

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16844

研究課題名（和文）シトリン欠損症における乳児期肝障害の病態解明と新規治療開発

研究課題名（英文）The phenotype of citrin-KO mice by cystine reduced nutrition

研究代表者

市野井 那津子 (Ichinoi, Natsuko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40509402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、“シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症”の病態解明のため、既存のシトリンKOマウスを用いた解析を行った。システイン含有濃度の異なる飼料を各遺伝子型のマウスに与え表現型を解析した。生存期間や体重、外観などは有意な変化を認めなかった。また、マウス血液検体を用いた解析では、肝逸脱酵素や血糖、アミノ酸分析結果において、各群間に明らかな差異は見出しえなかった。種間の代謝の差異が影響している可能性も考えられた。本研究で得られた肝臓組織検体の解析は今後さらに進める。NICCDの病態は本研究では解明しえなかったため、別の方策で検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトリン欠損症はアジアで比較的頻度の高い疾患で、その詳しい病態については未解明な点も多い。今回、システイン代謝と本疾患との関連に着目し解析を進めたが、システイン含有濃度の異なる飼料を与えたシトリンKOマウスにおいては明らかな表現型の変化は認めなかった。種間におけるシステイン代謝の差異なども考慮されるため、今後、解析対象細胞を変えるなど、さらなる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to explore the pathogenesis of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, NICCD, related to cysteine. The phenotype of citrin KO mice fed different cysteine concentrations was assessed. There were no changes in survival, appearance, body weight, or blood level of AST/ALT between each group of mice. Analysis of liver pathological characteristics is proceeding. We need further studies to elucidate the pathogenesis of NICCD.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：システイン シスチン シトルリン ミトコンドリア ATP

1. 研究開始当初の背景

シトリン欠損症は、*SLC25A13* 遺伝子を原因遺伝子とする常染色体潜性遺伝疾患で、日本、中国をはじめとする東アジアで頻度が高い。ミトコンドリア膜のトランスポーターであるアスパラギン酸グルタミン酸キャリア (AGC) を担うシトリン蛋白の欠損により、年齢依存性に多彩な症状を呈する。新生児・乳児期は一過性胆汁うっ滞性肝障害を呈するが、重症度は多様で、肝移植を要する例や致死性となる例の報告がある一方で、自然軽快する例やごく軽微な徴候のみの例も多く、その要因は不明である。本疾患の病態にはシトリン欠損に伴うミトコンドリア機能不全の関連が示唆されているものの、その明確な病態は未解明である。

これまで、乳児期に一過性に類似した経過をとる他の疾患でミトコンドリア内転移 RNA (tRNA) 減少の発症への関与が示唆されている。これらの疾患では、ミトコンドリア tRNA 修飾に関わる酵素の機能喪失により、ミトコンドリア内 tRNA 機能不全に伴う翻訳障害を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を呈する。*TRMU* 遺伝子異常の病態には、アミノ酸の一種であるシステインが乳児期の細胞内欠乏が関与していると考えられており、チオール基の供給源となりうるシステインの投与により症状軽快した例の報告がある (Soler-Alfonso C, et al. 2019)。

シトリン蛋白は、ミトコンドリア膜においてグルタミン酸とアスパラギン酸の輸送に加えて、システインの中間代謝産物であるシステインスルフィンのミトコンドリア内輸送を担う。システインスルフィンはミトコンドリア内のチオール基のドナーとして働くため、システインスルフィン担体であるシトリン欠損によって、ミトコンドリア内のシステインスルフィン酸が低下し、*TRMU* 遺伝子異常と同様の機序で乳児期の一過性肝障害を来すという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究ではシトリン KO マウスを用いシトリン欠損症の乳児期肝障害の病態解明を目的とした。シトリン欠損症は本邦で罹患頻度が高く、非常に特異的な自然歴が判明しているが、発症/未発症の原因識別やその詳細な機序は不明である。これまで未解明であったシトリン欠損症における乳児期肝障害の病態を明らかにすることは、病態に則した治療法の提供につながり、未発症あるいは非常に軽症の段階で肝障害の進行予防を行いえると考えられる。さらに、システインの補充を標的とした新たな創薬の開発につながる可能性を有する。

3. 研究の方法

上記を明らかにするため、ミトコンドリア機能障害の評価、ミトコンドリア画分内のシステイン代謝産物の低下、モデルマウスへのシステイン投与/非投与下における表現型解析。特にでは、システイン投与前後における表現型の回復の有無を見るために肝障害やミトコンドリア機能障害の評価に注力する。

既存のシトリン欠損症モデルマウスを入手し、システイン濃度の異なる飼料 (実際にはシステイン結合した含硫アミノ酸であるシスチンを減じた飼料) を与え、マウスの表現型解析を行う。肝組織を採取し、血清マーカー測定、病理標本作製を行う。

ミトコンドリア機能低下の原因としてミトコンドリア内システイン代謝産物の低下を示すため、シトリン蛋白を欠失させた肝細胞のミトコンドリア画分を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデムマス装置を用いたメタボローム解析を検討する。

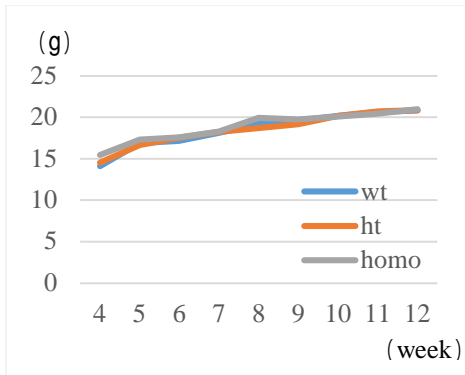
シトリン欠損症モデルマウスへのシステイン投与前後でのミトコンドリア機能評価を行う。

4. 研究成果

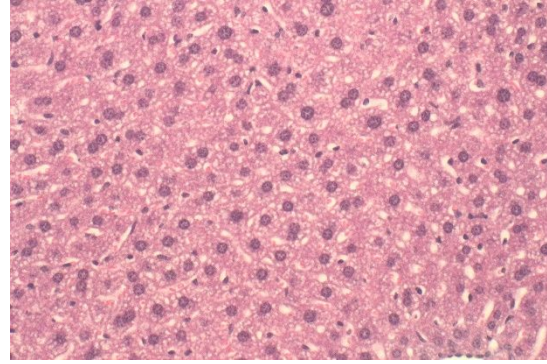
研究代表者の異動に伴い、一部研究方法内容を変更し、ミトコンドリア機能解析およびシステイン代謝産物解析は今後の課題とした。

シトリン KO マウスに通常飼料、低シスチン飼料、通常濃度シスチンのアミノ酸含有飼料を与え、野生型、ヘテロ型、変異型のマウスにおける表現型解析を行った。シトリン KO マウスの遺伝子型は野生型：ヘテロ型：変異型 = 38:84:29 で分離された。各遺伝子型マウスの血液検体および肝組織を分析に用いた。表現型としては、体重や生存期間などにおいて有意差は認めなかった (図 1)。肝逸脱酵素は一部高値を示す個体があったものの、各群間の有意差は認めなかった (図 2)。血糖値の変動も各遺伝子型群で有意な変化を見出しなかった。血中アミノ酸分析ではヒトで認めるシトリン上昇は、シスチン減量飼料摂取の有無に関わらず認めなかった。肝組織の組織学的評価およびミトコンドリア形態の定量的な評価については行っておらず、今後の課題として解析を進める予定である (図 1)。

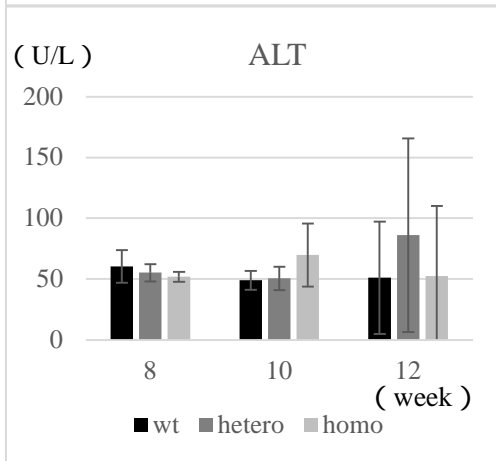
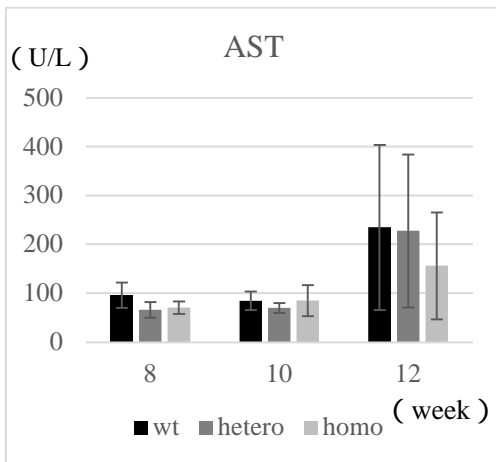
研究期間全体を通して、シトリン欠損マウスにおいて、シスチン減量飼料の摂取による表現型および血液検査における明らかな変化や明らかな有意差は示しなかった。種間による表現型の差異や、血液検体を採取する時期の検討などが必要であると考えられた。



【図1】低シスチン飼料を与えた各遺伝子型マウスの体重推移 (n=4)



【図3】低シスチン飼料を与えたシトリン K0 マウスの肝組織像



【図2】低シスチン飼料を与えた各遺伝子型シトリン K0 マウスの AST, ALT 値 (n=4, 一部 3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Arai Ichinoi Natsuko, Kikuchi Atsuo, Wada Yoichi, Sakamoto Osamu, Kure Shigeo | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Hypoglycemic attacks and growth failure are the most common manifestations of citrin deficiency after 1 year of age | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease | 6. 最初と最後の頁 838 ~ 846 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jimd.12390 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 大海なつき、市野井那津子、殿内亮介、峯佑介、高野智圭、小川えりか、石毛美夏、浦上達彦、森岡一朗、石毛信之 |
| 2. 発表標題 低血糖時の分枝鎖アミノ酸上昇を反復したシトリン欠損症幼児 |
| 3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 市野井那津子 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 診断と治療社 | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 小児科診療86巻春増刊号 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|