

201024146A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

高グリシン血症の実態把握と治療法開発に関する研究

(H22-難治-一般-091)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吳 繁夫

平成 23 年 (2011年) 3月

目 次

I. 総合研究報告		
高グリシン血症の実態把握と治療法開発に関する研究		
呉 繁夫	-----	7
II. 分担研究報告		
高グリシン血症の新しい診断基準の使用経験		
呉 繁夫	-----	13
高グリシン血症の新しい診断基準	-----	17
タンデムマスによる高グリシン血症の新生児スクリーニング		
大浦敏博、山口清次、遠藤文夫、花井潤師	-----	19
モデルマウスを用いた高グリシン血症の新しい治療法の開発		
松原洋一、呉 繁夫	-----	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
VI. 研究成果の刊行物・別刷	-----	29

I . 総括研究報告

「高グリシン血症の実態把握と治療法開発に関する研究」

研究代表者 呉 繁夫 東北大学・大学院医学研究科・准教授

研究要旨

高グリシン血症は、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を特徴とし、「グリシン脳症」とも呼ばれる小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症の一つである。本症の多くは新生児期に発症し、水頭症や脳梁欠損などの脳形成異常を高率に合併する。現在、未解決の問題は、1) 患者数が不明。2) 有効な治療法が未確立で予後が悪い、の2点である。患者数把握のため、平成21～22年度に渡り新生児8万症例以上の血中グリシン濃度を測定し、その濃度分布を明らかにした。次に、治療法開発の目的でGCS活性を全く欠くノックアウト・マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症(NTD)など、種々の脳形成異常が発生した。GCSは葉酸代謝に関与するため、妊娠マウスに葉酸やその代謝物の投与実験を行ったところ、葉酸代謝産物の本症治療における有効性。その結果、メチオニンを投与すると脳形成異常の発生が有意に低下することを見出し、本症治療における有効性が示唆された。

共同研究者

大浦敏博(東北大学・大学院医学系研究科)

松原洋一(東北大学・大学院医学系研究科)

山口清次(島根大学・医学部)

遠藤文夫(熊本大学・医学部)

A. 研究目的

申請者らは、以前より本疾患の病態解明に関する研究を行い、原因遺伝子の同定・遺伝子発現・構造・高頻度変異を明らかにしてきた(Kure, J Biol Chem, 1991; Kume, J Biol, Chem, 1991; Kure, J Clin Invest, 1992; Takayanagi, Hum Genet, 2000)。最近、次の3点を明らかにした。1) 新生児期の症状を全く欠く軽症成人例の発見、2) 3つの原因遺伝子の変異スペクトラム

(Kure, Hum Mutat, 2006)、3) 非侵襲的酵素診断を可能にする安定同位体¹³Cグリシン呼気試験の開発(Kure, Ann Neurol, 2006)。本研究は1969年に東北大学医学部小児科のTadaらによる本症の欠損酵素の同定に端を発する。その後の研究もすべて日本発であり、研究の独自性は極めて高い。一連の研究により、本症の診断技術や遺伝的背景の解明に関しては長足の進歩を遂げた。

今回の研究の目的は、研究が遅れている、1) 患者数把握、2) 新治療の開発、の2点である。

1) 患者数把握

今までの発生頻度はすべて医療機関への受診者数を基にしている。本症では、

新生児期の突然死や、未診断の成人例などが存在するため、従来の方法では患者数把握は困難である。そこで、タンデムマス試験による新生児における血中グリシン濃度の測定に注目した。平成 21-22 年の継続した解析で、多数の新生児の血中グリシン濃度分布を測定し、濃度分布を明らかにする

2) 新治療の開発

本症は、稀少遺伝病であることからランダムイズド試験のような臨床からのアプローチは極めて困難である。そこで、モデルマウスを開発し、前臨床試験を行い、有効な薬剤を見出す。これまでに軽症型モデルマウスを用い、NMDA 型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位のアンタゴニストが有効である事を示した(Kojima-Ishii, *Pediatr Res*, 2008)。今年度は、GCS が葉酸代謝酵素として機能している事に着目し、葉酸やその代謝産物の有効性を検討する。

B. 研究方法

1) 新しい診断基準の有効性の検討

平成 21 年度に作成した、遺伝子検索や¹³C グリシン呼気試験を取り入れた新しい診断基準を基に、本症が疑われる患児を実際に診断し、その有用性を検証する。

2) タンデムマス試験による新生児スクリーニングにおける血中グリシン濃度解析に基く患者数把握

タンデムマス試験による新生児スクリーニングは、北海道地方は札幌市衛生研究所の花井潤師(研究協力者)、東北地方

は東北大学の太浦敏博(研究分担者)、中国四国地方は山口清次(研究分担者)、九週地方は遠藤文夫(研究分担者)が担当する。平成 21 年度から引き続いて、新生児期の血中グリシン濃度のデータを収集・解析し、その濃度分布を明らかにする。グリシン濃度の平均、標準偏差、分散を求める。ちなみに、新生児期に発症する典型例の場合、血漿グリシン濃度が正常の 3~4 倍以上に達している事が多い事を考慮してカットオフ値を検討する。有機酸代謝異常症の除外のため、各症例で、C3 値、及び C3/C2 比を同時に測定した。

3) 高グリシン血症のモデルマウスの作成と表現型の解析(呉、松原)

GCS のノックアウト・マウスは、構成酵素の一つをコードする Amt 遺伝子をエクソン・トラップ法で機能喪失を行わせる。機能喪失を検証するために、変異のホモ接合体を作成し、GCS 残存酵素活性を測定する。次に、変異ホモ接合体マウスの詳しい表現型を解析する。これらの実験は東北大学医学部動物実験施設で行い。既に研究計画が承認されている。

4) 高グリシン血症モデルマウスの薬物治療に関する前臨床試験(呉、太浦)

3) で作成したホモ接合体をモデルマウスとして、治療事件を行う。治療の指標には、このマウスで高率に認められる脳形成常を用いる。具体的には、産仔の脱脳症の出現頻度を観察する。GCS は補酵素として、テトラヒドロ葉酸を利用し、この活性化もおこなっている。今回の治療実験には葉酸やその代謝産物(チミジル酸、メチオニン)を妊娠マウスへ投与し、産仔における脱脳

症の有無を胎生 18 日に検討する。

(倫理面への配慮)

高グリシン血症の遺伝子診断は、東北大学倫理委員会の承認を受けている(承認番号: 2006-77)。モデルマウスに関する実験は、東北大学医学部動物実験施設にて行い、本研究は平成 21 年度の東北大学動物実験委員会の承認を受けている(承認番号: 21 医動-243)。

C. 研究結果

1) 新しい診断基準に基づく診断経験

従来の診断基準は、臨床症状と髄液および血清のアミノ酸分析所見、及び生検肝を用いた酵素活性測定に基づいていた。本研究班では、昨年度、遺伝子検査及び¹³Cグリシン呼気試験を加えた新しい診断基準を確立した。この新しい診断基準を用い、3 症例を高グリシン血症と診断した具体例を検討した。

2) 患者数把握に関する研究

タンデムマス試験で血中グリシン濃度を測定可能である点に着目し、新生児の血中グリシン濃度データを 80,391 名分を収集した。平均グリシン濃度は 387.8 μ M、標準偏差(SD)は 126.7 μ Mであった。今回の検索により、平均値の 4 倍以上の高値(+11SD)を示す 3 症例を確認した。

3) 治療法開発に関する研究

GCS 活性を全く欠くノックアウト・マウスを作製し、その表現型を解析した。GCS の完全欠損マウスは、血中や脳に多量のグリシンの蓄積を認めた。更に、脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症(NTD)など、種々の脳形成異常が系統依

存性に発生していた。C57/B6 を遺伝的背景とする場合、脱脳症を 80%以上のホモ接合体マウスに認めた。この脱脳症の出現頻度を指標として、治療実験を実施した。投与した薬剤は、GCS は葉酸代謝に関与するため、葉酸やその代謝物(チミジル酸、メチオニン)を試した。妊娠マウスにこれらの薬剤を投与し、産仔の脱脳症の出現頻度を観察すると、メチオニンを投与した場合に、脱脳症の出現頻度が有意に低下した。他の葉酸やチミジル酸を投与した場合、脱脳症の出現頻度に有意の低下は認められなかった。

D. 考 察

カットオフ値を+8SD とすると、80,391 人中 24 名(0.03%)となる。これらの 24 名の新生児の C3 濃度、および C3/C2 比を解析したところ、いずれの症例も C3 値、C3/C2 比は正常範囲にあり、メチルマロン酸血症やプロピオン酸血症といった有機酸代謝異常症は否定的であり、有機酸血症との鑑別は可能であった。

GCS は葉酸代謝に関与するため、妊娠マウスに葉酸や葉酸代謝産物(メチオニン、チミジンなど)の投与実験を行った。その結果、メチオニンを投与すると脱脳症の発生が有意に低下することを見出し、本症治療における有効性が示唆された。

E. 結 論

新生児スクリーニングにおいて血中グリシン濃度の検索を行うとともに、モデルマウスの治療実験を行い有効な薬剤の検索を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 高柳俊光、呉 繁夫「日齢2より筋緊張低下、無呼吸を呈した男児」症例から学ぶ先天代謝異常、診断と治療社、2009年60-63頁

2) Suzuki Y, Kure S, Oota M, Hino H, and Fukuda M. Nonketotic hyperglycinemia: Proposal of a diagnosis and treatment strategy. *Pediatr Neurol*, 2010;43:221-224.

3) Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S,

Osaka H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. *Brain Dev*, 2011 (in press).

4) Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia). *Brain Dev* 2011 (in press)

H. 知的財産権の出願、登録状況
該当なし

II. 分担研究報告

「高グリシン血症の新しい診断基準の使用経験」

研究代表者 吳 繁夫（東北大学・大学院医学研究科・准教授）

研究要旨

従来の診断基準は、臨床症状と髄液および血清のアミノ酸分析所見、及び生検肝を用いた酵素活性測定に基づいていた。しかしながら、アミノ酸分析のみでは高グリシン血症以外の疾患の鑑別が十分ではなく、肝組織を用いた酵素活性測定では肝生検が必要であるため、診断確定に困難があった。そこで、本研究班では診断確定のための検査として、遺伝子検査、及び¹³Cグリシン呼気試験を加えた診断基準を確立した（平成21年度研究成果報告書）。本症が疑われる本症患者に対し、この新しい診断基準を使用した使用経験をえたので報告する。

A. 研究目的

高グリシン血症は、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を特徴とし、「グリシン脳症」とも呼ばれる小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。本症の確定診断には、従来生検肝を用いたGCS酵素活性測定が必要であった。昨年度の本研究で、非侵襲的酵素診断の¹³Cグリシン呼気試験の開発(Kure, Ann Neurol, 2006)、および遺伝子診断を加えた新しい診断基準（文末参照）を作成した。その使用経験を報告する。

B. 症例提示

【症例1】第3生日の男子。主訴；筋緊張低下、呼吸障害（無呼吸）

周産期歴；母親は21歳、1回経産。血

族婚（一）。第1子の女兒は健康。今回の妊娠経過中特に異常なく、妊娠38週6日、頭位自然分娩にて出生。出生体重2832g、アプガールスコア1分9点、5分10点。出生後も全身状態良好で4時間目より哺乳開始。出生当日は特に異常に気付かれていない。

現病歴；日齢1に哺乳は維持できていたが、やや活気が乏しい事を母親が感じていた。日齢2に「明らかに活気が低下し、飲みが悪く泣かなくなった」との事でK病院へ紹介入院。同日夜より呼吸停止（無呼吸）が断続的に生じ、人工換気療法を開始。しかし、筋緊張低下と無呼吸が進行するため、日齢3に当院へ搬送入院となった。

入院時現症並びに検査所見；明らかな外表奇形なし、筋緊張はほぼ消失（自発呼吸なし）、刺激に対してかすかに四肢を動かすも重力に抗した動きなし。人工換気下に心音・呼吸音は異常なし。入院時検査所見

を表 1 に記したが、代謝性アシドーシスや低血糖、高アンモニア血症を認めず。感染症や頭蓋内血管病変の関与も否定的であった。

入院後経過（急性期，NICU 入院中）；日齢 3（当院入院当日）；筋緊張は著明に低下、自発呼吸なし。痛刺激に対する反応もほぼ消失。同日準夜より吃逆（しゃっくり）を頻回に求める。検査にて有機酸代謝異常症や、尿素サイクル異常症などを示唆する所見は認めなかったが、意識障害（活動性の低下）が著明で、吃逆が目立つ事から高グリシン血症を疑う。

日齢 4；刺激に対する反応は有ったり無かったり。自発呼吸もほぼ消失。

日齢 5；体動なし。指の動き軽度で吃逆は継続。脳波にて吃逆に呼応して **suppression burst** を認めた。検査会社より髄液・血漿のグリシンの異常高値と比の上昇を認めるとの報告あり、臨床症状とも併せて高グリシン血症を疑う。この症例に対し、新しい診断基準で以下の **13C** グリシン呼気試験と遺伝子検査を実施した。

【症例 2】研究発表論文 2 参照

【症例 3】研究発表論文 3 参照

C. 研究結果

1) [1-¹³C]グリシン呼気試験

10 m/kg（体重 10kg 以上の場合、一律 100mg）の[1-¹³C]グリシンを経口投与後、15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 分後の呼気を 100 ml ずつフェイスマスクにて採取し、呼気中の ¹³C で標識された二酸化炭素の濃度を測定した。患児の身長体重から二酸化炭素排出量を推定し、その値を基に時間当たりの ¹³C 回収率を計算した。その結果、5 時間後の ¹³C 累積回収率は 8.7%（成熟新生児の平均値 ± 標準偏差値は

21.5 ± 4.8%）と著明に低下していた。

2) 遺伝子検査

責任遺伝子は、グリシン開裂酵素をコードする *GLDC*, *AMT*, *GCSH* の 3 つが知られている。*GLDC* の全 25 エクソンの直接シーケンスにより、イントロン 2 に **IVS+1G>A**（スプライス・コンセンサス配列の変異）とエクソン 6 に **c.806C>T**, (**p.269The>Met**) を認め、遺伝子検査からも診断が確定した。

症例 2、症例 3 に対しても新診断基準を適応した。

D. 考 察

新しい診断基準を用いる事で、侵襲的な肝生検などを実施することなく、高グリシン血症の診断を確定できるようになった。

E. 結 論

高グリシン血症新しい診断確定は、有用と考えられる(4)。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 高柳俊光、呉 繁夫「日齢 2 より筋緊張低下、無呼吸を呈した男児」症例から学ぶ先天代謝異常、診断と治療社、2009 年 60-63 頁

2) Suzuki Y, Kure S, Oota M, Hino H, and Fukuda M. Nonketotic hyperglycinemia: Proposal of a diagnosis and treatment strategy. *Pediatr Neurol*, 2010;43:221-224.

- 3) Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S, Osaka H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. Brain Dev, 2011 (in press).
- 4) Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia). Brain Dev 2011 (in press)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

高グリシン血症の診断基準

(疾患名の別称：非ケトーシス型高グリシン血症、グリシン脳症)

A. 新生児型

以下の1)～5)の基準を満たすものを確定症例とする。

- 1) 新生児期に次の一つ以上の症状を呈する。
 - ・筋緊張低下
 - ・けいれん重積
 - ・意識障害（多くは呼吸障害を伴う昏睡）
- 2) 脳波所見が、サプレッション・バースト 又はヒプス・アリスミア
- 3) 髄液/血漿グリシン濃度比が0.07以上
- 4) 1)と3)の臨床所見が2か月齢を超えても認められる
(一過性高グリシン血症の否定)
- 5) 以下のいずれかの検査で陽性
 - ・遺伝子変異検索で、GLDC, AMT, GCSHいずれかの遺伝子に変異を認める
 - ・¹³Cグリシン呼気試験で、異常低値
 - ・肝組織を用いたグリシン開裂酵素系の活性が異常低値

B. 乳児型

以下の1)～4)の基準を満たすものを確定症例とする。

- 1) 乳児期以降に次のいずれかの症状を示す（新生児期は、原則無症状）
 - ・筋緊張低下
 - ・けいれん
 - ・精神発達遅滞
 - ・行動異常（多動など）
- 2) 脳波異常
- 3) 髄液/血漿グリシン濃度比が0.03以上
- 4) 以下のいずれかの検査で陽性
 - ・遺伝子変異検索で、GLDC, AMT, GCSHいずれかの遺伝子に変異を認める
 - ・¹³Cグリシン呼気試験で、異常低値
 - ・肝組織を用いたグリシン開裂酵素系の活性が異常低値

「タンデムマスによる高グリシン血症の新生児スクリーニング」

研究分担者	大浦敏博	（東北大学・大学院医学研究科・非常勤講師）
	山口清次	（島根大学。医学部小児科・教授）
	遠藤文夫	（熊本大学・医学部小児科・教授）
研究協力者	花井潤師	（札幌市衛生研究所・部長）

研究要旨

高グリシン血症は、昏睡などの重篤な中枢神経症状を特徴とする小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。本症は主に新生児期に発症する。治療法は、未確立で、生命予後は悪い。本症は、常染色体劣性遺伝病である。稀少遺伝病であるため、発症率、治療内容、予後などの実態が不明のままであるそこで、患者数把握のため、新生児スクリーニングの血液濾紙を80,391検体を分解析し、血中グリシン濃度の分布を分析した。血中グリシン濃度の平均値は387.8 μM であり、標準偏差は126.9 μM であった。

A. 研究目的

高グリシン血症は、筋緊張低下、無呼吸、けいれん、などの重篤な中枢神経症状を特徴とし、「グリシン脳症」とも呼ばれる小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、基質であるグリシンが蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。有効な治療法は未確立で、新生児期に発症し、生命予後は悪い。未解決の課題は、出生早期に突然死したり、非典型的な症状を示したりする未診断症例があり、患者実数が不明である点である。今までの発生頻度はすべて医療機関への受診者数を基にしている。本症では、新生児期の突然死や、未診断の成人例などが存在するため、従来の方法では患者数把握は困難である。そこで、パイロット試験が始まっているタンデムマス試験による新生児スクリーニングに着目した。タンデムマス試

験により、多数の新生児の血中グリシン濃度を測定し、診断の基盤となる血中グリシン濃度の分布を解析する。

B. 研究方法

タンデムマス試験による新生児スクリーニングのパイロット試験は既に幾つかの施設で開始されている。この研究班では、北海道地方は札幌市衛生研究所の花井潤師先生（研究協力者）、東北地方は東北大学の浦敏博（研究分担者）、中国四国地方は山口清次（研究分担者）、九週地方は遠藤文夫（研究分担者）が既に実施している。新生児の血中グリシン濃度のデータを収集・解析し、新生児期の血中グリシン濃度の分布を求める。

C. 結果

我が国の新生児の血中グリシン濃度データを80,391名分収集した。平均グリシン濃

度は $387.8 \mu\text{M}$ 、標準偏差(SD)は $126.7 \mu\text{M}$ であった。今回の検索により、平均値の4倍以上の高値(+11SD)を示す3症例を確認した。カットオフ値を+8SDとすると、人中24名(0.03%)となる。有機酸代謝異常症でも血中グリシン濃度が上昇することが知られている。これらの24名の新生児のC3濃度、およびC3/C2比を解析したところ、いずれの症例もC3値、C3/C2比は正常範囲にあり、メチルマロン酸血症やプロピオン酸血症といった有機酸代謝異常症は否定的であった。

D. 考 察

本症では、新生児期の突然死や、未診断の成人例が存在し、医療機関の受診歴からの患者数把握には限界がある。平成21-22年度で8万人を超える新生児の血中グリシン濃度を測定し、その濃度分布を検討する事が出来た。過去に経験した新生児期に発症する典型例の場合、血中グリシン濃度が正常の3~4倍以上に達している症例が多い。新生児の血中グリシン濃度は $387.8 \mu\text{M}$ であるため、その3倍は $1163.4 \mu\text{M}$ となる。これらの症例は、C3値やC3/C2比から有機酸血症は否定的であったため、平均値+8SDを超える症例は高グリシン血症の検索する価値があると考えられる。タンデムマス試験による新生児スクリーニングは急速に普及しており、既存のシステムを利用できる点で費用便益が高い。

E. 結 論

8万人を超える新生児の血中グリシン濃度を収集し、新生児期の血中グリシン濃度分布を決定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願、登録状況
該当なし

「モデルマウスを用いた高グリシン血症の新しい治療法開発」

研究分担者 松原洋一 東北大学・大学院医学研究科・教授

研究代表者 吳 繁夫 東北大学・大学院医学研究科・准教授

研究要旨

高グリシン血症は、重篤な中枢神経症状を特徴とする小児の神経難病の一つである。本症はグリシン開裂酵素(GCS)の遺伝的欠損により生じ、グリシンが体液中に蓄積する先天性アミノ酸代謝異常症である。本症は主に新生児期に発症し、有効な治療法は未確立で、生命予後は悪い。本症の特徴の一つは、水頭症、脳梁欠損、小脳低形成などの脳形成異常を高率に合併することである。高グリシン血症の新しい治療法の開発のために平成21年度よりモデル動物を作成し、前臨床試験を行っている。GCS活性を全く欠くノックアウト・マウスを高グリシン血症のモデルマウスとして作製し、その表現型を解析した。脳梁欠損、水頭症、脱脳症のような神経管欠損症(NTD)など、種々の脳形成異常を認めた。GCSは葉酸代謝に関与するため、妊娠マウスに葉酸やその代謝物の投与実験を行い、脱脳症の発生頻度を解析した。妊娠マウスに葉酸代謝産物であるメチオニンを投与すると脳形成異常の発生が有意に低下することを見出した。高グリシン血症の治療における有効性が示唆された。

A. 研究目的

グリシン脳症は、グリシン解裂酵素系(以下GCS)の遺伝的欠損により発症する先天代謝異常症の一つで、基質であるグリシンが体液中に蓄積することを特徴とする。典型例では新生児期に、意識障害、筋緊張低下、けいれん重積など重篤な中枢神経障害症状を呈する。新生児の脳症に症状が類似することから、「グリシン脳症」とも呼ばれている。これらの中枢神経症状に加え、小頭症や脳梁欠損といった脳形成異常を高率に合併する。呼吸不全やけいれん重積などにより新生児期に死亡することも多く、救命しえても重度の精神神経障害を残す。

脳内に蓄積したグリシンは、1) NMDA型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位から同受容体の過剰興奮、2) 抑制性グリ

シン受容体の過剰刺激、を引き起こすと推測される。実際、軽症型モデルマウスに1)のアンタゴニストを投与すると多動などの症状が改善する事を既に見出している(Kojima-Ishii, *Pediatr Res*, 2008)。

本研究では、本症に高率に伴う脳形成障害の成因を明らかにするためGCSをコードする遺伝子のノックアウト・マウスを作製し、その病理学的及び代謝学的解析により、脳形成異常の成因を明らかにする。

B. 研究方法

重症型高グリシン血症のモデルマウスはGCS遺伝子のエクソン・トラップ法にて作成した。この重症型マウスの詳しい表現型を解析する。生後の表現型と胎生期の表現型を病理学的に解析した。遺伝的背景の影響を検討するため、C57BL/6

マウスとの戻し交配を行い、表現型を観察する。これらの実験は東北大学動物実験委員会による承認を受け、実施した。

C. 結果

ノックアウト・マウスのホモ接合体マウスを作製し、肝臓における GCS 活性を測定したところ、検出感度以下であることを確認した。次に、このマウスの表現型を検索したところ、ホモ接合体マウスには、脳梁欠損、水頭症などを含む様々な脳形成異常を認めた。この脳形成異常の出現は、マウスの系統に依存し、戻し交配により遺伝的背景を変化させると、認められる脳形成異常も変化した。C57/B6 を遺伝的背景とする場合、脱脳症を 80%以上のホモ接合体マウスに認めた。この脱脳症の出現頻度を指標として、治療実験を実施した。投与した薬剤は、GCS は葉酸代謝に関与するため、葉酸やその代謝物（チミジル酸、メチオニン）を試した。妊娠マウスにこれらの薬剤を投与し、産仔の脱脳症の出現頻度を観察すると、メチオニンを投与した場合に、脱脳症の出現頻度が有意に低下した。他の葉酸やチミジル酸を投与した場合、脱脳症の出現頻度に有意の低下は認められなかった。

D. 考察

GCS のノックアウト。マウスでは、種々の脳形成異常を認め、高グリシン血症に伴う脳形成常のモデルとして有用と考えられた。GCS は代謝にも関与しており、テトラヒドロ葉酸から活性型のメチレンテトラヒドロ葉酸を生成する。また、葉酸代謝は、神経管欠損症の発生に関与していることが知られている。今回、脱脳症の産仔における出現頻度が妊娠マウスへのメチオニン投与で低下したことから、高グリシン

血症に伴う脳形成常の発生機序として、葉酸代謝の異常が示唆される。また同時に、メチオニンの本症における有効性も示唆された。

E. 結論

グリシン脳症に合併する脳形成異常をモデルマウスで再現する事に成功した。更にそのモデルマウスに対する治療実験において、葉酸代謝産物の有効性を確認し、本症治療への示唆を得た。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

呉 繁夫. 「高グリシン血症」見逃せない先天代謝異常症（五十嵐隆、高柳正樹編）、2010年、小児科臨床ピクシス235巻、249-251頁

H. 知的財産権の出願、登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
呉 繁夫	高グリシン血症	・五十嵐隆、高柳正樹編	見逃せない先天性代謝異常症(小児科臨床ピクシス23巻)	中山書店	東京	2010年	249-251

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
呉 繁夫	アミノ酸・有機酸代謝異常症を見逃していませんか？	小児内科	42	1183-1186	2010
呉 繁夫	アミノ酸代謝異常症（フェニルケトン尿症、楓糖尿症など）	小児科診療	73	488-489	2010
Suzuki Y Kure S Oota M Hino H Fukuda M	Nonketotic hyperglycinemia: Proopsal of a diagnostic and treatment strategy	Pediatr Neurol	43	221-224	2010
Tsuyusaki Y Shimbo H Wada T Iai M Tsuji M Yamashita S Aida N Kure S Osaka H	Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia	Brain Dev		in press	2011
Kure S	Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia)	Brain Dev		In press	2011

<p>Kamada F Aoki Y Narisawa A Abe Y Komatsuzaki S Kikuchi A Kanno J Masao N Ishii N Owada Y Fujimura M Mashimo Y Suzuki Y Hata A Tsuchiya S Tominaga T Matsubara Y <u>Kure S</u></p>	<p>A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moya moya disease gene</p>	<p>J Hum Genet 56</p>	<p>34-40</p>	<p>2011</p>
<p>Komatsuzaki S Aoki Y Niihori T Okamoto N Hennekam RCM Hopman S Ohashi H Mizuno S Watanabe Y Kamasaki H Kondo I Moriyama N Kurosawa K Kawame H Okuyama R Imaizumi M Rikishi T Tsuchiya S <u>Kure S</u> Matsubara Y</p>	<p>Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and hematologic malignancies</p>	<p>J Hum Genet 55</p>	<p>801-809</p>	<p>2010</p>