

脳症発症と 酸化障害の関連性に関する研究

研究分担者 山口清次 (島根大学医学部小児科学 教授)

研究要旨

正常だった小児が感染などを機に急性増悪するミトコンドリア 酸化異常症(酸化異常症)はインフルエンザ脳症の発症形態と類似点がある。このため、インフルエンザの重症化が 酸化障害を介して発展してゆくという仮説のもとに、酸化に影響する因子について、培養皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いる in vitro probe assay (IVP assay) を用いて調べた。以下の結論が得られた。 PPAR アゴニストで高脂血症薬のベザフィブラート (BEZ) は、酸化異常を改善する効果が期待される。

培養環境が、高温下 (41) では長鎖脂肪酸の代謝が障害され、低温下 (33) では酸化が改善する。変異タンパクの立体構造の安定化などがこの理由として考えられる。さらに、サイトカインの酸化におよぼす影響について調べた。インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン (IL1、IL6、INF および TNF) の存在下で酸化能の変化を評価した。結論として、IF と IL6 による酸化への影響は少なく、IL1 と TNF は、酸化障害を悪化させる可能性が高い。すなわちサイトカインの種類によって酸化に影響を及ぼしインフルエンザの病態を悪化させる可能性が示唆された。インフルエンザに関連したこの他の諸因子についても酸化への影響をみる価値がある。

研究協力者

長谷川有紀 (島根大学小児科助教)
小林弘典 (島根大学小児科助教)
山田健治 (島根大学小児科医科医員)
高橋知男 (島根大学小児科医科医員)

に急激に悪化して、急性脳症、乳幼児突然死様の経過をとり、インフルエンザ脳症と 酸化異常症の臨床的特徴に類似性がある。インフルエンザ脳症等の急性増悪における 酸化障害の関わりの有無を明らかにする。

A . 研究目的

正常だった小児がインフルエンザ感染を機に短時間のうちに急性脳症に発展し、死亡することもある。これは「インフルエンザ脳症」として知られている。一方、ミトコンドリア脂肪酸 酸化異常症 (酸化異常症) も、安定している時はふつうと変わりなく、感染などを契機

B . 方法

1) in vitro probe assay
培養皮膚線維芽細胞を特殊なメEDIUM (最小限のブドウ糖遊離脂肪酸を含まずかつ過剰量のカルニチン) で培養し、酸化を亢進させた状態で、パルミチン酸などの脂肪酸を添加してメEDIUM

中に分泌されるアシルカルニチンを測定し、酸化能、および障害部位を評価した。これを *In vitro* probe (IVP) assay という。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した(図 1)。インフルエンザ脳症のリスク因子、あるいは緩和因子を探索するために、IVP assay の系に以下のような環境変化、薬剤添加等によって酸化能の変化を評価した。

2) 高脂血症薬ベザフィブラート (BEZ)

Peroxisome proliferating receptor (PPAR) アゴニストとして知られ、高脂血症薬として使用されている BEZ (400 nmol/mL) の存在下で、酸化異常症患者の細胞を培養し、酸化能改善効果を評価した。

3) 環境温度の影響

培養環境を、高温下(41℃)と低温下(33℃)にして、37℃環境下での酸化能と比較した。

4) サイトカインの影響

インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン(IL1、IL6、INF および TNF)存在下で酸化能の変化を評価した。

C. 結果

1) IVP assay の結果

IVP assay による結果を図 2 に示す。正常コントロール(図 2A)におけるアシルカルニチンプロファイルは、アセチルカルニチン(C2)のみが主なピークで、他のアシルカルニチンは低い。これに対し、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症(図 2B)では、代謝障害部位に対応して、C4、C6、C8 の増加がみられ、中鎖脂肪酸の代謝障害を反映している。極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症(図 2C)では、長鎖脂肪酸の代謝障害を反映して C12、C14、C16 の長鎖アシルカルニチンの増加がみられた。

2) ベザフィブラート (BEZ) の酸化異常症への影響

図 3 に、VLCAD 欠損症とグルタル酸血症型(GA2)の IVP assay の結果を示している。VLCAD 欠損症では長鎖脂肪酸の代謝障害を示し、一方 GA2 では、広範囲の酸化障害の病態を反映して、C4 から C16 まで全体的に増加している。

これに対し BEZ 存在下で培養した時のアシルカルニチンプロファイルは、図 3 の下段のように異常ピークが正常化している。このことから BEZ は、酸化異常症における代謝異常を改善する効果が推測された。

種々の酸化異常症の培養細胞で同様の実験を行ったところ、図 4 に示すようにほとんどすべての酸化異常症の細胞で酸化能の改善が認められた。

3) 環境温度の影響

33℃(低温下)、37℃、および 41℃(高温下)で酸化異常症の細胞を用いて IVP assay を行った。その結果、図 5 に示すように、VLCAD 欠損症では、41℃(高温下)で、C12、C14、C16 のアシルカルニチンが増加した。一方 33℃では、C14、C16 は低下した。

広範囲の酸化障害の起こる GA2 では、高温下では C12~C16 アシルカルニチンは増加し、C4~C10 の中鎖アシルカルニチンは低下した。一方、低温下(33℃)では、長鎖アシルカルニチンを含むすべての炭素鎖長のアシルカルニチンが低下した。

高温環境と低温環境で対照的な結果を示した。すなわち、VLCAD 欠損症も GA2 も長鎖脂肪酸の酸化は高温下では悪化した。GA2 においては中鎖短鎖の酸化は改善しているかのような所見を示した。すなわち高温環境では長鎖脂肪酸の酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の酸化障害が緩和すると推測された。

4) サイトカインによる酸化への影響

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち、INF、IL1、IL6、およびTNFをそれぞれ10 ng/mLの濃度で添加してIVP assayを行った。結果はアシルカルニチンのC2に対する比で表した。インフルエンザ脳症等による死亡例で報告されているサイトカイン濃度は以下のとおりである：IF 0.1~0.15 ng/mL；IL1 22.6±4.7 pg/mL；IL6 1.1~16.1 ng/mL；TNF 8.8~315 ng/mL。

図6に示すように、正常細胞ではサイトカインの有無によって酸化能は影響を受けなかった(図6A)。MCAD欠損症では、C8は4種類のサイトカインの存在下で増加し、C10はIL1とTNFの存在下で増加した(図6B)。

VLCAD欠損症では、IFとIL6による影響はみられなかったが、IL1とTNF存在下でC14とC16の増加がみられた(図6C)。GA2では、IFとIL6による影響はみられなかったが、IL1とTNF存在下でC4~C16のすべてのアシルカルニチンの増加がみられた(図6D)。

検査した4種類のINF、IL1、IL6、およびTNFのうち、IFとIL6による酸化への影響は少なく、IL1とTNFは、酸化異常症の障害部位の代謝を悪化させる可能性が高い。

D. 考察

インフルエンザ脳症のように電撃的に急性経過を取る疾患が、酸化障害を介して起こるといふ仮説のもとに、種々の薬剤や環境による変化を評価した。酸化異常症のように代謝の脆弱な体質の個体では、感染などを契機に急性経過を取ることが少なくない。今回の検討の結果、高脂血症薬のBEZは酸化異常症を改善する可能性のあることを示した。その機序として、BEZはPPARアゴニストとして働き、PPARは酸化酵素の上流の配列に結合して酵素の転写を促進

し、このために酵素タンパクの量を増加させ残存活性を上昇させることが考えられている。酸化は連続して働く代謝経路であり、もしも正常な酵素も同じように増加させるならば、変異タンパクの増加量とのアンバランスが起こることも考えられる。BEZの作用機序についてはin vivoも含めて、さらに検討が必要であろう。

環境温度による影響をみた研究では、長鎖脂肪酸の代謝の脆弱な個体(または酸化異常症)では、高温下では長鎖脂肪酸代謝が悪化する可能性がある。一方中鎖~短鎖の酸化は高温下では促進される。一方低温下では、長鎖酸化の異常も緩和されることが推測された。この機序として、変異タンパクでも低温下では立体構造が比較的保たれて安定化するために、酵素活性が保存されたことが考えられる。

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち4種類の酸化に対する影響を調べた実験では、IFとIL6の酸化への影響は少なく、IL1とTNFでは、酸化異常症を悪化させる可能性が高いことが分かった。インフルエンザはウィルスそのものの毒性というよりもサイトカインストームが病態を悪化するとされており、今後さらにこの他のサイトカインの影響についても検討する価値がある。

E. 結論

インフルエンザの症状のうち、酸化に影響を与える可能性のある薬剤、環境温度、およびサイトカインの影響を調べた。結論として、BEZは酸化異常症を改善する効果が期待される。環境温度では、低温下の方が酸化にとって良い可能性が高い。またサイトカインの中でも、IFとIL6の酸化への影響は少なく、IL1とTNFは、酸化系を悪化させ

る可能性があるということが明らかになった。この他のインフルエンザに関連した諸因子について検討する価値がある。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013
- 4) 山口清次: MS 解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013
- 5) 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代 ; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013
- 6) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013
- 7) 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013
- 8) 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスと GC/MS の臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 61(9): 817-824, 2013
- 9) 山口清次(編): *タンデムマス・ガイドブック、診断と治療社、東京、2013*

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. *2013 Joint Meeting of the*

- Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamaguchi S: Diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation defects. The Second Forum of International Translational Medicine of Clinical Genetics in Beijing - Development and Application of Genetic Technology 講演. Beijing, China, August 2013
 - 5) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type 1 : comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
 - 6) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of glutaric acidemia type 1 . 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
 - 7) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
 - 8) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
 - 9) Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Chiba, November 2013
 - 10) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状で発症し先天代謝異常症と判明した 10 例の検討. 第 40 回日本マス・スクリーニング学会. 大阪, 2013 年 8 月
 - 11) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の β 酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013 年 9 月
- F . 知的財産権の出願・登録状況
- 1 . 特許取得
該当なし
 - 2 . 実用新案登録
該当なし
 - 3 . その他
該当なし

図1. In vitro probe assayの原理

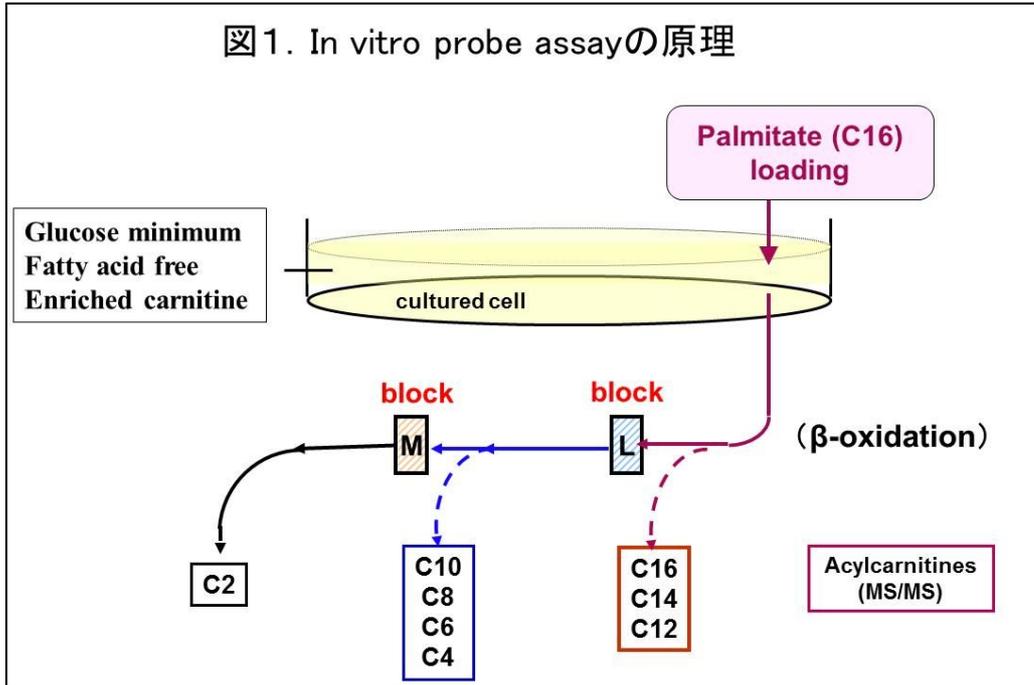


図2. In Vitro Probe Assayの結果の例

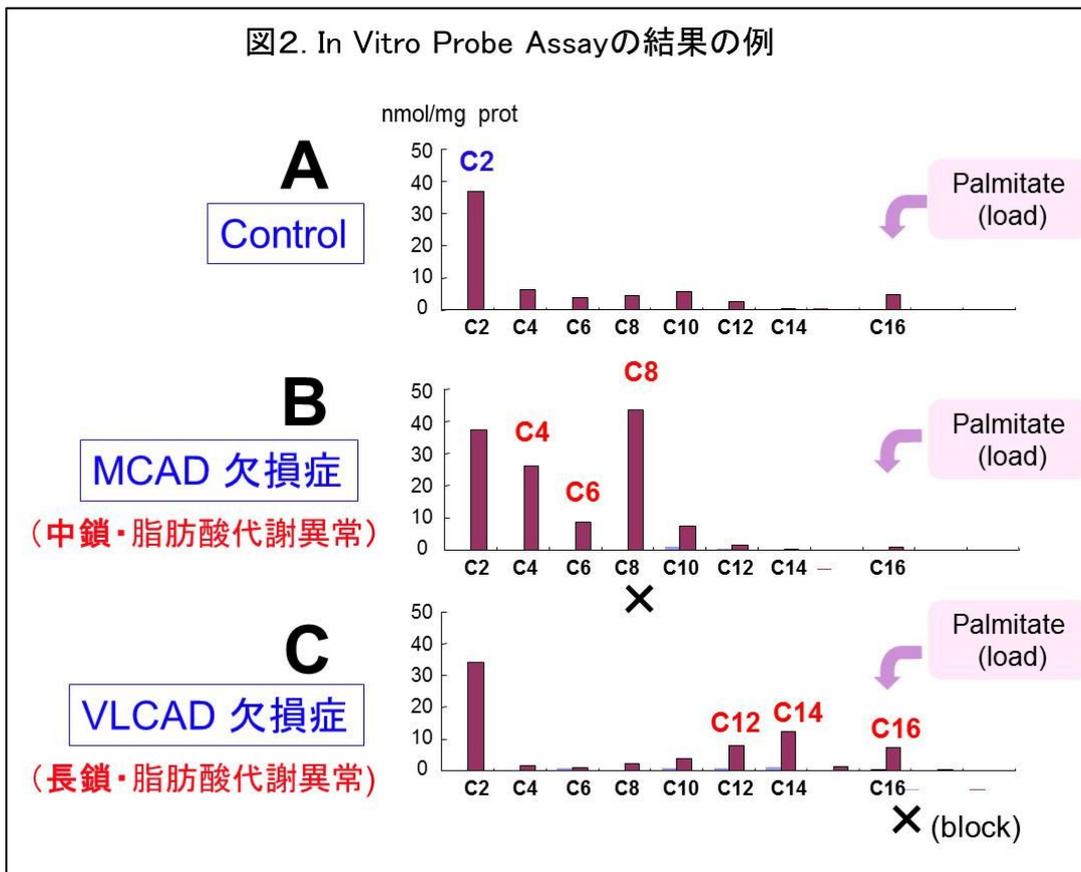


図3. ベザフィブラート添加前後のアシルカルニチンの変化

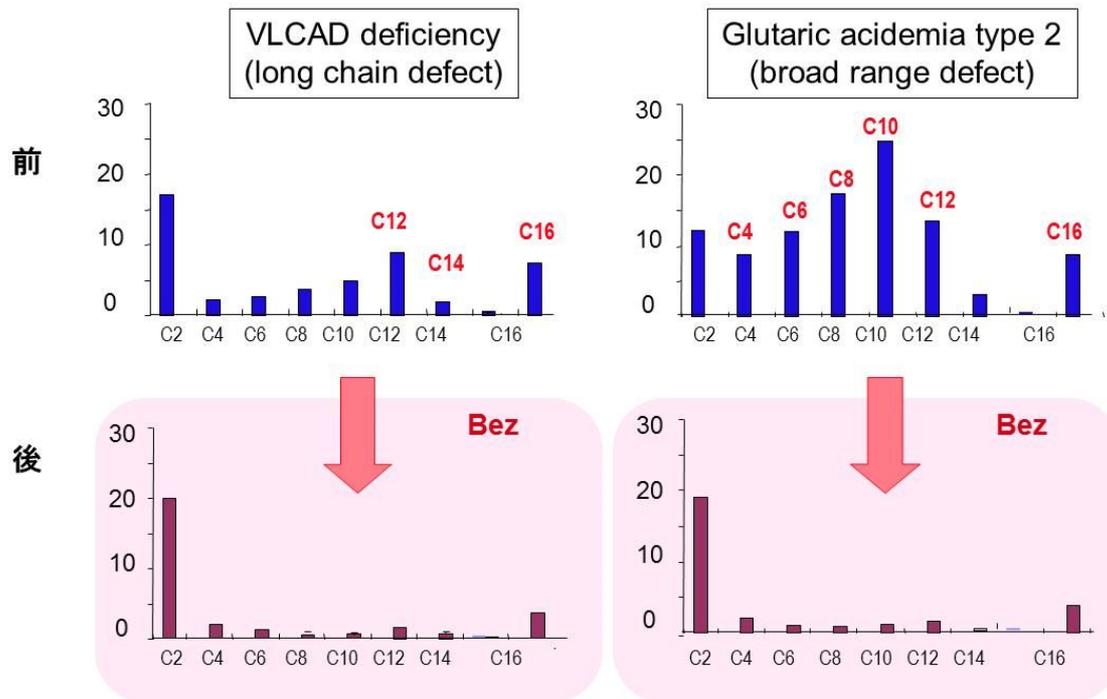
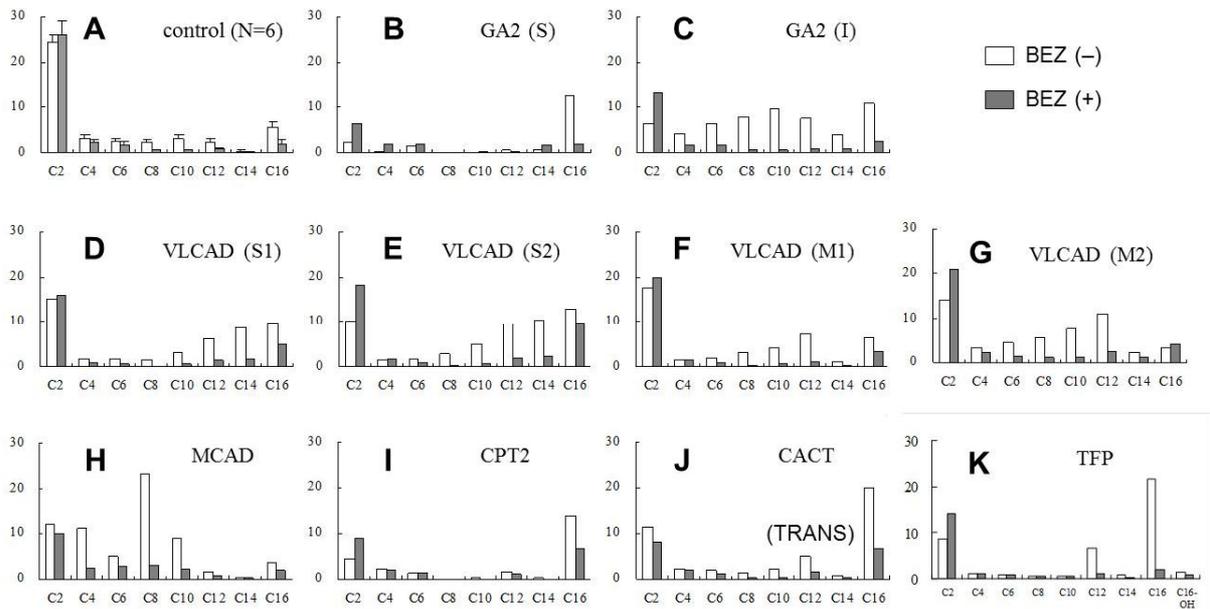


図4. ベザフィブレートの脂肪酸代謝異常改善効果in vitro probe assayによる評価



略字: GA2(S), GA2(I)=グルタル酸血症 II 型重症型と中間型; VLCAD(S), VLCAD(M)=VLCAD欠損症重症型と軽症型; MCAD=MCAD欠損症; CPT2=CPT2欠損症; CACT=カルニチン・アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症; TFP=三頭酵素欠損症

図5. 高温下と低温下のアシルカルニチンの変化 (in vitro probe assay)

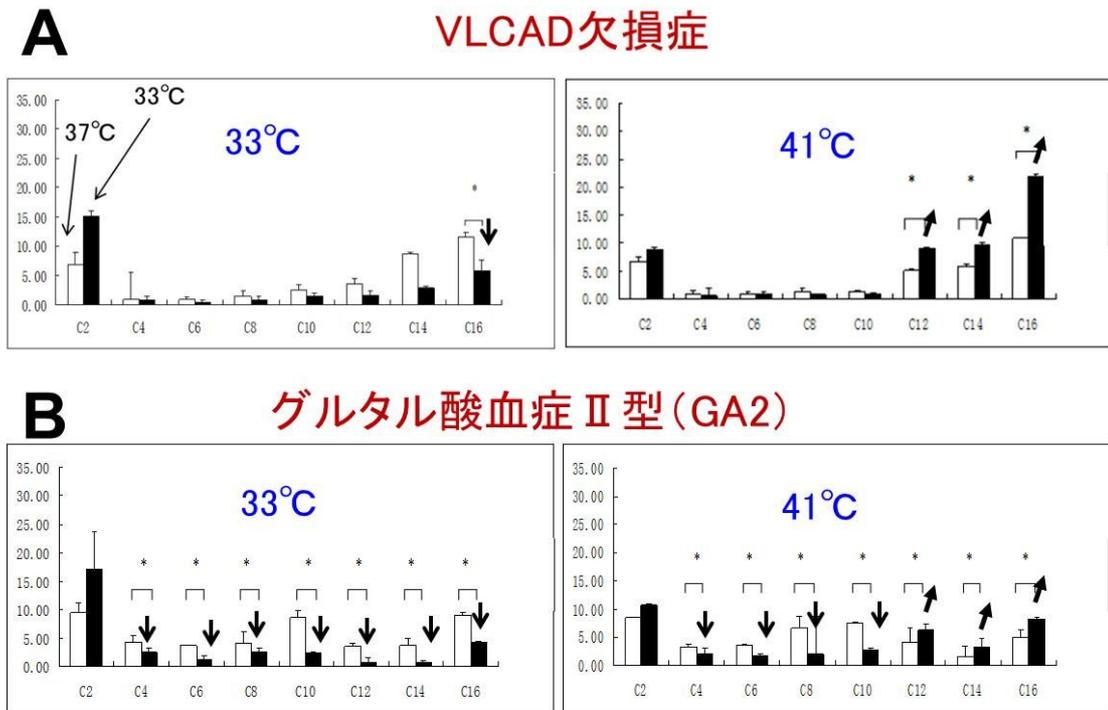


図6A. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

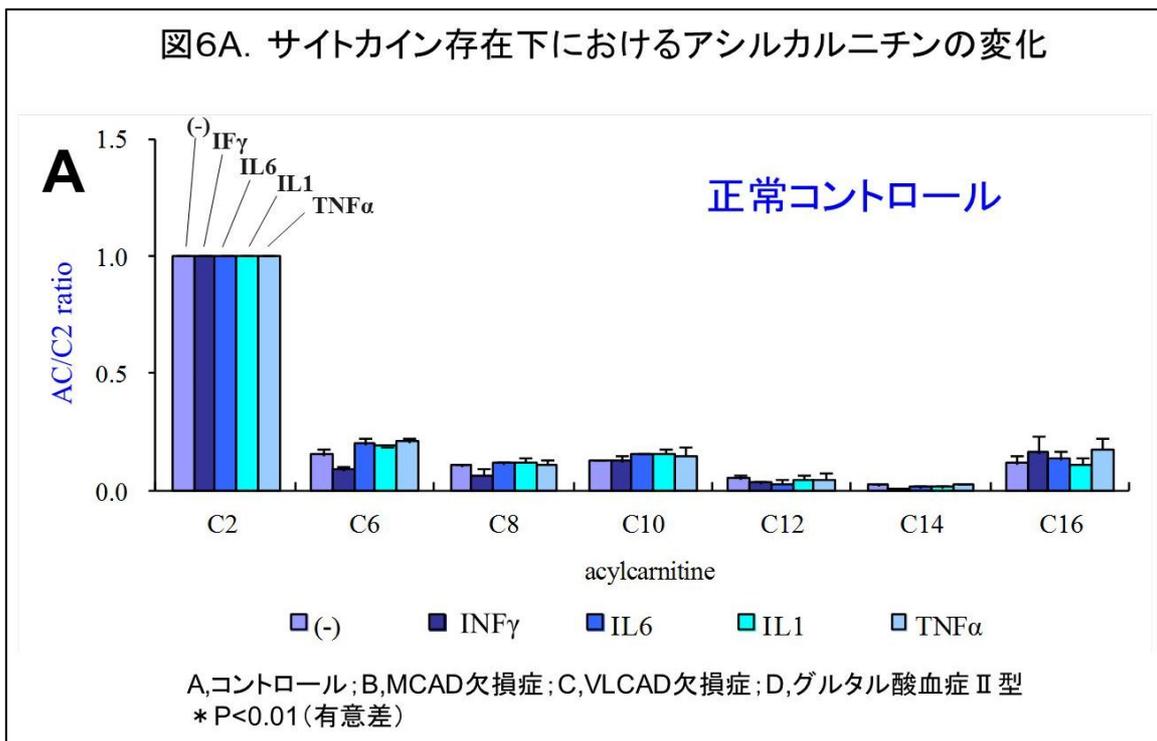


図6B. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

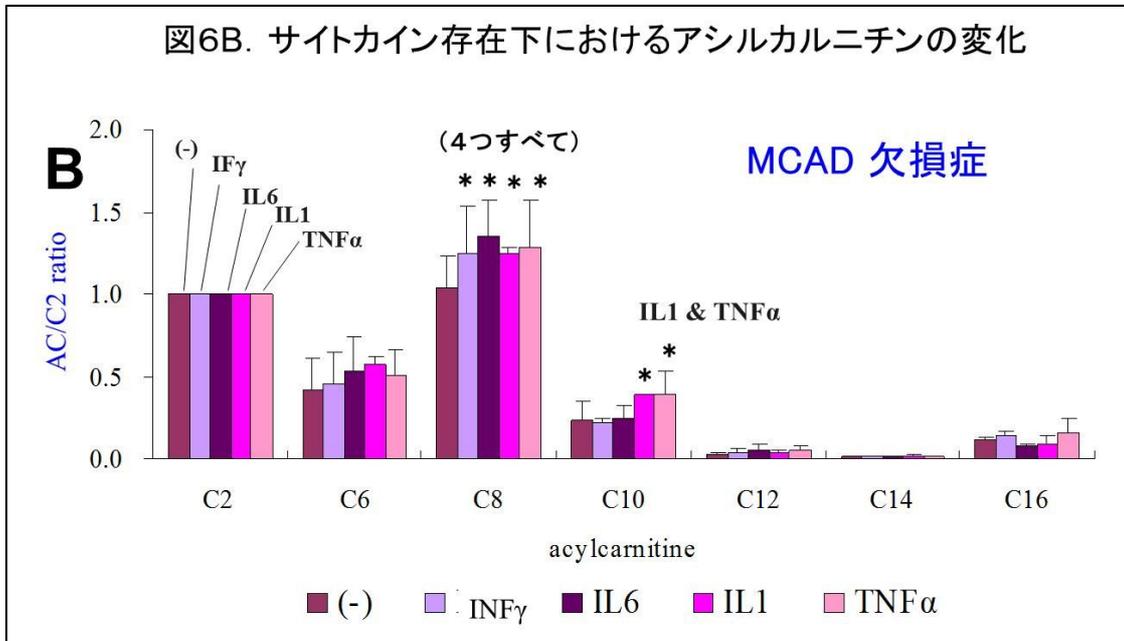


図6C. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

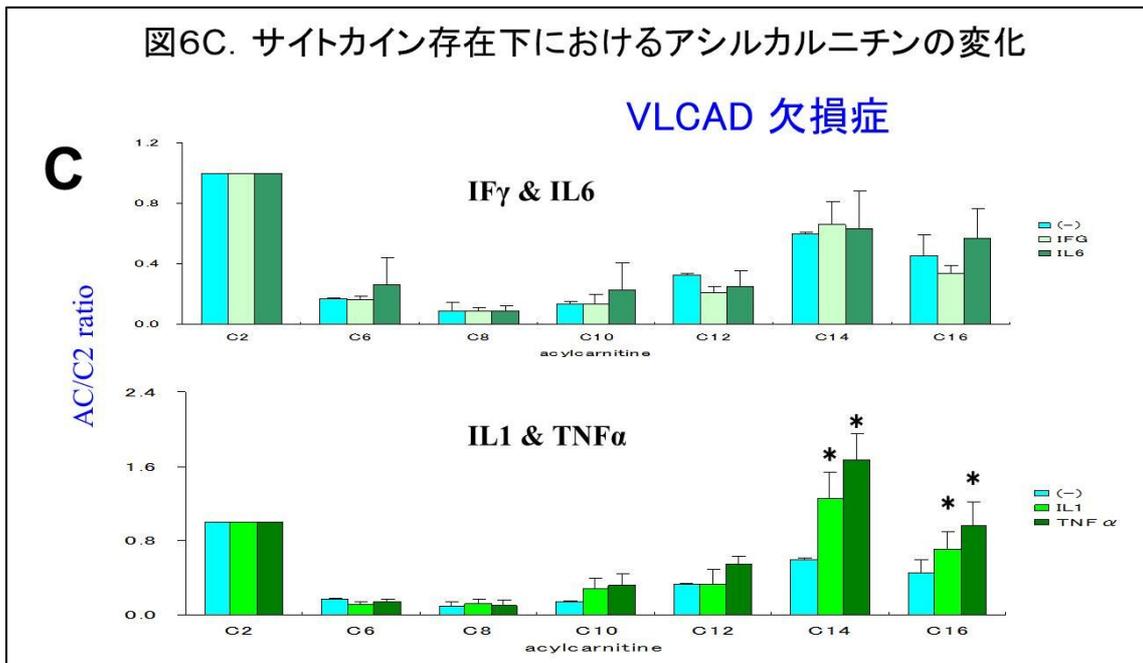


図6D. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

