



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 先天性ケトン体代謝異常症の臨床および分子病態に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 深尾, 敏幸 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/697">http://hdl.handle.net/20.500.12099/697</a>

### (3) 研究成果の総括 (平成14、15年度)

本研究はケトン体代謝異常症の蛋白遺伝子レベルでの病因・病態ならびに臨床像について検討し、その成果を以下に要約し、報告A~Lを掲載した。

#### ケトン体産生異常症 (VLCAD欠損症)

1) 既報告1例を含む4例の日本人症例について蛋白遺伝子解析を行い、筋症型の2例では変異蛋白が残存活性をもつ変異であることを明らかにし、それらの変異は温度感受性をもつことを明らかにした。また軽症小児型の1例では、他の2例に比べて変異はより重症型であるが、それでも残存活性をもち、本症におけるphenotype/genotype correlationを明確に示した。(報告A)

2) 更に日本人で筋症状で発症したVLCAD欠損症の遺伝子解析を行い臨床像と変異を明らかにした。(報告B)

#### (グルタル酸尿症2型)

3) グルタル酸尿症2型はETF/ETF-DH系の異常によりミトコンドリアβ酸化系の異常も生じる有機酸代謝異常症である。異なる臨床像の2名の日本人グルタル酸尿症2型の患者においてETFαサブユニットの変異を同定した。これらの変異cDNAを発現してイムノプロットで蛋白発現の異常を明らかにした(報告C)

#### ケトン体利用異常症 (SCOT欠損症)

4) SCOT欠損症の軽症変異型:(報告D)

我が国ではこれまで3家系5症例が診断されている。今回この3家系の蛋白遺伝子解析と臨床像について検討し、軽症変異型ではpermanent ketosisがみられないことから、Permanent ketosisは本症に特徴的ではあるが、ないからといって否定できないことを明らかにした。以下はそのサマリーである。

**GS02,GS02s(第1家系)**:日本初のSCOT欠損症家系で、妹GS01sは出生前診断にて診断され、注意深く観察されており、重篤な発作はきたしていない。臨床像はこれまでの報告例と同様の典型的なSCOT損症であり、間欠期においても尿ケトンにはほぼ陽性で、血中ケトン体は常に高値で、permanent ketosisといえる。

**GS08(第2家系)**:両親が奄美大島出身で、発作間欠期の尿ケトンが陰性であったり、血中ケトン体量はケトosisと言えない程度度があり、SCOT欠損症に特徴的とされたpermanent ketosisを呈していなかった。しかし発作時の所見はGS02と同様に強いケトアシドーシスのため酵素診断を行って本症と診断された。

**GS09,GS09b(第3家系)**:奄美大島在住で、反復性のケトアシドーシスをきたしていたが、改善すると尿ケトンが陰性になることから、本症の可能性は低いと主治医は考えていたが、第2家系の報告を学会で聞いて、酵素診断に至り、SCOT欠損症と診断された。

**蛋白遺伝子解析**:線維芽細胞でのイムノプロットではGS02,GS02ではSCOT蛋白は検出されず、GS08では正常な位置にSCOT蛋白が量は少ないが検出された。GS02,GS02sの遺伝子変異については以前報告した通り、V133E, C456Fのcompound heterozygotesあり、発現実験では残存活性は認められなかった。一方GS08はシークエンス解析の結果T435Nのhomozygoteであり、GS09,GS09sは同郷であることから同変異をもつか制限酵素切断法にて調べたところ、やはりT435Nのhomozygoteであった。37度における発現実験ではT435N変異は約25%の残存活性を持つことが明らかになった。

**Phenotype/Genotype correlation** : 残存活性をもたない変異のGS02, GS02sはpermanent ketosisを呈し、既報告例と臨床像は同様であったが、残存活性のあるT435N変異をもつ3症例では、permanent ketosisをきたしておらず、残存活性の有無とpermanent ketosisの有無はよく関連していた。本症の大事な特徴とされるpermanent ketosisがない症例でもSCOT欠損症がありうることを念頭におき、生理的なケトーシスより強いケトーシスを来す症例では本症を考慮する必要がある。

### (T2欠損症)

5) ス페인5症例の蛋白遺伝子解析: 1例はDelE85とG152Aの複合ヘテロ接合体, 1例はG152AとE345Vの複合ヘテロ接合体, 1例はK124Rのホモ接合体, 1例はQ145Eのホモ接合体, 最後の1例は380C>Tのホモ接合体であった。ミスセンス変異のうちQ145E変異のみが残存活性を有する変異であることを明らかにし、変異の詳細な検討を蛋白3次構造モデルを含めて検討した。この論文の図がMol Genet Metabの表紙絵として用いられた。(報告E)

7) 開始メチオニンコドン変異の特徴: 日本人症例GK30においてc.2T>Cという開始メチオニンコドンの変異をヘテロで同定した(もう1つの変異は149delC)。開始メチオニンコドンの変異はアミノ酸置換がおこるのではなく、その変異開始メチオニンコドンでの翻訳開始の効率がどのように変わるのかが問題となる。そこで開始メチオニンコドンに可能な9種類のうちの1つの1塩基置換を入れた発現ベクターを作成し、T2欠損SV40-transformed fibroblastsにtransientに発現させて変異開始メチオニンコドンでの翻訳開始効率を蛋白量として調べた。結果はWild typeに比べて、c.1A>C(66%)>c.2T>C, c.3G>C, c.3G>T(22%)>c.3G>A, c.1A>G(11%)>c.2T>A, c.2T>G, c.1A>T(7.4%)とすべての変異で翻訳が変異開始メチオニンでおこることがわかり、その効率にはかなり差があることがわかった。以上からT2欠損症における開始メチオニンコドン変異は軽症遺伝子型になることが明らかになった(報告F)

8) 軽症変異型のチオラーゼ欠損症の特徴(報告G, H)。

#### 本邦5症例の発作間欠期における有機酸、アシルカルニチン解析結果

本邦では1986年に初めての日本人症例が報告されて以来現在まで4家系5例が診断されている。今回これら5例の遺伝子解析と臨床所見を比較し、mild genotypeの本症の特徴について報告した。

日本人患者5例のうちGK01は残存活性をもたない変異のcompound heterozygoteでsevere genotypeに、他の4例は少なくとも一方の変異が残存活性をもつmild genotypeと分類された。

ケトアシドーシス発作の頻度と重症度: 一度発作がおこるとそのケトアシドーシスの強さは血液ガス所見からみてもgenotypeとは関連していないと考えられた。発作頻度についても診断がついた後はどの症例もケトアシドーシス発作を来しておらず、genotypeとの関連性は認められなかった。

発作間欠期の尿有機酸所見と濾紙血アシルカルニチンプロファイル: 一般に本症では発作時、発作間欠期に拘わらず、大量のtiglylglycine, 2-methyl-3-hydroxy butyrateが検出されるとされているが、severe genotypeのGK01では従来の報告通りであった。しかしmild genotypeの4例では、tiglylglycine traceもしくは検出されず、2-methyl-3-hydroxybutyrateも非常に少なく、我々のシステムでのcut-off valueを下回っている症例がみられた。血液濾紙によるアシルカルニチン分析でも、C5:1ルニチン(tiglylcarnitine)はmild genotypeでは正常域であり、OH-C5(2-methyl-3-hydroxybutyrylcarnitine)cut-off value近辺であり、GK01のように明らかな異常を示さなかった。以上からmild genotypeの症例の発作間欠期の有機酸所見やアシルカルニチンプロファイルの異常は軽微であり、正常と見誤る可能性があるため注意が必要である(報告G)。

軽症遺伝子型ミトコンドリア・アセトアセチル-CoA チオラーゼ(T2)欠損症はa coupled assay with tiglyl-CoAでは正常活性と診断されてきた可能性がある。

ヨーロッパ、アメリカで本症の酵素診断に最近まで用いられていたA coupling assay with tiglyl-CoA(tiglyl-CoA法)にて正常T2活性と診断されていた軽症遺伝子型のT2欠損症例を2例経験した。フ

ランスのHopital DebrousseのDr.Rollandによってtiglyl-CoA法にて正常T2性と診断されたレバノンのGK45およびフランスのGK47(JIMD 23:751-753)。tiglyl-CoA法にてT2欠損症と診断されたGK46 GK49, GK50の3症例の計5例を対象とした。GK45, GK47はthe coupled assay with tiglyl-CoAでは正常範囲内であるがカリウムイオン依存性アセトアセチル-CoA チオラーゼ活性からT2欠損症と診断された。5症例における遺伝子変異は表の通り。ミスセンス変異cDNAの37℃での発現実験ではA132Gは37℃の発現にて10%の残存活性、D339-V340insDは10%の残存活性、G152A、H397Dでは有意な残存活性を認めなかった。発現実験からGK45, GK47は少なくとも一方のアリールに残存活性をもつ遺伝子変異のある軽症変異型であり、その他の3例は37℃で残存活性のない重症変異型と分類できた。重症遺伝子型の3例はtiglyl-CoA法で明らかな活性低下を示したのに軽症型2例は同方法にて活性が正常範囲であった。2001年以降はこの方法は中止されているが、それ以前の軽症遺伝子型の症例は、tiglyl-CoA法によって正常と過って診断されてきた可能性を示唆している。  
(報告H)

## ケトン代謝異常症

- 9) ケトン体代謝の経路とコントロールについて基礎から臨床についてまとめた (報告I)
- 10) これまでのケトン体代謝異常症に関する分子病態学的研究についてT2欠損症を中心にまとめた (報告J)
- 11) T2欠損症についてまとめた (報告K)
- 12) チオラーゼ一般, ミトコンドリア・アセトアセチル-CoAチオラーゼ, 細胞質アセトアセチル-CoAチオラーゼについてまとめた (報告L)

以上の研究は平成14、15年度文部省科学研究費補助金(基盤研究C)によって行われました。ケトン体代謝異常症の研究は、前岐阜大学医学部小児科学講座教授、現中部学院大学教授の折居忠夫先生、前岐阜大学小児科学教室講師で現島根医科大学小児科学講座教授の山口清次先生、前信州大学生化学講座教授の橋本隆先生の御指導により岐阜大学大学院医学研究科の研究テーマとして1986年に開始し、今年で17年になります。本研究の成果は、上記先生方および現岐阜大学医学部小児科学講座教授近藤直実先生の御指導、御助言、またこれまで研究に関わってくれた大学院生(加納正嗣先生、宋向前先生、張改秀先生)、研究生(桑原尚志先生、若園明裕先生、中村こずえ先生)、研究助手の坂口直美さん、島根医科大学から岐阜大学にVLCAD欠損症の研究をした田草雄一先生、長谷川有紀先生、そして教室の皆さんの御協力によるところが大きく、ここに感謝いたします。また貴重な症例を御紹介いただいた国内外の諸先生方、特に大阪市立大学の自宅治夫先生、広島大学の佐倉伸夫先生、福井医科大学の重松陽介先生、チオラーゼ欠損症の発見者で共同研究をしていただいたCharles R Scriver先生、SCOT欠損症をはじめケトン体代謝研究の共同研究者のGrant A Mitchell先生、T2およびSCOTの3次構造モデルの作成、変異の構造からの解釈などで共同研究していただいている大阪大学蛋白質研究所の中村春木先生に深謝いたします。