

平成 24 年 4 月 15 日現在

機関番号：24402
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591332
 研究課題名（和文）グルタメイト脱水素酵素異常症による高アンモニア血症の病態解明と治療法の開発
 研究課題名（英文）The study of mechanism and approach to treatment for the hyperammonemia in the glutamate dehydrogenase abnormality
 研究代表者
 岡野 善行 (OKANO YOSHIYUKI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：60231213

研究成果の概要（和文）： 高インスリン高アンモニア血症は Glutamate Dehydrogenase (GDH) の GTP の抑制制御が失われるため、GDH 活性の上昇をきたし、膵β細胞で高インスリン分泌をもたらす。高アンモニア血症の発症機構の解明と治療法の開発のためにトランスジェニックマウスを作成した。肝臓、心臓、腎臓、脳についてメタボローム解析では、脂肪酸代謝の亢進と肝組織での α -oxoglutarate までの代謝産物の抑制とその後の増加が認められた。高アンモニア血症の発症機構として、N-acetylglutamate の減少はなく、carbamoyl phosphate synthetase 活性低下は生じてない可能性が高い。新たな日本人患者の GDH 解析を行った。

研究成果の概要（英文）： Hyperinsulinism hyperammonemia causes dysregulation of GDH activity due to have severe insensitivity for GTP inhibition, and mediate the unregulated insulin secretion. We made a transgenic mouse for elucidation of mechanism of hyperammonemia and development of a therapy. Metabolom analysis in liver, heart, kidney, and brain indicated the enhancement of fatty acid metabolism and decreased synthesis of α -oxoglutarate in liver. As onset mechanism of hyperammonemia, there is not decrease of N-acetylglutamate, and carbamoyl phosphate synthetase activity may not decrease. The new Japanese patients have been diagnosed with GDH analysis.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

1998年 Stanley ら(N Eng J Med 338: 1352-1357, 1998)は高インスリン高アンモニア血症の低血糖症と高アンモニア血症という2つの異なる臓器(膵臓と肝臓)由来の症状がGDHという単一遺伝子の異常、しかも、1対立遺伝子の異常で発症することを明らかにした。通常の先天性代謝異常症と大きく異なり、本症はGDH活性のGTPの抑制制御が失われる結果、GDH活性が上昇するという『gain of function』によって発症する。

我々は4症例を酵素学的に診断し、当初発見された遺伝子変異の領域である蝶番部位の変異(I444M, G446D)以外に、GTP結合部位(H262Y)、アンテナ様構造部位(L413V)での遺伝子変異を発見した(図1)。L413VはGTPで抑制効果の減少に加え、基礎GDH活性の上昇を認め、GDH立体構造上での遺伝子変異の位置の違いが反映していると推定した(Fujioka et al. Eur J Hum Genet 9:931-937, 2001)。

(1) 高インスリン血症の発症機構

変異GDHcDNAをMIN6膵β細胞へ導入し、インスリン過剰分泌までのシグナル伝達のメカニズムを明らかにした(図2、Kawajiri et al. Ped Res 59: 359-364, 2006)。すなわち、L413V変異導入膵β細胞ではGDHのGTP抑制効果の喪失とグルコース低濃度領域でのインスリンの過剰分泌を示し、生理的な制御機構が崩壊していた。patch-clamp法によるシングルチャンネル解析では、細胞膜の有意な脱分極と頻回のCa²⁺ spike、さらに細胞内ATP濃度の上昇を明らかにした。チャンネル作動薬を用いた実験からK_{ATP}チャンネルの閉鎖とともに非選択性陽イオンチャンネルの活性化を認めている。Liら(J Biol Chem 281:15064-15072, 2006)は高インスリン血症動物モデルでのK_{ATP}チャンネル以外のチャンネルの存在とその重要性を指摘しており、我々の研究結果を支持している。以上の結果から、膵β細胞において(1)GDH遺伝子変異によるGDH活性の亢進、(2)細胞内ATP/ADP比の上昇、(3)K_{ATP}チャンネルの閉鎖、

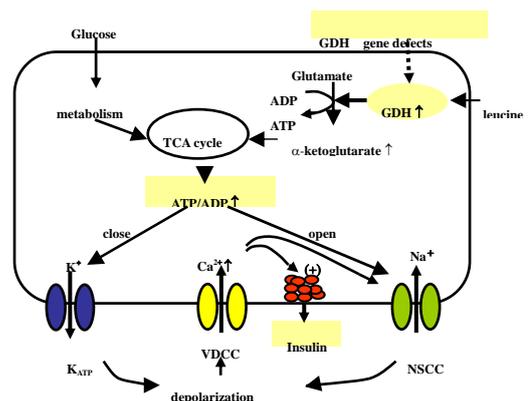
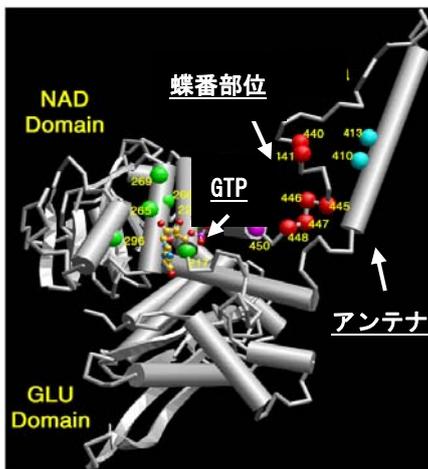
(4)非選択性陽イオンチャンネルの活性化と脱分極、(5)細胞外から細胞内へCa²⁺の流入、(6)インスリン分泌という、高インスリン高アンモニア血症のインスリン過剰分泌機構を解明した。

(2) 高アンモニア血症の発症機構

GDH異常症における高アンモニア血症の発症原因については、1)肝臓でのglutamateの減少に伴いカルバミルリン酸合成酵素を活性化物質のN-acetylglutamate産生障害。2)全身臓器でのglutamateとNH₃からのglutamine産生障害などが推定されているが、その発症機序は必ずしも明らかではない。高アンモニア血症の発症機構を解明すべく、ヒトL413V変異にchicken b-actin promotor、CMV-IE enhancerをマウスC57BL/6に導入し、GDH異常をユニバーサルに発現するトランスジェニックマウスを作成した。

(3) 高アンモニア血症の治療法の開発

主要症状の一つである低血糖症—高インスリン血症—に対する治療はK_{ATP}チャンネルへの作用薬であるジアゾキサイドが有効で、良好な血糖コントロールを可能としている。しかしながら、高アンモニア血症に対しては、当該患者の静脈血中のアンモニアが高値であるにも関わらず、肝静脈のアンモニア値がそれほど高くないこと、carbamylglutamate(N-acetylglutamateのアナログ)、安息香酸ナトリウムの投与で高アンモニア血症が軽減されないことから、高アンモニア血症の治療にはGDH活性そのものを抑制することが必要と考えている。GDH活性を抑制する薬剤としては緑茶の成分であるepigallocatechin gallateがGDH活性とinsulin分泌を抑制することを報告されている(Li C et al. J Biol Chem 281:10214-10221, 2006)。その他にも蛋白-RNA相互作用の阻害剤であるATA(aurintricarboxylic acid, Li et al. Biochemistry 46: 15089-15102, 2007)、5'-deoxypyridoxal, pyridoxal 5'-sulphate, pyridoxal 5-methisulphonate (Valinger Z et al. Biochem J 294:835-839,1993)がGDH



阻害剤として報告されている。また、ミトコンドリア内酵素である SIRT4 は ADP-ribosylation により GDH 活性を抑制し、インスリン分泌を阻害する (Haigis MC et al. Cell 126:941-954, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では高インスリン高アンモニア血症 (GDH 異常症) の高アンモニア血症の発症機構の解明を行い、その有効な治療法の開発を行うことを目的とする。高インスリン高アンモニア血症は 1 対立遺伝子の GDH 遺伝子の異常が GDH の制御機構を崩壊させ、しかも『gain of function』によって、臓器特異性に特徴ある症状にて発症するという非常にユニークな疾患である。この GDH 異常は肝臓のみならず、全身臓器への影響の結果として高アンモニア血症を来していると考えている。高アンモニア血症はたとえ軽度であっても小児期から長期にわたる場合その影響は甚大で、成人になるにつれて精神症状などの中枢神経障害を来す。GDH 異常症での高アンモニア血症の発症機構についての研究報告はほとんどなく、いまだ不明な点が多い。現在、本症患者への薬物をはじめとする有効な治療法はない。本研究では高インスリン高アンモニア血症 (GDH 異常症) モデルマウスを用いて高アンモニア血症の発症機構の解明を行い、その有効な治療法の開発を行う。

- 1) 新たな患者における GDH 酵素活性、キネティック解析、遺伝子異常を同定する。
- 2) トランスジェニックマウスにおけるアンモニア解毒の全身ネットワークを考えた上で、GDH 遺伝子異常のアンモニア産生と代謝を検討する。肝臓では N-acetyl glutamate の合成低下、カルバミルリン酸合成酵素および尿素サイクル各酵素活性への影響、アミノ酸バランスを検討する。腎臓、筋肉など他の臓器でのアンモニア代謝の役割を明らかにする。
- 3) トランスジェニックマウスによる長期にわたる高アンモニア血症の発育発達に与える影響を明らかにする。
- 4) epigallocatechin gallate, ATA の高アンモニア血症に対する治療効果を検討する。SIRT4 の GDH 活性抑制作用と高アンモニア血症との関わりを確認する。

3. 研究の方法

(1) GDH 活性の測定方法と遺伝子変異の同定

患者末梢血から Epstein-Barr ウィルスでリンパ芽球作成した。10 mM Tris-acetate (pH 8.0)、1 mM EDTA でホモジナイズした後、遠心分離後、上清を酵素液とした。20 mM Tris-acetate (pH 8.0)、50 mM NH₄Cl, 0.2

mM NADH, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100 で 5 min、25°C 前反応させた後、10 mM α -ketoglutarate で NADH の酸化反応を開始し、GDH 活性を測定した。GTP と ADP を反応液に種々の濃度で加えて、阻害効果とアロステリック効果測定した (Fujioka et al. Eur J Hum Genet 9:931-937, 2001)。

リンパ芽球よりゲノム DNA を抽出し、PCR 増幅合成した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にてダイレクトシーケンスにて遺伝子変異を同定した。

(2) トランスジェニックマウスの作成と確定

ヒト L413V 変異、chicken b-actin promotor, CMV-IE enhancer を組み込んだ pASCxaGDH を作成する。精製した遺伝子をマイクロインジェクション法によりマウス C57BL/6 の受精卵に導入し、GDH 異常をユニバーサルに発現するトランスジェニックマウスを作成する。ヒト L413V/GDH cDNA と導入ベクターの断片を allele-specific amplification 法にて確認することで、マウススクリーニングを行う。トランスジェニックマウスの確定には、作成したマウスの肝臓による基礎 GDH 活性と GTP 阻害効果、ADP 促進効果の酵素分析と Western blotting での蛋白発現量をチェックする (Fujioka et al. Eur J Hum Genet 9: 931-937, 2001)。異常 GDH の発現を確認する。

(3) 動物モデルにおける GDH 遺伝子異常の各臓器への影響

高アンモニア血症の発症と各臓器の相互作用と影響について検討する。すなわち、アンモニア代謝の生体内の生理的なネットワークシステムを考慮し、GDH 遺伝子異常の影響を検討する。高アンモニア血症の発症に最も関与する臓器としては、肝臓が考えられるが、心臓、腎臓、脳などの臓器の役割とその影響を明らかにする。各臓器でのアミノ酸分析、有機酸分析すなわち、空腹時での血糖と血中インスリン、アンモニアのチェックを行う。各臓器別に関連する静脈からアンモニアとアミノ酸分析を行う。カルバミルリン酸合成酵素および尿素サイクル各酵素活性の測定とアンモニア、N-acetylglutamate およびアミノ酸、有機酸をはじめとする他の代謝産物の測定をメタボローム解析にて行う。

4. 研究成果

(1) 高インスリン高アンモニア血症患者の診断

5 症例 (表 1、Patients 1-4, 11) について GDH 酵素活性の測定と遺伝子診断を行った。1) GDH 活性測定 (図 3) : 基礎 GDH 活性は、5 症例とも 8.2 から 15.1 nmol/mg of protein/min と正常コントロール 12.7 とほぼ

表 わが国における高インスリン高アンモニア血症のサマリー

Patients	Sex	Age at onset	Mutation	Exon	Therapy	Blood glucose (mg/dl)	NH ₃ (μmol/L)	Mental retardation
1	M	10 m	S217C	6	diazoxide	20-30	60-83	-
2	M	1 m	H262Y	7	diazoxide	26-40	77-142	-
3	M	22 m	H262Y	7	diazoxide	30-40	153-166	+
4	M	9 m	H262Y	7	pancreatectomy	unknown	unknown	-
5	M	6 d	R265K	7	pancreatectomy	N/A	N/A	+
6	F	7 m	Y266C	7	diazoxide	30	128	-
7	F	6 m	E296A	7	diazoxide	N/A	N/A	-
8	F	4 y	R322H	7	diazoxide	23	125	+
9	M	0 d	N410T	10	diazoxide	10-60	150-236	+
10	M	4 m	L413V	10	diazoxide	13	60-148	+
11	F	15 m	I444M	11	diazoxide	30	100	-
12	F	4 m	S445L	12	diazoxide	N/A	N/A	-
13	F	16 d	S445L	12	diazoxide	N/A	N/A	-
14	M	11 m	S445L	12	diazoxide	N/A	N/A	+
15	F	10 m	S445L	12	diet	40	178	-
16	M	5 d	G446D	12	pancreatectomy	8	148	+
17	M	1 d	G446D	12	pancreatectomy	10	160-230	+

同等の値を示していた。GTPによる抑制効果は正常コントロールに比較して著明に減少した。

2) 遺伝子解析の結果(表 1): 症例 1 では GTP 結合部位であるエクソン 6 に S217C 変異を認めた。症例 2-4 では同じく GTP 結合部位であるエクソン 7 に c.956 C>T 変異を認め、H262Y のアミノ酸置換をきたしていた。症例 11 ではエクソン 11 に c.1054 A>C 変異を認め、I444M のアミノ酸置換をきたしていた。いずれも 1 対立遺伝子にのみ同定された。今回同定された I444M はこれまで報告はされていない喋番部位での変異であった。また、GTP 結合部位の変異である S217C 変異は MacMullen らによって、H262Y 変異は Raizen らによって報告されている。

3) 表にこれまでわが国で報告された高インスリン高アンモニア血症例をまとめている。これまで、臨床表現型と遺伝子型の関連については明確ではない。G446D 変異の患者においては重症型と関連している可能性が高い。

(2) トランスジェニックマウスの解析

ヒト L413V/GDH cDNA と導入ベクターの断片を allele-specific amplification 法にて選択したヘテロのトランスジェニックマウス: モデルマウスでは、肝組織での基礎 GDH 活性はコントロールマウスと同等であり、GTP による抑制効果は減少していた。そして、血糖の低下とアンモニアの上昇を認め、動物モデルとしての有用性を確認した。臓器間の代謝ネットワークでの GDH 遺伝子異常の影響を明らかにするため、肝臓、心臓、腎臓、脳についてメタボローム解析を行った。1) 一晩の絶食期間の結果、GDH ヘテロマウスは低血糖、高アンモニア血症を生じなかったが、その活動性は著明に低下していた。2) ケトン体、グリセロール 3 リン酸の増加があり、脂肪酸代謝の亢進が認められた。3) 肝組織では TCA サイクルでの α-oxoglutarate までの代謝産物の抑制とその後の増加が認められた。これは GDH 活性の機能亢進により glutamate から α-oxoglutarate への産生増加のためと推定された。しかしながら、他の

臓器ではこの傾向は認めなかった。4) 尿素サイクルでのオルニチンからアルギニンには量的変化は認められなかった。
N-acetylglutamate の増加はすべての臓器で認めていない。

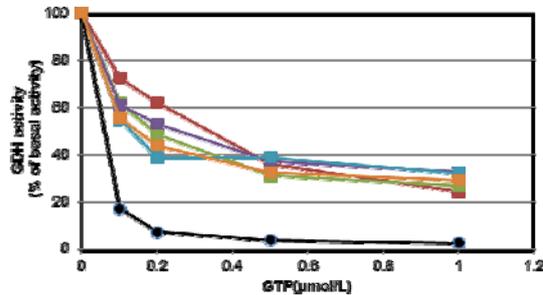


図 3 高インスリン高アンモニア血症患者のリンパ芽球での GDH 活性と GTP の効果

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 1 件)

Aso K, Okano Y, Takeda T, Sakamoto O, Ban K, Iida K, Yamano T, Shintaku H.; Spectrum of glutamate dehydrogenase mutations in Japanese patients with congenital hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome. Osaka City Med J. (査読有り) 57 (2011)1-9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡野 善行 (OKANO YOSHIYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60231213

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森田 隆 (MORITA TAKASHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70150349

小林 圭子 (KOBAYASHI KEIKO)

鹿児島大学・歯学総合研究科・准教授
研究者番号：70108869

佐伯 武頼 (SAHEKI TAKEYORI)

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

(4)研究協力者

川尻 三枝 (KAWAJIRI MIE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究医

麻生 和良 (ASOU KAZUYOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生

鶴原 昭史 (TSURUHARA AKIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生