

平成 30 年 9 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09595

研究課題名(和文) シトリン欠損症におけるCTLN2発症・重篤化に関わる遺伝因子・環境因子の解明

研究課題名(英文) Genetic and environmental factors related to onset and severity of CTLN2 in citrin deficiency

研究代表者

佐伯 武頼 (Saheki, Takeyori)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10056070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：シトリン欠損症の特異性は糖質忌避の行動にある。それには肝臓での代謝に伴う代謝異常が何らかの機構を介して脳にシグナルを送っている。それにはモデルマウスにおいて肝内のNADH上昇とATP濃度低下が関与する可能性を示した。一方、タンパク質、アミノ酸は糖質の毒性を緩和する作用がある。その機構を明らかにした。高度な高アンモニア血症モデルを作製し、その解消にオルニチンとアスパラギン酸(またはアラニン)が有効であることを明らかにした。また、アスパラギン酸自体は尿素サイクルが存在する肝細胞には取り込まれないが、小腸でアラニンに変換された後、肝細胞に取り込まれ、アスパラギン酸を再生していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aversion against sugars is the remarkable characteristics of citrin deficiency. We showed that two factors simultaneously induced by sugar intake, an increased cytosolic NADH and decreased ATP in the liver, send signals to the brain, to avoid intake of excess sugars.

On the other hand, we have shown that intake of protein and some amino acids ameliorate sugar toxicity. In this research, we clarified that a severe hyperammonemia induced in the model mice was greatly relieved by oral administration of ornithine + aspartate or alanine. Although aspartate can't directly enter the hepatocyte carrying urea cycle, it can be converted into alanine in the small intestine, which then can enter the hepatocyte with urea cycle and converted back to aspartate, resulting in almost complete dissolution of hyperammonemia.

研究分野：病態生化学

キーワード：citrin deficiency CTLN2 hyperammonemia sugar toxicity NADH ornithine aspartate alanine

「シトリン欠損症における CTLN2 発症・重篤化に関わる遺伝因子・環境因子の解明」

1. 研究開始当初の背景

本研究を実施する佐伯は、故小林圭子博士とともにシトリン欠損症の代表的病態である成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の病因遺伝子 (SLC25A13) をカナダトロント Steve Scherer 博士と共同で発見し、遺伝子解析法を開発し、本遺伝子異常に基づく新生児・小児の疾患である新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) を発見・明確にし、本遺伝子がコードするタンパク (シトリンと命名) を欠損する新しい疾患、シトリン欠損症という疾患概念を打ち立てた。また、本疾患が日本に限定された疾患ではなく、中国を中心とする東・東南アジアに非常に多い常染色体性劣性遺伝病であることも明らかにした。現在はどの人種にも存在する疾患であることも明らかになってきている。また、イタリア、スペインの研究者と共同でシトリンがミトコンドリア内膜局在の aspartate glutamate carrier (AGC) であることを明らかにした。AGC には肝臓、心臓、腎臓等に発現するシトリン (AGC2) のほかに脳神経系、筋肉、心臓、腎臓で発現するアイソフォーム (AGC1; aralar) が存在するが、シトリンタンパク質の機能は、(1) ミトコンドリアから細胞質に向けて aspartate (Asp) を放出し、交換で glutamate とプロトン (H⁺) を取り込み、細胞質に Asp を供給する役割 (alarar も同様) を持ち、細胞質でのタンパク合成、核酸合成、尿素合成に Asp を供給しているが、それだけにとどまらず、(2) Malate aspartate シヤトルの員として細胞質に存在する NADH をミトコンドリアに運ぶ役割 (NADH シヤトル) をもつ。

本疾患の病態を解明し、治療法を確立するには動物モデルが不可欠である。佐伯らはカナダトロントの David Sinasac らと共同で Slc25a13 を欠損したシトリンノックアウト (Ctrn-KO) マウスを確立したが、本マウスはほとんどヒトの多彩な症状を示さなかった。その原因は、ヒト肝臓の発現が低いが、マウス肝臓ではもう一つの NADH シヤトルである Glycerophosphate (GP) シヤトルの発現が強いためである。それは、GP シヤトルの主要なメンバーである mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPD) をも欠損した Ctrn/mGPD double-KO マウスを作成した結果、ヒト患者で観察される各種の症状を発現し、モデル動物を確立することができたことから明らかである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「シトリン欠損症における CTLN2 発症・重篤化に関わる遺伝因子・環境因子の解明」であったが、その研究はまだ道半ばにある。本研究期間内の明らかにできたのは以下の 2 研究課題である。

【1】 Double-KO マウスを含む関連モデルマウスの、シヨ糖, エタノール, グリセロールの忌避に関連する代謝中間体の同定

【2】 著しい高アンモニア血症モデルの作製と高アンモニア血症の解消 (抑制) に有効なアミノ酸の同定

である。

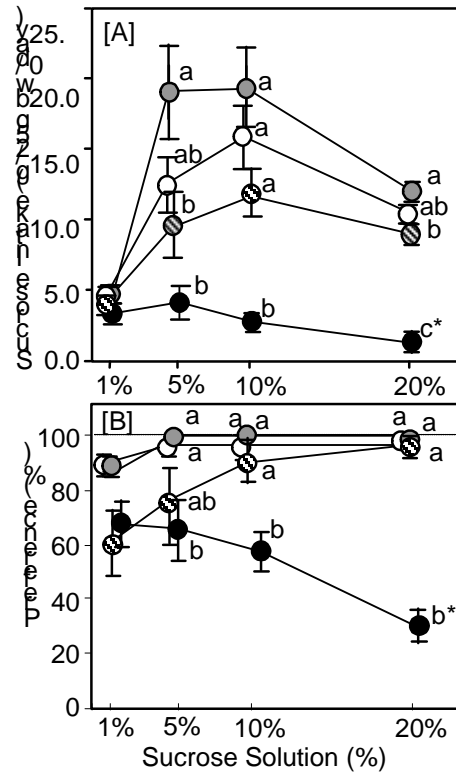


Fig. 1. Intake [A] of and preference [B] for varied concentrations of a sucrose solution Mice were provided two bottles, one containing water and the other containing either a 1, 5, 10 or 20% sucrose solution. [A] Intake of each mouse was determined by weighing the bottles each day and averaged over a two-day period. [B] Preference (%) was calculated as $100 \times (\text{g of test solution}) / [(\text{g of test solution}) + (\text{g of water})]$ as described in Methods. White circles denote wt mice; grey, Ctrn-KO mice; striped circles, mGPD-KO mice; black circle, Ctrn/mGPD double-KO mice.

3. 研究の方法

1) 野生型 (wt), シトリン欠損 (Ctrn-KO), mGPD-KO、および Ctrn/mGPD double-KO, 4種のマウスに各種濃度のシヨ糖, エタノール, グリセロールを two-bottle system で自由摂取させ、その摂取量と試験溶液摂取量/全摂取量 (水 + 試験溶液) を preference として測定・計算した。摂取量または preference が有意に wt マウスより低い場合、および最低濃度での摂取量より減少した場合にそれぞれ点数をつけ、忌避 (aversion) の度合いを表記した。以上の方法で aversion score は 4 点が最高の点数になる。一方、その濃度

の溶液を 20ml/kg 体重の量で強制投与し、1 時間後に freeze-clamp 法にて肝臓を採取し、肝内代謝物(解糖系中間体, **TCA** サイクル中間体, アミノ酸, アデニンヌクレオチド)を定量し、溶液忌避との関連を検討した。

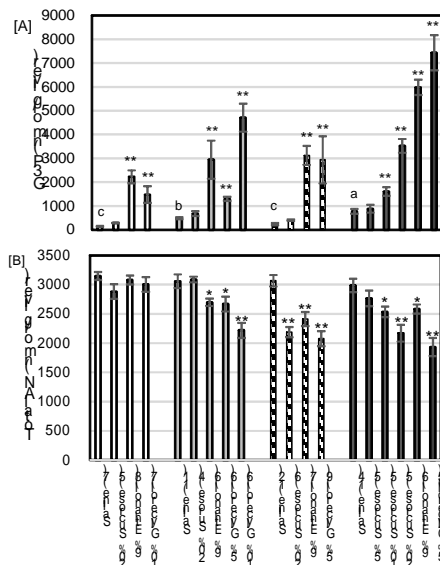


Fig. 2. Changes in the hepatic G3P [A] and total adenine nucleotide [B] levels following oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions

One hour after an enteral administration of a test solution (either 0.9% saline, 10% or 20% sucrose, 9% ethanol, or 5% or 10% glycerol) at a standard dose of 20 ml/kg bw by gastric tube, mice were sacrificed, livers quickly removed by freeze-clamp method and extracted with perchloric acid, and a neutralized, perchloric acid-extracted liver homogenate was prepared and analyzed as described in Methods. Treatments and number of mice are shown under the figure. White column denotes wt mice; grey column, Ctrn-KO mice; striped column, mGPD-KO mice; black column, Ctrn/mGPD double-KO mice.

2) mGPD-KO マウスに 5%エタノールと各種アミノ酸等を投与し、1 時間後に freeze-clamp 法によって得た肝臓の G3P, アミノ酸を定量し、投与アミノ酸の効果を検定した。その結果から、血中アンモニアを上昇させるアミノ酸を同定し、高アンモニア血症モデルを作成した。この高アンモニア血症モデルにアンモニア低下作用が予想されるアミノ酸を投与し、その効果を検定した。さらに血漿シトルリン (Cit) を定量してアミノ酸の作用点を明らかにした。

4. 研究成果

1) 4 種マウスにおける各種濃度シヨ糖摂取量の比較 (Fig. 1)

マウスはシヨ糖を好み、高濃度では摂取量も多く、100%の preference で摂取したが、double-KO マウスは摂取量も増えずむしろ減少し、ほかのマウスに比べても摂取量は少なく、preference も低下した(score; 4 点)。成分のグルコースとフルクトースを比較した結果、両単糖ともに double-KO マウスは摂取量が他のマウスに比べ少なく、シヨ糖の 2 成分どちらも好まないことが判明した。

2) エタノールとグリセロールの摂取比較

エタノールとグリセロールの場合は、double-KO マウスだけでなく mGPD-KO マウスは double-KO マウスと同様に Ctrn-KO マウスの場合は高濃度の場合に摂取量が減少し、最高濃度では score はいずれも 4 点となった。

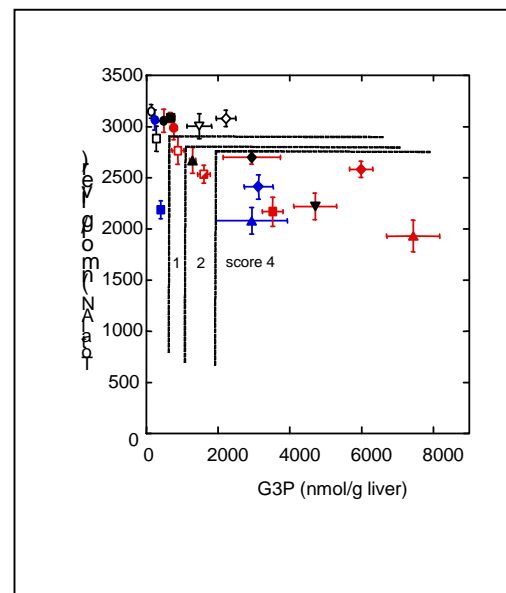


Fig. 3. Relationship between aversion score and hepatic G3P and total adenine nucleotide (AN). Each plot depicts a mean hepatic G3P concentration with SEM in horizontal axis and a mean hepatic total AN concentration with SEM in vertical axis. Vertical dotted lines show the lowest levels (mean minus SEM) of groups with aversion score 1, 2 and 4. Horizontal dotted lines show the highest levels (mean plus SEM) of groups with aversion score 1, 2 and 4. Concentrations administered (20 ml/kg bw).

3) シヨ糖、エタノールグリセロール投与 1 時間後の肝内代謝物の測定

20%シヨ糖、9%エタノール、10%グリセロール投与後の肝内代謝物、glycerol 3-phosphate(G3P)、クエン酸、グルタミン酸 (Glu)、シトルリン、アスパラギン酸などのアミノ酸、ATP などのアデニンヌクレオチドを定量した。その結果、G3P の上昇と ATP と全アデニンヌクレオチド (total AN) 濃度の低下 (Fig. 2) は溶液の忌避とよく一致したが、合致しない場合もあった。そこで、G3P と total AN 両者の変化が同時に起こる場合

を検討すると溶液の忌避 (score 1-4) と一致した。すなわち、G3P が上昇し、同時に total AN が低下する場合に忌避がみられた (Fig. 3)。このことから、肝臓または同様の臓器における代謝物 (G3P と ATP または total AN) 濃度の変動が何等かの機構を通じて脳にシグナルを伝え、忌避行動を起こしているものと考えられる。その後の解析で、脳内の食欲に関連する神経ペプチドの mRNA 量が double-KO マウスで著しく上昇していることを見出した。今後は神経ペプチド mRNA レベルと糖質等の忌避との関連性を検討していきたい。

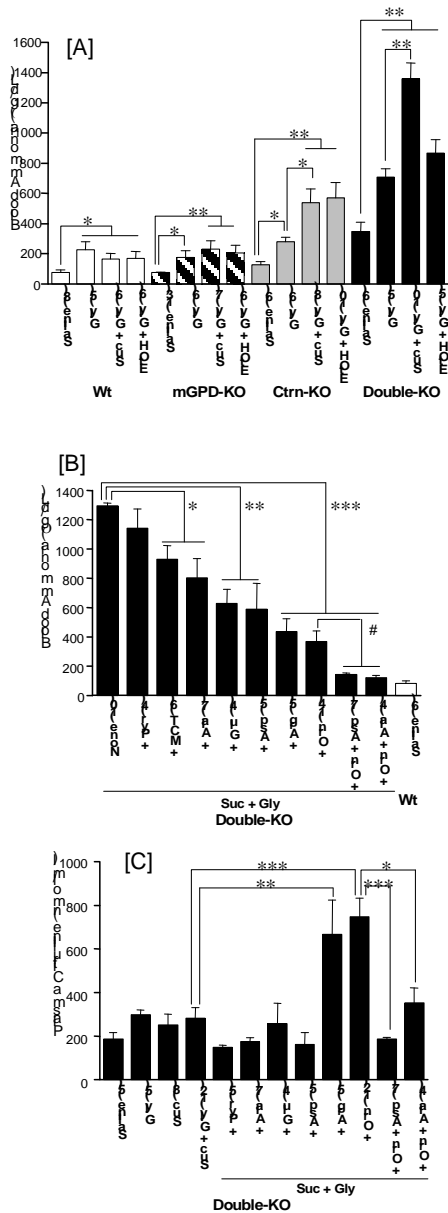


Fig. 4. Effects of oral supplementation indicated on blood ammonia (A and B) and plasma citrulline (C).

(A) Effects of 1 M Gly administered with or without 20% sucrose (Suc) or 5% ethanol (EtOH) (20 ml/kg bw) on blood ammonia in all four mouse genotypes: wild type (wt; white bar), mGPD-KO (hatched bar), Ctrn-KO (gray bar) and Ctrn/mGPD double-KO (black bar). (B) Effects of 0.5 M amino acids (Ala, Glu, Asp, Arg or Orn), 0.5M Pyr, 5% MCT or combination of amino acids (20 ml/kg bw) on blood ammonia levels increased by administration of 20% Suc+1M Gly in double mice, with wt mice administered saline as a reference level. (C) Effects of administration of amino acids and other substances indicated in the figure on plasma citrulline in Ctrn/mGPD double-KO mice.

II のテーマに関する結果は以下のとおりである。

4) エタノール投与により上昇する肝内 G3P レベルを低下させるアミノ酸

エタノール投与は mGPD-KO マウス肝内 G3P を上昇させる。これに Gly, Pyr, Orn, Ser, Ala 等を加えると G3P の上昇を抑制した。

5) エタノール投与で低下する肝内 Asp を上昇させるアミノ酸

エタノール投与で低下した。これを上昇させるアミノ酸として、Ala, Orn, Asp, Pro などが同定された。

6) 肝内シトルリンレベルに影響するアミノ酸とその作用機構

エタノールの投与は肝内 Cit レベルを上昇させるが、Glu, Asp, Pro は低下させた。一方、Gly, Orn, Ser はさらに大きく肝内 Cit レベルを上昇させた。Orn はシトルリンに変換されるので、その上昇は理解できるが、Gly と Ser 投与で肝内シトルリンの上昇を起こす原因はそれらアミノ酸投与でアンモニア産生が昂進するのではないかと考え、血中アンモニアを測定した結果、Gly と Ser の投与は血中アンモニアを上昇させたが、Orn 投与は血中アンモニアレベルの上昇を起こさなかった。さらに Gly による血中アンモニア上昇に対するエタノールとショ糖の効果を比較した結果、double-KO マウスでは 1 M Gly+20% Suc (20ml/kg) の投与によって血中アンモニアを 1000 microg/dL 以上のレベルにまで上昇させることが判明した (Fig. 4A)。

7) 上昇した血中アンモニアを低下させる作用を持つアミノ酸との作用。

これまでに血中アンモニアを低下させる作用を持つことを明らかにしているピルビン酸ナトリウム (Pyr), MCT に加え, 本研究で有効性が想定できる Ala, Glu, Asp, Arg, Orn が double-KO マウスにおける Gly + Suc による高アンモニア血症を抑制できるかどうかを検討した. その結果, Fig. 4B に示すように Pyr を除いてはすべての試験物質でアンモニア低下効果が見られた. 効果が検出できたアミノ酸のうち, Arg と Orn は尿素サイクル中間体として同じ作用を示すが, 余分な尿素を産生しない Orn の作用への Glu と Asp の追加効果を検定した. その結果, いずれも血中アンモニアをほとんど野生型マウスの血中アンモニアレベルまで低下させることが判明した. そこで, Orn と Asp 及び Ala の効果は異なるのではないかと, 血漿 Cit レベルへの効果を比較検討した (Fig. 4C). その結果, Arg と Orn は血漿 Cit レベルを上昇させたが, Ala 及び Asp は上昇した Cit レベルを低下させる作用が検出でき, Orn と Ala 及び Asp の作用が異なること, 後者は ASS のレベルを促進していると考えられた.

8) 灌流肝における塩化アンモンからの尿素合成への Orn および Ala と Asp の作用比較

灌流肝における塩化アンモンを基質とする尿素合成に対する Ala と Asp の作用を検定した. 4 種のマウスにおいていずれも塩化アンモンからの尿素合成を促進したが, wt および mGPD-KO マウス肝に比べ, Ctrn-KO 及び double-KO マウスでは低いレベルにあり, さらに Orn の添加は前 2 者のマウス肝では尿素合成を促進したが, 後 2 者では有意な促進効果は検出されなかった. しかし, いずれの尿素合成もさらなる Ala の添加によって尿素合成は著しく促進された. しかしながら, Asp の添加はいずれのマウス肝でも尿素合成促進効果が見られなかった.

Asp の作用に関して, *in vivo* と *in vitro* で相違がみられた. この理由は, Stoll et al によって報告されている Asp や Glu の代謝と関連する. すなわち, Asp 及び Glu は尿素サイクルが存在する門脈周辺の肝細胞 (periportal hepatocytes) には取り込まれることなく, 尿素サイクルの存在しない中心静脈周辺の肝細胞 (perivenous hepatocytes) に取り込まれ, Gln や Asn 合成の利用される. 以上の実験結果と考察から, Asp は肝細胞に至る前に Ala などに変換され, その後, 肝細胞に取り込まれることによってアンモニア解毒に役立つのではないかと推論し, 以下の実験を行った.

9) 門脈血と動脈血の同時採取による小腸におけるアミノ酸代謝の検討

門脈血と動脈血を同時に採取し, 血漿を分離したのちそのアミノ酸を分析し, 動静脈のアミノ酸差を計算した. 値が負の場合は, 小腸での取り込みを示し, 正の場合は小腸からの放出を示す. 生食のみを投与した場合 (対照) では, Gln の取

り込みが見られ, Ala, Cit, Pro の放出が観察された. Asp, Glu 及び Orn の経口投与は, Ala, Cit 及び Pro の放出を増加させた.

以上から, Asp は小腸において Ala に変換された後, periportal hepatocytes に取り込まれ, そこで Fig. 5C に示したような経路によって Asp の合成を促し, 尿素サイクルを促進していると考えられる. 以上より, Orn と Asp または Ala のコンビネーションはシトリン欠損症モデルマウスにおける高アンモニア血症の治療に有効と考えられる結果を得た.

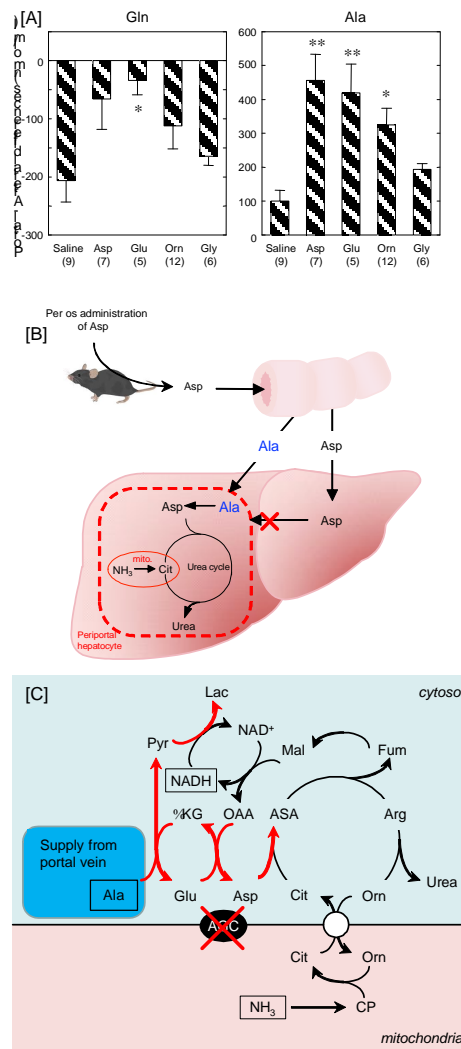


Fig. 5. Portal vein-arterial differences in the plasma concentration of Gln and Ala 1 hr after administration of saline, Asp, Glu, Orn or Gly (A), schematic diagram of Asp metabolism after enteral administration with in the small intestine and liver (B), and postulated metabolic pathway of Ala in periportal hepatocytes (C).

0.5 M Asp, Glu, Orn or Gly (20 ml/kg bw) were enterally administered to mGPD-KO mice, and 1hr after the administration, blood was collected

simultaneously from abdominal aorta and portal vein for the portal vein-arterial difference. Minus and plus values denote uptake by, and release from, the portal vein, respectively. Number of mice are shown in parentheses. *P<0.05 and **P<0.01 denote differences compared to saline.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Inui A, Hashimoto T, Sogo T, Komatsu H, Saheki T, Fujisawa T. Chronic hepatitis without hepatic steatosis caused by citrin deficiency in a child. *Hepatol Res*. 2016;46(4):357-62.

Saheki T, Inoue K, Ono H, Fujimoto Y, Furuie S, Yamamura KI, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Moriyama M, Sinasac DS, Yamamoto T, Furukawa T, Kobayashi K. Oral aversion to dietary sugar, ethanol and glycerol correlates with alterations in specific hepatic metabolites in a mouse model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab*. 2017;120(4):306-316.

Saheki T, Song YZ. Citrin Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. 2005 Sep 16 [updated 2017 Aug 10].

[学会発表](計 16件)

Takeyori Saheki, Izumi Yasuda, Tatsuhiko Furukawa, Yuki Fujimoto, Sumie Furuie, Ken-ichi Yamamura, Treatment of Citrin Deficiency: Effect of amino acids on increases in hepatic cytosolic NADH or glycerol 3-phosphate induced by sucrose or ethanol in citrin deficiency model mice. Asia Europe Workshop on Inborn Error of Metabolism, 2016.3.30-4.2, Seoul, Korea

Takeyori Saheki, Current State and Treatment of Citrin Deficiency, Basis and Application of Precision Medicine at Quanzhou, 2016.6.3, Quanzhou (China)

Takeyori Saheki, An Overview of Citrin Deficiency, Symposium on Citrin deficiency at Guangzhou, 2016.5.14, Guangzhou (China)

Takeyori Saheki, How to manage Citrin Deficiency -for the patients and their families-, Seminar on Citrin Deficiency, 2017.1.17, Singapore

Saheki T, Kuroda E, Funahashi A, Yasuda I, Setogawa Y, Gao GH, Ushikai M, Horiuchi M, Moriyama M, Pathogenesis, Pathophysiology

and Treatment of Citrin Deficiency, -Treatment of Hyperammonemia in Citrin Deficiency with Amino Acids by using the Model, Citrin/mGPD double-KO, Mice-, International Congress on Inborn Error of Metabolism (ICIM) 2017, 2017.9.17, Rio de Janeiro (Brazil)

Saheki T, Kuroda E, Funahashi A, Yasuda I, Setogawa Y, Gao GH, Ushikai M, Horiuchi M, Moriyama M, Study on Treatment of Citrin Deficiency by using the Animal Model: Effects of Amino acids, International Symposium on Precision Medicine and Genetics, 2017.11.10, Quanzhou (China)

[図書](計 1件)

佐伯武頼: シトリン欠損症 医者も知らない特異な疾患 諷詠社 2017. April

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯武頼 (**SAHEKI, Takeyori**)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号: **10056070**

(2) 研究分担者

井ノ上逸郎 (**INOUE, Ituro**)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号: **00192500**

矢崎正英 (**YAZAKI, Masahide**)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号: **70372513**

森山光章 (**MORIYAMA, Mitsuaki**)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: **20275283**

(3) 研究協力者

舟橋亞希 (**FUNAHASHI, Aki**)

鹿児島大学・医歯学総合研究科

黒田英志 (**KURODA, Eishi**)

鹿児島大学・医歯学総合研究科

安田いづみ (**YASUDA, Izumi**)

鹿児島大学・医歯学総合研究科

瀬戸川芳子 (**SETOGAWA, Yoshiko**)

鹿児島大学・医歯学総合研究科