

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

[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] 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
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
矢崎正英 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
池田修一 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

[目的] シトリン欠損症は主に新生児期の NICCD と成人期の CTLN2 の 2 病態からなる疾患概念である。ほぼすべての遺伝子異常ホモ接合体者（頻度 1/17,000）は NICCD に罹患すると思われるが、CTLN2 はその 1/5~1/15 であり、CTLN2 罹患には何らかの要因が関与する。その一つは、病態発症の原因となる糖質摂取の増加（環境要因）である。もう一つは遺伝要因である。mGPD (mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase) はその候補遺伝子である。シトリン欠損 Ctrn-KO マウスは生体レベルでは無症状であるが、mGPD をも欠損した Ctrn/mGPD double-KO マウスは糖投与後に増悪する高アンモニア血症など特有の症状を示す。Ctrn-KO マウスは糖投与では異常を示さないが、アルコールやグリセロール投与によって肝内 G3P とシトルリン濃度が顕著に上昇する。すなわち、ヒトでも mGPD が高活性であれば、CTLN2 を発症しない可能性がある。ヒト mGPD が CTLN2 に関連するかどうか検討し候補遺伝子としての可能性を探った。

[方法] ヒト mGPD で血中グリセロールレベルと関連する SNP (H264R 多型) が存在するとの報告がある (St-Pierre J et al. MGM 2001;7:209-17)。本多型が CTLN2 に関連するかどうかを検討した。鹿児島大学医歯学総合研究科分子病態生化学においてシトリン欠損症の診断後、説明を受け、保存し、研究に用いることへの同意書が作成されている DNA 試料、*SLC25A13* 変異なしの者（対照者；80名）、NICCD 患者（90名）、および CTLN2 患者（65名）を用いた。新たに設定したプライマーセットを用いてエクソン7を増幅後、制限酵素 *Nla*III を用い、PCR 産物を切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、切断パターンから HH, HR, RR の診断を行った。

[結果および考察] *SLC5A13* 変異なし(対象者)、NICCD 罹患者、CTLN2 罹患者での観察された HH, HR, RR の例数はそれぞれ、58 : 36 : 6、63 : 34 : 2、41 : 20 : 4 であり、相互に有意差はなかった。以上の結果は、ヒトにおいて mGPD 多型は CTLN2 と関連がないことを示す。今後はエクソーム解析によって、関連する遺伝子を探索する予定である。

[結論] ヒト mGPD の H264R と CTLN2 罹患との連関性は認められなかった。

4. シトリン欠損症による脂肪肝生成メカニズムの解析

[分担研究者] 氏名：小松 通治

所属：信州大学医学部第二内科

[共同研究者] 木村 岳史 所属：信州大学医学部第二内科

青山 俊文 所属：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

田中 榮司 所属：信州大学医学部第二内科

[目的]

成人発症 2 型シトルリン血症において脂肪肝を高率に合併することを報告したが、その生成メカニズムは明らかではない。また脂肪沈着の主体は中性脂肪であり、ヒト肝組織を用いて中性脂肪代謝関連遺伝子を中心に解析することにより生成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

[方法]

シトリン欠損症患者より肝生検等で得られた肝組織 14 検体を脂肪沈着 < 33% 9 検体、> 33% 5 検体に分けて脂肪酸-中性脂肪代謝関連遺伝子について解析した。Normal control として肝移植ドナーより得た 7 検体も併せて解析した。

[結果および考察]

脂肪酸取り込み系 (FAT)、輸送系 (FABP)、分解系 (CPT1 α 、TP α 、MCAD、VLAD、CYP4A13)、分泌系 (MTP) で m-RNA レベルでの発現低下を認め、脂肪沈着の程度により有意差を持って低下していた。またその調節因子である PPAR α の mRNA レベルも発現低下しており、脂肪沈着に比例して有意差を持って低下していた。

[結論]

シトリン欠損症における脂肪肝の生成メカニズムには PPAR α ならびにその関連遺伝子が関与している可能性が示唆された。

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

[分担研究者] 氏名：呉 繁夫

所属：東北大学医学系研究科小児病態学分野

[共同研究者]

氏名：市野井那津子

所属：東北大学医学系研究科小児病態学分野

氏名：菊池敦生

所属：東北大学医学系研究科小児病態学分野

氏名：坂本 修

所属：東北大学医学系研究科小児病態学分野

氏名：大浦敏博

所属：仙台市立病院小児科

[目的]

シトリン欠損症（以下、本症）は、*SLC25A13* の遺伝的変異によって発症する、常染色体劣性遺伝性疾患である。症状は、多彩で非特異的な場合が多く、その確定診断は遺伝子診断によって行われる。我々は、本症における 11 種（mutation [I]、[II]、[III]、[IV]、[V]、[VI]、[VII]、[VIII]、[IX]、[XIX]、[XXI]）の高頻度遺伝子変異を Real-time PCR を用いて簡便かつ迅速に検出する方法を確立した（Kikuchi A, Mol Genet Metab, 2012;105:553）。本遺伝子解析法によって本症と確定診断がついた患者の診断年齢、診断の契機となった症状などについて解析する。2 アレルとも検出された症例数と 1 アレルのみ判明した症例数との比をもとに変異アレルの検出率を検討する。

[方法]

2010年1月から2012年6月まで本症の遺伝子解析のため当施設に送付された検体 114 件の遺伝子型、臨床像の解析を行った。

[結果および考察]

114 例中、ホモ接合体は mutation [II]が 8 例と最も多く、mutation [I]、mutation [IV]、mutation [VI]がそれぞれ 1 例ずつであった。複合ヘテロ接合体は 25 例であり、両アレルとも判明した症例は合わせて 36 例（31.6%）であった。保因者（患者の家族）9 例を除き、1 アレルのみ判明した症例が 10 例（8%）であった。両アレルとも不明であった症例は 59 例であった。診断の年齢は 1 歳未満が 72%を占めた。診断の契機となった症状は、黄疸または便色異常が 21 例（45%）、体重増加不良 13 例（28%）、新生児マススクリーニング 8 例（17%）などが多くみられた。小児とは異なり、成人患者では、行動異常、脳症が初発症状として認められた。本解析法における変異アレルの検出効率は 87%程度と推定された。

[結論]

本症の診断は、症状や検査所見のみでは困難であり、確定診断における遺伝子解析の有用性が示唆された。

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

[分担研究者] 氏名：池田修一

所属：信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

[共同研究者] ○矢崎正英 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

福島和広 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

小松通治 所属：信州大学医学部消化器内科

中村未生 所属：信州大学医学部附属病院 栄養部

[目的] 成人型シトルリン血症 (CTLN2) 患者の臨床像を検討し、CTLN2 の臨床的多様性を明らかにする。

[方法] 1990 年以降、当科に入院加療歴のある本症患者 34 名（男性 20 名；女性 14 名）の臨床像について検討した。

[結果および考察] 脳症初発年齢は平均 39.7 ± 14.7 歳で、最小年齢 11 歳から最高年齢が 73 歳であった。脳症の程度は肝性昏睡度 I-V 度と様々であった。1 名で統合失調症、2 名でうつ病として加療されていた。発症誘因が比較的明らかな患者は、3 名（飲酒 1 名、腎不全食 2 名）であった。33 名に飲酒や糖質を嫌う食嗜好が認められたが、73 歳発症の患者では、飲酒も可能であり、特異な食癖は顕著ではなかった。脳症以外の臨床像としては、全例で脂肪肝を認め、7 例 (21%) で脳症発症以前に膵炎の罹患歴が認められた。2 例 (6%) に肝臓癌、1 例で十二指腸ソマトスタチン産生腫瘍を合併していた。また 2 例で多発のう胞腎、1 例で巣状糸球体硬化症による慢性腎不全を併発していた。1 名 (11 歳) で神経性食思不振症・成長障害を合併した。50 歳代発症患者では、20 歳時に原因不明の肝障害を指摘され、肝生検にて遷延性肝炎と診断されていた。

[結論] 本症の臨床像は多様性に富んでおり、脳症発症以前に、肝炎、膵炎、脂肪肝、肝臓癌、神経性食思不振症を併発する。本症と慢性腎障害との関連性は明らかではないが、腎機能低下に対しての蛋白制限食が発症誘因となっていた可能性がある。高齢発症患者では、本症に特異な食癖は目立たず、また飲酒も可能であり、高齢発症の肝性脳症患者には、本症の可能性についても注意が必要である。

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

[研究協力者] 氏名：大浦敏博

所属：仙台市立病院小児科

[共同研究者] 氏名：佐藤 亮、所属：岩手県立中央病院小児科

[症例報告]

症例：4 か月女児

主訴：体重増加不良、遷延性黄疸

家族歴：3歳の兄が新生児期に黄疸を指摘され、光線療法を受けた。

出生・既往歴：38週、2400gで出生。新生児スクリーニング正常（生後5日）。胆道閉鎖症便色スクリーニング正常（色状5）。

現病歴：生後2か月で淡黄色便あり。3か月時に体重増加不良、4か月時に眼球黄染、肝腫大に気付かれ受診した。

現症（生後4か月）：体重4245g (-3.0SD)、身長57.3cm (-2.4SD)、灰白色便（色状3）、肝腫大（2横指）、皮膚・眼球結膜に軽度黄疸あり。

検査データ：D.Bil 5.05 mg/dl, γ -GTP 136 IU/L, AST 214, ALT 104, NH₃ 88 μ g/dl, HPT 32.8 秒

新生児スクリーニング再検値：Gal 33.9 mg/dl, Cit 114 nmol/ml, Cit/Ser 比 1.1

SLC25A13 遺伝子解析：g.IVS11+1G>A/g.IVS11+1G>A

治療：NICCDの診断後母乳を一旦中止し、乳糖除去粉乳100 mLに中鎖脂肪酸（MCT）オイルを2 mL添加したミルクを開始した。さらに脂溶性ビタミン、利胆剤も併用した。

経過：ビリルビン、シトルリン値は1週間で正常化し、体重増加も得られた。

考察：生後4か月で診断されたNICCDの症例を報告した。新生児スクリーニング（日齢5）、胆道閉鎖症便色スクリーニング（1か月）は正常であったが、受診時（4か月）には高ガラクトース血症、高シトルリン血症、灰白色便を認めた。MCTオイルを添加した乳糖除去粉乳が著効した。MCTはNICCD患児のみならずCTLN2症例にも有効性が報告されている。MCTは食品として販売されており、安全性も高い。今後、様々な不定愁訴を訴える患児や発育不良を認める患児を対象にMCTを使用し、その効果を検証したい。

8. CTLN2 における中鎖脂肪酸療法について

[分担研究者] 氏名：早坂 清

所属：山形大学医学部小児科

[共同研究者] 氏名：沼倉 周彦 所属：山形大学医学部小児科

[目的] NICCD 4 症例の治療経験から、中鎖脂肪酸の投与がシトリン欠損症の基本的病態を改善している事が示唆された。今回、CTLN2 の 3 症例について治療を試み、治験得たので報告する。

[症例および方法]

症例 1 51 歳 (男性)

1 年前より体重が 1kg 程減少した。1 ヶ月前より羽ばたき振戦あり。入院。兄 CTLN2 のため 53 歳時に死亡した。

症例 2 62 歳 (男性)

3 ヶ月前に退職し、体重が 4kg 程減少した。1 ヶ月前より徘徊、失禁、羽ばたき振戦あり、入院。

症例 3 62 歳 (女性)

10 ヶ月前の震災のため魚を中心とした食生活が、オニギリなどの炭水化物食 となった。6 ヶ月前より物忘れ、傾眠経口を認め、3 ヶ月前より更に意識水準が低下し、痙攣なども出現した。1 ヶ月前に診断され、入院。

治療 高脂肪低炭水化物食とし、更に中鎖脂肪酸を投与した。

[結果および考察]

いずれも入院後には、高アンモニア脳症を認めず、アンモニアも徐々に低下した。経過から、以下のことが示された。

効果の判定には、アンモニアの日内変動が有用な指標となる。

早期発見、早期治療が有効と考える

食事内容の変更によるためか、一次的に高 TG 血症となるが、経過とともに低下してくる。回復の指標となる可能性がある。

[結論]

治療対象を増やして効果を確認する必要がある。

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

[分担研究者] 氏名：栗山 進一¹⁾、²⁾

所属：1) 東北大学災害科学国際研究所

2) 東北大学東北メディカル・メガバンク機構

[共同研究者] 氏名：石黒 真美²⁾、小原 拓²⁾、目時 弘仁²⁾、菊谷 昌浩²⁾

所属：2) 東北大学東北メディカル・メガバンク機構

[目的]

シトリン欠損症は、新生児～乳児期に発症する新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) と成人発症 2 型シトルリン血症 (CTLN2) の二つの病型に分類される。NICCD を発症後には CTLN2 を発症するまでの間に適応・代償期があり、症状が軽減されるか無症候状態となることが知られている。NICCD の臨床症状は把握が困難であり、しばしば診断に至らずに CTLN2 の発症で初めてシトリン欠損症と診断される場合もある。また、CTLN2 では精神発達遅滞や見当識障害なども併発するため、鑑別に時間を要するケースもある。しかし、CTLN2 では重度の肝機能障害を合併する頻度も多く報告されており、早期発見・治療が重要であることから、適応・代償期におけるシトリン欠損症のスクリーニングが課題である。

シトリン欠損症では、離乳期以降に炭水化物を好まず、高たんぱく・高脂質食を好むという特徴的な食癖があることが報告されており、食事摂取調査がシトリン欠損症のスクリーニングの一手段として有効である可能性が考えられる。実際に、1-33 歳のシトリン欠損症患者 18 人において秤量記録を用いた食物摂取量を調査した研究では、同年代の日本人の平均摂取量と比較し、淡水化物の摂取量が有意に低かった。しかし、シトリン欠損症を広くスクリーニングできるような小児や学童期への簡易な食事摂取調査方法に関しては未だ検討されていない。本研究では、小児や学童期において食事摂取調査票を用いたシトリン欠損症のスクリーニング方法を検討するために、小児や学童期を対象として使用されている食事摂取調査票の探索を行った。

[方法]

日本語又は英語で作成された小児から学齢期を対象とした食事調査票を検索し、内容や対象とする集団を比較した。

[結果および考察]

日本においては一般の小学生や中高生を対象とした簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) などの調査票の使用例があった。海外においては Health Behavior in School-aged Children (HBSC) study で作成された学童期向けの調査票が国際的に使用されていた。

[結論]

小児から学齢期を対象とした食事摂取調査票には様々な種類があり、特に海外で使用されている調査票などは日本においても一般集団で妥当性の検討が必要である。妥当性の検討後には実際のシトリン欠損症患者において食事摂取調査票を基に偏食の傾向を調査し、その上で適応・代償期にある集団でのスクリーニングへの適応を検討していく必要がある。また、今後はシトリン欠損症などの偏食嗜好が認められている先天代謝異常についての調査票も検討していく必要がある。

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

[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] 氏名：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
矢崎正英 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
池田修一 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

[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講座では 1980 年から 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 月小林圭子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する。

[方法] 当該講座において、アミノ酸分析、酵素診断、遺伝子解析を行った試料とその資料を整理した。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。

[結果および考察] 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 102 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 (一) 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。

[結論] 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。

[V] 班構成員名簿

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班

区分	氏名	所属等	職名
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
研究分担者	呉 繁夫	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教授
	栗山 進一	東北大学大学災害科学国際研究所災害公衆衛生学分野	教授
	早坂 清	山形大学医学部小児科学講座	教授
	小松 通治	信州大学医学部内科学、消化器内科	助教
	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	特任教授
	乾 明夫	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会・行動医学講座、心療内科分野	教授
研究協力者	大浦 敏博	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野	臨床教授
	矢崎 正英	信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科	准教授
	長船 健二	京都大学iPS細胞研究所科学技術振興機構 さきがけ	准教授
	岡野 善行	兵庫医科大学遺伝学・臨床遺伝部	非常勤講師
	玉置 知子	兵庫医科大学遺伝学・臨床遺伝部	教授
	塚原 宏一	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学	准教授
事務局	矢崎正英 倉科美鈴	信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1 TEL 0263-37-2673 FAX 0263-37-3427 e-mail mayazaki@shinshu-u.ac.jp	

