

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591516

研究課題名(和文)モデルマウスを用いるシトリン欠損症の治療法と発症予防法の開発

研究課題名(英文)To develop therapeutic and prophylactic procedures for citrin deficiency

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルを用いた解析を行い、以下の結果を得た。(1)モデルマウスにおいて尿中のグリセロールが上昇していること、およびショ糖投与に伴い、血漿グリセロール濃度が上昇することを見出し、シトリン欠損症の診断法、治療効果の判定に用いる。(2)成人発症II型シトルリン血症の発症誘因である、糖質(ショ糖)、エタノール、およびグリセロールの高濃度溶液の飲用をモデルマウスは忌避すること、ならびにそれら高濃度溶液の強制投与に伴い、肝中のグリセロール3-リン酸の上昇とともにATP濃度の低下が共通して起こることを見出した。これら二代謝変動を解消する物質は治療に用い得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：By using a citrin deficiency model mouse, we have got following results in the field of pathophysiology and treatment. (1) Urine glycerol level was higher in the model mouse than in the control mice and sucrose administration increased plasma glycerol in the model mouse, suggesting that these parameters are possible diagnostics. (2) Aversion to the high concentration of sucrose, ethanol and glycerol, the precipitating factors of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2), was observed in the model mouse, and the forced oral administration of such solutions coincidentally accompanied with both a marked increase in hepatic glycerol 3-phosphate and a decrease in ATP. These results suggest that substances which suppress the phenomena stated above (an increase in glycerol 3-phosphate and a decrease in ATP) are possible therapeutics for citrin deficiency.

研究分野：医歯薬学

キーワード：シトリン欠損症 マウスモデル 糖質毒性 アスパラギン酸グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体

1. 研究開始当初の背景

佐伯・小林らは、高アンモニア血症に基づく、失見当識、意識障害、異常行動、痙攣などを伴う成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の病因遺伝子、*SLC25A13*、を明らかにし、その遺伝子産物をシトリン (citrin; *ctn*) と名づけた。シトリンの欠損は、CTLN2 のみならず、肝内胆汁うっ滞を伴う新生児肝炎 (NICCD; neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency) をも引き起こすことを明らかにし、シトリン欠損症という疾患概念を打ち立てた。

シトリンの機能は、ミトコンドリア内膜局在のアスパラギン酸グルタミン酸 ミトコンドリア膜 輸送体 (AGC) であることも解明し、シトリン欠損症で見られる各種症状 (高アンモニア血症、シトルリン血症、低血糖、低蛋白血症など) の発症機構が、肝型 AGC であるシトリン機能欠損に起因することを明らかにしてきた。これまでに 50 余種の *SLC25A13* 変異を同定し、日本、中国、韓国を含む東アジアには共通の変異があり、イスラエル人や白人の変異とはまったく異なることを見いだした。ヘテロ接合体頻度は、日本人で 65 人に 1 人であるが、南中国では 40 人に 1 人にも及び、非常に高頻度の常染色体劣性の遺伝性疾患であることを明らかにした。

一方、申請者らは、CTLN2 に対するこれまでの、高糖質食、高濃度糖輸液、ならびに脳浮腫へのグリセロール投与による治療法の危険性を指摘してきた。さらに、シトリン欠損症者 (無症状の変異ホモ接合体を含む) の特異な「たんぱく質・脂肪を好む」食癖を定量的に解析し、本質的には糖質の摂取量が少なく、糖質を嫌悪・忌避していることを明らかにし、上記と合わせ、シトリン欠損症における糖質毒性を報告し、医療界に警告してきた。すなわち、シトリンの機能は、単にアスパラギン酸をミトコンドリアから細胞質へ運び、尿素やたんぱく質の合成に必要なアスパラギン酸を供給するだけでなく、リンゴ酸・アスパラギン酸シャトルの一員として、細胞質からミトコンドリアへ NADH 還元当量を輸送するという糖代謝にとって重要な役割を担っていて、この機能欠損が過剰糖質摂取時の病態発症に関わることを証明した。また、申請者らは、病態解明・治療法開発を目的として、病因遺伝子 *Slc25a13* を破壊した、シトリン欠損 (*ctn*-KO) マウスを作成したが、シトリン欠損症症状を呈さなかった。その原因は、マウスでは、第 2 の細胞質 NADH 処理機構である、グリセロリン酸シャトルが、ヒトに比し高活性であることに基くと考えた。そこで、ミトコンドリア型グリセロール 3-リン酸 (G3P) 脱水素酵素 (mGPD) をも欠損した *Ctrn/mGPD* double-KO マウスを作成した結果、高アンモニア血症、シトルリン血症、低血糖を呈し、

シヨ糖を嫌い、シヨ糖強制投与で血中アンモニア上昇を起こすヒトシトリン欠損症モデルマウスを確立することができた。本モデルマウスにシヨ糖を投与し、その肝内の代謝物変動を解析し、肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) の上昇、TCA サイクルメンバーの減少、シトルリンの上昇、グルタミン酸・グルタミンの低下、リジンの上昇を明らかにした。特に G3P の上昇は著しく、肝内の NADH/NAD⁺ 比の上昇を反映していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究で最も重要な知見は、double-KO マウスの高アンモニア血症を糖質投与が著しく増強することである。これは患者に観察される糖質忌避・糖質毒性と一致する。CTLN2 治療には従来、肝移植が有効であることが知られていたが、コストとドナーの問題がある。そこで、内科的治療法の開発が望まれる。我々は疾患モデル確立の過程でピルビン酸の効果に気付き、初期段階の CTLN2 患者に試験的に投与し、検査所見の正常化と身体発育への顕著な効果を認めた。また、たんぱく質・アミノ酸、および中鎖脂肪酸からなるトリグリセリド (MCT) のモデルマウスへの有効性も明らかにした。本研究では、その作用機構の解明とさらには発症予防法の確立を目指している。現時点では、まだまだシトリン欠損症の病態の解明も十分でなく、まずは病態を解明し、その成果を生かした治療法の開発・発症予防法の開発を行っている。

3. 研究の方法

ヒトシトリン欠損症モデルマウスを用い、以下の実験を試みた。疾患モデルマウス (*Ctrn/mGPD*-KO) は、*mGPD*-KO (*mGPD*^{-/-}) の背景をもつ *citrin*^{+/+} マウスの交配によって得、別に交配で作出する野生型 *wt* と *Ctrn*-KO の系と合わせ、実験には 4 種類 (*wt*; *Ctrn*-KO; *mGPD*-KO; *Ctrn/mGPD*-KO) のマウスを用い比較検討した。マウスの採尿はメタボリックケージを用いた。患者尿は熊本大学倫理委員会の承認を得て採取した。

CTLN2 発症誘導因子であるシヨ糖、エタノール、グリセロールに対するマウスの嗜好性を以下の方法で検討した。すなわち、それら溶液と水を入れた 2 種のボトルを用意し、マウスの 1 日当たりの自由摂取量を計量した。また、それら溶液の肝代謝への影響を、胃管を用い強制経口投与し、1 時間後に肝臓を freeze-clamp 法で採取し、その perchloric acid 抽出液の代謝物を定量し検討した。

4. 研究成果

4 - 1 . *Ctrn/mGPD* double-KO マウス尿お

よび血漿中へのグリセロール上昇と患者尿グリセロール排泄の検討

ショ糖を投与したモデルマウス肝中の G3P の著しい増加は、シトリン欠損症の大きな特徴である。この現象はもし、もっと容易に検出できれば、シトリン欠損症の診断や治療効果の判定に用い得ると考えられる。そこで、血漿および尿中の G3P とグリセロールの検出を試みた。その結果、Ctrn/mGPD double-KO マウス尿中の G3P とグリセロールの上昇を認めた。血漿中では G3P は検出限界以下であったが、グリセロールは検出された。絶食条件下では double-KO マウスにおいて有意に高値を示したが、摂食条件下では差がなかった。しかし、肝 G3P の上昇をきたすようなショ糖やエタノールの胃管による経口投与によって double-KO マウスの血漿グリセロールは上昇し、肝内 G3P 濃度と血漿グリセロール濃度間には有意な相関が得られた。そこでヒト対照およびシトリン欠損症患者の尿中の G3P とグリセロールを定量した。年齢によって尿中濃度が著しく異なることから 3 群に分けて比較した。1 歳から 9 歳のシトリン欠損症患者では G3P およびグリセロールともに有意に上昇していた。しかし、それ以外の年齢層では差が認められなかった。以上の結果は、より詳細厳密な調査を行えば、尿 G3P やグリセロール、および血漿グリセロールがシトリン欠損症の診断検査に用いられる可能性を示唆している。

4 - 2 .CTLN2 発症誘因(糖質、エタノール、グリセロール)に対する 4 種マウスの嗜好性と経口投与による肝内代謝中間体の変動

我々は、糖質摂取がシトリン欠損症病態発症の大きな原因であることを示してきたが、飲酒およびグリセロールと果糖からなる脳浮腫治療薬グリセロールの投与が患者の病態悪化の大きな原因であることが明らかになっている。そこでこれら糖質(実験ではショ糖を使用)、エタノール、およびグリセロールの各種濃度溶液の自由摂取(水と試験溶液のどちらでもマウスは選択できる条件)量を検討した。その結果、Fig. 1 に示すようにショ糖はマウスも好む物質であるので、wt、Ctrn-KO、mGPD-KO マウスともに大量にまた、preference から明らかかなようにショ糖のみを摂取したが、Ctrn/mGPD double-KO マウスの摂取量は濃度を増すと減少し、preference も低下した。この現象を忌避 aversion と名付けた。

同様の試験をエタノールとグリセロールで行った。その結果は、Table 1 に示すようにそれぞれの高濃度(9%エタノール、5%および 10%グリセロール)では double-KO マウスのみならず、Ctrn-KO および mGPD-KO マウスでも aversion が観察された。

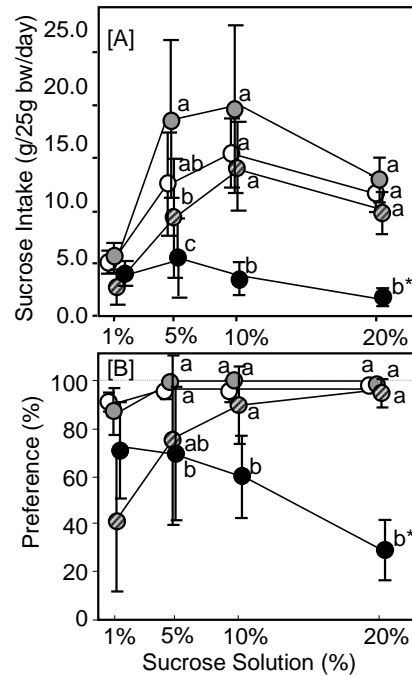


Fig. 1. Intake [A] of and preference [B] for varied concentrations of a sucrose solution.

Mice were provided two bottles, one containing water, and the other containing either a 1, 5, 10 or 20% sucrose solution. [A] Intake of each mouse was determined by weighing the bottles each day and averaged over a two-day period. [B] Preference (%) was calculated as $100 \times (\text{g of test solution}) / [(\text{g of test solution}) + (\text{g of water})]$. White circles denote wt mice; grey, Ctrn-KO mice; striped, mGPD-KO mice; black, Ctrn/mGPD double-KO mice. Data on each group of mice are expressed as mean \pm SD (n=6-8). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at $p < 0.05$.

そこで、このような aversion が観察される条件下で肝内の代謝物変動を検出するために高濃度溶液の胃管による強制的投与を行い、その後の肝内代謝物を定量した。定量した代謝物は以前の研究においてショ糖投与で変化する代謝物(G3P、クエン酸、シトルリン、グルタミン酸、リジン)とした。その結果、いずれの代謝物も単独では aversion と一致した変化は見られなかった。そこで以前から解析を行い、ショ糖投与 mGPD-KO マウスでも低下したことから関連性が少ないと考えていた ATP の変化を加味したところ、Table 1 に示すように aversion は G3P の上昇と ATP の低下が同時に起こった場合と一致して生じることが明らかになった。

Table 1. Relation between aversion and metabolite changes in the liver of mice

Treat-ment	Mouse	Aversion	G3P	ATP
20% Sucrose (4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn	no	nc	nc
	mGPD	no	nc	Dec
	Double	Yes	Inc	Dec
9% Ethanol (1.4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn	Yes	Inc	Dec
	mGPD	Yes	Inc	Dec
	Double	Yes	Inc	Dec
5% Glycerol (1g/kg)	Wt	no	nc	nc
	Ctrn	Yes	Inc	Dec
	mGPD	Yes	Inc	Dec
	Double	Yes	Inc	Dec
10% Glycerol (2g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn	Yes	Inc	Dec
	mGPD	Yes	Inc	Dec
	Double	Yes	nt	nt

The solutions shown in the Table were administered per os via gastric tube. Ctrn, mGPD and Double indicate Ctrn-KO, mGPD-KO and double-KO mice, respectively. Dec, decreased; Inc, increased; yes and no, presence and absence of aversion; nc, not changed. Grey highlights indicate coincidence of aversion and the two metabolic changes shown, and yellow, metabolic changes without aversion.

以上の結果は新しい治療薬の探索において重要と考える。ピルビン酸は肝 G3P の低下を起し、高炭水化物食の摂食量を増加させた。G3P 濃度には影響せず、ATP の増加をきたす物質にも同様の効果があるのではないかと推定している。

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 11件)

1. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab.* 2012;105(4):553-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.12.024. 査読あり
2. Saheki T, Inoue K, Ono H, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Furuie S, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Yamamura K, Kobayashi K. Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic

metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012;107(3):322-9. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.07.021. 査読あり

3. Yazaki M, Kinoshita M, Ogawa S, Fujimi S, Matsushima A, Hineno A, Tazawa K, Fukushima K, Kimura R, Yanagida M, Matsunaga H, Saheki T, Ikeda S. A 73-year-old patient with adult-onset type II citrullinemia successfully treated by sodium pyruvate and arginine. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(8):1542-5. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.12.027. 査読あり
4. Chen R, Wang XH, Fu HY, Zhang SR, Abudouxikuer K, Saheki T, Wang JS. Different regional distribution of SLC25A13 mutations in Chinese patients with neonatal intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(28):4545-51. doi: 10.3748/wjg.v19.i28.4545. 査読あり
5. Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. SLC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. *PLoS One.* 2013;8(9):e74544. doi: 10.1371/journal.pone.0074544. eCollection 2013. 査読あり
6. Moriyama M, Fujimoto Y, Rikimaru S, Ushikai M, Kuroda E, Kawabe K, Takano K, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Okano Y, Yazaki M, Ikeda SI, Zhang C, Song YZ, Sakamoto O, Kure S, Mitsubuchi H, Endo F, Horiuchi M, Nakamura Y, Yamamura K, Saheki T. Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2015;S0925-4439(15)00129-5. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.04.023.
7. 査読あり

[学会発表](計 25件)

1. Saheki T. Citrin Deficiency -one of the most prevalent inherited metabolic diseases in East Asia- Vietnamese Association of Diabetes and Endocrinology, May 11-12, 2012, Hue, Vietnam
2. Saheki T. Citrin Deficiency: Then and Now; A tribute to Dr. Keiko Kobayashi, Special Symposium on Citrin Deficiency in Memory of Dr. Keiko Kobayashi, 10th Asia-Pacific

- Conference on Human Genetics (APCHG), December 6-8, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.
3. Saheki T, Studies on citrin deficiency and carnitine deficiency using animal models.招待講演 Conference on Genetic and Metabolic Disease in Fujian, 2013.6.8. Fujian, China
 4. 佐伯武頼: シトリン欠損症における糖とアミノ酸の代謝異常相関. JSAAS2013 日本アミノ酸学会第7回学術大会, 熊本, 11月2日, 2013年.
 5. Saheki T, Citrin deficiency; Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects, 招待講演 3rd ACIMD/ 55th JSIMD, 2013.11.27-11.29, Maihama, Japan
 6. Saheki T, Fujimoto Y, Yamamura K, Plasma glycerol was increased parallel to blood ammonia in citrin deficiency model in response to administration of sugars, #rd ACIMD/55th JSIMD, 2013.11.27-11.29, Maihama, Japan

〔図書〕(計 1件)

1. Saheki T, Animal models of citrin deficiency, the citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse, In Oxidative stress in applied basic research and clinical practice, Studies on pediatric disorders eds, Tsukahara H & Kaneko K), pp. 159-182, Springer New York, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室
<http://irda-genetics.kuma-u.jp/yamamura/member/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

牛飼美晴 (Ushikai Miharuru)

鹿児島大学医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 70232816

(3)連携研究者

山村研一 (Yamamura Ken-ichi)

熊本大学生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号: 90115197

押村光雄 (Oshimura Mitsuo)

鳥取大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20111619