

平成30年 5月29日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19637

研究課題名(和文) アスパラギン合成酵素欠損症の診断スクリーニング法の確立と治療法の研究

研究課題名(英文) Development of diagnostic screening method and treatment for asparagine synthetase deficiency

研究代表者

久保田 一生 (Kubota, Kazuo)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10526940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラギン合成酵素欠損症の診断スクリーニング法と治療法の開発を目的として研究を行った。4つの新規変異について発現ベクターを構築しASNSタンパクの発現実験を行った。シクロヘキシミドによる安定性比較試験では変異体と野生型の間には有意差はなかった。アスパラギンの定量はできず、培養細胞の内在性タンパクが影響していると考えた。患者皮膚繊維芽細胞はアスパラギンを添加してない培地では増殖せず、アスパラギンを添加すると細胞増殖が見られ、アスパラギン投与が治療法として示唆される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop diagnostic screening method and treatment for asparagine synthetase deficiency. Expression experiment was performed using mutant expression vectors of four novel ASNS mutations we identified. In the stability analysis, there were no significant differences between mutants of ASNS protein and the wild type. We could not quantify of asparagine because of interrupting by endogenous proteins including cultured cells. There is markedly reduced proliferation of patient fibroblasts when cultured in growth medium without asparagine, compared to control fibroblasts. On the other hand, the fibroblasts were increased in medium including asparagine. The results suggest that asparagine supplementation may be effective in asparagine synthetase deficiency.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：アスパラギン合成酵素欠損症

## 1. 研究開始当初の背景

アスパラギンは生体内でつくることのできる非必須アミノ酸の一つである。生体内ではアスパラギン合成酵素 (ASNS) によりグルタミンの存在下で ATP を利用してアスパラギン酸とグルタミン由来のアミノ基から合成される。この ASNS は成熟した脳でよく発現しているとされる。ヒトでは、この ASNS の欠損により先天性小頭症、難治性のてんかん、精神運動発達遅滞などを呈するアスパラギン合成酵素欠損症が近年報告された。非常にまれな疾患で、海外からの報告は 10 家系に満たず、本邦では我々が初めての症例を報告した。まだ新しい疾患であるためその病態や治療法などはよく分かっていない。アミノ酸の代謝異常であるが、髄液や血漿アミノ酸の測定は必ずしも有用ではなく、診断においては遺伝子検査を行う他ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、アスパラギン合成酵素欠損症の新しい診断スクリーニング法の開発と治療法への臨床応用に展開するための基礎的研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 発現ベクターの構築と発現実験

我々の報告したアスパラギン合成酵素欠損症の原因遺伝子である ASNS 遺伝子の 4 つの新規変異について発現ベクターを構築する。これを HEK293 細胞や HeLa 細胞などの培養細胞に導入して Western blot 法を用いて ASNS タンパクの発現を確認する。

### (2) 安定性比較試験

シクロヘキシミドを投与して変異タンパクの安定性を経時的に比較検討する。

### (3) アスパラギン合成能の評価

ニンヒドリン反応を用いて、アミノ酸をニンヒドリンにより呈色して液体クロマトグラフでアスパラギンの定量を行う。

### (4) 線維芽細胞を用いた検討

患者皮膚線維芽細胞を樹立し、アスパラギンの添加の有無で線維芽細胞の増殖の変化を観察する。

## 4. 研究成果

HEK293 細胞や HeLa 細胞などの培養細胞に導入した ASNS タンパクの発現は良好に確認することができた。シクロヘキシミド処理による ASNS タンパクの安定性比較試験では変異体と野生型の間には有意な差は認められなかった。ニンヒドリン法を用いたアスパラギンの定量では十分にアスパラギンの定量を行うことはできなかった。患者皮膚線維芽細胞を用いた検討では、アスパラギンを添加してない培地では患者皮膚線維芽細胞はほとんど増殖が見られなかったか。しかし、培地にアスパラギンを添加すると患者皮膚線維芽細胞の増殖が見られた。

考察：ニンヒドリン法を用いてアスパラギンを定量できなかった原因には培養細胞の内在性タンパクが影響している可能性が考えられ、今後検討が必要である。疾患患者由来の細胞の増殖にはアスパラギンが必須であることがわかった。このことからアスパラギンの投与が治療法として有効である可能性があることが示唆される。また、これを応用してリンパ球を用いた迅速な診断スクリーニングのアッセイ系の構築を検討中である。

## 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)

[雑誌論文](計 5 件)

Kubota K, Shikano H, Fujii H, Nakashima Y, Fukao T: Levetiracetam-Associated Decrease in Pitch Perception. Am J Ther. in press. 査読あり

山本 崇裕, 西村 悟子, 久保田 一生, 深尾 敏幸: 福祉の現場から 在宅重症心身障害児者における栄養法に関するコホート研究. 地域ケアリング. 2017;19,57-60. 査読あり

Kubota K, Yamamoto T, Kawamoto M, Kawamoto N, Fukao T: Levetiracetam-induced rhabdomyolysis: A case report and

literature review. Neurology Asia. 2017;22:275-278. 査読あり

Kubota K, Yamamoto T, Orii K, Shinoda S, Fukao T: Acute dystonia associated with aripiprazole overdose in an adolescent boy. Asian J Psychiatr. 2017;29:183-184. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.ajp.2017.07.021.

Yamamoto T, Endo W, Ohnishi H, Kubota K, Kawamoto N, Inui T, Imamura A, Takanashi JI, Shiina M, Saito H, Ogata K, Matsumoto N, Haginoya K, Fukao T: The first report of Japanese patients with asparagine synthetase deficiency. Brain Dev. 2017;39:236-242. 査読あり  
DOI:10.1016/j.braindev.2016.09.010.

[学会発表](計 3件)

Yamamoto T, Endo W, Ohnishi H, Kubota K, Kawamoto N, Inui T, Imamura A, Takanashi J. I, Shiina M, Saito H, Ogata K, Matsumoto N, Haginoya K, Fukao T: Asparagine Synthetase Deficiency: The First Japanese Case Report and Review of Literature. AOCCN2017, 14th Asia Oceanian Congress Child Neurology, 5/11-5/14/2017, Fukuoka, Japan

久保田 一生, 山本 崇裕, 川本 典生, 大西 秀典, 今村 淳, 才津 浩智, 松本 直通, 深尾 敏幸: 進行性の小頭症、重度の精神運動発達遅滞と難治性てんかんを認めアスパラギン合成酵素 欠損症と診断した一例 第 58 回日本先天代謝異常学会総会, 2016 年 10 月 27 日~29 日, 東京

山本 崇裕, 大西 秀典, 久保田 一生, 西村 紗織, 笠原 由貴子, 折居 建治, 今村 淳, 才津 浩智, 松本 直通, 深尾

敏幸: whole-exome 解析により診断したアスパラギン合成酵素欠損症の変異機能解 第 58 回日本小児神経学会学術集会, 2016 年 6 月 3 日~5 日, 東京

[図書](計 0件)  
該当なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)  
該当なし

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)  
該当なし

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者  
久保田 一生 (KUBOTA, Kazuo)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 10526940

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )