

マス・スクリーニングで見出された高フェニルアラニン血症患者の遺伝子解析

(分担研究：マススクリーニング対象疾患一次スクリーニングから二次スクリーニング法のあり方に関する研究)

分担研究報告書

呉 繁夫¹⁾、侯 殿昌¹⁾、大浦敏博²⁾、松原洋一¹⁾、成澤邦明¹⁾

<要約>

ろ紙血を用いたフェニルアラニン(Phe)血中濃度の一次スクリーニングで異常を示す新生児の中にはフェニルケトン尿症(PKU)、高フェニルアラニン血症(HPA)、テトラヒドロピオプテリン(BH4)代謝異常症など、治療法や予後の異なる疾患が含まれている。これらに対する二次スクリーニング法の一つとしてPhe水酸化酵素遺伝子の異常を検出する方法を検討した。1) PKUに関しては、本邦では約60%の変異アレルが10種類の変異により説明される事から、この変異を迅速に検索できるアレル特異的PCR増幅法を確立した。2) HPAに関しては変異検索が未だ充分でないため変異検索を行い、新しいミスセンス変異を同定した。この変異とPKU変異(R252W)を合わせ持つ患児はBH4の大量投与に反応し血中Phe濃度が低下する症例であり、BH4代謝異常症と鑑別を考える上で興味深い。この変異は他の家系にも見出され、その頻度とBH4反応性を現在検索している。

<見出し語>

高フェニルアラニン血症、テトラヒドロピオプテリン反応性、フェニルアラニン水酸化酵素遺伝子変異、アレル特異的PCR増幅

東北大学医学部病態代謝¹⁾ (Department of Bichemical Genetics, Tohoku University School of Medicine), 同小児科²⁾(Department of Pediatrics)

図1

一次スクリーニング



血中フェニルアラニン高値

二次スクリーニング

<鑑別疾患>

- | | |
|----------------------|----------|
| 1) フェニルケトン尿症 (PKU) | PAH遺伝子 |
| 2) 高フェニルアラニン血症 (HPA) | PAH遺伝子 |
| 3) BH4欠乏症 | GPTCH遺伝子 |
| | PTPS遺伝子 |
| | DHPR遺伝子 |

図2

フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)遺伝子の変異解析

既知のPKU遺伝子変異の有無をアレル特異的増幅法にて検索



異所性PAHmRNAをnested PCR法にて増幅



直接シーケンス



変異の同定

表 PKU遺伝子変異(98 アレル)

1. R413P	13.3%	6. T278I	6.1%
2. R111X	10.2%	7. R241C	5.1%
3. R243Q	7.1%	8. Y204C	4.1%
4. R252W	6.1%	9. IVS-9	2.0%
5. IVS-4	6.1%	10. V388M	1.0%

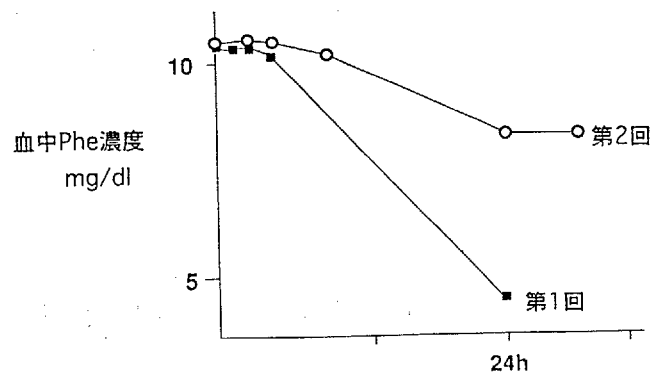
図3

高フェニルアラニン血症患者

1. R242W / ?
2. R413P / ?
3. IVS-4 / ?
4. R111X / ?
5. T278I / ?
6. R241C / T278I

図4

BH4負荷試験



<研究方法>

本研究は図1に示すように二次スクリーニングの効率的な運用のためにPAH遺伝子解析を取り入れる目的で行った。遺伝子変異解析は図2に示す戦略で行った。リンパ芽球細胞株が得られない場合には各エクソンの両側に準備したPCRプライマーにて13個のエクソンを増幅して解析した。

1) アレル特異的PCR増幅による既知変異の有無の検索：R413P, R111X, R243Q, R252W, IVS-4, T278I, R241C, Y204C, IVS-9, V388Mの10種類の変異の同定するシステムを確立した。この方法はPCRプライマーを正常型と変異型との2種類用意しPCRを行い、変異の有無によりPCR産物の出来方に差が出来ることを利用している。DNAの抽出は血液ろ紙を3mm径のパンチ片3個を0.1mlの100ug/mlのProteinaseKを含む溶液により消化し、この酵素を熱変性させたものを使用した。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動により確認した。

2) PKU及びHPA患者：両親のインフォームド・コンセントの得られた患児の血液ろ紙よりDNAを抽出し、1)のアレル特異的PCRにより解析を行った。

3) PAHcDNA変異検索：変異遺伝子検索はリンパ芽球中に微量に存在する異所性PAHmRNAを利用した。即ち、患者由来のリンパ芽球細胞からpolyA+RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを調製した。これを鋳型にnested PCR法にてPAHcDNAの蛋白翻訳領域を増幅後、直接シークエンス法にて変異部位を同定した。

4) BH4負荷試験：体重当たり10mgのテロラハイドロピオプテリン（サントリー株式会社より供与）を経口投与し図4にある各時間で採血し、血中Phe濃度を測定した。測定は10日間おいて2回行った。

<結果>

1) PKU変異の頻度

アレル特異的PCR増幅法を用いて日本人PKU患者に比較的多く見られる10種類のPAH遺伝子変異を簡便に同定するシステムを確立した。これを用いて日本人PKU患者49人の変異検索を行なうと表に示すように全体で約60%の変異アレルの同定が可能で合った。表の様に10種類の

遺伝子変異で61%の変異アレルが同定可能であった。

2) HPA遺伝子変異

6名のHPA患者が上述の10種類の変異を有するかどうかを検索した（図3）。5名の患者はいずれかの変異を一方のアレルに有していたがもう一方のアレルは不明であった。また、残りの1名の患者は両方のアレルに既知変異を持っていた。図3の患者1のリンパ芽球細胞株を樹立し、異所性PAHcDNAを増幅し、塩基配列を決定したところ、新しいミスセンス変異を同定した。この変異は患者4にも認められた。この患者はBH4にたいして反応性と考えられ、そのBH4の負荷試験の結果を図4に示した。24時間後にBH4投与前に比べての約25-40%の血中Phe濃度の低下を認めた（投与前値11mg/dl）。

<考察>

今回検索した10種類の遺伝子変異はPKU患者のみならず、HPA患者にも広く分布していることが明らかとなった。私共の確立した方法は実施が容易で特別な施設を必要としないことから、2次スクリーニングには好適なシステムであると考えられた。このほかにもいくつかの変異を検索してみたが大きく同定率を改善する事は出来なかった。従って、今回同定されなかった約40%の変異アレルは多種類の変異により構成されているものと考えられた。

BH4反応性のHPA患者に認められたミスセンス変異に関しては現在、発現実験や日本人患者における頻度などについて検索を行っている。これらの症例の分子レベルでの検索はBH4欠乏症との鑑別の点から重要であると考えられた。

<文献>

Takahashi, K, Kure, S, Mastubara, Y, and Narisawa, K. Novek phenylketonuria mutation detected by analysis of ectopically transcribed phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblasts. *Lancet*, 340:1473, 1992.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



<要約>

ろ紙血を用いたフェニルアラニン(Phe)血中濃度の一次スクリーニングで異常を示す新生児の中にはフェニルケトン尿症(PKU)、高フェニルアラニン血症(HPA)、テトラヒドロピオプテリン(BH4)代謝異常症など、治療法や予後の異なる疾患が含まれている。これらに対する二次スクリーニング法の一つとしてPhe水酸化酵素遺伝子の異常を検出する方法を検討した。1) PKU に関しては、本邦では約60%の変異アレルが10種類の変異により説明されることから、この変異を迅速に検索できるアレル特異的PCR増幅法を確立した。2) HPA に関しては変異検索が未だ不十分のため変異検索を行い、新しいミスセンス変異を同定した。この変異とPKU変異(R252W)を合わせ持つ患児はBH4の大量投与に反応し血中Phe濃度が低下する症例であり、BH4代謝異常症と鑑別を考える上で興味深い。この変異は他の家系にも見出され、その頻度とBH4反応性を現在検索している。