

厚生科学研究費 ヒトゲノム・再生医療等研究事業

平成13年度 研究報告書

新規遺伝子 (Ca-dependent mitochondrial solute carrier) の機能解析と
疾患発症の分子機構の解明ならびに遺伝子診断と治療法の開発

Annual Report of the Research on Human Genome,
Tissue Engineering Food Biotechnology
Health Sciences Research Grants
The Ministry of Health and Welfare of Japan 2001

平成 14 年 3 月

主任研究者 佐 伯 武 頼
(鹿児島大学医学部教授)

厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称： 厚生科学研究費

研究事業名： ヒトゲノム・再生医療等研究事業

研究課題名：新規遺伝子(**Ca-dependent mitochondrial solute carrier**)
の機能解析と疾患発症の分子機構の解明ならびに
遺伝子診断と治療法の開発

国庫補助金精算所要額 (円)： 35,000,000 円

研究期間 (西暦)： 1999年～2001年

研究年度 (西暦)： 2001年度

主任研究者名： 佐伯武頼 (鹿児島大学医学部)

分担研究者名： 小林圭子 (鹿児島大学医学部)

飯島幹雄 (鹿児島大学医学部)

Stephen W Scherer (University of Toronto, Canada)

目 次

1. 総括研究報告	-----	1
2. 研究業績（発表論文添付：一部 Abstract のみ）		
(1) Transplantation (2001)	-----	23
(2) Journal of Neurological Sciences (2001)	-----	26
(3) Human Genetics (2001)	-----	30
(4) Journal of Pediatrics (2001)	-----	34
(5) Journal of Pediatrics (2001)	-----	40
(6) Journal of Medical Genetics (2001)	-----	43
(7) Neurology (2001)	-----	45
(8) Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry (2001)	-----	46
(9) Advances in Enzyme Regulation (2001)	-----	54
(10) The EMBO Journal (2001)	-----	72
(11) Journal of Neurological Sciences (2001)	-----	82
(12) Transplantation (2001)	-----	83
(13) Molecular Genetics and Metabolism (2001)	-----	86
(14) 日本先天代謝異常学会誌 (2001)	-----	89
(15) 日本マス・スクリーニング学会誌 (2001)	-----	94
(16) 日本マス・スクリーニング学会誌 (2001)	-----	100
(17) Human Mutation (2002)	-----	105
(18) American Journal of Kidney Disease (2002)	-----	114
(19) Biochimica Biophysica Acta (2002)	-----	118
(20) Journal of Inherited Metabolic Disease (2002)	-----	127
(21) Metabolic Brain Disease (2002)	-----	128

総括研究報告

はしがき

本研究は、主任研究者（佐伯 武頼）と分担研究者（小林 圭子、飯島 幹雄、Stephen W Scherer）が中心となり、下記に示す数多くの研究者の方々ならびに研究機関の協力を得て、共同研究で遂行されたものである。鹿児島大学医学部生化学第一講座が主な研究組織であるため、この冊子にまとめた総括研究報告および研究業績をもって、平成 13 年度の成果報告書とする。

なお、平成 13 年度の研究業績として、論文発表ならびに口頭発表の概略をまとめ、末尾には一部印刷中を含めて掲載された論文のコピーを添付した。

研究協力機関ならびに研究協力者・共同研究者名（敬称略）

[鹿児島大学医学部]	安田 智嗣, 山口 直喜, 西 育美, Md Abdul Jalil, Laila Begum, 李 孟賢, 岩元 幸三, 堀内 正久, 牛飼 美晴, 田畑 文子, 高 宏志, 魯 耀邦, 中川 正法, 納 光弘, 宇宿 功市郎, 中河志朗
[Toronto 大学]	David S Sinasac, Lap-Chee Tsui
[Bari 大学]	Ferdinando Palmieri
[Madrid 大学]	Jorgina Satrustegui, Araceli del Arco
[愛媛大学衛生学]	近藤 郁子
[杏林大学薬理学]	遠藤 仁
[大阪市立大学第三内科]	河田 則文
[群馬大学第二外科]	笠原 群生, 大和田 進, 森下 靖雄
[群馬大学小児科]	友政 剛, 金子 浩章, 森川 昭廣
[東北大学小児科]	大浦 敏博, 飯沼 一字
[岩手県立中央病院]	虻川 大樹
[町立大河原病院]	田澤 雄作
[鳥取大学小児科]	村上 潤, 細田 淑人, 飯塚 俊之, 長田 郁夫
[広島大学内科]	丸山 博文, 小川 雅文
[Taiwan 大学]	Wuh-Liang Hwu
[福岡大学第五内科]	坪井 義夫, 藤野 泰祐, 山田 達夫
[信州大学第三内科]	池田 修一, 武井 洋一, 服部 健, 矢崎 正英
[信州大学第一外科]	橋倉 泰彦, 川崎 誠治
[岩手医科大学第一内科]	岩井 正勝, 佐藤 慎一郎, 鈴木 一幸
[鹿児島厚生連病院]	今村 也寸志, 田原 憲治, 窪菌 修

[名古屋市立大学小児科]	坂 京子, 和田 義郎
[Sant Joan 病院]	M Antonia Vilaseca
[琉球大学第三内科]	田名 毅, 東風平 勉, 大城 さおり
[徳島大学小児科]	内藤 悦雄, 伊藤 道德, 黒田 泰弘
[大阪市立大学小児科]	岡野 善行, 山野 恒一
[藤井寺市民病院]	玉森 晶子
[厚木病院内科]	伊藤 俊
[東京慈恵会医科大学]	松浦 知和
[岡山大学第一内科]	寺田 亮, 辻 孝夫
[久留米大学第二内科]	神代 龍吉
[防衛医科大学]	赤津 拓彦
[東京都立神経病院]	川田 明広
[京都大学移植外科]	木内 哲也, 小倉 靖弘, 伊藤 孝司, 田中 紘一
[神戸大学第二内科]	尹 聖哲
[紀南総合病院神経内科]	畑中 史郎
[松波総合病院]	松波 英寿
[国立国際医療センター]	正木 尚彦
[東京大学代謝内科]	富田 佐智子, 石橋 俊
[福山市民病院]	下江 俊成
[春日部秀和病院内科]	小野田 教高
[昭和大学第二内科]	竹内 義明
[東京大学移植外科]	渡辺 慶史, 松井 郁一
[太田西ノ内病院]	迎 慎二, 星 奈美子
[新潟大学脳研究所]	神田 健史, 小林 央
[高知医科大学第一内科]	岩崎 信二
[東京女子医科大学]	堀田 恭子
[久留米大学第一内科]	西村 靖子
[杏林大学神経内科]	近藤 公一
[春日部秀和病院]	小野田 教高
[自治医科大学内科]	小林 高久
[市立島田市民病院]	武藤 庫参
[西脇市立西脇病院]	高島 康弘
[神戸大学医学部]	松尾 雅文
[Westmead 子供病院]	Bridget Wilcken
[Shaare Zedek 医学 Center]	Orly N Elpeleg

[福井医科大学小児科]	畑 郁江, 重松 陽介, 眞弓 光文
[筑波大学小児科]	須磨崎 亮, 長谷川 誠
[津山中央病院小児科]	梶 俊策, 山下 麻理子
[京都大学小児科]	依藤 亨, 室井 純子
[大阪大学小児科]	田尻 仁, 古座岩 宏輔, 沢田 敦
[富山県立中央病院]	五十嵐 登
[久留米大学小児科]	芳野 信, 大和 靖彦
[茨城県立こども病院]	土屋 真紀, 泉 維昌
[千葉県こども病院]	高柳 正樹, 小川 恵美, 高橋 和浩, 秋岡 祐子
[君津中央病院]	村上 圭
[埼玉医科大学小児科]	大竹 明
[広島大学小児科]	佐倉 伸夫, 西村 裕, 宮河 真一郎
[川崎医科大学小児科]	松田 和之, 小林嘉一郎
[九州大学小児科]	井原 健二
[宗像医師会病院小児科]	大嶋 昭雄
[国立療養所西札幌病院]	長尾 雅悦
[小樽協会病院小児科]	森 俊彦
[八木小児科病院]	八木 恒夫
[三条小児科医院]	三条 雅英
[もりおかこども病院]	米沢 俊一
[市立秋田総合病院]	西宮 藤彦
[山形市立病院済生館]	坂本 美千代
[島根医科大学小児科]	山口 清次
[山形大学小児科]	早坂 清, 木村 敏之
[日光市民病院小児科]	佐々木 暢彦
[帝京大学小児科]	児玉 浩子
[千葉大学小児科]	小川 真司, 金澤 正樹
[日赤医療センター]	川上 義
[駿河台日本大学病院]	中林 啓記, 大和田 操
[横浜市立大学小児科]	今川 智之, 菊地 信行
[川崎市立川崎病院]	長 秀男, 後藤美和
[奈良県立医科大学]	福田 和由
[大阪母子医療センター]	吉村 文一
[関西医科大学小児科]	大橋 敦
[兵庫県立淡路病院]	中村 豊

[倉敷中央病院小児科]	亀山 順治, 河合 勇介
[熊本大学小児科]	三淵 浩, 遠藤 文夫
[福岡大学小児科]	広瀬 伸一
[都立墨東病院小児科]	橋本 祐至
[金沢医科大学小児科]	伊藤 順庸, 柿沼 宏明
[東海大学小児科]	篠原 治
[Los Angeles 子供病院]	Shoji Yano
[福島県立医科大学]	鈴木 重雄, 西原 正泰
[公立昭和病院神経内科]	鈴木 美紀, 内潟 雅信
[済生会熊本病院]	宮瀬 秀一
[芦北学園医療センター]	木村 昭彦
[三木市民病院小児科]	安島 英裕, 宅見 徹
[新潟大学第三内科]	市田 隆文
[県立奈良病院]	西久保 敏也
[牛久愛和病院小児科]	柏木 玲一, 斉藤 久子, 犬童 道治
[広島大学産婦人科]	三春 範夫
[九州大学生体防御研]	松田 貴雄
[Humboldt 大学]	Eberhard Moench
[Innsbruck こども病院]	Daniela B Skladal
[Jena こども病院]	Joerg Seidel
[Necker こども病院]	Jean-Marie Saudubray
[Genova こども病院]	Roberto Cerone
[Tubingen 大学]	Friedrich Karl Trefz
[Hacettepe 大学]	Serap Kalkanoglu
[Stanford 大学]	Kim Hart
[München 大学]	Ania Muntau
[Brussel 大学小児科]	Sara Seneca
[McMaster 大学]	Susan Zeesman
[Gazi 大学病院小児科]	Fath Suheyl Ezgü
[Florence 大学小児科]	Maria Luisa Giovannucci Uziell
[Saint 病院 France]	Caroline Sevin
[Friedrich Alexander 大学]	Ina Knerr
[Barcelona 中央大学]	Margarita Rodes
[Hippocraton 病院]	Persephone Augoustides-Savvopoulou
[Nijmegen 大学]	Wim Ruitenbeek

1. 研究目的

尿素サイクル酵素 argininosuccinate synthetase (ASS) の欠損は、シトルリン血症を引き起こす。ASS 遺伝子 (染色体 9q34) の異常に基づく古典型シトルリン血症 (CTLN1) とは異なり、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) は、肝臓特異的 ASS 蛋白の低下をきたすが、ASS 遺伝子に異常は認められず、その原因遺伝子は長年不明であった。我々は、homozygosity mapping と positional cloning により、CTLN2 の責任遺伝子として新規遺伝子 SLC25A13 (染色体 7q21.3) を同定し、Ca-binding mitochondrial solute carrier に属する遺伝子産物を citrin と命名した (Kobayashi et al. Nature Genetics 22: 159-163, 1999)。

本研究の目的は、(1) citrin ならびにその類似蛋白である aralar の機能および生理的役割を解明する、(2) それら蛋白の異常によって生じる病態を把握し、疾患発症の分子機構を明らかにする、(3) 迅速で確実な診断法を確立する、さらに、(4) 有効な治療法および予防法を開発する、ことを目指すものである。特に CTLN2 は本邦で発症者数の多い予後不良の難病であるため、その成果は、医学水準の向上をもたらし、社会に貢献するところ大である。

2. 研究方法

1) Citrin ならびに aralar の機能解析

Ferdinando Palmieri ら (イタリア) と Jorgina Satrustegui ら (スペイン) との共同研究によって、Ca-binding mitochondrial solute carrier protein としての機能解析を行なった。主な方法としては、citrin あるいは aralar の recombinant 蛋白をリポソームに組み込んだミトコンドリア膜再構築系を利用し、各種代謝中間体を基質にして輸送活性を測定した。

2) マウスにおける遺伝子発現および疾患モデルマウスの作成

マウス citrin, aralar, urea cycle 関連酵素 cDNA をプローブに用いた Northern blot 解析、ならびに各種特異抗体を用いた Western blot 解析によって、発現の組織分布の違い、成長に伴う変化、食餌条件の違いによる変化などを検討した。

一方、citrin および aralar 挿入変異マウスの genotype を確定するため、genomic DNA-PCR による遺伝子診断法を確立した。Homologous recombination の手法を用いて作成した citrin ノックアウト (KO) マウスも含めて、3 種のマウスにおける遺伝子発現の異常を、mRNA ならびに蛋白レベルで検討した。

3) 高アンモニア血症の診断とシトルリン血症の病態解析

本邦には、5つの尿素サイクル酵素の活性を測定できる施設がなく、我々は基礎医学講座であるが、全国の医療機関から依頼を受け、高アンモニア血症の酵素学的診断を20数年来継続して行なってきた。特に、シトルリン血症では、CTLN2とCTLN1を確実に鑑別診断する必要があり、また国内外の医療機関から解析依頼があるため、CTLN1についても酵素学的診断およびASS遺伝子の変異解析と遺伝子診断を実施した。

4) SLC25A13 遺伝子の変異解析と遺伝子診断

CTLN2患者のSLC25A13遺伝子上で、すでに同定している7種の既知変異に対する遺伝子診断は、PCRと制限酵素切断を組合せた方法に従って行なった。未知(新規)変異の解析は、RT-PCRあるいはゲノムDNA-PCRによって増幅したcDNAやDNA断片の塩基配列決定により行なった。Messenger RNA(cDNA)上で見いだした変異は、ゲノムDNA上での異常を明らかにし、遺伝子診断法を確立した。

5) 変異遺伝子の検索とスクリーニング法の開発

すでに確立した遺伝子診断法を用いて変異遺伝子の頻度検索を行なうと同時に、一方では大量のサンプルを処理するために、GeneScan/SNaPshot法を利用した変異遺伝子のマルチ検出システムを開発した。Citrin欠損症の患者とその家族さらに健常者における遺伝子検索では、後述する倫理的配慮に従って文書による同意を得た後、主に血液細胞から抽出したDNAを用いた。

[倫理面への配慮]

本研究を遂行するに際し、鹿児島大学医学部倫理委員会に申請した研究課題「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」(申請代表者:佐伯武頼)は、平成12年1月25日に承認された。申請書類等の詳細は平成11年度の厚生科学研究報告書に掲載したが、それに基づいて、個人の人権擁護とインフォームドコンセントの確保を心掛けた倫理的配慮を行なった。各医療機関からの診断依頼がほとんどであるので、主治医に対して説明文書を配付し、被験者に遺伝子検査の内容を充分理解して頂いた上で実施した。さらに、各医療施設における倫理委員会に対しても、遺伝子検索の承認手続きが諮られている。

なお、動物実験にあたっては、鹿児島大学医学部動物実験施設の規則に従って実施した。

3. 結果と考察

1) Citrin と aralar は aspartate glutamate carrier (AGC) である

SLC25A13 遺伝子はヒト第 7 染色体 7q21.3 にあり、その遺伝子産物 citrin の欠損症は新生児期に NICCD (詳細は後述する) を、成人で CTLN2 を発症する。一方、alarar をコードする SLC25A12 遺伝子はヒト第 2 染色体 2q24 に座位するが、その遺伝子異常に起因する aralar 欠損症の疾患名はまだ知られていない。両蛋白は、アミノ酸配列で 77.8% の identity を示し、N-half 領域に 4 個の EF-hand motif を持ち、C-half 領域に 6 回の膜貫通 domain が存在する。我々は、ミトコンドリア膜輸送体の研究では世界をリードする Ferdinando Palmieri らのグループと、alarar を単離した Jorgina Satrustegui らのグループと共同研究を行なった。その結果、ミトコンドリア内膜に局在する両蛋白が、ミトコンドリア内外での物質 (アスパラギン酸とグルタミン酸) の交換反応を触媒する aspartate glutamate carrier (AGC) であること、AGC 活性はカルシウムにより活性化されることを明らかにした¹⁰⁾。

2) AGC の機能と生理的役割

AGC の代表的な機能としては 2 つあり、① 肝臓での尿素合成過程、細胞質に局在する ASS 反応において、ASS の基質であるアスパラギン酸を供給する重要な役割を担う。また一方、② AGC は、malate aspartate shuttle の構成メンバーであり、解糖系など細胞質で生成した NADH などの還元当量をミトコンドリアに輸送し、エネルギー代謝に関わり、蛋白質・アミノ酸・糖質・脂質などの代謝の要にある。

一方、ヒト組織においてすでに報告したように、citrin は肝臓を中心に、腎臓や心臓など比較的 ubiquitous に発現するが、alarar は骨格筋、脳、心臓など限局した発現パターンを示す。このことは、Northern blot ならびに Western blot 解析により、マウスにおいても確認することができた。さらに、citrin が新生児期の小腸に発現していること、また aralar が腎臓で発現していることを見いだした。一方、ヒトでもマウスでも、肝臓には aralar の発現が認められない。このことは、肝臓特異的疾患である citrin 欠損症において重要な意味を持つと考える。

我々は、AGC の機能解析を目的に、yeast two hybrid system を用いて、EF-hand motif を含む N-half 領域および C-末端膜外部領域と相互作用する蛋白の検索を行っている。ヒト肝臓由来の cDNA ライブラリーから、いくつかの候補クローンが得られている。それらは、protein kinase C の Ca^{2+} 作用を調節する蛋白および酸化還元に関与する蛋白であり、さらに詳細な解析を行っている。

3) ヒト疾患モデルマウスの作成

カナダのグループ (David Sinasac と Stephen Scherer ら) との共同研究により作成した citrin-KO マウス、アメリカの Lexicon Genetics 社と共同研究している citrin および aralar 挿入変異マウスは、いずれも鹿児島大学医学部動物実験施設内において誕生しており、我々は現在病態解析と繁殖維持管理に努めている。Citrin-KO マウスならびに citrin 挿入変異マウスともに、遺伝子診断法を確立し、容易に genotype を区別することができる。Northern blot ならびに Western blot 解析により、両マウスともに citrin mRNA と citrin 蛋白が欠損することを確認しているが、まだ顕著な症状はあらわれていない。一方、alarar 挿入変異マウスは、マウス Slc25a12 遺伝子の情報が不十分であったため、genotyping の開発に時間を要したが、ごく最近遺伝子診断が可能になった。Aralar 変異ホモ接合体は、他のマウスと比較して、外見上 phenotype に違いが認められる。従って、まだ知られていないヒト疾患を解明する上で、alarar 挿入変異マウスを用いた今後の解析は大いに期待できる。

4) CTLN2 の新生児期病態：NICCD の発見

これまで CTLN2 の所見には、新生児小児期での顕著な症状やエピソードはほとんど記載されていなかった。SLC25A13 遺伝子の発見と変異遺伝子診断法の確立は、citrin 欠損症において新たな展開をもたらした。ある種の特発性新生児肝炎を呈する症例において CTLN2 で同定した SLC25A13 変異が認められ^{3,5)}、CTLN2 の新生児期症状の発見につながった。この新生児肝炎に見られる症状は成人で発症した CTLN2 病態とは異なっており、症例の多くが肝内胆汁うっ滞性黄疸を示すことから、我々はこの新生児期病態を NICCD (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency) と名づけた^{3,17)}。

5) NICCD の多彩な症状と代償機構

我々は、2000 年のはじめに NICCD を発見し、同年秋に学会発表を行ない、論文に報告した^{3,5)}。それ以来、SLC25A13 変異遺伝子の診断依頼が急増した。その理由は、NICCD の症状が多彩である(後述)ことに起因すると考えられる。我々は多くの小児科グループとの共同研究により、NICCD の可能性を検討するために、この 2 年間で 150 例の新生児小児例における遺伝子検索を行なった。現在までに、両 allele に SLC25A13 変異が存在したホモ接合体は 61 例、1 つの allele にのみ変異が存在した症例は 9 例、残りの症例では既知変異は存在しないという結果を得ている。現段階で既知変異が negative であっても、未知変異が

存在する可能性を否定することはできない。今後、SLC25A13 遺伝子上で新規変異を同定すべき症例かどうかの判断を行なうためにも、NICCD の臨床像を確立していく必要がある。

予備的試みではあるが、2001 年 12 月、大浦ら（東北大学）の協力を得て、これまで我々が遺伝子診断を行なってきた 50 施設（150 症例）にアンケート調査を依頼した。変異の有無に関わらず 150 例すべてを調査することは、NICCD を他疾患と鑑別診断する上で、非常に重要であると考えた。2002 年 2 月までの段階で、32 施設（70 症例）から回答が得られている。その中には既知変異 negative の症例も含まれているが、ここでは変異ホモ接合体症例 45 例について、検査所見の一部を表にまとめた。

表. Some biochemical data in 45 NICCD patients showed homozygote of SLC25A13 mutation.

	Control	NICCD		Control	NICCD
TB	0.3-1.2	6.9 ± 3.4 (n=45)	Cit	17-43	435 ± 366 (n=39)
DB	0.0-0.3	3.5 ± 1.8 (n=42)	Arg	54-130	235 ± 134 (n=36)
TBA	1.3-9.0	259 ± 105 (n=36)	Met	19-40	280 ± 247 (n=38)
TP	6.7-8.4	4.9 ± 0.8 (n=40)	Tyr	40-90	220 ± 179 (n=38)
Alb	4.0-5.0	3.3 ± 0.6 (n=35)	Thr	67-190	605 ± 329 (n=38)
NH ₃	30-85	109 ± 46 (n=32)	Ser	72-160	244 ± 123 (n=37)
Glc	70-110	69 ± 29 (n=21)	Thr/Ser	1.17 ± 0.13*	2.6 ± 0.8 (n=37)
AFP	<20	167000 ± 108000 (n=18)			

TB, total bilirubin (mg/dl); DB, direct bilirubin (mg/dl); TBA, total bile acid (μmol/l); TP, total protein (g/dl); Alb, albumin (g/dl); NH₃, ammonia (μg/dl); Glc, glucose (mg/dl); AFP, α-fetoprotein (ng/ml); Cit, citrulline; Arg, arginine; Met, methionine; Tyr, tyrosine; Thr, threonine; Ser, serine (each nmol/ml); *Thr/Ser ratio in control (see Saheki et al. J Clin Biochem Nutr 1:129-142, 1987).

NICCD 症状は一過性であり、検査所見データも年齢あるいは症例によって変化する。表にまとめた数値に関して、変異ホモ接合体 45 症例のデータは測定された時期（生後 10 日齢から 8 ヶ月齢）が異なっている点を、考慮する必要がある。また、control の値は一般検査施設のものを使用しているため、年齢に応じた値を参考にすべきである。

NICCD 症状は、肝内胆汁うっ滞や黄疸遅延の他に、低蛋白血症、凝固異常、多種アミノ酸血症（シトルリン、メチオニン、チロシン、スレオニンなど）、ガラクトース血症、低血糖、脂肪肝、肝線維化など非常に多彩である^{3-5,15-17,20}。発見の契機は、新生児マススクリーニング検査の異常、軽度の肝機能検査異常、黄疸遅延など様々である（研究業績の論文および口頭発表参照）。一方、大浦らの記載¹⁶にあるように、検査所見の異常値はすべての項目で同じように推移するとは限らないので、注意を要する。ほとんどの場合、多彩な症状は一過性であり、1歳前後で消失する。しかし、NICCD と遺伝子診断した 70 例の中には、分類不能型チロシン血症と診断され、肝不全をきたし、生後 10 ヶ月前後で肝移植手術を受けている症例が 3 例も存在しており、citrin 欠損症の複雑さを痛感している。

ほとんどの NICCD 症例が自然治癒することから、citrin の AGC 機能不全を補うために、何らかの適応・代償機構（グリセロリン酸シャトルなど）が作動していることが推測される。見かけ上健康に過ごし、10 数年～数 10 年を経て、代償機構の破綻および何らかの現在不明の機構（肝 ASS 蛋白の低下も含めて）によって、CTLN2 を発症すると考えている^{14,15,21}。

6) SLC25A13 変異遺伝子のマルチ診断法の確立と頻度検索

Citrin 欠損症 (CTLN2 ならびに NICCD) 患者の SLC25A13 遺伝子を解析し、7 種の既知変異：[I] 851del4、[II] IVS11+1G>A、[III] 1638ins23、[IV] S225X、[V] IVS13+1G>A、[VI] 1800ins1 (R600X)、[VII] R605X に加えて、現在までに、8 種の新規変異あるいは多型：[VIII] E601X、[IX] E601K、[X] IVS6+5G>A、[XI] R184X、[XII] T546M、[XIII] P632L、[XIV] IVS6+1G>C、[XV] Exon 15 repeat を同定した。これらのうち、アミノ酸置換については、ミスセンス変異かあるいは多型かを検討する必要がある。また、イントロン上での塩基置換は splicing 異常を起すのかどうかを mRNA 上で解析する必要がある、今後の課題である。

上記の変異（多型）のうち、変異頻度が高いことが予想される 9 種に対して、マルチ遺伝子診断を確立した¹⁷。サイズの違いを利用した GeneScan 法により、欠失あるいは挿入変異 ([I], [III], [VI]) を同時に検出した。一方、一塩基置換変異は、SNaPshot 法を利用した方法で、3 種ずつ ([II], [IV], [V]) または ([VII], [VIII], [IX]) を同時に診断した。

マルチ診断法を用いて、これまで酵素学的に診断してきた約 150 例の CTLN2 症例のうち、120 例において遺伝子検索を行なったところ、240 allele 中 90% に 9 種の変異が存在するを見いだした。その結果、CTLN2 が SLC25A13 遺伝子の異常に基づく疾患であり、これまで我々が築いてきた CTLN2 の判定基準

が間違っていなかったことが確認・証明でき、一疾患概念の樹立につながった。我々は、この20数年間に約150例（年に6～7例）のCTLN2症例を解析・診断してきた。それに対して、発見以来2年程度の短期間で診断したNICCD症例は70例を超え、数の多さに驚いている。しかし、現在までに同定している変異では、まだ完全にcitrin欠損症を診断することができないので、今後さらに変異を同定する必要がある。CTLN2ならびにNICCD症例いずれの場合も、2種（[I]と[II]）の変異が高頻度（80%）に存在した¹⁷⁾。

一方、健常者1372人の遺伝子検索で20人のヘテロ接合体（保因者）を認め、SLC25A13変異遺伝子頻度が本邦において高いことを見いだした。この保因者の割合（1/70）から計算すると、一般集団における変異ホモ接合体の頻度は1/20,000となり、CTLN2の発症率（1/100,000）と比べて、大きな開きがある。この違いを説明することは容易ではない。CTLN2症例が、てんかん、精神分裂病、うつ病などと診断されていることも少なくないので、誤診の可能性は充分考えられる。また、患者の同胞や家族に健康な変異ホモ接合体を認めたこと、さらに79歳で発症したCTLN2患者が存在することなどから、発症しない可能性もある。NICCD症例に男女差は認められないが、CTLN2症例での男女比は80：40であり、男性症例が有意に多い。CTLN2の発症には何らかの遺伝要因、あるいは性ホルモンの影響も含め環境因子の関与が示唆される。

7) Citrin欠損症の世界的拡がり

これまでに解析され、報告されたcitrin欠損症の大部分は日本人症例である。SLC25A13遺伝子の発見後、諸外国グループとの共同研究が増えつつある。CTLN2が疑われた中国人症例2例の遺伝子解析を行ない、日本人と同じ変異を同定した⁶⁾。また、オーストラリアに住むベトナム人の新生児症例に、日本人症例と同じ変異を見だし、NICCDと診断した（Lee et al. 学会発表 Hum Genet Soc Australasian 2001, 論文作成中）。ごく最近、パレスチナ人のNICCD症例において、日本人症例には見られない新規のSLC25A13変異を同定した（Elpeleg et al. 論文作成中）。これらの事実は、citrin欠損症が日本に限定された疾患でないことを示しており、少なくとも東アジア諸国には日本と同じ変異があり、患者は広範に存在することを示唆している。現在、研究課題「既採取ヒト由来試料をSLC25A13遺伝子変異の検索に利用する研究」（主任研究者：佐伯武頼）を、鹿児島大学医学部倫理委員会に倫理審査の申請を行なっているので、承認が得られ次第、台湾、中国、韓国におけるSLC25A13変異の遺伝子検索を実施する予定である。

8) Citrin 欠損症の治療

NICCD 症例は全くの自然治癒例も存在するが、新生児肝炎の治療法に準じて行なわれているようである。胆汁酸分泌不全により消化管での脂肪の吸収低下、それに伴う脂溶性ビタミン欠乏、脂肪便、体重増加不良を認める患児も少なくないので、特にビタミン K 欠乏による出血、D 欠乏によるくる病を予防することが重要である、と大浦らは指摘している¹⁶⁾。また、体重増加不良例に対しては吸収の良い中鎖脂肪酸含有特殊ミルクを使用し、ガラクトース血症例に対しては乳糖除去ミルクを用いる必要があると記載している。しかし、前述したように、乳児期に肝移植を必要とした重症例も存在するので、citrin の AGC としての機能から治療法を検討していく必要がある。

それに対して、CTLN2 では症状も重篤であり、発症後急激な進行で死に至る場合も多いため、有効な治療法として、これまでに 22 症例に肝移植が適用された^{1,8,14,15,21)}。そのうち 20 例は生体部分肝移植であり、ドナー候補の検討には、従来、血液生化学検査と同時に生検肝を行ない、肝 ASS 活性が低下していないことを確認していた。SLC25A13 変異遺伝子診断が可能になって、比較的侵襲の少ない方法（採血）で、正確な判断が得られるようになった。しかしながら、結果として、CTLN2 を発症していない変異ホモ接合体の同胞を検出することにもつながる可能性もあるため、カウンセリング体制の充実を強化し、倫理面を十分に配慮した上で実施されるべきであると考ええる。

肝移植は高額な医療費を必要とし、さらにドナーを誰にするかという問題も生じる。Citrin の機能が AGC であるということが明らかになったので、新しい概念に基づく治療・予防法を開発できる可能性が考えられるようになってきた。さらに、欠損マウスも誕生しているので、疾患モデルマウスとしての樹立を行なった上で、内科的治療法の開発と同時に遺伝子治療も検討する必要があると考えている。

9) CTLN2 の複雑な病態把握

CTLN2 は、疾患名のように、成人（11 歳～79 歳：多くは 20 歳～40 歳代）で突然に、異常行動、失見当識、意識障害などの精神神経症状が出現し、気づかれてきた。肝臓特異的 ASS 蛋白の低下により、血清中のシトルリンならびにアルギニンが上昇し、しばしば高アンモニア血症を伴う。さらに、ピーナッツや大豆などの豆類、卵、魚肉類のような蛋白性食品を好み、米飯や甘いものなどの糖質類を嫌う、特異な食癖が見られる。一方、CTLN2 の症状も複雑であり、膵炎、肝癌、あるいは高脂血症などとの合併症と記載されている症例も少なく、まだまだ解明すべき問題が多い疾患である^{1,2,6-8,11,14,15,18,20)}。

肝臓特異的疾患であることは、肝 ASS 蛋白の低下と特異な組織分布、肝 PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor) の発現亢進、脂肪肝、肝線維化などの特徴に加え、肝移植治療が著効を示していることで証明された。脳に不可逆的な器質的障害を残す以前に手術を行えば、手術後直ちに社会復帰できる^{1,8)}。肝移植後、術前 (CTLN2 発症時) に見られた血液生化学検査の異常所見はもちろん、精神神経症状も含めてすべて正常化したことは驚きであり、肝臓における citrin の AGC としての機能が非常に重要であることを示唆している。

一方、予後不良のため死の転帰となった症例も多く、CTLN2 発症症例から、発症以前の情報を収集することは困難である。そこで我々は、臨床施設の協力ならびに肝移植 CTLN2 症例の同意を得て、アンケート調査を実施した。ごく最近の手術例を除き、16 施設 (18 症例) に依頼し、15 施設 (17 症例) から回答が寄せられた。CTLN2 症例は発症年齢が高いため、残念ながら、新生児乳児期の症状やエピソードなどの詳細な情報は得られなかったが、少なくとも 2 例においては乳児性肝炎を呈したことが記載されていた。また、全員において、CTLN2 特有の蛋白性食品を好み糖質を嫌う食癖は消失し、米飯や麺類さらには甘いまんじゅうも好むようになった。また、嫌いであった炭酸飲料も好きになり、飲めなかったアルコールも少々飲めるようになっている。肝移植前後における食生活の変化は劇的であり、興味ある知見が得られている。

1 0) 高アンモニア血症の診断と CTLN1 解析

日本において、尿素サイクル酵素の活性を測定する施設がないため、我々は全国の臨床施設から依頼を受けて、引き続き高アンモニア血症の酵素学的診断を行なっている。その中でも特に、ASS 遺伝子の異常に基づく CTLN1 では、国内の臨床施設のみならず諸外国からも依頼があり、遺伝子解析と診断を実施してきた^{12,13)}。これまでに 90 例を超える CTLN1 症例を解析し、ASS 遺伝子上に 50 種近くの変異を明らかにしてきた。これらの解析は、citrin 欠損症を鑑別診断する上で非常に役立っている。

4. 結論

1999 年に本研究を開始し、平成 11 年度には、CTLN2 が citrin 欠損症であることを証明し、一疾患概念の樹立 (OMIM #603471) に至った。当初の研究計画では予想もしなかったことであるが、平成 12 年度には、ある種の新生児肝炎が SLC25A13 遺伝子の異常に起因することを見だし、CTLN2 の新生児期症状

の発見につながる結果を得た。平成 13 年度には、(1) 多くの症例を解析し、CTLN2 の病態とは異なるこの新生児期の病態を、NICCD (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency; OMIM #605814) と名づけた。さらに、機能解析では、(2) citrin および aralar が aspartate glutamate carrier (AGC) であることを明らかにした。また、(3) 2 種の citrin 欠損マウス (ノックアウトマウスと挿入変異マウス) ならびに aralar 変異 (挿入) マウスも誕生し、病態解析を行なっている。

Citrin 欠損症は、新生児期 (誕生から 1 歳前後) に NICCD 症状を呈し、適応現象や代償機構が働き、見かけ上健康に過ごす。その後 10 数年～数 10 年の間に代償機構の破綻やあるいは何らかの機構に障害をきたした場合に、重篤な CTLN2 を発症すると考えている。この適応・代償機構、代償不全機構、さらには CTLN2 の発症誘発因子が解明できれば、我々が目指していること「遺伝性疾患だから治療できる、発症の予防ができる」「早期診断により、豊かな QOL を得ることができる」が可能になる。今後、国内外の多くの臨床施設と共同研究を行ない、早急にこれらの機構解明と病態発症に関わる要因を明らかにする必要がある。また同時に、新生児小児期および成人期に診断した変異ホモ接合体 CTLN2 未発症者の詳細な経過観察とフォローアップも重要な課題であると考えている。

研究業績

A. 論文発表 (2001～2002)

- [1] Kasahara M, Ohwada S, Takeichi T, Kaneko H, Tomomasa T, Morikawa A, Yonemura K, Asonuma K, Tanaka K, Kobayashi K, Saheki T, Takeyoshi I, Morishita Y. Living-related liver transplantation for type II citrullinemia using a graft from heterozygote donor. **Transplantation** 70: 157-159 (2001)
- [2] Maruyama H, Ogawa M, Nishio T, Kobayashi K, Saheki T, Sunohara N. Citrullinemia type II in a 64-year-old man with fluctuating serum citrulline levels. **J Neurol Sci** 182: 167-170 (2001)
- [3] Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Nishi I, Abukawa D, Sakamoto O, Inuma K, Saheki T. Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. **Hum Genet** 108: 87-90 (2001)

- [4] Tazawa Y, Kobayashi K, Ohura T, Abukawa D, Nishinomiya F, Hosoda Y, Yamashita M, Nagata I, Kono Y, Yasuda T, Yamaguchi N, Saheki T. Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia. **J Pediatr** 138: 735-740 (2001)
- [5] Tomomasa T, Kobayashi K, Kaneko H, Shimura H, Fukusato T, Tabata M, Inoue Y, Ohwada S, Kasahara M, Morishita Y, Kimura M, Saheki T, Morikawa A. Possible clinical and histologic manifestations of adult-onset type II citrullinemia in early infancy. **J Pediatr** 138: 741-743 (2001)
- [6] Hwu W-L, Kobayashi K, Hu Y-H, Yamaguchi N, Saheki T, Chou S-P, Wang J-H. A Chinese adult-onset type II citrullinemia patient with 851del4/1638ins23 mutations in SLC25A13 gene. **J Med Genet** 38: E23 (2001)
- [7] Tsuboi Y, Fujino Y, Kobayashi K, Saheki T, Yamada T. High serum pancreatic secretory trypsin inhibitor before onset of type II citrullinemia. **Neurology** 57: 933 (2001)
- [8] Ikeda S, Yazaki M, Takei Y, Ikegami T, Hashikura Y, Kawasaki S, Iwai M, Kobayashi K, and Saheki T. Type II (adult-onset) citrullinaemia: clinical pictures and the therapeutic effect of liver transplantation. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 71: 663-670 (2001)
- [9] Iijima M, Jalil MA, Begum L, Yasuda T, Yamaguchi N, Li MX, Kawada N, Endou H, Kobayashi K, Saheki T. Pathogenesis of adult-onset type II citrullinemia caused by deficiency of citrin, a mitochondrial solute carrier protein: tissue and subcellular localization of citrin. **Adv Enzyme Regul** 41: 325-342 (2001)
- [10] Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, del Arco A, Kobayashi K, Iijima M, Runswick MJ, Walker JE, Saheki T, Satrustegui J, and Palmieri F. Citrin and aralar1 are Ca²⁺-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. **EMBO J** 20: 5060-5069 (2001)
- [11] Maruyama H, Ogawa M, Nichio T, Kobayashi K, Sunohara N. Citrullinemia type II in a 64-year-old man with fluctuating serum citrulline levels: mutations in the SLC25A13 gene. **J Neurol Sci** 193: 63 (2001)

- [12] Ban K, Sugiyama N, Sugiyama K, Wada Y, Suzuki T, Hashimoto S, Kobayashi K. A pediatric patient with classical citrullinemia who underwent living related partial liver transplantation. **Transplantation** 71: 1495-1497 (2001)
- [13] Vilaseca MA, Kobayashi K, Briones P, Lambruschini N, Campistol J, Tabata A, Alomar A, Rodes M, Lluich M, and Saheki T. Phenotype and genotype heterogeneity in Mediterranean citrullinemia. **Mol Genet Metab** 74: 396-398 (2001)
- [14] 佐伯武頼. 日本先天代謝異常学会賞受賞論文：成人発症 II 型シトルリン血症研究の現状とこれから. 日本先天代謝異常学会雑誌 17: 29-33 (2001)
- [15] 小林圭子, 佐伯武頼. Citrin 欠損症 (基礎) : SLC25A13 遺伝子変異がもたらす疾患とその病態. 日本マス・スクリーニング学会誌 11: 17-22 (2001)
- [16] 大浦敏博, 虻川大樹, 相川純一郎, 坂本 修, 飯沼一字, 田澤雄作, 小林圭子, 佐伯武頼. Citrin 欠損症 (臨床) : 新生児マススクリーニングを契機に発見された citrin 欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症: 9 症例の臨床像の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌 11: 23-27 (2001)
- [17] Yamaguchi N, Kobayashi K, Yasuda T, Nishi I, Iijima M, Nakagawa M, Osame M, Kondo I, Saheki T. Screening of *SLC25A13* mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis method for nine mutations. **Hum Mutat** 19: 122-130 (2002)
- [18] Oshiro S, Kochinda T, Tana T, Yamazato M, Kobayashi K, Komine Y, Muratani H, Saheki T, Iseki K, Takishita S. A patient with adult-onset type II citrullinemia on long-term hemodialysis: reversal of clinical symptoms and brain MRI findings. **Am J Kidney Dis** 39:189-192 (2002)
- [19] Begum L, Jalil MA, Kobayashi K, Iijima M, Li MX, Yasuda T, Horiuchi M, del Arco A, Satrustegui J, Saheki T. Expression of three mitochondrial solute carriers, citrin, aralar1 and ornithine transporter, in relation to urea cycle in mice. **Biochim Biophys Acta** (2002) in press
- [20] Naito E, Ito M, Matsuura S, Yokota I, Saijo T, Ogawa Y, Kobayashi K, Saheki T,