


財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2007年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 小林圭子 

所属機関名： 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

所属部署： 分子病態生化学 職名： 助教授
〒 890-8544

所在地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1

電話： 099-275-5242 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国・揚子江南方地域におけるシトリン欠損症の患者発見とSLC25A13変異頻度検索

3. 成果の概要 (100字程度)

日本人症例で同定した15~16種のSLC25A13変異検索を行い、湖南省・黄疸症例77例中2例のヘテロ接合体、福建省・肝癌症例36例中1例のヘテロ接合体、広東省・代謝異常症例110例中11例のヘテロ接合体・17例の変異ホモ接合体(シトリン欠損症の患者)を見いだした。患者発見には、中国医療関係者の疾患周知・理解・認識が重要である。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 小林圭子 職名： 助教授

所属機関： 鹿児島大学 部署： 大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 魯耀邦 職名： 副教授

所属機関： 湖南中医薬大学 部署： 薬学院生物工程教研室

中国・揚子江南方地域におけるシトリン欠損症の患者発見と

SLC25A13 変異頻度検索

研究代表者	小林 圭子（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）
中国側共同研究代表者	魯 耀邦（湖南中医薬大学薬学院）
共同研究者	牛飼 美晴、盛 建勝、飯島 幹雄（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科） 佐伯 武頼（徳島文理大学健康科学研究所） 李 孟賢、祝 益民、高 喜容（湖南省児童医院） 宋 元宗（暨南大学第一医院） 劉 麗（広州市児童医院） 林 玲、高 宏志（福建医科大学第二医院）

要旨

シトリン欠損症は、常染色体劣性の遺伝性疾患であり、現在少なくとも2つの病態：肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD) と成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) が知られている。東アジアの保因者頻度は高く、特に中国・揚子江南方地域では43人に1人の割合で保因者が存在する。保因者頻度から計算すると東アジアに10万人以上の変異ホモ接合体の存在が推測されるが、これまでに発見された患者は日本以外では極めて少ない。本研究では、揚子江南方地域の湖南省、広東省、福建省の研究機関と共同研究を行い、シトリン欠損症の患者発見のために啓蒙活動、診断提供と技術指導を実施した。本研究結果と過去の診断例を合わせると、分子遺伝学的に診断した中国人症例は40例（中国、台湾、オーストラリア、マレーシア、米国在住）になる。これまで分子遺伝学的に診断した日本人症例は370例を超えるので、中国をはじめとする東アジアにおいて、シトリン欠損症の疾患概念の周知と診断システムの確立を図る必要がある。

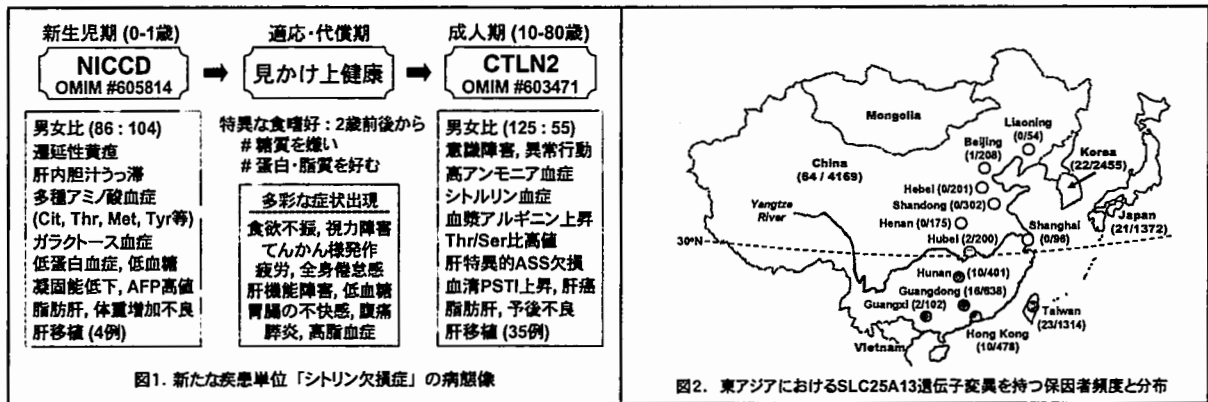
Key Words シトリン欠損症, SLC25A13, アスパラギン酸・グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体, 成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2), 肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD)

緒言

研究代表者の小林らは、長年原因不明で日本に多発する重篤な肝脳疾患、成人発症 II 型シトルリン血症 (adult-onset type II citrullinemia: CTLN2) の責任遺伝子 SLC25A13 を発見し、新規遺伝子産物をシトリン (citrin) と命名した¹⁾。さらに、CTLN2 の新生児期病態として、肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD) の発見・命名^{2,6)}により、「シトリン欠損症」という新規疾患概念を提唱した (図1)^{1,5-7)}。日本において、これまで CTLN2 症例 160 余例と NICCD 症例 200 余例を分子遺伝学的に確定診断すると同時に、SLC25A13 変異 13 種を一般集団で検索し、保因者が高頻度 (1/65) に存在することを明らかにした^{5,8)}。

一方、日本人と同じ変異を持つ中国人 CTLN2 症例を分子遺伝学的に診断したこと^{9,10)}により、東アジアの一般集団で 12 種の変異頻度検索を行い、中国・揚子江南方地域において、より高頻度 (1/43) に保因者が存在することを見いだした (図2)^{11,12)}。中国南部では、保因者頻度から計算される両 allele に SLC25A13

変異を持つホモ接合体頻度は 1/7,400 となり、80,000 人を超える患者の存在が予想される。しかし、シトリン欠損症は多彩な症状・複雑な病態 (NICCD > 見かけ上健康 > CTLN2 あるいは他疾患) を呈し、分子遺伝学的手法でしか確定診断できないためか、日本以外では、これまでに発見された患者数は極めて少ない⁹⁻¹⁵⁾。本研究の目的は、特に中国南部を中心に、疾患の啓蒙活動と診断技術の提供を行い、日中共同研究により、シトリン欠損症の患者を発見することである。



対象と方法

- # 対象：湖南省・長沙では黄疸を呈する症例 77 例、広東省・広州ではガラクトース血症あるいはチロシン血症などの代謝性疾患が疑われた症例 110 例、福建省・泉州では肝癌症例 36 例を、シトリン欠損症診断の対象者とした。
- # 方法：乾燥濾紙血あるいは末梢血から抽出した DNA を鋳型にして、日本人症例で同定した比較的頻度の高い SLC25A13 変異 15~16 種：[I]~[V]¹⁾、[VI]・[VII]⁷⁾、[VIII]・[IX]⁵⁾、[X]・[XI]・[XIV]¹²⁾、[XX]¹⁶⁾、[XVI]・[XIX]・[XXII] (Tabata et al. 論文作成中) を、PCR/RFLP 法や SNaPshot/GeneScan 法を用いて検索した。既知変異が検出されない症例について、RNA を用いた RT-PCR/sequencing および genomic DNA-PCR/sequencing 法により変異同定後、遺伝子診断法を確立した。
- # 啓蒙活動と診断技術提供：中国語の総説発表、学会発表と論文投稿を行うとともに、中国の共同研究者グループに対して診断技術指導を実施した。

結果

- ① 変異同定：既知変異 [I]:851del4 を 1 つの allele に見いだした米国在住の中国人 NICCD 症例において、変異解析を行い、SLC25A13 遺伝子の exon-12 内に新規変異 [XXIV]: C1189T (Q397X) を同定した^{a,d)}。変異診断系確立後、両親の遺伝子検索を行い、[I] は母親由来、[XXIV] は父親由来である結果を得た。さらに、国内外のシトリン欠損症症例において、数種の新規変異を見だし、遺伝子診断法の確立ならびに頻度検索を行っている (Song et al. 未発表)。
- ② 患者診断：SLC25A13 変異 15~16 種を検索し、湖南省サンプル・黄疸症例 77 例では 2 例のヘテロ接合体 (1/38.5)、福建省サンプル・肝癌症例 36 例では 1 例のヘテロ接合体 (1/36) を見いだした。また一方、広東省サンプル・ガラクトース血症やチロシン血症など 110 例では、11 例のヘテロ接合体 (1/10: 未知変異を持つ患者を含む可能性大) と 17 例の変異ホモ接合体 (患者発見率: 1/6.5) を検出した^{b,c,f)}。
- ③ 啓蒙活動：第 10 回国際先天代謝異常学会 (幕張) におけるシトリン欠損症に関する発表は^{a-d)}、世界から集まった 1,000 名を超える参加者の中で注目を集めた。また一方、中国各地の医療関係者に対して、シトリン欠損症の疾患概念を周知するために、中国語による総説掲載^{e)}と論文投稿^{f)}を行った。

考察

本研究：日中医学協会助成事業ならびに JSPS-アジア・アフリカ学術基盤形成事業（平成 18～20 年度、小林圭子）の遂行により、中国を中心とした東アジアにおいて、「シトリン欠損症」に対する関心が高まり、広東省・広州では数多くの患者を発見することができ、大きな成果が得られた。日本における NICCD 症例の 40%は新生児マス・スクリーニング陽性を示し^{8,16-22)}、今回の広東省の解析もそれを支持する結果が得られており、中国においてガラクトース、チロシン、メチオニン、シトルリンなどの検査の導入は不可欠である。一方、CTLN2 患者では各 10%が肺炎、高脂血症、肝癌を合併^{6-8,15,23-28)}しており、さらに中国南部は肝癌患者多発地域であることが知られている。シトリン欠損症の可能性のある疾患・患者を検索したにも関わらず、湖南省の黄疸患者および福建省の肝癌患者におけるヘテロ接合体の割合は、一般集団の頻度と同じ、あるいは若干高い程度であった。これらは検索した患者数が少ないことに起因する可能性もある。少なくともそれぞれの疾患の中で、シトリン欠損症が大きな割合を占めるものではないと考えられるが、それら疾患形成にどの程度関与するかを検討するには、より多くの症例を検索すると同時に、アルコールが飲めない、甘いものが嫌いなどの因子を加えて絞り込みを行い、詳細に解析する必要があると考える。シトリン欠損症は日本や中国に限らず、世界中に患者が存在することが明らかになってきている^{8,29,30)}ので、疾患の啓蒙活動、診断法の開発³¹⁾に加えて、治療法の開発が今後の重要な課題となる。

参考文献：

1. 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)
2. Tazawa Y, Kobayashi K, Ohura T, et al. Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia. *J Pediatr* 138: 735-740 (2001)
3. 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)
4. Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* 108: 87-90 (2001)
5. Yamaguchi N, Kobayashi K, Yasuda T, et al. Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations. *Hum Mutat* 19: 122-130 (2002)
6. 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)
7. Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K, et al. Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* 107: 537-545 (2000)
8. Kobayashi K, Saheki T. Citrin deficiency. *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource*, developed at the University of Washington, Seattle [<http://www.genetests.org>] (2005/2006)
9. Hwu W-L, Kobayashi K, Hu Y-H, et al. A Chinese adult onset type II citrullinaemia patient with 851del4/1638ins23 mutations in the *SLC25A13* gene. *J Med Genet* 38: E23 (2001)
10. Yang YL, Tagami Y, Saheki T, et al. Adult-onset type II citrullinemia: a family analysis. *Chin J Med Genet* 20: 380 (2003)
11. Kobayashi K, Lu YB, Li MX, et al. Screening of nine SLC25A13 mutations: their frequency in patients with citrin deficiency and high carrier rates in Asian populations. *Mol Genet Metab* 80: 356-359 (2003)
12. Lu YB, Kobayashi K, Ushikai M, et al. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the *SLC25A13* gene of Japanese patients with citrin deficiency. *J Hum Genet* 50: 338-346 (2005)
13. Song YZ, Hao H, Ushikai M, et al. A difficult and complicated case study: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Chin J Contemp Pediatr* 8: 125-128 (2006)
14. Lee N-C, Chien Y-H, Kobayashi K, et al. Time course of acylcarnitine elevation in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 29: 551-555 (2006)
15. Tsai CW, Yang CC, Chen HL, et al. Homozygous SLC25A13 mutation in a Taiwanese patient with adult-onset citrullinemia complicated with steatosis and hepatocellular carcinoma. *J Formos Med Assoc* 105: 852-856 (2006)
16. Takaya J, Kobayashi K, Ohashi A, et al. Variant clinical courses of 2 patients with neonatal intrahepatic cholestasis who have a novel mutation

- of *SLC25A13*. *Metabolism* 54: 1615-1619 (2005)
17. Naito E, Ito M, Matsuura S, et al. Type II citrullinaemia (citrin deficiency) in a neonate with hypergalactosaemia detected by mass screening. *J Inherit Metab Dis* 25: 71-76 (2002)
 18. Ohura T, Kobayashi K, Abukawa D, et al. A novel inborn error of metabolism detected by elevated methionine and/or galactose in newborn screening: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Eur J Pediatr* 162: 317-322 (2003)
 19. Nishimura Y, Tajima G, Dwi Bahagia A, et al. Differential diagnosis of neonatal mild hypergalactosaemia detected by mass screening: clinical significance of portal vein imaging. *J Inherit Metab Dis* 27: 11-18 (2004)
 20. Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, et al. Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res* 56: 608-614 (2004)
 21. Hachisu M, Oda Y, Goto M, et al. Citrin deficiency presenting with ketotic hypoglycaemia and hepatomegaly in childhood. *Eur J Pediatr* 164: 109-110 (2005)
 22. Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* in press (2007)
 23. Kobayashi K, Iijima M, Yasuda T, et al. Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (ed. Pochet R) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 565-587 (2000)
 24. Ikeda S, Kawa S, Takei Y, et al. Chronic pancreatitis associated with adult-onset type II citrullinemia: clinical and pathological findings. *Ann Intern Med* 141: W109-W110 (2004)
 25. Terada R, Yamamoto K, Kobayashi K, et al. Adult-onset type II citrullinemia associated with idiopathic hypertriglyceridemia as a preceding feature. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1634-1635 (2006)
 26. Takagi H, Hagiwara S, Hashizume H, et al. Adult onset type II citrullinemia as a cause of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 44: 236-239 (2006)
 27. Hagiwara N, Sekijima Y, Takei Y, et al. Hepatocellular carcinoma in a case of adult-onset type II citrullinemia. *Intern Med* 42: 978-982 (2003)
 28. Soeda J, Yazaki M, Nakata T, et al. Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial differentiations associated with citrin deficiency: a case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* in press (2007)
 29. Ben-Shalom E, Kobayashi K, Shaag A, et al. Infantile citrullinemia caused by citrin deficiency with increased dibasic amino acids. *Mol Genet Metab* 77: 202-208 (2002)
 30. Dimmock DP, Kobayashi K, Iijima M, et al. Citrin deficiency: a novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. *Pediatrics* 119: 773-777 (2007)
 31. Tokuhara D, Iijima M, Tamamori A, et al. Novel diagnostic approach to citrin deficiency: analysis of citrin protein in lymphocytes. *Mol Genet Metab* 90: 30-36 (2007)

注：本研究は、「第10回国際先天代謝異常学会」(2006年9月12-16日、幕張)にて口頭発表^{a,b)}ならびにポスター発表^{c,d)}、「中華医学遺伝学雑誌」(2006年12月)に総説掲載^{e)}、「中華児科雑誌」(2006年11月)に論文投稿^{f)}

- (a) Kobayashi K, Iijima M, Ushikai M, Lu YB, Tabata A, Sheng J-S, Saheki T, Okano Y, Yang Y, Hsiao K-J, Lau Y-L, Tsui L-C, Hwu W-L, Lee DH. *SLC25A13* mutations in citrin deficiency and the frequency. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 26 (2006)
- (b) Liu L, Kobayashi K, Ushikai M, Saheki T, Li XZ, Mei HF, Cheng J. *SLC25A13* mutation analysis in Chinese hepatitis syndrome. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 26 (2006)
- (c) Song YZ, Wang ZN, Ushikai M, Saheki T, Kobayashi K. Citrin deficiency (NICCD) in South China: A report of two cases. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 157 (2006)
- (d) Sheng J-S, Ushikai M, Iijima M, Packman S, Weisiger K, Martin M, McCracken M, Saheki T, Kobayashi K. Identification of a novel mutation in a Taiwanese patient with citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 163 (2006)
- (e) Yao-Bang Lu, Fei Peng, Meng-Xian Li, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki. Progresses and perspectives in the study on citrin deficiency. *Chin J Med Genet* 23: 655-658 (2006)
- (f) Yuan-Zong Song, Mihar Ushikai, Jian-Sheng Sheng, Mikio Iijima, Keiko Kobayashi. *SLC25A13* gene mutation analysis in a pedigree of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Chin J Pediatr* (submission)

作成日：2007年3月14日