

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590892

研究課題名(和文) シトリン欠損症における糖質摂取忌避と食欲低下の機構

研究課題名(英文) Mechanism of aversion to carbohydrate in citrin deficiency

研究代表者

牛飼 美晴 (Ushikai, Miharū)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70232816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シトリン欠損症における食癖(糖質摂取を好まない)について注目し、疾患モデルマウスを用いて中枢神経系を中心に解析した。視床下部における食欲関連ペプチドの遺伝子発現を評価した結果、通常食摂取時には、摂食抑制ペプチドであるUrocortin1(Ucn1)が高発現した。また、スクロース投与後の血中乳酸濃度は、野生型に比べて有意に上昇した。Ucn1・血中乳酸濃度が、摂食行動に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we analyzed the mechanism of aversion to carbohydrate in citrin deficiency using a model mouse. Our analysis on the appetite-related neuropeptides revealed a higher expression of urocortin1 (Ucn1) in the model mouse under the fed conditions. Oral sucrose administration significantly increased blood lactate concentration in the model mouse as compared with the wild-type, suggesting that the increases in blood lactate and Ucn1 expression in the central nervous system are related to the aversion in the model mouse.

研究分野：健康科学 栄養学

キーワード：シトリン欠損症 食行動解析

1. 研究開始当初の背景

シトリン欠損症は、SLC25A13 を病因遺伝子（遺伝子産物：シトリン citrin）とする劣性遺伝性先天代謝異常症で、新生児期（生後 1 歳まで）に NICCD（neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency）を起こし、見かけ上健康な時期を過ごし、成人期に重篤な CTLN2（成人発症 II 型シトルリン血症）を発症する、小林・佐伯らによって確立されたまったく新しい疾患概念である。NICCD では多種アミノ酸血症・胆汁うっ滞・ガラクトース血症などの多彩な症状を、CTLN2 ではシトルリン血症と高アンモニア血症を伴う意識障害発作を引き起こす、診断が難しい疾患である。最も重要で明確な生活習慣は、糖質を嫌い、たんぱく質・脂肪に富む食事を好むという特異な食癖である。この食癖を聞き出すだけでほぼ診断は可能である。このような食癖を生じる原因は、高糖質食摂取、高糖質輸液などで高アンモニア血症を起こすことと関連があると考えられる。さらに重症の CTLN2 では、顕著な痩せが認められ、幼児期～学童期に食べないことを一因とする低血糖・成長障害が認められる。佐伯らはこれまでに 200 例を超える CTLN2 を生化学的・分子遺伝学的に解析してきた。シトリンは、ミトコンドリア内膜局在の肝臓型アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体であるという機能が解明され [Palmieri et al. EMBO J 2001]、多彩な病態発症や代償機構の説明、治療法の再考が可能となった。シトリンの代謝機能は、ミトコンドリアから細胞質へ、尿素合成・タンパク質合成・核酸合成に必要なアスパラギン酸を供給し、肝臓の主要な NADH シャトルである malate-Asp シャトルを構成して細胞質 NADH 還元当量のミトコンドリアへの輸送：好氣的解糖に関与し、また 乳酸からの糖新生にも関与していることである。

病態解明・治療法開発を目的として作製されたシトリン欠損 (citrin KO) マウスは、*in vitro* の実験系では有用であったが、モデルマウスは生体レベルではヒトシトリン欠損症の症状をほとんど呈さなかった。その原因はヒト肝臓中で活性が低いグリセロリン酸(GP)シャトルがマウスでは高活性であることによると考えられた。そこで、ミトコンドリアグリセロリン酸脱水素酵素(mGPDH)と citrin を同時に欠損するダブル(citrin/mGPDH)KO マウスを作成し、高アンモニア血症、高シトルリン血症、低血糖、成長障害を呈すヒトシトリン欠損症モデルマウス(citrin/mGPDH double-KO マウス) が樹立できた。

2. 研究の目的

シトリン欠損症モデルマウスの高アンモニア血症はショ糖溶液の強制投与によって著し

く増強され、また、モデルマウスは高糖質食を忌避する。このことはヒト患者に観察される糖質毒性（糖質投与による高アンモニア血症、成長障害、特異な食癖）と一致する。本研究では、シトリン欠損症のほぼすべての症状は、糖質の毒性に起因すると想定し、疾患モデルマウスの主に中枢神経系における、糖質毒性が発揮される機構と糖を忌避する機構を、遺伝、環境両因子の関与を含め解析する。すなわち、モデルマウスの食に関わる行動の解析を行ない、食欲調節機構に関わる神経ペプチドの動態との関連を検討し、摂食抑制が起こっている原因を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトシトリン欠損症モデルマウスを用いた以下の実験を試みた。疾患モデルマウス(citrin/mGPDH-KO)は、mGPDH-KO(mGPDH^{-/-})の背景をもつ citrin^{+/-}マウスの交配によって得られ、別に交配で作出する野生型 wild と citrin-KO の系と合わせ、実験には 4 種類(wild-type; citrin-KO; mGPDH-KO; citrin/mGPDH-KO) のマウスを用い比較検討した。食餌としては、通常の飼育管理に用いている固形食(CE-2)と食餌組成の違う餌として糖質含量が高くたんぱく質含量の低い固形食(AIN-93)を用いた。

食行動：食餌摂取量・摂水量などを測定した。摂食中枢である視床下部における食欲関連ペプチドの遺伝子発現(RT-PCR 法)と食欲調節ホルモンレベルを比較検討し、中枢神経系における対応・応答性を検討した。2 種類のマウス(wild-type・citrin/mGPDH-KO)にスクロースを投与し、血糖・血中乳酸値を測定(0・30・60・120 分後)した。

4. 研究成果

食行動解析：CE-2；4 種類のマウスにおいて、摂食時における摂食量・飲水量に有意差は認められなかった。摂食パターン(日内変動)においても、4 種類のマウスは、明期では摂食量が低下し、暗期開始直後 1-2 時間・暗期終了前 1-2 時間に摂食量が増加する同様のパターンを示した。AIN-93；citrin/mGPDH-KO マウスの摂食量は、他のマウスに比べ有意に少なく、体重も約 20%減少した。

摂食中枢である視床下部における食欲関連ペプチドの遺伝子発現(RT-PCR 法)の評価：citrin/mGPDH-KO マウスにおいては、CE-2 摂食時に Urocortin1(Ucn1)が、高い発現を示し、AIN-93 摂食時に Agouti related neuropeptide(AgRP)と Ucn1 が高発現を示した。また、mGPDH-KO マウスにおいては、AIN-93 摂食時に Ucn1 が高発現した。従って、citrin/mGPDH-KO マウスで

は、視床下部の Ucn1 が上昇し、摂食を抑制している可能性が示唆された。

血糖値：開始時は、citrin/mGPDH-KO マウスが有意に低かった。スクロース投与後、2種類のマウスは 30-60 分後にピークを示したが、有意差は認められなかった。血中乳酸値：開始時に有意差はなく、スクロース投与 30 分後にピークを示す同様のパターンが認められた。citrin/mGPDH-KO マウスは、30 分以降有意に高い値を示した。血中乳酸濃度が、糖質忌避に關与する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Moriyama M, Fujimoto Y, Rikimaru S, Ushikai M, Kuroda E, Kawabe K, Takano K, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Okano Y, Yazaki M, Ikeda SI, Zhang C, Song YZ, Sakamoto O, Kure S, Mitsubuchi H, Endo F, Horiuchi M, Nakamura Y, Yamamura KI, Saheki T. Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondria glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 2015 May 5. pii: S0925-4439 (15) 00129-5. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.023.

Yoshizaki Y, Kawasaki C, Cheng KC, Ushikai M, Amitani H, Asakawa A, Okutsu K, Sameshima Y, Takamine K, Inui A. Rice koji reduced body weight gain, fat accumulation, and blood glucose level in high-fat diet-induced obese mice. *PeerJ*. 査読有 2014 Aug 26; 2:e540. DOI: 10.7717/peerj.540.

Marchianti AC, Arimura E, Ushikai M, Horiuchi M. Voluntary exercise under a food restriction condition decreases blood branched-chain amino acid levels, in addition to improvement of glucose and lipid metabolism, in db mice, animal model of type 2 diabetes. *Environ Health Prev Med*. 査読有 2014 19(5): 339-47. DOI: 10.1007/s12199-014-0400-z

Li JB, Nishida M, Kaimoto K, Asakawa A, Chaolu H, Cheng KC, Li YX, Terashi M, Koyama KI, Amitani H, Sakoguchi T, Ushikai M, Ikeda S, Aoyama K, Horiuchi M, Li JZ, Inui A. Effects of aging on the plasma levels of nesfatin-1 and adiponectin. *Biomed Rep*. 査読有 2014 Jan; 2(1):152-156.

Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Kaimoto K, Sameshima N, Koyama KI, Haruta I, Tsai M, Nakahara T, Ushikai M, Cheng KC, Hamada S, Inui A. Plasma klotho levels decrease in both anorexia nervosa and obesity. *Nutrition*. 査読有 2013 29(9):1106-9. DOI: 10.1016/j.nut.2013.02.005.

Amitani H, Asakawa A, Cheng K, Amitani M, Kaimoto K, Nakano M, Ushikai M, Li Y, Tsai M, Li JB, Terashi M, Chaolu H, Kamimura R, Inui A. Hydrogen improves glycemic control in type1 diabetic animal model by promoting glucose uptake into skeletal muscle. *PLoS One*. 査読有 2013; 8(1):e53913. DOI: 10.1371/journal.pone.0053913. Epub 2013 Jan 10. Erratum in: *PLoS One*. 2013; 8(4). DOI: 10.1371/annotation/ea262856-dda3-470d-a8df-241df9fbc5ad.

Amitani H, Asakawa A, Ogiso K, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, Koyama K, Amitani M, Cheng KC, Inui A. The role of adiponectin multimers in anorexia nervosa. *Nutrition*. 査読有 2013 Jan; 29(1):203-6. DOI: 10.1016/j.nut.2012.07.011.

Saheki T, Inoue K, Ono H, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Furuie S, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Yamamura K, Kobayashi K. Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab*. 査読有 2012 Nov; 107(3):322-9. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.07.021.

Cheng KC, Li YX, Asakawa A, Ushikai M, Kato I, Sato Y, Cheng JT, Inui A. Characterization of preptin-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. *J Endocrinol*. 査読有 2012 215(1):43-9. DOI: 10.1530/JOE-12-0176.

[学会発表] (計 5 件)

牛飼美晴, Ancah Caesarina Novi Marchianti, Pulong Wijang Pralampita, Li Qi 中野恵美子、有村恵美、堀内正久：糖尿病モデルマウスにおける運動負荷方法の違いがアミノ酸代謝に及ぼす影響。第 85 回日本衛生学会学術総会（2015 年 3 月 28 日、和歌山市）
牛飼美晴, Ancah Caesarina Novi Marchianti, Pulong Wijang Pralampita, 中野恵美子、有

村恵美、堀内正久：摂食制限下の自発運動は、2型糖尿病モデルマウスの糖・脂質代謝とともにアミノ酸代謝も改善する。第18回日本病態栄養学会年次学術集会（2015年1月10日、京都市）

Moriyama M, Ushikai M, Kuroda E, Inui A, Takano K, Nakamura Y, Saheki T : Increased hepatic glycerol synthesis in citrin deficiency model mouse. 3rd ACIMD/55th JSIMD(2013年11月27日、千葉県浦安市舞浜)

佐伯武頼、古家澄江、山村研一、牛飼美晴、浅川明弘、乾明夫、矢崎正英、池田修一、小林圭子：鹿児島大学医歯学総合研究科分子病態生化学において解析した尿素サイクル関連異常症例。第54回日本先天代謝異常学会総会（2012年11月15-17日、岐阜市）

佐伯武頼、古家澄江、山村研一、井ノ上逸朗、牛飼美晴、浅川明弘、乾明夫、矢崎正英、池田修一、小林圭子：CTLN2発症に関わる遺伝要因の検索：ミトコンドリア glycerol-3 phosphatase dehydrogenase。第54回日本先天代謝異常学会総会（2012年11月15-17日、岐阜市）

6．研究組織

(1)研究代表者

牛飼 美晴 (Miharu Ushikai)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70232816

(2)研究分担者

佐伯 武頼 (Takeyori Saheki)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・
特任教授
研究者番号：10056070

(3)研究分担者

浅川 明弘 (Akihiro Asakawa)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：10452947