

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：バイオマーカー研究

TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究

研究分担者 山口 清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

ミトコンドリアの呼吸鎖機能のバイオマーカーとなる代謝産物を尿中・血中に発見できないか、質量分析を用いて検討する。今回、gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) を用いて、ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) を中心にシトリン欠損症などミトコンドリア機能障害を疑われる患者の尿中有機酸分析を行い、TCA 回路関連代謝産物の排泄について検討した。

患者の尿では正常コントロールに比べて、特に 4-ヒドロキシフェニル乳酸 (PHPLA) の排泄増加が明らかであった。継時的に分析を行った症例では持続的に排泄増加を認めており、ミトコンドリア機能障害のマーカーになりうるかもしれない。グリセロール 3 リン酸 (G3P) も検討したが、昨年と同様、MELAS 患者での上昇はほとんど認められなかった。

また、尿中有機酸分析の異常代謝産物の排泄パターンからビタミン B1 欠乏と考えられた 3 か月女児で、母体もビタミン B1 欠乏が明らかだったにもかかわらず、ビタミン B1 投与で児の代謝プロファイルに変化がなく、後に家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された症例を経験した。ビタミン B1 が補酵素として働く酵素は TCA 回路に関わる酵素でもあり、尿中有機酸分析の代謝プロファイルから MELAS の診断につながる可能性が示唆された。

研究協力者

長谷川(小村)有紀 (島根大学小児科助教)

A. 研究目的

ミトコンドリアの呼吸鎖では、β酸化系や解糖系・TCA 回路から供給される NADH_2^+ や FADH_2 が酸化される際に放出する電子を伝達している。ミトコンドリア機能低下により高乳酸血症になると、これらの回路に供給される NAD^+ が枯渇し、最終的に NADH_2^+ や FADH_2 の供給が障害される。主に MELAS 患者の尿を用いてこれら NADH_2^+ や FADH_2 の酸化還元反応の場である TCA 回路の代謝産物を測定し、動態を検討するために質量

分析を行った。

B. 研究方法

尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定
ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 患者などミトコンドリア機能低下を疑われた患者について、GC/MS を用いた尿中有機酸分析から TCA 回路関連成分の排泄量を測定した。尿中有機酸分析は TCA 回路関連成分である乳酸、ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、アコニット酸、クエン酸、イソクエン酸などをいずれも検出・同定できる。特に NADH_2^+ や FADH_2 を生成する過程の前後にあるイソクエン酸、 α -ケトグルタル酸(2KG)、コハク酸、リンゴ

酸の値に注目した（図 1）。またミトコンドリア機能低下と関連するとされるチロシン代謝産物の 4-ヒドロキシフェニル乳酸（PHPLA）についても検討した。また健常コントロールと比較し、どんな代謝産物の排泄が高いかも検討した。

（倫理面への配慮）

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

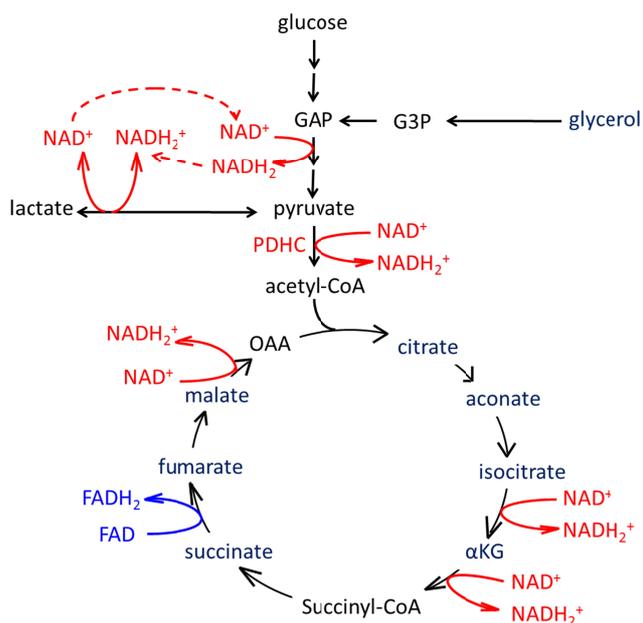


図 1：解糖系・TCA 回路と NADH₂⁺、FADH₂ 産生

C. 研究結果

1) 尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定（図 2）

学童から成人の MELAS 患者 4 名（患者 A～D）、シトリン欠損症 1 名（患者 E）、家族内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す女兒（患者 F）で尿中有機酸分析を行った。TCA サイクル代謝産物は健常コントロールと比べ、MELAS 患者と患者 F でイソクエン酸、2KG、コハク酸の排泄が多く、シトリン欠損症はコントロールとほぼ変わらなかった。患者 F についてはさらにフマル酸とリンゴ酸の排泄増加が明らかであった。

PHPLA の排泄は、患者 C を除く全員で健常コントロールに比べて強い上昇を示していた。特に

継続的な分析が行えた患者 E と F では、持続的な排泄増加を認め、これはピルビン酸の内服前後で変化しなかった。

グリセロール、グリセロール-3-リン酸（G3P）についても検討したが、排泄が認められたのは MELAS 患者 1 名とシトリン欠損症患者のみであり、今回も G3P の排泄増加は認められなかった。

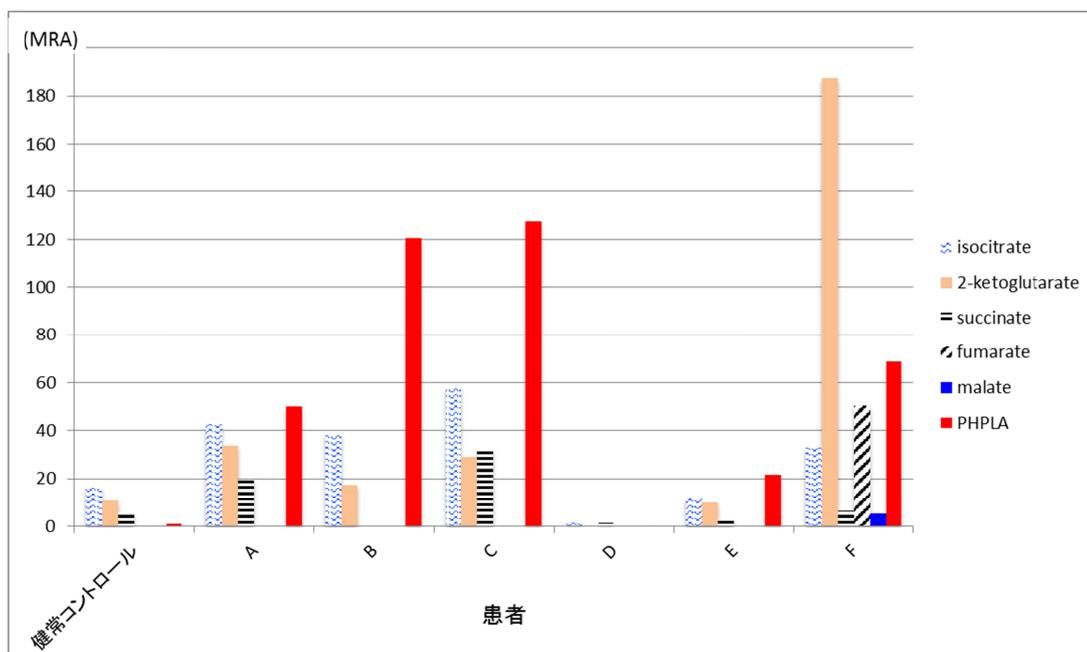


図 2 : MELAS 患者 (A~D)、シトリン欠損症患者 (E)、高乳酸血症を示す乳児 (F) と、TCA 回路関連成分・PHPLA の排泄量

2) 家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された 3 か月女児例

今回の研究中に、高乳酸血症を示す 3 か月女児 (患者 F) を経験した。女児の代謝プロファイルは、乳酸、ピルビン酸の排泄増加とともに、分枝鎖アミノ酸代謝産物である α -ケト酸 (2-ケトイソカプロン酸、2-ケト-3-メチル吉草酸) や 2-ケトグルタル酸、2-ヒドロキシグルタル酸、2-ケトアジピン酸、2-ヒドロキシアジピン酸などの排泄増加が認められた。これらの排泄は ピルビン酸脱水素酵素複合体、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体、分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体が同時に障害される場合、すなわちビタミン B1 欠乏や E3 欠損症例でみられるプロファイルを示していた (図 3、4)。母が出産前に悪阻が強く食事

がほとんど食べられなかったことや、母体血中のビタミン B1 が著明に低下を認められており、これらの状況や血中ビタミン B1 値からもビタミン B1 欠乏と判断した。しかし、ビタミン B1 (25mg/日) を投与後も児の代謝プロファイルに変化はなかった。ビタミン B1 付加酵素の欠損症も疑い、酵素活性も検討したがこれにも異常はなかった。

女児に心不全などの脚気症状は認められなかったが、生後 8 か月で体重 4.9kg と著明な体重増加不良を呈していた。後に家系内に 2 人の MELAS 患者が発見された。今回の経過から、女児の代謝プロファイルが MELAS 発症前の病態と関連している可能性が示唆された。

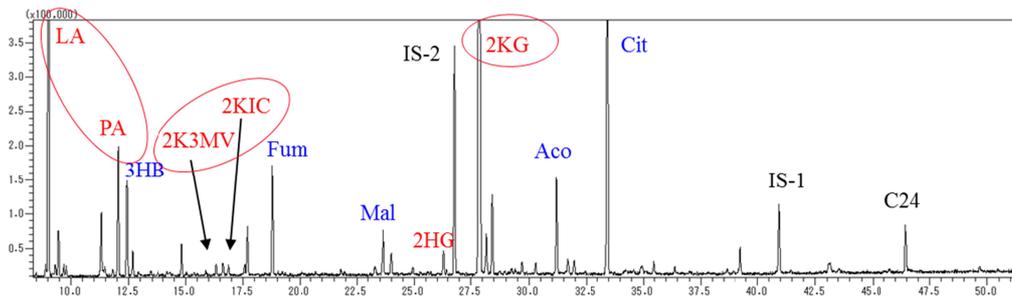


図 3：患者 F の尿中有機酸所見

- 1) ピルビン酸脱水素酵素複合体障害：LA:乳酸、PA:ピルビン酸
 - 2) 分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体障害：2K3MV:2-ケト-3-メチル吉草酸、2KIC:2-ケトイソカプロン酸、
 - 3) 2-ケトグルタル酸脱水素酵素複合体障害：2KG:2-ケトグルタル酸、2HG:2-ヒドロキシグルタル酸
- 略称：3HB:3-ヒドロキシ酪酸、Fum:フマル酸、Mal:リンゴ酸、Aco:アコニット酸、Cit:クエン酸、IS:内部標準物質

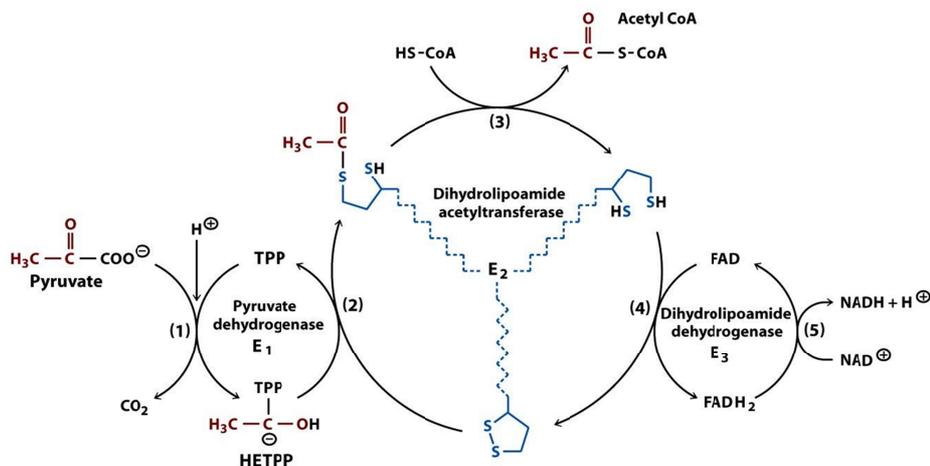


Figure 13-1 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

図 4：脱水素複合体におけるビタミン B1 (TPP) の作用：3 つの脱水素酵素複合体に共通に作用

D. 考察

ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系の働きはミトコンドリア機能に直結する。呼吸鎖への電子伝達を担う TCA 回路や解糖系の代謝プロ

ファイルはこの機能を示していると考えられる。今回、MELAS 患者を中心に解析し、MELAS 患者では健常者に比較して TCA サイクルの代謝産物が増加していることが示唆された。一方、シトリン欠損症では TCA サイクルの代謝産物の増加

は認められなかった。これは MELAS のミトコンドリア機能障害は直接的に TCA サイクルの代謝障害に影響するが、シトリン欠損症は肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体蛋白の障害であり、TCA サイクル代謝に通常の状態では大きく作用しない、ということを示すものかもしれない。シトリン欠損症で肝炎など何らかの症状がある場合に分析すれば、また違う結果が得られた可能性は残る。

一方、PHPLA は MELAS 患者のうち 1 名を除き、全員で強い排泄増加を認めた。この排泄増加はいずれも健常コントロールの 10SD を超えるものであった。継続的に検査できた症例では持続的な排泄増加を認めており、昨年解析でミトコンドリア枯渇症候群でも同様の所見が得られていることから、ミトコンドリア機能障害の鋭敏なマーカーとなりうる可能性がある。ただし、昨年の検討ではピルビン酸内服による排泄量の変化は認めていないことから、治療評価マーカーとしては現時点では適切とは言えなかった。

さらに G3P について今回も検討したが、排泄増加がみられた症例はなく、やはりヒトではシトリン欠損症における G3P 脱水素酵素の代償機能が低いため指標となりにくいのではないかと考えられた。

一方、家系内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す乳児症例では、今回検討した MELAS 患者とはやや異なり、2KG が著明に高値で、フマル酸、リンゴ酸の排泄増加を示す有機酸分析所見であった。これはビタミン B1 欠乏でみられる 3 種類の脱水素酵素複合体障害を示すものであったが、患者ではビタミン B1 投与後も異常なプロファイルが続いている。ビタミン B1 不足は脚気衝心や末梢神経障害、Wernicke 脳症など多彩な症状をもたらすが、本患者の発達は現時点では正常である。しかし著明な発育障害が認められており、ビタミン B1 が細胞内に本当に取り込まれ、機能しているのかどうかは不明で、今後代謝プロファイルの変化と症状に関連がみられていくかどうか

か、今後も継続して検討したい。

E. 結論

TCA 回路関連成分などの中間代謝産物は、MELAS 患者では上昇している一方、シトリン欠損症では健常コントロールと同程度であった。しかし両者ともに PHPLA の排泄増加がみられており、これをマーカーとして呼吸鎖障害を早期に発見できる可能性がある。しかし、治療評価についてはまだマーカーとして適切なものはなく、今後も解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the β -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric

acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFHDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)

- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, inpress
- 5) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*, inpress
- 6) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの社会的意義と課題. *公衆衛生情報* 44(3): 5-8, 2014 (6月)
- 7) Mine J, Taketani T, Yoshida K, Yokochi F, Kobayashi J, Maruyama K, Nanishi E, Ono M, Yokoyama A, Arai H, Tamaura S, Suzuki Y, Otsubo S, Hayashi T, Kimura M, Kishi K, Yamaguchi S: Clinical and genetic investigation of 17 Japanese patients with hyperekplexia. *Developmental Medicine & Child Neurology: Online*, 2014 (OCT)
- 8) Tomatsu S, Shimada T, Mason RW, Kelly J, LaMarr WA, Yasuda E, Shibata Y, Futatsumori H, Montano AM, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T: Assay for glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry and its applications. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques Special Issue 2: Online*, 2014 (February)
- 9) 坊岡美奈, 比嘉明日美, 津野嘉伸, 熊谷健, 奥谷貴弘, 吉川徳茂, 城道久, 太田菜美, 八木重孝, 南佐和子, 井篁一彦, 山田健治, 山口清次: 胎児心不全で発症したミトコンドリア三頭酵素欠損症の1例. *日本周産期・新生児医学学会雑誌* 50(3): 1015-1021, 2014 (9月)
- 10) 山本幹枝, 安井建一, 渡辺保裕, 古和久典, 山口清次, 中嶋健二: ホモシスチン尿症をともなったメチルマロン酸尿症の1例. *臨床神経学* 55(1): 23-28, 2015 (1月)
- 11) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸酸化異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p627-631, 2014 (6月, 883)
- 12) 山口清次: 有機酸代謝異常. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p622-626, 2014 (6月, 883)
- 13) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.31 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - てんかん症候群全般てんかんおよび症候群 症候性 特異症候群 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p205-211, 2014 (12月)

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
- 2) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014

- 3) Vatanavicharn N, Taketani T, Nabangchang C, Yamaguchi S: Isolated sulfite oxidase deficiency: A rare metabolic disorder with neuroimaging mimicking perinatal asphyxia. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 11 2014
- 4) 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 坊亮輔, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症の診断におけるろ紙血および血清アシルカルニチンプロファイルの差異に関する検討. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月
- 5) 深澤元晶, 白田信光, 厚沢季美江, 古居みどり, 橋本隆, 山口清次: ラット初代培養線維芽細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素の局在と酸化能の評価. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月
- 6) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭: HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月

G . 知的財産権の出願・登録状況
特になし。