

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16285

研究課題名(和文) 体タンパク質の同化・異化調節機構への介入による高アンモニア血症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy against hyperammonemia based on intervention in regulatory mechanism of bodily protein anabolism and catabolism

研究代表者

福井 香織 (FUKUI, KAORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50771193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：尿素サイクル異常症患者の高アンモニア血症発作は飢餓が誘因となることが多い。そのしくみを明らかにし、それに基づく治療法を研究した。その結果、飢餓状態ではグルタミンというアミノ酸の分解(グルタミノリシス)が過剰になることが高アンモニア血症発作の原因となることを見出した。この結果に基づき、 $\alpha$ -ケトグルタル(AKG)の誘導体であるジメチル  $\alpha$ -ケトグルタル酸(DKG)という物質が過剰なグルタミノリシスを正常化させ、試験管内のみならず動物個体でもアンモニア値を下げる事が分かった。これらからAKGまたはDKGなどその関連物質は高アンモニア血症の新たな治療薬となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高アンモニア血症の治療法は現在、産生されたアンモニアを除去することが主体となっている。いっぽう我々は飢餓と高アンモニア血症の関係に注目し、アンモニア産生の抑制に重点をおいて研究を行った。その結果、飢餓により亢進したグルタミノリシスを抑制し、かつTCAサイクルへの基質補充を行うことで、高アンモニア血症を是正できることを示した。これは高アンモニア血症の新奇、かつ現実的な治療戦略となりうる。

研究成果の概要(英文)：Patients with urea cycle disorders intermittently develop episodes of decompensation with hyperammonemia. Because such an episode is often associated with starvation, we attempted to elucidate the mechanism of such starvation-associated hyperammonemia. Using a cell culture system, we found that glucose starvation increases ammonia production, and that it is associated with enhanced glutaminolysis. These results led us to focus on  $\alpha$ -ketoglutarate (AKG), a glutamate dehydrogenase inhibitor and a major anaplerotic metabolite. We found that dimethyl ketoglutarate (DKG), a cell-permeable AKG analog, mitigates ammonia production primarily by reducing glutaminolytic flux. We also verified that DKG reduces ammonia also in in vivo animal models. Thus, AKG itself or cell-permeable forms of AKG are feasible candidates for a novel hyperammonemia treatment.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：高アンモニア血症 グルタミノリシス  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ジメチル  $\alpha$ -ケトグルタル酸 尿素サイクル異常症

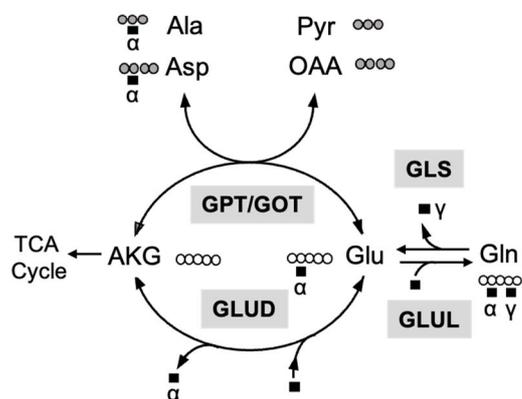
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

高アンモニア血症の急性期治療は、生成されたアンモニアの除去が主体である。一方、尿素サイクル異常症では飢餓を契機として高アンモニア血症の急性増悪を来することが知られている。その誘因は、“体タンパク質の異化亢進”と言われているが、その分子機序は明らかでなく、急性増悪時には異化抑制の目的でブドウ糖やインスリン補充が行われている。更に効率の良い治療法の開発が望まれており、これまでの研究視点とは異なる、体タンパク質の同化・異化の調節機構をターゲットとする治療法の開発を計画した。

当初は、体タンパク質の同化・異化の調節機構として mTORC1 に注目し、オートファジーの活性化が高アンモニア血症を引き起こすと考えたが、オートファジーノックアウト細胞でもアンモニアが上昇することからオートファジー以外の機序も関与することを発見した。

そこで、グルタミン代謝に注目した。図のようにほとんどの L-アミノ酸のアミノ基は一旦グルタミン酸(Glu)に集中し、ついで一部はグルタミン(Gln)に変換される。グルタミンはグルタミナーゼ(GLS)の作用でグルタミン酸になり、グルタミン酸はトランスアミナーゼ(GPT/GOT)経路またはグルタミン酸脱水素酵素(GLUD)経路を経てケトグルタル酸(AKG)となり、TCA サイクルに補充される。この一連の反応はグルタミンオリシスと呼ばれ、代表的なアナプレロシス反応であると同時に、この GLUD 経路で 2 分子のアンモニアが生じる。いっぽうトランスアミナーゼ経路ではアンモニアは生じない。



## 2. 研究の目的

飢餓による高アンモニア血症発作誘発のメカニズムを *in vitro* で検討し、そのメカニズムに基づいた高アンモニア血症の予防ないし治療法を検討、さらにその治療法の有効性を *in vitro* で確認することを目的として、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養液及びアンモニア、アミノ酸の測定について

まず、マウス胎児線維芽細胞(MEF)の培養系を用いて、飢餓モデルとしてブドウ糖欠乏によりアンモニアが上昇するかどうかを検討した。MEF はまず、25mM グルコースと 2mM グルタミンを含み、グルタミン酸を含まない標準的なダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で一晩培養し、その後指定された他の培地で培養した。各実験には無細胞培地のみを含むディッシュ (無細胞ブランク) を含み、そのアンモニアまたはアミノ酸濃度値は無細胞ブランクディッシュのものから差し引いたものとした。

### (2) 各酵素の flux 値算出について

GLS、GLUD、GOT のフラックスは、アンモニアとアラニンを除く一部のアミノ酸について、グルコース充足培養とグルコース飢餓培養で有意差のない値を採用し、以下の式に従って算出した<sup>1)2)</sup>。(1)  $GLS \text{ flux} = GLUD \text{ flux} + GOT \text{ flux} + \text{glutamate}$ ; (2)  $GLUD \text{ flux} = (\text{ammonia} - GOT \text{ flux} - \text{glutamate})/2$ ; (3)  $GOT \text{ flux} = \text{aspartate}$ , ここで は代謝物濃度の正味の濃度、フラックスの単位は  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1} \cdot 1 \times 10^6 \text{ cells}^{-1}$  である。

### (3) *in vivo*実験について

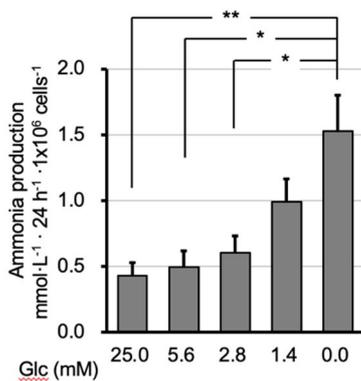
動物モデルにおいて薬剤が高アンモニア血症を緩和できるかどうかを検討するため、NH<sub>4</sub>Cl 負荷マウス及びブタを使用した。

野生型マウスを3つの群に分け、生理食塩水のみ(1群)、10mmol·kg<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl(2群)、10mmol·kg<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl 及び 5mmol·kg<sup>-1</sup> DKG(3群)を腹腔内に注入し、30分後にアンモニア値を測定した。また、遺伝子操作によりオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症(OTCD)を発症した牝の新生ブタに対して、出生後3時間40分未満で1.44mmol·kg<sup>-1</sup>のDKGをボラスで投与し、その後、ハルトマン液で希釈して1.44mol·kg<sup>-1</sup>·24h<sup>-1</sup>の速度で4時間連続注入をし、その後はDKGを含まないハルトマン液に移行した。

## 4. 研究成果

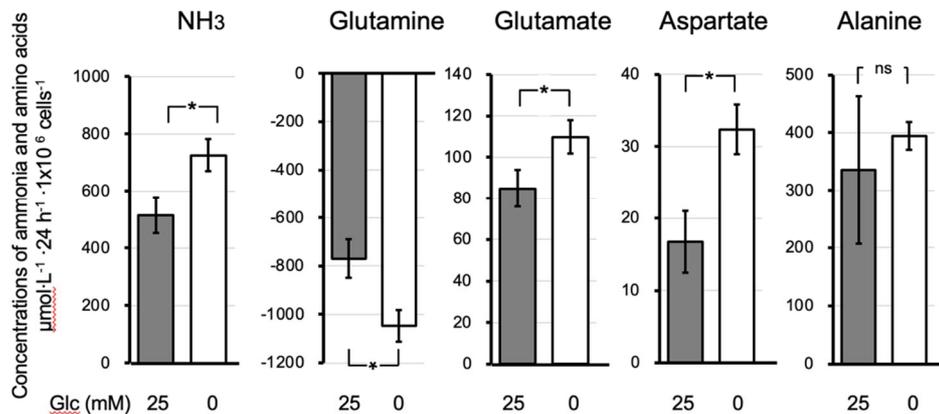
### (1) MEF 培養液中ではブドウ糖飢餓がアンモニア産生を促進させる

MEF 培養液中のブドウ糖(Glc)濃度を25 mMから0 mMまで変化させ、培養液中のアンモニア値を比較したところ、培養液中のブドウ糖濃度25 mM、5.6 mMに比較して0 mMでは有意にアンモニア値が上昇した。従って、MEF 培養液中ではブドウ糖欠乏によりアンモニア値は上昇することが確認でき、このシステムを利用して今回の研究を行った。



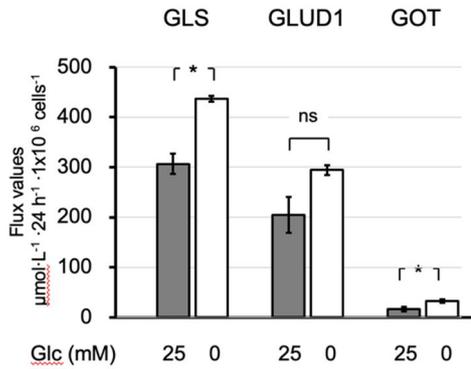
### (2) ブドウ糖飢餓はGLSのフラックスを促進し、アンモニア産生に寄与する

ブドウ糖充足時(25 mM)と欠乏時(0 mM)でのアンモニア及びグルタミノリシスに関するアミノ酸を比較したところ、ブドウ糖が欠乏すると、アンモニアは上昇し、グルタミンの消費は増大した。一方、グルタミン酸、アスパラギン酸の産生は増加した。アラニンには有意な変化はなかった。



以上の結果をもとにGLS、GLUD1、GOTの酵素反応を介したflux値を求めた。その結果、ブドウ糖充足状態ではGLSのflux値はGLUD1のflux値の1.5倍で、ブドウ糖欠乏状態ではそれぞれが1.4倍程度増加した。つまり、ブドウ糖欠乏によりGLS、GOTのfluxは亢進し、GLUD1のfluxもその傾向を認めた。以上の結果から、ブドウ糖欠乏状態では、グルタミノリシスの亢進の結果、アンモニア産生が増加することが明らかとなった。

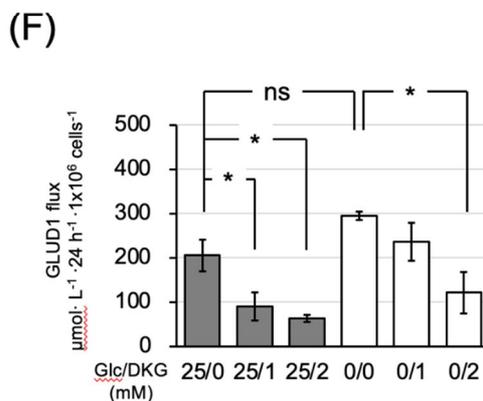
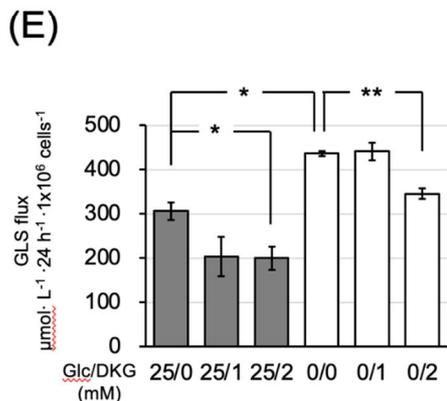
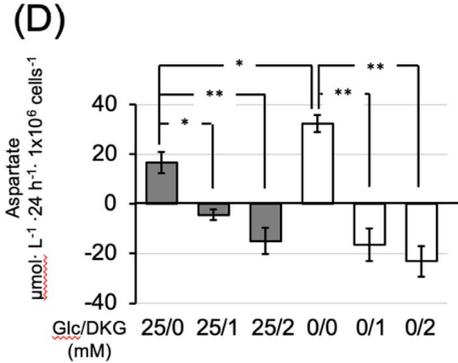
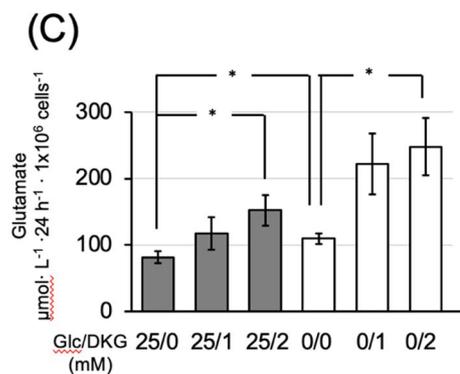
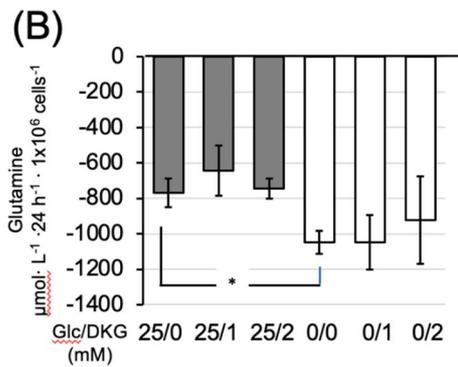
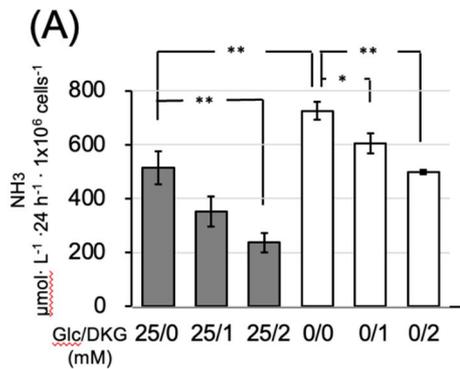
このことから、グルタミノリシスの亢進を是正することが高アンモニア血症の治療法になりうると思え、グルタミノリシスを抑制し、かつアナプレローシスを確保する物質として-ケトグルタル酸(AKG)に注目した。



### (3) DKG は主に MEF における GLUD1 の活性を阻害することでアンモニア産生を抑制する

MEF 培養液中に AKG の膜透過性アナログであるジメチル  $\alpha$ -ケトグルタル酸(DKG)を添加し、アンモニア産生の変化及びアミノ酸の変化を調べた。その結果、ブドウ糖の有無に関わらず、添加した DKG の濃度依存的にアンモニア値は低下した (A)。その際に、グルタミン酸の産生は増加し (C)、アスパラギン酸は減少に転じたが (D)、グルタミンの消費には変化がなかった (B)。

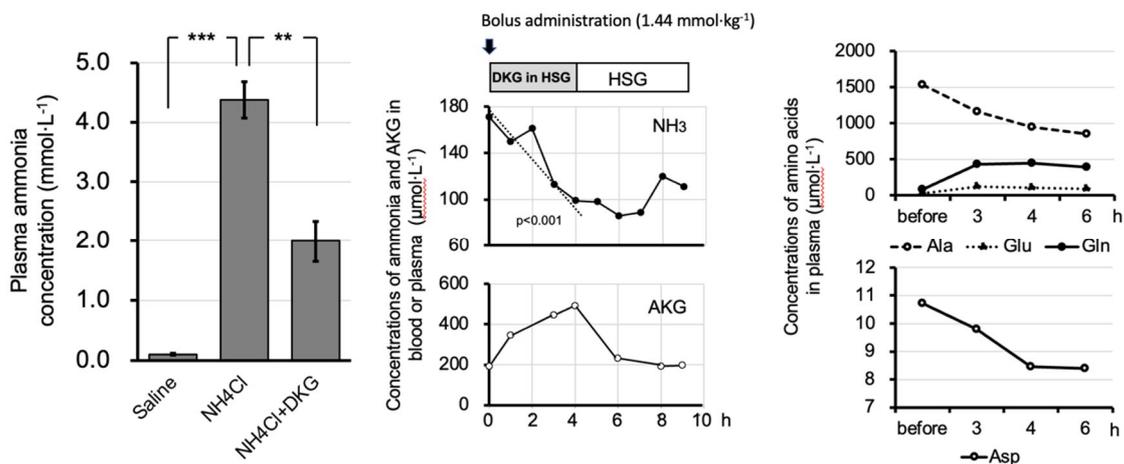
この結果をもとに各酵素の flux 値の変化を調べたところ、DKG を添加すると、ブドウ糖の有無に関わらず GLUD1 を介した flux 値は有意に低下し (F) GLS を介した flux 値も好容量の添加により低下した (E)。このことから、DKG は主に GLUD1 の flux を抑制することでグルタミンリシスを抑制し、アンモニアが低下することが示された。



#### (4) DKG は $\text{NH}_4\text{Cl}$ 負荷マウス及び OTC 欠損症新生牡ブタにおいて高アンモニア血症を軽減する

まず、DKG による高アンモニア血症の緩和効果をマウスモデルで検討した。生理食塩水のみ、塩化アンモニウムのみ、塩化アンモニウム及び DKG を投与した 3 群を設定し、薬液投与 30 分後に血漿中のアンモニア値を比較したところ、DKG 投与群では著明なアンモニア値の低下が見られた。

次に遺伝子工学的に作出された OTC 欠損症の牡新生仔ブタで DKG の有効性を検討した。DKG  $1.44\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  をボラス投与した後に同量の DKG の 24 時間均等輸注を開始し、4 時間経過したところで DKG を中止し輸液のみに変更した。その結果、DKG 輸注開始後には AKG の上昇に伴って、血中アンモニア値は低下し続け、4 時間後には前値の 57.5%、6 時間後には前値の 50.3% まで有意に低下し、その後は再上昇した。血漿中のグルタミン、グルタミン酸は、DKG 注入中は上昇し続けたが、DKG 中止後に低下し始めた。一方でアラニン、アスパラギン酸は低下した。これは、DKG がグルタミン合成を刺激していることを示しており、同時に DKG は *in vivo* のアンモニア濃度を低下させる効果も併せ持っていることが確認できた。



#### 5. 考察

本研究は、ブドウ糖飢餓は、グルタミンノリシスを亢進させ、アンモニア産生の増加を引き起こすこと、さらに AKG の膜透過性アナログである DKG の添加により、グルタミンノリシスの亢進は適正化され、アンモニア値が低下することを *in vitro* で示した。また、DKG は *in vivo* の高アンモニア血症モデルでもアンモニアの上昇を抑制することが確認できた。

以上から、AKG またはその膜透過性アナログは高アンモニア血症に対する新奇かつ現実的な戦略となると考えられる。

##### < 引用文献 >

1. Schoolwerth AC, Nazar BL, LaNoue KF. Glutamate dehydrogenase activation and ammonia formation by rat kidney mitochondria. J Biol Chem. 1978;253(17):6177-6183.
2. Treberg JR, Clow KA, Greene KA, Brosnan ME, Brosnan JT. Systemic activation of glutamate dehydrogenase increases renal ammoniogenesis: implications for the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010; 298(6): E1219-E1225.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 芳野 信、 福井 香織	4. 巻 1巻
2. 論文標題 高アンモニア血症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科診療ガイドライン 第4版	6. 最初と最後の頁 513-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福井香織、高橋知之、渡邊順子、山下裕史朗、石原直忠、松成ひとみ、内倉鮎子、長嶋比呂志、芳野 信
2. 発表標題 高アンモニア血症の新規治療戦略
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井香織、高橋知之、渡邊順子、芳野 信
2. 発表標題 Dimethyl -ketoglutarate reduces ammonia by primarily suppressing glutamate dehydrogenase flux
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井香織、高橋知之、松成ひとみ、内倉鮎子、渡邊將人、長嶋比呂志、石原直忠、角間辰之、渡邊順子、芳野信、山下裕史朗
2. 発表標題 グルタミンノリシスを標的とする高アンモニア血症の新規治療戦略
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Fukui, Tomoyuki Takahashi, Hitomi Matsunari, Ayuko Uchikura, Masahito Watanabe, Hiroshi Nagashima, Naotada Ishihara, Tatsuyuki Kakuma, Yoriko Watanabe, Yushiro Yamashita, Makoto Yoshino
2. 発表標題 A novel therapeutic strategy for hyperammonemia that targets glutaminolysis
3. 学会等名 5th International Symposium on UREA CYCLE DISORDERS (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高アンモニア血症を治療するための医薬組成物	発明者 芳野信、高橋知之、 福井香織、石原直 忠、長嶋比呂志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、263487	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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