

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

TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究

研究分担者 山口 清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

ミトコンドリアの呼吸鎖の基質として、脂質代謝系、解糖系・TCA 回路から NADH や FADH₂ が供給される。呼吸鎖異常症では、NADH、FADH₂ の酸化障害によりエネルギー産生障害をきたす。今回、TCA 回路と関連代謝産物の分析を通じて、ミトコンドリア呼吸鎖機能のバイオマーカーを GC/MS を用いた尿中有機酸分析で検討した。また解糖系の障害であるシトリン欠損症も NADH 過剰のために肝臓内グリセロール-3-リン酸（G3P）の増加が動物実験で報告されている。そこで G3P も別の方法で測定し検討した。以下の結果を得た。

シトリン欠損症では、肝機能障害を反映して、チロシン代謝産物 4-OH-フェニル乳酸の増加がみられた。シトリン欠損症では、G3P がピルビン酸 Na 投与後に減少傾向がみられた。ピルビン酸 Na 投与すると、ケトグルタル酸が投与後 2 時間をピークに増加した。しかし、明らかに特異的な診断マーカーは特定できなかった。年齢マッチコントロール、および患者数を増やして検討する必要がある。マーカーは現時点では確定できなかったものの、G3P や TCA 回路成分は何らかのマーカーになりうる。また今後は、GC/MS のみならず LC/MS/MS（タンデムマス）等による解糖系成分の一斉分析法を確立して、呼吸鎖異常症の評価法、診断マーカーの探索を進めたい。

研究協力者

長谷川(小村)有紀（島根大学小児科助教）
高橋知男（島根大学小児科大学院生）

A．研究目的

ミトコンドリアの呼吸鎖では、酸化系、解糖系、およびTCA回路から供給されるNADHやFADH₂を酸化してATPを産生している。しかし、ミトコンドリア機能の低下する疾患では、これらの回路からのNADHやFADH₂の供給不足、または呼吸鎖による酸化障害が起こることが推測される。ミトコンドリア呼吸鎖機能のバイオマーカーを探索することを目的として、尿中有機酸分析により、TCA回路成分、および関連代謝産物量を検討した。またシトリン欠損症ではTCA回路のオキサロ酢酸から生成されるアスパラギン酸の転送障害、および細胞質内のNADHの過剰蓄積をきたす。この病態からモデルマウスで肝臓組織内のグリセロール3リン酸（G3P）の上昇がみられることが報告されている。そこで、シトリン欠損症患者の尿中G3P量についても検討した。

B．研究方法

1) 尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分の評価
ミトコンドリアの障害による疾患のうち、Leigh脳症（5歳女兒）とミトコンドリア枯渇症候群（3カ月乳児）、シトリン欠損症（14歳女兒）を対象にGC/MSによる尿中有機酸分析を行った。すなわち、TCA回路関連成分である乳酸、ピルビン酸、コハク酸、フ

マル酸、リンゴ酸、ケトグルタル酸、アコニット酸、クエン酸、イソクエン酸を検討した。また乳児肝炎様症状をきたし肝障害をきたす可能性の高いシトリン欠損症については、チロシン代謝産物である4-OH-フェニル乳酸（PHPLA）についても検討した。

また、ピルビン酸Na内服前後のTCA回路関連成分の尿中排泄量を、尿中有機酸分析によって検討した。

2) 尿中G3Pの評価

シトリン欠損症患者の尿を定期的に採取し、ウレアーゼ法によるGC/MS分析でglycerolとG3Pを検出し、排泄量の変化について検討した。また高乳酸血症やミトコンドリア枯渇症候群、短腸症候群などの疾患でも尿中G3Pを測定し、排泄量を検討した。

（倫理面への配慮）

島根大学は分析施設であり、分析依頼はすべて家族の同意の下に行われている。当施設で疾患を集計する際には、年齢や初発症状の検討を行う際に個人が特定できないよう、個人情報保護に十分に配慮した。

C．研究結果

1) 尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分の評価（図1）

Leigh脳症とミトコンドリア枯渇症候群（5y）の患者では、ピルビン酸Na内服前と内服後4時間までの尿を1時間毎に検討した。

Leigh脳症（3m）：内服後2時間をピークに、クエン酸とケトグルタル酸、フマル酸、アコニット

酸の排泄が上昇したが、PHPLA、PHPPAの排泄は最初から認められなかった。

ミトコンドリア枯渇症候群(5y)：内服前後におけるTCA回路関連代謝産物の変化は認められなかったが、PHPLAは内服後より上昇し、4時間後にも継続して排泄が認められた。

シトリン欠損症(14y)：ピルビン酸Na内服前の尿と、内服後の尿を数か月ごとに検討した。TCA回路関連代謝産物の変化は内服前後での変化は明らかでなかった。PHPLAは他の疾患と異なり内服前から高値を示し、シトリン欠損症の診断マーカーの一つとなる可能性が示唆された。しかしピルビン酸Na内服前後での有意な変化は認められなかった。

2) 尿中G3Pの評価(図2)

シトリン欠損症患者(14y)：ピルビン酸Na内服前と内服後の尿中glycerolとG3Pを測定した。G3Pの尿中排泄量は内服前でも3.3 mmol/mol Creaと排泄増加は認められなかった。しかしピルビン酸Na内服後には排泄はさらに低下傾向を示した。Glycerolも内服後に低下したが、Gly/G3P比を確認すると内服後の比は増加傾向であり、ピルビン酸NaによってG3Pの低下がより有意であったと考えられる。

その他：先天性高乳酸血症やMELAS、ミトコンドリア枯渇症候群、短腸症候群、眼球運動失調の患者でG3Pを測定した。先天性高乳酸血症患者では、glycerolが高値であったが、G3Pの増加は認められなかった。またMELASやミトコンドリア枯渇症候群ではglycerolもG3Pも増加していなかったが、短腸症候群の患者では先天性高乳酸血症の患者と同様にglycerolの排泄増加があり、G3Pは正常であった。この2疾患ではGly/G3P比が高かった。

D. 考察

MELASなどのミトコンドリア異常症では、NADHの酸化障害があり、エネルギー産生低下をきたす。より簡便な生化学診断確立と、ピルビン酸Na投与によるミトコンドリア脳筋症の治療効果の判定を目的として、呼吸鎖に関わる解糖系やTCA回路を中心に診断マーカーを探索した。同時に細胞質内のNADH蓄積、NAD欠乏の病態を示すシトリン欠損症患者1名についても比較のため検討した。

尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分、およびチロシン代謝産物の評価を行ったところ、ピルビン酸Na投与によって代謝産物の排泄パターンが変化することが示唆された。特に ケトグルタル酸やコハク酸、PHPLAの排泄量は3疾患の間で大きく異なっており、これらが疾患特有的なパターンを示す可能性がある。またシトリン欠損症では14歳の年齢にしては明らかにチロシン代謝産物のPHPLAの増加が観察された。シトリン欠損症の一つの特徴であり、診断マーカーの一つになりうる。患者数が十分でないので、さらに増やして検討する必要がある。

またグリセロールと解糖系をつなぐ代謝産物としてグリセロール3リン酸(G3P)は、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)欠損症で増加することが報告されている。FBPaseは、糖新生の律速酵素である。またシトリン欠損症マウスモデルでもNADH過剰によってG3Pが増加するという報告がある。しかし今回検討した患者では、G3Pの尿中排泄量は増加していなかった。しかしピルビン酸投与後のG3P尿中排泄量は投与前に比較して減少させる可能性が推測された。シトリン欠損症と年齢をマッチさせた正常

コントロールの数を増やして検討する価値があると思われる。

また先天性高乳酸血症や短腸症候群でG3Pの増加はないもののGlycerolが高い症例がある一方、ミトコンドリア枯渇症候群やMELASではいずれも上昇しないなど、疾患によってGlycerolやG3Pの値が異なる可能性がある。

今後は、タンデムマス等のGC/MS以外の手法を応用して、解糖系、脂質代謝等の代謝産物を測定し、ピルビン酸Naなどの治療効果判定のための特異的マーカーを探索してゆきたい。

E. 結論

TCA回路関連成分、グリセロール代謝のG3Pなどは、呼吸鎖異常症の診断マーカーとなりうる。ミトコンドリアに関連する疾患や症例数を増やし、ピルビン酸Naの治療効果判定に有用なマーカーをさらに探索してゆきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013 (12月)
- 4) 山口清次: MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013 (1月)
- 5) 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013 (1月)
- 6) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013 (3月)
- 7) 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013 (2月)
- 8) 高橋知男, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, ジャミヤン・プレブスレン, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次: 新生児マススク

リーニングで発見された軽症型プロピオン酸血症：有機酸とアシルカルニチンの推移．日本マス・スクリーニング学会誌 23(1)：49-53, 2013

- 9) 山口清次：小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用：最近の進歩．臨床病理 61(9)：817-824, 2013 (9月)

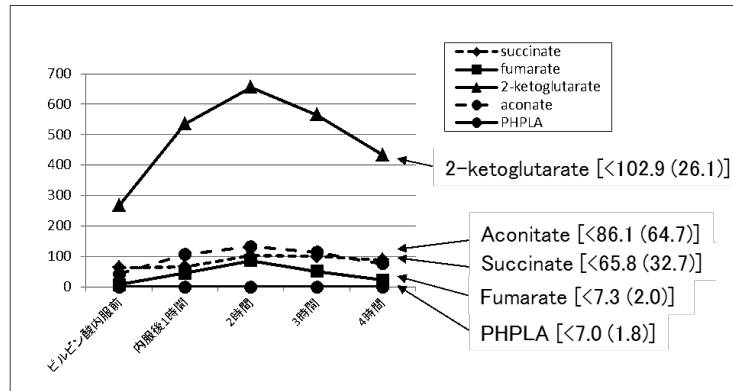
2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
- 5) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
- 6) Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Selective screening for organic acidemias by urinary organic acids analysis using GC/MS in Asian countries. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013
- 7) Yamaguchi S: Organic Acidemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
- 8) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月

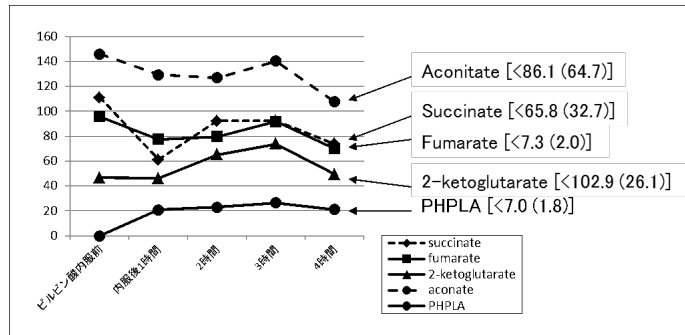
G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1 : ピルビン酸 Na 内服前後の TCA 回路成分の変化

1) Leigh 脳症 (3 m)



2) ミトコンドリア枯渇症候群 (5y11m)



3) シトリン欠損症 (14y)

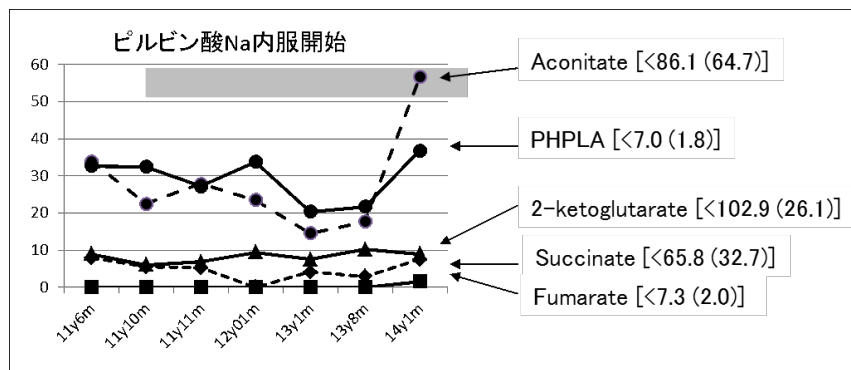
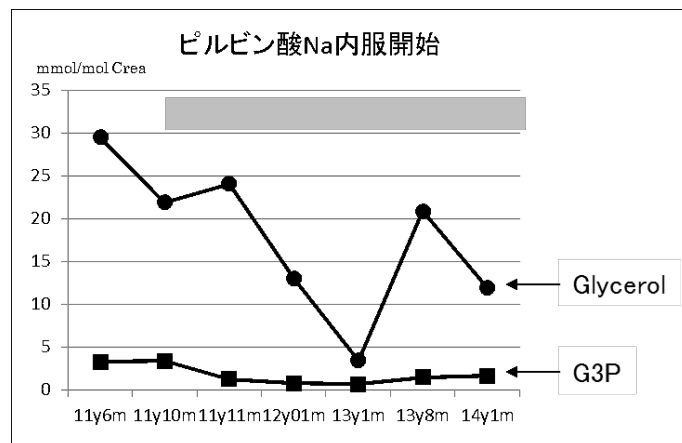
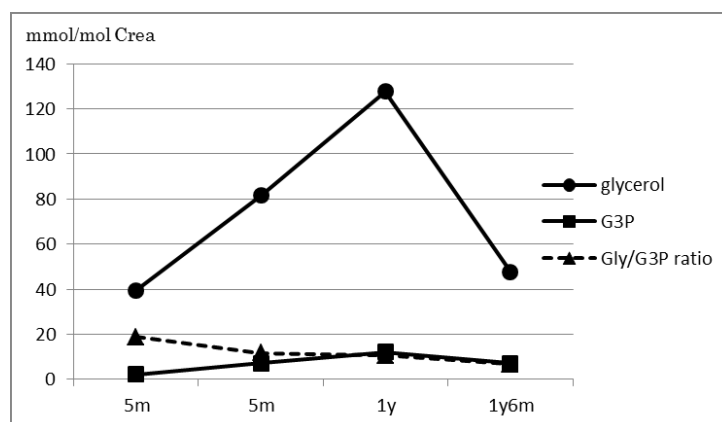


図 2 : 尿中 G3P の評価

1) シトリン欠損症 (14y)



2) 高乳酸血症 (先天性 CMV 感染、ビタミン B1 代謝異常の疑い) ピルビン酸投与なし



3) その他の疾患

	MELAS 症候群	Mit dep 症候群	短腸症候群	眼球運動失調	コントロール
Glycerol	6.5	7.8	127.1	51	3.7
G3P	5.9	2.8	9.4	12	35.4
Glycerol/G3P 比	1.1	2.8	13.5	4.3	0.1

略字 : G3P=glycerol-3-phosphate ; Mit dep=ミトコンドリア枯渇症候群