

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

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欠損症
- 新しい疾患概念の確立とマス・スクリーニングにおける問題点 -

研究要旨

フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)遺伝子変異により発症する高フェニルアラニン(Phe)血症のなかに、補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH4)投与に反応し血中Pheが低下する病態があることを見出し、これをBH4反応性PAH欠損症として報告した(J Pediatr, 1999; 135: 375-8)。本症は、食餌療法を行う以前の血中Phe濃度が15mg/dl以下の比較的軽症のPAH欠損症で見出されている。マス・スクリーニング陽性患児の確定診断のためのBH4負荷試験において、他のPAH欠損症と異なり、BH4に反応するパターンを示すため充分な注意が必要である。この反応パターンには、1) 血中Phe濃度の正常化には至らない、2) 血中Phe濃度の低下は極めて緩徐であるなどの特徴を持つ。現在までに、本症に特有なPAH遺伝子型が、3種類見つかっている。この中で遺伝子型(R413P/R241C)を持つ患児は現在までに3人見出されており、この3人はすべて同様なBH4反応パターンを示すことから、本症は、遺伝子診断の良い対象であると考えられる。

研究協力者

成澤邦明，呉 繁夫

(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)

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(Phe)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。今回、私共はPAH遺伝子変異の検索によりその疾患概念を確立と、マス・スクリーニングの一次陽性患児の鑑別診断における問題点を明らかにする目的で、疾患の特徴と見出された遺伝子変異検索の検討を行ったので報告する。

研究方法

- 1) BH4負荷試験：体重当たり10mgのテトラヒドロピオプテリン（サントリー株式会社より供与）を経口投与し図にある各時間で採血し、血中Phe濃度を測定した。血中Phe濃度の測定は日立アミノ酸自動測定装置によった。
- 2) 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

1. 疾患概念

血中Phe濃度の測定によるマス・スクリーニングにて、4mg/dl以上の濃度を示した患児は確定診断のための検査が必要になる。具体的には、図1に示した様に尿中プテリジン分析、乾燥ろ紙中のDHPR活性測定、BH4負荷試験の3種類の検査が行われている。この中でBH4負荷試験において、通常のPAH欠損症は無反応であり、この所見はBH4欠損症との鑑別上重要な所見の一つとなっている。ところが、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1症例を検索していく中で今回の新しい疾患概念が生まれた。その後、症例数が増えて現在5名の患者の存在を確認している。本疾患は、「フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)遺伝子変異により発症する高フェニルアラニン(Phe)血症で、補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH4)投与に反応し血中Pheが低下する病態」と定義される(J Pediatr, 1999; 135:375-8)。

2. 現在までに診断された本症患児の特徴

本症は、食事療法を行う以前の血中Phe濃度が15mg/dl以下の比較的軽症のPAH欠損症で見出されている。血中Phe濃度が20mg/dlを越えるようないわゆる古典型PKU患者には、現在のところ見いだされていない。BH4に対する反応性は年齢によって変化せず、この点で一過性BH4欠損症などとは異なる。いくつかの症例で数年の間隔をおいて再度BH4負荷試験を行ったがその反応性には変化がなかつ

た。BH4に対する反応性は特徴的で、1) 血中Phe濃度の低下は緩徐で、かつ、2)正常化に至らない、などの特徴を示す。しばしば、BH4投与後4時間後の血中Phe濃度は低下傾向を示さず、12-24時間後の測定で初めて低下傾向が明らかになる症例もある。

3. 本症患者の持つ遺伝子変異

本症患者のPAH遺伝子変異は異所性mRNAのreverse transcription mediated PCR法による増幅と各エクソンのPCRによる増幅の後、直接塩基配列決定を行って検索した。現在までに見いだされている遺伝子変異と患者数の対応を表1に示す。BH4反応性が確認されている遺伝子型は、P407S/R252W, IVS4-1G>A/A373T, R413P/R241Cの3種類であった。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いて、A407T変異はスペイン人のPAH deficiency患者で報告がある。A373T変異のみが今回我々がはじめて見出した変異である。R403P/R241Cの組み合わせの患者は現在までに3人の患者が見いだされている。R413Pは日本人PKU変異アレルでもっとも高頻度(30%)に見いだされる遺伝子変異で、R241CはPKU変異アレルの約7.5%を占める。このためこの遺伝子変異をもつ患者は他にも存在すると考えられる。この3患者において、BH4に対する反応パターンは類似しており、BH4に対する反応性は基本的にはPAH遺伝子型によって決定されていることが示唆される。

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。図2で示すようP407S/R252Wの遺伝子型を持つ患者はBH4に反応するが、P407S/R111Xの遺伝子型を有する患者はBH4に反応しない。このことから、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。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の形成が起らないのに対し、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に対する異常なKmを持つのかも知れない。

4. マス・スクリーニングにおける問題点と今後の課題

マス・スクリーニングの一次試験で陽性になった患者の鑑別診断のためにBH4負荷試験を行う際に、本症の存在を十分考慮する必要がある。本症の反応

パターンは、PTPS欠損症などと比較するとかなり特徴的であるが、少量のBH4投与には反応が顕著でないBH4欠損症との区別は困難な場合がある。その場合には、乾燥ろ紙中のDHPR活性を直接測定する、ないしは、PAH遺伝子変異検索を行うなどにより診断を確定する必要がある。

本症患者の治療にBH4投与が有効かどうかは現在検討中である。Diet治療のようにすべての高Phe血症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者に対し、BH4投与は補助療法として充分検討の余地がある。実際、現在2名の患者に対して長期にBH4投与を行い有効性を検討中である。この療法の可能性をさらに評価していくために、今後、どのようなPAH遺伝子変異の組み合わせでBH4に対する反応が出るのかを更に検討していく必要がある。

現在、私どもはPAH遺伝子変異検索を各患者の鑑別診断や食事療法に反映させるためのシステムの構築を計画している。図3にその概要を示す。遺伝子変異の検索が比較的容易にしかも確実に出来るようになった現在、この手法をマス・スクリーニングの2次検査として取り入れていくことは今後十分検討に値する課題と思われる。

文献

1. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-378.
2. Nagasaki Y, Matsubara Y, Takano H, Fujii K, Senoo M, Akanuma J, Takahashi K, Kure S, Hara M, Kanagane Y, Saito I, Narisawa K. Reversal of hypopigmentation in phenylketonuria mice by adenovirus-mediated gene transfer. *Pediatric Res* 1999;45:465-73.
3. 松原洋一, 藤井邦裕, 赤沼 順, 侯 殿昌, 高橋和俊, 呉 繁夫, 鈴木洋一, 成澤邦明. 「糖・アミノ酸代謝異常の遺伝子診断」 *Mebio* 1999;16:61-66.
4. 松原洋一, 長崎 裕, 藤井邦裕, 高野英昭, 成澤邦明. 「フェニルケトン尿症」日本遺伝子治療学会編「遺伝子治療開発研究ハンドブック」エヌ・ティー・エス出版 (東京) 1999, pp931-934.

表 1

BH4反応性PAH欠損症のPAH遺伝子変異

遺伝子型	遺伝子変異		患者数(人)
	アレル 1	アレル 2	
1	P407S	R252W	1
2	IVS4-1G>A	A373T	1
3	R413P	R241C	3

図 1

高フェニルアラニン血症の診断

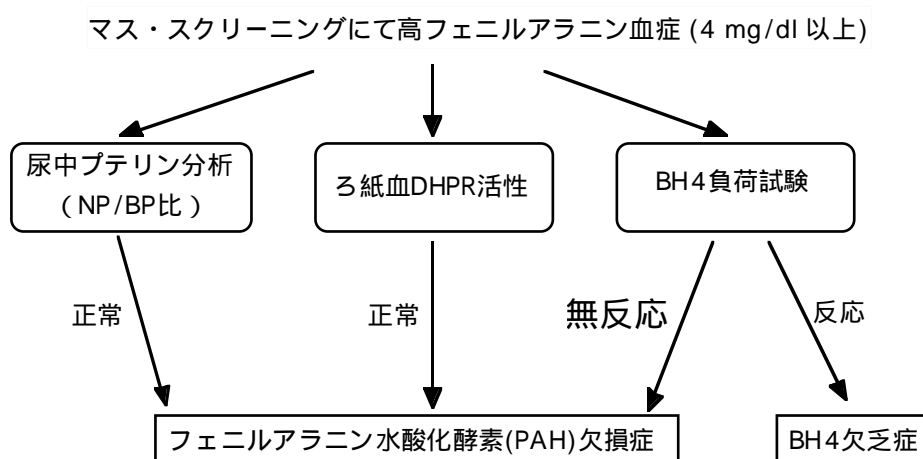


図 2

一方のアレルが共通の 2 名の患児のBH4反応性

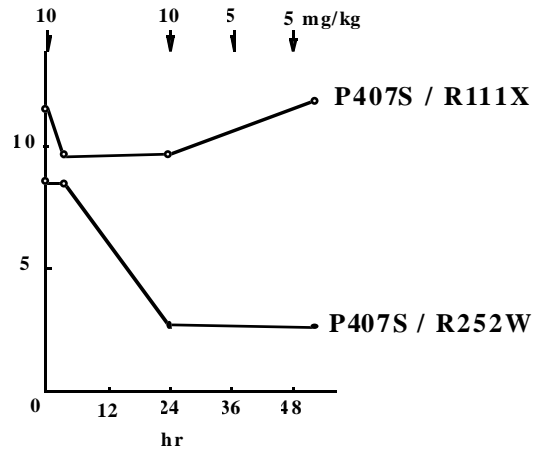


図 3

