

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390199

研究課題名(和文) 難治性神経代謝疾患に対するトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Translational research on intractable neuro-metabolic disorders

研究代表者

乾 明夫 (INUI AKIO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80168418

研究成果の概要(和文)：

難治性神経代謝疾患として、カルニチン輸送体(OCTN2)欠損症、シトリン欠損症、有棘赤血球舞踏病等の先天性代謝疾患や、癌性悪液質、神経性食欲不振症、うつ病等の多因子性疾患を取り上げ、トランスレーショナルな立場から研究を行った。JVSマウスやシトリン欠損症、癌性悪液質モデル動物等を作製し、病態解析を行い、アセチルカルニチン、ピルビン酸、グレリンアゴニスト、六君子湯などの新たな治療法を創出し、臨床応用を試みた。

研究成果の概要(英文)：

The translational research was conducted on intractable neuro-metabolic disorders such as congenital diseases including carnitine carrier deficiency, citrin deficiency and chorea acantosis, and multifactorial diseases including cancer cachexia, eating disorders and mood disorders. JVS mouse and animal models of cancer cachexia and citrin deficiency were created and used on pathological analysis. New treatment methods, such as acetylcarnitine, pyruvic acid, ghrelin agonist and Rikkunshito, were created or applied clinically from this research work.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：遺伝子、医療・福祉、神経医学、トランスレーショナルリサーチ、臨床

1. 研究開始当初の背景

難治性神経代謝疾患には、代謝異常(カル

ニチントランスポーター欠損症、アスパラギン酸グルタミン酸輸送体:AGC欠損症)、末梢

神経障害(遺伝性ニューロパチー)、脊髄小脳変性症、精神神経機能異常(有棘赤血球舞踏病、うつ病)や食行動異常(摂食障害、悪性悪液質)を示す病態等が含まれ、その遺伝的基盤も単一遺伝子異常から遺伝・環境の相互作用が重要な役割を有するものなど多様であるが、いずれも難治性で特徴づけられる重篤な病態である。難治性神経代謝疾患の中には、病因や診断法・治療法が全く明らかでないものも少なくない。近年の分子遺伝学的解析手段の進歩やヒトゲノム計画の知見から、世界的にも難治性神経代謝疾患に対する研究手法および臨床的アプローチが大きく変化しようという時期にある。

本プロジェクトでは、鹿児島大学もしくは鹿児島大学が国内外の中核機関として展開できる難治性神経代謝疾患を研究テーマに選定した。南九州に大家系を有する難治性神経代謝疾患には、代謝異常(シトリン欠損症)、末梢神経障害(Dejerine-Sottas病)、沖縄型筋萎縮症、脊髄小脳失調(SCANI)、精神機能異常(有棘赤血球舞踏病及びある種のうつ病)を示すものなどが含まれる。また、遺伝・環境両因子の相互作用が重要な役割を有する病態に、食行動異常症(摂食障害、悪液質)が存在する。難治性神経代謝疾患は、HTLV-I 関連脊髄症(HAM) やシトリン欠損症の研究をはじめ、鹿児島大学が研究や心理カウンセリング室の設置など、鹿児島大学の発展の歴史を踏まえたものと言える。

難治性神経代謝疾患のなかで、ミトコンドリア異常症としてのカルニチン輸送体欠損症は、慢性疲労との関係から注目されてきたが、その動物モデルとして JVS マウスを保有している。アスパラギン酸グルタミン酸輸送体異常症は、責任遺伝子発見と診断法の確立(Nature Genet 22: 159-163, 1999)と共に、2 種のアイソフォーム(citrin, aralar)欠損マウスの作製に成功した。また有棘赤血球舞踏病の原因遺伝子の同定から、その欠損マウスの作製にも成功した(Nature Genet 28: 121-122, 2001)。さらに脊髄小脳失調症(Nature Genet 32: 267-272, 2002)や小児の難病である Schimke immune-osseous dysplasia(Nature Genet 30:215-220, 2002)の病因遺伝子を同定し、そのノックアウトマウスを作製しつつある。一方、多因子性あるいは遺伝・環境両因子が重要な役割を有する難治性神経代謝疾患としては、飛躍的な進歩が認められた(Pharmacol Rev 52: 35-61, 2000, Pharmacol Rev 61(4): 430-481, 2009)。摂食障害の本態は未だ不明であるものの、飢えに対する応答と異なることを明らかにしてきた(Nature Rev Neurosci 2: 551-560, 2001)。摂食障害に対する食欲調節ペプチド一塩基多型(SNP)の解析(Nature Rev Drug Discov 2: 986-998, 2003)や、食欲調節ペプ

チドの先端的治療応用を国内製薬企業と共同で開始する準備を行っている(Nature Rev Drug Discov 3: 577-626, 2004)。これは他の難治性神経代謝疾患の先端的、統合的医療を行う上でモデルケースになるものと考えられる。このように、申請研究者らによって国際的レベルで行ってきた難治性神経代謝疾患に関する研究が、今回のプロジェクト基盤を成している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性神経代謝疾患の遺伝的基盤の解明、遺伝子改変モデル動物の作製などに従事し、国際的な業績をあげてきた研究者が、部局・講座横断的にチームを結成し、この分野の飛躍的進歩を図ることにある。難治性神経代謝疾患の遺伝的基盤を解明し、その遺伝子改変マウスを作製して、一生涯という時間軸に立った治療・予防法を開発する。さらに、病態関連遺伝子を同定することにより、病態解析や創薬のターゲットとなる機能分子を解明し、ヒトの神経代謝に関わる基盤的調節機構を明らかにする。

本研究では、神経代謝疾患の動物モデルの作製・解析を進め、我々が同定してきた南九州に大家系を有する神経代謝疾患解析と併せ、トランスレーショナルな立場から臨床応用を目指す。JVS マウス等の神経代謝異常モデル動物に特有の行動異常を解析し、その生物学的基盤を明らかにしたうえで治療応用を行う。一方、多因子性の難治性神経代謝疾患としては、摂食障害及び悪液質を本研究対象とし、悪液質モデル動物を用いて、食欲調節ペプチド、とりわけ研究代表者らが進めてきたグレリンから見た病態の解明と先端医療開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)、難治性神経代謝疾患の病態関連遺伝子の同定：南九州に多発する神経代謝疾患の大規模な症例集積により、連鎖解析、ポジショナルクローニングを行い、それらの病因遺伝子を同定する。同時に、不安・抑うつなど、難知性神経代謝疾患に共通するもしくは特異的なところの変化をとらえるために、臨床心理士による神経心理学的検査を施行する。マイクロアレイや yeast-two hybrid system、質量分析法などを用いて、病態関連遺伝子/蛋白質の同定を試みる。

(2)、遺伝子改変動物の作製と解析：現在、カルニチン輸送体(OCTN2)欠損 JVS マウス、アスパラギン酸グルタミン酸輸送体(SLC25A13: Citrin 及び SLC25A12: Aralar)欠損マウス、有棘赤血球舞踏病(CHAC)欠損マウス、食欲調節ペプチド/受容体遺伝子改変

マウス(グレリン、神経ペプチドY、膵ポリペプチド、ビーコンなど)、TDPI 欠損マウスを作製中もしくは保有している。とりわけ、JVSマウスや Citrin 欠損マウス等の表現型の解析を、行動薬理的に検討する。新たな病態関連遺伝子が同定されれば、その欠損マウスを作製する予定である。

(3)、難治性神経代謝疾患の遺伝子診断の開発：精神神経機能障害や行動障害は、臨床的には多様性のある病態(disorders)であり、遺伝子診断で疾患(diseases)としての診断を確定することは極めて重要である。遺伝子診断の需要の増加に対応するためにも、遺伝子異常の迅速なスクリーニング法を確立し、遺伝子診断システムを構築する。迅速な診断方法は、PCR/RFLP or Gene Scan/SNaPshot 法を用いて行う。

(4)、先端医療の開発とこころのケア：遺伝子改変動物や臨床病態の解析から得られた知見に基づき、先端医療としての臨床応用を行う。先端医療の応用にむけたこころのケアは、臨床心理士(心身医療科大学院生)及び我が国で初めて認可された臨床心理学研究科専門職大学院の修士課程学生を中心に行う。

4. 研究成果

(1)、カルニチン欠損症、シトリン欠損症、有棘赤血球舞踏病等の先天性神経代謝疾患：カルニチン輸送体(OCTN2)欠損症の自然のKOマウスであるJVSマウスを用いて検討を行った。JVSマウスは著明な高FFA血症を呈し、絶食(飢え)に対する摂食反応が欠如していることを見出した。このメカニズムはFFA上昇による視床下部CRFの上昇がその主因であり、CRF系を抑制することにより摂食行動促進が見られることを明らかにした。このCRFの上昇は、胃から分泌される空腹ホルモンのグレリンを抑制することにより、飢えに対する摂食応答を阻害する。脳内CRFの上昇は、神経性食欲不振症の特徴でもあり、CRFの上昇が飢えに対する摂食応答に重要であることを明らかにした。

また、病態モデル動物の開発を行い、aralar欠損症や末梢神経障害のモデル動物(ノックアウトマウス)を開発し、病態解析を進めているところである。

シトリン欠損症や有棘赤血球舞踏病は単一遺伝子疾患であるが、その表現型は同一家系においても多様であり、病態関連遺伝子(modifier遺伝子)を明らかにすることは、重要な治療の手掛りが得られる。有棘赤血球舞踏病に関しては、modifier遺伝子を同定しつつあり、GABA系の関与を明らかにした。

カルニチン欠損症やシトリン欠損症モデルマウスは高アンモニア血症、摂食行動異常、低血糖などの多彩な症状を呈することを明らかにした。さらに、エネルギー代謝やタンパク、脂質、糖質代謝異常の検討から、アセチルカルニチンやピルビン酸の投与が有効である可能性がある。シトリン欠損症モデルに対するピルビン酸ナトリウムの応用は、新規治療として有用であることを明らかにした。今後、先端医療として、シトリン欠損症の病態改善に有用かどうか検討して行く予定であり、臨床研究を開始している。

シトリン欠損症を初め、その遺伝子診断は、遺伝カウンセリングなどのこころのケアと平行して行ってきた。シトリン欠損症の遺伝子診断に関しては、多くの遺伝子多型を同定した。シトリン欠損症を初めとする難治性神経代謝疾患は、東南アジアにも多く認められ、シトリン欠損症については、鹿児島大学を拠点とした研究、診療活動を展開し、東南アジアとの連携を進めてきた。アジアからの留学生を多数受け入れ、国際的立場から研究を進め、実績を上げてきた。

(2)、癌性悪液質、神経性食欲不振症、うつ病等の多因子性神経代謝疾患：癌性悪液質モデル動物を用いて、癌に伴う高カルシウム血症の原因物質である副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)がCRF系を亢進させ、高カルシウムに依らず悪液質を発現することを証明し、臨床的に重要な知見を得た。

癌性悪液質の治療を念頭に、グレリン及びグレリン放出促進薬としての漢方薬、六君子湯の検討を行った。グレリンアゴニストのGHRP2は、Yoshida 肝癌細胞と腹腔内に播腫した癌性悪液質モデルにおいて、食欲を促進し、抗癌剤5FUによる治療効果を増強し、寿命の延長傾向が認められた。また、慢性腎不全モデルにおいて、グレリン及びグレリンアゴニスト投与により、摂食のみならず筋肉量(Lean Body Mass)を増加させることを明らかにした。さらに、六君子湯は担癌動物で亢進しているセロトニン系、特にその2c受容体を阻害し、グレリン分泌を促進することで、癌性悪液質モデルの食欲、体重、筋肉量を増加することを証明した。六君子湯のこの作用は、8つの構成生薬のうちチンピ及びソウジュツが重要な役割を担っていることを明らかにした。三次元HPLC解析を用いた生薬構成成分解析により、チンピにはフラボノイド(ヘスペリジン)が、この作用の少なくとも一部を担うことを証明した。

神経性食欲不振症では、その患者血中

にグレリンの自己抗体が存在することを明らかにした。我々はすでに神経性食欲不振症患者血中に強力な食欲抑制系メラノコルチン自己抗体が存在し、その自己抗体が神経性食欲不振症の病態の一翼を担う可能性を報告してきた。現在グレリン自己抗体の解析をすすめているところである。

また、うつ病の候補遺伝子として、ロッドスコアー3以上のものを見出しつつある。

(3)、こころのケア

国際統合生命科学研究センターを鹿児島大学の中心に設置し、「統合生命」「統合医療」からなるダブルコースの大学院教育システムを構築した。先端医療応用に向けた、こころのケアのためのチーム医療を確立しつつある。

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 19 件)

1. Terashi M, Asakawa A, Harada T, Ushikai M, Coquerel Q, Sinno MH, Déchelotte P, Inui A, Fetissov SO. Ghrelin reactive autoantibodies in restrictive anorexia nervosa. *Nutrition*. 査読有, 27(4):407-413, 2011
2. Shimo H, Nakamura M, Tomiyasu A, Ichiba M, Ueno S, Sano A. Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia. *Neurosci Res*. 査読有、Mar:69(3):196-202, 2011
3. Ushikai M, Horiuchi M, Kobayashi K, Matuda S, Inui A, Takeuchi T, Saheki T. Induction of PDK4 in the heart muscle of JVS mice, an animal model of systemic carnitine deficiency, does not appear to reduce glucose utilization by the heart. *Mol Genet Metab*. 査読有、102(3):349-55, 2010.
4. Asakawa A, Fujimiya M, Niijima A, Fujino K, Kodama N, Sato Y, Kato I, Nanba H, Laviano A, Meguid MM, Inui A. Parathyroid hormone-related protein has an anorexigenic activity via activation of hypothalamic urocortins 2 and 3. *Psychoneuroendocrinology* 査読有、35(8):1178-86, 2010
5. Fetissov SO, Laviano A, Kalra S, Inui A. Update on ghrelin. *Int J Pept. 査読有*, pii: 963501, 2010
6. Koyama KI, Yasuhara D, Nakahara T, Harada T, Uehara M, Ushikai M, Asakawa A, Inui A. Changes in acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, and ratio of acyl ghrelin to total ghrelin with short-term refeeding in female inpatients with restricting-type anorexia nervosa. *Horm Metab Res*. 査読有, 42(8):595-8, 2010
7. Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, Koyama K, Amitani M, Harada T, Yasuhara D, Inui A. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides* 査読有, 32(1):150-3, 2010
8. Miki Y, Nishie M, Ichiba M, Nakamura M, Mori F, Ogawa M, Kaimori M, Sano A, Wakabayashi K. Chorea-acanthocytosis with upper motor neuron degeneration and 3419_3420 delCA and 3970_3973 delAGTC VPS13A mutations. *Acta Neuropathol*. 査読有、119(2):271-3, 2010
9. Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev*. 査読有、61(4):430-481, 2009
10. Tanaka C, Asakawa A, Ushikai M, Sakoguchi T, Amitani H, Terashi M, Cheng K, Chaolu H, Nakamura N, Inui A. Comparison of the anorexigenic activity of CRF Family peptides. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、390(3):887-891, 2009
11. Sakoguchi T, Horiuchi M, Asakawa A, Ushikai M, Yoshida G, Fujimiya M, Kato I, Nakazato M, Takeuchi T, Saheki T, Inui A. Failure of the feeding response to fasting in carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice: involvement of defective acyl-ghrelin secretion and enhanced corticotropin-releasing factor signaling in the hypothalamus. *Biochim Biophys Acta*. 査読有、1792(11): 1087-1093, 2009
12. Tanaka R, Inui A, Asakawa, Atsuchi K, Ataka K, Fujimiya M. New method of manometric measurement of gasroduodenal motility in conscious mice: Effects of ghrelin and Y2

depletion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有、297(5): G1028-1035, 2009

13. Numata S, Iga J, Nakataki M, Tayoshi S, Taniguchi K, Sumitani S, Tomotake M, Tanahashi T, Itakura M, Kamegaya Y, Tatsumi M, Sano A, Asada T, Kunugi H, Ueno S, Ohmori T. Gene expression and association analyses of the phosphodiesterase 4B (PDE4B) gene in major depressive disorder in the Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 査読有、50B(4):527-34, 2009
14. Laviano A, Inui A, Marks DL, Meguid MM, Pichard C, Rossi Fanelli F, Seelaender M. Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab.、査読有、295(5):E1000-1008, 2008
15. Fujimiya M, Asakawa A, Ataka K, Kato I, Inui A. Different effects of ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on gastroduodenal motility in conscious rats. World J Gastroenterol. 査読有、14(41): 6318-6326, 2008
16. Deboer MD, Zhu X, Levasseur PR, Inui A, Hu Z, Han G, Mitch WE, Taylor JE, Halem HA, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Marks DL. Ghrelin Treatment of Chronic Kidney Disease: Improvements in Lean Body Mass and Cytokine Profile. Endocrinology 査読有、149(2): 827-835, 2008
17. Fujitsuka N, Asakawa A, Hayashi M, Sameshima M, Amitani H, Kojima S, Fujimiya M, Inui A. Selective serotonin reuptake inhibitors modify physiological gastrointestinal motor activities via 5-HT2c receptor and acyl ghrelin. Biol Psychiatry. 査読有、65(9): 748-759, 2008

[学会発表] (計6件)

- ① 乾 明夫、ペプチドはどこまでわれわれの行動を規定しているか、第51回日本心身医学総会、2010年6月26日、仙台
- ② Asakawa A, A central serotonin 2C receptor pathway regulates gastrointestinal motor activity via ghrelin-neuropeptide Y signaling, but does not downstream activation of melanocortin 3/4 receptors in rats., 5th CACHEXIA CONFERENCE, 2009. 12. 5~8, スペイン(バルセロナ).

- ③ 乾 明夫、摂食障害、特に神経性食欲不振症の基礎と臨床 第62回 日本自律神経学会総会 2009年11月5日 和歌山
- ④ 乾 明夫、悪液質のトランスレーショナルリサーチ 第11回日本神経消化器病学会イブニングセミナー 2009年9月24日 仙台
- ⑤ 乾 明夫、悪液質の病態と治療における最新の進歩 - 特に食欲調節の立場から - 第1回日本心身医学5学会合同集会 2009年6月6日 東京
- ⑥ 乾 明夫、浅川 明弘、上野 尚彦、藤宮 峯子、食欲・体重調節からみた消化管ホルモン 第72回 消化器心身医学研究会学術集会 2009年5月9日 札幌

[図書] (計1件)

乾 明夫、他、日本臨床、肥満症(第2版) - 基礎・臨床研究の進歩、NPY/AgRP、2010、128-142

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 悪液質改善剤

発明者: 乾 明夫、浅川 明弘、藤塚 直樹

権利者: 鹿児島大学

種類: 特願

番号: 2010-274339

出願年月日: 平成22年12月9日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 明夫 (INUI AKIO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80168418

(3) 連携研究者

佐野 輝 (SANO AKIRA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30178800

山中 寛 (YAMANAKA HIROSHI)

鹿児島大学・臨床心理学研究科・教授

研究者番号: 60182581

侯 徳興 (HOU DE-XING)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号: 90305160

堀内 正久 (HORIUCHI MASAHISA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 50264403