

〈一般研究課題〉 先天性ケトン体代謝異常症における
モノカルボン酸トランスポーター1の機能解析
助成研究者 中部大学 青山 友佳



先天性ケトン体代謝異常症における モノカルボン酸トランスポーター1の機能解析

青山 友佳
(中部大学)

Functional analysis of monocarboxylate transporter 1 in ketone body metabolic disorders

Yuka Aoyama
(Chubu University)

Abstract :

Ketone bodies are important alternative energy sources for maintaining blood glucose level. Ketone body metabolism disorders involve disorders of the ketone production or ketone utilization. Disorders of ketone body production include 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) lyase deficiency and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase deficiency, while disorders of ketone body utilization include Mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency, succinyl CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency and monocarboxylate transporter 1 (MCT1) deficiency.

Monocarboxylate transporter 1 (MCT1, gene symbol: SLC16A1) deficiency, a defect on ketone body utilization, that has only recently been identified (N Engl J Med, 2014) as a cause for recurrent ketoacidosis. The disease is reportedly caused by mutations in the SLC16A1 gene, which encodes MCT1 on the plasma membrane. Approximately 15 cases of MCT1 deficiency worldwide, but there have been no reports of Japanese. The disease is characterized by ketoacidosis episodes, often triggered by infection. There are many unknowns regarding the involvement of MCT 1 in cellular transport of ketone bodies and energy metabolism, and the pathogenic mechanism is not clear. The purpose of this study is to elucidate the pathogenesis of MCT1 deficiency by analyzing the function of MCT1 deficient cells.

1. はじめに

ケトン体とは、アセトン、アセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸の総称である。代謝によりアセトンは呼吸へ揮発されるため、体内ではアセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸が代謝的に重要なケトン体となる。このケトン体は、グルコースが枯渇し飢餓状態になった際に、肝臓での β 酸化系を通して脂肪酸から産生される。そして、血中を介して速やかに脳や筋肉などに運ばれ、ミトコンドリアのマトリックスで、SCOT、T2の2つの酵素により活性化され、アセチルCoAとなりTCA回路に入りエネルギーとなる。つまり、ケトン体はグルコースの役割を代替するエネルギー源となる。

このように、ケトン体は脂肪酸 β 酸化の最終産物であるが、その産生や利用の障害が原因となる疾患群をケトン体代謝異常症という。ケトン体産生障害には、HMG-CoA リアーゼ欠損症、HMG-CoA合成酵素欠損症があり、ケトン体利用障害には、 β -ケトチオラーゼ(T2)欠損症、サクシニルCoA:3-ケト酸CoA 転移酵素(SCOT)欠損症、モノカルボン酸トランスポーター1(MCT1)欠損症が知られている¹⁻³⁾。

このなかでも、近年、新たに同定された疾患であるMCT1欠損症は、モノカルボン酸トランスポーター1(MCT1, gene symbol: SLC16A1)の欠損症(OMIM #245340, *600682)で、常染色体劣性遺伝形式をとる。本疾患は、ケトン体の代謝異常症を疑うもののT2欠損症、SCOT欠損症を確定診断できない症例のなかで、2014年に世界で初めて、細胞膜上のMCT1をコードするSLC16A1遺伝子の異常により生じることが示された⁴⁾。これまで世界で15症例ほどが認められているが、日本人での報告はされていない。本疾患の多くは乳幼児期に発症し、感染や長期の飢餓を契機に嘔吐、意識障害、けいれんなど、重篤なケトアシドーシス発作が引き起こされる⁴⁻⁶⁾。確定診断には遺伝学的検査が用いられるが、MCT1のケトン体細胞輸送やエネルギー代謝への関与は不明な点が多く、発症メカニズムは明らかでない。

本研究では、申請者が作製したMCT1欠損モデル細胞を用いて、先天性ケトン体代謝異常症における細胞膜ケトン体トランスポーターであるMCT1の機能解析を行ない、本症の発症メカニズムの解明を目的とし、診断や発作の予防につながるマーカーを明らかにする。

2. 試料および実験方法

2.1 MCT1欠損細胞

MCT1欠損細胞株は、これまでに当研究室にてCRISPR-Cas9システムを用いて樹立した。TrueGuide RNAにてSLC16A1遺伝子のエクソン3にオフターゲットの低いgRNAを設計し作成した。ヒト皮膚線維芽細胞にCRISPR-Cas9 proteinと共にこのgRNAを導入し、培養にて単一細胞ごとのクローンを樹立した。得られた細胞をシーケンスし、321dupAを片アレルに変異を持つMCT1(-/+)細胞、両アレルに変異を持つMCT1(-/-)細胞を同定した。また、ウエスタンブロットにて、MCT1の発現がないことを認めている。

2.2 細胞培養

コントロールとしてヒト皮膚線維芽細胞(WT細胞)、MCT1(-/+)細胞、MCT1(-/-)細胞をそれぞれ10cmシャーレで培養を行った。代謝解析では、それぞれのアッセイに必要な細胞数に調節し、96ウェルプレートに播種した。通常培養にはD-MEM(高グルコース)に15%FBSおよび1%抗生剤

を調整し、使用した。また、低グルコース負荷のための培地にはD-MEM(低グルコース)に透析済みの15%FBSおよび1%抗生物質として調整した培地を用いた。

2.3 代謝解析

代謝解析の測定として、ケトン体、乳酸、グルコース濃度、ATP活性を測定した。上記に示した細胞で目的とする培養条件にて6時間、24時間後の培養上清、細胞を回収しサンプルとした。測定サンプル調整は各試薬のプロトコールに従った。発光を測定する装置は、GloMax Discover (Version 4.0.0)を使用した。各測定におけるアッセイ試薬と負荷条件、サンプルについて下記に示す。

1)ケトン体アッセイ: BHB-Glo Assay (promega) 試薬を用いて、通常の培養における細胞外(培養上清)の3-ヒドロキシ酪酸(3HB)を測定した。

2)乳酸アッセイ: Lactate-Glo Assay (promega) 試薬を用い、低グルコース負荷環境下で細胞外の乳酸と各細胞内の乳酸を測定した。

3)グルコースアッセイ: Glucose-Glo Assay (promega) 試薬を用い、低グルコース負荷環境下で細胞外の乳酸を測定した。

4) ATPアッセイ: CellTiter-Glo 2.0 Assay (promega) 試薬を用い、低グルコース負荷環境下での生存細胞のATP活性を測定した。

3. 実験結果

ケトン体アッセイでは通常の高グルコース培地を用いた培養にて、細胞から培養液に代謝される3HBを6時間、24時間後で測定した(図1)。

WT細胞、MCT1(-/+)細胞、MCT1(-/-)細胞に時間経過での差はなかった。また、この測定では、3HB濃度を検出するための必要細胞数が他のアッセイ試薬よりも多いことから、必要な細胞数をより得るための培養系の検討が今後の課題となった。

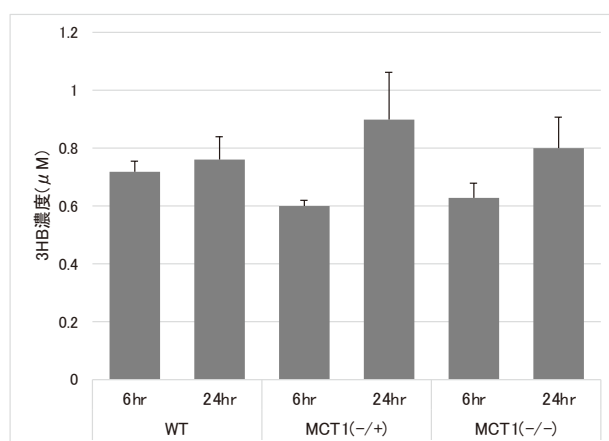


図1. ケトン体アッセイ

乳酸アッセイでは、低グルコース培地を用いた培養環境にて、6時間、24時間後の細胞と細胞外(培養上清)での乳酸の値を測定した。

細胞外(図2a)と細胞内(図2b)の乳酸値は、時間経過とともに増える傾向にあった。また、WT細胞と比較してMCT1(-/+), MCT1(-/-)細胞ともに、細胞内の乳酸が高値であることが明らかとなった。

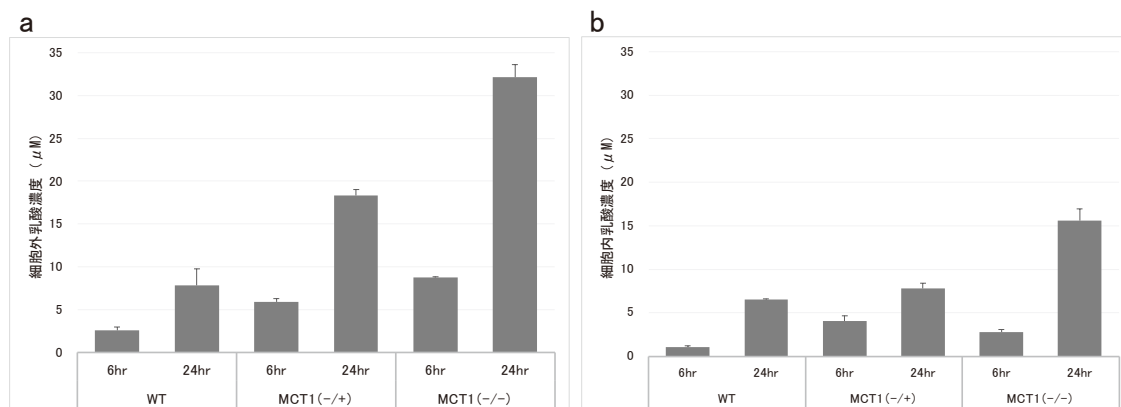


図2. 乳酸アッセイ
a.細胞外の乳酸濃度の比較、b.細胞内の乳酸濃度の比較

グルコースアッセイでは、低グルコース培地を用いた培養環境にて、6時間、24時間後の細胞外のグルコースの値を測定した(図3)

WTとMCT1(-/+)では時間とともに高くなる傾向にあったが、MCT1(-/-)細胞では24時間後のグルコース濃度は低下した。MCT1(-/-)細胞ではより多くのグルコースが必要であると考えられた。

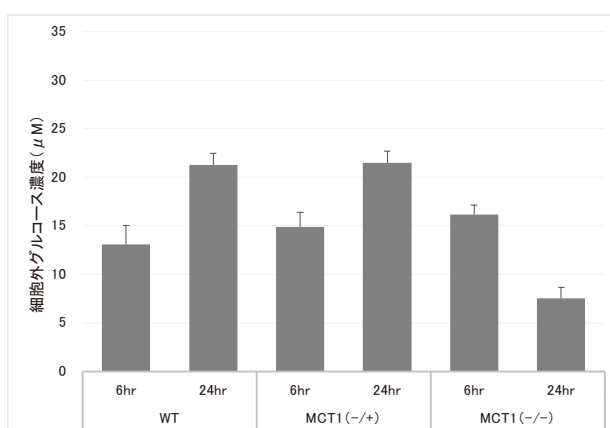


図3. グルコースアッセイ

また、ATPアッセイでは、低グルコース培地を用いた培養環境にて、6時間、24時間後のATP濃度を測定した(図4)。

特に、MCT1(-/+)細胞では24時間後のATP濃度が高く、MCT1(-/-)細胞では変動は認められなかった。MCT1(-/+)細胞とMCT1(-/-)細胞におけるATP活性の違いは、細胞発育の栄養環境を低グルコースにして飢餓状態近くなることで、その異なりが明らかになった。

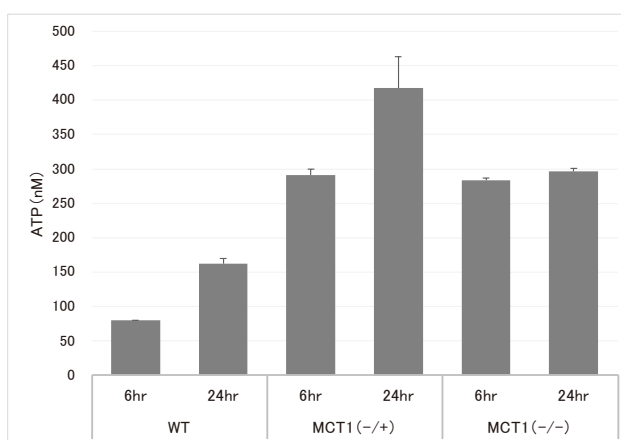


図4. ATPアッセイ

4. まとめ

MCT1欠損細胞を低グルコース培養条件下においた場合、6時間と24時間での細胞内および細胞外の乳酸濃度は高くなる傾向にあった。SLC16A1 にホモ接合変異を有する患者解析では、基礎状態での乳酸値が基準値よりも高値で維持されていること、低血糖によるアシドーシス発作を起こした際には乳酸値が上昇することが示されている⁷⁾。また、ヘテロ接合性変異では、繰り返すアシドーシス発作を経験する患者が多く存在することが報告されている^{4,8,9)}。

本研究では、低グルコース負荷によって細胞内と細胞外の乳酸値の上昇が認められた。これは、実際の患者における乳酸値の状態を模擬することが示唆され、ケトン体の変動だけではなく患者における乳酸の値に着目することも必要であると考えた。つまり、MCT1欠損症において乳酸の値は、疾患を評価するためのひとつのマーカーになりうると考えられる。また、本研究の課題として、樹立した細胞の発育が弱くなり必要な細胞数を調整できず、3-ヒドロキシ酪酸を十分に評価することができなかったこと、ATP活性では時間を追って評価が必要と考えられた。そのため、現在、MCT1欠損症における代謝解析の実験系をより確実にするために、SV40-transformed fibroblastsやHEK293細胞でのMCT1欠損細胞株の樹立を進めている。まだ日本で同定されていないMCT1欠損症を疑う症例が出てきた場合に、その評価をできるようにしておくことは今後の迅速な確定診断において重要であると考えられる。今後も研究を継続し、さらにMCT1欠損症に特異的なマーカーの同定につなげたいと考える。

参考文献

- 1) Hori T, Yamaguchi S, Shinkaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Takayanagi M, Fukao T: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57: 41-48, 2015.
- 2) Fukao T, Mitchell G, Sass JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. *J Inher Metab Dis* 37: 541-551, 2014.
- 3) Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Ago Y, Matsumoto H, Abdelkreem E: Recent advances in understanding beta-ketothiolase (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase, T2) deficiency. *J Hum Genet* 64:99-111, 2019.
- 4) van Hasselt PM, Ferdinandusse S, Monroe GR, Ruiten JP, Turkenburg M, Geerlings MJ, Duran K, Harakalova M, van der Zwaag B, Monavari AA, Okur I, Sharrard MJ, Cleary M, O'Connell N, Walker V, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Visser G, Houwen RH, van der Smagt JJ, Verhoeven-Duif NM, Wanders RJ, van Haften G: Monocarboxylate transporter 1 deficiency and ketone utilization. *N Engl J Med* 371:1900-7, 2014.
- 5) Balasubramaniam S, Lewis B, Greed L, Meili D, Flier A, Yamamoto R, Bilić K, Till C, Sass JO: Heterozygous monocarboxylate transporter 1 (MCT1, SLC16A1) deficiency as a cause of recurrent ketoacidosis. *JIMD Rep* 29:33-38, 2016
- 6) Le A, Yeganeh M, Buhas D, Trempe MJ, Myers KA: Monocarboxylate transporter-1 deficiency results in severe metabolic acidosis with ketogenic diet in early onset absence epilepsy: case report. *Seizure* 74:31-32, 2020
- 7) Stanescu S, Bravo-Alonso I, Belanger-Quintana A, Pérez B, Medina-Diaz M, Ruiz-Sala P,

Flores NP, Buenache R, Arrieta F, Rodríguez-Pombo P: Mitochondrial bioenergetic is impaired in monocarboxylate transporter 1 deficiency: a new clinical case and review of the literature. *Orphanet J Rare Dis* 17:243, 2022

- 8) Balasubramaniam S, Lewis B, Greed L, Meili D, Flier A, Yamamoto R, Bilić K, Till C, Sass JO: Heterozygous monocarboxylate transporter 1 (MCT1, SLC16A1) deficiency as a cause of recurrent ketoacidosis. *JIMD Rep* 29:33-38, 2016
- 9) Le A, Yeganeh M, Buhas D, Trempe MJ, Myers KA: Monocarboxylate transporter-1 deficiency results in severe metabolic acidosis with ketogenic diet in early onset absence epilepsy: case report. *Seizure* 74:31-32, 2020