

平成 21年 5月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591230

研究課題名（和文） マウスモデルを用いるヒトシトリン欠損症の病態解析と治療法の開発

研究課題名（英文） Pathophysiological analysis and development of therapeutic procedures for citrin deficiency by using a mouse model

研究代表者

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

研究成果の概要：

新生児期には、肝内胆汁うっ滞、多種アミノ酸血症、ガラクトース血症などを、成人期では高アンモニア血症を伴う成人発症 II 型シトルリン血症を発症するシトリン（肝型アスパラギン酸・グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体）欠損症のモデルマウスを作成した。本研究では、その病態を解析し、アミノ酸、尿素合成異常だけでなく、糖代謝異常が大きな役割を果たしていることを明らかにし、ピルビン酸ナトリウムやアミノ酸混合物が、疾患モデルマウスの病態改善に有効であることを見いだした。さらに、ショ糖投与後、肝臓において解糖系中間体濃度が著しく増加することを見いだした。本現象は、今後有効な治療薬検定における有効なマーカーになる得るものと考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：先天代謝異常症、モデル動物、アスパラギン酸・グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体、シトリン、病態解析、治療法

1. 研究開始当初の背景

高アンモニア血症とシトルリン血症を呈する肝脳疾患の酵素異常を解析し、佐伯らは、当疾患を成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) と名付けた。さらに CTLN2 の病因遺伝子 (SLC25A13) を発見、コードするたんぱく質をシトリンと命名すると同時に、遺伝

子診断法を確立した。その結果、新生児の新しい病態 (新生児肝内胆汁うっ滞症: NICCD) において、CTLN2 症例で同定したとまったく同じ変異を見だし、シトリン欠損症という疾患単位を打ち立てた。NICCD は、多種アミノ酸血症、黄疸、ガラクトース血症、低血糖症などの多彩な症状を呈する。この間に、シ

トリニンがミトコンドリア膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体であることを明らかにでき、病態発症の大まかな機構解明を成し得た。すなわち、シトリンはミトコンドリアからアスパラギン酸を細胞質に供給するという機能を持つ。その欠損は尿素合成におけるアスパラギン酸不足を招き、尿素合成不全から高アンモニア血症を呈する。さらにシトリンは、細胞質 NADH 還元当量をミトコンドリアへと輸送する代謝系である、リンゴ酸アスパラギン酸シャトルの一員である。シトリン欠損は、その機能不全を起し、エネルギー代謝異常を引き起こしているものと考えられる。

ところで、シトリン欠損症の詳細な病態を明らかにし、治療法を確立するにはモデル動物が欠かせない。シトリンを欠損するマウス (citrin-KO マウス) を作成した。しかし、citrin-KO マウスは、肝灌流のレベルでは尿素合成不全を示したものの、生体レベルでは、なんらの症状を示さなかった。もうひとつの細胞質 NADH 処理系であるグリセロリン酸シャトルが、マウス肝臓ではヒト肝臓に比べ、20 倍以上の活性があるので、citrin-KO マウスが症状を示さないのは、このヒトとマウスの違いにあると確信し、新たに、ミトコンドリアグリセロリン酸脱水素酵素 (mGPDH) をも欠損した citrin/mGPDH ダブル-KO マウスを作成した。本ダブル-KO マウスは高アンモニア血症と高シトルリン血症を示し、シトリン欠損症のモデルマウスを確立することができた。

一方、シトリン欠損症患者の栄養摂取量を解析することによって、シトリン欠損症の特異な食癖を解明することができた。すなわち、シトリン欠損症患者の食癖の最も重要な点は、絶対量的にも、摂取量のパーセンタイル分布でも、またエネルギー比 : protein/fat/carbohydrate (PFC) ratio においても、糖質摂取が統計的有意差を持って少ないことである。さらに、1 患者の解析から、糖質比率の高い病院食を取ると血中アンモニアの上昇傾向を示し、たんぱく質・脂肪の多い、糖質の少ない好みの食事を取ると血中アンモニア上昇の傾向がなくなることを見いだした。さらに、高濃度の糖を含む高カロリー輸液、脳浮腫へのグリセロール・フルクトース投与によって、CTLN2 患者の予後が不良になることから、シトリン欠損症における糖毒性の危険性を提唱してきた。

2. 研究の目的

本研究では、citrin/mGPDH ダブル-KO マウスが真にヒトシトリン欠損症のモデル足りえるかどうかを病態解析から明確にし、その結果を踏まえ、新しい治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) マウスの作成 :

Citrin-KO ヘテロ接合体 (citrin^{+/+}) の交配によって、野生型と citrin-KO マウスを得た。一方、mGPDH^{-/-}で citrin^{+/+}マウスの交配によって、mGPDH-KO と citrin/mGPDH ダブル-KO マウス (以下、ダブル-KO マウス) を作成し、実験に供した。

(2) 食事組成とピルビン酸ナトリウム (Na-Pyr) の添加効果 :

食事組成とそれへの Na-Pyr の添加効果を検討するために、固形食である CE2 を粉末化した食餌と粉餌食 AIN76 (ただしシヨ糖含量は30%とした AIN76/30%Suc 食) の摂取量と、AIN76 への 20%Na-Pyr を添加した食餌 (AIN76/30%Suc/20%Na-Pyr) の体重に及ぼす影響を検討した。

(3) 糖負荷試験と Na-Pyr、トリプトンの効果検定 :

シヨ糖溶液 (25%または 50%; 20ml/kg) を、胃ゾンデを用いて経口投与し、経時的、または 1 時間後に採血し、血中アンモニアを測定した。グルコース、フルクトースについても検討した。Na-Pyr は、シヨ糖投与後 30 分に、5%溶液を 20ml/kg (1g/kg) 腹腔内に投与した。トリプトン (カゼイン臍液消化物) は 25%溶液をシヨ糖液とともに投与した。

(4) ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) による肝内代謝中間体の検索と酵素法による分析 :

特異な代謝中間体濃度変化を見いだすために、上記 4 種のマウス freeze-clamp 肝臓過塩素酸抽出物中における解糖系と TCA サイクル中間体の相対的濃度比を GC/MS を用いて解析した。さらにその結果を、glycerol 3-phosphate (G3P) 特異的酵素を用いる方法 (G3P dehydrogenase) によって確認を行った。同様に、乳酸、ピルビン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸も酵素法によって測定した。

4. 研究成果

(1) 食餌組成のマウス体重に及ぼす効果と Na-Pyr 添加の効果 (図 1)

マウスの食餌は、通常 CE2 (PFC 比=29:12:59) を用いている。この食餌では、ダブル-KO マウスの体重は他の 3 種のマウスに比し、若年時低い傾向にあるが、100 日を過ぎると有意差を見いだせない程度となる。この時点において、成分の明確な飼料 AIN76 を修飾して用い、摂食量と体重への効果を比較した。シヨ糖を 30%含む糖質 65%、たんぱく質 20%脂質 5%の飼料 (AIN76/30% sucrose; PFC 比=21:12:68) を投与した結果、mGPDH-KO マウスでは特に変化はなかったが、ダブル-KO マウスでは摂餌量の減少を伴い、体重減少をきたした。次に、でんぷん量を調整して、

20%Na-Pyr を含む飼料 (AIN76/30% sucrose/20%Na-Pyr) を投与した結果、ダブル-KO マウスでは体重減少が抑制されたが、mGPDH-KO マウスでは体重減少が起こった。

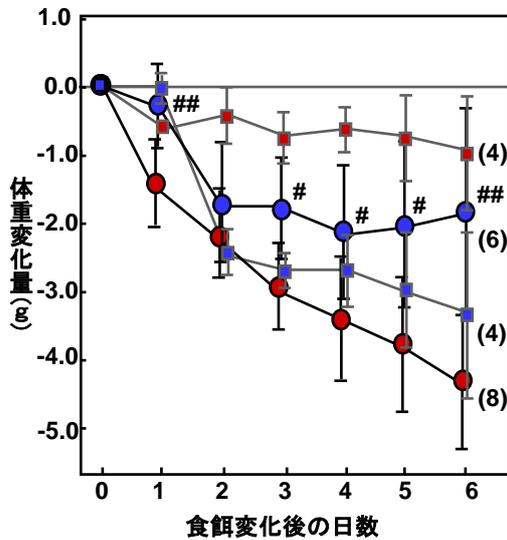


図 1. 体重に及ぼす食餌 AIN30%Sucrose (赤印) の効果と 20%Na-Pyr 添加 (青印) の効果
○ダブル-KO マウス；□mGPDH-KO マウス (マウス匹数), # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$.

以上の結果は、ショ糖の毒性を示唆するとともに、Na-Pyr の治療効果を示唆している。対照マウス (mGPDH-KO マウス) で Na-Pyr による体重減少が見られた原因は、Na-Pyr の味の悪さに由来するものと考えている。

(2) ショ糖溶液投与後の血中アンモニア濃度の上昇 (図 2)

ダブル-KO マウスでは、摂食時に血中アンモニア濃度が他のマウスに比し、有意に高値である。さらにショ糖溶液 (10g/kg) の経口投与の対与によって、ダブル-KO マウスでは 1 時間にピークとなる著しい血中アンモニア濃度の上昇を起こした。他のマウス (citrin-KO および mGPDH-KO) マウスではそのような現象は起こらなかった。ショ糖以外の糖についても検討した。フルクトース、およびグルコースでも同様に血中アンモニア濃度の上昇を起こした。以上の結果は、ダブル-KO マウスにおける糖質の毒性を明らかに示すものとする。

(3) ショ糖溶液投与による血中アンモニア濃度上昇に及ぼす Na-Pyr およびトリプトンの効果 (data not shown)

ショ糖溶液投与による高アンモニア血症に対して、Na-Pyr とトリプトンの投与効果を検討した。ショ糖投与 30 分後に Na-Pyr (1g/kg) を腹腔内に投与し、30 分後 (ショ糖投与 1 時間後) に血液を採取し、アンモニアを測定した。ダブル-KO マウスへの Na-Pyr

の投与によって、血中アンモニアは低下傾向を示したが、対照 (mGPDH-KO マウス) との比較で有意差は得られなかった。次に、トリプトン (カゼインの膵液酵素による加水分解物; 5g/kg) をショ糖と同時に投与した。血中アンモニアの上昇はトリプトンの投与によって大幅に抑制された。Na-Pyr については、投与量と投与時間について今後検討する必要がある。トリプトンは、明らかな血中アンモニア濃度を低下させる効果が得られた。今後は、トリプトンの濃度変化、および有効成分の同定を行う必要があると考える。

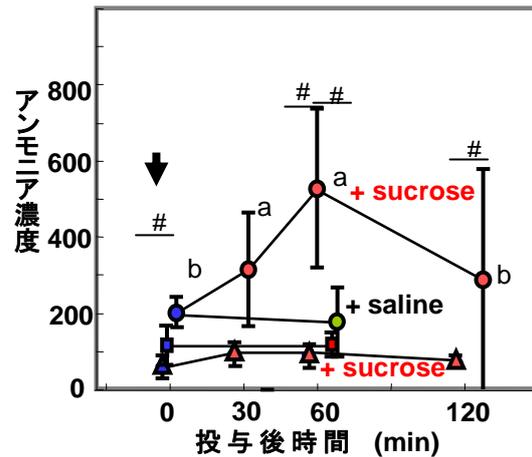


図 2. Citrin-KO, mGPDH-KO, ダブル-KO マウスへの sucrose (10g/kg) または saline 投与の血中アンモニア濃度への効果。○ダブル-KO マウス；□citrin-KO マウス；△mGPDH-KO マウス # $p < 0.05$; a, b はダブル-KO マウス時間経過における ANOVA による有意差検定を示す。縦軸はアンモニア濃度 $\mu\text{g/dl}$ を示す。

(4) GC/MS による肝内代謝中間体濃度の比較とショ糖投与の効果

ダブル-KO マウス肝臓において大きく変化している代謝中間体を検索する目的で、4 種のマウス freeze-clamp 肝臓の過塩素酸抽出液を用いて GC/MS による解析を行った。検出できたのは、TCA サイクル中間体、アミノ酸、および解糖系中間体の glycerol 3-phosphate (G3P) などであった。TCA サイクル中間体濃度は、野生型の濃度が全般に高く検出され、mGPDH-KO マウスおよびダブル-KO マウスで低濃度を示したが、特にダブル-KO マウスで特異な変化を示す物質は見いだせなかった。しかし、図 3 に示すように、解糖系中間体である G3P 濃度はダブル-KO マウスにおいて他のマウスより高い傾向にあった。そこで、mGPDH-KO マウスとダブル-KO マウスでショ糖溶液の投与効果を比較した。図 3 に示すように、ダブル-KO マウスにおいてはショ糖

投与によって肝内 G3P 濃度は著しく上昇することが判明した。同時に検出した2種のアミノ酸 (アスパラギン酸とアラニン) は、生食投与の対照、およびショ糖投与グループにおいてもダブル-KO マウスで低濃度であった。

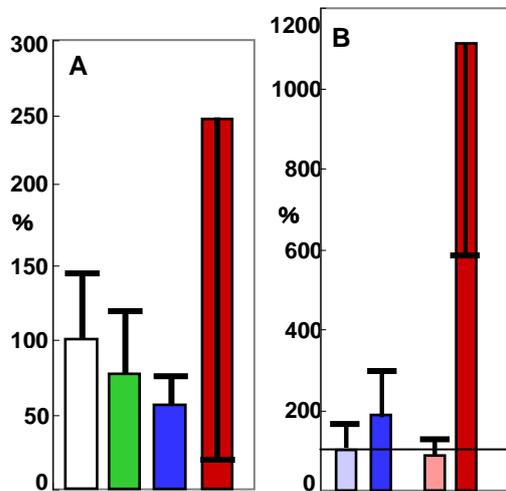


図 3. 肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) 濃度の比較 (GC/MS 法)。[A] 摂食時野生型 (白)、citrin-KO (緑)、mGPDH-KO (青)、ダブル-KO (赤)；[B] mGPDH-KO マウスとダブル-KO マウスに生食投与 (淡青、ピンク)またはショ糖 (10g/kg) 投与 (青、赤)1時間後の肝内 G3P 濃度。縦軸はそれぞれ、野生型または mGPDH-KO 生食投与群を 100%として示した。

(5) 酵素法による肝内 G3P 濃度変動の確認
GC/MS の結果を確認し、正確な濃度を算出するために、生食投与とショ糖投与の条件下で4種のマウス肝 G3P 濃度を酵素法によって測定した。図4に示すように、生食投与条件下では、citrin-KO マウスとダブル-KO マウスにおいて有意に G3P 濃度が他の野生型および mGPDH-KO マウスより高い濃度を示した。さらにショ糖投与条件下では、野生型と mGPDH-KO マウスにおいて有意に G3P 濃度は上昇し、citrin-KO マウスのレベルに達した。一方、ダブル-KO マウスにおいては、野生型マウスの約 50 倍と、著しい上昇を示した。以上の結果は、G3P が本シトリン欠損モデルマウスの有効な病態マーカーとなる可能性を示している。今後は肝 G3P 濃度の測定によって、病態を判断し、治療薬の開発に用い得ると考察する。

(6) 細胞質 NADH/NAD⁺比
細胞質 NADH/NAD⁺比は、乳酸脱水素酵素および細胞質 glycerol 3-phosphate 脱水素酵素が平衡反応を触媒することから 乳酸/ピルビン酸 (L/P) 比、および G3P/ジヒドロキシ

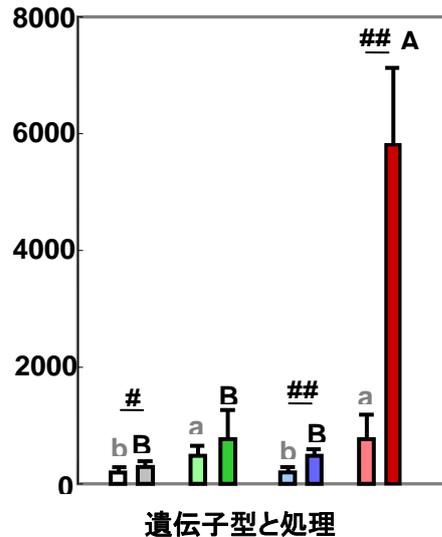


図 4. 酵素法による肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) 濃度の比較。左から、生食投与とショ糖投与の野生型、citrin-KO、mGPDH-KO、ダブル-KO マウスを示す。a,b は生食投与群間の比較 (ANOVA)、A,B はショ糖投与群間の比較 (ANOVA)。縦軸は G3P 濃度 nmol/g liver。

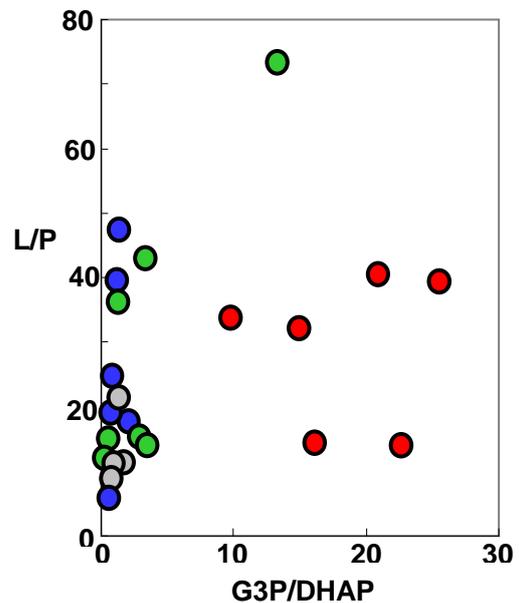


図 5. ショ糖投与時の肝内 G3P/DHAP 比と Lact/Pyruvate (L/P) 比の比較。野生型 (灰色)、citrin-KO (緑)、mGPDH-KO (青)、およびダブル-KO マウス (赤)

アセトンリン酸 (G3P/DHAP) 比を測定することによって得られるとされている。したがって、両比率は平行して変化するとされてい

る。しかしながら、両比率は必ずしも平行して変化せず、特にショ糖投与後、ダブル-KO マウスにおいて大きくずれている事が明らかになった (図5)。

なぜ、このような両比率間にずれが生じるのか、不明であるが、可能性としては、肝小葉内での酵素、代謝中間体の局在性の問題と考えている。いずれにしても、大変興味ある現象と考える。また、ショ糖投与による G3P 濃度の著しい上昇は、今後、トリプトンの成分中からの有効成分探索など、新規治療薬の開発におけるよいマーカーになりえるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

- ① Nagasaka H, Kobayashi K (8 番), Saheki T (9 番), Yorifuji T. Sustaining hypercitruinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2, citrin deficiency, even during the silent period. **Mol Genet Metab**, 97, 21-26 (2009) 査読あり
- ② Song YZ, Kobayashi K (10 番), Saheki T (11 番), Zheng XY. Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: Clinical and laboratory investigation of 13 subjects in mainland of China. **Dig Liver Dis.** (2009) 査読あり
- ③ Mutoh K, Kurokawa K, Kobayashi K, Saheki T. Treatment of a citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinaemia with arginine and sodium pyruvate. **J Inherit Metab Dis.** (2008 Oct 29) [Epub ahead of print] 査読あり
- ④ Komatsu M, Saheki T (10 番), Aoyama T, Kobayashi K (12 番). Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol.** 49, 810-820, (2008) 査読あり
- ⑤ Saheki T, Kobayashi K, Terashi M, Ohura T, Yanagawa Y, Okano Y, Hattori T, Fujimoto H, Mutoh K, Kizaki Z, Inui A. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. **J Inherit Metab Dis.** 31, 386-394, (2008) 査読あり
- ⑥ Tabata A, Saheki T (11 番), Kobayashi K (12 番). Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency. **J Hum Genet.** 53, 534-545 (2008) 査読あり
- ⑦ Soeda J, Kobayashi K (8 番), Saheki T (9 番), Kojiro M, Miyagawa S. Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial

differentiations associated with citrin deficiency: a case report. **J Clin Gastroenterol.** 42, 855-860 (2008) 査読あり

- ⑧ Ko JM, Saheki T (7 番), Kobayashi K (8 番), Yoo HW. Six cases of citrin deficiency in Korea. **Int J Mol Med.** 20, 809-815 (2007) 査読あり
- ⑨ Saheki T, Iijima M, Li MX, Kobayashi K, Horiuchi M, Ushikai M, Okumura F, Meng XJ, Inoue I, Tajima A, Moriyama M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Tsui LC, Tsuji M, Okano A, Kobayashi T. Citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. **J Biol Chem.** 282, 25041-25052 (2007) 査読あり
- ⑩ Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Abukawa D, Sakamoto O, Tsuchiya S, Saheki T. Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD). **J Inherit Metab Dis** 30 (2):139-144 (2007) 査読あり
- ⑪ Dimmock D, Kobayashi K, Iijima M, Tabata A, Wong LJ, Saheki T, Lee B, Scaglia F. Citrin deficiency: a novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. **Pediatrics.** 119, e773-777 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 63 件)

- ① 佐伯武頼, 小林圭子, 飯島幹雄. Citrin/mGPDH ダブル KO マウスを用いるシトリン欠損症の治療法の開発. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会・第 7 回アジア先天代謝異常学会 [2008. 11. 6-8] 米子
- ② Saheki T, Kobayashi K. Citrin deficiency: Pathophysiology and issues of its treatment. **AASPP-Seminar on Citrin Deficiency in Vietnam jointed with Pediatric Society Meeting of HCMC** [2008. June 26] Ho Chi Minh City, Vietnam
- ③ Saheki T, Kobayashi K. Citrin deficiency: Pathophysiology and issues of its treatment. The Celebration Ceremony for the 10th Anniversary of CJCP & the 2008 **National Conference on Pediatric Hotspot** [2008. 9. 17-21] Changsha, Hunan, China 招待講演
- ④ Saheki T, Kobayashi K. A newly-established disease entity, citrin deficiency. **The 11th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism (AEWIEM)** [2008. April 18-23] Seoul and Jeju, Korea 教育講演
- ⑤ Saheki T, Kobayashi K. Pathophysiology and nutritional aspect of citrin deficiency. **10th Military Annual Meeting on Pediatrics and 3rd National Conference on Pediatric Hotspots** [2007. 8. 17-20] 中国・内モンゴル自治区・呼和浩特市 招待講演

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

小林 圭子 (KOBAYASHI KEIKO)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・病態
医化学分野・准教授
研究者番号：70108869

(3)連携研究者

久原 とみ子 (KUHARA TOMIKO)
金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学
研究部門・教授
研究者番号：30080568