

表 1 本研究の文献研究から探索された国内の小児・学童期用 FFQ の概要

調査票	対象年齢	記入者	妥当性研究
A brief self-administrated diet history questionnaire for Japanese children and adolescents(BDHQCA)	小学校高学年 (10-11 歳*) 中高生 (13-14 歳*)	本人 (10 歳の 場合は親と共 に記入する必 要あり)	カロテノイド、 n-3 系不飽和脂肪 酸
A 75-item food frequency questionnaire(CFFQ)	3-11 歳	母親	エネルギー及び タンパク質等 26 種類の栄養素
A self-administrated FFQ with eighty-two food items (FFQW82)	12-13 歳	本人	エネルギー及び タンパク質等 9 種類の栄養素

* 妥当性研究の対象年齢

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

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

研究分担者 乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 心身内科学分野

共同研究者 牛飼美晴*、佐伯武頼**、矢崎正英***、池田修一***

*鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 心身内科学分野

**熊本大学生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野

***信州大学医学部内科学 脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究要旨 鹿児島大学（病態生化学）から信州大学（脳神経外科、リウマチ・膠原病内科）へ移管する試料・資料を整理した。今後、その内容は公開され、有効利用できることが示唆された。

A. 研究目的

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子病態生化学（現医化学）講座では、1980年～2010年まで主に尿素サイクル酵素欠損症、シトリン欠損症のアミノ酸分析、酵素診断および遺伝子診断を行ってきたが、2010年12月小林准教授の死去に伴い、本システムは終了した。終了に伴い、資料と試料を信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科に移管することで鹿児島大学医歯学総合研究科倫理委員会の承認を得た。移管に際して資料と試料を整理したので、その内容を公開し、有効利用できるようにすることを目的とした。

B. 研究方法

当該講座において、アミノ酸分析、酵素診断（約500例）、遺伝子解析（約2000例）を行った試料とその資料を整理した。

（倫理面への配慮）

DNA 試料は所定の同意書を得たものであり、今回、倫理委員会では連結不可能匿名化の条件で移管を承認されたものである。

C. 研究結果

当該講座研究室において診断した疾患名と例数は以下のとおりである。Carbamoyl phosphate synthetase 欠損症 29 例、Ornithine carbamoyl

transferase 欠損症 58 例、CTLN1 100 例（内外国からの依頼解析数 42 例）、アルギニノコハク酸尿症 21 例、アルギニン血症 3 例、CTLN2 203 例（内外国からの依頼解析数 6 例）、NICCD 369 例（内外国からの依頼解析数 117 例）、HHH 症候群 5 例、Lysinuric protein intolerance 6 例であった。なお、特記すべきは、診断がつかなかった高アンモニア血症（HA）症例が 80 例あることであり、SLC25A13 変異（-）症例 953 例であった。保有する約 1300 例の DNA は主にシトリン欠損症診断に用いたものであり、また、約 310 例の CTLN1、CTLN2、HA 症例由来組織・細胞を保有している。

D. 考察

本講座では本来シトルリン血症の解析から研究を開始したので、CTLN1、CTLN2 および NICCD 症例が多く、外国からの症例解析も多いが、その他の尿素サイクル酵素異常症および関連疾患の解析も行ってきた。診断名不明の高アンモニア血症の中にはミトコンドリア病、その他これまでに解析できなかった疾患も含まれている可能性があると考えている。特にシトリン欠損症症例および関連の組織、DNA 試料が多いので、これをシトリン欠損症研究に有効に利用したい。

E. 結論

鹿児島大学大学院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症例と利用可能な試料数を列挙した。

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.* Nov;107(3):322-9. 2012

2. 学会発表

1) 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

2) 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 -3phosphate 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

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

Number of cases with urea cycle-related diseases
analyzed at Department of Biochemistry, Kagoshima University

Disease	Number of cases (outside of Japan)
Carbamoylphosphate synthetase I (CPS) Deficiency	29
Ornithine carbamoyltransferase (OTC) Deficiency	58
Argininosuccinate synthetase (ASS) Deficiency	100 (42)
Argininosuccinate lyase (ASL) Deficiency	21
Arginase Deficiency	3
Citrin Deficiency	
CTLN2	203 (6)
NICCD	369 (117)
HHH Syndrome	5
Lysinuric protein intolerance (LPI)	6
Hyperammonemia (unknown cause)	80
SLC25A13 mutation negative	953 (555)
Total	1827 (706)

表 1

鹿児島大学で解析された（1980年～2010年）尿素サイクル酵素異常症および関連疾患数

Number of samples (tissue or cells, and DNA) kept

Disease	Number (tissue or cells)	(DNA)
CPS deficiency	23	
OTC deficiency	20	
CTLN1 (ASS deficiency)	36	
ASL deficiency	21	
Arginase deficiency	1	
Citrin Deficiency		
CTLN2	111	203
NICCD	26	369
HHH Syndrome	0	
Lysinuric protein intolerance (LPI)	1	
Hyperammonemia (unknown cause)	63	
SLC25A13 mutation negative	11	953
Total	313	1525

表 2

鹿児島大学で保有している尿素サイクル酵素異常症および関連疾患の組織・細胞、DNA 数

[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

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
Yazaki M, Kinoshita M, Ogawa S, Fujimi S, Matsushima A, Hineno A, Tazawa KI, Fukushima K, Kimura R, Yanagida M, Matsunaga H, <u>Saheki T, Ikeda SI</u>	A 73-year-old patient with adult-onset type II citrullinemia successfully treated by sodium pyruvate and arginine.	Clin Neurol Neurosurg.			2012 (in press)
Tazawa K, Yazaki M, Fukushima K, Ogata S, Makuuchi M, Morita K, Hiraishi H, Iwasaki Y, Kita J, Kubota K, <u>Ikeda S</u>	Patient with adult-onset type II citrullinemia beginning 2 years after operation for duodenal malignant somatostatinoma: indication for liver transplantation.	Hepatol Res			2012 (in press)
Yazaki M, Hineno A, Matsushima A, Ozawa K, Kishida D, Tazawa K, Fukushima K, Urata K, Ikegami T, Miyagawa S, <u>Ikeda S</u>	First two cases of adult-onset type II citrullinemia successfully treated by deceased-donor liver transplantation in Japan.	Hepatol Res	42	934-939	2012
Numata Y, Onuma A, Kobayashi Y, Sato-Shirai I, Tanaka S, Kobayashi S, Wakusawa K, Inui T, <u>Kure S, Haginoya K</u>	Brain magnetic resonance imaging, and motor and intellectual functioning in 86 patients born at term with spastic diplegia.	Dev Med Child Neurol	12013	167-172	2012
Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, <u>Kure S</u>	Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans.	Hum Mol Genet	21	1496-1503	2012
Miyatake S, Miyake N, Touho H,	Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe	Neurology	78	803-810	2012

Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, <u>Kure S</u> , and Matsumoto N	form of moyamoya disease.				
Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, <u>Kure S</u> , Niihori T, Matsubara Y, Costello and CFC syndrome study group in Japan	Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey.	Am J Med Genet A.	158	1083-1094	2012
Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Numata Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Fujiwara I, <u>Kure S</u>	Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome.	J Neurol Sci.	315	77-81	2012
Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, <u>Saheki T</u> , Kobayashi K, Ohura T, <u>Kure S</u> .	Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13.	Mol Genet Metab.	105	553-558	2012
Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, <u>Kure S</u> , Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N	Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.	PLoS One	7	e37892	2012
Uchida N, Sakamoto O, Irie M, Abukawa	Two novel mutations in the lactase gene in a Japanese infant with congenital lactase	Tohoku J Exp Med.	227	69-72	2012

D, Takeyama J, <u>Kure S</u> , Tsuchiya S.	deficiency.				
Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, <u>Kure S</u> , Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y	Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.	Leuk Res.	36	1009-1015	2012
Saito H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, <u>Hayasaka K</u> , Matsumoto N	Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome.	Ann Neurol.	72	298-300	2012
Takahashi Y, Koyama S, Tanaka H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Haga H, Watanabe H, Toyota K, Numakura C, <u>Hayasaka K</u> , Kato T	An elderly Japanese patient with adult-onset type II citrullinemia with a novel D493G mutation in the SLC25A13 gene.	Intern Med.	51	2131-4	2012
<u>小松通治</u> 、木村岳史、田中直樹、田中榮司	非アルコール性脂肪性肝炎	検査と技術	40	798-803	2012
Saito H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, <u>Hayasaka K</u> , Matsumoto N	CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia.	Epilepsia	53	1441-9	2012
<u>Hayasaka K</u> , Numakura C, Toyota K, Kimura T	Treatment with lactose (galactose)-restricted and medium-chain triglyceride-supplemented formula for neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency.	JIMD Reports	2	37-44	2012
<u>Saheki T</u> , Inoue K, Ono H, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Furuie	Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Mol Genet Metab	107	322-329	2012

S, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, <u>Inui A</u> , Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Yamamura K, Kobayashi K	double-knockout mouse model of human citrin deficiency.				
Gómez-Galán M, Makarova J, Llorente-Folch I, <u>Saheki T</u> , 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	306-317	2012
Wang JS, Wang XH, Zheng YJ, Fu HY, Chen R, Lu Y, Fang LJ, <u>Saheki T</u> , Kobayashi K	Biochemical characteristics of neonatal cholestasis induced by citrin deficiency.	World J Gastroenterol.	18	5601-5608	2012
Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, <u>Saheki T</u> , 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	347-362	2012
<u>佐伯武頼</u>	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

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
佐伯武頼	: IV. 先天代謝異常症 63. シトリン欠損症	「小児内科」「小児外科」編集委員会	小児疾患の診断治療基準 第4版	東京医学社	東京	2012	148-149
Kobayashi K, Saheki T, Song YZ.	Citrin Deficiency.	Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP	GeneReviews™ [Internet].	University of Washington,	Seattle	2005 Sep 16 [updated 2012 Jan 05]	

[IV] 本年度の活動報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業

「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（研究班初年度）ワークショップ

日時：平成 24 年 7 月 6 日（金） 14:00－16:30

場所：KKR ホテル東京 11 階 松（東京都千代田区大手町 1-4-1）

プログラム

14:00－14:20

1. 研究班の目的と実施計画

信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 池田修一

14:25－14:35

2. 昨年までのシトリン欠損症 研究班における成果報告

信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 矢崎正英

14:40－15:00

3. シトリン欠損症の病態—動物モデルでの知見

熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野 佐伯武頼

（15:00－15:15）コーヒーブレイク

15:15－15:35

4. 悪液質の最近の進歩—食欲調節ペプチドの立場から

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 心身内科学 乾 明夫

15:40－16:00

5. シトリン欠損症が疑われる症状と年齢

東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 呉 繁夫

16:00－16:30

総合討論

連絡事項

平成 24 年度研究報告会

日時：平成 25 年 1 月 18 日（金） 13:30－17:00 場所：KKE ホテル東京

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業

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

研究代表者 池田修一

事務局 矢崎正英、倉科美鈴

信州大学医学部内科学（脳神経内科、リウマチ・膠原病内科）

〒390-8621 松本市旭3-1-1 TEL 0263-37-2673 FAX 0263-37-3427 e-mail misuzuku@shinshu-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金 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 研究班

平成 24 年度 研究報告会 抄録集

日時：平成 25 年 1 月 18 日（金）13:30～17:00
場所：KKR ホテル東京 11 階鳳凰
（東京都千代田区大手町 1-4-1）

厚生労働科学研究費補助金

「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」
研究代表者 池田修一

事務局 矢崎正英、倉科美鈴

信州大学医学部内科学（脳神経内科、リウマチ・膠原病内科）

〒390-8621 松本市旭 3-1-1

TEL 0263-37-2673 FAX 0263-37-3427

e-mail misuzuku@shinshu-u.ac.jp

13:30 開会挨拶 研究代表者 池田修一

13:40~14:10

セッション1 動物モデル, 基礎研究

座長: 吳 繁夫

1. シトリン欠損症モデルマウス Ctrn/mGPD double-KO マウスを用いる病態解析の現状と課題

13:40~13:55

○^{さへきたけより}佐伯武頼¹⁾、藤本侑希¹⁾、古家澄江¹⁾、山村研一¹⁾、牛飼美晴²⁾、黒田英志²⁾、
乾 明夫²⁾

熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野¹⁾、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科²⁾

2. 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

13:55~14:10

○^{こたかまき}小高真希¹⁾、吉利エレナ幸江¹⁾、矢崎正英²⁾、池田修一²⁾、長船健二¹⁾、
京都大学 iPS 細胞研究所¹⁾、信州大学医学部第三内科²⁾

14:10~14:40

セッション2 発症機序解明

座長: 乾 明夫

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

14:10~14:25

○^{さへきたけより}佐伯武頼¹⁾、古家澄江¹⁾、山村研一¹⁾、牛飼美晴²⁾、乾 明夫²⁾、矢崎正英³⁾、
池田修一³⁾

熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野¹⁾、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科²⁾、信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科³⁾

4. シトリン欠損症による脂肪肝生成メカニズムの解析

○小松通治¹⁾、木村岳史¹⁾、青山俊文²⁾、田中榮司¹⁾

信州大学医学部第二内科¹⁾、信州大学大学院医学系研究科加齢適応医科学系独立専攻代謝制御学分野²⁾

休憩 14:40-15:00

15:00～15:30

セッション3 臨床像の多様性と治療 (I) 座長：早坂 清

5. シトリン欠損症の遺伝子解析からわかる変異遺伝子および症状の傾向

15:00～15:15

○呉 繁夫¹⁾、市野井那津子¹⁾、菊池敦生¹⁾、坂本 修¹⁾、大浦敏博²⁾

東北大学医学系研究科小児病態学分野¹⁾、仙台市立病院小児科²⁾

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研究

15:15～15:30

池田修一¹⁾、○矢崎正英¹⁾、福島和広¹⁾、小松通治²⁾、中村未生³⁾

信州大学医学部 脳神経内科、リウマチ・膠原病内科¹⁾、消化器内科²⁾、附属病院栄養部

15:30～16:00

セッション4 臨床像の多様性と治療 (II) 座長：佐伯武頼

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

15:30～15:45

○大浦敏博¹⁾、佐藤 亮²⁾

仙台市立病院小児科¹⁾、岩手県立中央病院小児科²⁾

8. CTLN2 における中鎖脂肪酸療法について

15:45～16:00

○^{はやさか}早坂 ^{きよし}清、沼倉 周彦

山形大学医学部小児科

16:00～16:30

セッション5 疫学調査、その他

座長：小松通治

9. 小児用食事摂取調査票の探索ーシトリン欠損症スクリーニングへの応用

16:00～16:15

栗山進一^{1),2)}、○^{いしくろまみ}石黒真美²⁾、小原拓²⁾、目時弘仁²⁾、菊谷昌浩²⁾

東北大学災害科学国際研究所¹⁾

東北大学東北メディカル・メガバンク機構²⁾

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内科、リウマチ・膠原病内科への移転

16:15～16:30

○^{さへきたけより}佐伯武頼¹⁾、牛飼美晴²⁾、乾 明夫²⁾、矢崎正英³⁾、池田修一³⁾

熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野¹⁾、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科²⁾、信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科³⁾

16:30～16:50

班構成員連絡会議

16:50

閉会挨拶 研究代表者 池田修一

1. シトリン欠損症モデルマウス **Ctrn/mGPD double-KO** マウスを用いる病態解析の現状と課題

[分担研究者] 氏名：佐伯武頼

所属：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 熊本大学生命資源研究支援センター疾患モデル分野

古家澄江 熊本大学生命資源研究支援センター疾患モデル分野

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

黒田英志 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科

牛飼美晴 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科

乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科

[目的] Ctrn/mGPD double-KO マウスはヒトシトリン欠損症のモデルとして病態解析、治療法の開発にこれまで有効であった。本マウスを用いる病態解析、治療法の開発における現状を述べ、その問題点と今後の解決策について考察し、議論の材料とすることを目的とする。

[方法] 野生型と Ctrn-KO マウスは Ctrn^{+/+} (ヘテロ接合体) マウスの、mGPD-KO と Ctrn.mGPD double-KO マウスは mGPD^{-/-}/Ctrn^{+/+} マウスの交配によって得、80–160 日齢で実験に使用した。25%ショ糖 (5g/kg) 溶液経口負荷試験の対象には生理的食塩水を用いた。治療効果は、対象物質をショ糖溶液に溶かし、投与した。肝臓は freeze-clamp 法によって採取し、液体窒素下で粉末とし、3%PCA (perchloric acid)、または adenine nucleotide (AN) 定量には、これに 2mM EDTA を加えた液で homogenize し、遠心上清を中和して測定に用いた。AN の定量は HPLC にて行った。G3P と glycerol は酵素と NAD⁺を用いる方法で、glycerol+G3P は peroxidase を用いる方法で定量した。

[結果および考察] (1) 本マウスの育種は、新生児期の食殺などがあり、実験に必要な数を得る事が困難であり、2 施設 (鹿児島大学と徳島文理大学、現在は熊本大学) で行い相補い数を確保してきたが、育種場所の変更、感染などがあると回復に時間を要した。また、現在のモデルマウスの問題点も考察したい。(2) ショ糖投与により、肝内 glycerol 3-phosphate (G3P)の上昇が著しいなどの代謝変動を生じるが、ピルビン酸ナトリウム、アミノ酸、MCT (medium-chain triglyceride)を添加するとそれらの代謝変動を抑制する。AN についてはこれまで完全に解明できていなかったもので、今回、HPLC を用いて ATP, ADP, AMP を定量した。その結果、ショ糖投与によって、mGPD-KO と double-KO の肝内 ATP レベルが低下することが判明した。今後は、治療効果が見られた物質の ATP 低下への効果、代謝への ATP 低下の効果などを検討する予定である。

(3) ショ糖投与による代謝変動をより簡便に検出することを目指し、存在が知られる尿中 G3P を測定した。G3P は十分に検出できたが、摂食条件下では double-KO と mGPD-KO マウスとの間に有意差は得られなかった。しかし意外にも glycerol 濃度に

は他のマウス群に比し、double-KO マウスで有意に高いことが判明した。今後、血中濃度変動、ヒトでの検討を予定している。

〔結論〕 Ctrn/mGPD double-KO マウスの育種は現在、順調に推移している。ショ糖投与によって double-KO と mGPD-KO マウスの肝内 ATP 濃度は同様に低下した。マウスの尿中に G3P とグリセロールが検出できた。G3P 濃度の変動に比し、glycerol のマウス間の変動が大きく、double-KO マウスで増加していた。

2. 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] 氏名：長船健二

所属：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 京都大学 iPS 細胞研究所

矢崎正英、池田修一 信州大学医学部第三内科

[目的]

シトルリン血症の病態に完全に合致する動物モデルがない為、ヒト細胞を用いた新規疾患モデルの開発が期待される。そこで、成人型シトルリン血症患者の体細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、試験管内で肝細胞へ分化誘導することにより同疾患の病態を再現し、新規の疾患モデルを開発することを目的とする。

[方法]

信州大学医学部第三内科に通院する成人型シトルリン血症患者 2 症例(40 歳台男性と 30 歳台女性)の皮膚線維芽細胞からレトロウイルスベクターによる山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 及び 3 因子 (c-Myc を除く) の遺伝子導入にて iPS 細胞を樹立する。樹立に際して導入を行ったリプログラミング因子の silencing の程度を定量 PCR で確認し、未分化マーカー発現の検討によって未分化状態維持を確認する。また、胚様体や奇形種を作製し、外・中・内胚葉の三胚葉系への多分化能の確認や核型異常の有無の確認を行う。成人型シトルリン血症患者由来の iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、肝細胞マーカーであるアルブミン遺伝子や薬物代謝酵素遺伝子に加え、同疾患の病態形成に関与する尿素サイクル関連遺伝子の発現などを検討する。

[結果および考察]

樹立に際して遺伝子導入を行ったリプログラミング因子の silencing の程度を定量 PCR で確認した結果、1 例目では 72 クローン中 9 クローン、2 例目では 36 クローン中 3 クローンで silencing が確認できた。それらのクローンの内、肝細胞へ分化誘導を行い、アルブミン陽性細胞へ効率よく分化誘導できたクローンについて、OCT3/4, NANOG, SSEA4, TRA1-81 などの未分化マーカーの発現が確認された。また、胚様体および奇形種を作製し、三胚葉系への多分化能を有することが確認された。次に成人型シトルリン血症患者由来の iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導した結果、肝細胞マーカーであるアルブミンや AAT だけでなく、肝細胞成熟マーカーである薬物代謝酵素遺伝子 (CYP3A4/CYP3A5/CYP3A7/CYP7A1) や尿素サイクル関連遺伝子 (CPS1/OTC/ASS/ASL/Citrin) が発現していた。また、分化誘導した肝細胞ではグルコーゲン蓄積が PAS 染色により確認された。

[結論]

成人型シトルリン血症患者の体細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立することが可能であった。成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞は、同疾患の罹患細胞種である肝細胞へ分化誘導可能であり、尿素サイクル関連遺伝子を発現することを確認した。今後、同疾患の病態を模倣しているか否かの詳細な検討を行う予定である。