

—— 研究助成報告 ——

てんかんのバイオマーカー探索 — 網羅的代謝プロファイリングの活用

秋 山 倫 之

要旨：小児てんかん患者と小児非てんかん患者の髄液メタボローム解析を行い、低年齢群（6歳未満）と高年齢群（6歳以上18歳未満）において、180種の代謝物について差異を検討した。低年齢群（てんかん22名、非てんかん13名）では、てんかん群において α -ケトグルタル酸が低下、ピリドキサミンとチロシンが上昇しており、エネルギー産生低下とビタミンB6代謝の変化を示唆する結果が得られた。高年齢群（てんかん12名、非てんかん17名）では、てんかん群において1,5-アンヒドログルシトールが低下していたが、この意義は不明であった。また、新規発症で未治療の小児てんかん患者19名と健常小児21名の尿検体を収集した。これらに関しては、てんかんの診断に資するバイオマーカーの探索を行うべく、メタボローム解析を現在施行中である。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2020；31：39-44

Key Words：メタボローム解析，代謝物，髄液，尿

序論

日常のてんかん診療における課題として、発作症状等の病歴聴取技術の熟練を要すること、脳波検査の感度・特異度が十分には高くなく、発作頻度の把握が患者の申告に依存するため必ずしも正確ではないことが挙げられる。また、てんかん発病の根本的なメカニズムが十分判明しておらず、既存の抗てんかん薬の多くが脳神経細胞の興奮を抑えることに特化した対症療法薬であることも挙げられる。てんかんの診断や病状把握、病態生理の理解に有用なバイオマーカーが明らかにできれば、てんかんのより正確な診断と治療が可能になり、新規治療法開発への貢献も期待される。本研究では、網羅的代謝物（メタボローム）解析を活用し、てんかんの病態生理の理解や診断に有用なバイオマーカーの発見を試みる。これを通じ、てんかんへのより深い理解や診断制度の向上への手掛かりを得たいと考えた。

研究1：てんかん患者と非てんかん患者の髄液中代謝物の差異の検討

方法

岡山大学病院小児神経科にて、神経疾患の原因検索の一環として髄液検査を行われる患者を被験者とした。既知の先天性代謝異常症に罹患した患者は除外した。他の基礎疾患、内服治療については、特に制限しないこととした。これは、種々の病因にわたり共通の変化を示す代謝物を見つけたいためと、臨床現場で髄液検査に至る患者数には限界があるためである。本研究は、岡山大学倫理審査委員会承認済である（承認番号：研1604-009）。

髄液検査は4-6時間の絶食後に行った。得られた髄液をルーチン検査用に取り分けた後、残余検体を本研究用として採取後1時間以内に-80℃のディープフリーザーで凍結保存した。

髄液中代謝物の解析には、ガスクロマトグラフ・タンデム質量分析（GC-MS/MS）を用いたメタボローム分析を使用した。分析は、東北

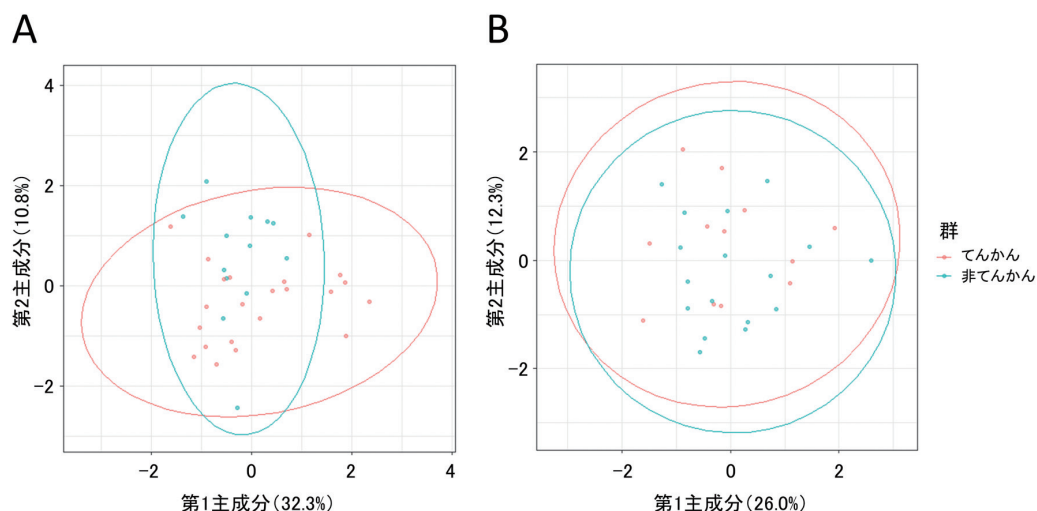


Fig. 1 メタボローム解析データの主成分分析

低年齢群 (A), 高年齢群 (B) における第1主成分と第2主成分の散布図と99%確率楕円を示す。外れ値はみつめられない。てんかん群と非てんかん群は明確には分離されていない。

大学東北メディカル・メガバンク機構に委託した。髄液の前処理方法は、Nishiumiらの方法¹⁾に従い、分析機器はGC-MS/MS TQ 8040 (島津社製)を用いた。代謝物ピークは、代謝物に特異的なプリカーサーイオン、プロダクトイオン、保持時間データを利用して自動的に同定し、次いで手作業による確認を行った。本研究で用いた代謝物データベースには、333物質由来の475ピークが含まれている²⁾。

統計解析には、R 3.4.2を用いた。てんかん患者と非てんかん患者の臨床的特徴の比較には、Mann-WhitneyのU検定、Fisher正確確率検定、カイ二乗検定を行った。相関分析には、Spearmanの相関係数を用いた。代謝物については、2つの年齢群 (低年齢群: 6歳未満, 高年齢群: 6歳以上18歳未満) で比較を行った。年齢群を分けたのは、多くの代謝物濃度が年齢依存性であり、解析における年齢の影響を減らすためである。代謝物濃度データは正規性を増すために対数変換を行い、平均値が0, 分散が1になるよう標準化した。そのうえで主成分分析を行い、外れ値が存在するか、2群間の差が出るかを検討した。その後、てんかん罹患の有無と個々の抗てんかん薬が各代謝物濃度に影響するかどうかを重回帰で検討した。代謝物数が

非常に多いためp値の補正が必要であり、false discovery rateを調整して $q < 0.05$ を有意と判定した。

結果

被験者は64名で、てんかん患者は34名、非てんかん患者は30名であった。低年齢群 (6歳未満) は、てんかん22名、非てんかん13名であり、高年齢群 (6歳以上18歳未満) は、てんかん12名、非てんかん17名であった。いずれの年齢群においても、年齢と性別に有意差はなかった。てんかん群では抗てんかん薬の内服を行っている方が当然ながら多く、バルプロ酸 (VPA) は両方の年齢群、レベチラセタム (LEV), ゾニサミド (ZNS), ベンゾジアゼピン系薬剤は高年齢群において有意に内服者数が多かったため、後述の重回帰分析での独立変数に採用した。通常髄液生化学検査では、高年齢群において、てんかん群で髄液糖濃度 ($p = 0.0477$) と髄液糖/血糖比 ($p = 0.0416$) が有意に低かった。

GC-MSでは180種の髄液中代謝物が測定された。主成分分析では、いずれの年齢群においても外れ値は検出されなかったため (Fig. 1), 全ての被験者のデータを以降の解析に使用し

Tab. 1 てんかん罹患および抗てんかん薬に関連がみとめられた代謝物

項目	代謝物	p値	q値
低年齢群 (6歳未満、n = 35)			
てんかん	2-ケトグルタル酸(↓)	0.0003	0.0302
	ピリドキサミン(↑)	0.0011	0.0416
	チロシン(↑)	0.0009	0.0416
バルプロ酸	2-プロピル-5-ヒドロキシペンタン酸(↑)	< 0.0001	0.0038
高年齢群 (6歳以上18歳未満、n = 29)			
てんかん	1,5-アンヒドログルシトール(↓)	0.0002	0.0292
バルプロ酸	2-アミノ酪酸(↑)	0.0025	0.0476
	2-ケトイソカプロン酸(↑)	0.0007	0.0187
	2-プロピル-5-ヒドロキシペンタン酸(↑)	0.0006	0.0187
	4-ヒドロキシプロリン(↑)	0.0013	0.0285
	アセチルグリシン(↑)	0.0002	0.0115
	メチオニン(↑)	0.0029	0.0491
	N-アセチルセリン(↑)	0.0003	0.0115
	セリン(↑)	0.0001	0.0115
レベチラセタム	1,5-アンヒドログルシトール(↓)	0.0002	0.0306
ゾニサミド	1,5-アンヒドログルシトール(↑)	< 0.0001	0.0050

た。一方、てんかん群と非てんかん群は明確に分離されなかったため、両群間に差のある代謝物はあったとしてもわずかであろうと推測された。

重回帰分析 (Tab. 1) では、低年齢群ではてんかん患者において、2-ケトグルタル酸 (α -ケトグルタル酸) が低く、ピリドキサミンとチロシンが高かった。高年齢群では、てんかん患者において、1,5-アンヒドログルシトールが低かった。VPA内服例では、VPA代謝産物の他、高年齢群では2-アミノ酪酸、2-ケトイソカプロン酸、4-ヒドロキシプロリン、アセチルグリシン、メチオニン、N-アセチルセリン、セリンが高かった。LEVとZNS内服例では、1,5-アンヒドログルシトールが低かった。

高年齢群において、てんかん群と非てんかん群とで髄液糖と1,5-アンヒドログルシトールに有意差がみられたため、これら2つに相関があるか否かを検討したが、相関はみられなかった。

考察

低年齢群のてんかんにおけるピリドキサミン

上昇の理由としては、ピリドキサルキナーゼやピリドキシン (ピリドキサミン) リン酸酸化酵素 (PNPO) によるピリドキサルリン酸 (PLP, 活性型ビタミンB6) の産生低下の可能性が挙げられる。実際、PNPO欠損症においてピリドキサミンの上昇が報告されている³⁾。PNPOの産物はPLPであり、PLPは抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸を合成するのに必須な補酵素である。我々は以前、てんかん患者において非てんかん患者よりも髄液中ピリドキサルリン酸 (PLP) が低いことを報告している⁴⁾。これらを合わせて考えると、低年齢群のてんかんにおいて、ビタミンB6代謝の変化が示唆される (Fig.2)。

クエン酸回路において、 α -ケトグルタル酸は律速段階に位置する中間代謝物であり、その減少は、低年齢群のてんかんにおけるエネルギー産生の低下を示唆している。また、 α -ケトグルタル酸とチロシンの代謝にはビタミンB6もかわっている。グルタミン酸からの α -ケトグルタル酸産生に関わるアミノ基転移反応の補酵素がPLPであり、チロシンを分解するチロシナーミ基転移酵素は α -ケトグルタル酸を基質、PLP

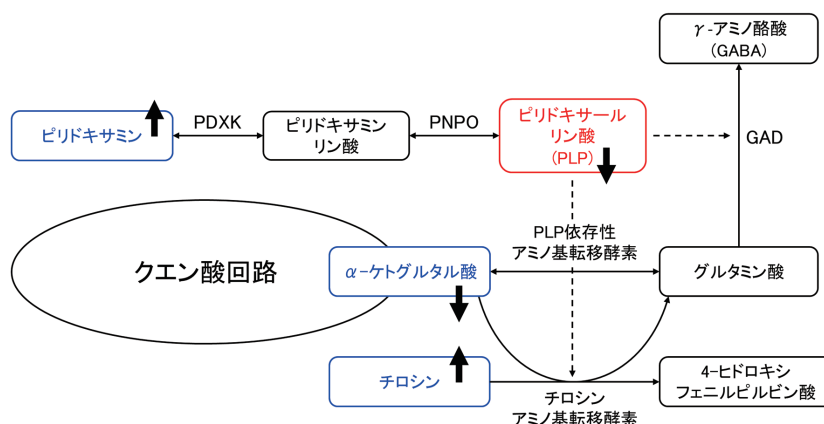


Fig. 2 α -ケトグルタル酸、ピリドキサミン、チロシンの関連性

ピリドキサミン上昇は、ピリドキサルキナーゼ (PDXK) とピリドキシン (ピリドキサミン) 酸化酵素 (PNPO) を経たピリドキサルリン酸 (PLP) の産生低下によるかも知れない。PLP低下はアミノ基転移酵素反応を介して α -ケトグルタル酸低下、チロシン上昇と関連している可能性がある。また、PLPは、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) の産生を行うグルタミン酸脱炭酸酵素に必須の補酵素である。

を補酵素とするからである (Fig. 2)。

高齢群のてんかんでは、髄液中1,5-AG低下がみられたが、この意義は不明である。

今回は、基礎疾患等に関わらないてんかんに共通したマーカーを探すため、先天性代謝異常症以外は組み入れ基準に制限を設けなかった。しかし、基礎疾患や内服薬の影響によるばらつきが大きいため、これらのある程度コントロールした方が、有意差の検出力は向上するものと考えられる。ただ、髄液検査が行える状況は限られており、どのような対象を選ぶかは大きな課題である。

本研究の詳細については、文献⁵⁾を参照されたい。

研究2：新規発症てんかん患者と健常者の尿中代謝物の差異の検討

方法

岡山大学病院および研究協力医療機関を受診した新規発症てんかんの小児患者、健常小児を被験者とした。新規発症てんかん患者は、明らかな基礎疾患を有さず (明らかな神経症状や知的障害がない) で、最終発作より1か月未満の方を対象とした。健常小児の年齢は、てんかん

患者にマッチする年齢 (主に幼児、学童) を対象とした。いずれにおいても、3日以内の薬剤・サプリメント・栄養ドリンクの摂取、1週間以内の急性疾患罹患、慢性疾患罹患、3日以内の月経 (女性の尿検体) がみとめられる方は除外した。てんかん患者は尿の他に血漿も保存した。本研究は、岡山大学倫理審査委員会承認済である (承認番号：研1604-009)。

尿中代謝物の解析には、研究1と同様のGC-MS/MSの他、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いたメタボローム分析を行う。後者では、500代謝物をターゲットとしており、分析は東北大学東北メディカル・メガバンク機構に委託する。

結果

解析対象となる被験者がなかなか集まらず、新規てんかん小児患者19名、健常小児21名の尿検体を目下解析中である。

おわりに

中枢神経系内におけるてんかんの病態生理に迫るための最も適切な検体は髄液検体であると考え、まず髄液メタボローム解析を行った。しかし、健常対照を得るのが困難なこと、種々

の基礎疾患による個体差、抗てんかん薬の影響（未治療のてんかん患者で髄液検査を行える機会は乏しい）など種々の因子が絡んでくるため、今後は対象をより絞った研究デザインが必要と考えられる。

一方、血漿や尿検体の採取は侵襲性が低く、均一な被験者集団を集めることは可能と考えられるが、中枢神経系の病態を直接反映はしない可能性がある。こちらについては被験者数を今後増やして検討を行っていききたい。

文献

- 1) Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, Yoshie T, Kibi M, Izumi Y, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One* 2012 ; **7** : e40459.
- 2) Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, Unno Y, Sakai T, Okamoto K, et al. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget* 2017 ; **8** : 17115-17126.
- 3) Mathis D, Abela L, Albersen M, Burer C, Crowther L, Beese K, et al. The value of plasma vitamin B6 profiles in early onset epileptic encephalopathies. *J Inherit Metab Dis* 2016 ; **39** : 733-741.
- 4) Akiyama T, Akiyama M, Hayashi Y, Shibata T, Hanaoka Y, Toda S, et al. Measurement of pyridoxal 5'-phosphate, pyridoxal, and 4-pyridoxic acid in the cerebrospinal fluid of children. *Clin Chim Acta* 2017 ; **466** : 1-5.
- 5) Akiyama T, Saigusa D, Hyodo Y, Umeda K, Saijo R, Koshiba S, et al. Metabolic profiling of the cerebrospinal fluid in pediatric epilepsy. *Acta Med Okayama* 2020 ; **74** : 65-72.

