

シトリン欠損症の病態解明

1. シトリン欠損症患者の血漿グリセロール
2. モデルマウスの病態における肝 glycerol 3-phosphate と ATP の重要性

研究分担者 佐伯 武頼 熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室・特任教授
共同研究者 藤本侑希、古家澄江、山村研一
熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室

研究要旨

若干のシトリン欠損症患者の尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)濃度を測定した結果、1歳から9歳までの患者で対照者に比し、有意に高値を示す結果を得た。

また、モデルマウスを用い、成人発症II型シトリン血症(CTLN2)の発症誘因である糖質(ショ糖)、エタノール、およびグリセロールの自由摂取による忌避現象の解析とそれに伴う肝内代謝物の解析を行い、忌避行動には肝内 G3P 上昇と ATP 低下の二つの代謝変動が同時に観察されることを見出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、ミトコンドリア膜輸送体である肝型aspartate glutamate carrier(シトリンcitrin)の欠損によって生じる、成人発症II型シトリン血症(CTLN2)、新生児肝内胆汁うっ滞症(NICCD)、およびその他のシトリン欠損による多様な病態を明らかにし、新たな診断法を開発し、ピルビン酸ナトリウムなどの治療薬の効果を簡便に判断できるようにすること、および新たな治療薬の開発のシーズを見出すことである。

B. 研究方法

以上の目的に従い、本年度は次の2つの研究テーマを実行した。

1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度モデルマウスを用い明らかにした尿中へのグリセロールおよびG3Pの排泄の増加を若干のシトリン欠損症患者において検討した。日本国内および中国において遺伝子解析によって、シトリン欠損症(CTLN2、NICCD)と診断された患者およびほぼ同年齢の対照者から尿を採取し、酵素法を用いてグリセロールとG3P濃度を定量¹⁾し、クレアチニン(酵素法によるキット使用)比で表記し、比較検討した。また年齢による差が大きいことから9ヶ月まで、1歳から9歳まで、10歳以上の3群に分け、対照群と比較検討した。尿の採取については以下の主治医・研究者に研究協力を得た(敬称略)。矢崎正英(信州大学)、岡野善行(おかのこどもクリニック)、坂本修(東北大学)、張春花(MILSインターナショナル)、Song, Yuan-Zong(中国 Jinan University)、三淵浩(熊本大学)。

2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

CTLN2の発症誘引となる糖(本実験ではショ糖を使用)、エタノール、グリセロールの自由摂取による忌避行動の解析とそれに伴う肝内代謝物の変動から忌避行動に関連して変動すると考えられる物質を明らかにすることを試みた。

飲用実験は、2本のボトルに水と各種濃度の試験溶液を入れ、どちらでも自由に摂取できるようにして、2日間テストし、1日の摂取量を重量(g/25g体重)で表し、また水と試験溶液摂取量中における試験溶液摂取量の比率からpreferenceを計算した。また、胃管を通じて各種濃度の溶液を強制的に投与し、1時間後にfreeze-3%過塩素酸抽出液作成・中和し、肝代謝物の解析を行った。G3P、クエン酸は酵素法^{2,3)}、アミノ酸はEZfaast・LC/MSを用いる方法(Phenomenex Ltd., Los Angeles, USA)、ATPはLC法⁴⁾で定量した。

(倫理面への配慮)

尿の解析に関しては熊本大学大学院生命科学研究部長に、「シトリン欠損症の新しい化学診断法の確立：尿中グリセロールの診断的価値」の題で臨床研究・医療技術承認申請を行い、また、多施設共同研究実施計画書を提出し、承認(先進第1652号)を得た。マウスの研究に関しては熊本大学長に動物実験計画書を提出し、承認(B25-147)を得た。

C. 研究結果

1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度報告のようにシトリン欠損症モデルマウスにおいては尿中にグリセロールおよびG3Pが他の遺伝子型マウスに比し、有意に増加することから、若干のシトリン欠損症患者群と対照群で比較した。年齢によって尿グリセロールとG3Pの値が大きく変動することから年齢から3群に分け、比較検討した。結果は、Fig. 1に示す。値のばらつきが大きいことか

ら箱ひげ図で示し、Mann-Whitney U testで有意差検定を行った。1歳から9歳のグループで尿グリセロールおよびG3Pともに患者グループで有意に高値を示したが、その他の群では有意差は得られなかった。

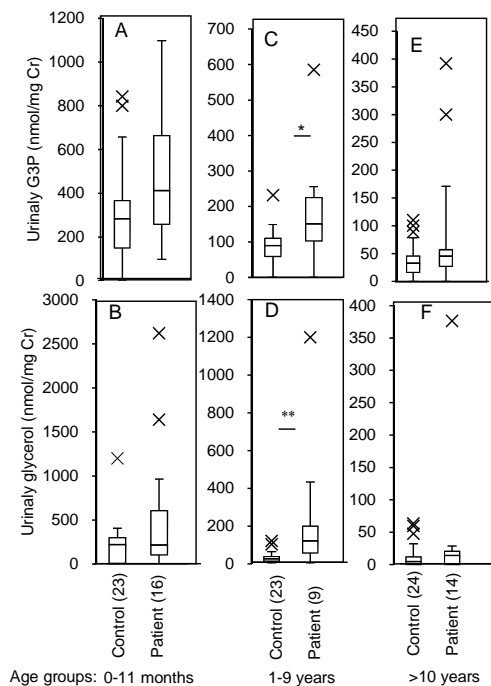


Fig. 1. Urine G3P (A, C and E) and glycerol (B, D and F) levels in controls versus patients with citrin deficiency by age. All subjects were divided into three age categories: 0-11 months (A and B), 1-9 years (C and D) and greater than 10 years (E and F). The data for control subjects and citrin deficient patients are shown as box-and-whisker plots (outlier values are shown as an 'X'), with the number of samples examined per age category being shown in parentheses. Significant differences between controls and patients within each age category were evaluated by the Mann-Whitney U test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

糖質、アルコールおよびグリセロールはCTLN2の発症誘因である。そこで、4種のモデルマウス、野生型 (wt)、シトリン欠損 (Ctrn-KO)、mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase欠損 (mGPD-KO)、およびCtrn/mGPD double-KOマウスを用い、各種濃度の糖 (ショ糖)、エタノール、グリセロール溶液の自由摂取量とpreferenceを計算した。Fig. 2にショ糖摂取、Fig. 3にエタノールとグリセロール摂取に関する結果を示す。ショ糖はエネルギー源で甘みを持つことからマウスにおいても嗜好性は高く、wt、Ctrn-KOおよびmGPD-KOマウスにおいて高濃度のショ糖摂取を好み、摂取量も多く、preferenceもほぼ100%を示す。しかし、double-KOマウスにおいては低濃度からの摂取量は増えず、20%濃度ではむしろ5%濃度よりも摂取量も、preferenceも低下し摂取忌避を起こしていると考えられる。一方、エタノール

とグリセロールに関しては、Fig. 3に示すように、double-KOのみならずmGPD-KOマウスも低濃度から摂取量が低下したが、Ctrn-KOマウスも高濃度では摂取量低下を示した。Preferenceについてもほぼ同様の結果となった。ここで他のマウスより有意に摂取量、preferenceが低い場合、および最少濃度の摂取量、preferenceが有意に低下した場合を忌避度それぞれ1として得点2以上 (最大4点) を忌避行動があると定義した。

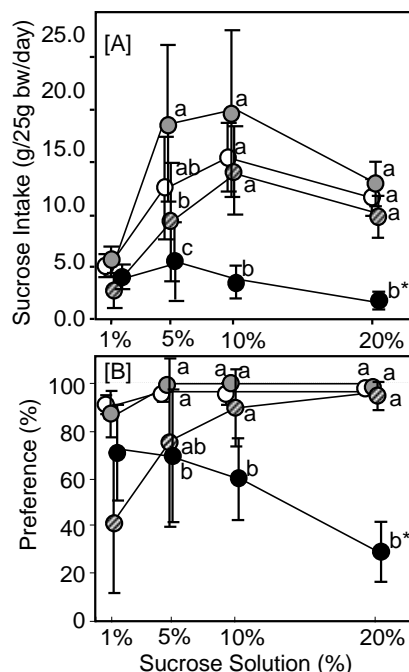


Fig. 2. Intake [A] and preference [B] for varied concentrations of a sucrose solution.

Mice were provided two bottles, one containing water, and the other containing either a 1, 5, 10 or 20% sucrose solution. [A] Intake of each mouse was determined by weighing the bottles each day and averaged over a two-day period. [B] Preference (%) was calculated as $100 \times (\text{g of test solution}) / [(\text{g of test solution}) + (\text{g of water})]$. White circles denote wt mice; grey, Ctrn-KO mice; striped circles, mGPD-KO mice; black circle, Ctrn/mGPD double-KO mice. Data on each group of mice are expressed as mean \pm SD ($n = 6-8$). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at $p < 0.05$.

続いて、以上のような忌避行動がどのような機序によって生じるかのヒントを得るため、忌避が起こる濃度溶液の強制的な投与による肝内代謝物の変動を検討した。すでに高濃度 (50%) ショ糖の強制投与によって変動する肝内代謝物は、報告した⁵⁾ように、G3P、TCAサイクル中間体、シトルリン、グルタミン酸、リジンがある。そこで、各種濃度の溶液の強制投与による代謝物の変動と忌避行動の関連性を検討した。Fig. 4にはG3PとTCAサイクルの代表として測定したクエン酸のデータを示す。肝内G3Pは忌避行動を起こすような溶液濃度においていずれも大きく上

昇したが、wtマウスで忌避行動を起こさない高濃度エタノール投与においても肝内G3P濃度は上昇していた。忌避が起こる条件の溶液濃度で、クエン酸は低下したが、忌避行動が起こらない濃度でも wtマウスやCtn-KOマウスなどで低下を示し、忌避行動との関連性は見られなかった。

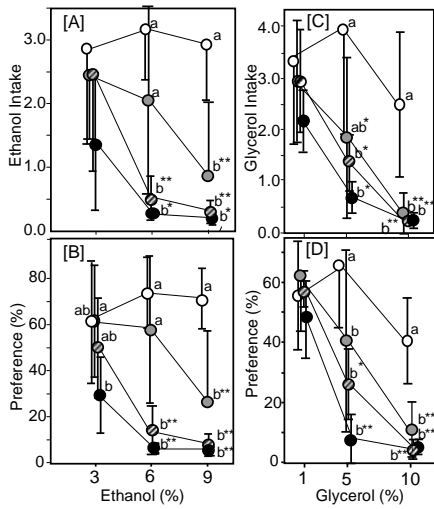


Fig. 3. Intake ([A] and [C]) of and preferences ([B] and [D]) for varied concentrations of glycerol ([A] and [B]) and ethanol ([C] and [D]).

Oral intake and preference of the mice were determined as indicated for Fig. 1. Concentrations of the test solutions are shown. The symbols for each group of mice are as indicated in Fig. 1. Data on each group of mice are expressed as mean \pm SD (n = 6-9). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at $p < 0.05$.

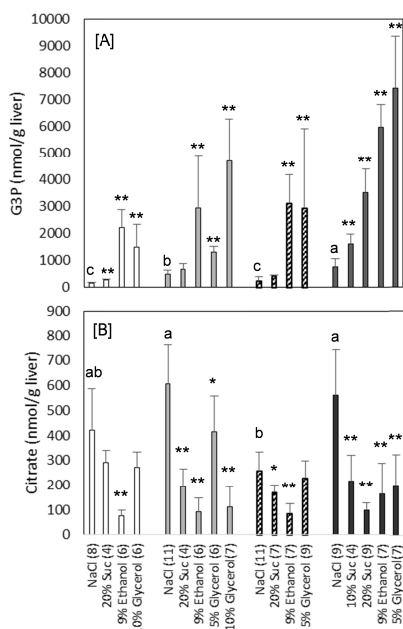


Fig. 4. Changes in the hepatic G3P [A] and citrate [B]

levels following oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions. One hour after an enteral administration of a test solution (either 0.9 % saline, 20 % or 10% sucrose, 9 % ethanol, or 5% or 10% glycerol) at a standard dose of 20 ml/kg by gastric tube to the fed mice, mice were sacrificed, a neutralized, perchloric acid-extracted liver homogenate was prepared and analyzed as described in Materials and Methods. White column denotes wt mice; grey column, Ctn-KO mice; striped column, mGPD-KO mice; black column, Ctn/mGPD double-KO mice. Mean values with the same character are not different at $p < 0.05$. * and ** denote $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, from the basal levels of each genotype.

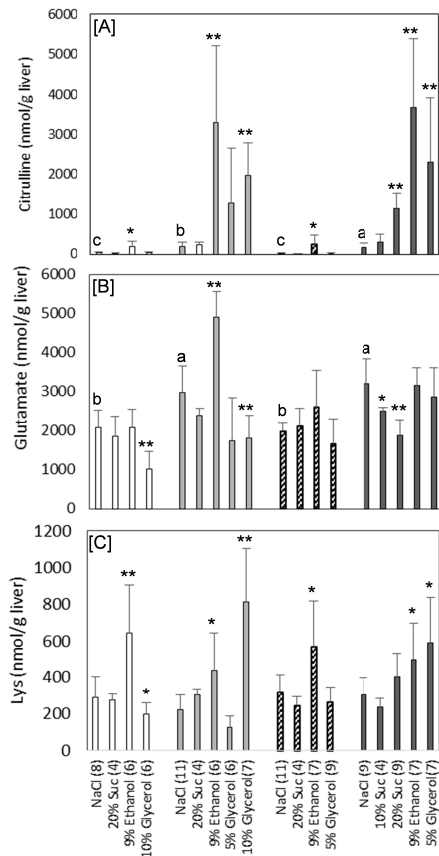


Fig. 5. Changes in the hepatic citrulline, glutamate and lysine (Lys) levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4. The hepatic amino acid levels were determined by liquid chromatography/mass spectrometry, as described in Materials and Methods. Mean values with the same character are not different at $p < 0.05$. * and ** denote $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, from the basal levels of each genotype.

同様にアミノ酸についても、Fig. 5に示すように必ずしも忌避行動との相関では見られなかった。たとえば、シトルリンの上昇は高アンモニア血症との関連性があるが、mGPD-KOマウスでは忌避行動は見ら

れてもシトルリンの上昇はない。

以上から、忌避行動はG3Pレベルとはほぼ一致の傾向が見られたので、複数因子が関与する可能性を考えた。肝ATP低下はショ糖投与下のmGPD-KOマウスでも見られることから当初は本忌避行動との関連性を考えなかったが、複合で関わる可能性を考慮してATPについても検討した。その結果はFig. 6に示すとおりであり、忌避行動を示さないmGPD-KOマウスへのショ糖投与を除いては忌避行動と肝ATP低下はよく相関している。そこで、G3Pのデータと照らし合わせるとG3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件と忌避行動が観察される条件は一致した (Table 1)。

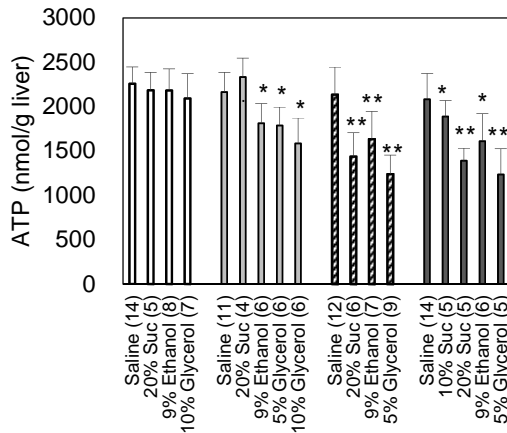


Fig. 6. Changes in the hepatic ATP levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4.. * and ** denote $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively, from the basal levels of each genotype.

Table 1. Relation between aversion and metabolite changes in the liver of mice

Treatment	Mouse	Aversion	G3P	ATP
20% Sucrose (4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	no	nc	nc
	mGPD-KO	no	nc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
9% Ethanol (1.4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
5% Glycerol (1g/kg)	Wt	no	nc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
10% Glycerol (2g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	nt	nt

Dec, decreased; Inc, increased; yes and no, presence (score>2) and absence (score<1) of aversion; nc, not changed; nt, not

tested. Grey highlights indicate coincidence of aversion and the two metabolic changes, and yellow, metabolic changes without aversion.

D. 考察

シトルリン欠損症モデルマウスで観察された尿グリセロールおよびG3Pの排泄増加は、シトルリン欠損症患者では1歳から9歳のグループにおいて対照群に比し、有意に上昇していた。しかしその他の年齢では対照群との間に有意な差は得られなかった。この理由は、1歳以下のNICCD患者および成人のCTLN2患者では症状があり、治療を受けているが、1歳以上のNICCD経験者ではほとんど治療を必要とするような症状が見られないことから治療を受けていないことに起因するのかもしれない。また、マウスでは糖質やエタノール投与で血漿グリセロールが上昇した。シトルリン欠損症患者に糖質やエタノールなどのCTLN2発症誘因となる物質の投与は不可能であるが、安全な負荷テスト可能な物質が見いだせれば、有効なシトルリン欠損症診断法になる可能性がある。

マウスにおいてもCTLN2発症誘因となる物質が高濃度の場合、その摂取を忌避することが明らかになった。その機構にはこれら忌避物質の代謝が関与する。ショ糖による忌避行動はショ糖が甘いという味の問題ではないことはサッカリンでは忌避行動が見られない(結果省略)ことからもうかがえる。さらには糖質、エタノールおよびグリセロールはいずれも細胞質にNADHを産生する物質であり、シトルリンの代謝上の役割が細胞質NADH還元当量のミトコンドリアへの輸送にあることからもうなずける。忌避行動が起こる機構について肝内の代謝変動を検討した。その結果、G3P上昇と高い相関性が見られたが、必ずしもその関係は完全には一致しなかった。そこで肝内ATPレベルについても検討した結果、G3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件では忌避行動が観察されることが明らかになった。これらの代謝変動がどのように忌避行動につながるのかは今後の問題であるが、これらの代謝変動が何らかの経路を経て脳神経系に伝えられるのであろうと想像される。また、このような代謝変動は肝臓ではなく腸管組織内での現象である可能性もある。一方、もし、G3P上昇またはATP低下を防ぐことができるならば、忌避行動を起こさなくすることが考えられる。実際に我々は、ピルビン酸ナトリウムやアラニン、グルタミン酸ナトリウムなどのアミノ酸、またはMCT (中鎖脂肪酸からなるトリグリセリド)が、高糖質食であるAIN-93Mの摂取低下から生じる体重減少を防ぎ、摂取量を増やすこと、ならびに初頭の強制投与による肝内G3Pの上昇を抑制することを観察している。すなわち、以上の2つの代謝変動はシトルリン欠損症悪化状態のマーカーと考えられる。今後はATPレベルへの効果を示す物質の検討・検索が重要と考えている。

文献

- O.H. Wieland, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 504-510.
- G. Lang, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 525-531.
- H. Möllerring, Citrate, Methods of Enzymatic

- Analysis, vol. VII, Verlag Chemie, Weinheim, 1985, pp. 2-12.
4. L.I. Zhou, et al, J Agric Food Chem. 60 (2012) 8994-8999.
 5. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 104 (2011) 492-500.
 6. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 107 (2012) 322-329.

E . 結論

シトリン欠損症患者では、尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)は、有意に高値を示し、バイオマーカーとして有用と考えられた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang ZH, Yang ZG, Chen FP, Kikuchi A, Liu ZH, Kuang LZ, Li WM, Song YZ, Kure S, Saheki T, Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong, China: a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency. Tohoku J Exp Med. 2014;233(4):275-281.

2. 学会発表

- 1) Saheki T, Prenary session, History and fundamental basis of the pathophysiology, International Symposium on Citrin Deficiency, Guanzhou, China
- 2) 佐伯武頼 特別講演「シトリン欠損症における特異な食癖とその病因・病態・治療との関連」日本栄養改善学会四国支部学術総会 平成 26 年 5 月 17 日、徳島
- 3) 藤本侑希、矢崎正英、岡野善行、張春花、坂本修、Yuan-Song Song、三淵浩、遠藤文夫、山村研一、佐伯武頼、シトリン欠損症新規病態マーカーの探索、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 4) 森山光章、藤本侑希、牛飼美晴、堀内正久、高野 桂、中村洋一、佐伯武頼、シトリン欠損症モデルマウス灌流肝アミノ酸および TCA サイクル中間体代謝に対する糖質負荷の効果、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 5) 佐伯武頼、藤本侑希、古家澄江、山村研一、シトリン欠損症の病態解析と治療法の開発：現在の課題、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 6) Saheki T, Fujimoto Y, Furuie S, Yamamura K, Metabolic basis of carbohydrate toxicity in citrin, liver-type mitochondrial aspartate glutamate carrier, deficiency, Asia Europe

Workshop on Inborn Error of Metabolism (AEWIEM) 2015, January 18-19, 2015, Cairo, Egypt.

G . 知的財産権の出願・登録状況

- なし
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし