

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461544

研究課題名(和文) 脳クレアチン欠乏症候群の病態解明に対する研究

研究課題名(英文) Study for Pathogenesis of Cerebral Creatine Deficiency Syndromes

研究代表者

和田 敬仁 (WADA, Takahito)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70359727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クレアチントランスポーター欠損症は、脳内のクレアチン欠乏により、知的障害を主症状として、てんかん、自閉症、言語障害を特徴とする疾患である。本研究においては、その病態解明が本研究の目標である。今年度においては、患者レジストリーの確立、基礎研究推進のための患者由来線維芽細胞およびiPS細胞樹立によるバイオリソースの整備、高速クロマトグラフィーによるクレアチン代謝産物の解析方法の開発、および、患者由来線維芽細胞を用いたクレアチントランスポーターの輸送能解析を行った。患者細胞における変異トランスポーターの細胞内局在異常によるトランスポーター能の低下が示された。

研究成果の概要(英文)：Creatine transporter deficiency is caused by mutations of SLC6A8 gene, leading to low concentration of creatine in cells in the brain, and is characterized with intellectual disability, epilepsy, autistic spectrum disorders, and delayed speech development. The aim of this study is to clarify the pathogenesis of this disease. During this year, we have 1) established the system to register patients to collect their clinical and genetic information, 2) prepared patients-derived fibroblast and iPS cells as bioresources for basic research, 3) developed the system analyzing creatine metabolites by high-performance liquid chromatography, and 4) demonstrated that mutated transporter of a patient-derived cell localized abnormally in the cell, causing to reduce its transport ability. Our result suggests that the strategy to find a treatment for the patient is to search chemicals with ability to transfer the abnormally localized transporters to plasma membrane.

研究分野：小児神経学

キーワード：知的障害 クレアチン トランスポーター 先天性代謝異常

1. 研究開始当初の背景

知的障害(intellectual disability:ID)は、人口の1-3%と頻度が最も高い病態の一つである。IDの原因は、環境的要因と遺伝学的要因からなり、近年、急速にその病態が明らかにされ始めている。特に、X染色体に責任遺伝子が同在しているX連鎖精神遅滞症候群の責任遺伝子がコードしているタンパクの15%は代謝に関わり[Lubs HA, *Am J Hum Genet.*2012]、治療可能性のある知的障害症候群(treatable ID)として、注目されている[van Karnebeek CDM. *Mol Genet Metab.*2012]。

脳クレアチン欠乏症候群(cerebral creatine deficiency syndromes: CCDSs)は、先天性代謝性疾患の一つであり、脳内クレアチン欠乏をきたし、精神遅滞、言語発達遅滞、てんかんを主症状とする。グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素(AGAT)欠損症、クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症の3疾患からなり、ID全体の0.3-2.7%を占め、特に、クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症は、遺伝性知的障害症候群の中では脆弱X症候群の次に頻度が高い疾患と推定されている。しかし、日本においての症例報告は我々が報告した3家系[Osaka H. *Mol Genet Metab.*2012; Kato H. *Brain Dev.*2013; 野崎. 脳と発達. 2015]を含む6家系が診断されているのみであり、本疾患の日本における認知度は低く、多くの症例は未診断と推測され、診断基準や早期診断方法の確立が急がれる。

臨床においては、クレアチン生成に関わる二つの酵素の欠損症である、グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症、および、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素(AGAT)欠損症の2疾患はクレアチン投与が有効であり、その早期診断や早期診断の重要性が指摘されている。一方、クレアチンを脳

の神経細胞などに取り込む輸送体の異常であるクレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症では、クレアチンの投与は有効ではなく、様々な治療法が試みられているものの、治療法は確立していない。しかし、サイクロクレアチン(cycocreatine)の治療薬としての可能性がモデルマウスで示され[Kurosawa Y, et al. *J Clin Invest.*2012]、欧米において臨床研究が始まろうとしている。

本研究代表者(和田)は、分担研究者(新保および小坂)とともに、クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症の患者の診療に取り組み、CCDSsに対する尿を用いたスクリーニング方法の開発を行い[Wada T. *Amino Acids*, 2012]、症例報告を行い[Osaka H. *Mol Genet Metab.*2012; Kato H. *Brain Dev.* 2013]、分子遺伝学的、および生化学的診断法を確立した。

分担研究者(立川および伊藤)は、クレアチンを含むグアニジノ化合物の血管脳関門輸送に関する研究をリードしている。

2. 研究の目的

本研究においては、以下を目的としている。

基礎研究を進めるためには、患者由来の検体が必須である。日本国内における患者数が少ない現状においては、日本におけるCCDSsの診断基準や診断方法を確立し、分子遺伝学的に診断された患者数を増やすことが必須である。また、分子遺伝学的情報と臨床情報との関連を解析し、タンパクのもつ機能を明らかにすることができるため、全国の症例を登録し、臨床情報を集積するシステムを確立する(和田、小坂)。

基礎研究を進めるためのリサーチリソース基盤整備のため、患者の検体(血液、尿、線維芽細胞など)を保存する体制を

確立する。また、患者由来線維芽細胞から iPS 細胞を樹立するとともに、患者由来 iPS 細胞から神経細胞へ分化させ、基礎研究を行うためのリサーチリソースとして整備する。(和田、小坂、新保)

患者由来の検体(線維芽細胞や iPS 細胞)を用いた病態解析(伊藤、立川、和田);本研究の中心である。患者由来の線維芽細胞や iPS を用いて、遺伝学的変異が変異タンパクに与える異常を解析することにより、病態を明らかにするとともに、その病態にあった薬剤開発の根拠とする。高速クロマトグラフィーを用いた、クレアチン関連化合物の分析方法の検討(新保);患者の病態を明らかにし、また、治療効果を確認するためには、クレアチン生成に関わるグアニジノ酢酸メチル基転移酵素、および、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素による中間代謝産物の測定方法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

患者レジストリーの確立

基礎研究、および、臨床研究を進めていく上で、患者の分子遺伝学的検査による正確な診断、および、患者の臨床情報は必須である。患者の個人情報保護、および倫理的な問題に配慮し、患者レジストリー制度を確立し、京都大学医学部医の倫理委員会にて承認された。(R0952; 脳クレアチン欠乏症候群患者登録システムの構築と運用)

リサーチリソース基盤整備

基礎研究推進を目的としたバイオリソースの整備として、クレアチントランスポーター欠損症の患者から採取した線維芽細胞、および、線維芽細胞より iPS 細胞を作成(熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野江良沢実教授との共同研究)し、保存とともに、基礎研究に利用した。

また、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所との共同研究により、CURE Path (脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究への橋渡しプロジェクト)を確立した。

患者由来線維芽細胞を用いた、クレアチントランスポーター輸送機能の解析

【目的】クレアチントランスポーターをコードする遺伝子(SLC6A8)は X 染色体上に局在し、男性においてはヘミ接合体で存在している。SLC6A8 欠損症の男性患者においては、SLC6A8 の機能喪失型変異により、クレアチントランスポーター能が低下することにより発症すると考えられている。

治療法の開発に際して、患者の個々の変異により、変異トランスポーターの細胞内局在の異常なのか、タンパク発現量の低下なのか、タンパク輸送能力の低下なのかを見極め、患者の病態にあった治療法の選択が重要である。本研究においては、クレアチントランスポーターの C 端のミスセンス変異からトランスポーター能としての残存活性が期待されたが、実際には、その残存活性をほとんど持たない患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、その細胞内局在を解析し、治療法の開発の検討を行った。

【結果と考察】

- a) 患者由来および正常健常者由来の線維芽細胞を用いて、クレアチントランスポーター遺伝子(SLC6A8)の mRNA 発現量は有意がないことを確認した。
- b) N 末端に Flag-tag をつけた変異 SLC6A8 遺伝子、および、野生型 SLC6A8 遺伝子発現 HEK293 遺伝子をそれぞれ構築し、免疫染色により、クレアチントランスポーターの細胞内局在を解析したところ、野生型では細胞膜内に局在していたが、変異型では一部は細胞膜内に局在するものの、細胞内部に顆粒状に存在することが確

認められた。

- c) 以上から、C 端のミスセンス変異により、mRNA への転写には影響を与えないが、変異タンパクの細胞内局在異常が示された。
- d) 本研究により、変異タンパクによる細胞内局在異常によりトランスポーター活性の低下をきたしたと考えられた。
- e) 今後、細胞内局在異常を示した異常クレアチントランスポーターを細胞膜に誘導する化合物が治療法として期待され、治療薬候補化合物のスクリーニングによる探索が期待される。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) を用いたクレアチン関連化合物解析方法の検討

【目的】クレアチン代謝には、クレアチン生合成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、および、クレアチンの細胞内への輸送体であるクレアチントランスポーター(SLC6A8)が関わっている。患者の診断においては、尿や血清中のクレアチン関連化合物(特にグアニジノ酢酸、クレアチニン、クレアチン)を測定が重要である。

本研究においては、大人数のスクリーニングにより早期診断が期待される、オートサンブラー付の HPLC 装置(Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000)を用いた多検体の尿を解析するための、水系の移動相で 10 分以内にクレアチン関連化合物を分析できる条件を検討した。

【方法】HPLC 分析装置(Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000)、カラム(Shodex YS-50)を用いて評価した。移動相としてギ酸水溶液を用いた。

標準品の調製：

CR クレアチン 0.01%,

GA グアニジノ酢酸 0.05%,

CN クレアチニン 0.01%

尿サンプルの調製：尿に等量のアセトニトリルで除タンパク後の上清を 10~100 倍水で希釈した。

【結果と考察】保持時間 10 分以内に CR, GA, CN が分離する移動相の条件を検討した結果、0.075%ギ酸水溶液で良好な結果が得られた(図1)。HPLC 分析装置を用いた、多検体のクレアチン代謝産物を測定可能とする系を確立した。新生児スクリーニング等への応用により、患者の早期発見・早期治療につなげることが出来ると期待される。

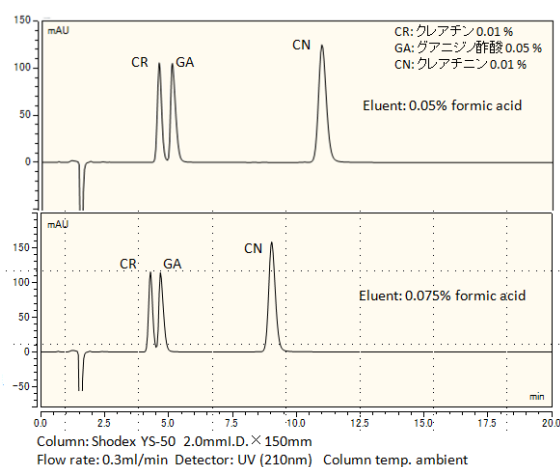


図1. 移動相の検討 ギ酸 0.05%(上)、ギ酸 0.075%(下)条件下で標準品分析

4. 研究成果

患者レジストリーの確立

研究年度終了時点で、クレアチントランスポーター欠損症の 6 家系が把握されている。今後、遺伝学的情報および臨床情報との関連を解析する準備が整った。

リサーチリソース基盤整備

クレアチントランスポーター欠損症の患者一家系で線維芽細胞および iPS 細胞を樹立し、基礎研究に用いる準備が整った。iPS 細胞から神経細胞への分化を試みたが、当研究年度内では、成功しなかった。

患者由来線維芽細胞を用いた、クレアチ

ントランスポーター輸送機能の解析

患者由来の検体を用いて、詳細な病態を確認することが出来た。患者に認められたミスセンス変異により、糖鎖修飾の異常を呈し、クレアチントランスポーターの細胞内局在異常とそれによるトランスポーター機能の低下が証明された。患者の病態に応じた治療薬の開発が期待される。

[Uemura T, et al. *Biol Pharm Bull* 40, 2017, 49-55]

高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) を用いたクレアチン関連化合物解析方法の検討

HPLC-UV 法によるクレアチンの代謝産物クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の測定方法の確立したことにより、患者の診断、治療の効果をより詳細に検討することが可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Uemura T, Ito S, Ohta Y, Tachikawa M, Wada T, Terasaki T, Ohtsuki S. Abnormal N-Glycosylation of a Novel Missense Creatine Transporter Mutant, G561R, Associated with Cerebral Creatine Deficiency Syndromes Alters Transporter Activity and Localization. *Biol Pharm Bull* 40, 2017, 49-55

DOI:10.1248/bpb.b16-00582.

Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Kuhara T, Shibata T, Kobayashi K, Kurosawa K, Yoshinaga H. SSADH deficiency possibly associated with enzyme activity-reducing SNPs. *Brain Dev.* 2016 38(9):871-4

和田敬仁. 脳クレアチン欠乏症. 小児科診療 79, 2016, 290

[学会発表] (計 8 件)

— 和田敬仁 脳クレアチン欠乏症の臨床研究、第 58 回日本小児神経学会学術集会、東京、平成 28 年 6 月 4 日

— 和田敬仁、「脳クレアチン欠乏症候群」研究班の概要 「脳クレアチン欠乏症候群」研究会、平成 29 年 3 月 19 日、フクラシア東京ステーション、東京

— 上村立記、伊藤慎悟、脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターの輸送機能特性と発現・局在解析「脳クレアチン欠乏症候群」研究会、平成 29 年 3 月 19 日、フクラシア東京ステーション、東京

— 大槻純男 血液脳関門の輸送とクレアチン供給 「脳クレアチン欠乏症候群」研究会、平成 29 年 3 月 19 日、フクラシア東京ステーション、東京

— 上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、黒木未央、和田敬仁、寺崎哲也、大槻純男. 新規変異クレアチントランスポーターのクレアチン輸送活性低下とそのメカニズムの解明. 第 9 回トランスポーター研究会九州部会 2016 年 10 月 1 日、宮崎

— 上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、平山未央、和田敬仁、寺崎哲也、大槻純男. 脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターのクレアチン輸送活性低下とそのメカニズムの解明. 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム. 2016 年 8 月 26-28 日、鹿児島

— H. Shimbo, K. Kurosawa, N. Okamoto, T. Wada. Molecular genetic study of 80 patients with ATR-X syndrome in Japan. The 13th International Congress of Human Genetics in 2016. 4 月 3-7 日 京都

— H. Shimbo, S. Ninomiya, K. Kurosawa, T. Wada. Two brothers with ATR-X syndrome

due to low frequency of maternal somatic mosaicism with deletion of exons 2-5 in the *ATRX*. 58 回日本小児神経学会 平成 27 年 6 月 3-5 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称：生体試料中のアミンの測定方法およびその方法を用いる患者のスクリーニング方法

発明者：和田敬仁、新保裕子、小坂仁

権利者：地方独立行政法人神奈川県立病院機構

番号：特許 5662182 号

取得年月日：平成 26 年 12 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

CURE Path

(<http://raredis.nibiohn.go.jp/cure/>)

ATRX 症候群&脳クレアチン欠乏症候群研究班

(<http://atr-x.jp/link.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田敬仁 (WADA, Takahito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70359727

(2) 研究分担者

立川正憲 (TACHIKAWA, Masanori)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：00401810

伊藤慎悟 (ITO, Shingo)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20466535

新保裕子 (SHIMBO, Hiroko)

地方独立行政法人神奈川県立こども医療センター臨床研究所・研究員

研究者番号：50724663

小坂仁 (OSAKA, Hitoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90426320

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大槻純男 (OHTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60323036