

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790990

研究課題名(和文) カルニチン欠乏症の診断と病態解析に関する研究

研究課題名(英文) A study on the diagnosis and pathophysiology of carnitine deficiency

研究代表者

小林 弘典 (KOBAYASHI HIRONORI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70397868

研究成果の概要(和文)：

まず、本研究ではカルニチン欠乏症例中の先天代謝異常症である OCTN2 異常症の頻度、臨床像について検討した。分析した 2,694 例中 269 例がカルニチン欠乏であった。2 例でヘテロ接合性変異を同定し、それぞれ S467C/WT、V465A/WT であった。本症ではヘテロ接合性変異を有する場合でも、感染等を契機に重篤な臨床像を呈する可能性が示唆された。

次に、培養皮膚線維芽細胞を用いたカルニチントランスポーターの機能解析法を確立した。OCTN2 異常症群における細胞内/細胞外の遊離カルニチン比はコントロール群より有意に低下した。本法は細胞内外のアシルカルニチンを観察可能であり、カルニチンが関与する他の脂肪酸代謝異常症の機能解析への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：

Deficiency of carnitine transporter, a product of OCTN2 gene, causes a primary carnitine deficiency. First, this study surveyed the prevalence and clinical presentation of OCTN2 deficiency among the carnitine deficiency. Acylcarnitine analysis identified 269 cases of carnitine deficiency out of 2,694 subjects. Two cases had heterozygous mutation, S467C/WT and V465A/WT, respectively. This result suggests that catabolic state upon infection or poor nutrition can trigger metabolic decompensation even in the heterozygous carrier of OCTN2 mutation.

Second, our study established a method for functional analysis of carnitine transporter using cultured skin fibroblast. The ratio of intracellular carnitine/extracellular free carnitine in OCTN2 deficiency was significantly lower than in normal controls. This method also enables to evaluate intracellular acylcarnitine profile simultaneously as well as extracellular acylcarnitine profile using conventional method. Further application of this strategy for the functional analysis of fatty acid oxidation is expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脂質、ゲノム、分析科学、カルニチン、タンデムマス、アシルカルニチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床の場においてカルニチン欠乏症が少なくない事が分かってきた

質量分析技術の進歩により、1990年代からESI-MS/MS(タンデムマス)による血中アシルカルニチン分析は脂肪酸代謝異常症の診断方法として普及した。この方法により少量の血液試料から幅広い脂肪酸代謝異常のスクリーニングが可能となった。申請者の教室では2003年からタンデムマスを導入し、脂肪酸代謝異常症をはじめ多くの先天代謝異常症を診断している。我々は、この経験の中から、先天代謝異常症としてのOCTN2異常症に加え、二次性カルニチン欠乏症を来す症例が多いことを見いだした。

(2) カルニチントランスポーター(OCTN2)異常症について

カルニチンは長鎖脂肪酸がミトコンドリアβ酸化を受ける際には必須の輸送体であり、カルニチントランスポーターにより細胞質へ能動的に取り込まれる。OCTN2異常症は先天代謝異常症である全身性カルニチン欠乏症異常の原因遺伝子であり、カルニチントランスポーターをコードする事が報告されている。この疾患は、感染や飢餓を契機に著しい低血糖などを呈するが、カルニチンの投与により著しい予後の改善が得られる。試験的遺伝子スクリーニングによると本邦でのOCTN2異常症は約1/4万人といわれるが発見される患者数は少なく、原因不明の突然死や急性脳症とされる症例が多いと推定された。

また、カルニチントランスポーターの機能解析の際にはこれまでRIを用いた遊離カルニチン取り込み率が必須の手法であった。この方法の原型は1988年に報告されたが、RIを用いねばならず、簡便性に問題があり、より簡便な方法を開発する必要があった。

2. 研究の目的

(1) タンデムマスによるアシルカルニチン分析(タンデムマス分析)がわが国の臨床現場においても徐々に普及するにつれて、カルニチン欠乏症を呈する症例が散見されるようになった。本研究では、こうしたカルニチン欠乏症例中のOCTN2異常症の頻度、およびそれらの臨床像についての検討を行った。

(2) これまでOCTN2異常症の診断に必要であった、RIを用いたカルニチントランスポーターの機能解析法に代替する、より簡便な機能解析法の開発に関する研究を行った。

3. 研究の方法

(1) アシルカルニチン分析によるカルニチン欠乏症例の集積

何らかの症状を有し、臨床的に脂肪酸代謝異常症を含めた先天代謝異常症が疑われる患者の血中アシルカルニチン分析を行った。ろ紙血における遊離カルニチン濃度が $20 \mu\text{mol/l}$ 以下をカルニチン低下症例と定義し症例を収集した。この際、尿中アシルカルニチン分析に加え、尿中有機酸分析なども同時に行い、多角的な解析を試みた。尿アシルカルニチン分析を行った症例については遊離カルニチンクリアランス((尿中遊離カルニチン値×血清Cr値)/(血清遊離カルニチン値×尿Cr値)×100%(正常値 ≤ 2.1))を算出した。

(2) カルニチントランスポーター異常症が疑われる症例の遺伝子解析

OCTN2異常症のスクリーニングには尿中への遊離カルニチンクリアランスを用いた。ここから抽出された症例のうち、同意が得られた症例についてOCTN2遺伝子を解析した。遺伝子解析の是非については島根大学医学部において倫理委員会の承認を得た検査方法・同意書式に準じて行った。

(3) 線維芽細胞を用いたカルニチントランスポーター機能の評価法確立

培養皮膚線維芽細胞を培養プレート上で培養し、コンフルエントに達したところで、表面を洗浄した。これに脂肪酸を含まないBSAを加えたMEMに、L-carnitine それぞれ $10, 50, 400 \mu\text{mol/l}$ 、パルミチン酸 $200 \mu\text{mol/l}$ を最終的にそれらの濃度になるように添加し、96時間培養した。培養液(細胞外液に近似する)の上清を $10 \mu\text{l}$ 採取した。一方、細胞ペレットはFolch法を用いて細胞内液の精製を行い(図1)、そのうちの $10 \mu\text{l}$ を分析用試料として採取した。その後、それぞれの試料をブチル誘導体化しタンデムマスでアシルカルニチン分析を行った。得られた遊離カルニチン濃度を細胞蛋白濃度で補正した後、異なる遊離カルニチン量での培養系間での細胞内外の遊離カルニチンについて検討を行った。

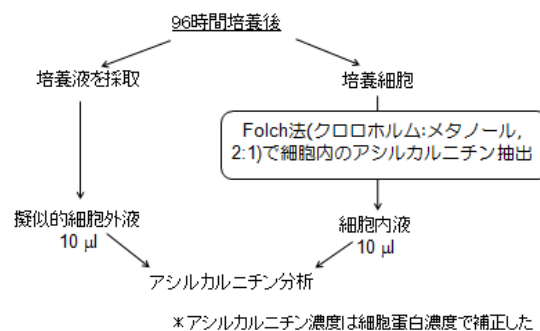


図1. 細胞内および細胞外アシルカルニチンの同時測定法

4. 研究成果

(1) アシルカルニチン分析によるカルニチン欠乏症例の集積

2009年4月1日～2010年3月末までに、何らかの症状を呈し、臨床的に脂肪酸代謝異常症などの先天代謝異常症を疑われた症例から2,694検体の血液ろ紙検体を得て、タンデムマス分析を行った。269症例のカルニチン欠乏症例を発見した。カルニチン欠乏症発見後の問診や再検、化学診断をすすめた結果、カルニチン欠乏症は二次的に起こっている事が非常に多い事が明らかになった。

(2) OCTN2 遺伝子解析

このうち、23例について尿アシルカルニチン分析を行ったが、OCTN2 異常症のスクリーニング指標として報告されている 2.1%を超える症例は3症例であった。これらの3症例を含む4症例について遺伝子解析を行った。このうちの2例ではヘテロ接合性変異を有し、それぞれ S467C/WT、V465A/WT を同定した。前者は、13歳4ヶ月に診断された女兒であり、繰り返す痙攣発作および頭部MRI上の異常信号を呈していた。遊離カルニチンクリアランスは3.12%であった。後者は1歳11ヶ月に急性胃腸炎罹患時の意識障害を契機に発症した女兒であった。遊離カルニチンクリアランスは46.7%であり、L-カルニチン内服により後遺症無く経過している。今回の検討から、OCTN2 遺伝子についてはヘテロ接合性変異を有する場合であっても、感染などで低栄養や異化亢進が引き金になって重篤な臨床像を呈する可能性が示唆された。

(3) 正常コントロールの線維芽細胞を用いた細胞内外の遊離カルニチン濃度の検討

正常コントロールにおいて培養液中の遊離カルニチン濃度を生体内における過量、正常量、不足量として、それぞれ 400 $\mu\text{mol/l}$ 、50 $\mu\text{mol/l}$ 、10 $\mu\text{mol/l}$ として培養し、細胞内外のアシルカルニチンプロファイルを比較した(図2)。正常コントロール細胞ではカルニチン欠乏下においては遊離カルニチン濃度が細胞外に比べて細胞内で高くなる事が明らかになった。また、その他の2群では細胞外の遊離カルニチン濃度に近似した細胞内遊離カルニチンとなった。この事から、カルニチントランスポーターは細胞外遊離カルニチン値が低い状況下においてより働き、その機能を観察できる事が明らかになった。細胞外遊離カルニチン濃度が十分である時はトランスポーターを介さないカルニチン輸送が行われると考えられた。

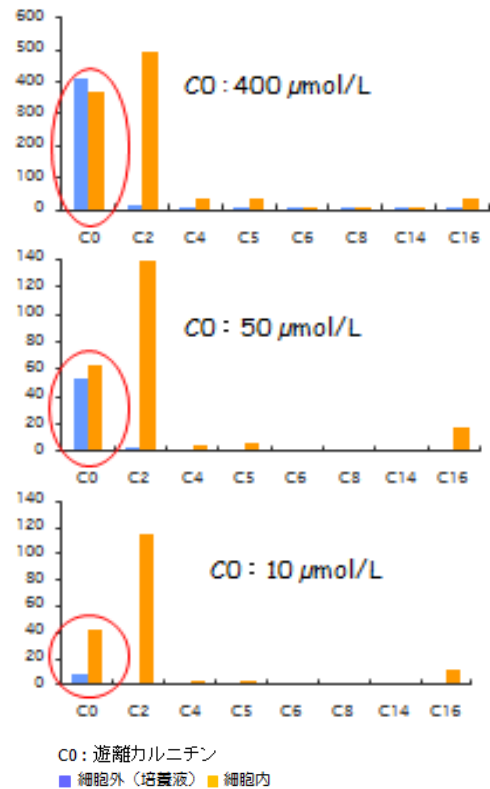


図2. 健常コントロール細胞における細胞外および細胞内アシルカルニチンプロファイル

(4) OCTN2 患者の培養皮膚線維芽細胞を用いた細胞内外遊離カルニチン濃度の検討

遺伝子解析で確定診断がなされている OCTN2 異常症患者 2 例および正常コントロール 2 例をもちいて細胞内外の遊離カルニチン濃度について検討を行った。図3に示すとおり、OCTN2 異常症例では培養液中のカルニチン濃度が 10 $\mu\text{mol/l}$ の時にコントロールに比べて有意に細胞内/細胞外の遊離カルニチン比が低下した。よって培養液の遊離カルニチン濃度は生理的な細胞外遊離カルニチン濃度よりも低い場合にカルニチントランスポーターの機能をより正確に評価出来る事が明らかになった。

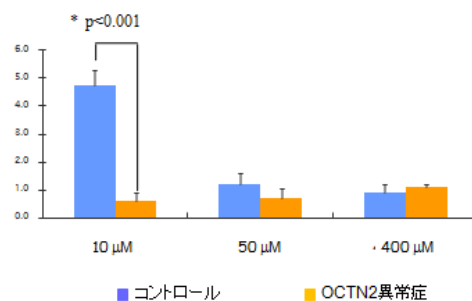


図3. 細胞内/細胞外の遊離カルニチン比

以上の結果より、OCTN2 異常症の確定診断に必要なトランスポーターの機能解析に

は、培養液中のカルニチン濃度を 10 $\mu\text{mol/l}$ として培養を行い、細胞内外の遊離カルニチン濃度を比較することで、従来の RI を用いる煩雑な方法に代替可能と考えられた。この機能解析法は細胞内外のアシルカルニチンを同時に観察可能であり、カルニチンが関与する他の脂肪酸代謝異常症の機能解析にも有用であることが期待される。

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 20 件)

- 1) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R. Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2011 Apr;102(4):399-406. (査読あり)
- 2) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S. Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. *Mol Genet Metab.* 2011 Mar;102(3):343-348. (査読あり)
- 3) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 221(3):191-195. (査読あり)
- 4) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S. In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type 2. *J Chromatogr B* 2010 Jun; 878(20):1673-1676. (査読あり)
- 5) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Purevsuren J, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamaguchi S. Heat stress deteriorates mitochondrial beta-oxidation of long-chain fatty acids in cultured fibroblasts with fatty acid beta-oxidation disorders. *J Chromatogr B* 2010 Jun; 878(20): 1669-1672. (査読あり)

6) Fukao T, Nguyen HT, Nguyen NT, Vu DC, Can NT, Pham AT, Nguyen KN, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui TP, Niezen-Koning KE, Wanders RJ, de Koning T, Nguyen LT, Yamaguchi S, Kondo N. A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010 May; 100(1):37-41. (査読あり)

7) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S. Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial beta-oxidation: comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain Dev.* 2010 May; 32(5):362-370. (査読あり)

8) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab.* 2009 Dec; 98(4):372-377. (査読あり)

9) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Nakamura I, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S. Enzymatic evaluation of glutaric acidemia type 1 by an in vitro probe assay of acylcarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS). *J Chromatogr B.* 2009 Sep; 877(25):2648-2651. (査読あり)

10) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S. Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain Dev.* 2010 May; 32(5):409-411. (査読あり)

11) 小林弘典, 李紅, プレブスレン・ジャミヤン, 虫本雄一, 長谷川有紀, 山口清次. タンデムマス導入による新生児マススクリーニングの新時代 タンデムマスによる新生児スクリーニングに対する in vitro probe acylcarnitine profiling assay による脂肪酸 β 酸化能評価の有用性に関する検討. 日本先天代謝異常学会雑誌 26(1): 50-54, 2010. (査読なし)

12) 小林弘典, 山口清次. タンデムマスによる新生児マススクリーニング. 小児科 51(12): 1697-1700, 2010(査読なし)

13) 小林弘典. 新生児拡大マススクリーニ

ング タンデムマス法. 小児科臨床 63(10): 2063-2069, 2010. (査読なし)

14) 小林弘典, 山口清次. 新生児医療の最前線 新しい新生児マススクリーニング タンデムマスの導入. Neonatal Care 23(9): 889-894, 2010. (査読なし)

15) 栗野宏之, 八木麻理子, 起塚庸, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 坂本修, 大浦敏博, 竹島泰弘, 松尾雅文. 幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例. 日本小児科学会雑誌 114(6): 961-965, 2010. (査読あり)

16) 顧艶紅, 小林弘典, 加藤忠明, 長谷川有紀, 原田正平, 山口清次. Two-Source Capture Recapture Method を用いた日本におけるメチルマロン酸血症の発症率及び小児慢性特定疾患治療研究事業での登録率の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌 20(1): 33-37, 2010. (査読あり)

17) 小林弘典, 山口清次. タンデムマスによる新生児・乳幼児突然死をきたす先天代謝異常症の早期発見. 産婦人科の実際 59(6): 931-936, 2010. (査読なし)

18) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, 福田誠司, 近藤陽一, 脇口宏, 藤枝幹也, 高杉尚志, 山口結, 吉良龍太郎, 原寿郎, 山口清次. 中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症日本人 5 症例の発症形態の検討. 日本小児科学会雑誌 113(1): 1800-1804, 2009. (査読あり)

19) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次. 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症の 2 例 血清分析の必要性. 日本マス・スクリーニング学会誌 19(3): 255-259, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1) 小林弘典. タンデムマスによる新生児スクリーニングのデータ解釈と臨床的意義. 平成 22 年度先天性代謝異常・内分泌疾患マス・スクリーニング基礎理論研修会 (招待講演). 2010 年 10 月 30 日、国立成育医療研究センター、東京

2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S. Toxic effect of cereulide of bacillus cereus on mitochondrial fatty acid oxidation. 第 52 回日本先天代謝異常学会 2010 年 10 月 22 日、大阪国際会議場、大阪市

3) 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 李紅, 虫本雄一, 長谷川有紀, 山口清次. ミトコンドリア三頭酵素欠損症に対するベサフィブレートの効果に関する In vitro probe assay での検討第 52 回日本先天代謝異常学会. 2010 年 10 月 22 日、大阪国際会議場、大阪市

4) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J,

Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S. Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) in FAO disorders: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. Society for the study of inborn errors of metabolism. 2010 年 8 月 31 日, The Istanbul Convention and Exhibition Center, Istanbul, Turkey

5) 小林弘典, 虫本雄一, 長谷川有紀, 他. 自治体主導のタンデムマス・スクリーニング: 島根県での試み. 2010 年 8 月 29 日 横浜市

6) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Li H, Mushimoto Y, Yamaguchi S. Development of a diagnostic method of systemic carnitine deficiency by in vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry and fibroblasts. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolism. 2010 年 3 月 10、福岡国際会議場、福岡

7) 小林弘典, 虫本雄一, 長谷川有紀, Purevsuren Jamiyan, 李紅, 山口清次. In vitro probe assay による脂肪酸代謝異常症の代謝能評価. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会・第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2009 年 11 月 7 日. 京王プラザホテル, 東京

8) Kobayashi K, Purevsuren J, Hasegawa Y, Yamaguchi S. Development of a diagnostic method of systemic carnitine deficiency by in vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry and fibroblasts. of Metabolism. 11th International Congress of Inborn Errors, 2009 年 8 月 31 日, Manchester Grand Hyatt Hotel, San Diego, CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弘典 (KOBAYASHI HIRONORI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 70397868

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし