

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 9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： 岡野 善行 

所属機関名： 大阪市立大学大学院医学研究科

所属部署： 発達小児医学 職名： 講師
〒 545-8585

所在地： 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

電話： 06-6645-3816 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

東アジアでのフェニルケトン尿症の分子遺伝学的解析

3. 成果の概要 (100字程度)

我々の開発したフェニルケトン尿症(PKU)の遺伝子診断システムは61種類の遺伝子変異で345/358の遺伝子診断を可能とする優れた方法であった。フェニルアラニン呼気テストはPKUの各病型を明確に区別でき、テトラヒドロビオプテリンの反応性の診断に有効であった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 岡野 善行 職名： 講師

所属機関： 大阪市立大学大学院医学研究科 部署： 発達小児医学

中国側研究者氏名： 宋 昉 職名： 助教授

所属機関： 首都児科研究所 部署： 医学遺伝学教室

東アジアでのフェニルケトン尿症の分子遺伝学的解析

研究者氏名 岡野 善行

日本研究機関 大阪市立大学大学院医学研究科

研究者氏名 宋 昉

中国所属機関 首都児科研究所

要 旨

フェニルケトン尿症(PKU)は新生児マススクリーニングにより世界的な規模で化学診断、遺伝子診断、治療がなされている。我々の PKU 遺伝子診断システムは 1) GC clamp プライマーを用いた WAVE 核酸フラグメント解析法による異常エクソンの検出。2) 当該エクソンのダイレクトシーケンスによる遺伝子変異の同定。3) multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法による欠失変異の同定を行っている。今回、日本在住フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)欠損症患者 179 名の分析結果では、シーケンスにて遺伝子変異を 343/358 対立遺伝子に、MLPA 法にてエクソン 5&6 の欠失変異を 2/15 対立遺伝子に同定した。61 種類の遺伝子変異(15 種の新規変異)で遺伝子診断率は 96%であった。中国在住患者では 349/370 対立遺伝子(94.3%)で遺伝子変異を同定した。日中間で主要な遺伝子変異は共通しているがその頻度は異なっていた。また、少数個別的な遺伝子変異は異なっていた。¹³C-Phe 経口投与によるフェニルアラニン呼気テストでは *in vivo* PAH 活性 (¹³CO₂ の累積回収率、CRR%) は古典型と軽症型 PKU 患者、ヘテロ保因者、そして正常コントロールの各群で有意に異なっていた。軽症型 PKU ではテトラヒドロビオプテリン(BH₄)は残存 *in vivo* PAH 活性に比例して PAH を活性化した。

Key Words フェニルケトン尿症、フェニルアラニン水酸化酵素、ビオプテリン、遺伝子解析、呼気テスト

緒 言：

フェニルケトン尿症(PKU)は肝臓のフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の欠損によって発症する常染色体劣性遺伝疾患である。新生児マススクリーニングによる早期発見と早期治療の結果、PKU での精神運動発達遅滞等の症状は予防され、良好な経過をとっている。PAH 活性は主に肝臓で発現し、末梢血や繊維芽細胞では認められないことから、PKU の診断は PAH の測定ではなく、食事などの環境的要素の影響を受ける血中フェニルアラニン値でなされている。PKU は無治療時の血中フェニルアラニン値とフェニルアラニン摂取許容量から軽症高フェニルアラニン血症(HPA)から軽症型 PKU、古典型 PKU と種々の重症度が知られており、遺伝的な多様性が明らかにされている。酵素診断が通常行われていない PKU では患者の重症度を推定することは非常に重要である。遺伝子診断の目的の一つは臨床重症度の推定である。今回、我々は新しい PKU 遺伝子診断システムを開発し、日本在住患者 179 名について分析した。すなわち、1) GC clamp プライマーを用いた WAVE 核酸フラグメント解析法(DHPLC)による異常エクソンの検出。2) 当該エクソンのダイレクトシーケンス(DS)による遺伝子変異の同定。3) multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法による欠失変異の同定を行っている。フェニルアラニン呼気テストで *in vivo* PAH 活性を測定し、PKU の臨床表現型と遺伝子型の関係、テトラヒドロビオプテリン (BH₄) の反応性について検討した。中国在住患者 185 名について宋昉準教授が分析した結果もあわせて報告する。

対象と方法：

1) PKU の遺伝子解析

血中フェニルアラニン値(治療前)が5mg/dl以上の日本在住 PAH 欠損症患者 179 名/358 対立遺伝子について分析した。DHPLC 法では 40bp の GC-clamp プライマーを片側に用いて、13 エクソンを PTC-200 Thermal-cycler で PCR 増幅合成した。95°C 5 分で denature した後、45 分間で 25°C へクーリングした。DHPLC 分析には WAVE system (Transgenomics, UK)で行った。ヘテロデュプレックスを示したエクソンを PCR 増幅合成した後、GFX purification kit (Amersham)で抽出し、dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて ABI PRISM 310 genetic analyzer で分析した。遺伝子変異を同定できなかったサンプルは multiplex ligation- dependent probe amplification (MLPA, MRC Holland)法にて分析した。DNA 100ng を 98°C で 5 分間 denature した後、SALSA probe mix と MLPA buffer を加え 60°C 16 時間でハイブリダイゼーションした。54°C 15 分で ligation した後、6-FAM で標識されたプライマーを片側に用いて PCR 増幅合成した。TAMRA でラベルした内部サイズ標準(TAMRA-500, ABI)を使用して ABI-377 gel sequencer で分析した。中国在住 PAH 欠損症患者 185 名/370 対立遺伝子について single-strand conformation polymorphism で遺伝子変異のあるエクソンをスクリーニングした後、シーケンス解析した。

で遺伝子変異スクリーニングと

2) フェニルアラニン呼気テスト

PAH 欠損症 20 例 (男 11 人、1-23 歳)、6-ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTPS) 欠損症 2 例、ヘテロ保因者 4 例、正常コントロール 4 例について分析した。PKU 患者の内訳は、古典型 PKU (無治療時の血中フェニルアラニン値 >1.2mM) が 13 例、軽症型 PKU (0.6-1.2mM) が 6 例、軽症型 HPA (<0.6mM) が 1 例であった。¹³C-フェニルアラニン (¹³C-Phe、10mg/kg、最大量 200mg) を内服後、0、10、20、30、45、60、90、120 分に呼気を採取し、質量分析計 (Breath MAT Plus; Finnigan MAT, Germany)にて ¹³CO₂、¹²CO₂ を測定した。BH₄ (10mg/kg/日、最大量 200mg/日) を呼気テスト前 3 日間連日服用し BH₄ 反応性をチェックした。呼気テストでは、1) 呼気中の ¹²CO₂ に対する ¹³CO₂ の割合を Δ¹³C (‰) として、2) 投与された ¹³C-Phe のうち 120 分間の呼気中に ¹²CO₂ として排出された量を累積回収率 (CRR, %) を in vivo PAH 活性の指標とした。

結果:

1) PKU の遺伝子解析

PCR プライマーに GC-clamp プライマーを使用した DHPLC の結果の例を図 1 に示した。エクソン 12 の R413P 変異では、通常プライマーを使用した場合メインピークの左に 1 本の peak が確認できるだけであったが、GC-clamp プライマーではヘテロデュプレックス由来とホモデュプレックス由来の各 2 本のピークが確認でき、ピーク判定が明確になった。他のエクソンにおいても GC-clamp プライマーを使用することで遺伝子変異の存在を容易に検出できるようになった。次に MLPA 法でエクソン 5&6 欠失変異を検出した結果を図 2 に示した。コントロールサンプルと比較して欠失変異ではエクソン 5 と 6 に対応するピークが明らかに低下していた。そして、その面積比を比較するとコントロールの 0.4~0.6 であった。

日本在住 PAH 欠損症患者 179 名の分析結果では、改良 DHPLC 法とシーケンスにて遺伝子変異を 343/358 対立遺伝子に、MLPA 法にてエクソン 5&6 の欠失変異を 2/15 対立遺伝子に同定した。61 種類の遺伝子変異(15 種の新規変異)で遺伝子診断率は 96%であった。中国在住患者の 185 名の分析では 70 種類の遺伝子変異(15 種の

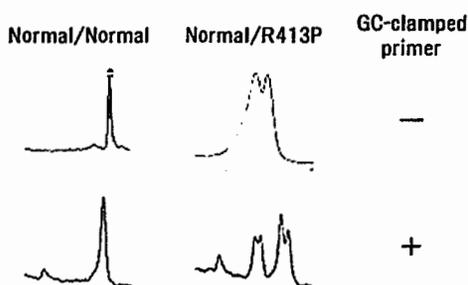


図1 DHPLCにおけるGC-clamped primerの影響

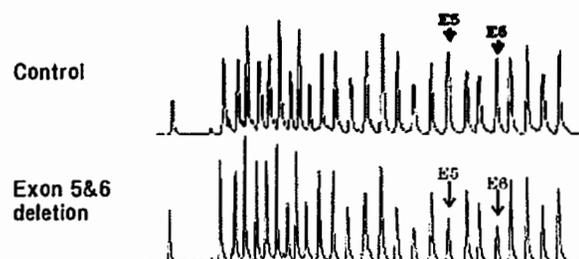


図2 MLPA法におけるエクソン5&6欠失変異の検出

新規変異)で遺伝子診断率は 349/370 対立遺伝子 (94.3%) であった。主要な遺伝子変異は R243Q、EX6-96A>G、R111X、Y356X、R413P でそれぞれの頻度は 22.2、11.1、8.7、6.5、6.5% であった。

2) フェニルアラニン呼気テスト

経口投与された ^{13}C -Phe が生体肝で代謝され呼気中に $^{13}\text{CO}_2$ として排出される。正常コントロールとヘテロ保因者では ^{13}C -Phe 投与後 20-30 分に $\Delta^{13}\text{C}$ のピーク値を示し、42.3% (28.7- 53.4%) と 27.2% (21.1-32.5%) であった。一方、古典型および軽症型 PKU では $\Delta^{13}\text{C}$ 値は低く、ピークも示さなかった。BH₄ 負荷後、軽症型 HPA の呼気中 $\Delta^{13}\text{C}$ 値は著明に増加し、20-30 分にピーク値 24.5% を示した。軽症型 PKU も同様に $\Delta^{13}\text{C}$ 値は増加しピーク値 8.87% (3.8-21.6%) を示した (図 3)

古典型 PKU、軽症型 PKU、軽症型 HPA、ヘテロ保因者、正常コントロールの各群で CRR は有意に異なっていた (図 4)。BH₄ 負荷により軽症型 PKU (4 例) と HPA (1 例) で CRR は 2.6 倍上昇したが、古典的 PKU 2 例ではその上昇を認めなかった。BH₄ 投与で血中フェニルアラニン値が 2mg/dl 以下にコントロールされている PTPS 欠損症患者 2 例の CRR は 5.88% と 19.0% であった。

軽症型 PKU 患者の遺伝子型は、軽症型変異 (L52S、R241C、R408Q) と重症型変異の複合ヘテロ接合体で、軽症型 HPA は R241C のホモ接合体であった。

考 察:

これまで PKU では世界中で 450 種類以上の遺伝子変異が同定されている (<http://www.pahdb.mcgill.ca>)。日本と中国での遺伝子解析では、それぞれ 61 種類と 70 種類の遺伝子変異が同定されている。頻度の多い主要遺伝子変異 (R111X、IVS4nt-1、EX6-96A>G、R241C、R243Q、Y356X、R413P) は両国に共通して認められることが多く、日本と中国の PKU 遺伝子のそれぞれ 67% と 63% を占めている。日本人と中国人では PKU 遺伝子種類と頻度は近似しているが、欧米白人のものとは異なっている。これらのことから PKU 遺伝子変異の大部分の発生起源は古く、白人種と別れて以降、両人種に分離する前であると推測される。今回同定された遺伝子変異では R241C、P407S、A373T、A132V、L52S、R408Q の各変異は PAH 活性が残存していると推測され、その遺伝子変異を有する患者は mild PKU もしくは mild HPA 患者であった。

フェニルアラニン呼吸テストでは経口投与された ^{13}C -Phe は小腸から吸収され、門脈を経過して肝細胞に輸送される。肝細胞内の ^{13}C -Phe は PAH により代謝され、チロシン、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を経て、

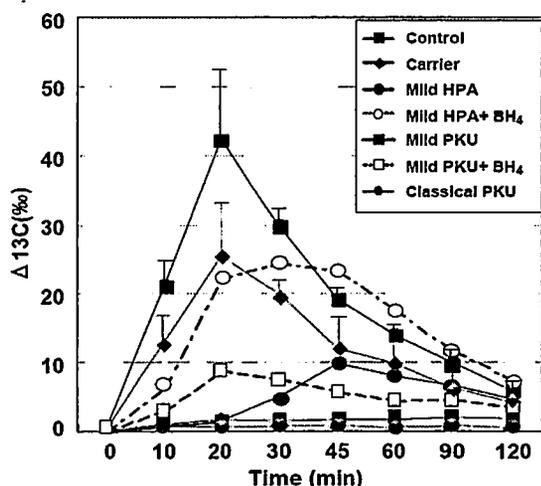


図 3 フェニルアラニン呼気テストにおける $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ の経時的変化

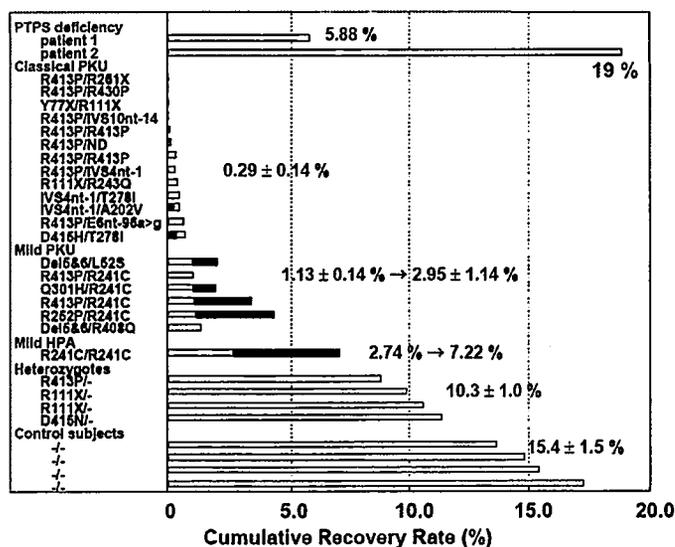


図 4 フェニルアラニン呼気テストにおける累積回収率

最終的に $^{13}\text{CO}_2$ として呼気中に排泄される。呼気テストでは、特別な前提条件や血液サンプリングのような痛みを伴う操作を必要とせず、約2時間の呼気のサンプリングで終了するために、容易にしかも繰り返し行うことができる。フェニルアラニン呼気テストでの CRR 値は、図4に示したように古典型 PKU から軽症型 HPA まで連続している。このことは PKU の臨床表現型が非常に多様であることと一致し、PKU 遺伝子変異の多様性と一致している。事実、本研究においても20人の患者で18の異なる遺伝子変異が認められている。

呼気テストの結果では、それぞれ、古典型 PKU、軽症型 PKU と軽症型 HPA 患者は、1%、1-1.4%、2.4%の有意に異なる CRR 値を示しており、逆に CRR から臨床表現型を決定できると考えられた。Kure らにより軽症型 PKU では BH_4 投与により、血中フェニルアラニン値は低下することが報告されている¹⁾。我々の呼気テストでは CRR1%以上の症例、すなわち、軽症型 PKU、軽症型 HPA 症例に BH_4 反応性が認められた。PTPS 欠損症患者と軽症型 HPA の呼気テストの結果から血中フェニルアラニン値を良好にコントロールするための CRR の目安は5-6%と考えられた。

今回の研究では、臨床表現型、呼気テスト、遺伝子型の3者は各患者で一致しており、不一致例はなかった。PKU の臨床表現型と遺伝子型の関連性が報告²⁾されるとともに、その後その不一致例が多数報告されている。呼気テストは臨床表現型に影響を与える環境因子のうち食事量などの不確定要素を除外することができ、臨床表現型と遺伝子型の不一致例のより詳細な検討に有効である。欧米でのこの呼気テストを利用した臨床表現型と遺伝子型の関連性では Treacy ら³⁾は呼気テストによる臨床表現型と遺伝子型の不一致、特にヘテロ保因者での不一致例を報告し、Muntau ら⁴⁾の呼気テストを用いた検討では、軽症型 PKU であっても、また、同じ遺伝子変異であっても BH_4 に反応する場合としない場合があると報告している。その原因として、PAH 側の要因とともに BH_4 側の要因としての BH_4 の生体内への吸収能の個体差、などを含めて今後、検討する必要がある。フェニルアラニン呼気テストは、PKU の臨床型、 BH_4 反応性 PAH 欠損症の診断、および BH_4 投与量の決定に有効であると考えられた。PKU では原則的に臨床表現型と遺伝子型の関連性が認められ、PKU の臨床症状を規定しているのは遺伝子型であるということが明らかである。しかしながら、その不一致例も存在し、何らかの要因が関与しているが、その因子についてはいまだ十分に明らかではなく、その解明は新しい治療法への糸口になる可能性がある。

参考文献：

- 1) Kure S et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-378
- 2) Okano Y et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *New Eng J Med* 1991; 324: 1232-1238,
- 3) Treacy EP et al. Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1- ^{13}C] phenylalanine oxidation rates in vivo: a pilot study. *Pediatr Res* 1997; 42: 430-435
- 4) Muntau AC et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild Phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002;347: 2122-2132

作成日：2007年3月9日