

201324083B

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 24～25 年度 総合研究報告書

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 24～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 池 田 修 一

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 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. 研究分担者総合報告	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 平成 24、25 年度の活動報告	37
V. 班構成員名簿	53

[I] 総合研究報告

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）

総合研究報告書

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 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）指針を作成し、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・予防法を確立することである。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

シトリン欠損症は、小児期に新生児肝炎 (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病である。本症はミトコンドリア膜蛋白（シトリン）の欠損に起因し、尿素回路異常症とは異なる疾患である。本邦では、病因遺伝子である *SLC25A13* 遺伝子の変異ヘテロ保有者率が約 1/60 と非常に高く、6,000 人を超える患者数が推定され、最も頻度の高い遺伝性疾患の一つと推測される。従来 NICCD、CTLN2 の病像については明らかされてきたが、両疾患を繋ぐ期間（無-脳症期）の病態については不明な点が多い。特に変異遺伝子ホモ保有者率 (1/17,000) と CTLN2 発症率 (1/100,000) との間に

は大きな解離があり、正確に CTLN2 と診断された患者以外の動向は全く不明で、未知な臨床病型や他の精神神経疾患と誤診されている患者が相当数いる可能性がある。このためシトリン欠損症の全容は解明できておらず、本症を総括した診断基準が未だ作成できていない。最近、無-脳症期にも思春期食思不振症、成長障害、若年性膵炎、脂肪肝炎など、多彩な臨床像を呈することが明らかにされている。また、学校給食による偏食の矯正や飲酒の強要が CTLN2 の発症誘因となった患者もおり、無-脳症期患者の正確な診断、生活指導・適切な治療が CTLN2 発症予防に繋がる可能性がある。一方、70 歳代発症の CTLN2 患者も確認されており、高齢発症患者の詳細な病態把握により、CTLN2 の発症抑制因子を明らかにできると考えられる。

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、CTLN2 の発症機序の解明と予防法を確立する。

B. 研究方法

I) シトリン欠損症患者の臨床像の多様性の検討

1990 年以降、信州大学医学部附属病院に入院加療歴のある CTLN2 患者 36 名(男性 22 名; 女性 14 名) の臨床像について検討し、CTLN2 前(無-脳症期) や発症後の臨床的多様性を明らかにし、CTLN2 の発症誘因などの有無を検討する。

II) 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について

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、高タンパク・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。

III) 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(タンパク: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。

IV) 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る新化学診断法

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を行った。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

I) シトルリン欠損症患者の臨床像の多様性の検討

CTLN2 患者 36 名の解析では、脳症初発年齢は平均 40.1 ± 14.5 歳で、最小年齢 11 歳から最高年齢

が73歳であった。発症誘因が比較的明らかな患者は、4名(手術1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。

II) 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について

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。

III) 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 7.19 ± 2.12 g/day: 4-15g/day)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1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 1.53 ± 1.68 と有意に改善した。12名の患者(80%)で、脳症発作頻度の低下、脳波所見の改善が認められた。3名については、投与後も発作を繰り返し、肝移植を施行している。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、分泌系で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。ま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。

④疾患修飾遺伝子の解明

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。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。

IV) 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

ショ糖では 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ョ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、ショ糖、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る新化学診断法の検討

尿中において G3P および glycerol 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。ショ糖を投与した 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、ショ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ョ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 細胞由来の肝細胞と比較

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) シトルリン欠損症患者の臨床像の多様性の検討

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（高炭水化物含有）が発症誘因となっていた可能性がある。また手術などの侵襲や、飲酒が発症誘因となり得ることが示された。ソマトスタチン産生腫瘍と本症との関連は明らかではないが、肝臓癌含めて、シトルリンが何らかの腫瘍起因因子である可能性が示唆された。高齢発症患者で、特異な食癖は目立たず、また飲酒も可能であった機序については、シトルリン以外のシトルリン機能を代償する機構の存在が、発症を規定している可能性がある。

II) シトル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、大部分はシトル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ル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。

III) シトル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。

シトル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、シトル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ル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、シトル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。

IV) 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、シトルリン欠損症の診断、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ル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。

本研究の達成度について

今回、多数例の解析から無-脳症期の臨床像は、従来報告されていた膵炎や肝癌以外にも、思春期食思不振症や慢性腎不全を呈する患者もいることが明らかにされ、非常に多彩な臨床症状を呈することが明らかになった。しかしながら、全く症状を呈さないシトルリン欠損症患者もおり、更なる患者の蓄積が必要である

CTLN2 発症機序の解明や予防法の確立では、発症誘因因子が明かである患者が数名おり、飲

酒や糖質の過剰摂取（腎不全食）が誘因となった可能性が示唆された。また、モデルマウスの研究では、糖質忌避傾向が示された。発症機序については、未だ不明な点が多いが、少なくとも糖質の過剰摂取は、CTLN2 発症に深く関与している可能性が明らかにされた。発症予防については、発症誘因因子を避けること以外には、完全には確立できていないが、今後疾患修飾因子が解明できれば、発症予防法も解明しうるものと考えている。

CTLN2 の治療戦略については、従来有効性が明らかにされていた肝移植療法以外にも、低炭水化物食や、ピルビン酸、MCT 療法などが有効性を示すことができ、侵襲性の高い移植療法以外の治療戦略について確立することができた。

本研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

シトリン欠損症患者は、本邦のみでなく、広く東アジア-東南アジア諸国に存在することが示されており、本研究の成果は、これら諸外国の患者の治療戦略、患者発見などに貢献でき、国際的に非常に価値のあるものと考えられる。

学童・思春期の原因不明の摂食障害や成長障害、非定型的精神病と診断されている患者の中に、本症患者が多数含まれている可能性がある。本研究により、これらの患者に正確な診断・治療がなされれば、小児死亡率の減少、学童・思春期の摂食異常症への新規治療法の導入、最終的には不登校・引きこもり患者の減少など、学校保健の改善にも繋がる。また、頻回におこる異常行動から重度精神病として閉鎖病棟に隔離されている患者さんを社会復帰させることができる。

国内で肝移植を受ける CTLN2 患者は年間 5-8 名と推測されるが、CTLN2 の発症予防法・内科的治療法が確立されれば、肝移植を回避することで医療費の削減が可能であり、また健常ドナーへの精神的、身体的負担を消滅できる。また NICCD 後の無-脳症期の患者は、常に CTLN2 の発症の恐怖に晒されており、発症予防・治療法の確立により精神的負担が軽減される。

本症では、高糖質輸液、グリセロール、糖質

含有量の多い肝不全病院食が患者の病態を急激に悪化させる。従来、CTLN2 が予後不良とされていた要因の一つが、医原性であった可能性があり、実際に医療訴訟に至った例もある。また学校給食による偏食の矯正が CTLN2 発症に繋がる可能性があるため、現在策定中のシトリン欠損症の診断・治療ガイドラインの提唱により、適切な食生活指導や治療を行うことで、病態の悪化を防ぐことができる。

今後の展望について

食嗜好アンケートの確立は、学童期のシトリン欠損症患者の更なる発見につながり、CTLN2 発症前の無-脳症期の臨床像を多数例で詳細に検討できる可能性がある。今回の iPS 細胞の確立、脂肪肝の発症機序の解明結果を用いて、今後は新規治療法の開発につなげていきたい。

E. 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。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。また数例であるが、飲酒などの発症誘因因子も明らかにできた。

本症患者のほとんどが罹患する脂肪肝については、肝細胞の PPAR- α 低下により、脂肪酸分解能の低下が関与していることが明らかにされ、今後の新たな治療法開発の基礎となるものと考えられる。

簡便な高頻度変異検出による遺伝子解析法では、少なくとも一個の高頻度変異を認めた患児の大部分は、シトリン欠損症と考えられた。また今後、食嗜好アンケート調査の有効性や、血・尿中グリセロール測定が診断マーカーとしての有効性が示せれば、高頻度変異検出法とあわせて、特に学童期の CTLN2 発症前（無-脳症期）のシトリン欠損症患者の更なる発見につながり、食事指導や発症誘因因子の指導などで CTLN2 発症を予防しうる可能性が期待できる。また iPS 細胞の樹立は、今後細胞レベルでの、病態の解明、CTLN2 の発症機序・発症予防因

子の解明につながるものと期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yazaki M, **Saheki T**, **Ikeda S**. A 73-year-old patient with adult-onset type II citrullinemia successfully treated by sodiumpyruvate and arginine. *Clin Neurol Neurosurg* 115:1542-1545, 2013,
2. Tazawa K, Yazaki M, Fukushima K, Ogata S, Makuuchi M, Morita K, Hiraiishi H, Iwasaki Y, Kita J, Kubota K, **Ikeda S**: Patient with adult-onset type II citrullinemia beginning 2 years after operation for duodenal malignant somatostatinoma: indication for liver transplantation. *Hepato Res* 43:563-568, 2013
3. Yazaki M, Hineno A, Matsushima A, Ozawa K, Kishida D, Tazawa K, Fukushima K, Urata K, Ikegami T, Miyagawa S, **Ikeda S**: First two cases of adult-onset type II citrullinemia successfully treated by deceased-donor liver transplantation in Japan. *Hepato Res* 42:934-939, 2012.
4. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, **Saheki T**, Kobayashi K, Ohura T, **Kure S**. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metabol*, 105:553-8, 2012
5. 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**. SLC25A13 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*. 8: e74544, 2013
6. 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*. 33:13957-71, 2013
7. 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*. 19: 4545-4551,2013
8. **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*. 107:322-329,2012
9. Wang JS, Wang XH, Zheng YJ, Fu HY, Chen R, Lu Y, Fang LJ, **Saheki T**, Kobayashi K. Biochemical characteristics of neonatal cholestasis induced by citrin deficiency. *World J Gastroenterol*. 18:5601 -5607, 2012
10. Takahashi Y, Koyama S, Tanaka H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Haga H, Watanabe H, Toyota K, Numakura C, **Hayasaka K**, Kato T. Anelderly Japanese patient with adult-onset type II citrullinemia with a novel D493G mutation in the SLC25A13 gene. *Intern Med*. 51:2131-2134. 2012
11. Wongkittichote P, Sukasem C, Kikuchi A, Aekplakorn W, Jensen LT, **Kure S**, Wattanasirichaigoon D. Screening of SLC25A13 mutation in the Thai population. *World J Gastroenterol*. 19: 7735-42, 2013
12. **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
13. **池田修一**。肝性脳症。神経疾患最新の治療 2012-2014 344-347, 2012
14. **池田修一**。成人型シトルリン血症。Clinical Neuroscience 30:612-613, 2012

2. 学会発表 国内学会

1. 矢崎正英、池田修一：成人型シトルリン血症の臨床的多様性—自験例 31 名における臨床病理学的検討。第 109 回日本内科学会総会、京都、4 月、2012
2. 矢崎正英、池田修一：成人型シトルリン血症患者の治療戦略。第 53 回日本神経学会総会、東京、5 月、2012
3. 尾澤 一樹, 日根野 晃代, 松嶋 聡, 岸田 大, 田澤 浩一, 福島 和広, 矢崎 正英, 池田 修一, 他 2 名:成人型シトルリン血症患者に対する本邦初の脳死肝移植 2 例の検討。第 53 回日本神経学会総会、東京、5 月、2012
4. 矢崎正英、池田修一。成人型シトルリン血症患者に対する国内初の脳死肝移植：本症患者 2 症例の経験。第 30 回日本肝移植研究会、福岡、6 月、2012
5. 矢崎正英、池田修一：成人型シトルリン血症の臨床病理像と遺伝子変異の対応。第 54 回日本神経学会総会、東京、5 月、2013
- 6.木下朋実、田澤浩一、下条久志、矢崎正英、小柳清光、池田修一：成人発症 2 型シトルリン血症の中樞神経系：2 剖検例の免疫組織検討。第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、4 月、2013

国際学会

1. Yazaki M, Ikeda S, Saheki T. Clinical pictures of Japanese adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) patients. The 10th Asia Pacific Conference on Human Genetics, Malaysia, 12 月,2012
2. Saheki T. Citrin deficiency: Then and Now- A tribute to Dr. Keiko Kobayashi. The 10th Asia Pacific Conference on Human Genetics, Malaysia, 12 月,2012
3. Yazaki M, Ikeda S, Saheki T. Therapeutic strategy for patients with adult onset typeII citrullinemia (CTLN2). The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), Chiba, 11 月,2013
4. Saheki T. Citrin deficiency: Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), Chiba, 11 月,2013
5. Moriyama M, Inui A, Saheki T. Increased hepatic glycerol synthesis in citrin deficiency model mouse. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), Chiba, 11 月,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

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っ滞症（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っ滞症、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・乳児期では胆汁うっ滞症、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] 研究分担者総合報告

平成 24～25 年度研究のまとめ

タ イ ト ル	シトリン欠損症の遺伝子診断と鑑別診断の効率化に関する研究
研究分担者	呉 繁夫
所 属 機 関	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野
<p>【目的】シトリン欠損症（以下、本症）は症状や化学診断のみでは診断できない症例が多く、診断確定には責任遺伝子である <i>SLC25A13</i> 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 <i>SLC25A13</i> 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）。以来、全国の本症が疑われる症例に対し遺伝子検査サービスを提供してきた。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 <i>SLC25A13</i> 変異を検出できない症例の遺伝的背景を検索することを目的とする。</p> <p>【方法】現在までに、当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、<i>SLC25A13</i> 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。</p> <p>【結果】11 種類の高頻度遺伝子変異（mutation [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 <i>SLC25A13</i> 遺伝子の全エクソン・シークエンスを実施し、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。</p> <p>【考察】高頻度変異スクリーニングで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、大部分は本症と考えられる。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。</p> <p>【結論】ハイリスク症例を対象とした高頻度変異検出による遺伝子検査において、少なくとも一個の高頻度変異を認めた患児の大部分はシトリン欠損症と考えられる。</p> <p>【文献】Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in <i>SLC25A13</i>. Mol Genet Metabol, 105:553-8, 2012</p>	