

ールの検出とマウス間の異同を検討した。

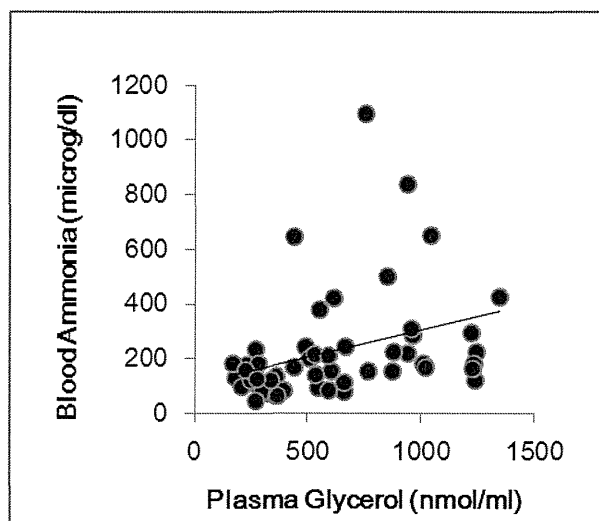


図6. Double-KO マウスの血漿グリセロール濃度と血中アンモニア濃度の関係

Double-KO マウスのデータのみをプロットした。
R = 0.340; p<0.05

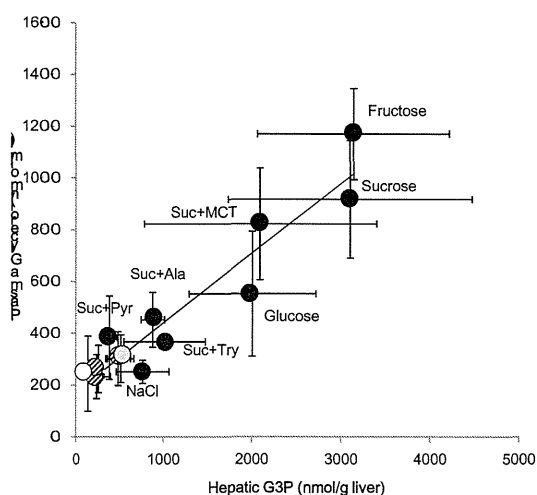


図7. 肝内 G3P と血漿グリセロールの相関性
ショ糖など糖質投与およびトリプトンなどを追加投与されたマウスの肝内 G3P 濃度と血漿グリセロールの相関性

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。縦と横のバーはそれぞれの S.D を示す。

R = 0.951; p<0.001

その結果、尿中では G3P およびグリセロールも検出され、さらには double-KO マウスでは他のマウスに比し、摂食時には有意に高いレベルで、絶食時にはグリセロールは有意に高いレベルであることが判明した。より臨床的に有用と考えられる血漿中では G3P は検出限界以下であったが、グリセロールは容易に検出された。摂食時にはマウス間に差は見出されなかったが、絶食時には double-KO マウスで有意に高いレベルにあった。以下、摂食条件下で糖質とエタノール投与の効果を検討した結果、ショ糖およびその成分であるグルコースおよびフルクトースによって double-KO マウスの血漿グリセロールは上昇した。またエタノールの投与は double-KO マウスにもならず、mGPD-KO マウスにおいても上昇した。ショ糖投与による肝 G3P 濃度の上昇はトリプトンやアラニンなどのアミノ酸、および Pyu-Na ならびに MCT の同時投与によって有意に低下したが、同様に結晶中のグリセロール濃度も低下した。しかし、MCT では有意には低下しなかった。中でも Na-Pyr の効果は血漿グリセロール濃度を生食投与のレベルにまで低下させた。以上からも推察されるが、肝臓 G3P と血漿グリセロールレベルは非常に高い相関性が認められ、血漿グリセロールが肝臓 G3P 由来であることを強く示唆していた。このことから血漿グリセロールを測定することで肝内 G3P を推定でき、治療薬の開発などに有効に利用可能と考える。

なお、Double-KO マウスにおける血漿グリセロールのレベルは血中アンモニアレベルと弱いながらも有意の相関性が認められた。

一方、ヒトにおいてはこれらの尿中および血漿グリセロールに診断的価値があるかどうかは現在検討中である。予備的結果ではシトリン欠損症患者尿中のグリセロールの上昇は認められていない。この事実は、double-KO マウスでは全身の mGPD が欠損しているのに対してヒトでは肝臓以外には mGPD が存在するので、肝臓で生じるグリセロールを腎臓などで早く代謝することによるのかもしれない。重症のシトリン欠損症患者では血漿にグリセロールレベルの上昇が観察されるかもしれない。

E. 結論

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。

文献

1. Saheki T, Iijima M, Li MX, Kobayashi K, Horiuchi M, Ushikai M, Okumura F, Meng XJ, Inoue I, Tajima A, Moriyama M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Tsui LC, Tsuji M, Okano A, Kobayashi T. Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J Biol Chem.* 2007;282: 25041-52.
 2. Saheki T, Inoue K, Ono H, Tushima A, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Kuhara T, Ohse M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Kobayashi K. Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011;104: 492-500.
 3. Lang. G, L-(-)-Glycerol 3-Phosphate, In: H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, third ed, Vol. VI, 1984, pp. 525-531.
 4. 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.* 2012 Nov;107:322-9.
- F. 健康危険情報**
なし。
- G. 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, Satrustegui 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, Satrustegui 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, Abudouxikuer 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, Satrustegui 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

発一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 Fujian, 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。

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

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 マウスにおけるグリセロール産生増加の機構

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

共同研究者 森山光章*、牛飼美晴**、黒田英志**、乾 明夫**、佐伯武頼***

*大阪府立大学大学院生命環境科学研究科統合生理学

**鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科

***熊本大学資源研究・支援センター

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用いられており、ショ糖投与後に血中グリセロール濃度の増加や尿中へのグリセロール放出が増加することが観察されている。この増加が肝臓でのグリセロール産生によるものか、肝臓灌流系を用いて検討した。フルクトースを基質としたときの double-KO 群におけるグリセロール生成は mGPD-KO 群と比べ有意に高い値を示し、このとき細胞質内の酸化還元状態の指標である乳酸/ピルビン酸 (L/P) 比も高い値を示した。グリセロール産生の高い double-KO 群においてピルビン酸や酸化剤である phenazine methosulphate を添加すると、L/P 比の低下とともにグリセロール産生は減少した。また、グリセロール産生の低い mGPD-KO 群において、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの阻害剤である aminooxyacetate を添加すると、L/P 比の上昇に伴いグリセロール産生は増加した。肝臓中の細胞質内酸化還元状態とグリセロール産生との間には正の相関が存在することを見出した。

A. 研究目的

シトリン (citrin; Ctrn) と mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPD) を両方とも欠損する Ctrn/mGPD double-KO マウスは、シトリン欠損症の病態解析や治療法の開発などに有用なモデル動物である。Double-KO マウスへのショ糖の投与は高アンモニア血症を引き起こすとともに肝臓内 glycerol 3-phosphate (G3P) の増加を起こす¹⁾。さらに、血中グリセロール濃度の増加や尿中へのグリセロール放出の増加をもたらす。この増加の機構を明らかにするため、肝臓灌流系を用いて検討した。

B. 研究方法

B. 1. マウス使用動物

実験には 13-24 週齢の野生型 (WT; Ctrn^{+/+}/mGPD^{+/+})、Ctrn-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{+/+})、mGPD-KO (Ctrn^{+/+}/mGPD^{-/-})、double-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{-/-}) マウスを用い、24 時間絶食したのち、灌流に供した。

B. 2. 肝臓灌流

肝臓灌流はマウスを pentobarbital sodium (50 mg/kg 体重、腹腔内投与) で麻酔した後、門脈を流入口、下大静脈を流出口として定流 (8 ml/min) の flow-through 方式で行った²⁾。灌流液は 95% O₂-5% CO₂ (37°C) で飽和した Krebs-bicarbonate buffer (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM Na₂SO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂) を用いた。灌流開始後 30 分間は灌流液のみで灌流し (前灌流)、その後、基質としてフルクトース (5 mM) を灌流液に加え、グリセロール生成を検討した。下大静脈から流出する灌流液を採取し、代謝物を測定した。灌流終了後、液体窒素を用いて肝臓を瞬時に凍結し、-70°C で保存した。

B. 3. 代謝物の定量

灌流流出液中のグリセロール濃度は glycerokinase 法³⁾を用いて、乳酸とピルビン酸濃

度は lactate dehydrogenase 法⁴⁾を用いて測定した。灌流液中のグルコース濃度はグルコース CII-テストワコー（和光純薬）を用いて定量した。

凍結した肝臓は 3% 過塩素酸を用いてホモゲナイズし、遠心後、上清を水酸化カリウム (2 M) を用いて中和し、G3P と dihydroxyacetone phosphate

(DHAP) 濃度の測定に供した。G3P⁵⁾および DHAP⁶⁾濃度はそれぞれ G3P dehydrogenase を用いた酵素法により測定した。

B. 4. 統計

得られた結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の有意差検定は Student's *t* test で行い、 $P < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

なお、本研究実施に関しては、大阪府立大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号：動物実験 22-2 号）。

C. 研究結果

C. 1. フルクトースからのグリセロール生成と L/P 比の変化

ショ糖は小腸の刷子縁膜で sucrase によりグルコースとフルクトースに分解されるため、本実験で用いる基質としてフルクトースを選択した。WT と Ctrn-KO 群において、フルクトース添加後のグリセロール産生はわずかな増加が認められたが、両群間で差はなかった（図 1A）。mGPD-KO 群と double-KO 群のグリセロール産生はフルクトースの添加後、著しい増加が認められた。しかし、mGPD-KO 群ではグリセロール産生は添加後 10 分以内に元のレベルに戻るのに対し、double-KO 群で

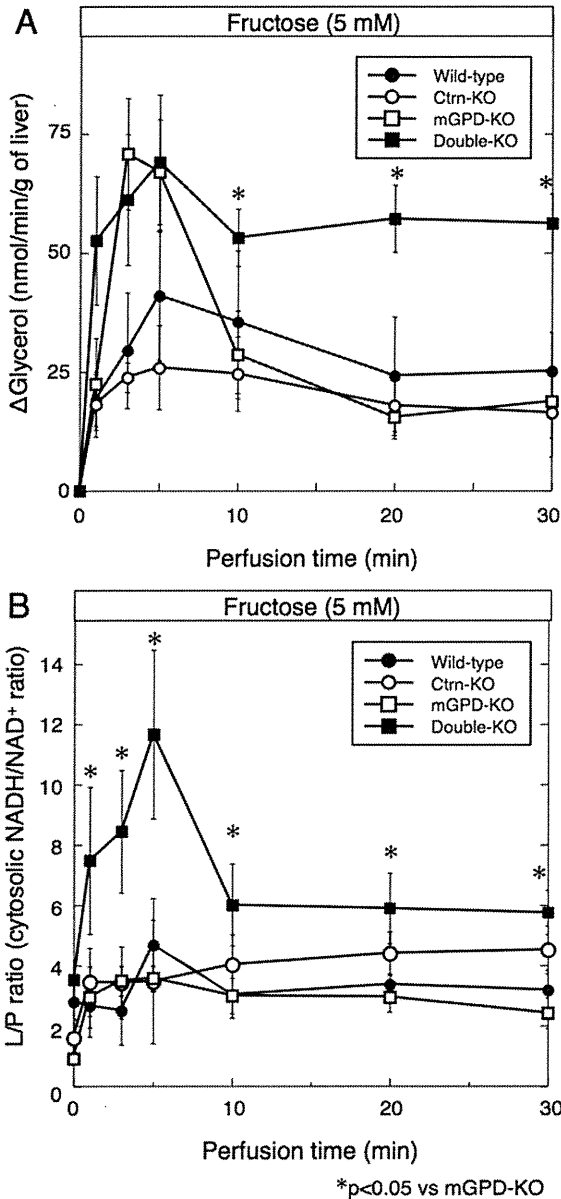


図 1. フルクトースからのグリセロール生成と L/P 比の変化

24 時間絶食後の WT 群または Ctrn-KO 群、mGPD-KO 群、double-KO 群のマウスを研究方法に記す方法で灌流した。30 分間の前灌流の後、灌流液中にフルクトース (5 mM) を添加し 30 分間灌流を行ったときのグリセロール生成 (A) と L/P 比 (B) の変化を測定した。

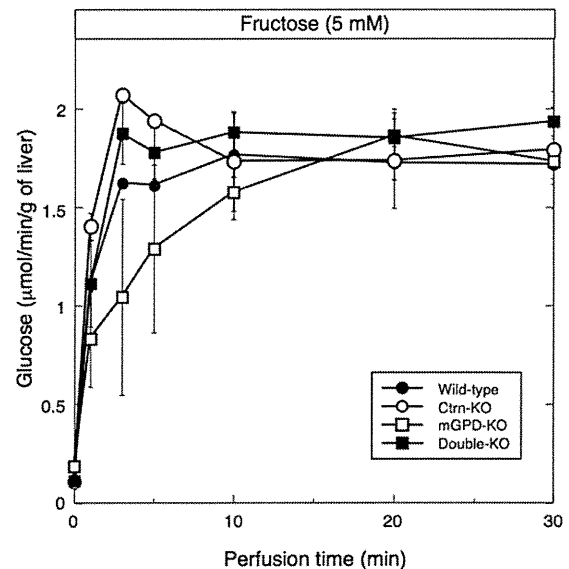


図 2. フルクトースからの糖新生の変化

図 1 の実験において、流出液中のグルコース濃度変化を測定した。

はその後も高い値を維持した。Double-KO群におけるグリセロール産生の増加は、細胞質内酸化還元状態の指標 (NADH/NAD⁺比) である L/P 比の増加を伴っていた (図1B)。

C. 2. フルクトースからの糖新生および乳酸、ピルビン酸生成と酸素消費の変化

フルクトース添加後のグルコース生成速度は、mGPD-KO 群において最初の 10 分間で低い傾向がみられるもののその後増加し、4 群間で差はなかった (図 2)。

このとき解糖系の指標である乳酸+ピルビン酸生成は、フルクトース添加後 10 分間で mGPD-KO 群が高い傾向を示すものの、その後は 4 群間で差はなかった (図 3A)。ミトコンドリアにおける呼吸活性の指標である酸素消費は最初の 10 分間のみ mGPD-KO 群で有意に低い値を示したが、その後は 4 群間で差はみられなかった (図 3B)。

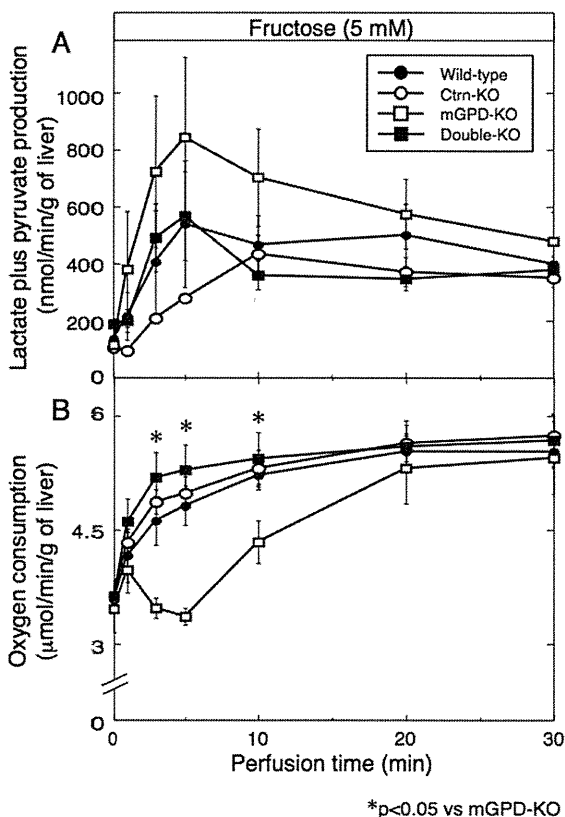


図 3. フルクトース添加後の解糖系活性と酸素消費の変化

図 1 の実験において、流出液中の乳酸+ピルビン酸濃度 (A) および酸素消費 (B) の変化を測定した。

C. 3. 細胞質内酸化還元状態によるフルクトースからのグリセロール生成の調節

肝臓におけるフルクトースからのグリセロール生成が細胞質内の酸化還元状態 (NADH/NAD⁺比) により影響を受けるか検討するため、細胞質 NADH を再酸化できるピルビン酸添加による影響を double-KO 群において検討した。灌流液へのピルビン酸 (2 mM) の添加により L/P 比が低下し (図 4B)、これに伴ってグリセロール生成も減少した (図 4A)。さらに化学的酸化剤で非酵素的

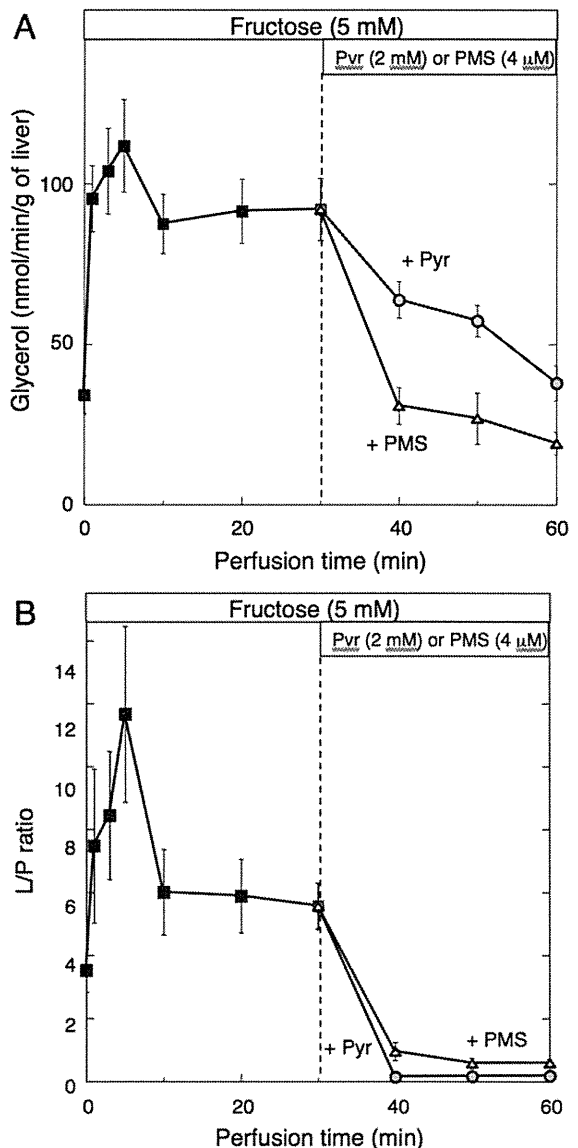


図 4. フルクトースからのグリセロール生成に対するピルビン酸と PMS の効果

図 1 に示す実験と同様に灌流し、30 分目にピルビン酸 (2 mM) または PMS (4 μM) を灌流液に加え、さらに 30 分間灌流したときのグリセロール生成 (A) と L/P 比 (B) の変化を測定した。

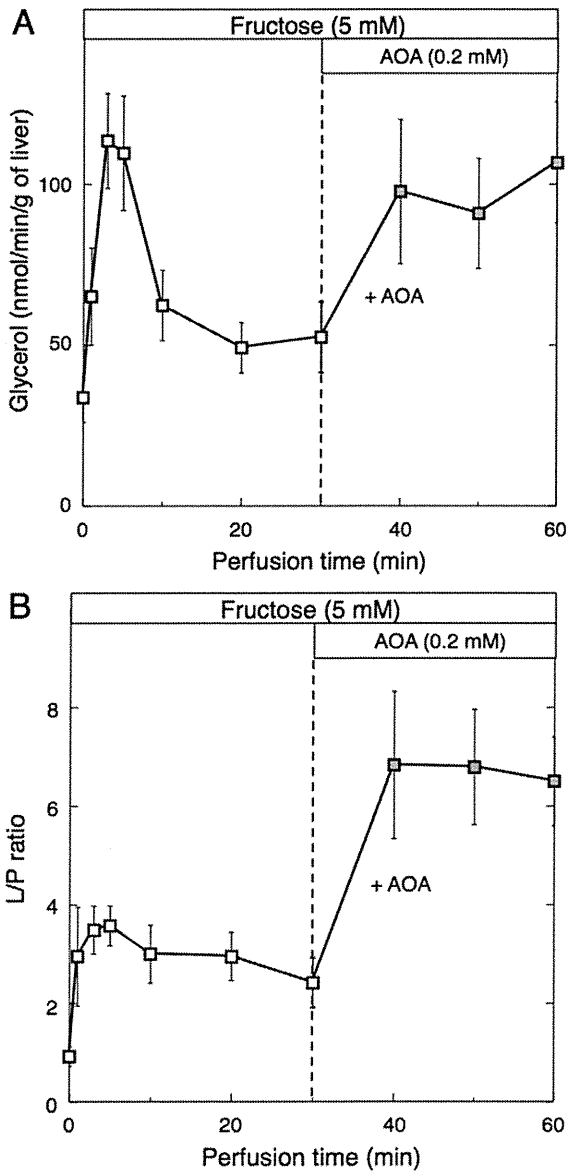


図 5. フルクトースからのグリセロール生成に対する AOA の効果

図 1 に示す実験と同様に灌流し、30 分目に AOA (0.2 mM) を灌流液に加え、さらに 30 分間灌流したときのグリセロール生成 (A) と L/P 比 (B) の変化を測定した。

に NADH 還元当量を酸化できる phenazine methosulfate (PMS)⁷⁾ の添加により L/P 比は低下し (図 4B)、このときグリセロール生成も減少が認められた (図 4A)。

次に mGPD-KO 群においても細胞質内酸化還元状態によりグリセロール生成が調節を受けるか検討した。リンゴ酸-アスパラギン酸シヤトルの阻害剤である aminooxyacetate (AOA)⁸⁾ の添加により L/P 比は上昇し (図 5B)、この変化に伴ってグリセロール生成も増加した (図 5A)。

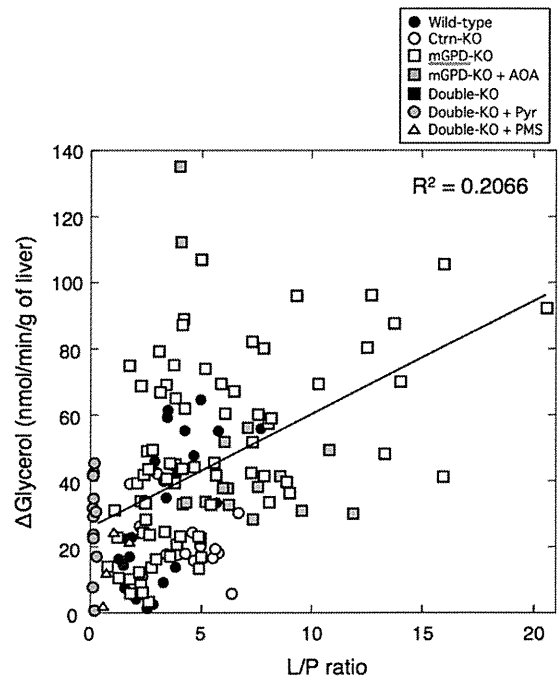


図 6. 肝臓における L/P 比とフルクトースからのグリセロール生成の関係

図 1 から 5 に示す実験において、フルクトース添加後の L/P 比とグリセロール生成とをプロットした。

表 1. 肝組織中の G3P および DHAP 濃度

Metabolite	WT	Ctrn-KO	mGPD-KO	Double-KO
G3P	621 ± 38	551 ± 40	547 ± 65	1312 ± 88*
DHAP	30 ± 4	28 ± 3	26 ± 4	29 ± 3
G3P/DHAP	21 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	47 ± 8*

図 1 に示す実験においてフルクトース添加後 30 分目に肝臓をサンプリングし、G3P および DHAP 濃度を測定した。*p<0.05 vs mGPD-KO

種々の条件下で L/P 比とグリセロール生成をプロットすると、両者に正の相関関係が認められた (図 6)。これらの結果は、細胞質内の酸化還元状態が肝臓におけるグリセロール産生の調節因子であることを示唆するものである。

C. 4. 肝臓中のG3PおよびDHAP濃度

表 1 に示すように、灌流終了時点での G3P 濃度は double-KO 群のみ高値を示し、DHAP 濃度は 4 群間で差はなかった。その結果、G3P/DHAP 比は double-KO 群のみ有意に高い値を示した。

D. 考察

シトリン欠損症モデル動物である double-KO マウスへのショ糖の投与は肝臓内 G3P の増加を起し¹⁾、その代謝物であるグリセロールの血中濃度の増加や尿中への放出増加をもたらす。この増加が肝臓内におけるグリセロール産生に由来するか否かを検討すべく、肝臓灌流系を用いてフルクトースからのグリセロール生成を検討した。その結果、NADH 還元当量のミトコンドリアへの輸送障害による細胞質内の還元化に伴い、肝臓におけるグリセロール産生の増加を見出した。

フルクトースの肝細胞への取り込みはグルコースとフルクトースに特異的なトランスポーターである glucose transporter 2 (GLUT2) を介して行われる。取り込まれたフルクトースはまず、フルクトキナーゼによって ATP でリン酸化され、fructose 1-phosphate (F1P) に変換される。F1P はアルドラーゼ B により DHAP と glyceraldehyde となる。DHAP は fructose 1, 6-bisphosphate、もしくは glyceraldehyde 3-phosphate となり解糖系および糖新生経路に組み込まれる。一方、glyceraldehyde は glyceraldehyde 3-phosphate となり解糖系および糖新生経路に入る。図 7 に肝臓におけるフルクトース代謝を示した。フルクトースの炭素骨格の主な運命は以下の 3 つに大別される⁹⁾。1) グルコースに変換される、2) 乳酸 + ピルビン酸生成に用いられる、もしくは 3) ミトコンドリアに輸送され酸化的リン酸化の基質として用いられる。灌流肝へのフルクトース添加後 10 分目までは、mGPD-KO 群において乳酸 + ピルビン酸生成が高い傾向にあること (図 3A) や酸素消費に促進がみられる (図 3B) もの、10 分目以降は糖新生、乳酸 + ピルビン酸生成およ

び酸素消費のいずれも 4 群間に差が認められなくなった。今回、GLUT2 活性は測定していないが、少なくとも 10 分目以降はフルクトースの取り込みおよび、その後の代謝速度に違いはないと考えられる。

ラット肝細胞において、5 mM フルクトース代謝時の ATP 量は一時的に低下し、その後徐々に回復していくことが報告されている¹⁰⁾。実際、胃内へのショ糖添加後の ATP レベルは低下すること (佐伯ら、未発表) から、この低下はフルクトース代謝が進んだ結果かも知れない。Double-KO 群では NADH をミトコンドリアに輸送する系を持たず ATP 産生に用いることが出来ないため、低下した ATP レベルを補う機構がより働かなくなっていると考えられる。今後、本実験での ATP レベルを確認する必要がある。

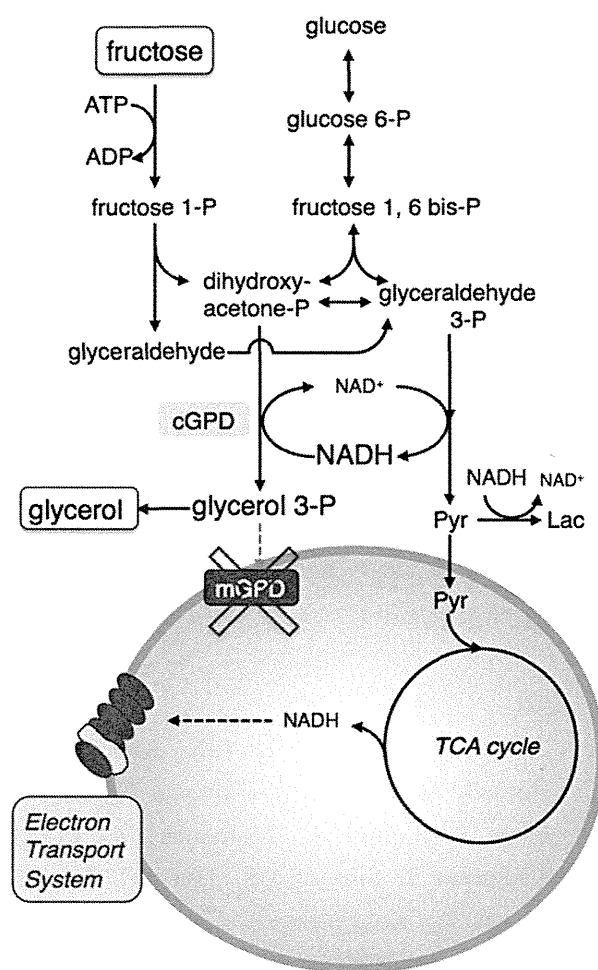


図 7. 肝細胞におけるフルクトース代謝

cGPD, cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase; mGPD, mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase

灌流肝においてもフルクトース代謝の過程で double-KO 群のみ G3P 濃度の増加および G3P/DHAP 比の上昇が確認された (表 1)。これは mGPD 欠損によりグリセロリン酸シャトルが働かないこと、さらに citrin 欠損によりリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルが働かないことにより、細胞質内で産生された NADH 還元当量がミトコンドリア内へ輸送出来ないことを反映している。蓄積した NADH 還元当量を再酸化するために cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase が働いた結果、G3P 濃度の上昇が起こりグリセロール生成が進んだと考えられる。実際に mGPD-KO 群において AOA の添加によりリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルを阻害するとグリセロール生成が増加すること (図 5) はこの考えを支持する。

Citrin のみが NADH 輸送系として機能している mGPD-KO 群ではフルクトース添加後 10 分目までに L/P 比の上昇を伴わないグリセロール生成の促進が認められた (図 1A および B)。このとき乳酸 + ピルビン酸生成は増加傾向にあり (図 3A)、酸素消費は他の 3 群と比べて低いこと (図 3B) から、フルクトース添加の初期には細胞質内の中間体レベルが増加している可能性がある。従って、今回測定していないがフルクトース添加後 10 分目までは mGPD-KO 群において G3P/DHAP 比が上昇し、これによってグリセロール生成が促進されたかも知れない。

E. 結論

シトリン欠損症モデル動物である double-KO マウスでは、フルクトースなどの糖質負荷により細胞質中の還元化が進み、肝臓におけるグリセロール生成が増加することを見出した。

文献

1. Saheki T, Iijima M, Li MX, Kobayashi K, Horiuchi M, Ushikai M, Okumura F, Meng XJ, Inoue I, Tajima A, Moriyama M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Tsui LC, Tsuji M, Okano A, Kobayashi T. Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J Biol Chem*, 282: 25041-24052, 2007.
2. Moriyama M, Li MX, Kobayashi K, Sinasac DS,

- Kannan Y, Iijima M, Horiuchi M, Tsui L-C, Tanaka M, Nakamura Y, Saheki T. Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *J Hepatol*, 44: 930-938, 2006.
3. Wieland OH. Glycerol. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, third ed, Vol. VI, 1984, pp. 504-510.
4. Bergmeyer HU and Gawahn K. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, NY, 1974.
5. Lang G. L-(-)-Glycerol 3-phosphate. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, third ed, Vol. VI, 1984, pp. 525-531.
6. Michal G. D-Fructose 1, 6-bisphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, third ed, Vol. VI, 1984, pp. 342-350.
7. Rognstad R. Control of ethanol utilization by rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 676: 270-273, 1981.
8. Rognstad R., Clark DG. Effects of aminooxyacetate on the metabolism of isolated liver cells. *Arch Biochem Biophys*, 161: 638-646, 1974.
9. Woods HF, Eggleston LV, Krebs HA. The cause of hepatic accumulation of fructose 1-phosphate on fructose loading. *Biochem J*, 119: 501-510, 1970.
10. Van den Berghe G. Fructose: metabolism and short-term effects on carbohydrate and purine metabolic pathways. *Prog Biochem Pharmacol*, 21: 1-32, 1986.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Moriyama M, Ushikai M, Kuroda E, Inui A, Takano K, Nakamura Y, Saheki T.: increased hepatic glycerol synthesis in citrin deficiency model mouse. 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

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

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の糖質忌避の機構解析

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*、古家澄江*、山村研一*、井上加奈子**、

黒田英志***、牛飼美晴***、浅川明弘***、乾明夫***

*熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野、**徳島文理大学健康科学研究所、

***鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心身内科

研究要旨 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）の輸液も同様に成人発症シトリン血症（CTLN2）発症を来す要因である。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、の解明を目指す。その目的から、シトリン欠損症モデルマウス（シトリンとミトコンドリアグリセロール 3-リン酸脱水素酵素を欠損する Ctrn/mGPD double-KO マウス）を含む野生型（wt）、Ctrn-KO、mGPD-KO、および Ctrn/mGPD double-KO の 4 種のマウスを用い、上記の溶液と水の自由摂取による摂取量とその嗜好性を比較した。その結果、double-KO マウスは高濃度シヨ糖摂取を好まないこと、エタノールとグリセロールに関しては、比較的低濃度から、double-KO および mGPD-KO マウスは摂取を嫌い、高濃度では Ctrn-KO マウスも摂取量が低下し、摂取を好まないことが判明した。この結果はこれらシヨ糖、エタノール、グリセロールがいずれもシトリン欠損症の発症要因であることと一致する。次にそれらの溶液液を忌避する共通の肝内代謝物偏移を、それら溶液の強制投与後の肝内代謝物を定量し解析した。その結果、摂取抑制または忌避行動は、肝内グリセロール 3-リン酸（G3P）の顕著な濃度上昇と ATP レベルの低下が同時に観察される場合に一致して見られることが判明した。以上の結果から、肝内または消化管における G3P の上昇あるいは細胞質 NADH 上昇と ATP 低下のシグナルが何らかの機構を介して脳神経系に送られ、摂取忌避行動を引き起こしているものと考えられる。

A. 研究目的

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）の輸液も同様に成人発症シトリン血症（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、の解明を目指す。

B. 研究方法

実験には 13 から 24 週齢の wt、Ctrn-KO、

mGPD-KO および Ctrn/mGPD double-KO マウスを用いた。溶液飲用実験では、濃度変化した溶液（シヨ糖、エタノール、またはグリセロール）と水を 2 本のボトルに入れ、マウスが自由に摂取可能とし、1 日に摂取した溶液量を重量変化で算出した。また、試験溶液と水の合計の全溶液摂取量に対する試験溶液の摂取割合を preference として算出した。肝臓における代謝中間体変化は、胃管による強制的な溶液投与 1 時間後に肝臓を freeze-clamp 法によって採取し、PCA 抽出液中の代謝物を酵素法、LC 法または LC/MS 法によって定量した¹⁾。

本研究に実施に関しては熊本大学動物実験委

委員会の承認を得た（承認番号：B25 147）。

C. 研究結果

C.1. 摂取量とPreferenceの測定

C.1.1. ショ糖摂取実験結果：本実験では、図1に示すように、ショ糖濃度を1%から20%に増加させて、その摂取量（溶液重量）と嗜好度（preference）を算定した。マウスはヒト同様に甘いものを好むので、濃度上昇に従い、摂取量（Fig.1[A]）はwt、Ctrn-KO、およびmGPD-KOマウスでは増加し、preferenceも100%まで上昇したが、double-KOマウスでは増加せず、20%ショ糖では1%のときよりも低い摂取量になった、またpreferenceも濃度上昇に従い低下傾向を示し20%では有意に1%濃度時よりも低い値となった。

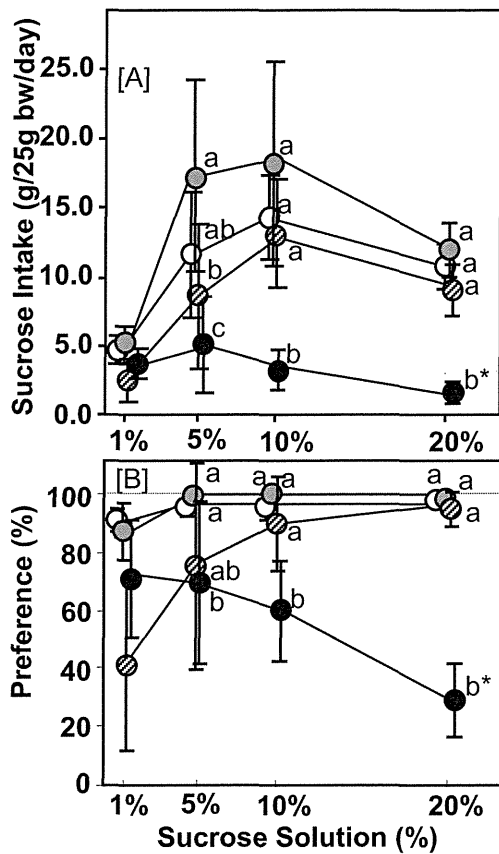


Fig. 1. Intake (A) and preference (B) of sucrose of wt (white), Ctrn-KO (grey), mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice.

The values denote mean±S.D. *p<0.05, lower than the values of 1% sucrose. The same alphabets denote no difference by ANOVA test.

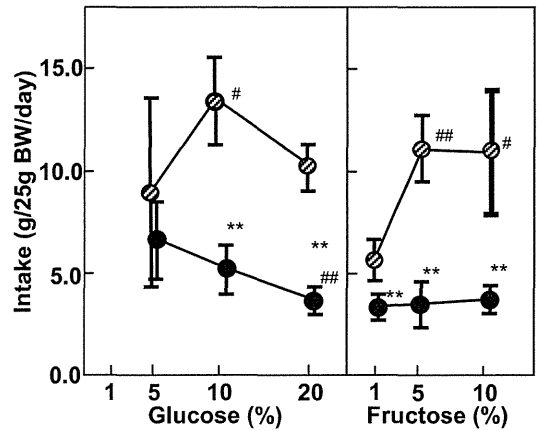


Fig. 2. Comparison of intakes of glucose and fructose between mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice.

mean±S.D. **p<0.01 between two genotypes; #p<0.05; ##p<0.01 vs the lowest conc.

なお、Fig. 2.に示すように、ショ糖成分のグルコースおよびフルクトースいずれにも double-KOマウスでは高濃度で摂取抑制が観察された。ただし、フルクトースのほうが低濃度で摂取抑制が観察された。

C.1.2. サッカリン、エタノールおよびグリセロール摂取実験：ショ糖摂取の抑制がショ糖の甘さによるのか、それとも代謝の結果なのかをサッカリンの摂取から比較観察した。Fig.3A.に示すように、サッカリン摂取量には、マウス間に差はなく、double-KOマウスに摂取抑制はなかった。このことからショ糖摂取抑制は代謝の結果生じていると考えられた。

飲酒は発症要因である。エタノールの摂取は、Fig.3B.に示すように、double-KOマウスのみならず、mGPD-KOマウスも低い濃度から摂取抑制が観察された。さらには高濃度ではCtrn-KOマウスも摂取抑制が観察された。Preferenceにおいてもほぼ同様の結果が得られた。

グリセロールは脳圧降下剤（グリセオール）の1成分として処方され、多くの患者の予後を不良とした。もうひとつの成分はフルクトースであり、Fig. 2.に示すように、グリセオールに含まれる濃度と同じ5%で摂取抑制を起している。

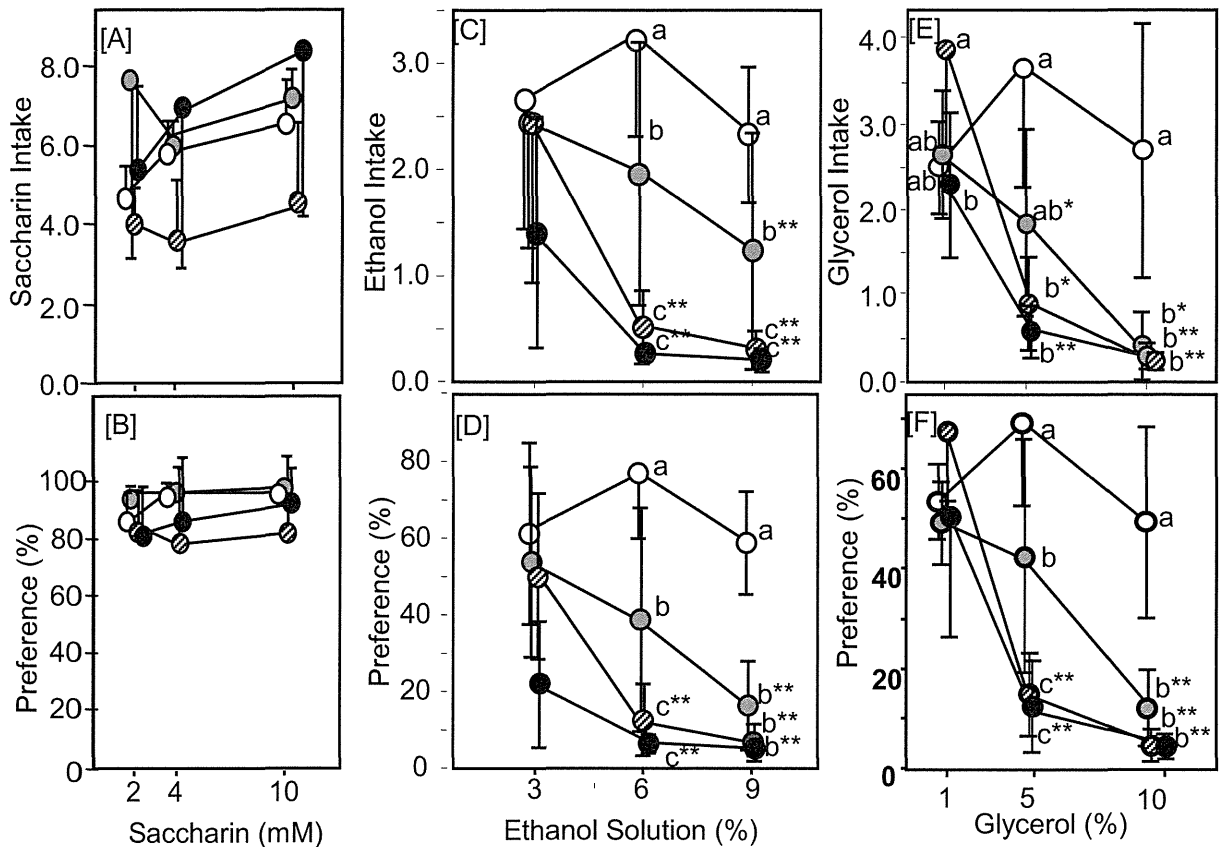


Fig. 3. Oral intake and preference of saccharin, ethanol and glycerol of wt (white circle), Ctrn-KO (grey), mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice.

The values denote mean±S.D. * $p < 0.05$, lower than the values of 1% sucrose. The same alphabets denote no difference by ANOVA test.

グリセロールもエタノールとほぼ同じ摂取量と preference 変化を示した。5%の濃度で mGPD-KO と double-KO マウスでは摂取量と preference において有意の低下を示し、Ctrn-KO マウスでは摂取量で 1%濃度より有意の低下を preference では wt より有意に低値を示した。

C.2. ショ糖、エタノールおよびグリセロールの強制投与による肝内代謝物の変動と自由摂取抑制との関連性

自由摂取抑制と肝内代謝物変動の関連性を検討するためにショ糖 (5g/kg)、エタノール (9%, 20ml/kg: 1.4g/kg)、およびグリセロール (5g/kg

と 10g/kg) を経口的に強制投与し、1 時間後の肝内代謝物変動を検討した。検討した代謝物は、glycerol 3-phosphate (G3P)、citrate、citrulline、glutamate (Glu)、lysine (Lys)、および ATP で、前 5 物質はすでにショ糖の強制投与で double-KO マウスにおいて有意な変動を示す代謝物である¹⁾。

C.2.1. 肝 G3P および citrate の変動: Double-KO マウス肝 G3P はショ糖投与で著しく増加することを報告している。今回さらにエタノールおよびグリセロールの強制投与でも、double-KO マウスのみならず、mGPD-KO および Ctrn-KO マウスでも増加すること、さらには wt マウスでも増加することが判明した (Fig. 5A)。

Citrate の変化を Fig. 5B に示す。Citrate はショ糖投与で mGPD-KO マウスを除いて減少したが、エタノール投与ではすべてのマウスで低下した。しかし 1g/kg グリセロール投与では wt マウスでは減少したが、mGPD-KO マウスでは減少しなかった。さらに 2g/kg グリセロール投与では mGPD-KO マウスも減少した。

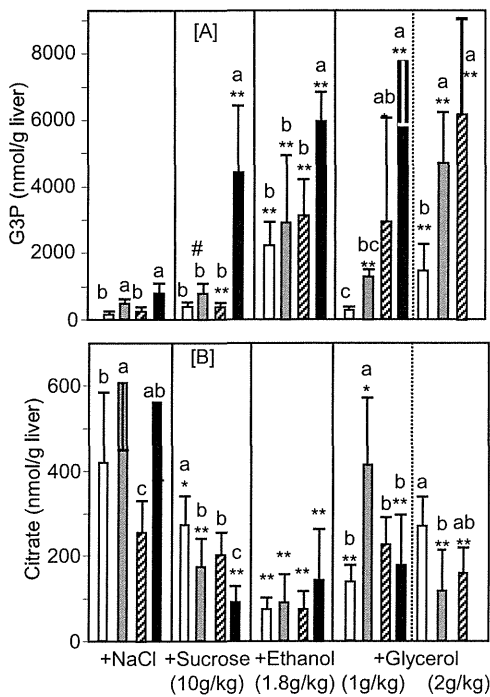


Fig. 4. Changes in hepatic G3P (A) and citrate (B) levels of the mice following oral administration of sucrose (5g/kg), ethanol (1.4g/kg), and glycerol (1g/kg or 2g/kg).

Wt (white column), Ctrn-KO (grey), mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice were used. The values are mean±S.D. *p<0.05 and **p<0.01 vs NaCl. The same alphabets denote no difference between the mice by ANOVA analysis.

C.2.2. アミノ酸の変動：肝中 citrulline の著しい増加はショ糖投与の時には double-KO マウスのみであったが、エタノールおよびグリセロール投与では Ctrn-KO マウスにおいても同様の著しい増加が観察された (Fig. 5A)。

Ctrn-KO および double-KO マウスの肝内 Glu はショ糖投与によって減少したが、エタノール投与では Ctrn-KO マウスでむしろ増加し、他のマウスでは変化がなかった。1g/kg のグリセロールではいずれのマウスも変動がなく、2g/kg グリセロール投与で wt マウスと Ctrn-KO マウスでの低下が見られ、mGPD-KO マウスでは変動しなかった。

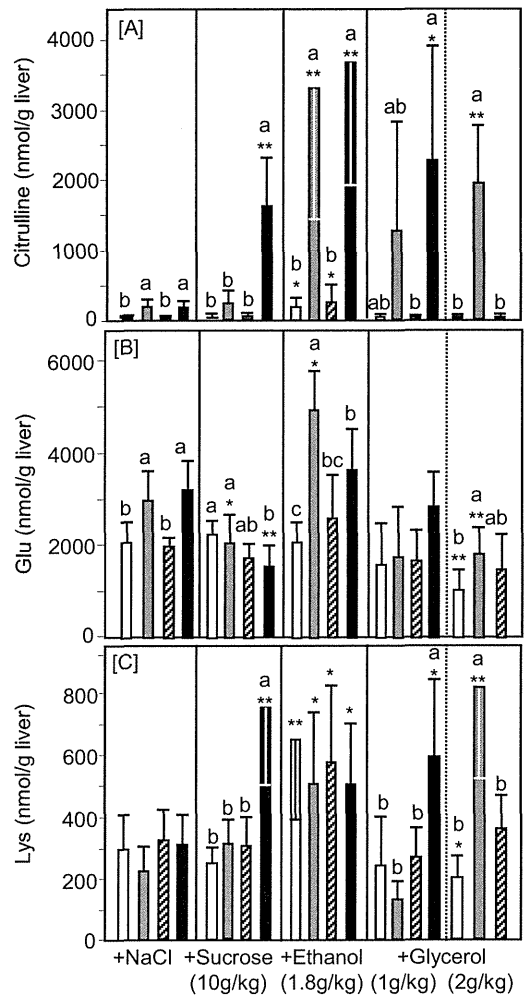


Fig. 5. Changes in hepatic citrulline (A), glutamate (B) and lysine (C) levels of the mice following oral administration of sucrose (5g/kg), ethanol (1.4g/kg) and glycerol (1g/kg or 2g/kg).

Wt (white column), Ctrn-KO (grey), mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice were used. The values are mean±S.D. *p<0.05 and **p<0.01 vs NaCl. The same alphabets denote no difference between the mice by ANOVA analysis.

ショ糖投与時では double-KO マウスのみ肝中 Lys 濃度が上昇したが、エタノール投与ではすべての genotype マウスで増加した。しかし、1g/kg グリセロール投与では double-KO マウスのみで上昇し、2g/kg グリセロールでは wt マウスでの低下と Ctrn-KO マウスでの上昇が観察された。

C.2.3. アデニンヌクレオチドの変動：

以上の解析からは摂取抑制と平行して変動する代謝物を同定でき得なかった。そこで、肝内 ATP レベルの変動を HPLC 法で定量し比較した。Fig. 6 に示すように、wt マウスでは、ショ糖、エタノール、2種のグリセロール投与によっては肝内 ATP レベルは有意の変動を示さなかった。しかし、一方、Ctrn-KO、mGPD-KO、および double-KO マウスではいずれも上記溶液投与によっていずれも肝内 ATP レベルは有意に低下した。

C.2.4. 摂取抑制と代謝異変同の関連性

以上の結果を Table 1 にまとめた。この表では、ショ糖摂取抑制が起こるときに同濃度溶液の強制投与で見られた代謝変動をハイライトし、エタノールおよび2濃度のグリセロールで観察される同じ摂取抑制と代謝物変動をハイライトし、共通の代謝物変動を探索した。結果は摂取量抑制が観察されるときには同時に G3P の上昇と ATP の低下が観察された。

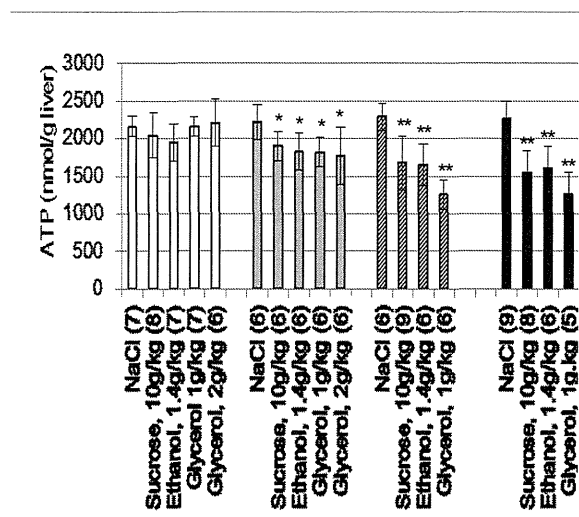


Fig. 6. Changes in hepatic ATP levels following administration of sucrose, ethanol or glycerol.

Wt (white column), Ctrn-KO (grey), mGPD-KO (hatched) and double-KO (black) mice were used. The values are mean ± S.D. *p<0.05 and **p<0.01 vs NaCl.

Table 1. Relation between voluntary suppression of intake and metabolite changes in the liver of mice

Treatment	Mouse	Suppression of intake	Hepatic metabolites					
			G3P	Citrulline	Citrate	Glutamate	Lysine	ATP
Sucrose (5g/kg)	Wt	Not sup	Inc (L)	Not ch	Dec	No	No	No
	Ctrn-KO	Not sup	No	No	Dec	Dec	No	Dec
	mGPD-KO	Not sup	Inc (L)	No	No	No	No	Dec
	Double-KO	Sup	Inc	Inc	Dec	Dec	Inc	Dec
Ethanol (1.4g/kg)	Wt	Not sup	Inc	No	Dec	No	Inc	No
	Ctrn-KO	Sup	Inc	Inc	Dec	Inc	Inc	Dec
	mGPD-KO	Sup	Inc	No	Dec	No	Inc	Dec
	Double-KO	Sup	Inc	Inc	Dec	No	Inc	Dec
Glycerol (1g/kg)	Wt	Not sup	No ch	No	Dec	No	No	No
	Ctrn-KO	(Sup)	Inc	Inc	Dec	No	No	Dec
	mGPD-KO	Sup	Inc	No	No	No	No	Dec
	Double-KO	Sup	Inc	Inc	Dec	No	Inc	Dec
Glycerol (2g/kg)	Wt	Not sup	Inc	No	No	Dec	Dec	No
	Ctrn-KO	Sup	Inc	Inc	Dec	Dec	Inc	Dec
	mGPD-KO	Sup	Inc	No	Dec	No	No	nt
	Double-KO	Sup	nt	nt	nt	nt	nt	nt

Dec, decreased; Inc, increased; Inc (L), increased but stayed low; Not ch, not changed; Not sup, not suppressed; nt, not tested; Sup, suppressed; (Sup), suppressed as compared with the lowest solution, but not different from wt in intake. Colored parameters denote those common to sucrose suppression in double-KO mice.

D. 考察

シトリン欠損症では、糖質を嫌い、たんぱく質・脂質に富む食品を好むという特異な食癖²⁾があり、さらにアルコール摂取後に発症した症例も報告され、さらには、グリセロールとフルクトースを含む脳圧降下薬であるグリセオール投与後に不幸な転帰を迎えた症例が多く報告されている³⁾。これらのことから、糖の毒性、さらには細胞質 NADH の産生を促進する食品・化合物などの毒性が示唆される。また実際にシトリン欠損症マウスもシヨ糖の摂取を嫌う性質が観察されたことからシヨ糖、エタノール、グリセロールの自発的摂取実験を行った。その結果、シヨ糖は、wt、Ctm-KO、mGPD-KO および Ctm/mGPD double-KO)マウスの4種のうち、double-KO マウスのみが高濃度シヨ糖の摂取が抑制され、忌避された。

シヨ糖の成分の、グルコースおよびフルクトース両者ともに同様の効果を持つこと、その中でもフルクトースはより低濃度からその作用を示すことが判明した。しかし、その作用は甘さではないことはサッカリンではそのような摂取抑制は見られないことからシヨ糖の代謝の結果に基づく忌避と判断できる。

さらにエタノールとグリセロールについては、double-KO マウスのみならず、mGPD-KO マウスもさらには高濃度では Ctm-KO マウスもそれら溶液の摂取を抑制する結果を示した。これらの実験事実は、シトリン欠損症の発症要因は患者に摂取を抑制するようなシグナルを出ていることを示唆する。そのシグナルが何であるかを推定するため、強制投与後の肝内代謝物変動を解析した。

すでにシヨ糖投与実験からその後起こる肝内代謝物変動には、G3P の著しい増加、クエン酸などの TCA サイクルメンバーの減少、citrulline と Lys の増加、Glu の減少を明らかにしている¹⁾が、これらに加え、ATP 濃度の変化を見出しているため、これらについて検討した。摂取抑制の定義を、最低濃度溶液に比し濃度増加で摂取量が有意に減少する場合、または wt マウスに比し、有意に減少する場合とした。Table 1 に示すようにシヨ糖に加え、エタノールとグリセロールの摂取について抑制がかかる場合に、共通して変動する代謝物を同定できなかった。しかし、G3P の増加と ATP の減少が同時に見られる場合に摂取

抑制が観察されていることを見出した。これまでに、ATP の減少が摂食促進を起こすことが報告されている。しかし、摂食抑制について中枢性の機構に関する研究はあるが、摂取後の消化器系からどのようなシグナルが送られているかについての研究は乏しい。本研究では ATP 減少に加え、G3P の増加が加わることによって摂取抑制を起こす、と考えられることが示された。G3P の増加は細胞質 NADH の上昇による。これらのシグナルが何らかの機構により、中枢に伝えられ、摂取抑制を起こすものと推測する。

E. 結論

シトリン欠損症の発症要因である糖質(本研究ではシヨ糖、グルコース、フルクトースを用いた)、エタノール、およびグリセロールはいずれも高濃度でシトリン欠損症モデルマウスにおいてそれら溶液の摂取抑制を起こした。高濃度エタノールとグリセロールに関しては、double-KO マウスのみならず、mGPD-KO および Ctm-KO マウスにも摂取抑制を起こした。摂取抑制は肝内代謝物変動としては共通に G3P の増加と ATP の減少を同時に伴った。これらのシグナルが何らかの機構によって中枢に伝えられ、摂取抑制を起こすものと考えられる。

F. 健康危険情報

以上の研究は、これまでのシトリン欠損症における研究を裏付け、シトリン欠損症においては、高濃度(または多量)の糖質、エタノール、およびグリセロールなどの細胞質に NADH 産生を促進するような物質投与を行ってはならないことを示すものである。

Reference

1. Saheki T, Inoue K, Ono H, Tushima A, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Kuhara T, Ohse M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Kobayashi K. Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011;104:492-500.
2. Saheki T, Kobayashi K, Terashi M, Ohura T, Yanagawa Y, Okano Y, Hattori T, Fujimoto H,

Mutoh K, Kizaki Z, Inui A. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. *J Inher Metab Dis*. 2008;31(3):386-94.

3. Yazaki M, Takei Y, Kobayashi K, Saheki T, Ikeda S. Risk of worsened encephalopathy after intravenous glycerol therapy in patients with adult-onset type II citrullinemia (CTLN2). *Intern Med*. 2005;44(3):188-95.

G. 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, Satrustegui 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, Satrustegui 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, Abudouxikuer 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, Satrustegui 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 Fujian, Fujian China, June 8, 2013.
- 3) 佐伯武頼：シトル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ル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ル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。

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

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）
シトル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

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

研究分担者 長船 健二 京都大学 iPS 細胞研究所

共同研究者 池田 修一、矢崎 正英

信州大学医学部第三内科

研究要旨 成人型シトルリン血症は、未だ有効な治療法の確立されてい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)の病態を呈することが知られている。本研究では、成人型シトルリン血症の患者皮膚細胞または末梢血 T 細胞より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同疾患の罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導可能であることを確認した。また、それらの疾患特異的 iPS 細胞由来の肝細胞は、同疾患の原因遺伝子である Citrin や尿素サイクル関連遺伝子を発現することも確認した。さらに、健常人 iPS 細胞由来の肝細胞はアンモニア分解能を示し、尿素サイクルが機能していることが示唆された。これらの結果は、成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞の肝細胞への分化誘導系を用いた試験管内疾患モデル作製と病態解析が可能であることを示唆する。

A. 研究目的

尿素サイクル関連分子である Citrin の欠損で発症する常染色体劣性疾患である成人型シトルリン血症は、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。本邦の肝疾患としてウイルス性肝炎が減少し、今後、肥満人口の急増を受けて、メタボリックシンドロームの肝病変である NASH から肝硬変、肝癌へ進展する患者が増加することが予想されている。

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。そこで、我々は、成人型シトルリン血症の患者由来 iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の肝細胞への分化系を用いることで同疾患と NASH に対する新規疾患モデルの開発を目指した。

本研究の目的は、成人型シトルリン血症患者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。

B. 研究方法

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の患者から同意取得後に皮膚生検または採血を行う。そして、皮膚塊を培養し増殖させた線維芽細胞にレトロウイルスベクターによる初期化誘導 4 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)または 3 因子(c-MYC を除く)の遺伝子導入にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。または、抹消血から T 細胞を分離しエピゾーマルベクターを用いた 6 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, shP53)にて iPS 細胞を樹立する。

次に、樹立された iPS 細胞を成人型シトルリン血症の罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導することにより、病態を模倣する試験管内疾患モデルの作製を行う。併せて既報のヒト iPS 細胞（胚性幹細胞）から肝細胞への分化誘導法を改良し、より効率よくかつより成熟した肝細胞の作製方法も検討する。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部「医の倫理委員会」にて承認された研究計画に基づき、匿名化の実施および遺伝情報を厳密に管理することによって、患者個人情報の漏洩によるプライバシー侵害の防止を徹底して行う。

C. 研究結果

昨年度までに 2 例の成人型シトルリン血症患者 (I(851del4)/II(IVS11+1G>A) の compound heterozygote の SLC25A13 遺伝子変異を有する 30 歳代女性と I(851del4) の homozygote 変異の 40 歳代男性。) の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞株を樹立していた。本年度は、更に 1 例の患者 (IV:Ser225X の homozygote 変異の 40 歳代男性。) の末梢血 T 細胞からエピゾーマルベクターを用いた 6 因子の導入によって iPS 細胞の樹立を行った。そして、導入エピゾーマルベクターのゲノムへの挿入の無い細胞株を選択した。次に、NANOG, OCT3/4, SOX2, TRA1-60, TRA1-81 など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。また、既報のヒト iPS 細胞から肝臓系譜への分化誘導法 (Kajiwara M, 2012) 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。また、健康人 iPS 細胞由来の肝細胞培養系へアンモニアを添加することによるアンモニア代謝能を確認した。

D. 考察

成人型シトルリン血症の患者体細胞から、レトロウイルスベクター法に加え、エピゾーマルベクター法を用いた遺伝子導入による疾患特異的 iPS 細胞樹立が可能であることが判明した。そして、成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞は、試験管内で肝細胞へ分化誘導可能であった。また、iPS 細胞から作製された肝細胞はアンモニアを分解可能であり、尿素サイクルが機能していることが示唆された。

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、本研究で確立される疾患肝細胞モデルは成人型シトルリン血症の病態を解析する上で有用なツールになるものと考えられる。

E. 結論

成人型シトルリン血症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 細胞から肝細胞が分化誘導可能であった。また、iPS 細胞由来の肝細胞において尿素サイクルが機能していることが示唆され、成人型シトルリン血症に対する試験管内疾患モデル作製、病態解析に使用可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S: A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Scientific Reports 4: 3594, 2014.

2) 前 伸一、荒岡 利和、長船 健二: iPS 細胞培養法. 分子腎臓病学実験操作法 (中外医学社) 27-36, 2013.

2. 学会発表

1) 長船 健二: iPS 細胞研究の臨床への応用～肝胆膵領域を中心に～. 第 18 回日本外科学会病理学会学術集会. 東京ドームホテル (東京). 2013 年 9 月 28 日.

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。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし