

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870379

研究課題名(和文) 本当に重症型グルタル酸血症2型にベザフィブラートは無効か？

研究課題名(英文) Efficacy of Bezafibrate for severe form of glutaric acidemia type 2

研究代表者

山田 健治 (Yamada, Kenji)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70624930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ベザフィブラート(BEZ)は脂肪酸代謝異常症への有効性が報告されているが、新生児期に発症する重症型には無効と考えられてきた。本研究ではグルタル酸血症2型の患者由来の皮膚線維芽細胞を用いたin vitro probe assayでBEZの有効性を評価した。

結果は、合併奇形をもち出生直後から心不全を呈する患者には低濃度BEZは無効であった。高濃度BEZの有効性は本研究法では判定できなかった。一方、それ以外の重症度では、低濃度BEZでも有効であった。

合併奇形がなく、新生児期に心不全などの重篤な症状を呈さない症例には、新生児発症の重症型GA2であってもBEZは臨床的に有効かもしれない。

研究成果の概要(英文)：Bezafibrate (BEZ) was reported as a drug for mild form of fatty acid oxidation disorders, but was considered not effective for severe (neonatal-onset) form. In this study, we investigated the efficacy of BEZ for fibroblasts derived from various form of glutaric acidemia type 2 (GA2) using in vitro probe (IVP) assay.

Low-dose BEZ was not effective for severest form of GA2 in which polycystic kidney, Potter's face, and severe cardiomyopathy was seen soon after birth. By contrast, low-dose BEZ was effective for neonatal-onset form without anomaly and cardiomyopathy. Moreover, good response to low-dose BEZ was observed in milder form which is onset after infancy. By the way, high-dose BEZ can not be evaluated using IVP assay due to precision of analysis

BEZ may be clinically effective even for neonatal-onset form of GA2 if the patient has no anomaly and cardiomyopathy.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ベザフィブラート 脂肪酸代謝異常症 グルタル酸血症2型 in vitro probe assay

1. 研究開始当初の背景

(1) グルタル酸血症 2 型 (GA2) は、ミトコンドリア 酸化異常症 (FAOD) のひとつで、電子伝達フラビン蛋白 (ETF) または ETF 脱水素酵素の先天的欠損により、飢餓時や発熱、嘔吐・下痢などの際にエネルギー不足に陥り重篤な低血糖や脳症、時に突然死などを呈する先天代謝異常症である。本邦では 30 万出生に 1 人の発見頻度と言われ、非常に稀な疾患ではあるが、根本的な治療がなく、対症療法や生活指導が中心となる。新生児発症型 (重症型) と遅発型 (軽症型) に分類され、重症型は致死的で集中治療を行っても救命すら難しい¹⁾。

(2) 近年、高脂血症薬の治療薬であるベザフィブラート (BEZ) が種々の軽症型 FAOD に対して有効と報告された²⁾。これは活性がわずかに残った酵素の発現を BEZ が増やすことで酸化能を改善させると考えられている。したがって、もともと酵素活性が全くない重症型 FAOD に対しては、発現を増やしても無効と考えられてきた。そのため、BEZ の適応拡大の治験においても、重症型 FAOD は対象外であった。

(3) 一方で、FAOD の 1 つである GA2 に対しては BEZ の有効性を評価した研究報告はほとんどなく、重症型 GA2 に対する有効性も分かっていない。

2. 研究の目的

(1) GA2 は複数の酸化に関わる酵素が障害される疾患で、単一酵素が障害される他の FAOD に比べると特殊な病態である。BEZ は多数の酸化系酵素を誘導させると考えられており、重症型 GA2 であっても効果が期待出来る可能性がある。本研究の主たる目的は、GA2 患者の皮膚線維芽細胞を用いて、BEZ の有効性を評価することである。

(2) GA2 に対する BEZ の有効性は in vitro probe assay (IVP アッセイ) と呼ばれる特殊な酵素診断法を主に用いる。また、BEZ が有効な症例の臨床的特徴を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) IVP アッセイによる脂肪酸代謝能の評価
IVP アッセイとはグルコースが添加されていない特殊な環境下で皮膚線維芽細胞を培養し、基質として添加した脂肪酸がどの程度代謝されたのか、タンデムマス分析計を用いて評価する方法である³⁾。本研究では炭素数 16 の脂肪酸 (パルミチン酸) を基質として添加し、パルミチン酸に対応するパルミトイルカルニチン (C16) が減少し、エネルギー源であるアセチルカルニチン (C2) が増えれば、BEZ が有効と判断した。

本研究では様々な重症度の GA2 患者から採取した皮膚線維芽細胞を対象とした。重症度は合併奇形をもつ新生児発症型 (胎児型)、合併奇形のない新生児発症型 (新生児型)、乳幼児期発症型 (中間型)、筋症状を主体とした思春期～成人期発症型 (筋型) の 4 つに分類した。

IVP アッセイを応用して、BEZ を 0-800 μM の濃度で添加し、96 時間培養後の C16 の変化から、BEZ の有効性を評価した。

(2) MTT アッセイによる BEZ の細胞毒性の評価

MTT は生細胞に添加すると色素が変わる物質である。MTT アッセイは、MTT を加えた細胞溶液の吸光度の変化から細胞の生存能力を評価する方法である。GA2 以外にも種々の脂肪酸代謝異常症患者由来の皮膚線維芽細胞に様々な濃度の BEZ を添加し、96 時間後の細胞生存能力を評価した。

(3) BEZ の有効性と臨床的特徴

IVP アッセイで BEZ が有効と判定した患者の臨床的な特徴を後方視的に検討した。

4. 研究成果

(1) IVP アッセイによる脂肪酸代謝能の評価

様々な重症度の GA2 患者由来の皮膚線維芽細胞に BEZ を加えて IVP アッセイによる脂肪酸代謝能の変化を評価した所、以下の結果を得た。

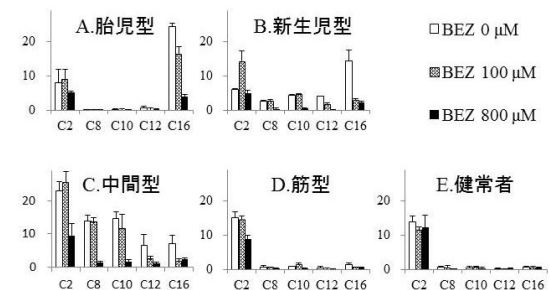


図1 様々な重症型GA2に対するBEZの反応

図 1-A に示す通り、胎児型では低濃度 (100 μM) BEZ では C16 の低下はなかったが、高濃度 (800 μM) BEZ では C16 は有意に低下した。一見すると最重症の胎児型 GA2 に対して高濃度 BEZ は有効ではないか、と考えられたが、エネルギー産生を示す C2 は上昇していない。したがって、高濃度 BEZ が脂肪酸代謝を改善させ、エネルギー産生が増加したとは考えにくい。他の重症度でも高濃度 BEZ では C16、C2 以外のアシルカルニチンも低下しており、高濃度 BEZ はアシルカルニチンの生成を抑制している可能性がある。また、脂肪酸代謝能が改善したのであれば、IVP アッセイの結果が BEZ の添加によって、より軽症のプロファイルに変遷すると考えられるが、そのような変化は認められなかった。以上のことから、

胎児型 GA2 には高濃度 BEZ であっても無効である可能性が高いが、IVP アッセイでは評価が難しいと考えられた。高濃度 BEZ に対する反応性の評価には、IVP アッセイ以外の分析方法が必要であることが分かった。

一方で、胎児型以外の重症度、つまり新生児型、中間型、筋型では低濃度 BEZ の投与によって著明に C16 が低下し、胎児型とは違う反応が得られた。しかし、高濃度 BEZ は胎児型と同様に全体的なアシルカルニチンの低下が認められた。

各病型を詳細に見ていくと、図 1-B に示す通り、新生児型では低濃度 BEZ によって著明な C16 の低下ならびに C2 の上昇が認められた。つまり、新生児期に発症する GA2 であっても、合併奇形がない場合は BEZ が有効である可能性が高いと推測された。

中間型は図 1-C の通り、低濃度 BEZ によって著明に C16 は低下したが、他の C10 や C8 といったアシルカルニチンはあまり低下しなかった。しかし、見かけ上はわずかではあるが、有意に C2 が上昇しており、低濃度 BEZ は中間型にも有用であると考えられた。

筋型は BEZ 投与前の IVP アッセイのプロファイルが健常者と類似しており、元々 C16 の蓄積はわずかである。そのため、BEZ 投与後の C16 の変化は一見すると分かりにくい(図 1-D)。しかし、低濃度 BEZ によって統計学的には C16 は有意に低下していた。

以上の IVP アッセイ結果をまとめると、新生児期に合併奇形のある胎児型以外は低濃度 BEZ に反応があり、脂肪酸代謝能が改善したことが分かった。しかし、筋型の評価や高濃度 BEZ の評価は IVP アッセイでは分かりにくいことも判明した。

(2) MTT アッセイによる BEZ の細胞毒性の評価

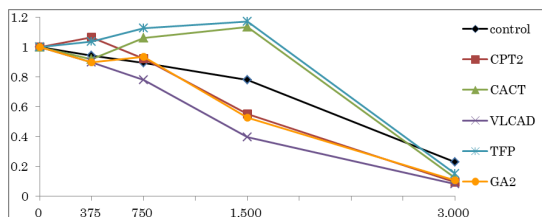


図 2 MTT アッセイによる BEZ の細胞毒性

0~3000 μM まで BEZ 濃度を变化させ、種々の脂肪酸代謝異常症患者由来の皮膚線維芽細胞の生存能力を評価した。上図に示す通り、今回高濃度と設定した 800 μM 近くの濃度でも GA2 患者由来の細胞の生存活性は 90% 以上あり、生存能力は障害されなかった。本研究の IVP アッセイで用いた BEZ 濃度は 0~800 μM であり、この濃度内であれば、患者由来の皮膚線維芽細胞の生存能力を障害することなく in vitro の実験が行えるということである。逆に言えば、800 μM 以上の BEZ 濃度は強い細胞毒性を示すことも明らかになった。

また、TFP (ミトコンドリア三頭酵素) 欠

損症や CACT (カルニチン・アシルカルニチン トランスポーター) 欠損症といった GA2 以外の脂肪酸代謝異常症では、1500 μM という異常高濃度でも細胞の生存能力は維持されたが、他の疾患では GA2 と同様に 1500 μM 以上の BEZ 濃度では強い細胞傷害を示した。

(3) BEZ の有効性と臨床的特徴

胎児型 3 例、新生児型 3 例、中間型 4 例、筋型 2 例を評価したが、IVP アッセイ上は胎児型 3 例を除いて、いずれも BEZ に良好な反応性を呈した。

BEZ が無効な胎児型 3 例については、いずれも多嚢胞腎やポッター顔貌といった合併奇形があり、出生直後から心不全や呼吸障害が見られ、全例生後 1 ヶ月以内で亡くなった。一方、BEZ が有効な新生児型はいずれも合併奇形はなく、出生直後 (生後 1 日以内) に発症したものの、心不全や呼吸障害などの重篤な症状は認められなかった。いずれも急性期治療 (輸液など) によって一旦、新生児期の代謝不全状態を脱しているが、1 例は生後 2 ヶ月時に突然死を、2 例は胃腸炎や RS ウィルスなどの感染症罹患を契機に人工呼吸器管理となり、徐々に心不全や呼吸不全が進行し、それぞれ 1 歳、2 歳で亡くなった。つまり、新生児期に発症する GA2 であっても、合併奇形がなく、急性期の代謝不全状態を乗り越えられる症例については BEZ が有効である可能性が示された。

中間型は乳児期以降に発症した症例である。4 例のうち 2 例は兄弟例で、弟は出生前診断され嚴重に管理されていたが、兄弟ともに徐々に代謝不全が進行し、3 歳で亡くなった。残りの 2 例は、兄の突然死を契機に乳児期に GA2 と診断された 1 例と新生児マスクリーニングによって未発症で診断された 1 例である。いずれも軽度の筋力障害や軽い代謝性発作はあったが、現在も存命である。筋型は思春期以降に筋症状として発症するもので、今回の 2 例は発作的に筋肉痛や筋力低下を認めるが、知的には問題ない。中間型、筋型のいずれも IVP アッセイでは有効例と判定された。

遺伝子異常については、日本人 GA2 には common mutation がなく、特定の遺伝子変異と BEZ の有効性との関連性は評価出来なかった。

上記を総合的に考えると、出生直後から発症する新生児発症型のうち、多発奇形や心不全などの重篤な合併症のない症例には BEZ を試してみる価値があると考えられる。また、乳児期早期に発症し、時に死亡してしまうような重篤な症例であっても、BEZ は有効かもしれない。従って、兄弟が亡くなったから、とか新生児期に発症したから、という理由で BEZ 治療を諦めるべきではない。

< 引用文献 >

Goodman SI, Frerman FE. Glutaric acidemia type II (multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency). JIMD. 1984; 33-37.

Yamaguchi S, Li H, et al. Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. MGM. 2012; 87-91.

Endo M, et al. In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type 2. J Chromatogr B 2010;878:1673-6.

5. 主な発表論文等

(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 6件)

Yamada K, Kobayashi H, et al: Clinical, biochemical and molecular investigation of adult-onset glutaric acidemia type II: Characteristics in comparison with pediatric cases. Brain Dev. 2016;38(3):293-301. 査読あり

Bo R, Hasegawa Y, Yamada K, et al. A fetus with mitochondrial trifunctional protein deficiency: Elevation of 3-OH-acylcarnitines in amniotic fluid functionally assured the genetic diagnosis. Mol Genet Metab Rep. 2015;5(6):1-4. 査読あり

Yamada K, Kobayashi H, et al: Elevation of pivaloylcarnitine by sivelestat sodium in two children. Mol Genet Metab. 2015;116(3):192-4. 査読あり

Takahashi T, Yamada K, et al: Metabolic disease in 10 patients with sudden unexpected death in infancy or acute life-threatening events. Pediatr Int. 2015;57(3):348-53. 査読あり

Vatanavicharn N, Yamada K, et al: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. Bra and Deve 37(7): 698-703, 2015. 査読あり

山田健治. in vitro probe assay とイムノプロットティング. 小児内科 46(4): 510-514, 2014, 査読なし

[学会発表](計 5件)

山田健治 他. L-カルニチン内服によるアシルカルニチンプロファイルの変化. 日本マススクリーニング学会. 広島大学

広仁館(広島). 2014年8月22~23日.
山田健治 他. Why does C14:1 increase in VLCAD deficiency? 日本先天代謝異常学会. 江陽グランドホテル(宮城) 2014年11月13~15日.

山田健治 他. VLCAD 欠損症の診断マーカーにおける血清 C14:1/C12:1 比の有用性. 日本マススクリーニング学会. 大手町サンケイプラザ(東京). 2015年8月21~22日.

Yamada K, et al. Serum C14:1/C12:1 ratio is a sensitive diagnostic marker for VLCAD deficiency. SSIEM, France, Lyon. 2015年9月1~4日.

山田健治 他. VLCAD 欠損症合併妊娠の母児例. 日本先天代謝異常学会. 大阪国際会議場(大阪). 2015年11月12~14日.

[図書](計 1件)

山田健治. 診断と治療社. 引いて調べる先天代謝異常症. 2014, p175

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等はなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健治 (YAMADA, Kenji)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 70624930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし