

201415056A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患政策研究事業

**HSD10 病の発症形態と患者数の把握、  
診断基準の作成に関する研究  
(H26-難治等(難)-一般-021)**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 深 尾 敏 幸

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- HSD10 病の発症形態と患者数の把握、診断基準の作成に関する研究 …………… 1  
研究代表者 深尾敏幸

## II. 分担研究報告

1. 日本における HSD10 病の症例同定と遺伝子診断法の確立…………… 9  
研究分担者 深尾敏幸
2. 日本における HSD10 病のアンケート調査 …………… 13  
研究分担者 堀 友博  
研究分担者 深尾敏幸
3. HSD10 病の予後を規定しうる神経ステロイド代謝測定系樹立 …………… 15  
研究分担者 長谷川行洋
4. HSD10 病の生化学診断の問題点の検討 …………… 17  
研究分担者 山口清次

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 23

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 25

# I. 厚生労働科学研究費補助金 総括研究報告書

## HSD10 病の発症形態と患者数の把握、診断基準の作成に関する研究

研究代表者 深尾敏幸 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

### 研究要旨

HSD10 病はイソロイシン代謝系でβ-ケトチオラーゼ欠損症の1つ上流ステップがブロックされる代謝異常症である。本研究班の1年目の活動として、新たな症例の発見ということが1つの目標であったが、新たに2例（日本で3例目）を診断することができた。有機酸代謝スクリーニング施設へのアンケート調査、島根大学、岐阜大学に T2 欠損症疑いで紹介された症例の後方視的検討、診断法の確立のための研究などを行った。来年度に診断基準を策定することになっている。2012年日本で最初の本症患者を同定したが、本年度 J. Hum Genet に掲載された。

### 研究分担者

山口清次・島根大学医学部小児科学教授  
長谷川行洋・東京都立小児総合医療センター部長  
堀 友博・岐阜大学医学部附属病院小児科助教

### A. 研究目的

β-ケトチオラーゼ欠損症と同様の尿有機酸所見を示すが臨床像が異なる疾患として、2001年に世界ではじめての症例が同定されて以降、日本においても本症の可能性について常に考えて、ケトン体代謝異常症の相談を行ってきたが、2012年にアジアではじめてのHSD10病の症例を同定することが出来た。本症は、単にイソロイシン代謝系でβ-ケトチオラーゼ欠損症の1つ上流のステップが障害されるのみでなく、この酵素が多機能蛋白であり、ミトコンドリア内のステロイド代謝、ミトコンドリア RNaseP のコンポーネントとして働くことから、重症例では神経退行を示し予後の悪い疾患である。しかし世界でも報告例は20家系程度であり、まだ十分に臨床像が明らかになっていない疾患でもある。そこで、本年からこの研究班を立ち上げて研究を行うことになった。最終的には平成27年度に診断基準を作成することである。

平成26年度の研究目標は以下の通りである。

- 1) 本疾患の診断法の確立（山口、深尾、長谷川）：本症の診断には 2M3HBDH 活性測定、17βhydroxysteroidDH 活性測定、遺伝子診断があげられるが、病態の理解のためにはその両者の酵素活性と遺伝子診断の3者を行うことが必要と考えられる。
- 2) アンケート調査による候補症例の集積（堀、深尾）：有機酸分析を行っている施設へのアンケート調査を行い、候補となる症例の有無を確認する。
- 3) β-ケトチオラーゼ（T2）欠損症疑いで否定された症例の後方視的解析（山口、深尾）
- 4) 以上をもとに新規患者の診断  
上記から抽出された症例について、患者家族の同意を

得て酵素診断および遺伝子診断により本症の可能性を検討する。

### B. 研究方法

#### 1) 診断法の確立

- A) 遺伝子診断法の確立（深尾）：これは通常のゲノムレベルの解析で有り、比較的容易に確立でき、まずはこれが診断法としてすぐに用いられるよう準備する。
- B) 2M3HBDH 活性測定法の検討（深尾）：基質、クロトナーゼという酵素が必要であるが、これらが試薬として供給されておらず、それを手に入れる必要がある。現在基質の tiglyl-CoA はストックが岐阜大学にあり、当面は使用可能である。
- C) 17βhydroxysteroid dehydrogenase 活性測定法の検討（長谷川）：本酵素活性はミトコンドリア内の酵素活性であり、解析が難しいことが推測されるが、その確立を試みる。本酵素活性が測定できると臨床像の多様性の理解に重要と考えている。
- D) 有機酸分析による 2-methylacetoacetate の検出：島根大学の有機酸分析において、本症と T2 欠損症の鑑別に重要な 2-methylacetoacetate の検出についての検討を行う。

- 2) アンケートによる候補症例の集積（堀、深尾）  
腫瘍小児科施設へのアンケート調査よりもむしろ本症や T2 欠損症を疑えば必ず行われる尿有機酸分析を行っている施設へのアンケートが効率的かつ確実であると考えた。尿有機酸分析を行っている施設へのアンケート調査を行い、候補となる症例の有無を確認する。  
札幌市衛生研究所  
東京都予防医学協会  
大阪府立母子保健総合医療センター  
化学及血清療法研究所  
久留米大学 医学部  
日本疾患メタボローム解析研究所

3) 過去の T2 欠損症が疑われ、否定された症例の後方視的解析 (山口、深尾)

本症は T2 欠損症と類似した有機酸分析、アシルカルニチン分析結果を示す。日本で最も多くのこれらの解析を行っている島根大学の過去 5 年のファイルから候補症例の抽出を行う。また、過去に T2 欠損を疑われ、岐阜大学で否定した症例の過去 5 年のファイルから抽出を行う。

4) 全国からのケトン体代謝異常症、T2 欠損症の疑い症例の相談

相談を継続して受け、その中で HSD10 病の可能性のある症例については、本症の遺伝子検査についても家族の承諾のもとで行う。

### C. 研究結果

#### 1) 診断法の確立

##### A) 遺伝子診断法の確立:

遺伝子解析は常法に従い、本症の責任遺伝子 HSD17B10 のエクソゲノム PCR, ダイレクトシーケンシングを行った以下のそのプライマー配列で解析した

HSD10 primers		
exon 1	sense	5'-g.470ATCCCCATCCCGTGGAGTGG
	antisense	5'-g.683AGTGCTGACTTTCACCTCTTGA
exon 2	sense	5'-g.810GGAGAAGCAGCACACCTAGT
	antisense	5'-1279TCCACAGTGCTTGAAGGCT
exon 3,4, 5	sense	5'-g.2309CCTCTCCCTTCTCACAAATCT
	antisense	5'-g.3139TGCTGCTGCTTAGGTGGTGGAT
exon 6	sense	5'-g.3130AGCAGCAGCAGCCTTTATCT
	antisense	5'-g.3565ATTAGGCACAGAGGGCGACT

Nucleotides are numbered according to NG\_008153 RefSeqGene.

可能性のある症例について解析を行い、日本で 3 例の HSD10 病を診断することが出来た (後述)。

##### B) 2M3HBDH 活性測定法の検討:

本酵素活性は、日本最初の症例において測定し、報告した (Fukao et al. 2014) . しかしこの活性測定に必要な基質 tiglyl-CoA および crotonase という酵素は現在市販されておらず、継続的活性測定が困難な状況となった。そこで現在ヒト crotonase cDNA を大腸菌発現ベクターに組み込み、発現させて精製することを行っている。

##### C) 17beta hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD) 活性測定法の検討:

本症における臨床像は上記 2M3HBDH 活性の有無によるのではなく、本酵素の持つ他の活性 17HSD の活性低下によるという報告があり、病態解明の上から本酵素活性が変異によってどのように変化するのか理解することが重要と考えられる。長谷川らは HSD10 蛋白の正常および患者 3 名で見つかった遺伝子変異をいれた cDNA の発現ベクターを構築し、現在その発現細胞の検討を行っている。タンデムマスで基質からの反応生成物 (3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THDOC, estrone) を評価する方法で解析をする予定である。

##### D) 有機酸分析による 2-methylacetoacetate の検出

島根大学の有機酸分析において、本症と T2 欠損症の鑑別に重要な 2-methylacetoacetate の検出ができていないことから、今回その検出の検討をおこなった。その結果、典型的 T2 欠損症症例において 2-methylacetoacetate のピークを検出することが出来、今後 2-methyl-3-hydroxybutyrate (2M3HB), tiglylglycine (TIG) という T2 欠損症と HSD10 病の共通の有機酸分析結果に加え、T2 欠損では通常検出され、HSD10 病では検出されない 2-methylacetoacetate を検討することでより本症の疑い例をはっきりさせることが出来る。山口はその MAA の検出について検討し、2MAA の oxim-TMS 誘導体の分子量 m/z 275 と推定され、主なフラグメントイオン M/z 260、m/z 186、および m/z 170 のマスキンググラフによって、メチレンユニット 14.76 の位置に 2MAA と推定されるマススペクトルが同定された。また尿検体が古い場合、尿ろ紙検体では 2MAA が分解されて検出出来ないことを念頭に置く必要があることをあきらかにした。

##### 2) アンケート調査

方法に記載した 9 施設に過去 5 年間に T2 欠損症を疑う尿有機酸分析結果を示した症例についてアンケート調査を行った (島根大学結果は後述)、全施設から回答を得た。結果として既に岐阜大学で T2 欠損症と診断した 1 家系 2 症例、HSD10 病と診断した計 3 症例以外には、疑い症例はないことが明らかとなった。

##### 3) 後方視的解析

軽症 T2 欠損症では、TIG が検出されず、2M3HB が診断をうたがう重要な指標となる。実際に後者の排泄のみで T2 欠損症であった症例が日本には多いが、後者が少量検出されるのみの場合、必ずしも T2 欠損とは言えないことがわかっている。同様に HSD10 病の軽症例があるとすると同様の所見が得られる可能性があり、このような 2M3HB が少量検出された症例についても T2 欠損症が否定されれば本症も疑う必要性があるのかもしれない。そのため島根大学にてそのような症例についてピックアップを行った。

β ケトチオラーゼ欠損症疑い例について (島根 2011~2015)

病院	2011~2014年		GC/MS	性別	T2/SCOT活性	遺伝子解析	
	分析年月日	年齢(診断時)				T2	HSD10
滋賀	2014.10.4	1y0m	著明なケト-シス、2M3HBの軽度排泄増加	男	正常	正常	正常
大分	2014.07.24	1m0m	著明なケト-シス、2M3HBの軽度排泄増加	男	正常	検査中	検査中
福岡	2014.06.20	2y2m	著明なケト-シス、2M3HBの軽度排泄増加	女	正常	正常	正常
熊本	2013.7.09	2y4m	著明なケト-シス、2M3HBのごく軽度排泄増加		検査未	未	未
埼玉	2013.4.24	2y1m	著明なケト-シス、2M3HB、チグリルグリシンの強い排泄増加	女	T2欠損		変異確定
愛知	2011.6.7	1y4m	著明なケト-シス、2M3HBの排泄増加	男	正常	正常	正常
兵庫	2011.4.27	3y	著明なケト-シス、2M3HBのごく軽度排泄増加	男	正常	検査中	検査中

この表の症例は必ずしも T2 欠損症。HSD10 と限らないが、男児に着いては解析をすすめる。

また岐阜大学では 2008~2015 間にケトン体代謝異常症疑いで紹介された症例約 40 例に着いて、HSD10 についても遺伝子異常の有無を調べる予定である。

#### 4) HSD10 病と同定できた 3 例について

アジアで最初の症例については J. Hum. Genet に本年掲載された (添付)。その症例は 6 歳の男児。5 日間の胃腸炎による食欲不振の後、強いケトアシドーシスを来した。pH7.01, HCO<sub>3</sub> 2.8mmol/L, 血糖 106mg/dl, 乳酸も正常範囲、ケトン体は 14000 micromol/L。尿有機酸分析で、2M3HB, TIG が検出され、T2 欠損症が疑われた。しかし T2 の酵素活性は回復して正常で、本症が疑われ、遺伝子解析で A154T 変異が同定され本症と診断された。精神運動発達の退行はなく、これまでの欧米の分類では非典型例となる。その後一度低血糖発作を来している。

本年度 2 名の新たな症例を、臨床像、有機酸分析結果等から疑い、遺伝子解析にて診断することが出来た。

ゲノム PCR, ダイレクトシーケンスは本症が X 染色体劣性遺伝で、患児は原則男児であり、ヘミ接合であるため、比較的容易であった。

その 2 例については簡単に記載する。(この 2 例は共同発表として 2014 年度の日本先天代謝異常学会にて発表しており、その抄録を添付する)。

1 例は 4 歳の男児。前日から発熱、食欲不振、当日意識レベル低下。受診時血糖が 2.0 mg/dl と低血糖あり。そのわりに pH 7.337, BE-7.1 mmol/L, ケトン体は 5400 micromol/L であった、尿有機酸分析で、2M3HB, TIG が検出され、T2 欠損症が疑われた。しかし T2 欠損症ではもし低血糖があれば、もっと強いケトアシドーシスを来すと考えられ、当初から HSD10 病を疑った。遺伝子解析により A157V 変異が同定された。この症例は日本最初の症例と同様に精神運動発達の退行をしめていない。また低血糖発作をもう一度起こしているところも最初の報告例と同様である。

もう 1 例は日齢 1 に多呼吸を呈した男児。日齢 1 に pH7.130, HCO<sub>3</sub> 4.7mmol/L, 血糖 20mg/dl、そして非常に乳酸が高値 (19mmol/L) であった。当初ミトコンドリア病が疑われたが、尿有機酸分析で 2M3HB, TIG が検出され、T2 欠損症が疑われた。しかし T2 欠損症では新生児期発症は稀で、高乳酸血症も稀なため、相談を受けた段階から HSD10 病を疑った。遺伝子解析で R226Q の変異を認め、本症と診断した。母には変異は検出されず de novo であると考えられた。本児と同じ変異がやはり de novo として欧米で新生児発症例で報告されており、本症例も新生児発症で、退行が 3 ヶ月頃より進行している。

#### D. 考察

本症はイソロイシン代謝においては  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の 1 つ上流の代謝ステップが障害される。そのため両者の尿有機酸分析上の違いは、理論的には  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症では 2 メチルアセト酢酸が検出されるが、本症では 2 メチルアセト酢酸が出ないことである。しかし尿中の 2 メチルアセト酢酸は不安定であり、検出が難しい (山口清次分担報告書参照)。 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症ではコンスタントに 2 メチルアセト酢酸が検出され、本症では検出されないことが定量的にわかれば、鑑別上重要となる。

本年度同定された 2 例は臨床的には典型的  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症と検査所見、発症時期などで異なっていたので本症を疑うことが出来たが、アジア最初の症例は発症時期が遅いことを除けば、発作時の検査所見はむしろ  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症を疑わせる所見であった

#### 来年度の診断基準作成に向けて

臨床像が多様であり、世界で 30 例、日本で 3 例で

まだ臨床像、自然歴が典型例以外に不明である。日本の 1 例はいわゆる典型例 (重症例)、2 例はこれまでの分類で非典型例となる

臨床病型 (Zschocke の分類)

新生児期発症型

乳児期発症型

小児期発症型

非典型例

に準じた分類とする

診断基準

1) 有機酸分析で 2-methylacetoacetate の排泄の有無が明確になれば、尿有機酸分析で化学診断可能。しかしすべての有機酸分析施設で検出可能ではない。現時点では、疑診として、確定診断は遺伝子診断とするのが妥当と考えられる。島根大学で検討した結果、これまでの方法で 2-methylacetoacetate が検出出来ることがわかり、今後の島根の有機酸分析で検出可能となる。

2) これまでの症例でタンデムマスによるアシルカルニチン分析で C5-OH があがらなくても C5:1 が高い症例があり、新生児マスマスクリーニングでは見逃されていた。本症を 2 次スクリーニング疾患として早期診断できないか? 治療法が確立されていないことから現時点ではスクリーニング対象とするのは難しいか?

3) 遺伝子診断法については確立された。2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase 活性、17HSD 活性など酵素欠損の証明は本症診断に必ずしも必要ではないと考える。しかし病態を考察するためには必要。来年度の診断基準策定にむけて更に検討する。

#### E. 結論

HSD10 病はイソロイシン代謝系で  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の 1 つ上流ステップがブロックされる代謝異常症である。本研究班の 1 年目の活動として、新たな症例の発見ということが 1 つの目標であったが、新たに 2 例 (日本で 3 例目) を診断することができた。有機酸代謝スクリーニング施設へのアンケート調査、島根大学、岐阜大学に T2 欠損症疑いで紹介された症例の後方視的検討、診断法の確立のための研究などを行った。来年度に診断基準を策定することになっている。2012 年日本で最初の本症患者を同定したが、本年度 J. Hum Genet に掲載された。今後も T2 欠損症と本症を鑑別して診断していくことが重要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1. **Fukao T**, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. J Hum Genet 59:609-14, 2014

2. Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, **Fukao T**, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. Brain Dev in press.

3. **Fukao T**, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. J Inherited Metab Dis 2014 Jul;37(4):541-51

4. Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. Pediatr Int in press

## 2. 学会発表

1. Akiba K, **Fukao T**, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake T, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without intellectual disability. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

2. **Fukao T**, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

3. **Fukao T**: Clinical Importance of ketone body metabolism and its defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism and 3rd National Conference of ISiEM, Sep 19-21, Hyderabad(India), 2014

4. 青山友佳、市原朋子、山本俊至、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ欠損症において MLPA 法を用いた 1 症例における Uniparental disomy の同定. 日本マススクリーニング学会 8 月 22-23 日 広島 2014

5. 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、園府寺美、木野稔、**深尾敏幸**、青山友佳、重松陽介: ケトン性低血糖発作を契機に診断した

HSD10 病の 4 歳男児. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

6. 折居建治、森本将敬、笹井英雄、松井永子、村上圭、大竹明、**深尾敏幸**: 新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 型異常症の姉弟例の検討 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

7. 小林正久、**深尾敏幸**、重松陽介、長谷川有紀、村山圭、井田博幸: 本邦初の乳児期発症の HSD10 病症例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

8. 青山友佳、山本俊至、坂口直美、石毛美夏、田中藤樹、市原朋子、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ (HMGCL) 遺伝子の MLPA 法確立と HMGCL 欠損症 1 症例における

Uniparental disomy の同定. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

9. 笹井英雄 北澤徹三 木村豪 川本典生 川本美奈子 **深尾敏幸** 下澤伸行、山本崇裕

経過中に大脳白質病変を呈したホモシスチン尿症の 1 例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

10. 伊藤哲哉 中島葉子 加藤沙耶香 **深尾敏幸**: ミトコンドリア HMG-CoA 合成酵素欠損症の急性期症状. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

11. **深尾敏幸**、堀友博、笹井英雄、大塚博樹、青山友佳: ACAT1 遺伝子のイントロン 9 への Alu 挿入はエクソン 10 の認識に影響を与える。

第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

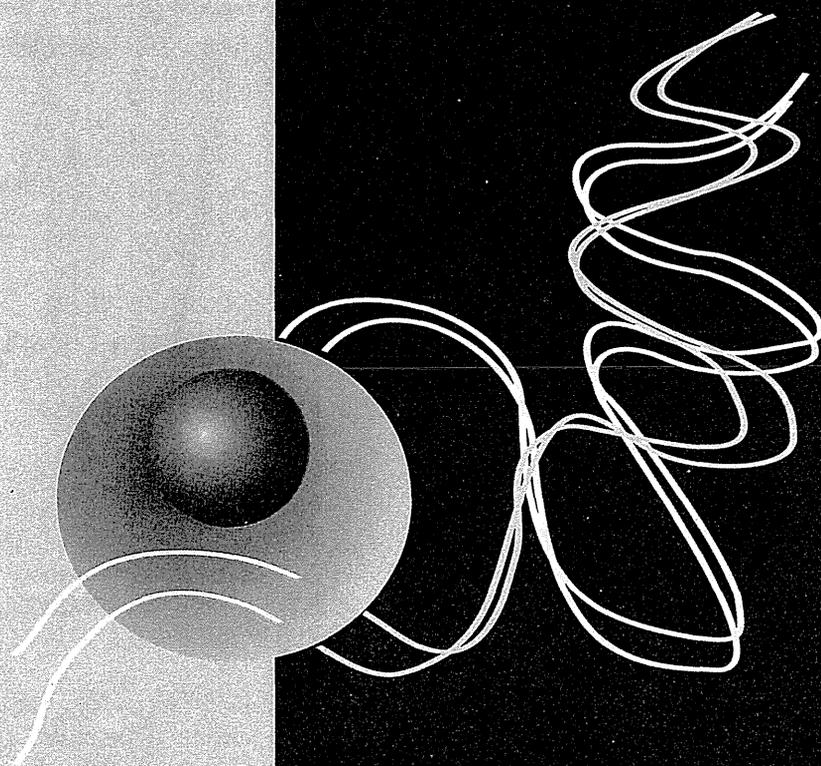
3. その他 なし

ISSN 0912-0122

Japanese Journal for Inherited Metabolic Diseases  
**日本先天代謝異常学会雑誌**

第56回日本先天代謝異常学会 総会号

併催：第12回アジア先天代謝異常症シンポジウム



**Vol.30 2014**

## O-33

### ケトン性低血糖症を契機に診断した HSD10 病の 4 歳男児

○赤川翔平(SHOHEI AKAGAWA)<sup>1</sup>, 保坂泰介<sup>1</sup>, 石井紘介<sup>1</sup>, 寺口正之<sup>1</sup>, 村上貴孝<sup>1</sup>, 圀府寺 美<sup>1</sup>, 木野 稔<sup>1</sup>  
重松陽介<sup>2</sup>, 青山友佳<sup>3</sup>, 深尾敏幸<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 中野こども病院, <sup>2</sup> 福井大学 医学部 健康科学, <sup>3</sup> 岐阜大学 大学院 連合創薬医療情報研究科

<sup>4</sup> 岐阜大学 大学院 医学系研究科 小児病態学

【はじめに】HSD10 (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10) 病は世界で約 20 例報告されている X 染色体劣性遺伝の先天代謝異常症である。私たちはケトン性低血糖症を契機に診断した本邦で 2 例目の HSD10 病を経験した。

【症例】生来健康な 4 歳男児。X-1 日から 39 度台の発熱を認め、食事摂取ができず、活気低下を認めていた。X 日に近医を受診し、意識レベルの低下を認めるため当院を紹介受診した。当院受診時の血糖は 20mg/dl 未満、ケトン 5400  $\mu$ mol/l とケトン性低血糖を認めた。アンモニアは 265  $\mu$ g/dl と高値であり、静脈血液ガスは pH 7.337, pCO<sub>2</sub> 33.8mmHg, HCO<sub>3</sub> 17.7mmol/l, BE -7.1mmol/l であった。ブドウ糖液を静脈注射し、速やかに意識レベルの改善を認めた。入院の上、輸液加療のみで翌日には身体所見、検査所見ともに改善した。著明な低血糖の精査のために、急性期の検体で尿中有機酸分析を施行し、2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸とチグリルグリシンの増加から  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症が疑われたが、酵素活性は正常であった。HSD17B10 の遺伝子解析にて A157V の新規変異を認め、HSD10 病と確定診断した。退院後、低血糖発作は認めておらず、発熱や食事摂取不良の際には速やかにブドウ糖輸液を行う方針としている。

【考察】HSD10 病は、2-メチル-3-ヒドロキシブチリル CoA 脱水素酵素 (2M3HBD) 欠損症として報告されてきた疾患である。2M3HBD はコレステロール代謝では HSD10 であり、またミトコンドリア tRNA のプロセシングに必要な RNaseP を構成する蛋白でもあり、多機能蛋白である。海外の報告では、乳児期までの発症では神経発達障害や心筋症などをきたし予後不良とされているが、年長児の発症では比較的軽症であり予後良好とされている。本症例では治療により速やかに低血糖の改善を認め、退院後も神経学的異常は認めていないが、今後長期にわたってフォローが必要であると考え。現在までの経過を文献的考察を含めて報告する。

## O-34

### 本邦初の乳児期発症の HSD10 病の 1 例

○小林正久(MASAHISA KOBAYASHI)<sup>1</sup>, 目澤秀俊<sup>1</sup>, 梅田千里<sup>1</sup>, 深尾敏幸<sup>2</sup>, 笹井英雄<sup>2</sup>, 重松陽介<sup>3</sup>, 長谷川有紀<sup>4</sup>  
村山 圭<sup>5</sup>, 大橋十也<sup>6</sup>, 井田博幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京慈恵会医科大学 小児科, <sup>2</sup> 岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学, <sup>3</sup> 福井大学医学部健康科学

<sup>4</sup> 島根大学医学部小児科, <sup>5</sup> 千葉こども病院 代謝科

<sup>6</sup> 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 遺伝子治療研究部

【諸言】HSD10 病は世界で約 20 家系報告されている X 連鎖遺伝形式の先天代謝異常症である。ケトン体代謝に関わる有機酸代謝異常症として初めて報告されたが、欠損酵素である 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase(2M3HBD)がミトコンドリア RNaseP の構成タンパクの 1 つであることから病態の本質はミトコンドリア機能障害と考えられており、典型例では生後 6~18 ヶ月から退行を認める予後不良の疾患である。今回、HSD10 病と診断された本邦初の乳児例を経験したので報告する。

【症例】症例は、在胎 37 週、2630g、Apgar スコア 8/9 点で出生した男児。日齢 1 に多呼吸を認め、血液ガス分析で pH 7.130、HCO<sub>3</sub> 4.7mmol/L、Anion Gap 28.1mmol/L、Glucose 21mg/dL、Lactate 19.0mmol/L と Anion Gap の開大を伴う代謝性アシドーシス、低血糖、高乳酸血症を認め入院となった。高カロリー輸液、ミトコンドリアレスキュー薬投与により軽快し、再発を認めなかった。ろ紙血タンデムマス分析では C5:1 の軽度上昇を認め、尿中有機酸分析では 2-methyl-3-hydroxybutyric acid (2M3HB)、tiglylglycine の排泄増加を認めたが、 $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症としては非典型的であった。ミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素活性に異常を認めなかった。生後 4 ヶ月、尿中有機酸分析で 2M3HB と tiglylglycine の排泄増加を認めたが methylacetoacetate の排泄増加を認めず、2M3HBD をコードする HSD17B10 遺伝子に R226Q 変異を認めたことから、HSD10 病と診断した。患児は、生後 5 ヶ月より筋緊張の低下、追視の消失等の退行を認めている。

【考察】HSD10 病は、日本でこれまでに 2 例の報告がある (1 例は本学会で発表) が、幼児期発症の遅発型であり、典型的な乳児型症例は本症例が本邦初となる。HSD10 病は、タンデムマス分析、尿中有機酸分析で異常を認めるものの、有機酸代謝異常症としては非典型的であり、診断に苦慮する。症例を重ね診断法の確立が望まれる。



## Three Patients with HSD10 Disease in Japan.

*Toshiyuki Fukao<sup>1</sup>, Hideo Sasai<sup>1</sup>, Yuka Aoyama<sup>2</sup>, Kazuhisa Akiba<sup>3</sup>, Masahiro Goto<sup>3</sup>, Yukihiro Hasegawa<sup>3</sup>, Masahisa Kobayashi<sup>4</sup>, Hiroyuki Ida<sup>4</sup>, Shohei Akagawa<sup>5</sup>, Tomohiro Hori<sup>1</sup>, Yuki Hasegawa<sup>6</sup>, Seiji Yamaguchi<sup>6</sup>, Yosuke Shigematsu<sup>7</sup>*

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan; <sup>2</sup> Medical Information Sciences Division, United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University, Japan; <sup>3</sup> Tokyo Metropolitan Children's Medical Center, Japan; <sup>4</sup> Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine, Japan; <sup>5</sup> Nakano Children's Hospital, Japan; <sup>6</sup> Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine, Japan; <sup>7</sup> Department of Health Science, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Japan

2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (2M3HBD) deficiency (HSD10 disease) is a rare X-linked recessive inborn error of metabolism, and <30 cases have been reported worldwide. This disorder is typically characterized by progressive neurodegenerative disease from 6 to 18 months of age. Here, we report the first three patients with this disorder in Asia. Case 1 is a 6-year-old boy, who had been well, presented with severe ketoacidosis following a 5-day history of gastroenteritis. Case 2 is a 4-year-old boy, who presented with severe hypoglycaemia and metabolic acidosis, following one day episode of fever and appetite loss. Case 3 is a newborn who presented polypnea with hypoglycaemia, metabolic acidosis and lactic acidosis at the age of 1 day. Their urinary organic acid analysis showed massive excretion of 2-methyl-3-hydroxybutyrate and tiglylglycine and suspected as having beta-ketothiolase deficiency. But later they were revealed to have normal mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase enzyme activity. Hence the diagnosis of beta-ketothiolase deficiency was excluded. Then they were suspected to have HSD10 disease. They were revealed to have hemizygous p.A154T, p.A157V, and p. Q226R mutations, respectively, in HSD17B10 gene. The former two mutations were new mutations whereas p.Q226R mutation was previously reported in a patient with infantile form. Case 1 and Case 2 developed normally and classified to be atypical form of HSD10 disease. Case 3 showed regression from the age of 5 months, consistent with an infantile form. We should consider this disorder if beta-ketothiolase deficiency is suspected by urinary organic acid analysis but is excluded by enzyme assay and/or mutation analysis.

**Keywords:** 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, RNaseP, beta-ketothiolase deficiency

## Ⅱ. 厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

## 研究題名

### 日本における HSD10 病の症例同定と遺伝子診断法の確立

研究分担者 深尾敏幸 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

#### 研究要旨

HSD10 病はイソロイシン代謝系でβ-ケトチオラーゼ欠損症の1つ上流ステップがブロックされる代謝異常症である。世界で報告例は20家系程度である。HSD10 病の遺伝子診断を確立し、2012年アジアで最初の本症患者を同定し、本年度 J. Hum Genet に掲載された。その後本年度に2例の新たな症例が有機酸分析にて疑われ、遺伝子診断にて同定することが出来た。研究代表者のところにはβ-ケトチオラーゼ欠損症の疑いがある場合に相談、診断依頼が全国から集まることにより、本症の可能性のある症例も同様に集まることになる。3年で3名の症例が日本で見つかっており、必ずしも稀な疾患ではない可能性があり、臨床像の検討が必要である。

#### 研究協力者

青山友佳 岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 大学院生／中部大学 生命健康科学部 生命医科学 助教  
笹井英雄 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 大学院生  
小林正久 東京慈恵会医科大学 小児科 講師  
赤川翔平 中野こども病院 小児科

#### A. 研究目的

β-ケトチオラーゼ欠損症と同様の尿有機酸所見を示すが臨床像が異なる疾患として、2001年に世界ではじめての症例が同定されて以降、日本においても本症の可能性について常に考えて、ケトン体代謝異常症の相談を行ってきたが、2012年にアジアではじめての HSD10 病の症例を同定することが出来た。本症は、単にイソロイシン代謝系でβ-ケトチオラーゼ欠損症の1つ上流のステップが障害されるのみでなく、この酵素が多機能蛋白であり、ミトコンドリア内のステロイド代謝、ミトコンドリア RNaseP のコンポーネントとして働くことから、重症例では神経退行を示し予後の悪い疾患である。しかし世界でも報告例は20家系程度であり、まだ十分に臨床像が明らかになっていない疾患でもある。そこで、本年からこの研究班を立ち上げて研究を行うことになった。

#### B. 研究方法

全国からケトン体代謝異常症、β-ケトチオラーゼ欠損症の疑いで、症例の相談を受けているが、その中で HSD10 病の可能性のある症例については、本症の遺伝子検査についても家族の承諾のもとで行った。

遺伝子解析は常法に従い、本症の責任遺伝子 HSD17B10 のゲノム PCR、ダイレクトシーケンスを

行った。

#### C. 研究結果

アジアで最初の症例については J. Hum. Genet に本年掲載された（添付）。その症例は6歳の男児。5日間の胃腸炎による食欲不振の後、強いケトアシドーシスを来した。pH7.01, HCO<sub>3</sub> 2.8mmol/L, 血糖 106mg/dl、乳酸も正常範囲、ケトン体は 14000 micromol/L。尿有機酸分析で、2メチル3ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンが検出され、β-ケトチオラーゼ欠損症が疑われた。しかし T2 の酵素活性は回復して正常で、本症が疑われ、遺伝子解析で A154T 変異が同定され本症と診断された。精神運動発達の退行はなく、これまでの欧米の分類では非典型例となる。その後一度低血糖発作を来している。

本年度2名の新たな症例を、臨床像、有機酸分析結果等から疑い、遺伝子解析にて診断することが出来た。ゲノム PCR、ダイレクトシーケンスは本症が X 染色体劣性遺伝で、患児は原則男児であり、ヘミ接合であるため、比較的容易であった。

その2例については簡単に記載する。（この2例は共同発表として2014年度の日本先天代謝異常学会にて発表しており、その抄録を添付する）。

1例は4歳の男児。前日から発熱、食欲不振、当日意識レベル低下。受診時血糖が 20mg/dl と低血糖あり。そのわりに pH 7.337, BE-7.1 mmol/L, ケトン体は 5400 micromol/L であった、尿有機酸分析で、2メチル3ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンが検出され、β-ケトチオラーゼ欠損症が疑われた。しかしβ-ケトチオラーゼ欠損症ではもし低血糖があれば、もっと強いケトアシドーシスを来すと考えられ、当初から HSD10 病を疑った。遺伝子解析により A157V 変異が同定された。この症例は日本最初の症例と同様に

精神運動発達の退行をしめしていない。また低血糖発作をもう一度起こしているところも最初の報告例と同様である。

日本のHSD10病患者

もう1例は日齢1に多呼吸を呈した男児。日齢1にpH7.130, HCO<sub>3</sub> 4.7mmol/L, 血糖20mg/dl, そして非常に乳酸が高値(19mmol/L)であった。当初ミトコンド

症例	生年	性別	家族歴	初回発作			尿有機酸		現在の年齢	予後	遺伝子変異	特記事項	
				発症時期	誘因	多呼吸	意識障害	TIG					2M3HB
1	2006	M	なし	6Y	胃腸炎	+		+	+	8歳	正常範囲	c.460G>A(p.A154T)	もう一度低血糖発作あり
2	2010	M	なし	4Y	発熱、食欲不振		+	+	+	4歳	正常	c.470C>T(p.A157V)	もう一度胃腸炎で低血糖発作
3	2014	M	なし	1D		+		+	+	9ヶ月	死亡	c.677G>A(p.R226Q, de novo)	4ヶ月頃から退行

リア病が疑われたが、尿有機酸分析で2メチル3ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンが検出され、β-ケトチオラーゼ欠損症が疑われた。しかしβ-ケトチオラーゼ欠損症では新生児期発症は稀で、高乳酸血症も稀なため、相談を受けた段階からHSD10病を疑った。遺伝子解析でR226Qの変異を認め、本症と診断した。母には変異は検出されず de novo であると考えられた。本児と同じ変異がやはり de novo として欧米で新生児発症例で報告されており、本症例も新生児発症で。退行が3ヶ月頃より進行している。

#### D. 考察

本症はイソロイシン代謝においてはβ-ケトチオラーゼ欠損症の1つ上流の代謝ステップが障害される。そのため両者の尿有機酸分析上の違いは、理論的にはβ-ケトチオラーゼ欠損症では2メチルアセト酢酸が検出されるが、本症では2メチルアセト酢酸が出ないことである。しかし尿中の2メチルアセト酢酸は不安定であり、検出が難しい(山口清次分担報告書参照)。β-ケトチオラーゼ欠損症ではコンスタントに2メチルアセト酢酸が検出され、本症では検出されないことが定量的にわかれば、鑑別上重要となる。

本年度同定された2例は臨床的には典型的β-ケトチオラーゼ欠損症と検査所見、発症時期などで異なっていたので本症を疑うことが出来たが、アジア最初の症例は発症時期が遅いことを除けば、発作時の検査所見はむしろβ-ケトチオラーゼ欠損症を疑わせる所見であった。

症例の蓄積と本症の啓蒙が今後重要であると考えられる。

#### E. 結論

HSD10病の遺伝子診断を確立し、2012年アジアで最初の本症患者を同定し、本年度 J. Hum Genet に掲載された。その後本年度に2例の新たな症例を同定することが出来た。今後もβ-ケトチオラーゼ欠損症と本症を鑑別して診断していくことが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. **Fukao T**, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M,

Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. J Hum Genet 59:609-14, 2014

2. Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, **Fukao T**, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. Brain Dev in press.

3. **Fukao T**, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. J Inherited Metab Dis 2014 Jul;37(4):541-51

4. Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. Pediatr Int in press

##### 2. 学会発表

1. Akiba K, **Fukao T**, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake T, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without intellectual disability. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

2. **Fukao T**, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

3. **Fukao T**: Clinical importance of ketone body metabolism and its defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism and

3rd National Conference of ISiEM, Sep 19-21, Hyderabad(India), 2014

4. 青山友佳、市原朋子、山本俊至、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ欠損症において MLPA 法を用いた 1 症例における Uniparental disomy の同定. 日本マススクリーニング学会 8 月 22-23 日 広島 2014

5. 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、囀府寺美、木野稔、**深尾敏幸**、青山友佳、重松陽介: ケトン性低血糖発作を契機に診断した HSD10 病の 4 歳男児. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

6. 折居建治、森本将敬、笹井英雄、松井永子、村上圭、大竹明、**深尾敏幸**: 新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 型異常症の姉弟例の検討 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

7. 小林正久、**深尾敏幸**、重松陽介、長谷川有紀、村山圭、井田博幸: 本邦初の乳児期発症の HSD10 病症例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

8. 青山友佳、山本俊至、坂口直美、石毛美夏、田中藤樹、市原朋子、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ (HMGCL) 遺伝子の MLPA

法確立と HMGCL 欠損症 1 症例における Uniparental disomy の同定. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

9. 笹井英雄 北澤徹三 木村豪 川本典生 川本美奈子 **深尾敏幸** 下澤伸行、山本崇裕 経過中に大脳白質病変を呈したホモシスチン尿症の 1 例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

10. 伊藤哲哉 中島葉子 加藤沙耶香 **深尾敏幸**: ミトコンドリア HMG-CoA 合成酵素欠損症の急性期症状. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

11. **深尾敏幸**、堀友博、笹井英雄、大塚博樹、青山友佳: ACAT1 遺伝子のイントロン 9 への Alu 挿入はエクソン 10 の認識に影響を与える。 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 研究題名

### 日本における HSD10 病のアンケート調査

## 研究分担者

堀 友博 岐阜大学医学部附属病院 小児科 助教  
深尾敏幸 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

## 研究要旨

過去5年間に $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、HSD10 病に特徴的な尿有機酸分析結果を示した症例について、全国で尿有機酸分析を行っている施設、小児科にアンケート調査を行った。4例が典型的パターンを示したが、1例は $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、3例は HSD10 病ですべて既に診断されていた。

## 研究協力者

笹井英雄 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学大学院生  
折居建治 岐阜大学医学部附属病院新生児集中治療部准教授

## A. 研究目的

本邦でアジア初の HSD10 病を報告したが、その他にも本症の可能性のある症例があるかどうかについて検討するためにアンケート調査を行う。

## B. 研究方法

本症の臨床像は多彩であり、臨床像からアンケート行うことは難しいと判断し、今回は特徴的な尿有機酸分析所見に注目し、岐阜大学医学研究等倫理審査委員会の承諾をえた疫学調査を本邦において有機酸分析を行っている施設、ハイリスクタンデムマス分析を行っている施設に対して、疑いをもつ症例濃霧について調査を行った。

## C. 研究結果

「ケトン体代謝異常症、HSD10 病の発症形態と患者数の把握のための疫学研究」という研究題名で倫理審査委員会の承諾を得てアンケート調査を行った。検討の結果以下の所についてアンケートを依頼し、すべての施設から返答を得た。

札幌市衛生研究所  
東京都予防医学協会  
大阪府立母子保健総合医療センター  
化学及血清療法研究所  
久留米大学 医学部  
日本疾患メタボローム解析研究所  
島根大学小児科学  
福井大学小児科学  
千葉こども病院

その結果、過去5年間で典型的な $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損

症もしくは HSD10 病のパターンであるチグリルグリシン、2メチル3ヒドロキシ酪酸の排泄を認めた例は4例で、そのうち1例は $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、3例が HSD10 病であった。これらは既に研究代表者の深尾のところに解析依頼があり、診断のついていた症例であり、未解析例はなかった。

問題となるのは2メチル3ヒドロキシ酪酸の軽度排泄が著しいケトン尿とともに検出された症例である。 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の軽症変異型ではチグリルグリシンが発作時でも排泄されないことがわかっており、これらも $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の可能性を否定出来ない。同時に HSD10 病の可能性も否定出来ないことになる。実際このような非典型例の7例がピックアップされて、そのうちの5例が岐阜大学にて $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の活性測定がなされ、3例については T2 遺伝子、HSD10 遺伝子の解析も行われて異常なし。残り2例についても今度遺伝子解析にて HSD10 遺伝子変異のないことを確認する予定である。

## D. 考察

日本においては $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症が疑われたら、岐阜大学小児科において研究代表者らによって活性、遺伝子診断をするということが行われてきて、典型例についてはすべて症例が集まってきており、同様の有機酸プロフィールを示す HSD10 病も $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の疑いで症例が集まることになり、この3年間で3例の HSD10 病を診断することが出来た。

本症は酵素診断が $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症等と比べると難しく、遺伝子診断をすることになる。

まだ成果でも20家系程度の報告であり、本症の臨床像、予後については不明な点も多く、今後のけん糖が必要である。

## E. 結論

日本で過去5年間に HSD10 病の可能性のある尿有機酸分析パターンを示した症例についてアンケート調査を行い、4例が典型的パターンを示したが、1例は $\beta$ -ケトチ

オラーゼ欠損症、3例は HSD10 病ですべて既に研究代表者によって診断されていた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. **Fukao T**, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59:609-14, 2014

2. Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, **Fukao T**, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain Dev* in press.

3. **Fukao T**, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. *J Inherited Metab Dis* 2014 Jul;37(4):541-51

4. Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* in press

##### 2. 学会発表

1. Akiba K, **Fukao T**, Goto M, kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake T, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without intellectual disability. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

2. **Fukao T**, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014

3. **Fukao T**: Clinical Importance of ketone body metabolism and its defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism and 3rd National Conference of ISIAM, Sep 19-21,

Hyderabad(India), 2014

4. 青山友佳、市原朋子、山本俊至、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ欠損症において MLPA 法を用いた 1 症例における Uniparental disomy の同定. 日本マスキリーニング学会 8 月 22-23 日 広島 2014

5. 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、園府寺美、木野稔、**深尾敏幸**、青山友佳、重松陽介: ケトン性低血糖発作を契機に診断した HSD10 病の 4 歳男児. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

6. 折居建治、森本将敬、笹井英雄、松井永子、村上圭、大竹明、**深尾敏幸**: 新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 型異常症の姉弟例の検討 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

7. 小林正久、**深尾敏幸**、重松陽介、長谷川有紀、村山圭、井田博幸: 本邦初の乳児期発症の HSD10 病症例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

8. 青山友佳、山本俊至、坂口直美、石毛美夏、田中藤樹、市原朋子、大原克明、**深尾敏幸**: HMG-CoA リアーゼ (HMGCL) 遺伝子の MLPA 法確立と HMGCL 欠損症 1 症例における

Uniparental disomy の同定. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

9. 笹井英雄 北澤徹三 木村豪 川本典生 川本美奈子 **深尾敏幸** 下澤伸行、山本崇裕 経過中に大脳白質病変を呈したホモシスチン尿症の 1 例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

10. 伊藤哲哉 中島葉子 加藤沙耶香 **深尾敏幸**: ミトコンドリア HMG-CoA 合成酵素欠損症の急性期症状. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

11. **深尾敏幸**、堀友博、笹井英雄、大塚博樹、青山友佳: ACAT1 遺伝子のイントロン 9 への Alu 挿入はエクソン 10 の認識に影響を与える。

第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## 研究題名

### HSD10 病の予後を規程しうる神経ステロイド代謝測定系樹立

研究分担者 長谷川 行洋

東京都立小児総合医療センター 内分泌・代謝科

研究要旨 本邦初の HSD10 病を経験した。我々の経験した症例は臨床上、神経予後、生命予後ともに良好な非典型症例である。この成因を解明するため、神経ステロイド代謝測定系樹立の第一段階を完了した。

研究協力者 秋葉 和壽（都立小児総合医療センター）

#### A. 研究目的

我々は本邦初の HSD10 病を経験した。HSD10 病は世界で約 20 家系のみ報告されている X 染色体劣性遺伝の先天代謝異常症である。その原因はイソロイシン代謝、神経ステロイド代謝、ミトコンドリアの機能維持と多彩な機能をもつ蛋白である 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA 脱水素酵素 (2M3HBD) の欠損である。典型例では重度の神経発達障害、心筋症をきたす予後不良な疾患である。我々の経験した症例は臨床上、神経予後、生命予後ともに良好な症例であり、8 歳現在重篤な神経症状や合併症を起こしていないという経過で過去の典型的報告と比べ予後に関して非典型例と位置づけられる。これまでの過去の研究によるとイソロイシン代謝は本疾患の神経予後に関与しないとされているが、この予後を規程する因子は不明である。候補となる成因として①神経ステロイドの代謝異常、②ミトコンドリアの機能異常の二つの仮説が報告されている。この両者の測定を簡便に行う方法は現在まで確立されていない。今回、我々は神経ステロイド代謝を評価する測定系を確立することを試みた。

#### B. 研究方法

1) 野生型、変異型 cDNA クローニング；常法に従って行った。  
2) 発現させる細胞のスクリーニング；COS1、CHO 細胞について行った。

#### C. 研究結果

1) 肝 cDNA ライブラリーから野生型 cDNA のクローニング、さらにそこから、変異体作成（我々の症例 A154T を含む 4 種類）をおこなった。  
2) COS1 細胞、CHO 細胞については、RT-PCR、ウエスタンブロットで内因性発現が示唆された。現在、両測定法の特異度の検討を行うとともに、上記 2 種以外の細胞株での検討を予定している。

#### D. 考察

我々と同様の仮説は Song-Yu Yang らの論文 (PNAS. 2009;106(35):14820-14824) に記載され、検討されているが、我々の方法論はタンデムマスで基質からの反応生成物 ( $3\alpha, 5\alpha$ -THDOC, estrone) を評価する点が優れていると考える。

使用する細胞としては、内因性発現がないこと、さらに、理想的には神経系細胞株が望ましいがこういった条件を満たす細胞は現在までみつけることはできていない。今後も検討するが、場合によっては患者自身から iPS 細胞を樹立し、その後 Inoue らの方法 (Cell Metabolsim 2013) を行い神経系細胞を誘導、あるいは著者らとの共同研究を考えたい。

#### E. 結論

今年度は最終的な目的の第 1 段階が終了した。

F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. J Hum Genet. 2014 Nov;59(11):609-14.

2014 Nov;59(11):609-14.

##### 2. 学会発表

秋葉らが、2014 年小児科学会（名古屋）、2014 年国際先天代謝異常学会（インスブルック）にて我々の症例について発表した。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 研究題名

### HSD10 病の生化学診断の問題点の検討

研究分担者 山口清次(島根大学医学部小児科教授)

#### 研究要旨

$\beta$  ケトチオラーゼ (BKT) 欠損症と HSD10 欠損症は、イソロイシンの代謝過程で障害部位が隣接するため異常代謝産物の種類は類似するが、臨床像は大きく異なる。BKT 欠損症は常染色体劣性遺伝疾患で、 $\beta$  酸化系のアセトアセチル-CoA チオラーゼの活性も持つため、ケトアシドーシス発作を主徴とする。一方 HSD10 欠損症は X 連鎖劣性遺伝疾患で男児のみに起こり、コレステロール代謝、RNaseP の障害があるため、進行性の神経障害、高乳酸血症などを呈する。

アシルカルニチン分析では両者とも C5-OH と C5:1 の上昇がみられ、尿中有機酸分析では両者ともに 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸 (2M3HBA) とチグルルグリシン (TG) の増加がみられるが、2-メチルアセト酢酸 (2MAA) の有無が両者の鑑別点となる。しかし  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症の実際の分析では 2MAA が検出されなかった。

本研究でこの原因を検討したところ以下のことが明らかになった。すなわち、①古い検体では凍結保存されたものでも 2MAA は分解して検出できない可能性がある、②生化学的に軽症の BKT 欠損症では、2MAA が検出困難なことがあるので、他の代謝産物の量をみながら判定する必要がある、③尿ろ紙 (室温で乾燥) の検体では 2MAA が分解して検出困難である。以上の点を念頭に置いて、BKT 欠損症、HSD10 欠損症の生化学診断をすべきである。

#### 研究協力者

長谷川有紀 (島根大学医学部小児科助教)  
重松陽介 (福井大学医学部生命科学教授)

#### A. 研究目的

HSD10 欠損症は、に示すようにイソロイシン代謝過程の  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症の酵素欠損部位の上流の 2-メチル-3-ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素 (2M3HBD) の欠損による有機酸異常症 (2M3HBD 欠損症) として 2000 年に初例が報告された (Zschocke et al., Ped Res, 2000)。その後 2M3HBD にあたるタンパクは、コレステロール代謝に働く HSD10 と同一のタンパクであり、また HSD10 は PNaseP の構成タンパクの一つであることもわかり、特異な臨床像との関連が明らかになってきた。そして一般的には 2M3HBD 欠損症ではなく、代わりに「HSD100 欠損症」と呼ばれるようになった。

HSD10 欠損症は、イソロイシン代謝過程の有機酸代謝異常であり、代謝障害部位の上流代謝産物が蓄積するため、有機酸分析、アシルカルニチン分析によって生化学診断が可能である。すなわち、有機酸分析で 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸 (2M3HBA) とその上流のチグルルグリシン (TG) の増加がみられる。アシルカルニチン分析では、C5-OH (2M3HB-カルニチン) と C5:1 (チグルルカルニチン) の増加がみられる。

$\beta$  ケトチオラーゼ欠損症と代謝障害部位が近接しているため、異常代謝産物が類似しているが、2M3HBD より下流の 2-メチルアセト酢酸 (2MAA) は  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症でみられるが HSD10 欠損症ではみられない。この点で両者は鑑別点である。

しかし、多くの  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症患者の分析では、鑑別点となる 2MAA が検出されず、臨床経過から鑑別せざるを得ないことが多かった。そこで本研究において、尿中有機酸分析による 2MAA の検出の問題点について検討した。

#### B. 研究方法

血中アシルカルニチンをブチル誘導体化していたものをタンデムマスによって分析した。前処理はスタンダードな前処理法に準じた (Shigematsu Y, et al., J Chromat B 792: 63-72, 2003)。尿中有機酸は、溶媒抽出-オキシム・トリメチルシリル誘導体化 (oxim-TMS 化) して GC/MS 分析した (Fu XW, et al., J Chromat B 758: 87-94, 2001)。検体は、インド、ベトナムおよび日本人の  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症患者と、HSD10 欠損症の日本人症例 3 例であった。インドおよびベトナムの症例の検体はガスリーろ紙で作られた血液ろ紙、および尿ろ紙の形で送られた。日本人症例は、それぞれ血液濾紙と凍結された尿であった。

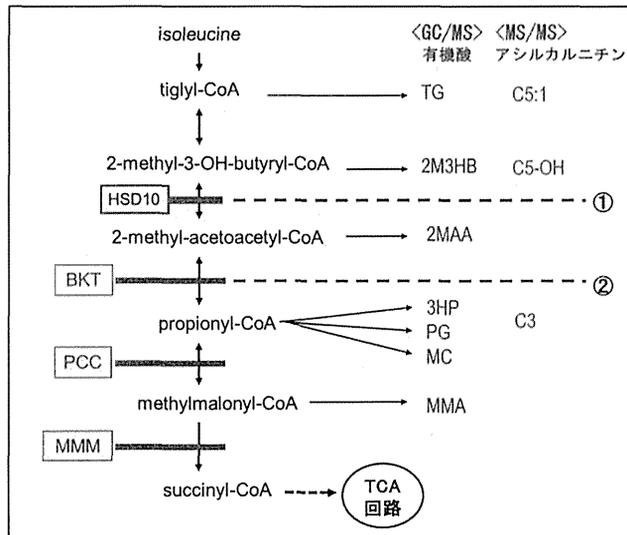


図1. イソロイシンの代謝経路

略字：BKT=βケトチオラーゼ（βケトチオラーゼ欠損症の欠損酵素，短鎖型チオラーゼ，T2 と同義である）；PCC=プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ（プロピオン酸血症の欠損酵素）；MMM=メチルマロニル-CoA ムターゼ（メチルマロン酸血症の欠損酵素）；TG=チグリルグリシン；2M3HBA=2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸；2MAA=2-メチルアセト酢酸；3HP=3-ヒドロキシプロピオン酸；PG=プロピオニルグリシン；MC=メチルクエン酸；MMA=メチルマロン酸。HSD10 欠損症では、①より上の代謝産物が蓄積する。βケトチオラーゼ欠損症では②より上の代謝産物が蓄積する。

### C. 研究結果

#### 1) βケトチオラーゼ欠損症とHSD10欠損症のアシルカルニチン所見と尿中有機酸所見(表1)

βケトチオラーゼ欠損症3例はインド、ベトナムおよび日本人症例でいずれも酵素診断されたものである。このうちインドとベトナムの症例1と2では、アシルカルニチン分析でC5-OHおよびC5:1の上昇がみられたが、日本人の症例3ではアシルカルニチンの上昇はみられなかった。尿中有機酸分析で

は症例1と2では、チグリルグリシン(TG)、および2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸(2M3HBA)の増加がみられ、症例3では2M3HBAの軽度増加のみがみられた。しかし3症例ともに2MAAは認められなかった。

HSD10欠損症(日本人症例)のアシルカルニチン分析所見では、症例1ではC5-OHとC5:1の両方が増加し、症例2ではC5:1のみが上昇していた。症例3ではアシルカルニチン分析はされなかった。尿中有機酸分析所見では、3症例ともにTGおよび2M3HBAの増加がみられた。

表1. アシルカルニチン所見(タンデムマス)と尿中有機酸所見(GC/MS)

分析項目	基準値	βケトチオラーゼ欠損症			HSD10欠損症(日本人)			
		1 (Ind)	2 (VN)	3 (JPN)	1 (11)	2 (13)	3 (14)	
タンデムマス	C5-OH	<0.16	<u>2.98</u>	<u>1.92</u>	0.11	<u>0.19</u>	0.11*	NA
	C5:1	<0.04	<u>0.66</u>	<u>0.78</u>	0.01	<u>0.4</u>	<u>0.63*</u>	NA
GC/MS	TG	nd	<u>853.5</u>	<u>101.7</u>	n.d	<u>3.0</u>	<u>53.24</u>	<u>7.4</u>
	2M3HB	nd	<u>950.4</u>	<u>132.7</u>	<u>23.6</u>	<u>25.31</u>	<u>20.79</u>	<u>15.1</u>
	MAA	nd	?	?	?	nd	n.d*	nd

略字：Ind、インド人症例；VN、ベトナム人症例；JPN、日本人症例(2014年発見)；HSD10欠損症の11、13、および14は検体番号をさしあまり意味はない。TG=チグリルグリシン；2M3HBA=2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸；2MAA=2-メチルアセト酢酸；nd=測定感度以下；NA=測定データなし。測定値の単位：アシルカルニチンはnmol/mL；有機酸分析所見は、内部標準に対する相対面積(%)。

## 2) 尿中有機酸所見

尿中有機酸分析 (GC/MS) のクロマトグラムを図2に示す。HSD10 欠損症では (図 2A) 乳酸の著増の他に 2M3HBA と TG の増加が監察された。 $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症の分析例 (図 2B と 2C) は同一症例 (日本人初例) であるが、分析例 1 (2B) は 1986 年に採取された検体で、分析例 2 (図 2C) は約 6 か月前 (2013 年 12 月) に採取されたものである。分析例 1 も 2 も、2M3HBA と TG が検出されたが、分析例 1 では 2MAA

は検出されず、分析例 2 では 2MAA が検出された。

2MAA の検出過程を図3に示した。すなわち 2MAA の oxim-TMS 誘導体の分子量  $m/z$  275 と推定され、主なフラグメントイオン  $M/z$  260、 $m/z$  186、および  $m/z$  170 のマスクロマトグラフィーによって、メチレンユニット 14.76 の位置に 2MAA と推定されるマススペクトルが同定された。

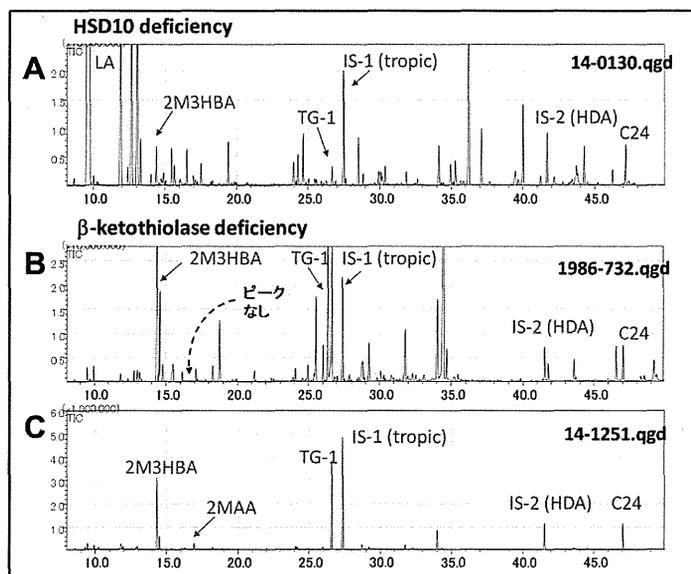


図 2. 尿中有機酸クロマトグラム

A=HSD10 欠損症；B= $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症 (日本人症例、1980 年代に採取された検体)；C=B と同じ症例で 6 か月前に採取された検体 (2013 年 12 月採取)。

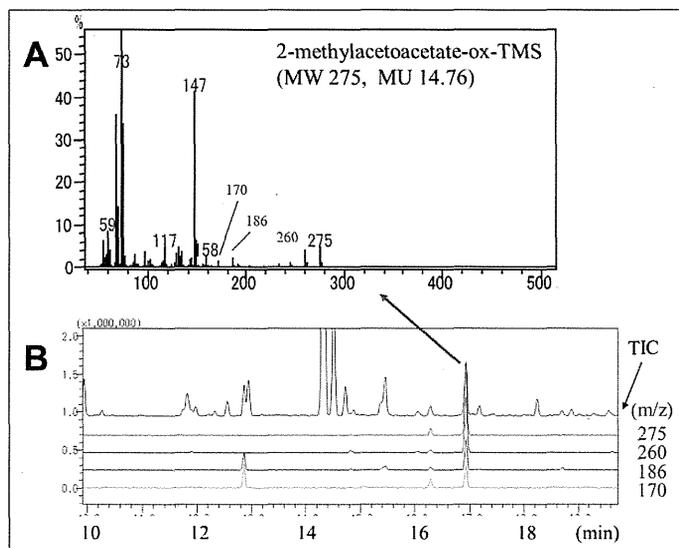


図 3. 2-メチルアセト酢酸の同定とマススペクトル

A=2-メチルアセト酢酸のマススペクトル；B=2-メチルアセト酢酸を検出するためのマスクロマトグラム。略字:TIC=total ion chromatogram