

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08498

研究課題名(和文) アデニル酸シクラーゼ活性量変動を用いた神経調節性失神患者の診断と治療効果

研究課題名(英文) Diagnosis and therapeutic effect of neurally mediated syncope (NMS) using fluctuation of adenylylase activity

研究代表者

小見山 智義 (Komiyama, Tomoyoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60439685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はアデニル酸シクラーゼ(AC)活性量の変化からNMS発症原因を解明し予防と再発防止を目的とした。血管抑制型(VT)と混合型(MT)の患者では、健康者と比較して安静時のAC活性量に違いが見られた。特にVT患者では有意に高値を示したが、高分解能ホルター心電図調査では変化はなかった。またチルト試験ではVT患者と健康者間では血圧とAC活性量に有意な違いが見られた。さらに、VTとMT患者の2B-AR遺伝子のグルタミン酸(Glu12、Glu9)多型別では、AC活性量の違いから失神を起こす時間に違いが確認された。以上の結果からAC活性量を調査することでNMSの診断と予防に用いることができると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未来に向けた超高速旅客機、リニアモーターカーや宇宙ステーション作業時のストレスへの操縦者の適正をみる点でも意義がある。また、今後我が国で予想される大規模災害時のストレスに対する医療マネジメントの標準化の指標にも役立つ。さらに、機序が明らかになることで、これまでになかった治療薬を開発できる可能性もある。失神自体は意識を失うがすぐに回復するため軽く見られがちだが、このストレス社会でバス・列車・長距離トラックの運転手や航空機の操縦者が一端おこすと、多くの人たちを巻き込む事故につながるため操縦適正者の選抜にも役立つ。以上からNMS診断と発症予防・再発リスク評価に大いに役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the causes of Neurally Mediated Syncope (NMS) using changes in adenylylase (AC) activity, and to help prevent and prevent recurrence. Patients with vasodepressor (VT) and mixed (MT) types differed in the amount of AC activity compared with healthy subjects. In particular, VT showed significantly higher values, therefore high-resolution Holter electrocardiographic (ECG) examinations showed no change. The tilt test showed significant differences in blood pressure and AC activity between VT patients and healthy volunteers. In addition, glutamic acid (Glu12, Glu9) polymorphisms of the 2B-AR gene in VT and MT patients showed differences in the timing of syncope due to differences in AC activity levels. From these results, examining of the amount of AC activity could potentially be used for the diagnosis and prevention of NMS.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：神経調節性失神 アデニル酸シクラーゼ活性量 ヘッドアップチルト試験 アドレナリン受容体 高分解能ホルター心電図 自律神経変動 カテコラミン NMS診断

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

近年は高齢者ドライバーによる交通事故が連日報道されている。しかし高齢者ドライバーに限らず失神による事故も無視することができない。ふらつきや目の前が暗くなる程度の“前失神”まで含めると数多くの方が経験したことのある疾患である。NMS 失神は厄介なことに意識消失を頻回に発症するが、診察時には回復しているのが通常で原因不明とされる。この原因不明の失神の約 20%は NMS と考えられている。我々のグループでは、これまでにアドレナリン受容体遺伝子(ADR- α 2B) 多型解析で Gi α -タンパク質共役受容体 (GPCR)における結合エネルギーの違いから、血管収縮に関与する AC 活性への抑制時間が NMS 発症との関連性があることを報告した。さらに、ヘッドアップチルト試験 (HUT) を行うことで、血管平滑筋収縮機能に深く関わる AC 活性量を調査したところ血中活性量が健常者に比べ大きく異なり発症予防と治療に役立つ可能性があることを見出した。本申請では、これらのデータの統計的信頼性を高めるために新たに 100 名の NMS 患者と 50 名の健常者を調査することで、健常者内に潜む外見では診断できない NMS 失神の診断・治療法の開発を行う。また、患者の問診よりカフェインの摂取量と NMS 発症の関連性も確認されたことから、カフェインを用いた治療効果についても調査したい。本研究の成果は、医療の現場で役立ち、社会医学に強く貢献できる可能性が高いと考える。

2. 研究の目的

NMS の予防と再発リスクを評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 問診と診察によるスクリーニング：

NMS の可能性を判断された被験者は、インフォームドコンセントをとり理解と同意を得る。また被験者は脳や心臓に障害がない方を対象とした。NMS の基準は、日本循環器学会ガイドラインと Moya, A, et al. (2009)を参考にした。調査人数 150 名(NMS 患者 100 名、健常者 50 名)の HUT 試験を用い、ストレス負荷時における臨床疫学試験から検討を行い、心電図、血圧、脈拍の定量化を行う。

*NMS 患者は、本院で 3 年間に約 120 名が HUT 試験を行っており、研究期間内で患者 100 名は十分可能な人数である。健常者は AC 活性量の標準値を決めるために必要である。

(2) 臨床試験： ヘッドアップチルト (HUT) 試験による診断 図 1 参照

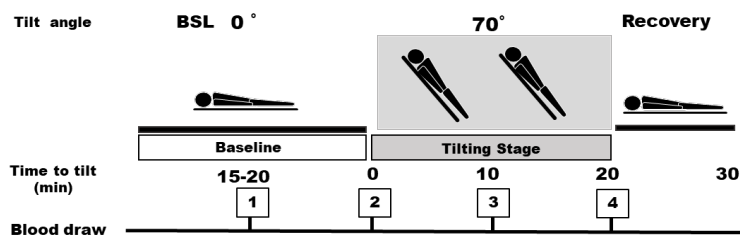


図 1. ヘッドアップチルト試験と採血の回数

- ① NMS 患者さんは試験前日入院。朝食を抜いた状態で検査。
- ② チルトテーブルにて仰臥位で安静 (15 分以上)。
- ③ チルトテーブルは 70 度ヘッドアップ状態で採血 (8ml) し、血圧と脈拍を測定。10 分後と 20 分後に採血 (8ml) と血圧、脈拍の計測 (1 分毎)。
- (3) AC 活性量の測定： HUT4 点 (図 1) で採血したリンパ球を用いる。
 - ① リンパ球の調製： 1) EDTA 採血 2) バキュテイナ単核球分離用採血管 3) 遠心分離しリンパ球層を回収 4) RPMI1640 で洗浄し血小板を除く 5) 細胞数カウント (10,000 個)
 - ② Assay に加える試薬の濃度調整： アドレナリン、イソプロテレノール、フォルスコリンをそれぞれリンパ球へ投与する。テスト試薬は 30 分間反応。
 - ③ AC 活性量の測定： キットは Promega cAMP-Glo Assay を使用し GloMAX で計測を行う。

(4) 高分解能ホルター心電計測定

ホルター心電図検査 (Ela Medical 社) では携帯用の小型心電計を用いて、24 時間にわたり心電図を記録する。この心電図の解析を通して日常生活(食事中、運動時、排便中、安静時、夜中、朝方)における心臓の動き(拍動)を調べ、異常がないかを検査する。特に心停止を伴う混合型、心抑制型のタイプの NMS の診断には有効である。日内変動観察のための周期との分散分析を行う。

(5) カフェイン摂取量との NMS 発症との関係

興味深いことに、コーヒー、緑茶等の摂取量の違いが NMS の発症頻度と関係している可能性が見えてきた。そこで、カフェイン摂取量(約 100ml 規定カップ 2~3 杯/1 日)との関係について、発症の防止に役立つか調査を行う。コーヒーおよび緑茶は、事前にカフェイン濃度を確認した既製品を使用する。さらに摂取前後の血中のカフェイン濃度および AC 活性量を確認する。また、コーヒー・緑茶のカフェイン含量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定を行う。

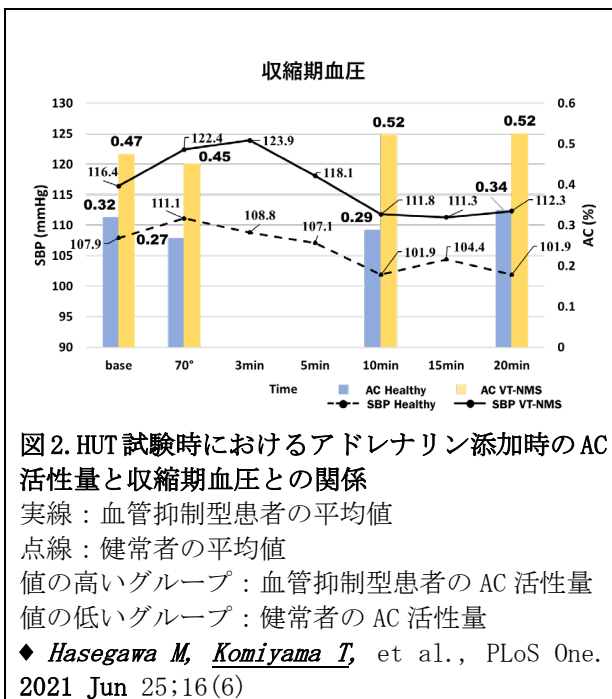
(6) 全カテコラミン各受容体遺伝子内の発症原因となるマーカーの探索

シークエンスには ABI Prism 3730xl DNA sequencer と MiSeq (Illumina) を使用する。各プライマーを設計しシークエンスを行い配列の決定を行う。各配列決定には ATCG software (Genetyx) を使用する。遺伝子実験の詳細については Komiyama, et al., (2015) を参考に実施する。各変異遺伝子に関しては遺伝子発現解析も実施する。また Gi, Gs による AC 活性の反応が血管平滑筋収縮に影響するため、Gi, Gs サブユニットも遺伝子解析を行う。

4. 研究成果

(1) 自律神経系の検査—HUT 試験および高分解能ホルター検査

4 5 名の血管抑制型 (VT-NMS) 患者を対象に HUT 試験 (血圧、脈拍数、AC 活性量) と高分解能ホルター心電図の調査を行った。この結果から男女差および年齢差は見られなかった。また高分解能ホルター心電図では、VT-NMS 患者の心電図検査中の自律神経変動に変化はなかった。そして HUT 試験では、VT-NMS 患者と健常者の間では血圧と AC 活性量では有意に高い値を認めた。VT-NMS 患者の収縮期血圧は立位 5 分後に低下し、10 分後では AC 活性量が最も高く、収縮期血圧が最も低下したことが確認できた。そして脈拍数は立位 10 分後に増加した (図 2)。



(2) NMS 発症と AC 活性量と関連分析

血管抑制型と混合型の患者では健常者と比較して AC 活性量に違いがあることが確認された。血管抑制型では健常者と比較して有意に高い値をしめし、混合型では健常者よりも低い値を示すことが分かった。このように AC 活性量を検査することで NMS の診断に利用できる可能性がある (図 2)。

(3) カフェイン摂取量と NMS 発症関連調査

毎月 1 回の“ふらつき”か“NMS 失神”を起こしていた 38 歳女性に、毎日ドリップコーヒー 1 杯 (150ml ; カフェイン量 135mg) 程度のコーヒーを半年間飲んでもらった。その間 1 回程度のふらつきしか起こらなかった。しかし、コーヒーの摂取を止めた後には数回のふらつきがあり、NMS を発症し倒れてしまった。また、毎日コーヒーを 5-6 杯飲んでた 63 歳男性では、コーヒー摂取量を 1-2 杯に控えてもらったところ、10 ヶ月間 1 回のふらつきのみで失神は起こらなかった。このようにコーヒーや緑茶などのカフェイン摂取量をすることで NMS 発症を抑える効果が期待される (表 1)。

患者	年齢	性別	コーヒーの摂取量と NMS の症状
NMS 1	36	男性	頻繁に飲んでいて、コーヒーを止めた3ヶ月後に NMS を発症。
NMS 2	46	女性	毎朝コーヒーを飲んでいて、飲むのを止めたら NMS を発症。
NMS 3	27	女性	1日3~4杯のコーヒーを飲むのを止めたら NMS を発症。
NMS 4	73	女性	コーヒーとお茶を止めてから、NMS を発症した。

表1. 聞き取り調査による NMS 患者とコーヒー摂取量について

(4) 全カテコラミン受容体遺伝子変異解析

今回の研究では、次世代シーケンスを用いた全カテコラミン受容体遺伝子変異解析を行った。現在解析途中である。そこで、カテコラミン受容体遺伝子の一つである $\alpha 2B$ -AR 遺伝子のグルタミン酸 (Glu) リピート多型部位に注目し、患者および健常者の配列について解析を行った。

その結果、血管抑制型と混合型の患者では Glu12/12:ホモ型、Glu9/12:ヘテロ型では、それぞれ失神を起こすタイミングに違いが見られた。特に、HUT 試験において、ホモ型では4点 (Base, 70度, 10分, 20分) の AC 活性量の測定結果がいずれも有意差を認めた (表2)。しかし、ヘテロ型では、HUT 試験開始から10分のみ有意差を認めた。このことから血管抑制型の患者ではホモ型、ヘテロ型とでは失神を起こす状況が異なる可能性を示唆した。

	Glu 12/12			Glu 9/12		
	VT-NMS n=18	Control n=10	p-value	VT-NMS n=20	Control n=6	p-value
HUT試験						
Base	0.68±0.17	0.52±0.11	p=0.004	0.62±0.19	0.55±0.11	p=0.17
70度	0.68±0.19	0.49±0.13	p=0.003	0.57±0.16	0.52±0.13	p=0.22
10分	0.69±0.20	0.51±0.14	p=0.006	0.64±0.21	0.51±0.09	p=0.02
20分	0.68±0.22	0.52±0.16	p=0.017	0.59±0.19	0.56±0.11	p=0.17

表2. ヘッドアップチルト試験中における Glu リピート数による AC 活性量の違い

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ayabe Kengo, Komiyama Tomoyoshi, Hasegawa Misaki, Sakai Tetsuri, Morise Masahiro, Sakama Susumu, Yagishita Atsuhiko, Amino Mari, Ikari Yuji, Yoshioka Koichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Significance of the Head-Up Tilt Test in Improving Prognosis in Patients with Possible Neurally Mediated Syncope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 919 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10090919	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 Hasegawa Misaki, Komiyama Tomoyoshi, Ayabe Kengo, Sakama Susumu, Sakai Tetsuri, Lee Kyong Hee, Morise Masahiro, Yagishita Atsuhiko, Amino Mari, Sasaki Ayumi, Nagata Eiichiro, Kobayashi Hiroyuki, Yoshioka Koichiro, Ikari Yuji	4. 巻 16
2. 論文標題 Diagnosis and prevention of the vasodepressor type of neurally mediated syncope in Japanese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0251450	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 Murakami Tsutomu, Komiyama Tomoyoshi, Matsumoto Shingo, Kajiwara Hiroshi, Kobayashi Hiroyuki, Ikari Yuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Examination of gender differences in patients with takotsubo syndrome according to left ventricular biopsy: two case reports	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	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) 10.1186/s13256-021-02856-9	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 Komiyama Tomoyoshi, Yoshikawa Masanobu, Yokoyama Keiko, Kobayashi Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of the source of aggressiveness in gamecocks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63961-1	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 Murakami Tsutomu, Komiyama Tomoyoshi, Kobayashi Hiroyuki, Ikari Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Gender Differences in Takotsubo Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 653 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology11050653	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 Komiyama Tomoyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of Genetic Mutation Sites in ADR Genes on Modern Chickens Produced and Domesticated by Artificial Selection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology12020169	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 綾部健吾, 小見山智義, 長谷川実咲, 酒井哲理, 坂間 晋, 柳下敦彦, 網野真理, 吉岡公一郎
2. 発表標題 中年以降で神経調節性失神が疑われる患者におけるヘッドアップチルト検査の有用性
3. 学会等名 第58回 日本臨床生理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小見山智義, 坂間 晋, 綾部健吾, 長谷川美咲, 永田栄一郎, 吉岡公一郎, 小林広幸
2. 発表標題 HUT試験時におけるNMS患者のアデニル酸シクラーゼ活性量とグルタミン酸リピート数多型の関係
3. 学会等名 第59回 日本臨床生理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山延喜, 松田晋一, 池上真理子, 宮下好洋, 重松枝里, 小見山智義
2. 発表標題 小児期起立性調節障害患者のアデニル酸シクラーゼ活性量の変動について
3. 学会等名 第59回 日本臨床生理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川実咲, 小見山智義, 綾部健吾, 坂間晋, 柳下敦彦, 網野真理, 小林広幸, 永田栄一郎, 吉岡公一郎, 伊苅裕二
2. 発表標題 神経調節性失神(血管抑制型)患者の診断と予防
3. 学会等名 第59回 日本臨床生理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山延喜, 松田晋一, 池上真理子, 宮下好洋, 小見山智義
2. 発表標題 起立性調節障害におけるアデニル酸シクラーゼ活性量の検討
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会円演題抄録
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0155205 ORCID iD https://orcid.org/0000-0003-2138-0084 東海大学医学部 臨床薬理学 https://www.cp-tokai.com/staff/ biology : Special Issue https://www.mdpi.com/journal/biology/special_issues/DOBOPC https://www.mdpi.com/journal/biology/special_issues/ZR1JMC40P8
--

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
研究分担者	吉岡 公一郎 (Yoshioka Koichiro) (30246087)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	永田 栄一郎 (Nagata Eiichiro) (00255457)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	小林 広幸 (Kobayashi Hiroyuki) (60195807)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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