

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

PKU/高フェニルアラニン血症を示す患児の鑑別に関する研究：  
BH4反応性フェニルアラニン水酸化酵素欠損症を中心に

研究要旨

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（HPA）患者のなかにフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の補酵素であるBH4投与に反応し血中フェニルアラニンが低下するが尿中プテリジン分析などからBH4欠乏症とは考えられない症例が存在する事を見出し、平成9年度の本研究班で報告した。今回、私共は更に症例を増やし検討を進めたので報告する。これらの患者はいずれもPAH遺伝子変異の複合ヘテロ接合体であり、10mg/kg体重のBH4投与すると6-24時間という非常に緩徐な経過で血中Phe濃度が低下した。同一のPAH遺伝子変異を持つ（R241CとR413Pとの複合ヘテロ接合体）二人の患者は、共にBH4への反応性を持っていたが、一方のアレルのみ共通（P407S)の変異を持つ患者同士ではBH4にたいする反応性は異なっていた。今回の2症例はBH4に反応するにも関わらずPAH遺伝子異常症であることから、鑑別診断上このような症例の存在に留意する必要がある。また、この性質はPhe制限食療法の補助治療として使われる可能性があることを示唆している。

研究協力者

成澤邦明、呉 繁夫、侯 殿昌  
(東北大学大学院医学系研究科  
小児医学講座遺伝病学分野)  
大浦敏博  
(東北大学大学院医学系研究科  
小児医学講座小児病態学分野)

研究目的

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（HPA）患者のなかにフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の補酵素であるBH4投与に反応し血中フェニルアラニンが低下するが尿中プテリジン分析などからBH4欠乏症とは考えられない症例が存在する事を見出し、本研究班で報告した。今回、私共はBH4に対する反応性を明らかにすることを目的とし、様々な遺伝子変異を持つ患児のBH4負荷試験の詳細を検討した。

研究方法

1) 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）を経口投与後、各時間で採血し、血中Phe濃度を測定した。

2)DHPR活性は血液濾紙を用いた方法で行った。尿中プテリジン分析はHPLCによった。3) PAH遺伝子変異検索：遺伝子型の決定はアレル特異的PCR増幅とエクソンを含む遺伝子断片をPCR法にて増幅し直接シーケンス法によった。

研究結果および考察

最近、BH4負荷試験において特異な反応パターンを示す3名の高Phe血症患者を見出した。体重1kg当たり10mgのBH4を経口投与しその後経時的に血中Phe濃度を測定したのが図1aである。3症例のマス・スクリーニングで見出された時の血清Phe値はそれぞれ、16, 4, 8mg/dlを示し、Phe-dietを行わない時の血中Pheはいずれの症例も6-20mg/dlの範囲にあり、non-PKU HPAに分類される高Phe血症患者であった。その負荷試験の結果の特徴は、1) 血清Phe値の低下のonsetは遅く、6-24時間ではじめてその低下を検出することが出来る、2) 血清Phe値は正常域には達しない、ということが挙げられる。この反応パターンは1-2時間以内に血清Phe値が正常化するPTPS欠損症患者で見られる反応と比較すると対照的である。これらの症例がBH4合成系の発達が遅いために起こる新生児一過性BH4欠損症である可能性を否定するため、症例1が1歳2カ月になったときに再度BH4負荷試験を実施した。この際、負荷試験ではBH4の投与プロトコルを変更した。今回見出した3症例とも血清Phe値の低下が極めて緩徐であるため、従来のプロトコルのような24時間までの観察では完全に低下したかどうかを確認出来ない。変更したプロトコルでは24時間以後もBH4を投与し、48時間まで血清Phe値を観察することにした。症例1の1年後の再検査でも血清BH4の低下は確かに認められ、BH4に対する反応は一過性でないことが確認できた。

これらの患者はすべて尿のプテリン分析結果とDHPR活性の測定結果は共に正常で負荷試験以外の結果はPAH deficiencyであることを示していた。一般的にはPAH deficiencyではBH4負荷試験には不応性と考えられており、BH4負荷試験の結果とこれらの検査結果が一見合わなかったため、診断確定の目的でPAH遺伝子の遺伝子分析を行った。その結果、3症例はすべてPAH遺伝子点変異のcompound heterozygoteであることが判明した。R252W, IVS-4, R413P, 及びR241Cの各遺伝子変異はいずれも東洋人PKU患者で既に報告されており、A407T変異はスペイン人のPAH deficiency患者で報告がある。A373T変異は今回我々がはじめて見出した変異である。このようにすべての症例でPAH遺伝子に変異が見出されることから、3症例ともBH4 deficiencyでなく、PAH deficiencyであることを確診した。

PAH deficiency患者におけるBH4投与に対する反応がPAH遺伝子変異によって決定されているならば、同一の遺伝子変異を持つ患児はBH4に対し同一の反応をするはずである。この事を検証するために、症例3と同一のPAH遺伝子変異 (R241C, R413P)を有する症例4を見出しBH4負荷試験を行った。症例2は症例3と同様にnon-PKU HPAに分類され、両者間に血縁関係はない。負荷試験時、症例4は12歳であった。症例4もBH4に反応して血清Phe値は低下し、血清Phe値を低値に保つことが出来き、BH4反応性は変異遺伝子の組み合わせにより決定されていることが示唆された。次に、一方のアレルのみが共通の患児の反応性を調べてみた。症例1の一方の遺伝子変異であるA407R変異が共通で、もう一つのアレルにP413W変異の代わりにR111X変異をもつ13歳の高Phe血症の患者(症例5)にBH4負荷試験を行ってみた。症例1の反応性とは対照的に症例5では血清Phe値の低下は認められなかった。

BH4投与がPheを低下させるメカニズムは未だ明らかでない。P407Sを共通に持ちながら症例1はBH4反応性であるのに対し、症例5は無反応であることから、PAH蛋白質の高次構造がBH4に対する反応性に重要な要件になっていると推察される。正常PAH酵素は大部分は4量体、一部は2量体で存在

する。症例5ではR111X変異を持つアレルからは110個のアミノ酸から成る短いPAHペプチドしか合成されないためpolyheteromerの形成が起これないのに対し、症例1においてはR252W変異を持つサブユニットとP407S変異を持つサブユニットとのheterotetramerやheterodimerが生じていると考えられる。これらのpolyheteromerがBH4にたいする異常なKmを持つのかも知れない。この結果は最近我々が行った変異PAHの発現実験の結果とも矛盾しない。即ち、COS細胞で発現したS407P変異を持つ変異酵素の活性は培地中や活性測定系にBH4を過剰に添加していても上昇する現象は認められなかった。

以上の結果はHPA患者のdiet療法を軽減する補助療法にBH4投与が使える可能性を示している。Diet治療のようにすべての高Phe血腫患者に有効と考えられるわけではないが、ある種のPAH遺伝子変異を持つ患児に対し、BH4投与は補助療法として充分検討の余地がある。実際、症例3では試験的に6カ月間5mg/dlのBH4服用を併用し、Phe制限を緩和することに成功している。この療法の可能性をさらに評価していくために、今後、様々のPAH遺伝子変異の組み合わせを持つ患者に対し負荷試験を行っていくことが必要である。今回反応性が確認された症例はいずれもnon-PKU HPAであり、BH4反応性の古典型PKUの患者はまだ見つかっていないが、BH4負荷試験を注意深く行うことにより見出される可能性がある。その際、従来のBH4負荷試験プロトコルである24時間までの観察期間ではBH4反応性PAH deficiencyを見落とす危険性があるので今回私達が用いた様な48時間まで血清Phe値をモニターする方法で行うことが望ましい。多くの患者で認められる遺伝子変異の組み合わせにおいてBH4反応性が確認されれば適応範囲の広い治療となることが期待される。

## 結論

今回の症例はBH4に反応するにも関わらずPAH遺伝子異常症であることから、鑑別診断上このような症例の存在に留意する必要がある。また、この性質はPhe制限食療法の補助療法として使われる可能性があることを示唆している。