

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591217  
 研究課題名（和文） グルタメイト脱水素酵素異常による高アンモニア血症の発症機構の解明と治療法の開発  
 研究課題名（英文） The study of mechanism and treatment for the hyperammonemia in the glutamate dehydrogenase abnormality  
 研究代表者 岡野 善行（OKANO YOSHIYUKI）  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号：60231213

## 研究成果の概要：

本研究ではグルタメイト脱水素酵素異常症の動物モデルの作成を行っている。アデノウィルスベクターに変異 GDHcDNA を導入した。このアデノウィルスをマウスに感染させることで、個別臓器に感染させ得る動物モデルを作成する。変異 GDHcDNA を用いてトランスジェニックマウスを作成し、4 系統のマウスを得た。両動物モデルを用いて、異常 GDH の発現と生体に与える影響（インスリン分泌、血糖、アンモニア値、アミノグラム）を検討し、高アンモニア血症の発症メカニズムを解明する。新たな日本人患者の GDH 解析を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

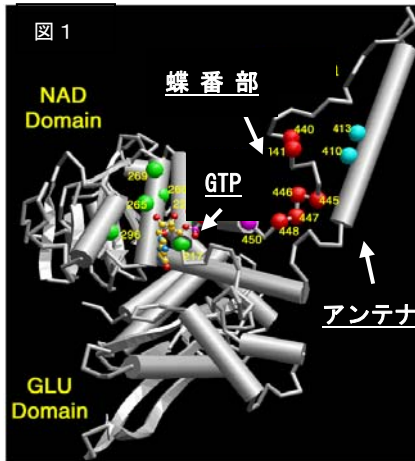
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：分子遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

1998 年 Stanley ら (N Eng J Med 338: 1352-1357, 1998) は高インスリン高アンモニア血症の低血糖症と高アンモニア血症という 2 つの異なる臓器（膵臓と肝臓）由来の症

状が GDH という単一遺伝子の異常で発症し、しかも、1 対立遺伝子の異常で発症することを明らかにしている。そして、通常の先天性代謝異常症と大きく異なり、本症は GDH 活性の GTP の抑制制御が失われる結果、GDH 活性が上昇する『gain of function』によって発

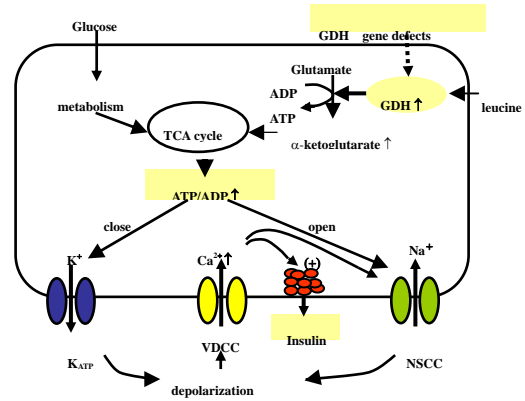


症するというユニークな疾患である。これまで、我々は2症例を酵素学的に診断し、当初発見された遺伝子変異の領域である蝶番部位の変異 (G446D) 以外に、アンテナ様構造部位での遺伝子変異 (L413V) を発見した (図1)。G446D は基礎 GDH 活性には変化なく、GTP で抑制効果の減少を認めた。しかしながら、L413V は GTP で抑制効果の減少に加え、基礎 GDH 活性の上昇を認め、GDH 立体構造上での遺伝子変異の位置の違いが反映していると推定した (Fujioka et al. Eur J Hum Genet 9:931-937, 2001)。

### 1) 高インスリン血症の発症機構

我々は変異 GDH cDNA を MIN6 膵β細胞へ導入することで、GDH 異常からインスリン過剰分泌までのシグナル伝達のメカニズムを明らかにしている (Kawajiri et al. Ped Res 59: 359-364, 2006)。すなわち、L413V 変異導入膵β細胞では GDH の GTP 抑制効果の喪失とグルコース低濃度領域でのインスリンの過剰分泌を示し、生理的な制御機構が崩壊していた。patch-clamp 法によるシングルチャンネル解析では、細胞膜の有意な脱分極と頻回の  $Ca^{2+}$  spike、さらに細胞内 ATP 濃度の上昇を明らかにした。チャンネル作動薬を用いた実験から  $K_{ATP}$  チャンネルの閉鎖とともに非選択性陽イオンチャンネルの活性化を認めている。Li ら (J Biol Chem 281: 15064-15072, 2006) は高インスリン血症動物モデルでの  $K_{ATP}$  チャンネル以外のチャンネルの存在とその重要性を指摘しており、我々の研究結果を支持している。以上の結果から、膵β細胞において (1) GDH 遺伝子変異による GDH 活性の亢進、(2) 細胞内 ATP/ADP 比の上昇、(3)  $K_{ATP}$  チャンネルの閉鎖、(4) 非選択性陽イオンチャンネルの活性化と脱分極、(5) 細胞外から細胞内へ  $Ca^{2+}$  の流入、(6) インスリン分泌という、高インスリン高アンモニア血症のインスリン過剰分泌機構を明らかにした (図2)。

図2



### 2) 高アンモニア血症の発症機構

GDH 異常症における高アンモニア血症の発症原因については、1) 肝臓での glutamate の減少に伴いカルバミルリン酸合成酵素を活性化物質の N-acetylglutamate 産生障害。2) 全身臓器での glutamate と  $NH_3$  からの glutamine 産生障害などが推定されているが、その発症機序は必ずしも明らかではない。

### 3) 高アンモニア血症の治療法の開発

主要症状の一つである低血糖症—高インスリン血症—に対する治療は  $K_{ATP}$  チャンネルへの作用薬であるジアゾキサイドが有効で、良好な血糖コントロールを可能としている。しかしながら、高アンモニア血症に対しては、当該患者の静脈血中のアンモニアが高値であるにも関わらず、肝静脈のアンモニア値がそれほど高くないこと、carbamylglutamate (N-acetylglutamate のアナログ)、安息香酸ナトリウムの投与で高アンモニア血症が軽減されないことから、高アンモニア血症の治療には GDH 活性そのものを抑制することが必要と考えている。GDH 活性を抑制する薬剤としては緑茶の成分である epigallocatechin gallate が GDH 活性と insulin 分泌を抑制することを報告されている (Li C et al. J Biol Chem 281: 10214- 10221, 2006)。

### 2. 研究の目的

本研究では高インスリン高アンモニア血症 (GDH 異常症) の高アンモニア血症の発症機構の解明を行い、その有効な治療法の開発を行うことを目的とする。この GDH 異常はアンモニア処理を行う肝臓のみならず、全身臓器への影響の結果として高アンモニア血症を来していると考えている。高アンモニア血症はたとえ軽度であっても小児期から長期間にわたる場合その影響は甚大で、成人になるにつれて精神症状などの中枢神経障害を来すことは先天性門脈欠損症や成人型シトルリン血症 (シトルリン欠損症) の報告からも明らかである。GDH 異常症での高アンモニア血

症の発症機構については研究報告がほとんどなく、いまだ不明な点が多い。

具体的には以下のような研究を行う。

- 1) 新たな患者における GDH 酵素活性、キネティック解析、遺伝子異常を同定する。
- 2) トランスジェニックマウスを作成し、各臓器での GDH 異常症の影響をアンモニア濃度、glutamate 代謝、尿素サイクル代謝を検討する。
- 3) トランスジェニックマウスによる長期にわたる高アンモニア血症の発育発達に与える影響を明らかにし、その治療法を検討する。
- 4) アンモニア解毒の全身でのネットワークを考えた上で、GDH 遺伝子異常の影響を検討する。高アンモニア血症の要因としては、肝臓が最も考えられるが、腎臓、筋肉などその他の臓器の果している役割を明らかにする。そのために、変異 GDHcDNA アデノウイルスをマウスの各臓器べつに感染するように投与し、そのアンモニア産生と代謝機能を検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) GDH 活性の測定方法と遺伝子変異の同定

患者末梢血から Epstein-Barr ウィルスでリンパ芽球作成した。10 mM Tris-acetate (pH 8.0)、1 mM EDTA でホモジナイズした後、遠心分離後、上清を酵素液とした。20 mM Tris-acetate (pH 8.0)、50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.2 mM NADH、1 mM EDTA、and 0.1% Triton X-100 で 5 min、25° C 前反応させた後、10 mM  $\alpha$ -ketoglutarate で NADH の酸化反応を開始し、GDH 活性を測定した。GTP と ADP を反応液に種々の濃度で加えて、阻害効果とアロステリック効果測定した (Fujioka et al. Eur J Hum Genet 9:931-937, 2001)。

リンパ芽球よりゲノム DNA を抽出し、PCR 増幅合成した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にてダイレクトシーケンシングにて遺伝子変異を同定した。

#### 2) アデノウイルス変異 GDHcDNA による動物モデル作製

ヒト肝臓から得られた Full-length GDHcDNA に site-directed mutagenesis 法で L413V と G446D 変異を導入し、変異 GDHcDNA を作製した。リコンビナントアデノウイルスベクターに FLP-FRT recombination system に基づいて導入した。(Tashiro F et al. Hum Gene Ther 10:1845-1852, 1999)。すなわち、pASCXa コスミドベクターに正常および変異 GDH 遺伝子を組み込み、ベクタープラスミドの構築を行なう。pAxCAwtGDH と親ウイルス DNA-TPC を 293 細胞に導入し組換えウイルスを得る。この動物モデルのを用いて、臓器別に変異 GDH 遺伝子を発症させることであ

る。すなわち、変異 GDHcDNA アデノウイルスをマウスの各臓器別に感染させる事で限定的な動物モデルを作成する。

#### 3) トランスジェニックマウスの作成

ヒト L413V 変異、chicken b-actin promotor、CMV-IE enhancer を組み込んだ pASCXaGDH を作成する。精製した遺伝子をマイクロインジェクション法によりマウス C57BL/6 の受精卵に導入し、GDH 異常をユニバーサルに発現するトランスジェニックマウスを作成する。ヒト L413V/GDH cDNA と導入ベクターの断片を allele-specific amplification 法にて確認することで、マウススクリーニングを行う。血糖、アンモニア等の高インスリン高アンモニア血症の臨床症状と生化学検査のチェックを行う。作成したマウスの肝臓および膵  $\beta$  細胞を中心に、GDH 酵素のキネティック・スタディおよび酵素免疫生化学的解析を行い、異常 GDH の発現を確認する。

次に、このモデル動物を用いて生体内での低血糖とインスリン分泌動態、高アンモニア血症を発症させるその臓器の影響について検討する。すなわち、カルバミルリン酸合成酵素および尿素サイクル各酵素活性の測定とアンモニア、N-acetylglutamate およびアミノ酸、他の代謝産物の測定、CCAAT/enhancer -binding protein について検討する。各酵素の測定法については研究分担者の小林らの使用している方法で行う (Pierson et al. J Biol Chem 252: 6464-6469, 1977, Su et al. Biochemistry 20: 2956-2960, 1981)。

### 4. 研究成果

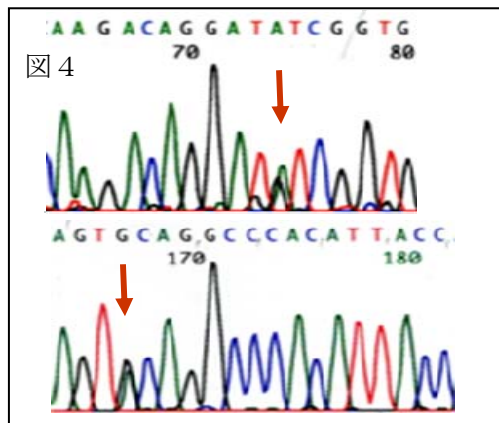
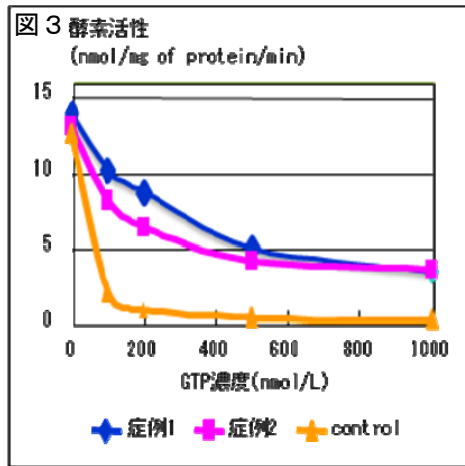
#### 1) 遺伝子解析

新たな 2 症例について酵素、遺伝子診断を行った。

a) 症例：症例 1 は 1 歳 3 ヶ月時より無熱性けいれんが頻発し、てんかんとして治療されていた。低血糖(発作時 30 mg/dl 程度)と高アンモニア血症(100  $\mu\text{mol/l}$  以上)が指摘されたが、血中インスリン値は正常上限であった。低血糖は L-ロイシン負荷にて増強され、ジアゾキサイドにて改善されている。その後、けいれん発作の消失を認めている。

症例 2 は生後 10 ヶ月時に、低血糖(29 mg/dl)で全身痙攣をきたし、アンモニア値は 130~240 mg/dl であった。明らかな高インスリン血症は認めていない。

b) GDH 活性測定(図 3):基礎 GDH 活性は、症例 1 で 14.1 nmol/mg of protein/min、症例 2 で 13.2、コントロールで 12.7 であった。症例 1、症例 2 とも GTP によって GDH 酵素活性は抑制されていた。1/2 最大抑制効果時の



GTP 濃度はそれぞれ 180、120、60  $\mu\text{mol/l}$  であった。

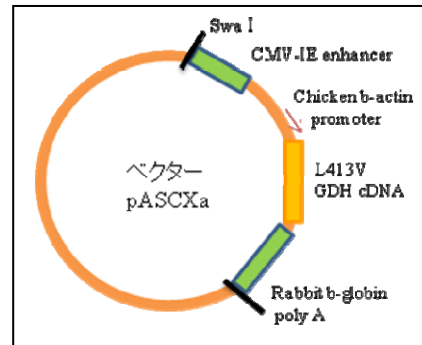
c) 遺伝子解析(図4)：症例1ではエクソン11にc. 1054 A>C変異を認め、I444Mのアミノ酸置換をきたしていた。症例2ではエクソン7にc. 956 C>T変異を認め、H262Yのアミノ酸置換をきたしていた。いずれも1対立遺伝子にのみ同定された。今回同定されたI444Mはこれまで報告はされていない喋番部位での変異であった。また、GTP結合部位の変異であるH262Y変異はRaizenらによって報告されている。

## 2) アデノウイルス変異GDHcDNAによる動物モデル作成

変異GDHcDNAアデノウイルスを作成した。L413Vアデノウイルスでは $4.5 \times 10^9$  plaque-forming units/ml、G446Dアデノウイルスでは $3.1 \times 10^{10}$ 、コントロールでは $1.6 \times 10^{10}$ 濃度をえることができた。マウスの腹腔内に投与するために、ウイルスを精製、濃縮したところである。今後、その濃度を測定し、マウスモデルを作成する。

## 3) トランスジェニックマウスの作成

ヒトL413V変異GDHcDNAをchicken b-actin promoter、CMV-IE enhancerをマウスC57BL/6



に導入し、GDH異常をユニバーサルに発現するトランスジェニックマウスを作成した。遺伝子の導入はL413V GDHcDNAの5' -と3' -の近傍領域をPCR増幅合成することで、確認した(図5)。その結果、初回の遺伝子導入受精卵からは1系統の2回目の受精卵からは3系統のマウスが得られた。現在、その生化学的特徴を確認し、系統樹立後にアンモニア代謝の全身でのネットワークを考えた上で、GDH遺伝子異常の影響を検討する。

## 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)

[学会発表] (計1件)

麻生和良、岡野善行、中野広輔、坂京子、山野恒一：高インスリン高アンモニア血症におけるglutamate dehydrogenase活性と遺伝子解析。日本先天代謝異常学会。2007年11月15-17日(山形市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 善行 (OKANO YOSHIYUKI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：60231213

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮崎 純一 (MIYAZAKI JYUNNICHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10200156

小林 圭子 (KOBAYASHI KEIKO)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：70108869

佐伯 武頼 (SAHEKI TAKEYORI)  
徳島文理大学・健康科学研究所・教授  
研究者番号：10056070

(4) 研究協力者

工藤 聡 (KUDOU SATOSHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員

麻生 和良 (ASOU KAZUYOSHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生