

分担研究：マススクリーニングの精度保証システムの確立に関する研究

マススクリーニングで発見された兄と見逃された妹のホモシスチニン尿症同胞例における  
分子遺伝学的検討

研究要旨

マススクリーニングで発見された兄とマススクリーニングで見逃された妹のホモシスチニン尿症同胞例においてその原因を明らかにするためにシスタチオニン合成酵素の分子遺伝学的検討を行った。兄妹共に母親由来のH65Rと父親由来のG116Rの複合ヘテロ接合体であり、CBS遺伝子の遺伝子型は全く同一であった。この結果から、この兄妹例における新生児期の血中メチオニン値の違いは、シスタチオニン合成酵素以外のメチオニン代謝関連酵素の新生児期における発達速度の差によるものであることが推測された。したがって、ホモシスチニン尿症の同胞をもつハイリスク新生児においては、現行新生児マススクリーニング検査が正常であっても、注意深い経過観察を行い、できるだけ早期に酵素診断や遺伝子診断を行うことが必要である。また、マススクリーニング検査でホモシスチニン尿症患児の見逃しを予防するためには、血中ホモシスチニン値などを指標にした新しいスクリーニング法の確立が重要であると考えられた。

研究協力者

黒田泰弘、陳淑麗、伊藤道徳  
(徳島大学医学部小児科)

研究目的

ホモシスチニン尿症は、先天的な酵素異常のためにメチオニンの代謝産物である、ホモシスティン、ホモシスチニンが血中に蓄積し、尿中にも大量に排泄される遺伝病である。本症は、欠損酵素によって 型、型と 型とに分類されるが、大部分はシスタチオニン合成酵素(CBS)の欠損による 型である。現在、わが国ではCBS欠損によるホモシスチニン尿症を対象として血中メチオニンの増加を指標とし新生児期にマス・スクリーニング検査が行われている。本研究では、新生児期の血中メチオニンが高値を示した兄と、正常であった妹のホモシスチニン尿症同胞例において、その原因を明らかにするためにCBS遺伝子変異の解析を行った。

研究対象および方法

対象は生後5日目に行われたマス・スクリーニング検査でメチオニン高値のためマス・スクリーニング陽性となった兄と、マス・スクリーニング検査ではメチオニン値がカットオフ値以下であった妹の同胞例である。マス・スクリーニング実施時のミルク摂取量は両者でほぼ同じであった。妹は2歳6ヶ月時に言語発達遅延を主訴として受診し、このときの検査で血中メチオニンおよびホモシスチニンの著増、尿中へのホモシスチニンの大量排泄が認められ、酵素活性測定によりホモシスチニン尿症と診断された。ま

た、2例ともビタミンB6不応型であった。

患者由来の培養皮膚線維芽細胞からTotal RNAを抽出し、これを錆型として単鎖cDNAを合成した。次いで合成した単鎖cDNAを錆型としてPCR法によりCBSに対する全長cDNAを増幅し、クローニング後塩基配列を決定した。制限酵素切断法、ミスマッチプライマ-を用いた制限酵素切断法で見いだされた遺伝子変異の有無を患児および両親のゲノムDNAで確認した。

研究結果

2例とも194番目のAからGへの変異と346番目のGからAへの変異のコンパウンドヘテロ接合体であった。これらの変異によりそれぞれCBS蛋白の65番目のヒスチジンがアルギニンに、116番目のグリシンがアルギニンに変わった。また、2例とも他の遺伝子変異は認められなかった。

次に、ゲノムDNAでのこれらの遺伝子変異の確認と両親での検索を行った。194番目のAからGへの変異により、あらたに制限酵素Mae Iの認識部位ができた。そこで変異部分を含むゲノムDNAをPCRで増幅後、Mae Iで切断した。患児ではPCR産物がMae Iで切断され、この遺伝子変異をもつことが確認された。また、母親も患児と同様PCR産物がMae Iで切断され、母親はこの変異の保因者であることが明らかとなった。346番目のGからAへの変異では新たな制限酵素認識部位はできないので、変異遺伝子でPst I認識部位ができるように、ミスマッチプライマ-を作成してPCRを行った。患児ではPCR産物がPst Iで切断され、この遺伝子変異をも

つことが確認された。また、父親も患児と同様PCR産物がPst Iで切断され、父親はこの変異の保因者であることが明らかとなった。

また、これらの遺伝子変異が病因遺伝子変異であることを確認するために、変異を含むCBS cDNAを大腸菌で発現させ、CBS活性を測定した。変異cDNAではCBS活性は検出限界以下で、これらの遺伝子変異が病因遺伝子変異であることが明らかとなった。以上の結果から、この同胞例は新生児期の血中メチオニン値が異なっているにもかかわらず、母親由来のH65Rと父親由来のG116Rのコンパウンドヘテロ接合体で、CBS遺伝子の遺伝子型は同一であることが明らかになった。

#### 考察

CBS欠損によるホモシスチン尿症では血中にメチオニンが増加し、尿中にホモシスチンが大量に排泄される。わが国では知的障害の発生予防のために血中メチオニンの増加を指標にしてホモシスチン尿症の新生児マススクリーニングが全国規模で実施されている。

本研究の対象である兄妹例では新生児期の血中メチオニン値が異なっており、兄は高値を示したが妹

は正常値を示したためスクリーニングで見逃された。しかし、兄妹共に母親由来のH65Rと父親由来のG116Rの複合ヘテロ接合体であり、CBS遺伝子の遺伝子型は全く同一であった。また、新生児スクリーニング検査時のミルクの摂取量もほぼ同じであった。ホモシスチンをメチオニンに再メチル化する機能は、新生児期に強く、加齢とともに減弱することが報告されている。したがって、新生児期に本兄妹例でみられた血中メチオニン値の差は、5-メチルテトラヒドロ葉酸メチルトランスフェラーゼなどホモシスチンの再メチル化に関与する酵素の発達速度の違いによることが推測された。

このように、新生児期の血中メチオニン値はCBSの遺伝型だけでなく、他のメチオニン代謝関連酵素の発達速度に影響されるため、ホモシスチン尿症の同胞をもつハイリスク新生児においては、現行新生児マススクリーニング検査結果が正常であっても、注意深い経過観察を行い、できるだけ早期に酵素診断や遺伝子診断により確定診断を行うことが必要である。また、新生児マススクリーニング検査でのホモシスチン尿症患児の見逃しを予防するためには、血中ホモシスチン値などを指標にした新しいスクリーニング法の確立が重要である。