

201324083A

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

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 田 修 一

平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田修一

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
(資料) シトリン欠損症臨床ガイドライン (案)	
成人型シトルリン血症の臨床ガイドライン	
II. 分担研究報告	
1. シトリン欠損症モデルマウス Ctrn/mGPD double-KO マウスにおける尿中および血漿グリセロールレベルと病態・治療との関連	
佐伯 武頼	13
2. シトリン欠損症モデルマウス Ctrn/mGPD double-KO マウスにおけるグリセロール産生増加の機構	
乾 明夫	21
3. シトリン欠損症モデルマウスの糖質忌避の機構解析	
佐伯 武頼	29
4. 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	
長船 健二	37
5. シトリン欠損症における脂肪肝生成機序の解析	
小松 通治	39
6. シトリン欠損症遺伝子検査サービスの提供と類似症状を示す疾患の遺伝的背景の検索	
呉 繁夫	41
7. 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	45
8. 成人型シトルリン血症患者の内科的治療戦略：低炭水化物食と経口ピルビン酸の有効性	
池田 修一	47
9. シトリン欠損症スクリーニングの検討 ～食嗜好に注目して～	
栗山 進一	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 本年度の活動報告	61
V. 班構成員名簿	81

[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 25 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ルリン血症 (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 25 年度の研究では、高頻度遺伝子変異解析の有効性の検討、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、脂肪肝の成因の同定、疾患修飾遺伝子の解析、糖質忌避機構解析、新規疾患マーカー候補の同定、小児用食事摂取調査票による学童期シトリン欠損症患者スクリーニング法開発、疾患モデル細胞としての iPS 細胞・肝細胞への分化誘導を主に行った。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）
長船健二（京都大学 iPS 細胞研究所 准教授）
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 (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ことである。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、高頻度遺伝子変異解析の有効性の検討、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、脂肪肝の成因の同定、糖質忌避機構解析、新規疾患マーカー候補の同定、小児用食事摂取調査票による学童期シトリン欠損症患者スクリーニング法開発、疾患モデル細胞としての iPS 細胞・肝細胞への分化誘導を重点的に行った。

I) シトリン欠損症患者の診断法の確立

① 高頻度変異スクリーニングの有効性

シトリン欠損症の診断確定には責任遺伝子である *SLC25A13* 変異検索が重要である。本症の診断効率化を目的として、日本人に高頻度に認められる 11 種類の *SLC25A13* 変異を迅速、簡便に検出する検査法を 2 年前に確立した (Kikuchi A, Mol Genet Metabol, 2012)。本研究では、これまで提供してきた診断サービスの結果を評価し、本性を疑われながら *SLC25A13* 変異を検出できない症例の遺伝的背景を検索した。東北大学医学部小児科に、本症の遺伝子検査を依頼された 169 名を検索対象とした。各症例の臨床症状は検査依頼書に記載の症状・検査所見に基づいた。高頻度遺伝子変異の検出には、real-time PCR による融解温度解析法を、*SLC25A13* 遺伝子の全エクソン変異解析にはキャピラリー・シークエンサーを、エクソーム解析には IonProton 次世代シークエンサー (Life Technology 社) を用いた。

② 学童期シトリン欠損症患者の食嗜好アンケートを用いたスクリーニング法の確立

CTLN2 発症前の学童期患者を発見する目的で、有効なスクリーニング法の確立を検討した。シトリン欠損症では炭水化物を好まず、高蛋白・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いる。このことから、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と考え、平成 24 年には既存の小児や学童を対象とした食事摂取頻度調査 (FFQ) のレビューを行った。平成 25 年にはシトリン欠損症患者の特徴的な食嗜好を、具体的な食品によって捉えるアンケート調査を実施した。

II) シトリン欠損症の治療戦略の確立

① 中鎖脂肪酸 (MCT) 療法

山形大学医学部小児科における 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強く示唆された。CTLN2 への有効性を確認するために、CTLN2 患者 6 名に対し、低炭水化物高脂肪食のもと、中鎖脂肪酸を投与し、臨床経過、検査データを検討した。

② 低炭水化物食と経口ピルビン酸投与の有効性の確立

ピルビン酸療法は、シトリン欠損症モデルマウスや、小児軽症患者で有効性が報告されている。しかしながら、成人例での有効性は検討されていない。信州大学医学部脳神経内科において、CTLN2 患者 15 名に対し、食事総カロリーの PFC 比 (蛋白:脂質:炭水化物熱量比) の炭水化物比を 40%前後に低下させた (健常人では約 60%) 炭水化物制限食と、経口ピルビン酸を投与し、有効性について検討した。

③ 脂肪肝発症機構の解明

シトリン欠損症においては、脂肪肝を高率に合併し、慢性肝炎～肝硬変・肝細胞癌を発症することが知られている。しかし脂肪肝の生成機序は不明である。これまでの検索で、脂肪沈着の主体は中性脂肪であることが明らかにされており、今回、患者肝組織を用いて中性脂肪-脂肪酸代謝関連遺伝子を中心に解析した。CTLN2 患者 14 名と、健常者 7 名の脂肪肝の病理学的検討、脂肪酸の取り込み系、輸送系、分解系、分泌系で関連遺伝子の mRNA レベルの発現について解析した。

④ 疾患修飾遺伝子の解明

シトリン欠損症者の多くは新生児期に NICCD に罹患するが、ほとんどは 1 歳までにすべての症状・検査所見が正常化する。その一部は成人に至り、重篤な CTLN2 を発症する。発症には飲酒や高炭水化物食、グリセロールや高張糖液の輸液などの環境要因が関わっているが、遺伝的要因 (modifier gene) が関与する可能性も高いと想像される。そこで、i) 候補遺伝子における多形解析と ii) Exome sequencing による modifier gene 検索を行った。

III) 疾患モデルの確立と CTLN2 発症機構の解明

①シトリン欠損マウスを用いた糖質忌避の機構解析

シトリン欠損症では糖質の摂取により、細胞質 NADH が上昇し、高アンモニア血症を起こす。また、その他細胞質 NADH 上昇を起こすアルコール摂取、脳浮腫治療に使用されてきたグリセオール（グリセロール+フルクトース）の輸液も同様に CTLN2 発症をもたらす要因である。これらの CTLN2 発症要因がどのように作用するのか、糖質を嫌う（忌避する）機構は何かの解明を目指し、ショ糖、エタノール、グリセロールの濃度の異なる溶液をボトルに入れ、水の入ったボトルとともにマウスに自由に摂取させ、テスト溶液摂取量を重量変化から定量した。マウスについては、野生型、シトリンを欠損する Citrin-KO、グリセロリン酸シヤトルのメンバーであるミトコンドリア glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPD)を欠損する mGPD-KO、および citrin と mGPD を欠損する citrin/mGPD double-KO マウスの 4 種マウスを用い、各種溶液の自由摂取実験を行った。

②モデルマウスを用いた新診断マーカーの検討

シトリン欠損症モデルマウスの解析から、ショ糖投与などの発症要因の最も大きな代謝上の影響は、肝内 glycerol 3-phosphate (G3P)濃度の著しい上昇である。しかし、ヒトでの G3P 濃度の検出には NMR などの大掛かりな機器を必要とし、手軽に診断に用いることができなかった。そこで、肝内 G3P の変化が血漿や尿中の G3P または glycerol として検出可能かどうかを検討した。検出は酵素法によって行った。

③シトリン欠損症 iPS 細胞の樹立

CTLN2 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。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。本研究の目的は、CTLN2 患者体細胞から疾患特異的 iPS（人工多能性幹）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。

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 3 例の皮膚生検組織より増殖させた線維芽細胞または末梢血液 T 細胞からレトロウイルスおよびエピゾーマルベクターによる初期化誘導因子の遺伝子導入にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

（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、CTLN2 患者に対する内科的治療法の改良、高頻度遺伝子解析の妥当性の確立、脂肪肝の成因の同定、小児用食事摂取調査票による学童期シトリン欠損症患者スクリーニング法開発新規疾患マーカーとしての血・尿中グリセロール測定の有効性、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 CTLN2 に関する臨床診断基準・治療指針の素案を策定した。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。

各研究分担者による本年度の成果を以下に示す。

I) シトリン欠損症患者の診断法の確立

①高頻度変異スクリーニングの有効性

SLC25A13 遺伝子における 11 種類の高頻度遺伝子変異 (変異 [I]、[II]、[III]、[IV]、[V]、[VI]、[VII]、[VIII]、[IX]、[XIX]、[XXI]) のスクリーニングを 169 症例で行い、80 例に少なくとも 1 個の遺伝子変異を検出した。そのうち、67 例 (84%) では高頻度変異を 2 個認め、13 例 (16%) では 1 個の高頻度変異を認めた。この 13 例において *SLC25A13* 遺伝子の全エクソン・シーケンスを実施し、9 例 (69%) で 2 つ目の遺伝子変異を同定できた。高頻度変異を 1 個も認めなかった 89 例のうち、脂肪肝、黄疸、血中シトルリン高値 (>50 micromole/L)、など特徴的な症状を有する 7 例を選び、エクソーム解析を行っている。現在までに 3 例の解析を終了したが、複数の症例で変異が認められる遺伝子は同定されていない。

②学童期シトリン欠損症患者の食嗜好アンケートを用いたスクリーニング法の確立

平成 24 年では、文献データベース“MEDLINE”を用いて 2000-2012 年までに出版された学術論文を検討し、日本国内では 3 件の FFQ が該当した。小児用 FFQ では調査対象の食品にシトリン欠損症患者が好まない「和菓子」があり、さらに頻度の質問に「食べなかった」という項目があることから、シトリン欠損症のスクリーニングに使用可能と考えられる。しかし、「食べなかった」という項目が「体質的に食べられない」かどうかの検討が必要である。さらに全ての FFQ は最近一か月の食事を基に回答するため、摂取頻度には季節の影響も受けやすい可能性が示唆され、同様に「体質的に食べられない」のか、「季節が影響して食べなかった」のかの検討も必要である。また、海外の FFQ では各国で広く行われている調査項目の一部に該当する FFQ があったが、欧米型の食事内容に即している可能性もあり、日本での導入は妥当性の検討が必要である。

平成 25 年には、前年の FFQ や先行研究を参考にして具体的な食品からシトリン欠損症患

者の食嗜好を捉えることを目的として、2 医療機関において実際のシトリン欠損症患者 10 名程度に食嗜好のアンケートを実施している。

II) シトリン欠損症の治療戦略の確立

①中鎖脂肪酸(MCT)療法

治療を施行した 6 名の患者いずれも治療開始後には、疲労感は消失し、アンモニア脳症の再発を認めず、食後の高アンモニア血症は 2、3 ヶ月かけて徐々に低下した。治療効果の判定には、食後の血中アンモニア値、Fischer 比、血漿シトルリン値が指標となることが示唆された。発症早期の治療がより有効と考えられた。

②低炭水化物食と経口ピルビン酸投与の有効性の確立

CTLN2 患者 15 名 (男性 9 名 ; 女性 6 名) に対し、炭水化物制限食 (炭水化物熱量比 40-45%) と経口ピルビン酸 (平均 7.65±3.45g/日: 4-15g/日) の投与を行い、臨床経過の観察から、治療法の有効性を検討した。15 名の CTLN2 患者において、最短で 2 か月、最長で 6 年経過観察を行った。投与前後の肝性昏睡度 (1-5 度: 犬山分類) の比較では、投与前の平均昏睡度が 3.87±0.64 度であったが、治療開始後は 2.07±1.75 と有意に改善した。10 名の患者 (67%) で、脳症発作頻度の低下、脳波所見の改善が認められた。5 名については、投与後も発作を繰り返し、このうち 3 名については肝移植を施行している。また 5 名中 2 名の患者は慢性腎不全症例であった。全例重篤な副作用は、今のところ認められていない。

③脂肪肝発症機構の解明

患者肝における脂肪酸代謝系における mRNA の解析では、脂肪酸の取り込み系、輸送系、分解系、分泌系に関連遺伝子の発現低下を認めた。また、これらの遺伝子発現の調節因子である PPAR- α の低下を認め、脂肪肝の生成に PPAR- α が関連することが示唆された。これまでの報告で PPAR- α の低下因子として炎症やアルコール摂取が報告されており、炎症について TNF 等について検討したが病態の進行と関連する因子は見つからなかった。また脂肪酸の酸化についても評価し、 β 酸化の低下や血清ケト

ン体の低下を認めた。炎症マーカーについては TNF で脂肪沈着が多い群で活性上昇を認めたが、その他では有意な差は認めなかった。

これらの結果よりシトリン欠損症では脂肪酸の分解がより抑制されている可能性があり、そのために肝細胞内に脂肪が蓄積する可能性が示唆された。

④疾患修飾遺伝子の解明 i) 候補遺伝子における多型解析と ii) Exome sequencing による modifier gene 検索を行った。i) では、CTLN2、NICCD、変異陰性者 65-100 名について、mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPD) の多形を検討した。ii) においては、同じ変異を共有するが、一方が CTLN2 を発症し、他が発症していない 4 兄弟家系について、Exome sequencing を行い、4 家系共通の多型を持つ遺伝子を検索した。その結果、i) mGPD 遺伝子におけるよく知られた多形 (H264R) の CTLN2、NICCD、変異陰性群での頻度では、3 群間に有意の相違を見つけることができなかった。ii) Exome sequencing によって 4 家系・兄弟間で共通に見出された多形を有する遺伝子として 68 個の遺伝子が検出された。そのうち、2 遺伝子の多形は 4 家系と兄弟間での発症の有無と関連していた。現在、CTLN2、NICCD、変異陰性群で関連性を検討している。

III) 疾患モデルの確立と CTLN2 発症機構の解明

①シトリン欠損マウスを用いた糖質忌避の機構解析

シヨ糖では double-KO マウスでのみ高濃度溶液の摂取忌避が観察された。一方、エタノールおよびグリセロール摂取では double-KO マウスに加え、mGPD-KO マウス、さらには citrin-KO マウスも高濃度溶液の摂取を忌避した。この忌避の機構を解明するために、まずは Saheki et al. (Mol Genet Metab 2011) によって明らかにされたシヨ糖の強制投与に伴う異常代謝産物 (glycerol 3-phosphate, citrulline, citrate, glutamate, glutamine, aspartate, lysine)、および ATP レベルの変化を検討した。その結果、シヨ糖、エタノール、グリセロールの摂取忌避を来す条件下では共通して、細胞質 NADH 蓄

積を示す glycerol 3-phosphate の上昇と ATP の低下が同時に見られること、一方のみの異常では忌避が起こらないことを確認した。現在は、視床下部における食欲に関与するホルモン・神経伝達物質の変化を検討している。

②モデルマウスを用いた新診断マーカーの検討

尿中において G3P および glycerol とともに検出可能であった。また、摂食条件下ではいずれも double-KO マウスのレベルが他のマウス (野生型、citrin-KO および mGPD-KO マウス) に比し、有意に高値だった。絶食条件下では、glycerol は有意に高値を示したが、G3P レベルには差がなかった。血漿では G3P は検出限界以下の値であった。グリセロールは検出可能であったが、マウス間には有意な差はなかった。シヨ糖を投与した 1 時間後の血漿グリセロールレベルは double-KO マウスにおいてのみ上昇していた。さらに、シヨ糖にピルビン酸ナトリウム、アラニンなど肝内 G3P レベルに効果がある物質はシヨ糖投与で上昇した血漿グリセロールを低下させた。

③シトリン欠損症 iPS 細胞の樹立

導入初期化因子の発現がサイレンスされている iPS 細胞株を患者毎に選択し、NANOG, OCT3/4, SOX2, TRA1-60, TRA1-81 などのヒト ES (胚性幹) 細胞と同様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。次に、既報のヒト ES/iPS 細胞から肝臓系譜への分化誘導法を改良し、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。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、Citrin 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。現在、健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して患者 iPS 細胞由来肝細胞の尿素産生能低下や培養上清中シトルリン蓄積、細胞質内の脂肪滴蓄積の有無などの検証を行っている。

D. 考察

I) シトリン欠損症患者の診断法の確立

高頻度変異スクリーニングにおいて、一方のアレルのみに高頻度変異を認めた症例の 69% は、full sequence 解析でもう一つの遺伝子変異を認めることから、大部分はシトリン欠損症と考えられる。高頻度変異スクリーニングで変異を認めない症例は遺伝的背景が異なると考えられ、本症と類似した症状を示す症例のエクソーム解析により、本性との鑑別に重要な疾患群が特定可能と考えられる。

食嗜好アンケート調査では、本調査によってシトリン欠損症のスクリーニングがより簡便に早期に実施するための方法が開発できると期待される。調査は現在進行中である。

II) シトリン欠損症の治療戦略の確立

現在 CTLN2 患者の治療において、最も確立された治療法は、肝移植のみであるが、本研究で、経口 MCT 療法、ピルビン酸療法とも有効性が示された。また重篤な副作用もなく、今後移植医療に代わる治療法として期待される。

シトリン欠損症の脂肪肝発症機序については、脂肪酸の β ・ ω 酸化、血清ケトン体は脂肪肝の進行により低下しており、脂肪酸の分解の低下によるものと考えられた。このため PPAR- α 低下の一因として、シトリン欠損症患者の偏食が関連している可能性がある。今までの報告よりシトリン欠損症の患者は炭水化物の摂取が健常者より少ない傾向があり、糖分負荷により肝性脳症を発症した症例も経験した。エネルギー産生の主要な回路である TCA 回路を動かすためには多量の ATP が必要であり、慢性的な ATP 欠乏により TCA 回路が効率よく働かないために脂肪酸・中性脂肪の分解が進まない可能性が考えられた。

疾患修飾遺伝子の解析では、現時点では明らかにできていないが、前述した臨床像の多様性の検討では、シトリン機能を代償する因子が存在する可能性が指摘されており、今後も検討が必要である。

III) 疾患モデルの確立と CTLN2 発症機構の解明

モデルマウスの解析から、尿および血漿グリセロール値は、シトリン欠損症の診断、重症度の判定、治療薬検定に有効である可能性を見出すことができた。

また iPS 細胞研究では、CTLN2 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 細胞から本疾患における罹患細胞種である肝細胞への分化誘導が可能であった。今後、肝細胞の機能的成熟化や薬剤負荷などを用いて本疾患の病態の再現が期待される。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、本研究からの進展で確立される疾患肝細胞モデルは成人型シトリン血症の病態を解析する上で有用なツールになることが期待される。

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
「肝細胞誘導化合物」にて国内出願準備中。
(研究分担者 長船健二)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

資料 1

シトリン欠損症臨床ガイドライン（案）

疾患名：シトリン欠損症

- ・ シトリン欠損による新生児肝内胆汁うつ滞症（neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, NICCD）
- ・ 成人発症 II 型シトルリン血症(adult-onset citrullinemia type 2, CTLN2)
- ・

1. 疾患概要

シトリンはミトコンドリア内膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体で、その欠損は細胞質へのアスパラギン酸供給障害やミトコンドリアへの NADH の供給障害、糖新生障害を引き起こす[1-3]。その欠損症は新生児・乳児期では肝内胆汁うつ滞症、高シトルリン血症(NICCD)、幼児・青年期では無症状ながら食癖異常など、成人期では高アンモニア高シトルリン血症、精神症状、肝不全などの成人発症 II 型シトルリン血症(CTLN2)を発症する。幼少期から、ピーナツ、大豆、乳製品などの高脂質・高蛋白食を好み、炭水化物を嫌う食嗜好が認められる[4]。治療は確定したものはないが、各症状に対して対処療法を行い、最終的には肝移植を必要とする場合もある。最近、CTLN2 発症予防、治療としてピルビン酸ナトリウム投与、MCT オイル、炭水化物制限による食事療法が考えられている。

病因遺伝子は *SLC25A13* である[5]。シトリン欠損症の確定診断は遺伝子診断によるところが大きく、日本人患者では代表的な 11 個の変異で変異頻度の 95%を占める[6, 7]。

2. 本邦での発生頻度

シトリン欠損症は日本で 1/17,000[6]、中国南部で 1/6,400 と東アジアを中心に高い頻度を示す。欧米白人種の頻度は明確ではないが、東アジアにと比較してかなり低いと考えられている。日本では 6,000 人前後の患者数が推定されている。

3. 臨床病型

シトリン欠損症は 2 つの病型を推移することが知られている。新生児から乳児の病型である NICCD[8-10]、および成人期の CTLN2 である[8-10]。

この間に「見かけ上健康」な適応・代償期がある。

4. 原因

高アンモニア血症、高シトルリン血症、肝不全、精神症状を呈し、予後不良な疾患である成人発症 II 型シトルリン血症(CTLN2)の原因遺伝子として *SLC25A13* が同定された。その遺伝子産物であるシトリンはミトコンドリア内膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体であり、その欠損により細胞質へのアスパラギン酸供給障害やミトコンドリアへの NADH の供給障害、糖新生障害を生じる[1-3]。新生児・乳児期では胆汁うつ滞症、高シトルリン血症、幼児・青年期では原則無症状ながら食癖異常などを示し、成人期にはその代償機構の破綻により、約 20%の患者で CTLN2 を発症する。この CTLN2 を顕在化せしめる原因についてはいまだ明確ではなく、遺伝的要因とともに環境的要因の関与が推定されている。

5. 診断基準

- ①遺伝子解析：*SLC25A13* 遺伝子の両アレルに病因として妥当な変異を認める
- ②肝組織、末梢血でのウエスタンブロット：シトリンタンパクが検出されない

①もしくは②を認めるものを確定例とする。

6. 症状

シトリン欠損症は新生児から老年までの幅広い年齢にわたり、また、それぞれの患者で異なる症状を呈する。

- 1) 新生児・乳児期：子宮内発育不全、高シトルリン血症、ガラクトース血症、肝内胆汁うつ滞症、黄疸、発育不全、低血糖症、ビタミン K 欠乏性凝固異常を呈するが生後 6～12 ヶ月で自然軽快する[11]。
- 2) 幼児から青年期：食癖異常（高脂肪高蛋白低糖質、頻回摂取）、成長障害（体重増加不良）、易疲労感、低血糖症、肝機能異常。
- 3) 成人期：成人発症 II 型シトルリン血症—高アンモニア血症、高シトルリン血症、高アルギニン血症、肝不全、けいれん、精神症状（見当識障害、異常行動など）。

NICCD の治療指針[12]

胆汁うつ滞に対する治療が中心となる

食事療法（ミルク）：母乳、一般ミルクとも炭水化物：蛋白質：脂肪のカロリー比はほぼ（40%、10%、50%）であり、栄養素から見ると NICCD にとって不適切ではない。

しかしながら、NICCD では高ガラクトース血症、胆汁うつ滞症をきたすため、それに対応するミルクが必要である。

- 1) 胆汁うつ滞性肝障害には MCT ミルクを使用する。
- 2) 胆汁うつ滞性肝障害と高ガラクトース血症がある場合には MCT+乳糖除去ミルク（蛋白加水分解 MCT ミルク：ML-3）を使用する。もしくは、乳糖除去粉乳 100ml に MCT オイル 2 ml 添加する（炭水化物：蛋白質：脂肪のカロリー比は 40%、10%、50%）。

薬物療法：胆汁うつ滞性肝障害が強い場合は新生児肝炎の治療に準じて行なう。

ビタミン A（チョコラ A） 400～500 IU/kg/日 「パンビタンなど総合ビタミンで代用可」

ビタミン D（アルファロール） 0.05～0.1 μ g/kg/日

ビタミン E（ユベラ） 軽症 5～10 mg/kg/日、中等症 20～50 mg/kg/日

ビタミン K（ケイツーシロップ） 2 mg/週～5mg/日

ウルソデオキシコール酸（ウルソ） 10～15 mg/kg/日

代償期の治療指針[12]

30 から 50%の症例で不定愁訴を含めた多彩な症状を示す。幼少時より大豆、ピーナッツ、卵、チーズ、牛乳、魚肉類などを好む。

- 1) シトリン欠損症患者の平均的摂取カロリー比は炭水化物（30–40%）、蛋白質（15–25%）、脂肪（40–50%）と低炭水化物・高蛋白質・高脂肪である。この特異な食癖が症状の発現を予防していると考えられており、是正しない。
- 2) 糖新生、エネルギー産生障害があるので、頻回食もしくは補食を必要としている場合が多い。たとえば、おやつとして牛乳をよく飲み、1日 2 L 前後摂取する例も珍しくない。

成人型シトルリン血症の臨床ガイドライン

I) 概論

CTLN2は思春期以降に意識障害、失見当識、けいれんなどの急性脳症様症状、行動異常、抑鬱などの精神症状で発症し、高アンモニア血症、高シトルリン血症をきたす。飲酒や炭水化物の過食、手術などが引き金になることがある。

II) 診断指針

1) 臨床症状

必須症状として、意識障害発作（傾眠、せん妄、昏睡）、異常行動、痙攣などの脳症発作を認める。

参考事項として、特異な食嗜好（糖質を嫌い、高蛋白・高脂質食を好む）を認め、飲酒を好まない患者は、CTLN2を疑う有力な情報となる。

2) 検査項目

血中アミノ酸分析：シトルリン・アルギニンの上昇、スレオニン/セリン比の上昇
血中アンモニア上昇が認められる。（アンモニア値は、正常のこともあり、複数回測定が望ましい。）

3) 確定診断

確定診断には遺伝子検査を実施する。また肝組織、末梢血でのウエスタンブロット解析（シトルリン欠損の証明）も有用である。

4) 鑑別診断

肝硬変、門脈一大循環シャント、劇症肝炎、脳炎、てんかん、Wilson病、ヘモクロマトーシス、尿素サイクル異常症

III) 治療指針

- 1) 炭水化物制限食（蛋白・脂質・糖質のカロリー比を 15-25% : 40-50% : 35-45%） [4, 13]
- 2) L-アルギニン製剤の経口投与とピルビン酸ナトリウム 4~15g/日 [14]
- 3) MCT オイル投与 [15, 16]
- 4) 難吸収性抗生剤（カナマイシン 1.5 g/日：週 5 日投与） [17]
- 5) ラクツロース（30-90ml/日：一日複数回排便するようコントロール） [17]
- 6) 脳症悪化時には、分子鎖アミノ酸製剤点滴（500-1000ml） [17]
- 7) 臨床症状が改善されない場合*、肝移植を考慮。

* 治療後も脳症の発作頻度が減少せず、月 2 回以上の意識障害発作を繰り返す。

頭部 MRI で、脳浮腫や大脳白質に、FLAIR 画像で高信号所見の出現。

麻痺、失調、全身痙攣などの中樞神経の器質的障害の出現。

禁忌事項

- 1) アルコール摂取
- 2) 高炭水化物食および大量の糖質摂取 [18]
- 3) 高濃度糖質輸液、グリセロール [19, 20]

・高カロリー輸液およびグリセオール使用の禁忌

一般に高アンモニア血症の治療としては「蛋白負荷の軽減」および「(糖質による) 高カロリー輸液」がなされるが、CTLN2においては禁忌である。また、脳浮腫の治療薬としてのグリセオールも病状を悪化させる。

文献

- 1) Saheki T, Kobayashi K. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). *J Hum Genet.* 47:333-341, 2002
- 2) Saheki T, Kobayashi K, Iijima M, et al. Adult-onset type II citrullinemia and idiopathic neonatal hepatitis caused by citrin deficiency: involvement of the aspartate glutamate carrier for urea synthesis and maintenance of the urea cycle. *Mol Genet Metab.* 81 Suppl 1:S20-26, 2004
- 3) Kobayashi K, Saheki T, Song YZ. Citrin Deficiency. *GeneReviews*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1181/>
- 4) Saheki T, Kobayashi K, Terashi M, et al. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. *J Inherit Metab Dis.* 31:386-394, 2008
- 5) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet.* 22:159-163, 1999
- 6) Tabata A, Sheng JS, Ushikai M, et al. Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency. *J Hum Genet.* 53:534-45, 2008
- 7) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, et al. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab.* 105:553-558, 2012
- 8) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet.* 108:87-90, 2001
- 9) Tazawa Y, Kobayashi K, Ohura T, et al. Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia. *J Pediatr.* 138:735-740, 2001
- 10) Tomomasa T, Kobayashi K, Kaneko H, et al. Possible clinical and histologic manifestations of adult-onset type II citrullinemia in early infancy. *J Pediatr.* 138:741-743, 2001
- 11) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD). *J Inherit Metab Dis.* 30:139-144, 2007
- 12) 厚生労働科学研究補助金難病性疾患克服研究事業「シトリン欠損症の実態調査と診断方法および治療法の開発に関する研究」(平成22年度から23年度 研究代表者 岡野善行)
- 13) Nakamura M, Yazaki M, Kobayashi Y, et al. The characteristics of food intake in patients with type II citrullinemia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 57:239-245, 2011
- 14) Mutoh K, Kurokawa K, Kobayashi K, et al. Treatment of a citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinaemia with arginine and sodium pyruvate. *J Inherit Metab Dis.* 31(Suppl 2):S343-347, 2008
- 15) Hayasaka K, Numakura C, Toyota K, et al. Treatment with lactose (galactose)-restricted and medium-chain triglyceride-supplemented formula for neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *JIMD Rep.* 2:37-44, 2012
- 16) Hayasaka K, Numakura C, Toyota K, et al. Medium-chain triglyceride supplementation under a low-carbohydrate formula is a promising therapy for adult-onset type II citrullinemia. *Mol Genet Metab Rep.* 1:42-50, 2014
- 17) 矢崎正英、池田修一。肝性脳症。EBMに基づく脳神経疾患の基本治療指針。第3版。Medical View、p488-490, 2010

- 18) Fukushima K, Yazaki M, Nakamura M, et al. Conventional diet therapy for hyperammonemia is risky in the treatment of hepatic encephalopathy associated with citrin deficiency. Intern Med. 49:243-247, 2010
- 19) Yazaki M, Takei Y, Kobayashi K, et al. Risk of worsened encephalopathy after intravenous glycerol therapy in patients with adult-onset type II citrullinemia (CTLN2). Intern Med. 44:188-195, 2005
- 20) Takahashi H, Kagawa T, Kobayashi K, et al. A case of adult-onset type II citrullinemia - deterioration of clinical course after infusion of hyperosmotic and high sugar solutions. Med Sci Monit. 12:CS13-15, 2006

〔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的脳症の発症予防法の開発

シトリン欠損症モデルマウス Ctrn/mGPD double-KO マウスにおける尿中および血漿グリセロールレベルと病態・治療との関連

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、佐伯 武頼、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 (citrin; Ctrn) とミトコンドリアグリセロール3-リン酸脱水素酵素 (mGPD) を欠損する Ctrn/mGPD double-KO マウスは、シトリン欠損症モデル動物としてシトリン欠損症の病態解析、治療法の開発などで有用であり、高アンモニア血症を起こすショ糖の投与は肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) の著しい増加を起こす。この肝内 G3P の変動を尿、または血液中で検出できれば、よい簡易に用いる診断法となると仮定した。実際に double-KO マウス尿中に G3P およびグリセロールが、血漿中では、グリセロールが検出された。Double-KO マウスの血漿グリセロールは、ショ糖、グルコース、フルクトース、エタノールの投与により増加し、ショ糖による増加は同時に投与したピルビン酸ナトリウムやトリプトンなどによって低下するなど、さまざまな条件下で変動すること、および血漿グリセロール濃度は血中アンモニア濃度と有意の相関を、また、肝中 G3P 濃度と強い相関を示すことを見出した。

A. 研究目的

シトリン (citrin; Ctrn) とミトコンドリアグリセロール3-リン酸脱水素酵素 (mGPD) を欠損する Ctrn/mGPD double-KO マウスは、シトリン欠損症モデル動物としてシトリン欠損症の病態解析、治療法の開発などで有用である¹⁾。高アンモニア血症を起こすショ糖の投与は肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) の著しい増加を起こす²⁾。この肝内 G3P の変動を尿、または血液中で検出できれば、よい診断法となると仮定し、実験を行った。

B. 研究方法

B.1. マウス

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。

B.2. 採尿と血漿の採取

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。

B.3. 投与実験

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。

B.1.3. 定量

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 glycerol 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、クレアチニ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。

B.1.4. 統計

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、結果の図は箱ひげ図 (box plot) を作成した。マウスの数は結果の図にそれぞれ (n) で表した。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。

なお、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)。

C. 研究結果

C.1. マウス尿中G3Pとグリセロール濃度

マウス尿中にG3Pとグリセロールが検出され、クレアチニン比で定量化できた。その結果は、図 1A と B に示すように、摂食時にはG3Pおよびグリセロールともにdouble-KOマウスで有意に増加していた。絶食時 (図2AとB) にはグリセロールはdouble-KOマウスで高い値を示したが、G3Pは統計学的に有意差が出なかった。

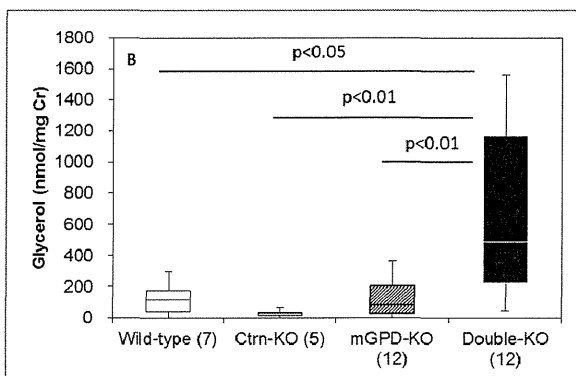
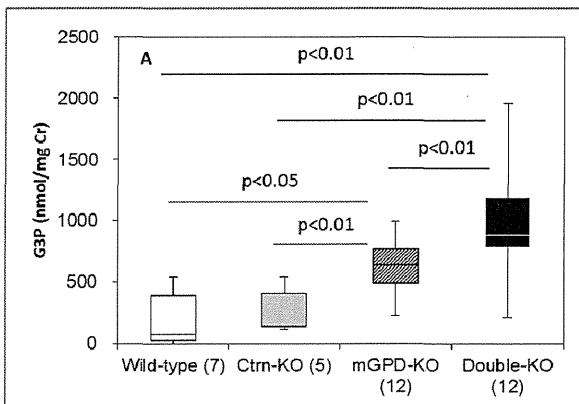


図 1. 絶食時の尿中 G3P (A) とグリセロール (B) 濃度

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。

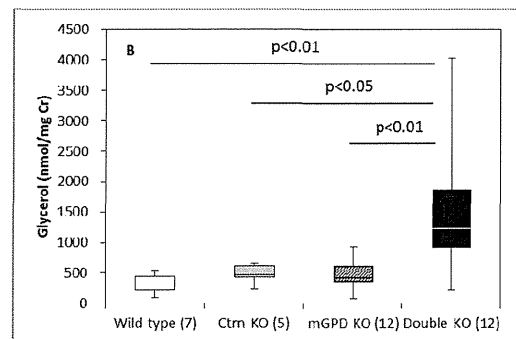
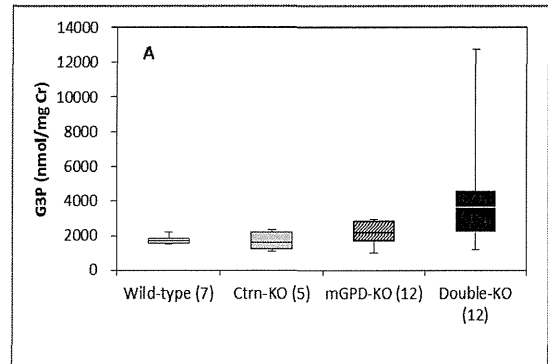


図 2. 絶食時の尿中 G3P (A) 及びグリセロール (B) 濃度

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。

C.2. 血漿グリセロール濃度

今回の測定法では、血漿中の G3P 濃度は検出限界以下であった。一方、グリセロールは容易に検出できたので、市販のグリセロール測定キットを用いて測定した。摂食時にはマウス 4 群間に有意差はなかったが、絶食時には double-KO マウスで有意に高い値を示した (図 3)。

図 4 に示すように、ショ糖投与によって double-KO マウスでのみ、高値を示した。さらにグルコースとフルクトースの投与によっても double-KO マウス血漿グリセロール値は上昇したが、後者の方がより高い値を示した。エタノールの投与は、double-KO マウスだけでなく mGPD-KO マウスでも有意に高い値を示した。

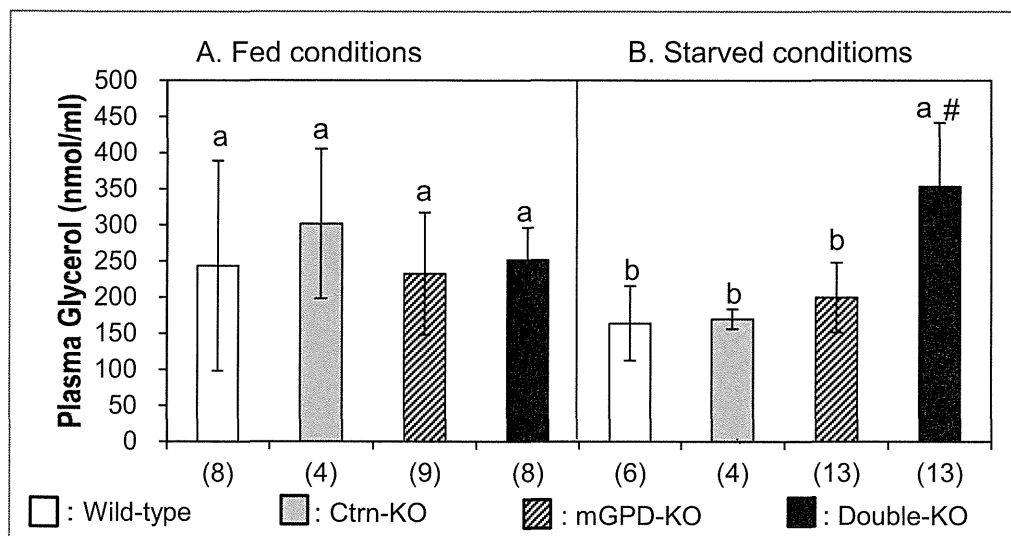


図3. 4種マウスの摂食時 (A) と絶食時 (B) 血漿グリセロール濃度 (mean ± S.D.) の比較

4種マウス間の比較 (a,b,c) は、one-way ANOVA で分散分析後、Tukey-Kramer test で検定した。 #, p<0.05 (摂食時との比較)

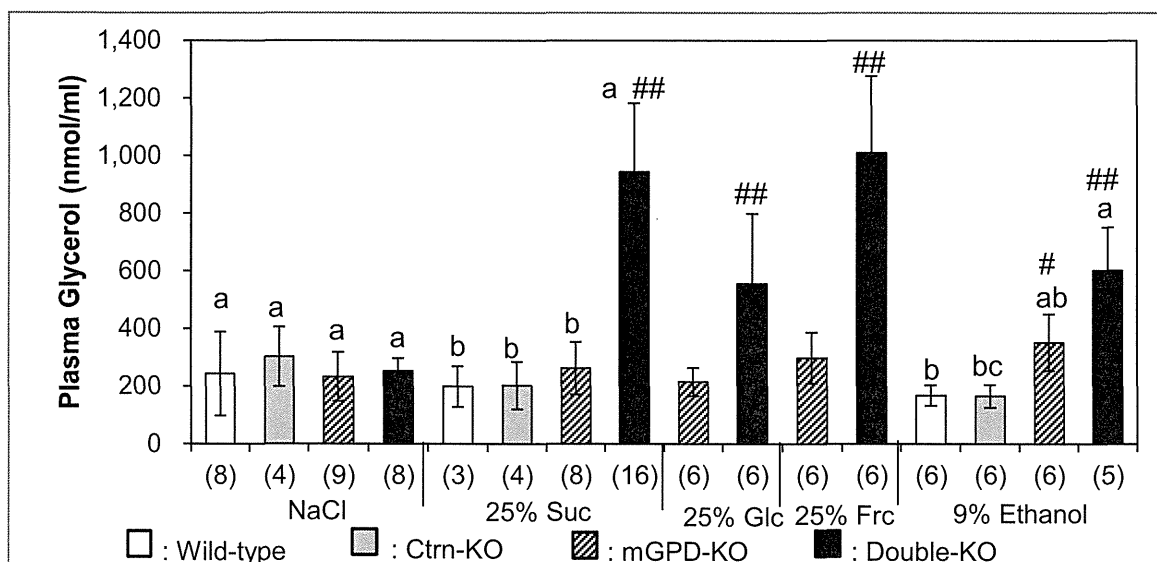


図4. ショ糖(25% Suc; 5g/kg)、グルコース(25% Glc; 5g/kg)、フルクトース(25% Frc; 5g/kg) およびエタノール(9%; 1.4g/kg) 経口投与1時間後の血漿グリセロール濃度の比較

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

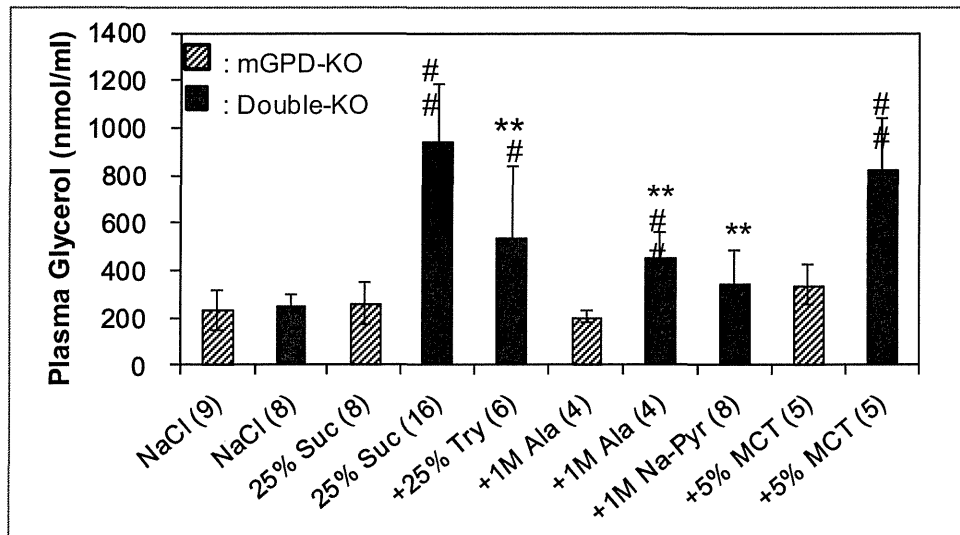


図5. 血漿グリセロール濃度へのショ糖効果に対するトリプトン (25% Try; 5g/kg)、アラニン (1M Ala; 20mmol/kg)、ピルビン酸ナトリウム (1M Na-Pyr; 20mmol/kg)、MCT (5%; 1g/kg) 添加 (+) の効果

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

C.3. ショ糖による血漿グリセロール上昇を抑制するトリプトン、アラニン、ピルビン酸ナトリウム (Na-Pyr)、およびMCTの効果
すでに報告したように⁴⁾、トリプトン (カゼインの胨酵素水解物)、アラニン、Na-Pyr およびMCTは、ショ糖投与による肝内 G3P 濃度上昇を抑制する効果を持つ。これらが血漿グリセロールにどのような効果を持つかを検定した。図5に示したように、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が、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。

C.4. 血漿グリセロールと血中アンモニア濃度および肝内 G3P との相関性

これまで報告してきたように、ショ糖の投与は血中アンモニア濃度を上昇させ、トリプトンの添加は血中アンモニア濃度の上昇を抑制する。図6は、本研究において測定した 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相関性を検討したものである。相関係数は 0.340 (p<0.02)と大きくはないが、有意の相関性がみられた。

さらに、それぞれ別のマウスで測定した結果であるが、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、Na-Pyr、アラニン、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。その結果、両者間には図7に示すように非常に高い相関性 (R=0.951; p<0.001) がみられた。このことは、血漿グリセロールの由来が肝臓であることを強く示唆するものである。

D. 考察

ショ糖投与によってシトリン欠損症モデルマウスである Ctrn/mGPD double-KO マウスは高アンモニア血症を呈する¹⁾。肝臓内では NADH の蓄積によって肝内 G3P が著しく増加する²⁾。このことは臨床的には重症度の診断に有効と考えられる。しかし、肝内 G3P 濃度の測定は、NMRなどの装置を使用しなければ、容易には測定できない。そこで、尿や血漿で肝内 G3P が推定できれば、容易に診断が可能である。その目的を持って尿中の G3P およびその代謝物であるグリセロ