

201231146A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と  
致死性脳症の発症予防法の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 田 修 一

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と  
致死的脳症の発症予防法の開発

Health and Labour Sciences Research Grant, Intractable Diseases (A study of the diversity of clinical phenotypes and the prevention of fatal encephalopathy in patients with citrin deficiency) in Japan

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 田 修 一

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と致死的脳症の発症予防法の開発

池田 修一 ..... 1

### II. 分担研究報告書

1. シトリン欠損症の新規疾患マーカーの発見 —シトリン欠損症モデル、Citrin/mGPD double-KO マウスにおける尿中グリセロール排泄増加—

佐伯 武頼 ..... 5

2. 成人型シトルリン血症特異的 iPSC 細胞を用いた新規疾患モデルの作製

長船 健二 ..... 13

3. CTLN2 発症に関わる遺伝要因の検索：ミトコンドリア glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPD) 多型解析

佐伯 武頼 ..... 17

4. シトリン欠損症における脂肪肝発生メカニズムの解析

小松 通治 ..... 23

5. シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と致死的脳症の発症予防法の開発

呉 繁夫 ..... 25

6. 成人型シトルリン血症の臨床像 —自験例 34 名における臨床病理学的検討

池田 修一 ..... 29

7. MCT オイルが著効したシトリン欠損症による新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) の一例

大浦 敏博 ..... 33

8. II 型シトルリン血症 (CTLN2) における中鎖脂肪酸療法について

早坂 清 ..... 35

9. 小児用食事摂取調査票の探索—シトリン欠損症スクリーニングへの応用

栗山 進一 ..... 37

10. 鹿児島大学医歯学総合研究科分子病態生化学において解析した尿素サイクル関連異常症例と残された試料およびその信州大学脳神経外科、リウマチ・膠原病内科への移転

乾 明夫 ..... 41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 本年度の活動報告

V. 班構成員名簿

# [ I ] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

## シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と致死性脳症の発症予防法の開発

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 池田修一 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 教授

**研究要旨** シトリン欠損症は、新生児期に胆汁うっ滞性肝炎(NICCD)を引き起こし、その後、一見健康な状態期を経て、致死性脳症である成人型シトリン血症（CTLN2）を引き起こす常染色体劣性遺伝性疾患である。NICCD と CTLN2 の両疾患を繋ぐ期間（無-脳症期）の病態については、未だ解明できておらず、CTLN2 と正確に診断された患者以外の動向は全く不明であり、未知な臨床病型や精神神経疾患、消化器疾患と誤診されている患者が相当数いる可能性がある。本研究の目的は、無-脳症期の臨床像の多様性を検索することで疾患の全容解明を行い、シトリン欠損症の診断(治療)指針を作成する。また臨床像の多様性の発症機序の解明から、致死性疾患である CTLN2 の発症機序の解明と治療法・予防法を確立する。平成 24 年度の研究では、遺伝子診断法の改良、無-脳症期の臨床像の解明、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、高齢発症者の臨床像の解明、脂肪肝の成因の同定、新規疾患マーカー候補の同定、疾患モデル細胞としての iPS 細胞の樹立を主に行った。本研究により、他疾患と誤認されている本症患者への正確な診断と、適切な治療の提供による患者救命率の向上と社会復帰、さらに無-脳症期患者への CTLN2 の発症予防を確立することが期待できる。

### 研究分担者

呉 繁夫（東北大学小児病態学 教授）  
栗山進一（東北大学災害科学国際研究所 教授）  
早坂 清（山形大学小児科 教授）  
小松通治（信州大学第二内科 助教）  
佐伯武頼（熊本大学生命資源研究・支援センター 特任教授）  
乾 明夫（鹿児島大学心身内科学 教授）

### A. 研究目的

シトリンは、ミトコンドリアの Asp-Glu 輸送体であり、その欠損は細胞質への Asp 供給障害や解糖により生じた細胞質 NADH のミトコンドリアへの供給障害を引き起こす。このためシトリン欠損症患者では、糖質・飲酒を嫌い、高蛋白・高脂質食を好むという特異な食癖が形成される。これまでの臨床研究で、NICCD と成人期の CTLN2 の間の一見健康な時期にも、多彩な臨床症状が出現し、決して疾患休止期ではないことが明らかにされている。一方、本症の最重症型である CTLN2 では、発症年齢が 10-80 歳代と個人差が大きく、また思春期食思不振症、内因性精神病、膵炎、脂肪肝炎（NASH）、肝癌などと診断されている患

者も多数存在する可能性がある。この無-脳症期の臨床像や分子病態は不明な点が多いが、この臨床病期の解明により、シトリン欠損症の全容の解明と、更には CTLN2 の発症促進・抑制機構が解明できる可能性がある。本研究の目的は、無-脳症期の臨床像を明らかにして疾患の全容を解明し、シトリン欠損症の診断（治療）指針を作成する。また CTLN2 の発症機序の解明と予防法を確立する。

### B. 研究方法

今年度は、無-脳症期の臨床像の解明、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、高齢発症者の臨床像の解明、脂肪肝の成因検索、小児用食事摂

取調査票の探索—学童期シトリン欠損症患者スクリーニングへの応用、遺伝子診断法の改良、モデル動物を用いた疾患マーカーの検索、疾患モデル細胞としての iPS 細胞の樹立—肝細胞への分化を重点的に行った。

#### ○倫理面への配慮

対象患者に対しては、本研究の主旨を十分に説明して、同意が得られた患者について検査と治療を行った。同意して本研究に参加した後でも、患者の意思で何時でも本研究を中止できる等の説明をして、対象患者の人権保護を十分に行った。ピルビン酸などの未承認薬の使用については、研究者が所属する施設の倫理委員会の承認を得ている。遺伝子改変動物については鹿児島大学、徳島文理大学、および熊本大学において、組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。また動物実験に関しては、各施設の動物実験委員会の承認を得ている。iPS 細胞研究に関しては、京都大学医学部倫理委員会の承認を得て行っている。

#### C. 研究結果

班全体の研究成果としては、無-脳症期の臨床像の解明、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、高齢発症者の臨床像の解明、脂肪肝の成因の同定、遺伝子診断法の改良、新規疾患マーカー発見、疾患細胞モデルとしての iPS 細胞の樹立—肝細胞への分化である。また現在 CTLN2 に関しての臨床診断基準の素案を作成中であり、診断基準を確立・啓蒙できれば、これまで正確な診断をされていなかった患者へ、正確な診断と、当研究班で確立した治療法を提供することが可能となる。これまで、肝移植療法が最も確立された治療法であったが、内科的治療法が確立できれば、本邦での移植ドナー不足の解消に貢献することができる。

各研究分担者による本年度の成果を以下に示す。

#### CTLN2 の発症前 (無-脳症期) と発症後の臨床像の検討

##### 1) 新たな無-脳症期の臨床像の発見

信州大学医学部に入院加療歴のある 34 名 (男性 20 名 ; 女性 14 名) の CTLN2 患者の臨床像の検討で、これまで報告されていた非アルコール性

膵炎、非アルコール性脂肪肝炎、肝細胞癌の合併以外に、十二指腸ソマトスタチノーマの合併例を報告した。十二指腸も肝細胞と同様に、シトリンの発現が認められており、シトリン欠損と腫瘍原性の機序については、今後検討する予定である。また 3 名 (8.9%) の患者で、CTLN2 発症前に腎不全 (多発のう胞腎、巣状糸球体硬化症) を罹患しており、慢性腎不全の食事管理 (低蛋白食) が、CTLN2 発症誘因になっている可能性が示唆された。

##### 2) 思春期成長障害—神経性食思不振症の病態解明

成長障害・食思不振を合併した学童期シトリン欠損症患者 (12 歳女児) の血液中の食欲関連ホルモン (グレリン) を、鹿児島大学で測定し、神経性食思不振症患者と同様の結果であり、シトリン欠損症も神経性食思不振症の一因であることが示された。来年度は症例数を増やして更に検討する予定である。

##### 3) 小児用食事摂取調査票の探索—シトリン欠損症スクリーニングへの応用

シトリン欠損症患者では、その特徴的な食癖から、食事摂取のアンケート調査が、学童期におけるシトリン欠損症患者のスクリーニングに有効である可能性が考えられる。平成 24 年度は、実際に本邦で小児や学童期を対象として使用されている食事調査票が、実際にシトリン欠損症患者のスクリーニングに妥当であるか検討を行った。

##### 4) 高齢発症者の臨床像の解明

信州大学で治療歴のある 34 名の患者 (平均発症年齢  $39.7 \pm 14.7$  歳) の検討では、60 歳以上の高齢発症患者が 2 名含まれており、最高発症年齢は 73 歳であった。また他院からの遺伝子解析の依頼による診断では、83 歳発症患者も見つekte おり、60 歳以上の高齢者であっても、発作的に異常行動や、物忘れ・見当識障害などの認知症症状を起こす患者に対しては、本症の可能性を鑑別する必要性が示された。これらの高齢発症患者では、炭水化物食を嫌うというシトリン欠損症患者における食癖の特徴が目立たず、73 歳発症患者では、飲酒も可能であり、高齢発症患者では、何らかの代償因子が働いてシトリン欠損状態を補

完し、発症を予防している可能性が示唆された。

5)シトリン欠損症における非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の成因—脂肪沈着機序の解明

CTLN2 患者の肝生検あるいは、肝移植時に摘出された肝組織検体について、脂肪酸取り込み系遺伝子、脂肪酸輸送系遺伝子、分解系遺伝子、分泌系遺伝子の mRNA レベルについて、健常対照群と比較検討した。結果については、上記遺伝子の発現レベルは、患者群ですべて発現が低下しており、脂肪沈着の程度とも相関し、脂肪肝の程度が激しいものほど有意に低下していた。これらの遺伝子発現を調整している PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ) の mRNA レベルも低下しており、本症における脂肪沈着のメカニズムに PPAR $\alpha$  の発現低下が関与していることが示された。本症における脂肪肝は、肝癌発生機序にも関連している可能性があり、PPAR $\alpha$  低下の是正が、脂肪肝や肝癌の発症抑制に繋がる可能性があり、また NASH の治療法解明に繋がる可能性がある。

### CTLN2 の治療法の確立

#### 1)内科的治療法の確立

信州大学では、低炭水化物食（食事の炭水化物比を 40%に制限。健常者は約 60%）に加えてピルビン酸ナトリウムの経口投与を 15 名の患者に対して施行し、3 名では、投与後も脳症発作が持続し、肝移植療法を施行したが、11 名で脳症発作の減少・消失を観察でき、食事療法とピルビン酸投与により、多くの患者で肝移植が不要になる可能性が示唆された（1 名では、本人の希望で中止）。

また山形大学、仙台市立病院では、1 名の NICCD 患者と 3 名の CTLN2 患者に対して MCT (medium chain triglyceride) を投与し、NICCD 患者では肝機能の正常化・体重増加、CTLN2 患者では脳症の消失、血漿アンモニア値の低下を観察し得ており、新たな内科的治療法として確立した。

2)肝移植療法—本症における脳死肝移植療法の確立

これまで本邦では、本症に対する肝移植療法は、ほとんどが生体肝移植であったが、今回 3 名の患

者に対して、本邦では本症患者に対しては初となる脳死体肝移植を施行し、その有効性を確立した。この結果、健常者（生体ドナー）に手術するという倫理的な問題、肉親者に生体ドナーが存在せずに移植をあきらめてきた患者に対しても、移植医療の選択肢を広げることができた。

### シトリン欠損症診断法の確立

#### 1)real-time PCR 法を用いた迅速診断の確立

東北大学では、シトリン欠損症の原因遺伝子である *SLC25A13* 遺伝子に関して、本邦患者における頻度の高い遺伝子異常 11 種に対して、Real-time PCR 法を用いて簡便・迅速に診断する方法を確立した。この方法を用いて、全国諸施設の本症患者が疑われる 114 名の患者に対し遺伝子診断を実施し、本解析法の変異アレル検出率は 89%と、多くの患者で、本解析法で迅速に診断可能であることを明らかにした。

### シトリン欠損患者における CTLN2 発症機序の解明

1)ミトコンドリア glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPD) の遺伝子多型の解析

シトリンは、malate-aspartate shuttle の構成蛋白であり、解糖で生じた細胞質 NADH をミトコンドリア内へ移送（還元当量移送）する機能を有している。このためシトリン欠損状態では、細胞質で NADH が蓄積し、尿素回路や解糖、糖新生などの様々な代謝系に影響を及ぼしている。しかしながらマウスでは、mGPD がシトリン機能を補完することが明らかにされており、ヒトでも、mGPD 活性の個体差などが、CTLN2 の発症を規定している可能性が示唆されていた。今回、mGPD の主な遺伝子多型 (H264R 多型) について、NICCD 患者、CTLN2 患者について検索したが、本多型における CTLN2 発症との関連性については有意な結果が得られなかった。今後は、他の遺伝子多型に関して、特に臨床像の異なる兄弟例について、エクソーム解析を行う予定である。

### モデル動物・モデル細胞の確立

1)シトリン欠損症の新規疾患マーカーの発見

熊本大学生命資源研究支援センターの佐伯らは、シトリン欠損症モデルマウスでは、肝組織中の glycerol 3-phosphate (G3P) が顕著に上昇するこ



とを見出し、疾患マーカーになりうる可能性を峻していた。しかしながら、測定にはNMRなどが必要で、より簡便に測定できる疾患マーカーを検索した。今回の研究では、モデルマウスにおいて、尿中グリセロールが上昇していることを見出し、疾患マーカーになりうる可能性を報告した。

#### 2)CTLN2 患者由来の iPS 細胞の確立—肝細胞への分化誘導

京都大学 iPS 細胞研究所において、CTLN2 患者 2 名に皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、肝細胞への分化誘導を行った。肝細胞マーカーであるアルブミン、肝細胞成熟マーカーである薬物代謝酵素遺伝子 (CYP3A4) や尿素回路関連遺伝子 (CPS1・OCT・ASS・ASL・citrin) の発現も同定でき、肝細胞への分化段階まできており、今後はシトリン欠損症の病態を模倣しているかの検討を行う。

#### D. 考察

NICCD と CTLN2 発症前までの、いわゆる無—脳症期の臨床症状・病態については、未だ不明な点が多いが、精神疾患、脂肪肝・膵炎などの消化器系疾患に加えて、肝癌や十二指腸腫瘍など、非常に多彩な病型をとり、診断を困難にしている可能性がある。また直接的な関連は不明であるが、慢性腎障害として治療されていた患者も存在した。治療に関しては、本邦においても脳死肝移植が可能であり、本症に対しての移植医療の適応をさらに拡大することができた。また内科的治療法として、ピルビン酸だけではなく、MCT の有効性も確立でき、治療法の選択肢が広がった。

遺伝子診断法の確立で、多くの患者の確定診断が可能になったが、約 10%の患者では、変異が同定されていないのも現状である。このような患者や、高齢発症患者、多彩な臨床像を呈する無—脳症期患者に対しては、シトリン欠損症を疑う第

一步として、血清や尿中で測定可能な診断マーカーが必要である。しかしながら、これまで活用されていた血清膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) が、最近外部委託業社で測定ができなくなり、新たな診断マーカーの確定が急務になっていた。今後、尿中グリセロールが、診断マーカーとして確立できれば、更に多くの患者について診断が可能になり、正確な診断とともに的確な治療を提供することが可能となる。

#### E. 結論

シトリン欠損症における治療法は、肝移植療法や複数の内科的治療法が確立されつつあり、以前に比べ、より treatable な疾患になってきている。このため、より簡便・的確に診断が可能になれば、多くの患者を救命出来うる可能性が示された。

また疾患細胞モデルとしてシトリン欠損症患者由来の iPS 細胞が確立できれば、今後新規治療薬の探求や、より正確な病態解明・予防法の確立につながるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

分担研究報告書参照

##### 2. 学会発表

分担研究報告書参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## [Ⅱ] 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
シトリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と致死性脳症の発症予防法の開発

## シトリン欠損症の新規疾患マーカーの発見 —シトリン欠損症モデル、Citrin/mGPD double-KO マウスにおける尿中グリセロール排泄増加—

研究分担者 佐伯武頼 熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野

共同研究者 藤本侑希\*、古家澄江\*、山村研一\*

\*熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野

**研究要旨** シトリン欠損症モデル Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPD) double-KO マウスの病態解析から肝中 glycerol 3-phosphate 濃度の上昇がシトリン欠損症の特徴ある疾患マーカーになると報告してきたが、体液中の濃度を測定できれば、診断にはより簡便で有用と考えられる。今回、モデルマウス尿中の glycerol 3-phosphate とともにグリセロールを定量した結果、尿グリセロール濃度がより簡便・的確な診断マーカーとなる可能性を見出したので、報告する。

### A. 研究目的

本研究の目的は、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2)、新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD)、およびその他のシトリン欠損によって生じる多様な病態を明らかにし、診断基準を明確にし、また重篤な病態を簡便に診断することにある。以上の目的を持ってシトリン欠損症モデルマウスの病態解析から、われわれはすでに肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) が顕著に増加することを見出し、疾患マーカーになりえることを報告してきた (1)。G3P は従来から尿中で検出されていることから、今回マウス尿中の G3P およびその代謝物であるグリセロールを定量した。その結果、シトリン欠損症モデルマウスである citrin/mGPD double-KO マウスにおいて摂食および絶食時ともに尿中グリセロール濃度が増加していることを見出した。

### B. 研究方法

シトリン欠損症モデルマウスに関わる 4 種のマウス、野生型 (wt)、Slc25a13 遺伝子欠損 Citrin-KO (Citrn-KO)、mGPD-KO、および Citrin/mGPD double-KO マウスを用い、固形食 CE-2 (Clea Japan) 摂食時と餌を除いた絶食時、17:00 から翌朝 9:00 まで、マウスを代謝ケージに入れ、尿を採取した。尿中 G3P とグリセロール濃度は、glycerol 3-phosphate dehydrogenase と glycerol kinase、および  $\text{NAD}^+$  を用いる酵素法 (2) で定量

した。尿中のアミノ酸は、LC/MS/MS を用いる EZ:faast Amino Acid Analysis キット (Phenomenex Ltd., Los Angeles, CA, USA) を用いて定量した。尿代謝物濃度は、クレアチニン mg あたりで表した。尿クレアチニンはラボアッセイ™クレアチニン (和光純薬工業) を用いて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は熊本大学に動物実験計画書を提出し、承認されている (承認番号 D 24-277)。

### C. 研究結果

すでに報告したように (1)、シトリン欠損症モデル、Citrn/mGPD double-KO マウス肝臓内の G3P 濃度は他の genotype マウスに比し有意に高く、ショ糖投与によって著しく増加し、疾患マーカーとなる可能性がある。しかしながら、肝中の G3P 濃度の上昇は、NMR などを用いなければ、容易には検出できない。一方、尿中には G3P が検出されると報告されていることから本モデルマウスの尿中の G3P の検出を試みた。

図1に摂食マウスの尿中の G3P レベルを示す。Double-KO マウスのレベルは他の 3 種の genotype マウスよりも有意に高かった。また、mGPD-KO マウスのレベルも Citrn-KO および wt マウスのレベルより高かった。しかし、図2に示すように 4 種の絶食マウス間には尿中 G3P レベルに差異はなかった。一方、同時に測定したグリセロールレベルは、図3、

および図4に示すように、摂食、および絶食条件下いずれにおいてもdouble-KOマウスにおいて他の genotypeマウスより有意に高い値を示した。

なお、4種の摂食マウスの尿中グリセロールとG3Pの間には図5に示すように、有意な相関 ( $n=36$ ;  $R^2=0.367$ ;  $p<0.0001$ ) が観察された。しかし、double-KOマウスのみでは、 $R^2=0.115$ ;  $p=0.212$  ( $n=12$ )となり、相関性はなかった。また、摂食 mGPD-KOとdouble-KOマウスの尿グリセロールと尿シトルリン濃度の間にも図6に示すように有意の相関 ( $n=24$ ;  $R^2=0.344$ ;  $p<0.005$ ) が認められたが、double-KOマウスのみでは、 $R=0.205$ ;  $p=0.140$  ( $n=12$ )となり、相関性は失われた。

#### D. 考察

シトルリン欠損症である、NICCD および CTLN2 の診断は、種々の困難を伴う。NICCD では、多彩な症状が観察され、検査所見も多彩であり、他疾患との鑑別が困難である。CTLN2 の症状は、精神・神経学的症状が多く、しばしば初期診断として、癲癇、うつ病、統合失調症などの精神神経学的診断名がつけられる。血中アンモニアの高値が見出され、血漿シトルリン濃度上昇が検出され、CTLN2 が始めて疑われる。いずれも、現在、最終診断は遺伝子診断に依存している。しかし、遺伝子診断でも約 5–10%は変異が見出されない。故に、シトルリン欠損症の病態解析を深め、より容易にシトルリン欠損症の診断を可能にすることは重要である。われわれは、シトルリン欠損症モデル、Ctrn/mGPD double-KO マウスの解析を進め、肝中のG3Pがシヨ糖などの細胞質NADHの上昇をもたらすような物質の投与で著しく上昇することを見出した。しかし肝中のG3Pの検出は容易ではない。そこで、尿中のG3P濃度を測定し、診断的価値があるかどうかを検討した。その結果、double-KOマウスの尿中のG3P濃度は必ずしも他の genotype マウスに比し、有意には高くなかった。しかしながら、同時に測定したグリセロール濃度は、摂食条件下、絶食条件下共にdouble-KOマウスにおいて他の genotype マウスより有意に高かった。以上から尿中グリセロール濃度の測定によってシトルリン欠損症を診断できる可能性が生じた。また、血中のグリセロールレベルが double-KO マウスにおいて高値を示す可能性を現在、追求している。なお、摂食条件下で

4種のマウスの尿グリセロールとG3P間に相関性が認められたが、double-KOマウスのみでは相関性は失われた。同様に、4種のマウス尿中グリセロールと尿中シトルリンの間には有意の相関が得られたが、double-KOマウスのみでは相関性はなく、グリセロールとG3P、およびグリセロールとシトルリンはそれぞれ独立の因子であり、グリセロールはシトルリンとは別の診断的価値を持つ可能性がある。以上のことから今後は、CTLN2 および NICCD などのシトルリン欠損症患者の尿中、および血中のグリセロール濃度測定を行い、診断的価値があるかどうか、追及していきたい。

#### E. 結論

シトルリン欠損症モデル、citrin/mGPD double-KOマウスの尿中のグリセロール濃度は摂食、絶食条件下で、他の genotype (wt, Ctrn-KO および mGPD-KO) マウスに比し、有意に増加していた。また、G3P濃度およびシトルリン濃度との有意の相関性は認められたが、double-KOマウスのみでの解析では相関性は認められなかった。以上の結果から尿グリセロールはシトルリン欠損症の新規の病態マーカーとなる可能性が示された。

#### 文献

- (1) Saheki T, Inoue K, Ono H, Tushima A, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Kuhara T, Ohse M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Kobayashi K: Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab.* 104:492-500, 2011.
- (2) Wieland OH: 3.1 Glycerol 3.1.1 UV-method, In *Methods in Enzymatic Analysis*, Third Edition, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Vol. 6:pp. 504-510, 1984.

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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*, 107:322-9, 2012.
- 2) 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*, 105:553-8, 2012.
  - 3) Gómez-Galán M, Makarova J, Llorente-Folch I, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J, Herreras O: Altered postnatal development of cortico-hippocampal neuronal electric activity in mice deficient for the mitochondrial aspartate-glutamate transporter. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32:306-17, 2012.
  - 4) Wang JS, Wang XH, Zheng YJ, Fu HY, Chen R, Lu Y, Fang LJ, Saheki T, Kobayashi K: Biochemical characteristics of neonatal cholestasis induced by citrin deficiency. *World J Gastroenterol*. 18:5601-7, 2012.
  - 5) Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrústegui J, Dierssen M, Pardo B: AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. *J Neurochem*, 124: 347-62, 2012.
  - 6) Kobayashi K, Saheki T, Song YZ. Citrin Deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2005 Sep 16 [updated 2012 Jan 05].
  - 7) 佐伯武頼:アミノ酸代謝異常症—シトリン欠損症—ここまで治せるようになった先天代謝異常症、小児内科 44: 1623-1627, 2012.
  - 8) 佐伯武頼:IV. 先天代謝異常症 63. シトリン欠損症、小児疾患の診断治療基準 第4版 pp148-149 (小児内科増刊号 2012; vol 44)、2012.
  - 9) Yazaki M, Kinoshita M, Ogawa S, Fujimi S, Matsushima A, Hineno A, Tazawa KI, 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.2013 in press
- ## 2. 学会発表
- 1) Saheki T. Treatment of Citrin Deficiency: Assessment by using an Animal Model. The 2nd Asian Congress on Inherited Metabolic Disease (ACIMD) & the 12th Asia Europe Workshop on Inborn Error of Metabolism (AEWIEM), Seoul, Korea, April 1-4, 2012.
  - 2) Saheki T. Citrin Deficiency -one of the most prevalent inherited metabolic diseases in East Asia- Vietnamese Association of Diabetes and Endocrinology, Hue, Vietnam, May 11-12, 2012.
  - 3) 佐伯武頼:シトリン欠損症の病態解析と治療法の開発—ピルビン酸ナトリウムの効果—、ビタミンB研究協議会 湘南国際村センター、9月1日、2012年
  - 4) Saheki T, Citrin deficiency past, present and future -What is citrin deficiency and what should we do now? Education Program of IEM and Pediatric Endocrinology, Guangzhou, China. October 7-8. 2012.
  - 5) Saheki T, Citrin deficiency past, present and future -What is citrin deficiency and what should we do now?-, 12th Chinese Society of Pediatric Endocrinology and Metabolism Conference (Tongli), Tongli, China, October 11-12, 2012.
  - 6) 佐伯武頼、古家澄江、山村研一、牛飼美晴、浅川明弘、乾明夫、矢崎正英、池田修一、小林圭子:鹿児島大学医歯学総合研究科分子病態生化学において解析した尿素サイクル関連異常症例。第54回日本先天代謝異常学会総会、岐阜市、11月16日、2012年
  - 7) 佐伯武頼、古家澄江、山村研一、井ノ上逸朗、牛飼美晴、浅川明弘、乾明夫、矢崎正英、池田修一、小林圭子:CTLN2発症に関わる遺伝要因の検索:ミトコンドリア glycerol -3-phosphate dehydrogenase。第54回日本先天代謝異常学会総会、岐阜市、11月16日、2012年
  - 8) 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), Kuala Lumpur,  
Malaysia, December 6-8, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

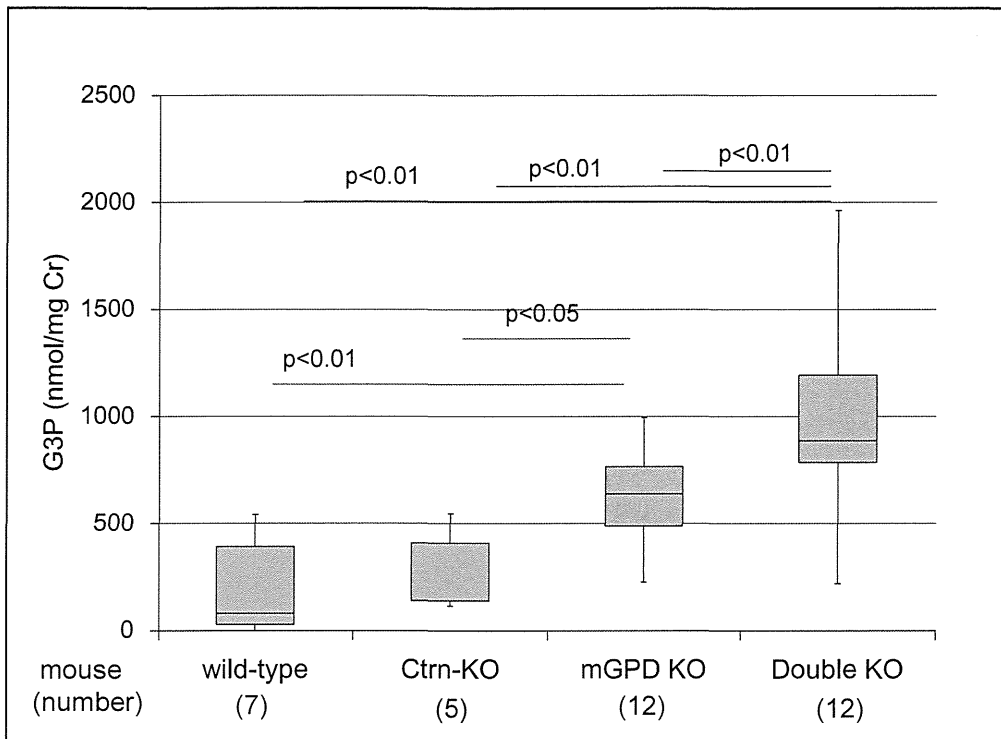


図1 摂食マウス尿中の G3P 濃度の比較  
 カッコ内の数字はマウスの数を示す。有意差検定は Wilcoxon の検定による。  
 Cr、クレアチニン

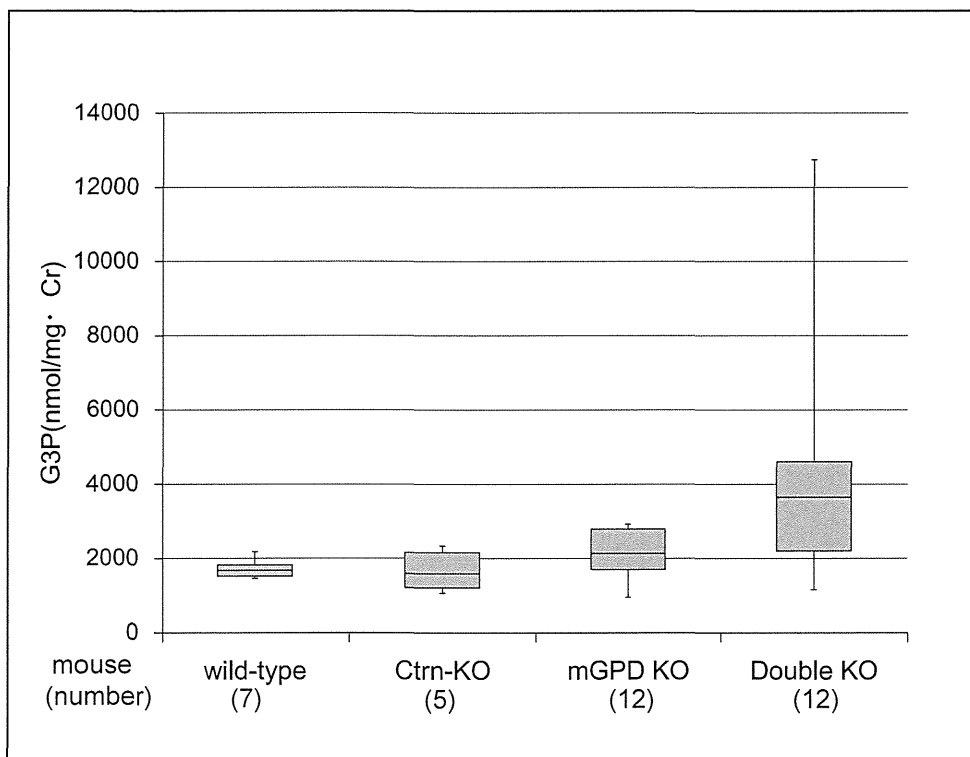


図2 絶食マウス尿中の G3P 濃度の比較  
 カッコ内の数字はマウスの数を示す。有意差検定は Wilcoxon の検定による。  
 Cr、クレアチニン

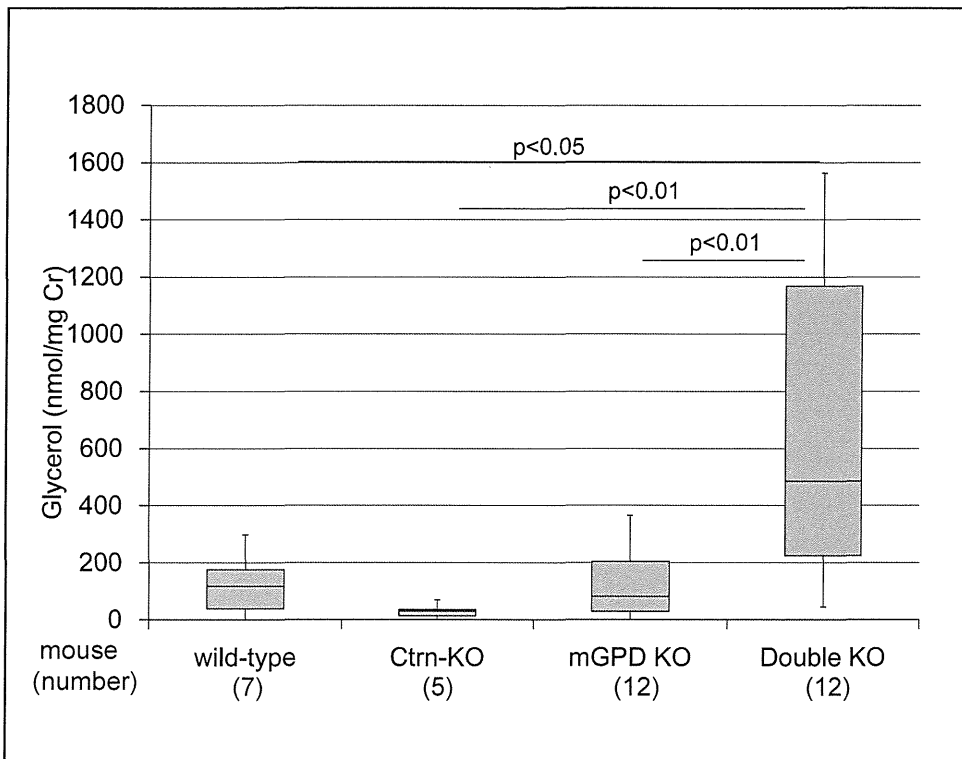


図3 摂食マウス尿中グリセロール濃度の比較

カッコ内の数字はマウスの数を示す。有意差検定は Wilcoxon の検定による。

Cr、クレアチニン

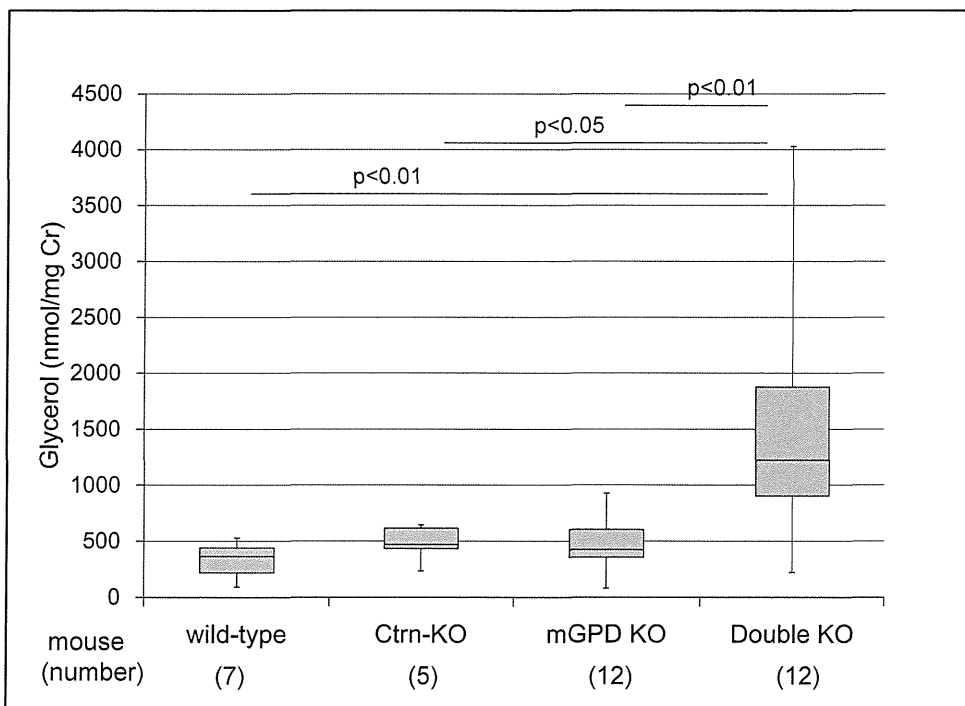


図4 絶食マウス尿中グリセロール濃度の比較

カッコ内の数字はマウスの数を示す。有意差検定は Wilcoxon の検定による。

Cr、クレアチニン



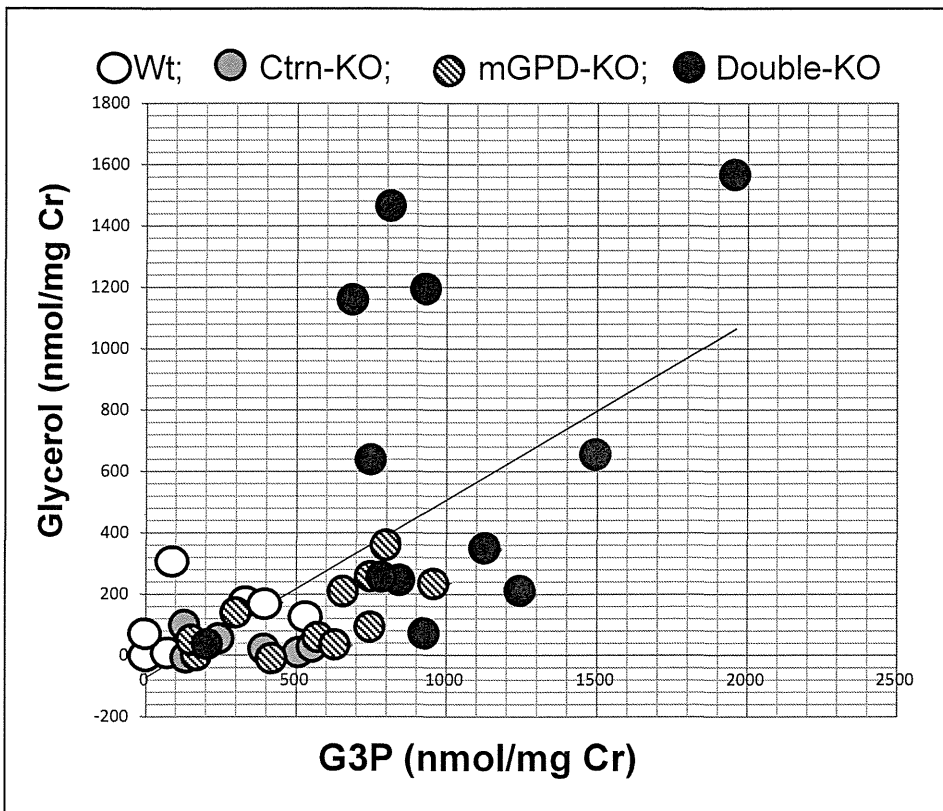


図5 摂食マウス尿中の G3P 濃度とグリセロール濃度の関係  
4 種 (wt, Ctrn-KO、mGPD-KO および double-KO) マウスのデータをプロットした。

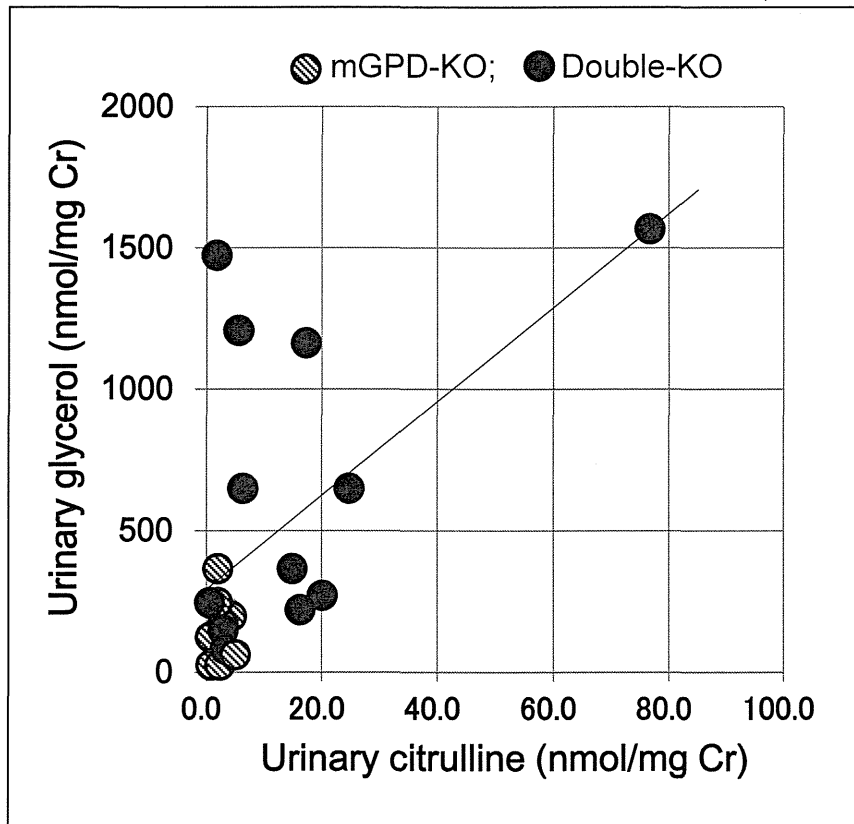


図6 摂食マウス尿中シトルリン濃度とグリセロール濃度の関係  
2 種 (mGPD-KO および double-KO) マウスのデータをプロットした。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
シトルリン欠損症患者における臨床像の多様性の解明と致死性脳症の発症予防法の開発

## 成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞を用いた新規疾患モデルの作製

研究協力者 長船 健二 京都大学 iPS 細胞研究所

共同研究者 小高 真希\*、吉利エレナ幸江\*、池田 修一\*\*、矢崎 正英\*\*

\*京都大学 iPS 細胞研究所、\*\*信州大学医学部第三内科

**研究要旨** 成人型シトルリン血症は、未だ有効な治療法の確立されていない致死性代謝性脳症を引き起こす難治性疾患である。また、同疾患は、肝細胞内の脂肪変性と肝線維症から肝硬変に至る非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)の病態を呈することが知られている。本研究では、成人型シトルリン血症の患者皮膚細胞より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同疾患の罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導可能であることを確認した。そして、成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞由来の肝細胞は、同疾患の原因遺伝子である Citrin や尿素サイクル関連遺伝子を発現することも確認した。これらの結果は、成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞の肝細胞への分化誘導系を用いた試験管内疾患モデル作製の可能性を示唆する。

### A. 研究目的

尿素サイクル関連分子である Citrin の欠損で発症する常染色体劣性疾患である成人型シトルリン血症は、肝移植以外に根治的治療法のない致死性代謝性脳症を引き起こす難治性疾患である。また、本疾患は、肝細胞内の脂肪変性と肝線維症から肝硬変に至る非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)の病態を呈する。本邦の肝疾患としてウイルス性肝炎が減少し、今後、肥満人口の急増を受けて、メタボリックシンドロームの肝病変である NASH から肝硬変、肝癌へ進展する患者が増加することが予想されている。

シトルリン血症と NASH の病態解明や新規治療法の開発研究に遺伝子改変マウスなどが使用されているが、ヒトの病態に完全には合致していないため、病態を正確に模倣した新規疾患モデルの開発が望まれている。そこで、申請者は、成人型シトルリン血症の患者由来 iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の肝細胞への分化系を用いることで同疾患と NASH に対する新規疾患モデルが開発できるのではないかと考えた。

本研究の目的は、成人型シトルリン血症患者体細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し試験管内で肝細胞に分化誘導することによって、同疾患の病態を再現する新規の試験管内疾患モデルを開発

することである。そして、肝移植以外に根治的治療法のない致死性代謝性脳症であるシトルリン血症と NASH の治療法開発に繋げることである。

### B. 研究方法

信州大学医学部附属病院に通院加療中の成人型シトルリン血症 2 例の患者から同意取得後に皮膚生検を行う。そして、皮膚塊を培養し増殖させた線維芽細胞にレトロウイルスベクターによる初期化誘導 4 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)または 3 因子(c-MYC を除く)の遺伝子導入(Takahashi K, 2007)にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。

さらに、樹立された iPS 細胞を成人型シトルリン血症の罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導することにより、病態を模倣する試験管内疾患モデルの作製を行う。併せて既報のヒト ES 細胞（胚性幹細胞）から肝細胞への分化誘導法を改良し、より効率よくかつより成熟した肝細胞の作製方法も検討する。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部「医の倫理委員会」にて承認された研究計画に基づき、匿名化の実施および遺伝情報を厳密に管理することによって、患者個人情報の漏洩によるプ

ライバシー侵害の防止を徹底して行う。

### C. 研究結果

2 例の成人型シトルリン血症患者 (I(851del4)/II(IVS11+1G>A) の compound heterozygote の SLC25A13 遺伝子変異が同定されている 30 歳代女性と I(851del4) の homozygote の変異が同定されている 40 歳代男性。2 例共に肝移植後。) の皮膚生検組織より線維芽細胞を増殖させ、iPS 細胞株を樹立した (図 1 左)。そして、導入初期化因子のサイレンシングの程度を評価し、1 例目では 72 株中 9 株、2 例目では 36 株中 3 株で十分なサイレンシングを確認した。次に、NANOG, OCT3/4, SOX2, TRA1-60, TRA1-81 などの未分化マーカーの発現、胚様体、奇形腫形成による三胚葉成分 (神経、軟骨、消化管上皮など) への多分化能を確認した。また、既報のヒト ES 細胞から肝臓系譜への分化誘導法 (Hay DC, 2008) を改良し、成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞から罹患細胞種である肝細胞への試験管内での分化誘導を行った (図 1 右)。そして、RT-PCR 法と免疫染色法にて、ALBUMIN, AFP, AAT, CYP3A4, CYP3A5 などの肝細胞マーカーに加え、Citritin や ASL (argininosuccinate lyase), ARG1 (arginase 1), ASS (argininosuccinate synthetase), OTC (Ornithine transcarbamoylase) などの尿素サイクル関連遺伝子の発現を確認した。

### D. 考察

成人型シトルリン血症の患者体細胞から、レトロウイルスベクターを用いた山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) および 3 因子 (c-Myc を除く) の遺伝子導入による疾患特異的 iPS 細胞樹立が可能であることが判明した。さらに、樹立された iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様の未分化状態特異的マーカー遺伝子を発現し、胚様体、奇形腫形成にてヒト ES 細胞と同様の三胚葉成分への多分化能を示した。また、成人型シトルリン血症

特異的 iPS 細胞は、試験管内で肝細胞へ分化可能であった。

本疾患に対するマウスなどの動物モデルは複数開発されているが、ヒトの病態を完全に模倣できる動物モデルは存在しておらず、本研究で確立した疾患肝細胞モデルは成人型シトルリン血症の病態を解析する上で有用なツールになるものとする。

### E. 結論

成人型シトルリン血症の患者体細胞から疾患特異的 iPS 細胞は樹立可能であり、樹立された iPS 細胞から分化誘導された肝細胞は試験管内疾患モデル作製に使用可能である。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 近藤 恭士、稲垣 暢也、長船 健二: ヒト ES 細胞、iPS 細胞の heterogeneity と再生医療に与える影響. 内分泌・糖尿病・代謝内科 (科学評論社) 印刷中.
- 2) 長船 健二: iPS細胞の臨床応用の見通し. 日本医事新報 (日本医事新報社) No. 4628: 46-47, 2013.
- 3) 前 伸一、荒岡 利和、長船 健二: iPS 細胞培養法. 分子腎臓病学実験操作法 (中外医学社) 印刷中.

#### 2. 学会発表

- 1) Kotaka M, Yasuda K, Kurose Y, Ohta A, Uesugi M, Yamanaka S, Osafune K: Development of efficient hepatic differentiation methods from human iPSCs/ESCs by using low-molecular weight compounds. 10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. June 14, 2012.

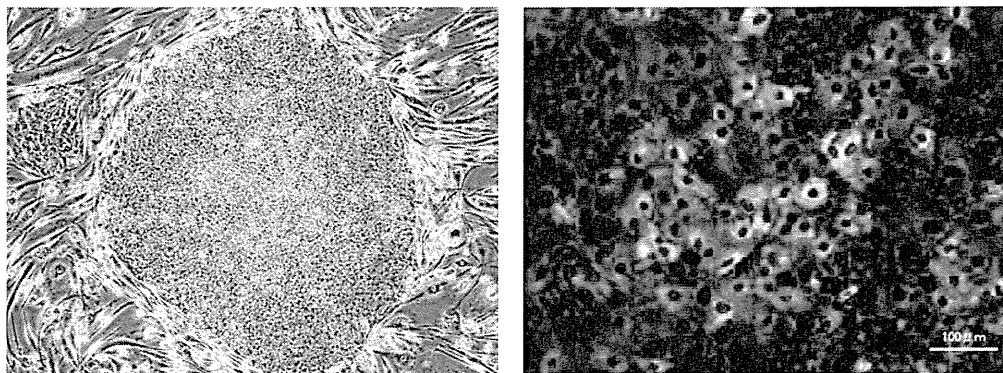


図 1  
成人型シトルリン血症患者の皮膚線維芽細胞から樹立された iPS 細胞（左）、および、  
その iPS 細胞から分化誘導された肝細胞  
（右; 抗アルブミン免疫染色。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。）。