

2015/0017A

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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 深尾敏幸

平成 28 (2016) 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	
添付書類 診断基準	
SSIEM ポスター	

II. 分担研究報告

1. HSD10 の活性測定法の確立	9
研究分担者 深尾敏幸	
2. 日本における HSD10 病の症例同定と遺伝子診断法の確立	11
研究分担者 深尾敏幸	
3. HSD10 病の生化学診断の問題点の検討	13
研究分担者 山口清次	
4. 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	17
研究分担者 長谷川行洋	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	21
-----------------	----

I. 総括研究報告

HSD10 病の発症形態と患者数の、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。昨年度の診断法の確立、患者数把握のためのアンケート調査などに引き続き、本研究班の2年目の活動として、診断基準を策定した。本症はまだ日本で3家系4症例が診断されたのみであるが、診断基準は確立したものの、臨床的多様性に富み治療法が確立されておらず、難病としての研究が必要な疾患である。

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

研究協力者

青山友佳 中部大学生命健康科学部 助教
笹井英雄 岐阜大学医学部附属病院小児科
秋葉和壽 東京都立小児総合医療センター医師
長谷川有紀 島根大学医学部 小児科学 講師
小林正久 東京慈恵会医科大学 小児科 講師
赤川翔平 泉大津市立病院 新生児内科

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。本研究の目的は、発症形態と患者数の把握、診断基準の作成である。

B. 研究方法

1) 診断法の確立

A) 遺伝子診断法の確立（深尾、笹井、堀）：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、笹井）：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) 尿有機酸分析における β -ケトチオラーゼ欠損症とHSD10病の鑑別（山口、長谷川）：尿有機酸分析にて鑑別のkeyとなる2-methylacetoacetateの検出をおこなった。尿中有機酸は、昨年度と同様に溶媒抽出-オキシム・トリメチルシリル誘導体化(oxim-TMS化)してGC/MS分析を行った。検体も昨年と同様にインド、ベトナム、日本のBKT欠損症それぞれ1例ずつと、HSD10欠損症の日本人症例3例を対象とした。インドおよびベトナムの症例では検体は尿ろ紙として送られた。日本人症例は凍結尿を用いた。

2) 症例の経過報告（深尾、長谷川、秋葉、小林、赤川）：日本の症例の主治医の先生方に研究協力者となっていたいただき、この1年間の経過についてまとめた。

3) 診断基準の策定（全員）

深尾がまず昨年度の議論をふまえて草案を作成し、班会議にて検討を加えて策定した。

C. 研究結果

1) 診断法の確立

A) 遺伝子診断法の確立：既に昨年度遺伝子診断は確立した。本年はHSD17B10 cDNAの発現系による変異の評価を行う系の作成に取り組んだ。正常型のcDNAの大腸菌で発現するベクターの構築を行い、発現させ精製を行い、活性のある蛋白を精製することが出来た。変異体の発現は今後の課題である。

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)。この活性測定に必要なcrotonaseという酵素が市販されていることがわかり購入して活性の測定系が確立出来た。患者線維芽細胞において正常細胞に比べあきらかに2M3HBDHの活性の低下を示すことが出来た。

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、その発現細胞の検討をおこなった。

D) 有機酸分析による 2-methylacetoacetate の検出

2MAA は 2013 年に採取・分析された検体では明らかにピークとして検出されたが、1980 年代に採取したマイナス 30 度保管の尿ではピークを認めなかった。

2MAA の oxime-TMS 誘導体の分子量は m/z 275 と推定され、これを C-ion に、フラグメントイオンの中でも特徴的な m/z 260 を Q-ion とし、Q/C 比を 81.4 と設定した。このデータをガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いた自動診断アルゴリズムに組み込んだ。これを用いて再解析を行うと、HSD10 欠損症では未検出だったが、BKT 欠損症ではいずれも検出が可能であった。

2) 症例の経過報告

GHSD10-1: 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。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, HCO₃ 2.8mmol/L, 血糖 106 mg/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 の酵素活性は反復して正常で、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。その後の追跡でも神経学的退行もなく、また低血糖発作もきたしていない。本症例の変異は A154T である。

GHSD10-3: 日齢 1 に多呼吸を呈した男児。日齢 1 に pH7.130, HCO₃ 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 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。本症例も新生児発症で。退行が 3ヶ月頃より進行している。そして生後 9カ月に嘔吐、多呼吸、活気不良をきたし、乳酸が高値 (25mmol/L), pH7.022 の代謝性アシドーシス、心筋症にて死亡した。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、生後 7カ月で死亡しており、同様の経過と考えられた。

GHSD10-2: 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。この症例には 10 歳の兄がおり、これまで異常を指摘されていない。しかし家族解析にて同じ遺伝子変異を認め、尿有機酸、血清アシルカルニチン分析はやはり本症の特徴を持っており、無症状ではあるが本症と診断された。学校も普通学級であるが、IQ はやや低く 74 であり、注意深く経過を観察する必要があると考えられた。この兄弟例の変異は A157V である。

3) 診断基準

1. 疾患概要

HSD10 病は重症例では急激に進行する精神、運動機能の退行、痙攣、失明、進行性心筋症を示す X 染色体劣性遺伝性疾患であるが、臨床的多様性が有ると考えられている。最初イソロイシン代謝系の 2-メチル-3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ (2M3HBD) 欠損症として報告された。尿有機酸分析にて 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンが排泄されるが 2メチルアセト酢酸は検出されないことが特徴である。しかし本酵素は多機能蛋白であり 2M3HBD だけでなくミトコンドリアの 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (HSD10) でもあり、またミトコンドリア機能維持に必須の RNaseP を構成する 3 蛋白の 1 つであることが明らかにされた。この蛋白は HSD17B10 にコードされる。(イソロイシン代謝異常とミトコンドリア機能障害の両方がある)

疫学 世界で 20 家系以上報告されており、日本では 3 家系が報告されている。しかし未診断が多いと考えられる。

2. 臨床病型

- ①新生児期発症型 新生児期に重篤な乳酸アシドーシスで発症し、ほとんど発達をせず、進行性心筋症を合併し生後数ヶ月で死亡する。
- ②乳児期発症型 本症の典型例。新生児期一過性の代謝障害があっても回復し、その後 6ヶ月～18ヶ月間正常に近く発達するが、その後ささいな疾患、予防接種などを契機に進行性の神経退行がみられ、進行性心筋症も合併し、生後 2年～数年で死亡する。
- ③若年発症型 生後 5歳ぐらまでは正常発達し、その後ゆっくりと神経学的退行がみられる。
- ④非典型例 上記に属さない症例が知られている。

3. 主要症状および臨床所見

以下のような臨床所見を示す。

成長障害：進行性の成長障害（低身長，低体重）と小頭症
神経学的所見：上気道炎，胃腸炎などの軽微な疾患や予防接種などを契機に発達退行がはじまり、言語、運動の消失、失調、舞踏病アテトーゼなどを起こす。難治性痙攣を合併する。

眼科的所見：網膜症，失明をきたすこともある。

耳鼻科的所見：難聴を合併することがある。

心臓所見：肥大型もしくは拡張型進行性心筋症を合併する

臨床的に飢餓時に低血糖，ケトーシスなどを伴って発症することがある。

4. 参考となる検査所見

一般血液検査：増悪期に高乳酸血症（L/Pが高い）、アニオンギャップ増大の代謝性アシドーシスが認められる。

頭部MRI：前側頭部もしくは全皮質の萎縮や基底核病変がしばしば認められる。

5. 診断の根拠となる特殊検査

1) 血中アシルカルニチン：

C5:1の異常高値がみられる。C5-OHの異常高値もみられることがある。

2) 尿中有機酸分析：

A) tiglylglycine, 2-methyl-3-hydroxybutyrateの排泄増加

B) 2-methylacetoacetateの排泄増加がない。

ただし2-methylacetoacetateは不安定で検出されないこともあり注意が必要である。

3) 2M3HBD酵素活性 線維芽細胞にて本酵素活性の低下

4) HSD17B10遺伝子解析 本遺伝子にヘミ接合の遺伝子変異が同定される。

6. 鑑別診断

β -ケトチオラーゼ欠損症

臨床像は反復するケトアシドーシスであり、発作時以外は無症状である。発作後遺症がなければ神経学的に正常である。そのためHSD10病の典型例の臨床像とは異なる。尿有機酸分析、血液アシルカルニチン分析結果が酷似しており、非典型例においては鑑別が必要となる。

ミトコンドリア病

本症はミトコンドリア病と臨床像（神経退行、心筋症、網膜症、難聴など）、乳酸アシドーシスなど似ている。尿有機酸分析が鑑別となる。

7. 診断基準

診断の根拠となる特殊検査のうち1)もしくは2)A)を満たすものを疑診、

2)A)をみたしかつB)をみたすか、3)、4)のいずれかを認めれば確定診断とする。

D. 考察

2年間の政策研究事業の2年目で、診断基準案を作成した。本症は世界でも20家系程度の報告で編まれた疾患であり、臨床経過についても、多様性があり、典型的な例では非常に予後は厳しいことがわかっており、比較的臨床経過はよく知られている（日本の症例のGHSD10-3）。しかし非典型例では、どのような臨床経過をとって行くのか不明であり、今後長く調査研究を行うべき疾患である（GHSD10-1, 2とその兄）。

臨床的重症度が本症においては2M3HBDHの残存活性とは関係がなく、もう1つの本酵素の活性である17beta hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD)の活性が関係しているという報告と、本酵素が3サブユニットの1つであるRNasePの活性が関係しているという報告があり、後者を支持する報告が多い。本研究班でも遺伝子診断の一環として変異蛋白の発現とその3つの活性の評価を行う予備的な研究までをすすめることが出来た。今後この部分については他の研究として行って行く必要がある。

診断基準を作成するにあたり、尿の有機酸分析における β -ケトチオラーゼ欠損症融の鑑別が大きな問題であったが、山口らは本研究において鑑別に必要な

2-methylacetoacetateの検出をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC/MS）を用いた自動診断アルゴリズムに組み込んで検出を可能とした。それによって、診断基準を明確化することが出来た。

E. 結論

本年度は本研究班で同定されたHSD10病の3家系4症例の経過観察および最終年度として診断基準策定をおこなった。

F. 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1. 論文発表

Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57:41-48, 2015

2. 学会発表

特別講演海外

1. Fukao T: (Plenary lecture) Ketolysis and Ketogenesis Defects. XIII Metabolic Diseases and Nutrition Congress. April 14-18, Adana (Turkey) 2015
2. Fukao T: Metabolism of ketone bodies and its defects. X Congreso Latinoamericano De Errores Innatos Del Metabolismo Y Pesquisa Neonatal November 17-20 Santiago (Chile) 2015

海外発表

1. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015
2. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015

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

HSD10 病の診断基準

1. 疾患概要

HSD10病は重症例では急激に進行する精神、運動機能の退行、痙攣、失明、進行性心筋症を示す X 染色体劣性遺伝性疾患であるが、臨床的多様性が有ると考えられている。最初イソロイシン代謝系の 2-メチル-3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ (2M3HBD) 欠損症として報告された。尿有機酸分析にて 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンが排泄されるが 2-メチルアセト酢酸は検出されないことが特徴である。しかし本酵素は多機能蛋白であり 2M3HBD だけでなくミトコンドリアの 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (HSD10) でもあり、またミトコンドリア機能維持に必須の RNaseP を構成する 3 蛋白の 1 つであることが明らかにされた。この蛋白は HSD17B10 にコードされる。(イソロイシン代謝異常とミトコンドリア機能障害の両方がある)

疫学 世界で 20 家系以上報告されており、日本では 3 家系が報告されている。しかし未診断が多いと考えられる。

2. 臨床病型

- ①新生児期発症型 新生児期に重篤な乳酸アシドーシスで発症し、ほとんど発達をせず、進行性心筋症を合併し生後数ヶ月で死亡する。
- ②乳児期発症型 本症の典型例。新生児期一過性の代謝障害があっても回復し、その後 6 ヶ月～18 ヶ月間正常に近く発達するが、その後ささいな疾患、予防接種などを契機に進行性の神経退行がみられ、進行性心筋症も合併し、生後 2 年～数年で死亡する。
- ③若年発症型 生後 5 歳ぐらいまでは正常発達し、その後ゆっくりと神経学的退行がみられる。
- ④非典型例 上記に属さない症例が知られている。

3. 主要症状および臨床所見

以下のような臨床所見を示す。

成長障害：進行性の成長障害（低身長，低体重）と小頭症

神経学的所見：上気道炎，胃腸炎などの軽微な疾患や予防接種などを契機に発達退行がはじまり、言語、運動の消失、失調、舞踏病アテトーゼなどを起こす。難治性痙攣を合併する。

眼科的所見：網膜症，失明をきたすこともある。

耳鼻科的所見：難聴を合併することがある。

心臓所見：肥大型もしくは拡張型進行性心筋症を合併する

臨床的に飢餓時に低血糖，ケトーシスなどを伴って発症することがある。

4. 参考となる検査所見

一般血液検査：増悪期に高乳酸血症 (L/P が高い)，アニオンギャップ増大の代謝性アシドーシスが認められる。

頭部 MRI：前側頭部もしくは全皮質の萎縮や基底核病変がしばしば認められる。

5. 診断の根拠となる特殊検査

1) 血中アシルカルニチン：

C5:1の異常高値がみられる。C5-OHの異常高値もみられることがある。

2) 尿中有機酸分析：

A) tiglylglycine, 2-methyl-3-hydroxybutyrateの排泄増加

B) 2-methylacetoacetateの排泄増加がない。

ただし2-methylacetoacetateは不安定で検出されないこともあり注意が必要である。

3) 2M3HBD酵素活性 線維芽細胞にて本酵素活性の低下

4) HSD17B10遺伝子解析 本遺伝子にヘミ接合の遺伝子変異が同定される,

6. 鑑別診断

β -ケトチオラーゼ欠損症

臨床像は反復するケトアシドーシスであり、発作時以外は無症状である。発作後遺症がなければ神経学的に正常である。そのためHSD10病の典型例の臨床像とは異なる。尿有機酸分析、血液アシルカルニチン分析結果が酷似しており、非典型例においては鑑別が必要となる。

ミトコンドリア病

本症はミトコンドリア病と臨床像（神経退行、心筋症、網膜症、難聴など）、乳酸アシドーシスなど似ている。尿有機酸分析が鑑別となる。

7. 診断基準

診断の根拠となる特殊検査のうち 1) もしくは 2) A) を満たすものを疑診、
2) A) をみたしかつ B) をみたすか、 3), 4) のいずれかを認めれば確定診断とする。

研究班 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班

Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan.

Fukao T¹, Sasai H¹, Aoyama Y², Akiba K³, Goto M³, Hasegawa Y³, Kobayashi M⁴, Ida H⁴, Akagawa S⁵, Hasegawa Y⁶, Yamaguchi S⁶, Shigematsu Y⁷

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

ABSTRACTS

Background: 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) is a rare X-linked recessive inborn error of metabolism, typically characterized by progressive neurodegenerative disease. Less than 30 cases have been reported worldwide.
Case reports: We report three patients from Japan. Case 1 is a 6-year-old boy, who presented with severe ketoacidosis following 5-day history of gastroenteritis. Case 2 is a 4-year-old boy, who presented with hypoglycaemia and metabolic acidosis, following one day episode of fever and appetite loss. Case 3 is a newborn who presented with hypoglycaemia, lactic acidosis at the age of 1 day. Their urinary organic acid analysis showed massive excretion of 2-methyl-3-hydroxybutyrate and tiglylglycine: mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (MAT) deficiency was suspected. However, MAT enzyme activity was found to be normal. They were identified to be hemizygous for p.A154T, p.A157V, and p.Q226R mutations, respectively, in HSD10 gene. The former two mutations were new mutations.
Discussion: 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 infantile form. There is wide clinical heterogeneity in this disorder and we added two patients to atypical form. We are now characterizing mutations identified in these patients.

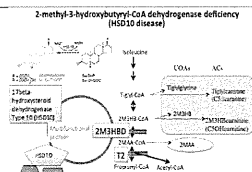
Keywords: 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, RNaseP, beta-ketothiolase deficiency

INTRODUCTION

The HSD10 disease, originally described as 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (2M3HBD) deficiency, is a rare X-linked recessive disorder caused by a mutation in the HSD10 gene. This gene encodes a multifunctional protein that has 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity as well as 2M3HBD activity, and which is also an essential component of mitochondrial RNase P, being required for tRNA processing in mitochondria.

This disorder was first identified in a patient with progressive infantile neurodegeneration whose urinary organic acid profile was suspected to be due to β -ketothiolase (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase; T2) deficiency in isoleucine catabolism. However, the clinical presentation of that patient was different from that of typical T2 deficiency, which is characterized by intermittent ketoacidosis and no clinical symptoms between crises, and typically normal development. Only 20 affected families have been reported to date. Typically, the HSD10 disease is characterized by a progressive neurodegenerative course from 6–18 months of age, in conjunction with retinopathy and cardiomyopathy leading to death at the age of 2–4 years or later⁵. However, clinical heterogeneity is noted in this disorder. An atypical milder presentation was reported in three families.

Recently we published a case of a 6-year-old Japanese boy with the HSD10 disease, and within these two years, we identified two other patients with HSD10 disease in Japan. We herein describe these three Japanese cases and discuss clinical phenotypes and pathophysiology of this disorder.



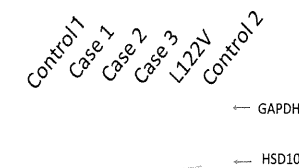
Results of Newborn Screening (NBS) using TandemMass.

In both patients, C5:1 level was very high but C5OH level was under cutoff limit. These two markers are used for screening of beta-ketothiolase deficiency. Elevated C5:1 may be a useful marker for this disorder.

		C5:1	C5OH
Case 2	day 5	0.07	0.59
	re-exam	0.09	0.29
Case 3	day3	0.105	0.25
control	cut off	0.01	1.0

Results of immunoblot analysis.

HSD10 protein was detected in all fibroblasts from cases 1-3. However, the amount of HSD10 protein was reduced in Case 3 and not reduced in Cases 1 and 2.



Case 1(6-year-old Japanese boy) This case was reported in J Hum Genet 2014

[chief complaint] abdominal pain and vomiting
[present illness] he had abdominal pain, nausea, appetite loss for 5 days before he came to the ER. He was admitted to the hospital because of dehydration and severe metabolic acidosis.

[past history] nothing particular, normal growth and development
[physical exam] Height 108cm, body weight 18.3kg(2kg), HR 128/min, RR 32/min, liver not palpable
[laboratory data]

BGA (Vein): pH 7.103, pCO₂ 9.2 mmHg, HCO₃ 2.8 mmHg, Lac 2.4 mmol/L, AG 22.8 mmol/L, Glu 106 mg/dL, Total ketone body 14,000 μmol/L, acetoacetate 1,266 μmol/L, 3OH butyrate 12,734 μmol/L

Urinary organic acid analysis: Tiglylglycine⁺, 2-methyl-3-OH butyrate⁺
[Clinical course] he was successfully treated with intravenous glucose infusion and discharged from the hospital on day 7. Based on the result of urinary organic acids, beta-ketothiolase deficiency was first suspected but excluded by enzyme assay and mutation analysis.

2nd episode

[chief complaint] abdominal pain and lethargy
[present illness] One month after the last hospitalization, he developed abdominal pain and lethargy
[laboratory data]

BGA (Vein): pH 7.29, pCO₂ 36.4 mmHg, HCO₃ 17.5 mmHg, Lac 5.5 mmol/L, AG 22.8 mmol/L, Glu 25 mg/dL,
Urinary organic acid analysis: Tiglylglycine⁺, 2-methyl-3-OH butyrate⁺, no 2-methylacetoacetate

[present neurological status] verbal IQ of 112, performance IQ of 64, full scale IQ of 88 (WISC)
Cerebral MRI and MRS yielded normal findings at the age of 6.5 years

Case 2(4-year-old Japanese boy)

[chief complaint] Unconsciousness
[present illness] he had 1 day history of high fever (39°C) and appetite loss, nausea, appetite loss. He was referred to the hospital because of unconsciousness.

[past history] nothing particular, normal growth and development
[physical exam] Height 90.5cm(-1.5SD), body weight 12.7kg(-1.7SD), HR 114/min, liver not palpable
[laboratory data]

BGA (Vein): pH 7.337, pCO₂ 33.8 mmHg, HCO₃ 17.7 mmHg, Lac 2.73mmol/L, Glu undetectable mg/dL, Total ketone body 5460 μmol/L, BUN 34.1mg/dl

Urinary organic acid analysis: Tiglylglycine⁺, 2-methyl-3-OH butyrate⁺
[Clinical course]

After infusion of glucose, BS was 119mg/dl. He became well and started oral food intake. However, 3rd hospital day, he complained epigastric pain and had melena. His Hb level was decreased to Hb 8.4g/dl. He was then diagnosed as having duodenal ulcer with which he need extra two weeks hospitalization. Beta-ketothiolase deficiency was first suspected with the data of urinary organic acid analysis

6 months later, he developed hypoglycemia again after febrile illness. His blood pH 7.366, CO₂ 23.9, HCO₃ 13.4, BE -9.8, Glu 32mg/dl, TKB 3900 μmol/L. He responded intravenous glucose promptly.

[Present neurological status] DQ 89 (Kyoto Scale of Psychological Development, 20)
[Familial analysis] His elder brother (10 year old) has the same mutation but no significant clinical episodes

Case 3 (1-day-old Japanese boy)

[chief complaint] polypnea
[present illness] he was born to non-consanguineous parents on 37W1D gestation by CS since the mother developed HELLP syndrome. Polypnea was noted at the age of 20 hr. Blood pH 7.130, PCO₂ 14.6, HCO₃ 4.7mmol/L, BE -24.5 mmol/L, Glucose 21mg/dl and Lactate 10 mmol/L. Because of hypoglycemia and lactic acidosis, he was on intravenous glucose infusion (10% glucose) and transferred to the NICU of Tokyo Jikei Medical University.

[physical exam] Height 48.9cm, body weight 2630g, HR 144/min, RR 36/min, liver not palpable
[laboratory data]

BGA (A): pH 7.208, pCO₂ 11.9 mmHg, HCO₃ 4.6 mmHg, Lac 15.25 mmol/L, Glu 145 mg/dl, BUN 10 mg/dl, NIE 136 μg/dl

[Clinical course]

He was first suspected to have a mitochondrial disease, and treated with intravenous fluid and vitamin cocktail, L-carnitine, etc. He was recovered from lactic acidosis within 5 days. Later urinary acid analysis showed elevated levels of tiglylglycine and 2-methyl-3-OH butyrate, suspecting beta-ketothiolase deficiency. After recovery from the neonatal episode, his development seemed normal but at 5 months of age, he was revealed to be hypotonic and started regression with mild hyperlactic acidemia and died at 9 months of age, due to cardiomyopathy.

Urinary organic acid analysis of cases 1 and 2, compared with T2 deficient patients

	Case 1		Case 2		T2D		T2D		Controls	
	acute phase	asymptomatic phase	acute phase	asymptomatic phase	acute phase	asymptomatic phase	ketotic phase	asymptomatic phase	mean±SD	
2M3HB	262	132.6	830	91.8	130 ⁺	91.8	121.6		4.4±4.0	
Tiglylglycine	0.1	268.9	252.6	207.7	212.4	212.4	2.7		2.2±4.3	
2MSA	0.0	0.7	0.1	0.1	69.4	2.8	64.0			
3HB	1716.1	3	3329.6	1.9	5.4	6295	27.8±21.5			

Japanese HSD10 patients

Case	Birth year	Sex	FH	1st episode	UAs	present	hypoglycemic	neurological	prognosis	gene							
	year	onset	preceding disease	polypnea	unconsciousness	Glucose	pH	HCO ₃	BE	Lac	TKB	2M3HB	age	episodes	regression	mutations	
1	2006	M	No	6y	gastroenteritis	+	106	7.01	2.8	26.4	+	+	8y	1	-	WNL	c.460C>A(p.A154T)
2	2010	M	No	4y	fever, appetite loss	+	<20	7.34	17.7	7.1	30	+	4y	2	-	WNL	c.470C>T(p.A157V)
3	2014	M	No	1D		+	21	7.13	4.7	20.4	139	+	8m	2	after 4mo	deceased	c.877C>A(p.R226Q) de novo

	Neonatal form	Infantile form	Juvenile form	Atypical form	MRSKSL0 form
Previous cases	3	More than 13	1	3 from 1 family	1 family

	Neonatal form	Infantile form	Juvenile form	Atypical form	MRSKSL0 form
UOAs	+	+	+	+	-
Mutations	p.N247S, p.R226Q, p.D86G	p.R130C	p.E249Q	p.R165H, p.A154T, p.A157V	c.S74C>A Splicing variant
Japanese cases		Case 3 between two forms		Case 1 and Case2	

Discussion

We herein described three HSD10 disease patients from Japan. In Asai, one Chinese patient was recently reported in 2013 in a Chinese Journal. Hence HSD10 disease is a rare disorder but may be identified in any Asian population. There are broad clinical heterogeneity in HSD10 disease. As shown in the above table, Zschoke divided clinical phenotypes into 4 forms, the classical presentation that is observed in most patients, which is called the infantile form. Our cases 1 and 2 had typical urinary organic acid profiles but they developed normally until now. Hence, according to Zschoke's classification, they are classified into atypical form. Their mutations, A154T and A157V were new mutations. Our case 3 had a transient neonatal metabolic decompensation and deteriorated from 4 months of age and died on 9 months. Hence he can be classified into either of neonatal or infantile form.

In HSD10 disease, phenotype/genotype correlation may be present. The defect of 2M3HBD activity was appeared not to correlate with clinical severity. The defect of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity or the defect of RNaseP function has been suspected to correlate with clinical severity. We are now preparing expression vectors of all these mutations and would like to perform enzyme assays for 2M3HBD and to analyze stability as a RNaseP complex. These analyses will help our understanding of pathophysiology of HSD10 disease

References

Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriama 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

II. 分担研究報告

研究題名

HSD10 の活性測定法の確立

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。本症の HSD10 の活性の一つである 2-methyl-3-hydroxybutyrate dehydrogenase(2M3HBD)活性を皮膚線維芽細胞にて安定して測定出来る系を確立することが出来た。

研究協力者

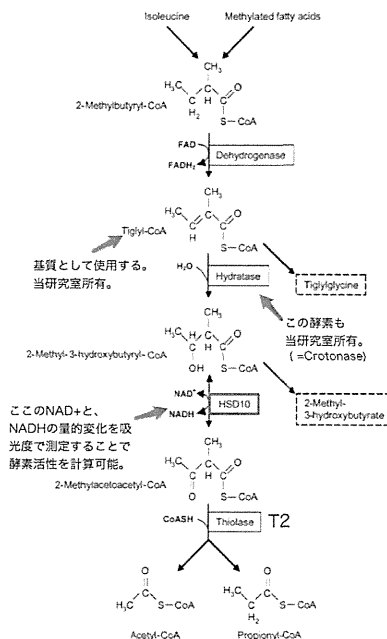
笹井英雄 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学
 大学院生

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。本研究の目的は、発症形態と患者数の把握、診断基準の作成である。

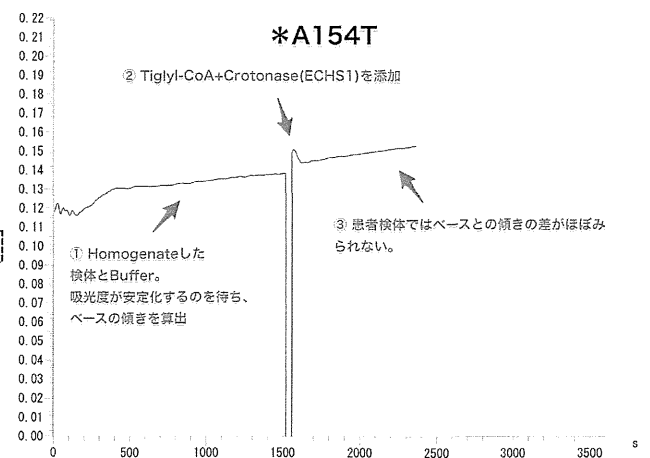
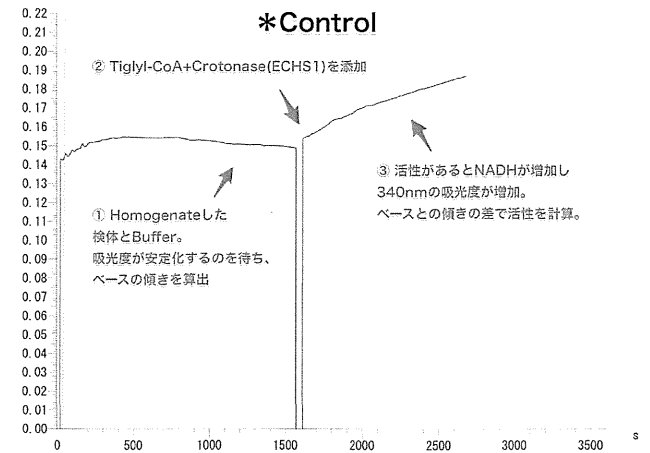
B. 研究方法

本症の酵素活性測定は、吸光度計を用いたカップリングアッセイ(Zschocke J, et al. Pediatr Res. 2000)により可能である。基質として Tyglyl-CoA を用いる。右図で示すように NAD⁺と NADH の量的変化を吸光度で測定することで、皮膚線維芽細胞による HSD10(2M3HBD)活性を測定する。



C. 研究結果

既に報告した症例の酵素活性について、再検討を行った。皮膚線維芽細胞による HSD10(2M3HBD)活性の結果を示す。下図のように、Control と比較し HSD10 病患者(A154T 変異)では酵素活性の低下を認めた。(Control; 1.27mU/mg protein、A154T; 0.11mU/mg protein)



D. 考察

本症の病態としてはイソロイシン代謝系やミトコンドリア内コレステロール代謝系などの酵素活性低下だけでなく、RNaseP の構成タンパクの機能低下が本態であるともいわれているが (Zschocke J, et al. J Inherit Metab Dis. 2012)、それらと臨床像との関連は報告も限られており、詳しい病態は不明な部分が多い。今後、イソロイシン代謝系の HSD10 (2M3HBD) 活性と臨床像をさらに詳細に検討していく上でも今回の酵素測定系の確立は重要であると考えられる。

E. 結論

今回の検討から皮膚線維芽細胞において本疾患原因酵素である HSD10 (2M3HBD) の活性を安定して測定することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57:41-48, 2015

2. 学会発表

特別講演海外

1. Fukao T: (Plenary lecture) Ketolysis and Ketogenesis Defects. XIII Metabolic Diseases and Nutrition Congress. April 14-18, Adana (Turkey) 2015
2. Fukao T: Metabolism of ketone bodies and its defects. X Congreso Latinoamericano De

Errores Innatos Del Metabolismo Y
Pesquisa Neonatal November 17-20
Santiago (Chile) 2015

海外発表

1. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015
2. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015

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た。その後昨年度に2家系2症例の新たな症例を診断した。本年度さらにそのうち1家系の患者の無症状の兄も本症であると診断した。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。むしろ β -ケトチオラーゼ欠損症より多く、3年で3家系4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。

研究分担者

堀 友博 岐阜大学医学部附属病院小児科助教

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

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シングを行った。

C. 研究結果

本研究を開始して、それまで1例であった症例数が3家系4症例となった。その遺伝子変異の解析等は昨年度報告した。

臨床経過のまとめ

昨年の報告書にも記載したが症例に限られており再掲載する。

GHSD10-1: 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。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, HCO₃ 2.8mmol/L, 血糖 106 mg/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。その後の追跡でも神経学的退行もなく、また低血糖発作もきたしていない。本症例の変異は A154T である。

GHSD10-3: 日齢1に多呼吸を呈した男児。日齢1に pH7.130, HCO₃ 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

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。本研究の目的は、発症形態と患者数の把握、診断基準の作成である。

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。

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。本症例も新生児発症で、退行が 3 ヶ月頃より進行している。そして生後 9 カ月に嘔吐、多呼吸、活気不良をきたし、乳酸が高値 (25mmol/L), pH7.022 の代謝性アシドーシス、心筋症にて死亡した。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、生後 7 カ月で死亡しており、同様の経過と考えられた。

GHSD10-2: 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 2.0mg/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。この症例には 10 歳の兄がおり、これまで異常を指摘されていない。しかし家族解析にて同じ遺伝子変異を認め、尿有機酸、血清アシルカルニチン分析はやはり本症の特徴を持っており、無症状ではあるが本症と診断された。学校も普通学級であるが、IQ はやや低く 74 であり、注意深く経過を観察する必要があると考えられた。この兄弟例の変異は A157V である。

D. 考察

日本の 1 症例 (GHSD10-3) は変異が R226Q 変異で、欧米から報告された新生児発症型とほぼ同様の経過で 1 歳前に亡くなっており、本症の重症型が予後が悪いことはこれまでの欧米からの報告通りである。あとの 2 症例とその兄の 3 例においては神経学的退行は認められず、非典型型に分類される。本年の SSIEM において、ブラジルから遺伝子変異 (A158V) も非常に近い非典型例で、20 歳代でパーキンソン病様症状を発症した症例が報告されており、今後日本の非典型例も注意深い経過観察が必要と考えられた。

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。その後本研究期間中に 2 家系 3 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

Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57:41-48, 2015

2. 学会発表

特別講演海外

1. Fukao T: (Plenary lecture) Ketolysis and Ketogenesis Defects. XIII Metabolic Diseases and Nutrition Congress. April 14-18, Adana (Turkey) 2015
2. Fukao T: Metabolism of ketone bodies and its defects. X Congreso Latinoamericano De Errores Innatos Del Metabolismo Y Pesquisa Neonatal November 17-20 Santiago (Chile) 2015

海外発表

1. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015
2. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015

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

β ケトチオラーゼ (BKT) 欠損症と 2-メチル-3-ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素 (HSD10) 欠損症はいずれもイソロイシンの代謝過程における酵素障害により発症する。臨床症状は大きく異なるが、尿中有機酸分析はよく似ており、2-メチルアセト酢酸 (2MAA) 排泄の有無によって鑑別が可能とされる。しかし古い検体や尿ろ紙を用いた検体では、保存状況によって 2MAA の検出が困難であることを昨年度に明らかにした。

今年度は GC/MS を用いた 2MAA の診断アルゴリズムの設定条件を検討し、昨年と同じ検体を用いて再度 2MAA の検出を試みた。すると HSD10 欠損症では全く検出されず、BKT 欠損症ではごく微量ではあるが、古い検体や尿ろ紙検体でも検出が可能となり、鑑別が可能であった。

研究協力者

長谷川有紀 (島根大学医学部小児科助教)
中川勝博 (島津製作所分析計測事業部)

A. 研究目的

HSD10 欠損症は、イソロイシン代謝過程において、 β ケトチオラーゼ (BKT) 欠損症の酵素欠損部位の 1 つ上流にある 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代謝異常症である (図 1)。

代謝障害部位の上流代謝産物が蓄積するため、尿中有機酸分析では HSD10 欠損症も BKT 欠損症も 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸 (2M3HBA) とその上流のチグリルグリシン (TG) の増加がみられる。一方、2M3HBD より下流にある 2-メチルアセト酢酸 (2MAA) は BKT 欠損症でみられる一方、HSD10 欠損症ではみられないことから、両者の鑑別に重要である。

しかし、昨年の検討で、古い検体や尿ろ紙を用いた検体では、BKT 欠損症患者であっても 2MAA が検出されないことが多いことが明らかとなった。

今回、2MAA のピークが検出できるよう診断アルゴリズムの設定条件を検討し、経過観察のために採取した患者の尿とともに、改めて古い検体や尿ろ紙も分析・検討した。

B. 研究方法

尿中有機酸は、昨年度と同様に溶媒抽出-オキシム・トリメチルシリル誘導体化 (oxim-TMS 化) して GC/MS 分析を行った。検体も昨年と同様にインド、ベトナム、日本の BKT 欠損症それぞれ 1 例ずつと、HSD10 欠損症の日本人症例 3 例を対象とした。インドおよびベトナムの症例では検体は尿ろ紙として送られた。日本人症例は凍結尿を用いた。

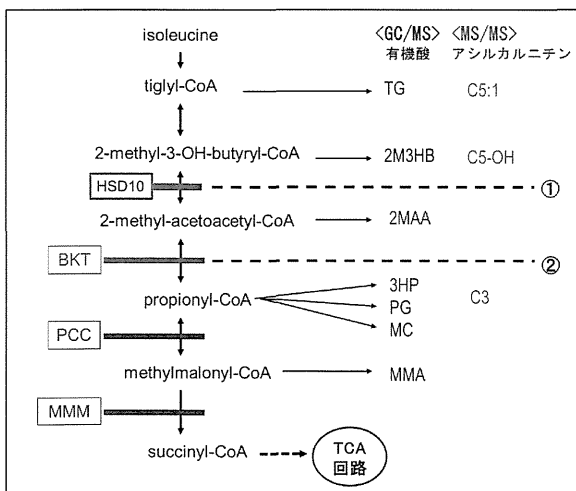


図 1. イソロイシンの代謝経路

略字：BKT=βケトチオラーゼ
PCC=プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ
MMM=メチルマロニル-CoA ムターゼ
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より上流の代謝産物が蓄積する。
BKT 欠損症では②より上流の代謝産物が蓄積する。

C. 研究結果

1) BKT 欠損症と HSD10 欠損症における 2MAA の検出状況

2MAA は図 2 のように 2013 年に採取・分析された検体では明らかにピークとして検出されたが、1980 年代に採取したものではピークを認めなかった。

2MAA の oxime-TMS 誘導体の分子量は m/z 275 と推定され、これを C-ion に、フラグメントイオンの

中でも特徴的な m/z 260 を Q-ion とし、Q/C 比を 81.4 と設定した。このデータをガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いた自動診断アルゴリズムに組み込んだ。

これを用いて再解析を行うと、図 3 のように HSD10 欠損症では未検出だったが、BKT 欠損症ではいずれも検出が可能であった。

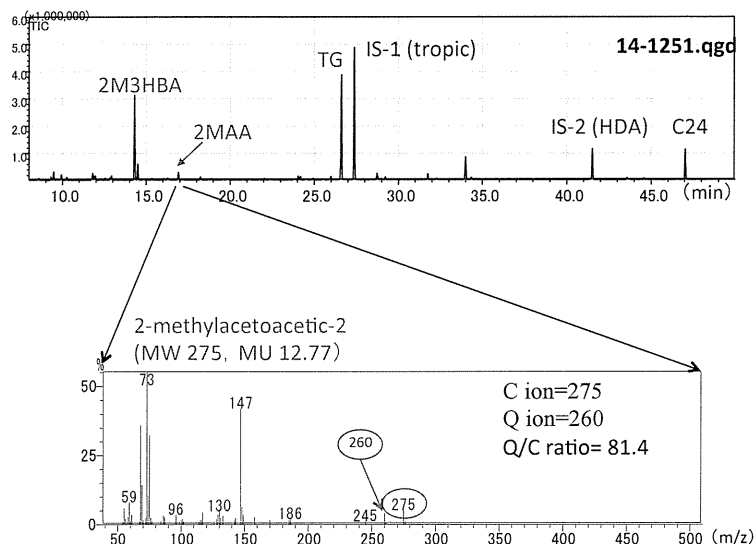
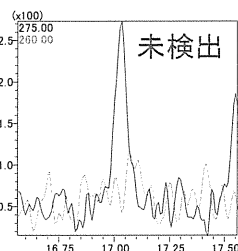


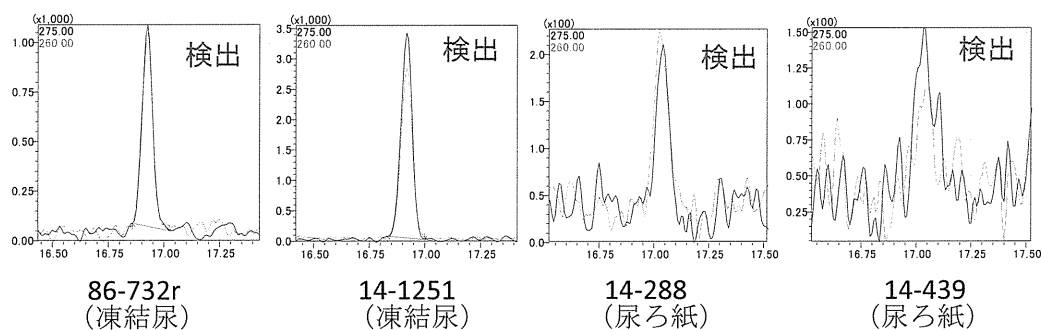
図 2. HSD10 欠損症例 (14-1251. qgd) の尿中有機酸所見とマススペクトル
略字：TG=チグリルグリシン；2M3HBA=2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸；
2MAA=2-メチルアセト酢酸；IS=内部標準物質；MW=質量；
MU=メチレンユニット。

HSD10



13-0086r
(凍結尿)

βケトチオラーゼ欠損症



86-732r
(凍結尿)

14-1251
(凍結尿)

14-288
(尿ろ紙)

14-439
(尿ろ紙)

図 3. 2-メチルアセト酢酸(2MAA)の同定

HSD10 欠損症では検出できないが、βケトチオラーゼ欠損症では検出される。
各図の下の数字は検体番号。

D. 考察

BKT 欠損症と HSD10 欠損症は、イソロイシンの代謝過程では近接した部位の代謝障害だが、臨床像は大きく異なる。しかし、両者は代謝産物のプロフィールが類似しており、尿中有機酸分析で 2MAA の検出の有無が重要な鑑別点となる。しかし昨年度の検討では 2MAA が検出されるべき BKT 欠損症例の多くで検出ができなかった。これは尿ろ紙を室温で保存したり、一定期間以上経過した古い検体では 2MAA が分解されてしまうことや、日本人症例がいわゆる軽症型のために 2MAA の排泄量が少ないことが原因と考えられた。

今回は、2MAA の oxim-TMS 誘導体の分子イオン m/z 275 とフラグメントイオンの 1 つである m/z 260 を組み合わせて GC/MS の自動診断アルゴリズムを設定したところ、BKT 欠損症の検体ではいずれも 2MAA の検出が可能となり、HSD10 欠損症との鑑別が可能であった。

ただし、凍結尿では単独のピークとして検出できたが、尿ろ紙では検出できてもごく微量であった。これはやはり尿ろ紙では 2MAA が分解されやすいためと考えられる。分析の際には検体の保存状況などにも注意を払い、ピークの十分な確認が必要である。

E. 結論

BKT 欠損症と HSD10 欠損症の鑑別には尿中有機酸分析において、2MAA の有無が重要である。GC/MS 分析の自動診断アルゴリズムの設定条件を検討し、2MAA の検出が可能となった。ただし、検体の条件によっては非常に微量しか検出されない場合があるため、臨床症状とともにピークの十分な確認が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto Y: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*

36(2): 232-239, 2015

- 2) Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, Yamaguchi S, Ino K: Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 41(5): 799-802, 2015
- 3) 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 and Development* 37(7): 698-703, 2015

2. 学会発表

- 1) Pitt JJ, Peters H, Ferdinandusse S, Ruiter J, Wanders RJA, Yaplito-Lee J, Kok F, Boy R, Korman SH, Fitzsimons PE, Crushell E, Hughes J, Yamaguchi S, Goto Y, Wakamatsu N, Yokochi K, Yamada K, Chen BC, Ngu LH: Leigh disease and the valine pathway. *Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2015*. Lyon, France, September 2015
- 2) Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. *Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2015*. Lyon, France, September 2015

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

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, 293 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、RTPCR、ウエスタンブロットで内因性発現が確認された。
3) 培養細胞上清を使い、タンデムマス法により神経ステロイド特に $3\alpha, 5\alpha$ -THDOC、estrone、estradiol を測定する系を確立した。

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、estradiol) 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。

今後は患者自身から iPS 細胞を樹立し、本疾患原因遺伝子に変異を導入し、その後 Inoue らの方法 (Cell Metabolsim 2013) を行い神経系細胞を誘導する研究を考えたい。詳細は示さないが変異を CRISPR/Cas9 法を用いて導入する技術まで確立している。

E. 結論

今年度は最終的な目的の第 1 段階が終了した。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表

1. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015
2. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表(分担報告書)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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,	The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation.	J Hum Genet	59	609-614	2014
Fukao T, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y	. Ketone body metabolism and its defects.	J Inherited Metab Dis	37	541-551	2014
Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, Fukao T	Inborn errors of ketone body utilization.	Pediatr Int	I57	41-48	2015