

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591522

研究課題名(和文) グルタメイト脱水素酵素異常症モデルマウスによる病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiological study and the developments of therapy using mouse model of glutamate dehydrogenase disorder

研究代表者

岡野 善行 (OKANO, YOSHIYUKI)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60231213

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)：高インスリン高アンモニア血症はグルタメイト脱水素酵素(GDH)の遺伝子異常の結果、GDH活性の抑制制御が失われ、高活性となるため発症する。ヘテロのトランスジェニックマウスではGDH活性の上昇、軽度の血糖低下とアンモニア上昇を認めたと、臨床症状はなかった。肝脳心腎のメタボローム解析で、肝で解糖系から -オキソグルタレートまでの代謝産物の低下とその後の増加があった。脂肪酸代謝が全臓器で亢進し、ケトン体が増加した。肝ではGlnの増加、Orn、Cit、Asの低下、Nアセチルグルタミン酸の変化がないことから、高アンモニア血症はカルバモイルリン酸合成酵素の低下ではなく、他の機序によって発症する。

研究成果の概要(英文)：Hyperinsulinism hyperammonemia is caused by dysregulation of GDH activity, which induces insensitivity for GTP inhibition and the unregulated insulin secretion. We have made a transgenic mouse (TGM) to clarify the mechanism of hyperammonemia and to develop the therapy. The hetero-TGM showed an increase of GDH activity, mild hypoglycemia, and mild hyperammonemia, however no clinical symptoms. In metabolome analysis of the liver, brain, heart, and kidney; fatty acid metabolites were enhanced in all the organs. The substances before -oxoglutarate decreased and the substances after -oxoglutarate increased in the glycolytic system and TCA cycle of the liver. Because of the increased Gln/Glu, decreased Orn, Cit, and As, and no decreased N-acetylglutamate, hyperammonemia is not caused by the reduction of carbamoyl phosphate synthase. We have to consider a new mechanism for hyperammonemia.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：グルタミン酸脱水素酵素 高アンモニア血症 高インスリン血症 動物モデル

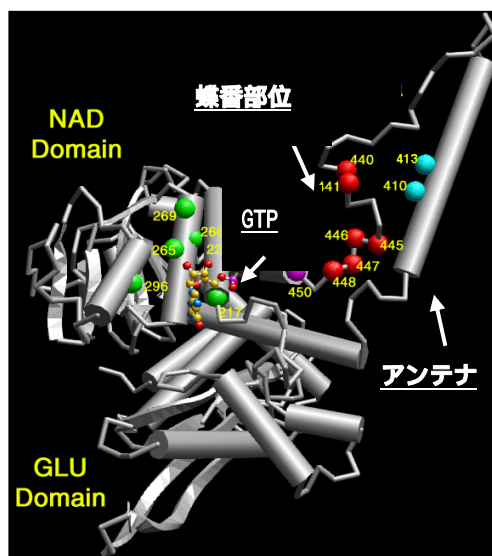
## 1. 研究開始当初の背景

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) インスリン血症の発症機構

変異 GDH cDNA 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  $Ca^{2+}$  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。



### (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、肝臓でのグルタミン酸の減少に伴いカルバミルリン酸合成酵素の活性化物質である N-アセチルグルタミン酸の産生障害や全身臓器でのグルタミン酸とアンモニアからのグルタミン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。

### (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、カルバミルグルタミン酸 (N-アセチルグルタミン酸のアナログ) や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。

## 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、GDH 活性上昇によって、臓器特異性に特徴ある症状にて発症する。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。

トランスジェニックマウスにおける GDH 遺伝子異常からのアンモニア産生と病態代謝をメタボローム解析にて検討する。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。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスジェニックマウスの作成

ヒト L413V 変異、chiken 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した。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)。

(2) 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。高アンモニア血症に最も関与する肝臓及び心臓、腎臓、脳についてメタボローム解析を行った。一晩絶食にした GDH 異常マウスとコントロールマウス各 3-4 匹について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。肝臓、心臓、腎臓、脳の各臓器を取り出し、迅速に液体窒素にて凍結後、メタボローム解析に供与した。各検体の重量 50 mg 当たり、内部標準物質 50  $\mu$ M を含んだ 500  $\mu$ L のメタノール溶液を氷冷下で加え、卓上型破砕機を用いて破砕 (1,500 rpm, 120 秒  $\times$  3 回) した。これに各検体に 500  $\mu$ L のクロロホルム及び 200  $\mu$ L の Milli-Q 水を加え攪拌し、遠心分離 (2,300  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分) をした後、水層を 150  $\mu$ L 分取し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50  $\mu$ L の Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

マウス各臓器について、キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施し、主要代謝物質 108 (カチオン 52, アニオン 56) に加え、アルギニノコハク酸及び N アセチルグルタミン酸について解析を行った。

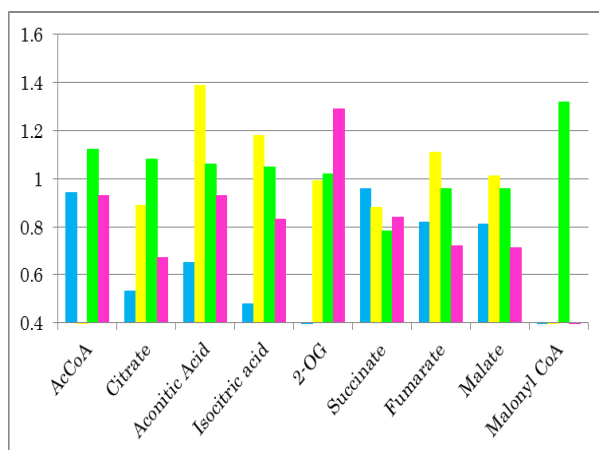


図1 GDH 異常の解糖系に与える影響  
縦軸は GDH 異常マウス/コントロールマウス比を示す。青色バーは肝臓、黄色バーは脳、緑色バーは心臓、赤色バーは腎臓での各物質の比を示す。

4. 研究成果

(1) ヒト L413V/GDH cDNA を導入したトランスジェニックマウスでは、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ったが、GTP による抑制効果は減少していた。随時行った血糖とアンモニアの検査ではそれぞれ軽度低下と上昇を認め、動物モデルとしての有用性を確認した。メタボローム解析では一晩絶食後のこの GDH ヘテロマウスでは低血糖、高アンモニア血症を生じなかった。マウスの活動は著明に低下していた。GDH ホモマウスでの検討も必要である。

(2) メタボローム解析では GDH 異常マウス/コントロールマウスの比にて GDH 異常の影響について検討した。図1に解糖系への影響を示した。肝臓、心臓では GDH 異常マウスでは全体的に低下傾向を認め、中でも G6P と G1P、F6P、6-PG と lactate、Ala で低下傾向が強い。脳では 3PG と 2PG が増加し、そのほか脳、腎では特異的な変化はない。

図2では TCA サイクルに与える影響を見ている。肝臓では TCA サイクルでの  $\alpha$ -オキシグルタル酸までの代謝産物の著明な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グルタミン酸から  $\alpha$ -オキシグルタル酸の産生増加のためと推定された。脳、心臓では著明な変化はなく、腎臓では  $\alpha$ -オキシグルタル酸の増加、succinic acid から malic acid までの代謝産物の抑制と citrate の減少が認められた。図3、4では GDH 異常のアンモニア代謝に関与するアミノ酸に与える影響を示している。肝臓では Arg 以外の尿素サイクルものは GDH 異常で低下しており、N-アセチルグルタミン酸はコントロールと差がなかった。脳と腎臓では尿素サイクル系アミノ酸、N-アセチルグルタミン酸はコントロールと差がなかった。心臓では Cit はコントロールの 0.68 と低下していたが、他の物質は 0.86-0.93 と著明な差はなかった。N-アセチルグ

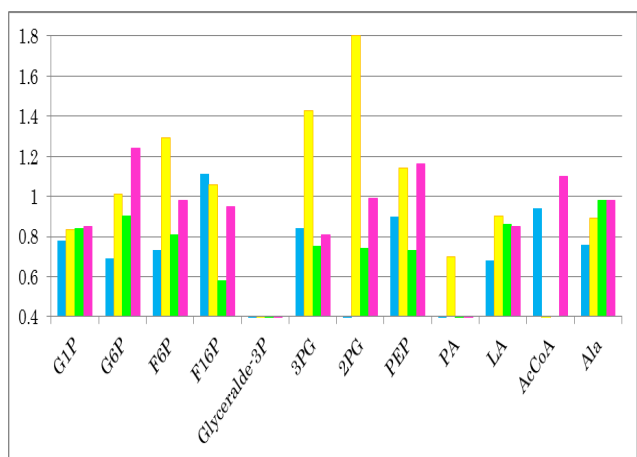


図2 GDH 異常の TCA サイクルに与える影響  
縦軸は GDH 異常マウス/コントロールマウス比を示す。青色バーは肝臓、黄色バーは脳、緑色バーは心臓、赤色バーは腎臓での各物質の比を示す。

ルタミン酸はいずれの臓器でもコントロールに比較して低下していなかった。グルタミン酸代謝に関して、肝臓ではグルタミン(Gln)量が GDH 異常で多く、Gln/グルタミン酸(Glu)比は 1.28 と増加していた。脳では Gln と Glu、 $\alpha$ -オキソグルタレートは変化がなかったが、Glu 量は他の臓器に比較して 2 - 5 倍の絶対量があった。心臓では逆に Glu 増加のために Gln/Glu は 0.72 と低下していた。腎臓では  $\alpha$ -オキソグルタレートは 1.29 と上昇していた。

図 5 に示すようにケトン体、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。肝臓、脳では ATP の絶対量の増加が認められており、また、肝臓では ATP/ADP の増加がある。一方、心臓、腎臓では ATP、ADP の絶対量が低下していた。

GDH 異常マウスのメタボローム解析では代謝の中心となる肝臓での変化が最も強く現れている。肝での糖質代謝では解糖系の低下、TCA サイクルでの  $\alpha$ -オキソグルタレートまでの代謝産物の抑制とその後の TCA サイクルの産生物質の増加が認められた。これは GDH 活性の機能亢進によりグルタミン酸から  $\alpha$ -オキソグルタレートへの産生増加のためと推定される。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ている。これは血糖維持とは無関係にインスリンの分泌異常のため、脳では糖質が利用

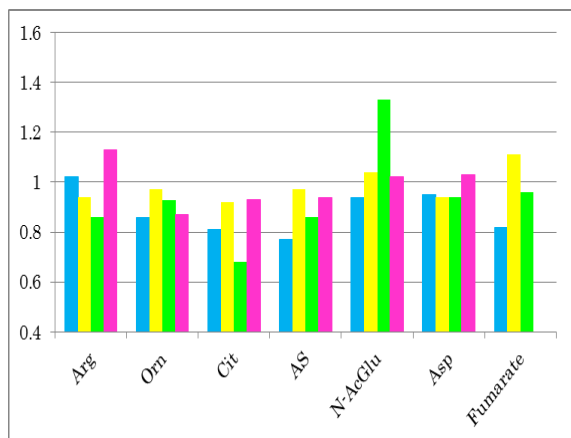
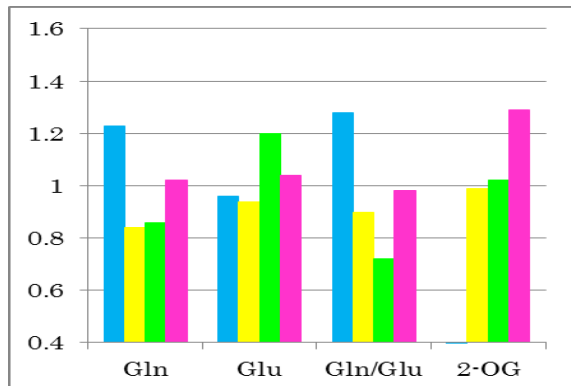


図 3、4 GDH 異常のアンモニア代謝に関するアミノ酸に与える影響  
縦軸は GDH 異常マウス/コントロールマウス比を示す。青色バーは肝臓、黄色バーは脳、緑色バーは心臓、赤色バーは腎臓での各物資の比を示す。

できず、肝臓でアセチル CoA から作られた 3-ヒドロキシ酪酸をエネルギー源として使用し、低血糖の影響を最小限にとどめている。アンモニア産生が増加しているために、Glu からアミノ基を 1 分子吸収して Gln への合成が盛んで、Gln/Glu 比の上昇がある。しかし、尿素サイクル系のアミノ酸ではアルギニンを除いて全体的に低下しており、その量の低下はアンモニア解毒能力の低下状態と推測される。また、これまで、GDH 異常症の高アンモニア血症の原因として、尿素回路の反応速度を律速しているカルバモイル酸シンターゼをアロステリックに活性化する N-アセチルグルタミン酸の濃度の低下が原因と推測されていたが、肝臓及び他の臓器においてもその低下は認められておらず、アンモニア高値は他の要因の可能性が高い。また、肝臓では脾臓と同様に ATP/ADP が増加している。他の臓器については肝臓ほど明確な変化は得られていない。しかしながら、高アンモニア血症の発症機序について非常に興味深い結果を得ることができた。

#### < 引用文献 >

- 1) Stanley CA et al, Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene, *N Engl J Med.* 338, 1998, 1352-7.
- 2) Fujioka H, Okano Y, et al. Molecular characterisation of glutamate dehydrogenase gene defects in Japanese patients with congenital hyperinsulinism/ hyperammonaemia. *Eur J Hum Genet.* 9, 2001, 931-7.
- 3) Kawajiri M, Okano Y, et al. Unregulated insulin secretion by pancreatic beta cells in hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: role of glutamate dehydrogenase, ATP-sensitive potassium channel, and nonselective cation channel. *Pediatr Res.* 59, 2006, 359-64.

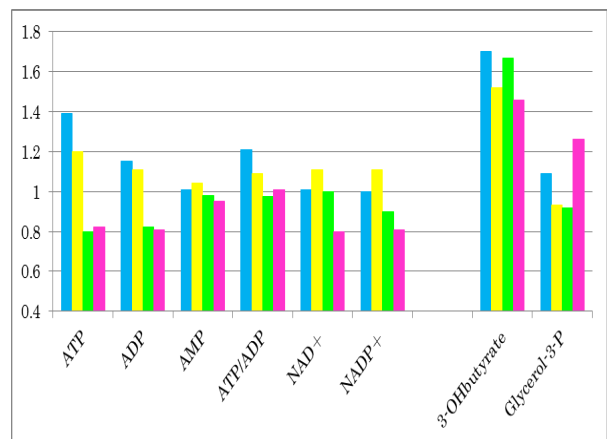


図 5 GDH 異常のエネルギー代謝とケトン代謝に与える影響  
縦軸は GDH 異常マウス/コントロールマウス比を示す。青色バーは肝臓、黄色バーは脳、緑色バーは心臓、赤色バーは腎臓での各物資の比を示す。

- 4) Li C, et al, Effects of a GTP-insensitive mutation of glutamate dehydrogenase on insulin secretion in transgenic mice. J Biol Chem. 281, 2006, 15064-72.
- 5) Aso K, Okano Y, et al, Spectrum of glutamate dehydrogenase mutations in Japanese patients with congenital hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome. Osaka City Med J. 57, 2011,1-9.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakano K, Kobayashi K, Okano Y, Aso K, Ohtsuka Y., Intractable absence seizures in hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. Pediatr Neurol. 47, 2012, 119-22. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.04.019. 査読有り

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 善行 (OKANO Yoshiyuki)  
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：60231213

### (2) 研究分担者

徳原 大介 (TOKUHARA Daisuke)  
大阪市立大学・医学(系)研究科・講師  
研究者番号：60448751

### (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

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