

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860490

研究課題名(和文) Metabolic Autopsyを用いた新しい法医診断学の確立

研究課題名(英文) Metabolic autopsy; The new approach to sudden unexpected death

## 研究代表者

山本 琢磨 (YAMAMOTO, Takuma)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：50634458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児突然死における代謝疾患について検討を行った。次世代シーケンサーにより遺伝子解析を行ったところ、乳幼児突然死症例に多く見られる遺伝子変異を見いだした。ミトコンドリア疾患のモデルマウスに対するBezafibrate投与による症状改善のメカニズムを検討した。今回の研究では、Metabolic Autopsyの手法を用いることで代謝疾患と突然死との関連を見いだした。

研究成果の概要(英文)：First we performed genetic analysis to sudden unexpected death in infancy cases. With using next generation sequencer, we found a genetic variant which is often detected in sudden unexpected death in infancy cases. Second we investigated the mechanism of Bezafibrate treatment to mitochondrial disorder model mouse. In the present study we found the relationship between sudden unexpected death in infancy and metabolic diseases.

研究分野：法医学

キーワード：Metabolic autopsy sudden unexpected death SIDS 突然死

### 1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死は、一見健康そうな乳幼児が何の前触れもなく死亡するものであり、残念ながら、本邦でも今なお多数の乳幼児が亡くなっている。予測不可能なため遺族には悲嘆反応が生じ、その悲しみを少しでも和らげるための手法として死因究明が重要視されている。しかし、ほとんどの場合通常の解剖を行っても死因を解明できず、従って現時点ではその予防も不可能である。

我々は乳幼児突然死の原因として先天性代謝異常症に着目し、解剖時の血液・尿中の代謝産物測定、代謝酵素の DNA 配列解析など代謝疾患に焦点を当てた Metabolic Autopsy の手法を提唱し、脂肪酸代謝異常症を診断した。脂肪酸代謝異常症は Metabolic Autopsy を用いなければ診断できず、さらにスクリーニングの施行により生前にその診断は可能であり、死を予防しえたことを喚起してその重要性を提唱した (Yamamoto et al. *Mol Genet Metab*, 2011)。

また、ミトコンドリア呼吸鎖異常症は先天性代謝異常症の中で最も頻度の高い疾患であるが、13 例の乳幼児突然死を対象に酵素活性測定を行ったところ、2 例がこの疾患であることを明らかにした。このことは、乳幼児突然死例では、ミトコンドリア呼吸鎖異常症を対象にした Metabolic Autopsy の施行が死因究明に極めて有用であることを意味している (Yamamoto, Emoto et al., *Mol Genet Metab* 2012)。

さらに、乳幼児突然死の遺伝多型についても検討し、乳幼児突然死症例には先天性代謝異常症の原因遺伝子の一つである *Carnitine Palmitoyltransferase 2 (CPT2)* 遺伝子の F352C 多型が多く存在することを報告した (2012 年ドイツ法医学会)。

### 2. 研究の目的

乳幼児突然死は、一見健康そうな乳幼児が何の前触れもなく死亡するものであり、今なお多くの乳幼児が亡くなっている。しかし、ほとんどの場合通常の解剖を行っても死因を解明できず、従って現時点ではその予防も残念ながら不可能である。そこで我々は従来の解剖手法に加え新たに、血液・尿中の代謝産物測定、代謝酵素の DNA 配列解析など代謝疾患に焦点を当てた Metabolic Autopsy の手法を用い、乳幼児突然死症例における先天性代謝異常症の関与を検討したい。さらに診断から治療・予防へと還元し、早期診断早期治療により突然死自体を予防し、「避けられる死」を提唱したい。

### 3. 研究の方法

-脂肪酸代謝異常症について-

#### (1)対象

長崎大学医学部にて解析した 1 歳未満の突然死症例 60 検体。解剖時に採取された心臓血および心臓血より抽出し-30 で保管さ

れた DNA。

#### (2)遺伝子変異解析

脂肪酸代謝異常症の原因遺伝子の中から 16 種類 (*ACSL1, SCL22A5, CPT1, CPT2, SCL25A20, ACADVL, ACADM, ACADS, ETFA, ETFB, ETFDH, DECR1, HADH, HADHA, HADHB, ECHS1*)、ミトコンドリア呼吸鎖複合体に關与する遺伝子 (*ACAD9*) の全エクソンを対象とした。TruSeq (Illumine, Japan)、HaloPlex (Agilent Technologies, Japan)により、60 検体のゲノム DNA のターゲット領域をハイブリダイゼーションし、PCR 増幅したものを Miseq (illumine, Japan)によりオートメーションでシーケンスを行った。検出された変異を過去の報告と照合した。一部についてはサンガー法で変異を確認した。

#### (3)血中代謝産物測定

島根大学小児科に依頼し、解剖時採取された心臓血のタンデムマスによる血中アシルカルニチン測定を行った。

-ミトコンドリア疾患について-

#### (1)対象と方法

ミトコンドリア疾患の一つである Leigh 脳症のモデルマウス (*NDUFS4<sup>fkyl/fky</sup>*) に対し *Bezafibrate* を連日経口投与 (0.05%, 0.5%) することにより 0.05% 群で生存率の改善が認められたが、今回はその機序について、ウエスタンブロット法による蛋白質発現を測定することにより検討した。

### 4. 研究成果

-診断：脂肪酸代謝異常症の遺伝子解析-

検出された遺伝子変異の中に病因と報告された Homozygous 変異および 2 種類以上の Heterozygous 変異を持つ症例は認められなかった。従って、今回検討した症例の中に明らかな脂肪酸代謝異常症は認められなかった。

次に遺伝子多型との関連について検討した。過去に疾患との関連が報告されている変異を抽出したところ、表 1 のような結果となった。乳幼児突然死群とコントロール群との統計学的解析を行ったところ、*CPT2* 遺伝子 F352C 変異において、有意差が認められた。*Acyl-CoA Dehydrogenase, Short-Chain (ACADS)* 遺伝子 G209S 変異においては、有意差は認められなかった。

表 1 F352C and G209S allelic frequency

		SUDI	Database	P value
F352C	Wild	36	798	0.007
	Hetero	16	331	
	Homo	8	52	
G209S	Wild	49	928	0.65
	Hetero	11	229	
	Homo	0	15	

また、乳幼児突然死症例の血中アシルカルニチン解析を行ったところ、(図 1a; C18-Acylcarnitine, b; C4-Acylcarnitine)のような結果となった。それぞれのハプロタイプ間で統計学的有意差は認められなかった。

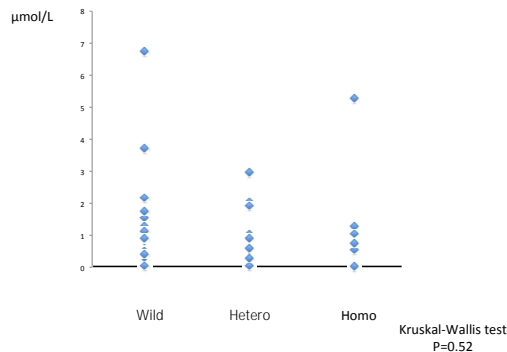


図 1a C18-Acylcarnitine

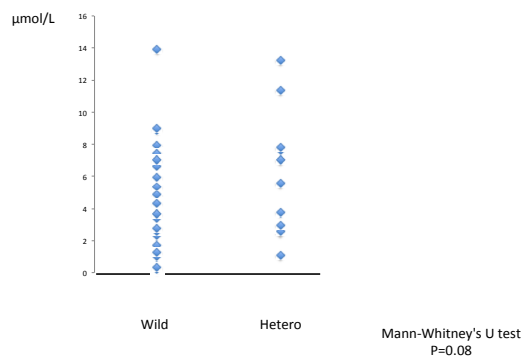


図 1b C4-Acylcarnitine

*Carnitine Palmitoyltransferase2* 遺伝子の F352C 変異は、これまでにインフルエンザ脳症や熱中症の患者に高頻度に認められている。我々も今回の検討で乳幼児突然死症例にも高頻度に認められることを確認した。本変異は高温だけでなくアシドーシス等の負荷時にも活性が低下すると言われており、本変異を持つ児は低酸素・高二酸化炭素等の負荷時に energy crisis に陥りやすい特性を持つ可能性が考えられる。

一方で、short-chain acyl-CoA dehydrogenase(SCAD) をコードする ACADS 遺伝子の G209S 変異も polymorphism ではあるものの SCAD 活性を低下させるとの報告もある。しかし、本検討ではコントロール群と比較し有意差は認められなかった。短鎖脂肪酸代謝異常症は酸化の最終段階であるため、長鎖脂肪酸代謝異常症に比べ症状を呈しにくいことも一つの要因になっているのかもしれない。

脂肪酸代謝異常症では、代謝酵素の活性の低下により前段階の代謝産物が血中に蓄積することから、血中代謝産物の測定によってどの酵素に異常が生じているのかを診断することができる。本研究で検討した、CPTII 欠損症では C18 アシルカルニチンが、SCAD

欠損症では C4 アシルカルニチンが増加すると言われているが、それぞれの遺伝子変異のハプロタイプ間で代謝産物濃度に有意差は認められなかった。死後の血中代謝産物解析では、死後変化により長鎖アシルカルニチンが分解し減少することが知られており、energy crisis 発症から死亡に至る際の代謝産物濃度を正確に反映していない可能性も考えられる。

－疾患予防：ミトコンドリア疾患について－  
ミトコンドリア疾患の一つである Leigh 脳症のモデルマウス (NDUFS4<sup>flky/flky</sup>) に対し Bezafibrate を連日経口投与したところ、0.05%群で生存率の改善が認められることが知られている。そこで、Bezafibrate 投与群・非投与群について、ミトコンドリア関連蛋白質の発現について検討したところ、図 2 のようになった。心臓・肝臓では Bezafibrate 投与により複合体 I の発現が増加したが、生存率との関連は認められなかった。筋肉・脳では一定の傾向は認められなかった。

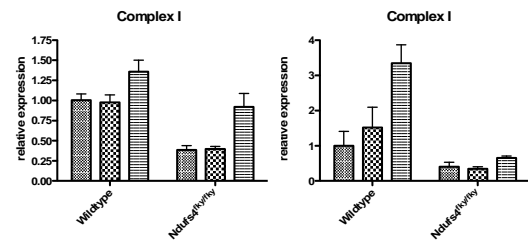


図 2a Heart

図 2b Liver

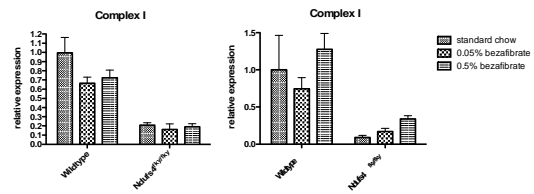


図 2c Muscle

図 2d Brain

今回の検討で、機序は明らかにならなかったが、Bezafibrate 投与によりミトコンドリア疾患の予後が改善する可能性が報告されている。実際にミトコンドリア疾患を持つ突然死症例も存在するため、早期発見・早期治療介入により突然死を予防することができると考えられる。

今回の研究では、Metabolic Autopsy の手法を用いることで代謝疾患と突然死との関連を見いだした。従来 of 形態的变化に頼る解剖手法では解明できなかった新たな知見を見いだすことができたものとする。さらに、薬物投与により早期治療・予防も可能であり、突然死自体の回避へと繋がる可能性が期待される。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Yamamoto T, Tanaka H, Emoto Y, Umehara T, Fukahori Y, Kuriu Y, Matoba R, Ikematsu K. Carnitine palmitoyltransferase 2 gene polymorphism is a genetic risk factor for sudden unexpected death in infancy. Brain Dev 36:479-483, 2014 査読あり

深堀友希, 梅原敬弘, 山本琢磨, 的場梁次, 池松和哉 次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャネル遺伝子解析 DNA 多型 22 巻 201-202 2014 年 査読なし

〔学会発表〕(計8件)

深堀友希, 梅原敬弘, 山本琢磨, 的場梁次, 池松和哉 次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャネル遺伝子解析, 日本DNA多型第22回学術集会 2013年11月21日-22日 宮城県仙台市

深堀友希, 梅原敬弘, 山本琢磨, 的場梁次, 池松和哉 次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャネル遺伝子解析, 第63回日本九州地方会 2013年10月18日-19日 福岡県福岡市

深堀友希, 梅原敬弘, 山本琢磨, 的場梁次, 池松和哉 次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャネル遺伝子解析, 第20回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会 2014年3月7日-8日 埼玉県さいたま市

Takuma Yamamoto, Jasper C Komen, Alysha Eibl-Geldart, Bi-Xia Ke, Adrienne Laskowski, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, David R Thorburn Bezafibrate treatment of an OXPHOS disorder mouse model of Leigh Syndrome 9<sup>th</sup> ISALM 2014年6月16日-20日 福岡県福岡市

Yuki Fukahori, Takahiro Umehara, Takuma Yamamoto, Ryoji Matoba, Kazuya Ikematsu Comprehensive analysis of cardiac ion channel gene of sudden infant death cases utilizing the next generation sequencer 9<sup>th</sup> ISALM 2014年6月16日-20日 福岡県福岡市

山本琢磨, 梅原敬弘, 深堀友希, 村瀬壮彦, 池松和哉 脂肪酸代謝異常症からみた乳幼児突然死症例の遺伝子解析, 第64回日本法医学学会九州地方会 2014年10月10日-11日 鹿児島県鹿児島市

山本琢磨, 梅原敬弘, 深堀友希, 村瀬壮彦, 池松和哉 脂肪酸代謝異常症からみた乳幼児突然死症例の遺伝子解析 日本DNA多型第23回学術集会 2014年11月27日-28日 愛知県名古屋市

山本琢磨, 石川泰輔, 深堀友希, 梅原敬弘, 村瀬壮彦, 蒔田直昌, 池松和哉 不整脈が原因と疑われた乳幼児突然死の一症例 第21回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会 2015年3月6日-7日 長野県松本市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 琢磨 (YAMAMOTO, Takuma)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 50634458

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し