U-13C-stearate load test were presumed to have significantly higher CSS and more severe disease.

研究分野：先天代謝異常疾患

キーワード：脂肪酸酸化異常症 カルニチンサイクル異常症 新生児マススクリーニング アシルカルニチン分析
末梢血単核球 安定同位体標識脂肪酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我が国では、タンデムマス法を用いた新生児マススクリーニングの開始によって、多くの脂肪酸酸化異常症患者の早期診断・治療が可能となっているが、臨床的重症度判定は必ずしも容易ではない。マススクリーニングを契機に診断される患者の中には、治療を必要としない軽症例も多く存在することが明らかとなり、不要な治療による負担を軽減するために臨床的重症度判定方法の開発が求められている。本研究では、我々が開発した末梢血単核球を用いた安定同位体標識脂肪酸負荷による脂肪酸酸化能検査法を応用し、変異遺伝子の機能解析結果との関係性を解析することによって、極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症の臨床的重症度判定、更に薬物治療についての患者毎の有効性判定を同時に行う方法を確立し、新生児マススクリーニング陽性例における迅速な治療方針決定を可能とすることを目指した。

脂肪酸酸化異常症患者の予後改善には、新生児マススクリーニングにより生後早期に診断し、治療を開始することが重要である。我が国では、2013 年よりタンデムマス法を用いた新生児マススクリーニングが開始され、当該疾患群の多くが対象疾患となっている。マススクリーニングの効果により、最重症例以外の多くの患者が急性代謝不全を発症することなく成長している。一方で、患者重症度には大きな幅があり、新生児マススクリーニング診断例が増加するにつれ、ほとんど治療を要することなく無症状で経過する患者も多く存在することが指摘されている。全ての診断例に対し一律の治療を行うことは、多くの軽症例に不要な負担を強いることになるが、診断時に重症度を推定して治療の差別化を行うことは、現状では困難である。従って、確定診断および臨床的重症度判定を同時に迅速に可能とする方法が検討されているが、いずれも確実性、迅速性、侵襲性などの面で十分な結果は得られていない。治療としては、急性増悪発作の予防のために飢餓状態の回避、運動制限、中鎖脂肪酸の摂取などが重要であり、疾患によってカルニチン投与も行われる。しかし、これらの対応にも関わらず、重症発作を来して死亡する症例が報告されている。また、運動負荷に伴う頻回の横紋筋融解症によって、日常生活が著しく制限される症例も少なくない。そのため、新たな治療法が検討されているが、未だ確立されたものはない。

2. 研究の目的

本研究では VLCAD 欠損症に焦点を絞り、我々が開発した末梢血単核球 (PBMC) を用いた安定同位体標識脂肪酸負荷による脂肪酸酸化能検査法を応用し、重症度の決定および有効な治療法の選択を可能とする方法を確立することを目的とする。VLCAD 欠損症は、タンデムマススクリーニングにより多くの患者が診断されるが、スクリーニング診断例の中には、未発症例が多いことが明らかとなっている (Pena LDM, et al. Mol Genet Metab 2016)。最軽症例に対する不要な治療を回避するためには、重症度の推定が重要である。従来から行われてきた皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性測定法では、酵素活性の測定結果が臨床経過やマススクリーニングでのアシルカルニチン分析結果と一致しない場合がある。また、VLCAD の遺伝子である ACADVL には多数の変異が同定されているが、一部の既報変異以外では遺伝子型と表現型の関係が不明である。特に、マススクリーニング診断例では、生後早期からの介入によって発症が予防されるため従来の臨床病型に分類できず、新規に同定された遺伝子変異の病的意義の推定が困難な場合が少なくない。そこで、培養皮膚線維芽細胞の脂肪酸酸化能を評価し、VLCAD 欠損症の重症度分類を行う試みがなされてきた (Hesse J, et al. J Inherit Metab Dis 2018、Roe DS, et al. Clin Chim Acta 2001、Diekman EF, et al. Genet Med 2015)。しかしこれまでの検討では、心筋障害を伴う最重症型の判別は可能だが、低血糖を伴う乳幼児発症型と骨格筋型との判別は困難であった。また、皮膚生検で得た皮膚線維芽細胞を用いることから侵襲的で培養に時間を要するため、新生児の診断には適切でない。

我々は、これまでに PBMC を用いた脂肪酸酸化能検査を開発し、脂肪酸酸化異常症の迅速な確定診断を可能にした (Hata Iら, 日本先天代謝異常学会雑誌 2013)。この方法では、細胞内の脂肪酸酸化の流れをアシルカルニチンプロファイルとして詳細に観察することができるのと同時に脂肪酸酸化能全体を評価することも可能であり、重症度をより詳細に反映できるものと考えている。また、温度条件や薬剤添加など、必要性に応じた様々な検討が同時に可能であるため、新生児マススクリーニング陽性例の迅速な治療方針決定のために有用な方法になり得ると考えた。

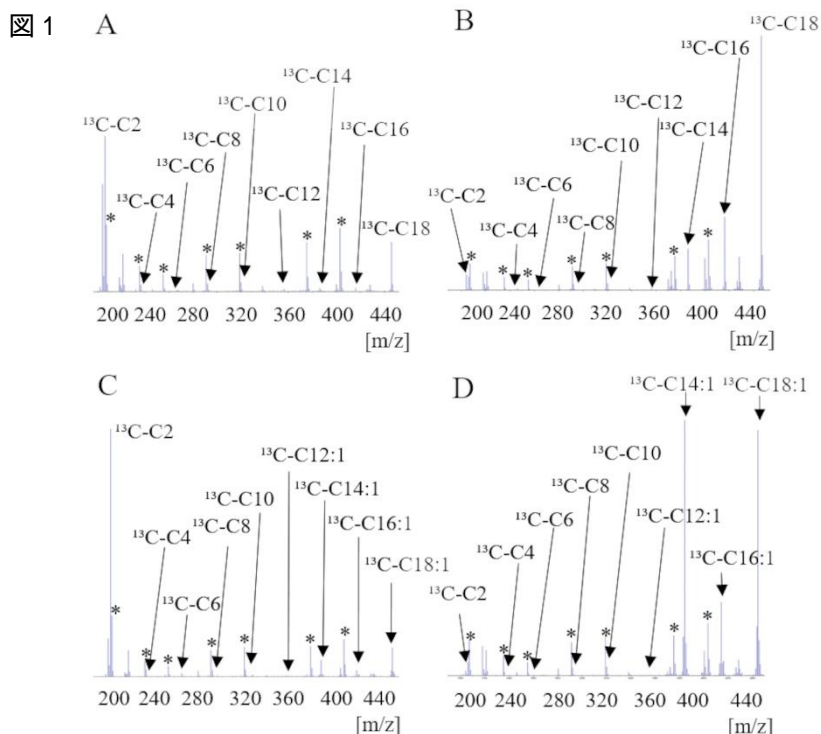
3. 研究の方法

2020 年 4 月から 2021 年 3 月において、これまでに血清アシルカルニチン分析や遺伝子検査で確定診断されている VLCAD 欠損症患者 14 人、ならびに健常成人 23 人を対象とした。末梢血から分離した単核球に炭素 13 標識脂肪酸の 13C-ステアリン酸、13C-オレイン酸を負荷し、その代謝産物をアシルカルニチン分析により測定した。患者群と健常者群のアシルカルニチン比率を比較し診断指標の確立を行った。また、患者群におけるアシルカルニチン比率と新たに設定した臨床重症度スコア (CSS) の相関を統計的に検討した。CSS は過去に横紋筋融解症を示唆する、血清 CK 値 1000 U/L と著明高値を呈したことがあるか、ミオグロビン尿や運動不耐、筋痛など

筋症状を呈したことがあるかなどから算出した。

4. 研究成果

(1) ステアリン酸負荷、オレイン酸負荷ともに、健常者検体では C18 や C18:1 からの代謝が進み産生される C2 の値が高く、正常な酸化の過程を反映していた。患者検体においては C14 や C14:1 以上のアシルカルニチンが高値、C12 や C12:1 以下のアシルカルニチンが低値となった。また両負荷とも産生される C2 も健常対象者と比較して低値になっていた (図 1)。



(2) 13C-ステアリン酸負荷検査での 13C-C2/13C-C18 比と 13C-オレイン酸負荷検査での 13C-C2/13C-C18:1 比による患者識別能を ROC 解析で検討した結果、13C-オレイン酸負荷検査の方がより正確に患者と健常者を識別できることが示された (図 2)。また、13C-ステアリン酸負荷検査における 13C-C2/13C-C18 比および 13C-C12/13C-C14 比、13C-オレイン酸負荷検査における 13C-C2/13C-C18:1 比および 13C-C12:1/13C-C14:1 比の各比は CSS と有意な相関を示し、疾患の重症度を反映すると考えられた (図 3)。一方で、従来の診断方法である酵素活性値と CSS とには有意な相関関係は認めなかった。初回濾紙血 C14:1 は CSS と間に相関関係を認めたが、CSS が 0 点の症例でも C14:1 値にはばらつきが大きく見られた (図 4)。さらに、13C-ステアリン酸負荷検査において 13C-C16/13C-C18 比が 13C-C14/13C-C18 比より高い患者は CSS が有意に高く、より重症であると示唆された (図 5)。

これらの結果は、本検査法が VLCAD 欠損症の臨床的重症度を予測する上で有用であり、重症化リスクを有する患者の同定に使用できることが示唆された。本測定結果をもとに、代謝発作リスクが低いと考えられる患者に対し、過剰な治療や生活制限を回避することで、より効率的な管理を行うことが期待される。

Figure 2

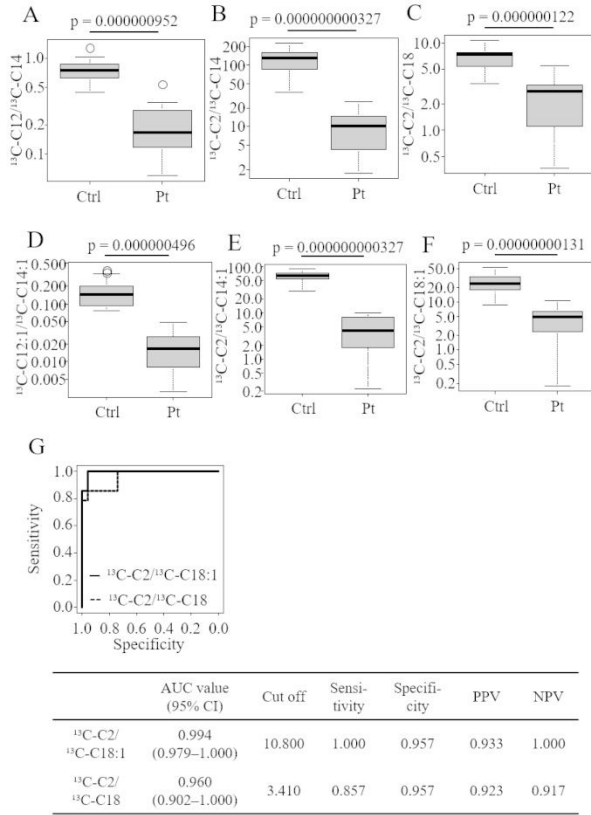


Figure 3

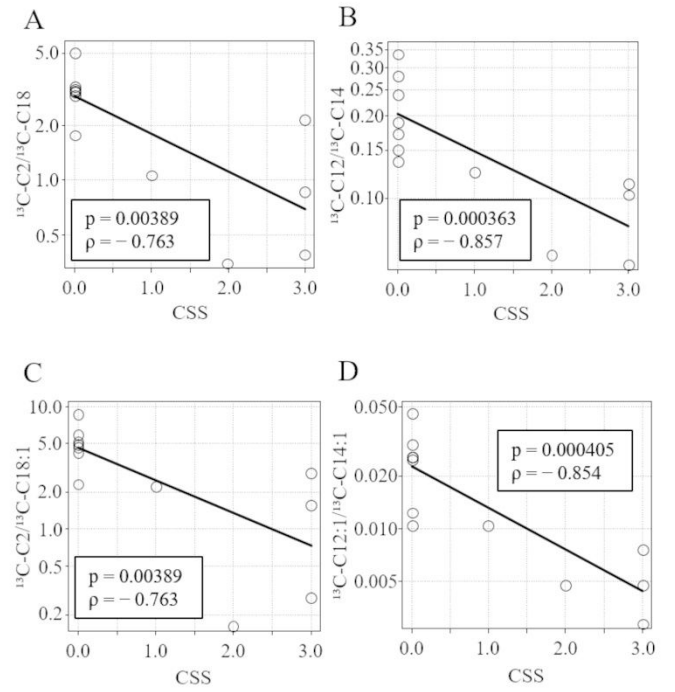


Figure 4

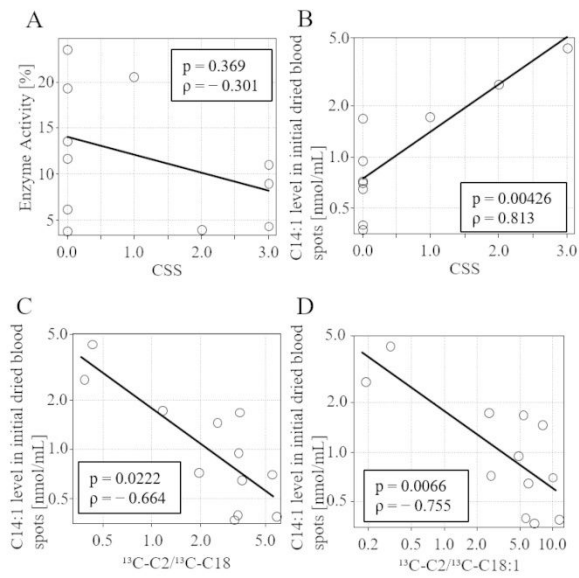
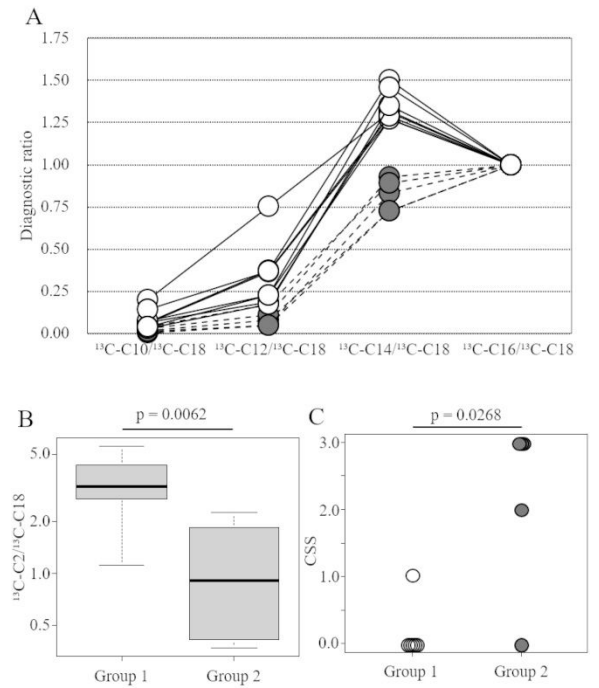


Figure 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sugihara Keiichi, Yuasa Miori, Isozaki Yuko, Hata Ikue, Ohshima Yusei, Hamazaki Takashi, Kakiuchi Toshihiko, Arao Masato, Igarashi Noboru, Kotani Yumiko, Fukuda Tokiko, Kagawa Reiko, Tajima Go, Shigematsu Yosuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Severity estimation of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency via 13C-fatty acid loading test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41390-022-01979-z	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉原 啓一、湯浅 光織、磯崎 由宇子、大嶋 勇成、畑 郁江、重松 陽介
2. 発表標題 末梢血単核球を用いた13C標識脂肪酸負荷検査による極長鎖アシル-CoA脱水素酵素（VLCAD）欠損症の診断・重症度判定
3. 学会等名 第48回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Diagnosis and Severity Estimation of VLCAD Deficiency by [U-13C] Fatty Acid Load Test
2. 発表標題 Keiichi Sugihara, Miori Yuasa, Yuko Isozaki, Ikue Hata, Yusei Ohshima, Yosuke Shigematsu
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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