

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）
分担研究報告書

肝型ミトコンドリア膜 aspartate glutamate carrier (シトリン) 欠損症モデルマウスにおける
血漿グリセロールの診断的価値

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 特任教授

研究要旨

肝型 aspartate glutamate carrier であるシトリンの欠損に基づくシトリン欠損症モデルマウスではショ糖などの糖質投与によって高アンモニア血症を呈する。そのとき肝内 glycerol 3-phosphate (G3P)が著しく増加し、その診断的価値が高いと報告してきた。しかし、肝内代謝物濃度を簡単には測定できない。そこで、尿中、および血中で肝 G3P 上昇を診断できるマーカーはないかを検討した。その結果、尿中にグリセロールおよび G3P が増加することを見出した。しかし、ショ糖など細胞質 NADH 上昇をもたらす物質の投与によって血漿グリセロールが上昇することから、より診断的価値は、血漿グリセロール測定によってもたらされることを見出した。

A. 研究目的

われわれは1999年に成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) がSLC25A13欠損によることを報告し、その遺伝子産物をシトリンと名づけた。その後、シトリンがMalate aspartate シャトルの一員であるミトコンドリア膜局在の肝型aspartate glutamate carrierであることを明らかにした。さらに同じ遺伝子変異が新生児の肝内胆汁うっ滞症 (NICCD, neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency)の原因遺伝子であることを明らかにし、シトリン欠損症という疾患概念を打ち立てた。マウスモデルはSlc25a13のみの欠損では症状を呈しないが、もうひとつのNADH シャトルであるグリセロリン酸シャトルに關与するmitochondria glycerol 3-phosphate (mGPD)をも欠失させることによって作成したCitrin/mGPD double-KOマウスがヒトシトルリン欠損症の症状を呈し、マウスモデルを打ち立てることができた。本モデルマウスを用い、肝臓における代謝異常解析の結果、細胞質NADHを増加させる糖質の毒性(糖質投与で高アンモニア血症を起こすなど)の機構解明を行ってきた。その結果、ショ糖などの糖質投与後には肝内のG3Pが著しく増加することを報告し、その診断的意義を述べてきた。しかし、肝臓内の代謝物変動を臨床的には容易には用いることができない。そこで、G3P、またはその代謝物を尿や血中で検出できれば、診断的意義は高まるとともに、治療薬の開発にも有用と考え、本研究を行った。

B. 研究方法

4種のマウス (13-24週齢)、野生型 (wt; Ctrn^{+/+}/mGPD^{+/+})、Ctrn-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{+/+})、Ctrn/mGPD double-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{-/-})マウスを実験に使用した。採尿はマウスを代謝ケージに入れることで行った。餌を投与している摂食時と1晩絶食後、餌の入っていない代謝ケージで飼育した絶食時、いずれも8:00から17:00までの間、尿を採取した。採血は、ソムノペンチル (10倍希釈液を10ml/kg量) 投与し、心臓からヘパリン採血し、直ちに遠心し血漿を得た。マウスに、胃管を通じて強制的にショ糖 (25%; 5g

/kg)、エタノール (9%V/V; 1.4g/kg)、ピルビン酸ナトリウム (Na-Pyr; 1M; 20mmol/kg)、トリプトン (25%; 5g/kg)、アラニン (1M; 20mmol/kg)、medium-chain triglyceride (MCT; 5%; 1g/kg) を単独、または合わせて投与し、1時間後に麻酔下採血、または頸椎脱臼し、肝臓をfreeze-clamp法で採取した。

尿中のG3Pとglycerol、および肝中G3Pは酵素法によって定量した³⁾。血漿グリセロールは市販のキット (RANDOX) で測定した。血中アンモニアはアンモニアテストワコー (和光純薬) を用いて定量した。なお、尿中濃度は、クレアチンをクレアチニンキット (カイノス) で定量し、クレアチニン比で表した。

尿中のG3Pとグリセロール濃度は、エクセルにてQUARTILEを用いて四分位数を求め、箱ひげ図 (box plot) を作成した。尿中代謝物のデータの2群間の有意差検定についてはJMPソフトウェアを用いノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney U test) で検定した。血漿中グリセロール濃度のデータはすべて平均 ± SDで表し、2群間の有意差検定はStudent's t-Testで行い、3群間以上はone-way ANOVAで分散分析後、Tukey-Kramer testで検定した。2群間の相関係数はCORRELで検定した。

(倫理面への配慮)

本研究に実施に関しては熊本大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: B25-147)。動物愛護の観点から、苦痛を軽減し、使用するマウスの数は最小限とした。

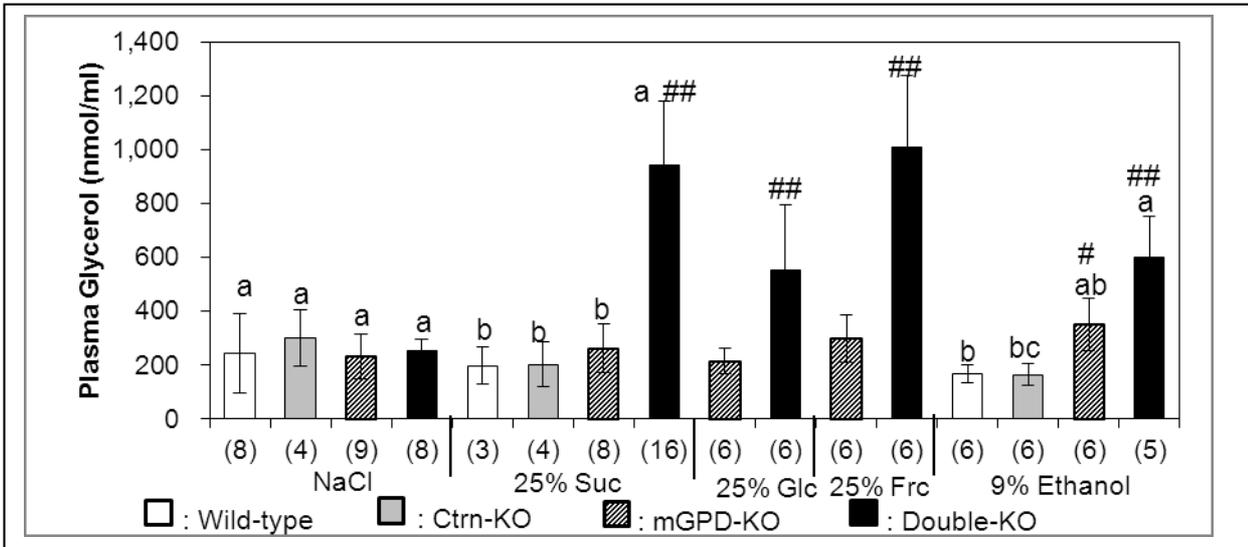


図1. ショ糖 (25% Suc; 5g/kg)、グルコース (25% Glc; 5g/kg)、フルクトース (25% Frc; 5g/kg) およびエタノール (9%; 1.4g/kg) 経口投与1時間後の血漿グリセロール濃度の比較

同一条件4群間の比較 (a,b,c) はANOVA解析。
p<0.05; ##p<0.01 vs NaCl

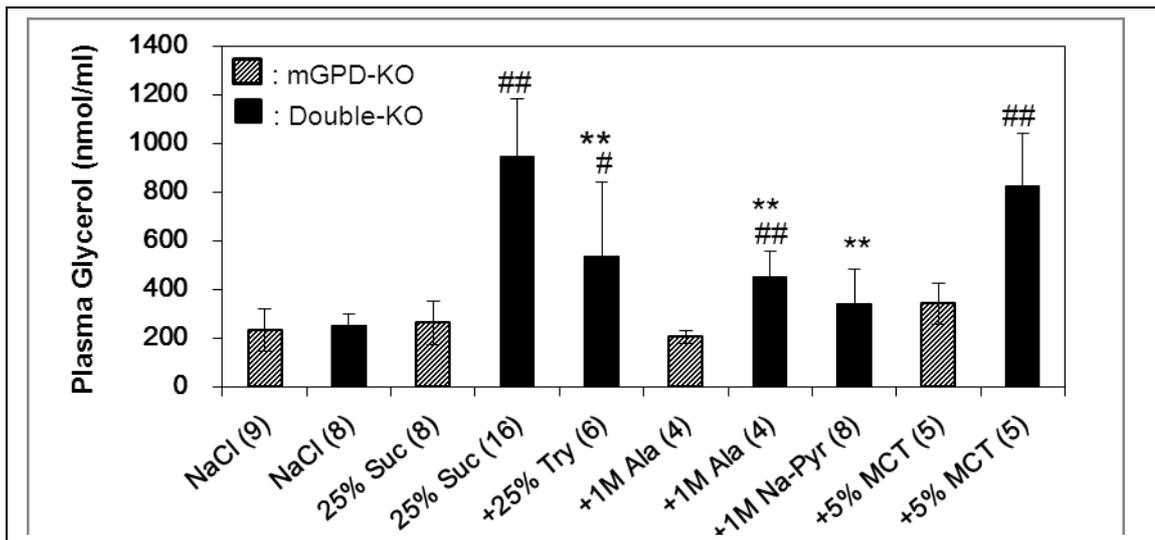


図2. 血漿グリセロール濃度へのショ糖効果に対するトリプトン (25% Try; 5g/kg)、アラニン (1 M Ala; 20mmol/kg)、ピルピン酸ナトリウム (1M Na-Pyr; 20mmol/kg)、MCT (5%; 1g/kg) 添加 (+) の効果

#p<0.05 and ##p<0.01 vs NaCl;
**p<0.01 vs 25% Suc.

C. 研究結果

C.1. 尿G3Pおよびグリセロールの定量

尿中にはG3Pおよびグリセロールともに検出された。値はクレアチニン比で表したが、摂食時にはG3Pおよびグリセロールともにdouble-KOマウスにおいて有意に高いレベルにあった。絶食時にはグリセロールは有意にdouble-KOマウスで高かったが、G3Pレベルにはマウスグループ間に有意差がなかった。

血漿中にはG3Pは検出限界以下しか検出できなかったが、グリセロールは容易に検出された。摂食時には4種のgenotypeマウス間に差はなかったが、絶食時にはdouble-KOマウスで有意に高い値を示した。

以下は摂食マウスを用いて行った。細胞質にNADHを生じる糖質(ショ糖、グルコース、フルクトース)またはエタノールを胃管を通じて投与し1時間後に血漿グリセロールを定量した。図1に示すようにショ糖投与によって、double-KOマウスにおいてグリセロール濃度が上昇した。同様にグルコースおよびフルクトース投与によってdouble-KOマウスの血漿グリセロールが増加したが、フルクトースのほうがより高いレベルに上昇した。エタノール投与はdouble-KOマウスにもならずmGPD-KOマウスにおいても有意に血漿グリセロール濃度を上昇させた。

続いて、ショ糖による肝内G3P濃度の上昇に対し、これを低下させる物質としてすでにトリプトン(カゼインの酵素分解物)、アラニン、ピルビン酸ナトリウム、MCT (medium-chain triglyceride)が有効であることを報告している⁴⁾。そこで、これら物質の血漿グリセロール濃度への効果を検討した(図2)。MCTを除いては、いずれの添加物もショ糖投与による血漿グリセロール濃度を有意に低下させた。なお、Na-Pyrは生食(NaCl)投与群のレベルにまで低下させることが示された。

それぞれ別のマウスで測定された結果であるが、ショ糖、グルコース、フルクトースなどの糖質を投与したdouble-KOマウス、およびショ糖にトリプトン、アラニン、Na-Pyr、MCTなどの治療効果を示した物質を添加したマウスの肝内G3Pと血漿グリセロールとの相関性を検討した。結果を図3に示す。 $R = 0.941$, $p > 0.001$ と非常に高い相関性を示し、血漿グリセロールが肝G3P由来であることを強く示唆している。さらに、血漿グリセロールは血液アンモニア濃度とそれほど強くはないが、有意な相関性($R = 0.340$; $p < 0.05$)を示した。

D. 考察

シトリン欠損症における肝内G3P濃度は糖質など細胞質NADH上昇をきたすような条件で増加し、それに伴って血中アンモニアが上昇し、高アンモニア血症を呈する。これがシトリン欠損症の病因に直結する最大の特徴である。これはシトリンが、ミトコンドリアからのアスパラギン酸の細胞質の供給だけでなく、リンゴ酸アスパラギン酸シャトルの一員として、細胞質NADHの処理に関わるため、細胞質NADHの上昇は、尿素サイクルへのアスパラギン酸の供給低下をきたし尿素サイクル不全、ひいては高アンモニア血症を引き起こすからである。即ち、肝内G3Pの上昇は細胞質NADH上昇のマーカーであり、シトリン欠損症の病態発症、悪化のマーカーである。しかし肝内G3Pは容易には測定可能ではない。そこで、尿、血液でのマーカーを探索することにした。本研究の結果、尿または血漿グリセロールの測定で肝内G3P濃度

の推定が可能であることが判明した。今後は重症化の診断や、新規治療薬の開発などに有用に利用できるものとする。人への応用に関してはマウスモデルでは、mGPDが全身で欠損しているため、肝臓でのみ低活性の人で同じように応用できるかどうかの判断は今後の研究に待ちたい。

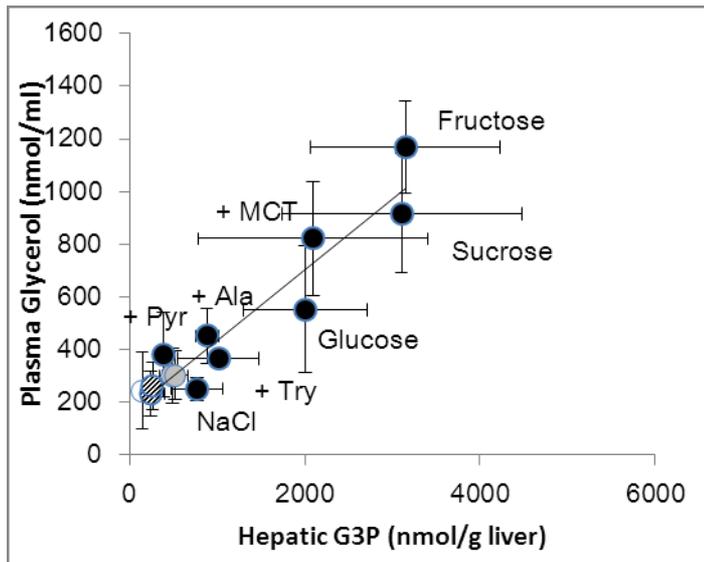


図3. 肝内G3Pと血漿グリセロールの相関性

ショ糖など糖質投与およびトリプトンなどを追加投与されたマウスの肝内G3P濃度と血漿グリセロールの相関性。肝内G3Pと血漿グリセロールはそれぞれ別のマウスで測定された。投与された物質は図内に示した。+はショ糖との同時投与を示す。縦と横のバーはそれぞれのS.D.を示す。

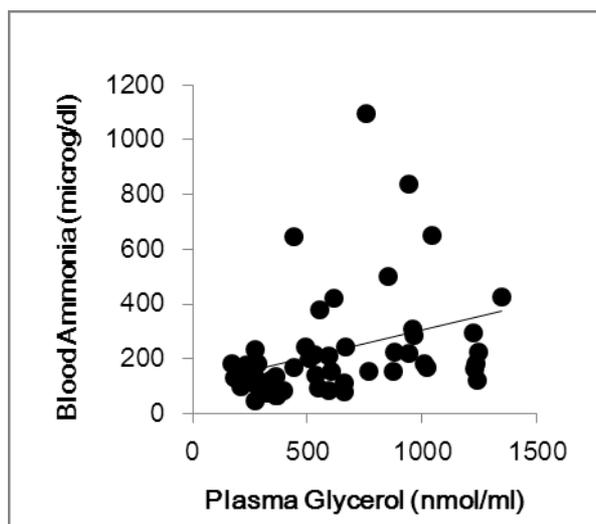


図4. Double-KOマウスの血漿グリセロール濃度と血中アンモニア濃度の関係
全てのdouble-KOマウスのデータをプロットした。

E . 結論

ミトコンドリア膜局在のaspartate glutamate carrierであるシトリンの欠損に伴い、糖質投与がもたらす肝内G3P濃度の変動を血漿グリセロールを測定することによって推定できることが判明した。本方法は、重症度の診断や治療薬の効果判定などに有用と考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Du J, Cleghorn W, Contreras L, Linton JD, Chan GC, Chertov AO, Saheki T, Govindaraju V, Sadilek M, Satrústegui J, Hurley JB. Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 12;110(46):18501-6.

2) Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. LC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. PLoS One. 2013;8(9):e74544.

3) Llorente-Folch I, Rueda CB, Amigo I, del Arco A, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. J Neurosci. 2013;33(35):13957-71.

4) Chen R, Wang XH, Fu HY, Zhang SR, Abudouxiker K, Saheki T, Wang JS. Different regional distribution of SLC25A13 mutations in Chinese patients with neonatal intrahepatic cholestasis. World J Gastroenterol. 2013;19: 4545-51.

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. 2013;124:347-62.

6) Saheki T. "Animal models of enhanced oxidative stress" (especially murine model of human citrin deficiency), Eds. Tsukahara H & Kaneko K, "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders" in press

2. 学会発表

1) 佐伯武頼：成人発症II型シトルリン血症（CTLN2）の診断、病因・病態解析と治療法の開発 - 患者さんもモデルマウスも甘いものとアルコールが苦手です - 川崎医科大学神経カンファレンス，倉敷，1月21日，2013年。

2) Saheki T.: Studies on Citrin Deficiency and Carnitine Deficiency using Animal Models. Conference on Genetic and Metabolic Disease in Fu

jian, Fujian China, June 8, 2013.

3) 佐伯武頼：シトリン欠損症における糖とアミノ酸の代謝異常相関． JSAAS2013 日本アミノ酸学会第7回学術大会，熊本，11月2日，2013年．

4) 佐伯武頼，藤本侑希，古家澄江，山村研一：モデルマウスを用いるシトリン欠損症患者の糖質忌避の機構解析．日本人類遺伝学会第58回大会，仙台，11月23日，2013年．

5) Saheki T: Citrin Deficiency: Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects. 3rd ACIMD/55th JSIMD, Educational Lecture, Maihama, Japan, November 27, 2013.

6) Saheki T, Fujimoto Y, Yamamura K: Plasma glycerol was increased parallel to blood ammonia in citrin deficiency model in response to administration of sugars, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

7) Fujimoto Y, Yano K, Yamashita K, Rikimaru S, Inoue K, Yamamura K, Saheki T: A possible diagnostic for citrin deficiency; high plasma and urinary glycerol detected in the model, Citrin/ mGPD double-KO mouse, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

8) 佐伯 武頼，藤本 侑希，山村 研一，井上 加奈子，小野 裕美：モデルマウスを用いたシトリン欠損症における糖質毒性の解析．第17回日本病態栄養学会年次学術集会，大阪，1月11日-12日，2014年．

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

