

2015/0017B

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 26～27 年度 総合研究報告書

研究代表者 深 尾 敏 幸

平成 28 (2016) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

- 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

添付資料

日本先天代謝異常学会抄録、ACIMD の抄録 SSIEM ポスター、診断基準

1. HSD10 の活性測定法の確立 …………… 12
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 …………… 14
研究分担者 堀 友博
研究分担者 深尾敏幸
3. 日本における HSD10 病の症例同定と酵素診断、遺伝子診断法の確立 …… 16
研究分担者 深尾敏幸
4. HSD10 病の生化学診断の問題点の検討 …………… 19
研究分担者 山口清次
5. 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 …………… 24
研究分担者 長谷川行洋

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 27

III. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 29

I. 総合研究報告

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

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(平成26年度)には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、2014 年には J. Hum Genet に掲載された。2年目(平成27年度)には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 岐阜大学大学院医学系研究科大学院
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。そこで、平成26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。

B. 研究方法

1) 診断法の確立

A) 遺伝子診断法の確立(笹井、堀、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(笹井、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) 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 活性測定法の検討(秋葉、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(長谷川有紀、山口)：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
島根大学小児科学
福井大学小児科学
千葉こども病院

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) 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。

5) 診断症例の検討（山口、深尾、長谷川、長谷川有紀、秋葉、青山、笹井、小林、赤川）

診断された症例の臨床症状、臨床検査、経過について検討を行う。

6) 診断基準の策定（全員）

以上の検討をもとに診断基準を策定する。

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	sense	antisense
exon 1	5'-g.470ATCCCCATCCCGTGGAGTGG	5'-g.683AGTGCTGACTTTCACCTCTTGA
	5'-g.810GGAGAAGCAGCACACCTAGT	5'-1279TCCCACAGTGCTTGAAGGCT
exon 3,4,5	5'-g.2309CCTCTCCCTTCTCACAAATCT	5'-g.3139TGCTGCTGCTTAGGTGGTGGAT
	5'-g.3130AGCAGCAGCAGCCTTTTATCT	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）。

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：

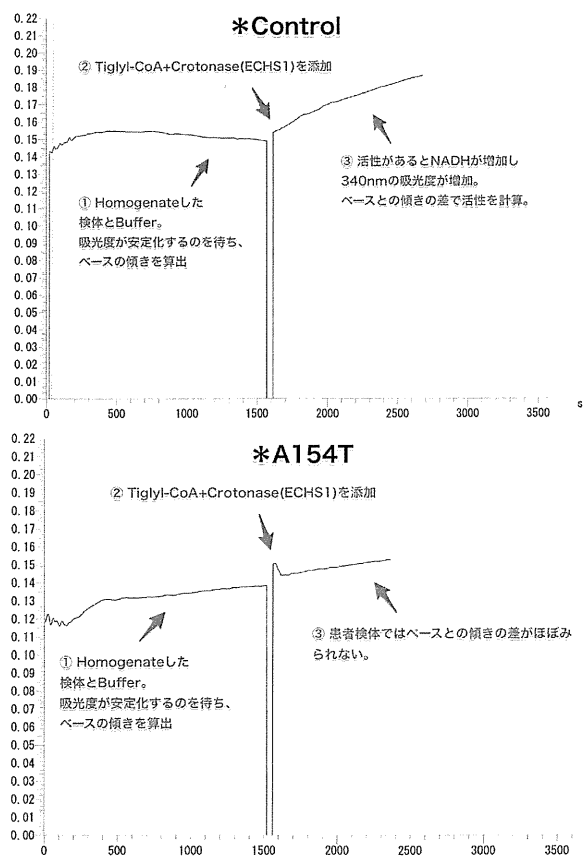
本酵素活性は、日本最初の症例において測定し、報告した(Fukao et al. 2014)。この活性測定に必要なcrotonaseという酵素が市販されていることがわかり購入して活性の測定系が確立出来た。患者線維芽細胞において正常細胞に比べあきらかに2M3HBDHの活性の低下を示すことが出来た（右ページ図）。

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

細胞の検討を行った。

2M3HBDHの線維芽細胞での活性測定



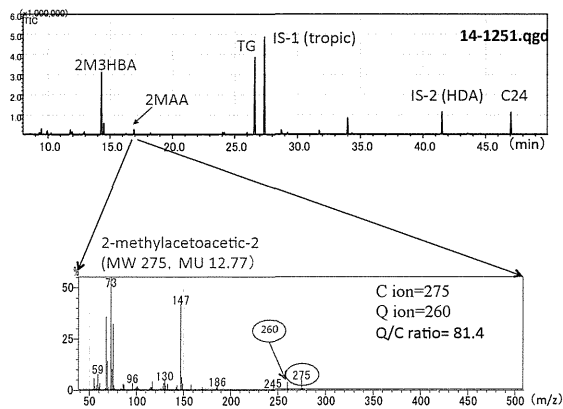
D) 有機酸分析による2-methylacetoacetateの検出

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。また尿検体が古い場合、尿ろ紙検体では2MAAが分解されて検出が難しいことを念頭に置く必要があることを明らかにした。

その後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、上記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。

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。



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)

2011~2014年				遺伝子解析			
病院	分析年月日	年齢(診断時)	GC/MS	性別	T2/SCOT活性	T2	HSD10
滋賀	2014.10.4	1y0m	著明なケトーシス、2M3HBの軽度排泄増加	男	正常	正常	正常
大分	2014.07.24	1m0m	著明なケトーシス、2M3HBの軽度排泄増加	男	正常	検査中	検査中
福岡	2014.06.20	2y2m	著明なケトーシス、2M3HBの軽度排泄増加	女	正常	正常	正常
熊本	2013.7.09	2y4m	著明なケトーシス、2M3HBのごく軽度排泄増加	検査未	検査未	未	未
埼玉	2013.4.24	2y1m	著明なケトーシス、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	著明なケトーシス、2M3HBの排泄増加	男	正常	正常	正常
兵庫	2011.4.27	3y	著明なケトーシス、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) 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し、以下の新たな2家系を診断した。

5) HSD10病と同定できた3例について

GHS10-1: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106mg/dl, 乳酸も正常範囲、ケトン体は14000micromol/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。

GHS10-3: 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。

GHS10-2: 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pH7.337, BE-7.1mmol/L, ケトン体は5400micromol/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。

症例	生年	性別	家族歴	初発発作				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					
1	2006	M	なし	6Y	胃腸炎	+		TIG + 2M3HB +	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		+	TIG + 2M3HB +	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		+		TIG + 2M3HB +	9ヶ月	死亡	c.677G>A(p.R226Q), de novo	4ヶ月頃から退行

6) 診断基準の策定 (深尾、山口、長谷川)

以下のように策定した。

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osis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) をみたまか B) をみたまか、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

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. 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

3. 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

海外特別講演等

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

2. Fukao T: (Plenary lecture) Ketolysis and Ketogenesis Defects. XIII Metabolic Diseases and Nutrition Congress. April 14-18, Adana (Turkey) 2015

3. 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. 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, 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

3. 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

国内発表

1. 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

2. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

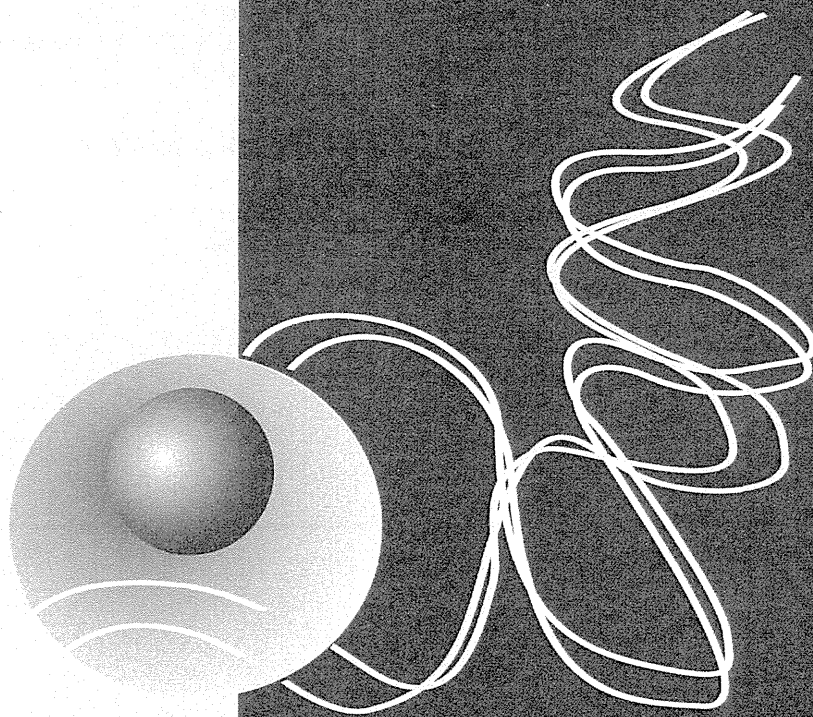
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

0-33

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)¹, 保坂泰介¹, 石井紘介¹, 寺口正之¹, 村上貴孝¹, 園府寺 美¹, 木野 稔¹
重松陽介², 青山友佳³, 深尾敏幸⁴

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

⁴ 岐阜大学 大学院 医学系研究科 小児病態学

【はじめに】HSD10 (17 β -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 μ mol/l とケトン性低血糖を認めた。アンモニアは 265 μ g/dl と高値であり、静脈血液ガスは pH 7.337, pCO₂ 33.8mmHg, HCO₃ 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 β 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。

0-34

本邦初の乳児期発症の HSD10 病の 1 例

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

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

⁴ 島根大学医学部小児科, ⁵ 千葉こども病院 代謝科

⁶ 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、HCO₃ 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、 β 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 methylacetate 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が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*¹, *Hideo Sasai*¹, *Yuka Aoyama*², *Kazuhiisa Akiba*³, *Masahiro Goto*³, *Yukihiro Hasegawa*³, *Masahisa Kobayashi*⁴, *Hiroyuki Ida*⁴, *Shohei Akagawa*⁵, *Tomohiro Hori*¹, *Yuki Hasegawa*⁶, *Seiji Yamaguchi*⁶, *Yosuke Shigematsu*⁷

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

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

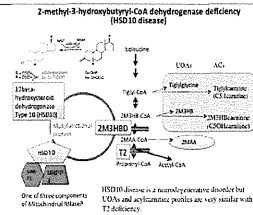
ABSTRACTS

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 HSD17B10 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 HSD17B10 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 later 5. 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 three Japanese cases and discuss clinical phenotypes and pathophysiology of this disorder.

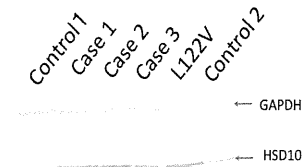
Results of Newborn Screening (NBS) using TandemMass.

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

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.

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)

[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 mmol/L, Lac 2.4 mmol/L, AG 22.8 mmol/L, Glu 106 mg/dL, Total ketone body 14.000 μ mol/L, acetoacetate 1.266 μ mol/L, 3OH butyrate 12,734 μ mol/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, betaketothiolase 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 mmol/L, 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 mmol/L, Lac 2.73mmol/L, Glu undetectable mg/dL, Total ketone body 5.100 μ mol/L, BUN 34 mg/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 5900 μ mol/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 10mg/dL. 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 (Ar): pH 7.208, pCO₂ 11.9 mmHg, HCO₃ 4.6 mmol/L, Lac 15.25 mmol/L, Glu 145 mg/dL, BUN 10 mg/dL, NH₃ 136 μ g/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 organic 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 severe		T2D mild		Controls mean \pm SD
	acute phase	asymptomatic phase	acute phase	asymptomatic phase	acute phase	asymptomatic phase	acute phase	asymptomatic phase	
2M3HB	262	132.6	330	91.5	130.4	121.6			4.44 \pm 4.0
Tiglylglycine	0.1	258.9	252.6	207.7	212.4	3.7	2.24 \pm 4.3		
2MVA	0.0	0.7	0.1	0.1	69.4	2.8	0 \pm 0		
3HB	17116.1	3	3329.6	1.9	5.4	6295	27.8 \pm 21.5		

Japanese HSD10 patients

Case	Birth year	Sex	PH	1st episode	UAs	present	hypoglycemic	neurological	prognosis	gene mutations	
1	2006	M	No	6y	+	+	+	8y	1	-	WNL c.460G>A/p.A154T
2	2010	M	No	4y	+	+	+	4y	2	-	WNL c.470C>T/p.A157V
3	2014	M	No	1D	+	+	+	9m	2	after 4mo dead	c.877G>A/p.R226Q de novo

Neonatal form	Infantile form	Juvenile form	Atypical form	MRXSD form
3	More than 13	1	3 from 1 family	1 family

Clinical presentation
 Immediately postnatal onset of severe metabolic/lactic acidosis, little psychomotor development, seizures, progressive cardiomyopathy, death in the first months of life
 Common form of HSD10 disease. The patient may have transient metabolic decompensation. A period of more or less normal development in the first 6–18 months of life, followed by a progressive neurodegenerative disease course in conjunction with progressive cardiomyopathy, leading to death at the age of 2–4 years or older
 develop normally in the first 5 years and slow deterioration of speech and motor skills linked to measles infection.
 Three boys in a family pedigree achieved neurologically normal development whereas they had typical urinary organic acid profile.
 X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior

UOAs	+	+	+	+
Mutations	p.N247S, p.R226Q, p.D86G	p.R130C	p.E249Q	p.R165H, p.A154T, p.A157V
Japanese cases	Case 3 between two forms		Case 1 and Case 2	

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

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、舞蹈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

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

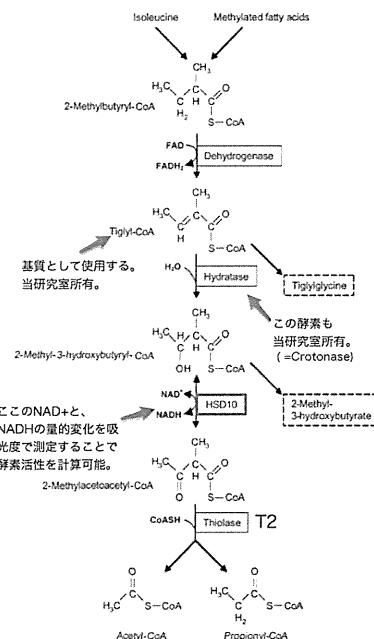
笹井英雄 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学
大学院生

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。

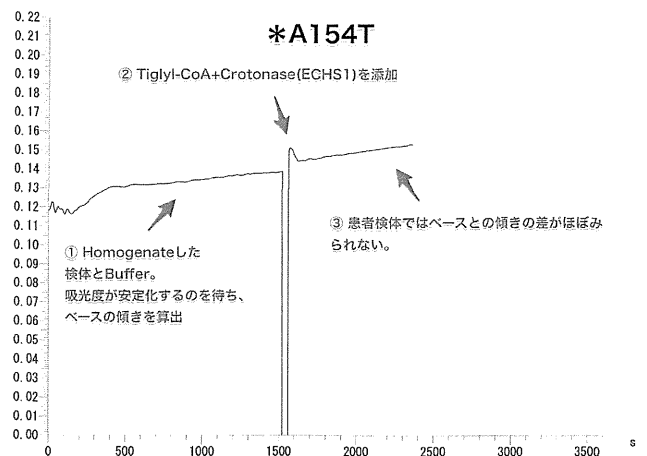
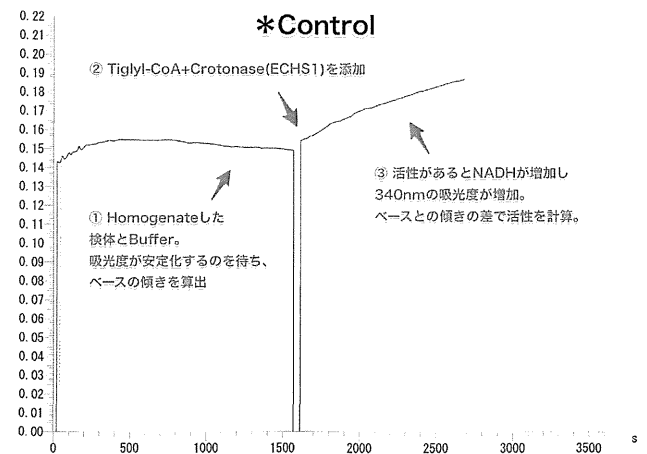
B. 研究方法

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 β -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 β -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、ハイリスクタンド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 β -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 β -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へ解析依頼があり、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。 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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. **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**: 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

3. 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、関府寺美、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

4. 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

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 病の症例同定と酵素診断、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る。遺伝子変異の評価のためにも2メチル3ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素活性をはじめとする3つの本酵素の機能解析の確立が望まれる。

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 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
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

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。

1) 診断法の確立

A) 遺伝子診断法の確立（笹井、堀、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) 2メチル3ヒドロキシブチリル-CoA 脱水素酵素（2M3HBDH）活性測定法の検討（笹井、深尾）：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。酵素アッセイにはクロトナーゼが必要であったが、これも今回手に入れることが出来、酵素アッセイの検討を行った。

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

1) 診断法の確立

A) 遺伝子診断法の確立

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 のエクソンゲノム PCR, ダイレクトシーケンスを行った以下のそのプライマー配列で解析した

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。本症の遺伝子解析法を確立し、新たな症例を診断し、さらに遺伝子変異の評価を行うことが目的である。

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

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。

B) 2メチル3ヒドロキシブチリル-CoA脱水素酵素(2M3HBDH)活性測定法の検討:

皮膚線維芽細胞を用いて、tiglyl-CoAを基質としクロトナーゼを反応させ、2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoAとして、これが2-methylacetoacetyl-CoAとなる反応をNADのNADHへの変化で測定する方法であるが、コントロール線維芽細胞に比べて明らかにGHSD10-1の線維芽細胞ではシンが検出され、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カ月に死亡しており、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pH7.337, BE-7.1mmol/L, ケトン体は5400micromol/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

2M3HBDHの低下が認められた。

C) HSD10蛋白発現系: Wild-type HSD17B10 cDNAを大腸菌で発現するベクターで構築し、大腸菌で発現させ、精製したHSD10蛋白にて、上記2M3HBDH活性測定を行ったところ活性が検出され、wild-typeの酵素の発現がうまく行っていることがわかり、現在変異体について同様の実験を行っている。精製蛋白において、2M3HBDHのみでなく17beta hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD)やRNasePの活性の測定系の確立が変異の解析のために今後重要である。

臨床経過のまとめ

昨年の報告書にも記載したが症例が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106mg/dl、乳酸も正常範囲、ケトン体は14000micromol/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

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。

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	原因	多呼吸	意識障害	TIG				
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

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A154T変異のGHSD10-1, A157V変異のGHSD10-1, とその兄の3例において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。

変異の機能的な評価をする上で、大腸菌でのHSD10蛋白発現系を用いた精製蛋白において、2M3HBDHのみでなく17beta hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD)やRNasePの活性の測定系の確立が変異の解析のために今後重要である。

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。遺伝子診断の後に続く変異