

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K20871

研究課題名(和文) SLC46A1新規変異を有した遺伝性葉酸吸収不全症に関する研究

研究課題名(英文) Hereditary folate malabsorption with a novel mutation in SLC46A1

研究代表者

野川 奈津子 (Nogawa, Natsuko)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：80757360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性葉酸吸収不全症(HFM)は、SLC46A1(PCFT責任遺伝子)遺伝子変異に起因した常染色体劣性遺伝疾患で、原発性免疫不全症の一種である。過去に後遺症なく治療が奏効した例は殆どない。申請者らは新規に報告した遺伝子変異について機能解析を進め、HFMに対する有効な治療基準の確立を目指した。研究期間内に、患児の葉酸吸収不全が両親由来の遺伝子変異が組み合わせられたことによることを確認した。また、患児由来EBV-LCL(ヒト不死化B細胞株)を樹立し、血球系への影響の有無の検討を行った。更に、HeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来細胞株)のPCFT発現解析や変異PCFTの葉酸取り込み能の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが報告した遺伝子変異については日本人特有の創始者変異あるいは世界共通で見られるホットスポットの可能性が。国内外のゲノムデータベース検索でも該当はないが、今後情報が集積されるにつれて明らかになる可能性がある。また今後の新規HFM患者の遺伝子解析においては、当該変異をピンポイントで検索することにより早期の診断治療につながり得ると考えられる。葉酸取り込み能の解析はより安全かつ簡便に施行できるため、機能解析の一助となる。

本研究は、原因不明の原発性免疫不全症とされ早期に適切な治療に到達しない潜在的患者に対し、その早期診断および治療に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Hereditary folate malabsorption (HFM) is an autosomal recessive disease caused by mutations in SLC46A1 encoding the proton-coupled folate transporter (PCFT), a type of primary immunodeficiency. There are few cases in the past in which treatment has been successful without sequelae. We advanced functional analysis of the newly reported gene mutation and aimed to establish effective treatment standards for HFM. During the study period, it was confirmed that folate malabsorption in the patient was due to a combination of genetic mutations from parents. And, EBV-LCL (human immortalized B cell line) derived from the patient was established, and the effect on the hematocytocyte system was examined. In addition, PCFT expression analysis of HeLa cells (human cervical cancer-derived cell lines) and folate transportant ability of mutant PCFT were analyzed.

研究分野：小児・障害者歯科

キーワード：PCFT SLC46A1 deep intronic mutation HFM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉酸は DNA 合成、アミノ酸合成に必須の補酵素であり、欠乏により巨芽球性貧血、免疫不全症状、神経症状などを来す。妊婦で葉酸が欠乏すると、胎児の神経管形成障害リスクが上昇する。この葉酸を先天的に吸収できない遺伝性葉酸吸収不全症 (Hereditary folate malabsorption, HFM) は 1961 年初報告され、2014 年現在全世界で 31 の報告がある。

2. 研究の目的

2014 年申請者らは、本邦初となる HFM 患者について報告した。その患児について、申請者らは葉酸輸送体 proton-coupled transporter (PCFT) のコード遺伝子 SLC46A1 に未報告の変異があることを発見した。当該患児は重症免疫不全症状、神経症状を有していた。過去の報告によれば、後遺症なく治療が奏功した例はほとんどない。本研究の目的は、当該遺伝子変異について機能解析を進め、遺伝性葉酸吸収不全症に対する有効な治療基準を確立することである。

3. 研究の方法

国内非血縁患者 4 名において、SLC46A1 の DNA および cDNA レベルの遺伝子解析を行った。アミノ酸置換を生じる変異がタンパクの構造や機能に与える影響を分析した。各変異がタンパク発現に及ぼす影響の評価については、HeLa 細胞に各変異体発現ベクターと pEGFP ベクター (導入効率のマーカー) を共導入し、ウェスタンブロット法で PCFT 発現を調べた。さらに各変異が葉酸輸送能に与える影響については、従来頻用されていたアイソトープを使用せずに、HeLa に各変異体と CD20 発現ベクター (導入効率のマーカー) を共導入した。MTX-FITC を PCFT 好適活動環境下で取り込ませてから細胞を回収し、遺伝子導入細胞における MTX-FITC 陽性細胞の比率を解析することで評価を行った。

4. 研究成果

(1) 患者 1 の SLC46A1 の DNA レベルの遺伝子解析では、患者と母にヘテロの塩基置換 (c.566G > T, p.G189V) のみを認めた。さらに cDNA レベルの解析を行なったところ、患者 1 と父において、エキソン 3 の後ろにイントロン 3 の 168 bp が挿入されていることが示された (図 1)。この挿入配列によって、その途中で premature termination が生じていた (p.G389Afs*20)。挿入部位付近の DNA シークエンス解析によって挿入配列の 3' 端の c.1166-285T > G の塩基置換が父と患者 1 のみでみられ、これは挿入配列を持たないコントロール 50 人の解析では認めなかった。スプライス異常を予測するソフトウェア解析からは、この変化によって、置換塩基の直後の塩基配列が splice donor site に変化する可能性が高まることが示唆された。

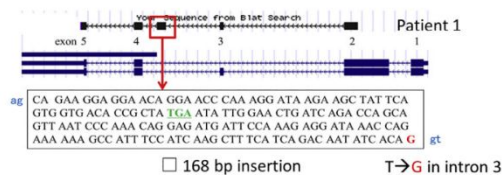


図 1 イントロン 3 の 168 bp 挿入配列

このスプライス異常についてさらに詳細に解析するために、挿入配列のみ増幅するプライマーと挿入のない配列のみを増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行い、増幅産物の遺伝子解析を行なったところ、168 bp の挿入配列がある転写産物は父のアレルのみから由来、168 bp の挿入配列のない転写産物は母のアレルのみから由来することが判明した。このことは、c.1166-285T > G があると必ず 168 bp が挿入されること、c.1166-285T > G がないと 168 bp の挿入は生じないことを示しており、168bp の挿入は transcriptional variant ではなく、c.1166-285T > G では必ず splice 異常が起こる、つまり leaky な splice 変異ではないことが示された。以上の結果から、患者 1 は c.566G > T, p.G189V と c.1166-285T > G, p.G389Afs*20 の複合ヘテロ接合変異を有していると考えた。

(2) 患者 2 の SLC46A1 の DNA レベルの遺伝子解析では異常がみられず、RT-PCR 産物の解析を行なったところ、患者 1 と同一のイントロン 3 の 168 bp が挿入された産物のみを認め た。DNA 配列を確認すると、患者 2 は両親由来の c.1166-285T > G, p.G389Afs*20 のホモ 変異と判明した。

(3) ここまでの結果から、患者 3, 4 はエキソン解析に加えて初めから患者 1, 2 共通の

c.1166-285T > G の有無についても解析した。すると、患者 3 は父由来の c.1166-285T > G , p.G389Afs*20 と母由来の既報変異 c.954C > G, p.S318R がみられ、患者 4 は母由来の c.1166-285T > G , p.G389Afs*20 と父由来の未報告の c.1174T > G, p.F392V がみられ、いずれも複合ヘテロ接合変異の可能性が考えられた。

(4) 次に患者 1, 3, 4 でみられたアミノ酸置換の与える影響について各種予測ソフトで検索したところ、いずれも影響は大きいと予測された。それぞれの PCFT 変異体発現ベクターを HeLa 細胞に一過性に導入し、ウェスタンブロット法で解析したところ、168 bp 挿入変異体、S318R 変異体では PCFT 発現が欠損しており、G189V 変異体では減少していた。一方で F392V 変異体は野生型とほぼ同等の PCFT 発現を示した (図 2)。

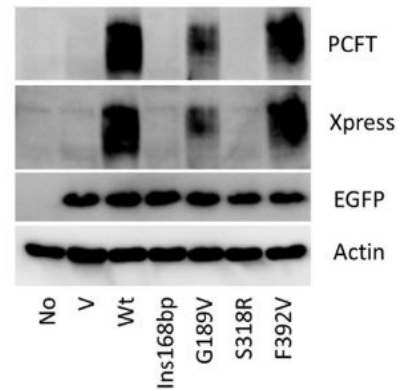


図 2 各変異体の PCFT 発現

(5) また、MTX-FITC の取り込みをフローサイトメトリー法で解析したところ、各変異体では MTX-FITC 陽性細胞が著明に低下しており、MTX 輸送能がほぼ 欠如することが示唆された (図 3)。

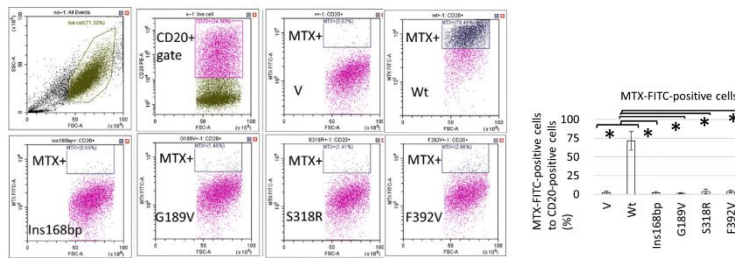


図 3 各変異体の MTX-FITX 陽性細胞の割合

以上の結果より、4 患者に共通していた c.1166-285T > G については日本人特有の創始者変異あるいは世界共通で見られるホットスポットの可能性はある。今後の新規 HFM 患者の遺伝子解析においては、全エキソン検索に加えて c.1166-285T > G をピンポイントで検索することで、より早期の診断治療につながり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tozawa Yusuke, Abdrabou Shima Said Mohamed Ali, Nogawa-Chida Natsuko, Nishiuchi Ritsuo, Ishida Toshiaki, Suzuki Yuichi, Sano Hideki, Kobayashi Ryoji, Kishimoto Kenji, Ohara Osamu, Imai Kohsuke, Naruto Takuya, Kobayashi Kunihiro, Ariga Tadashi, Yamada Masafumi	4. 巻 208
2. 論文標題 A deep intronic mutation of c.1166-285T>G in SLC46A1 is shared by four unrelated Japanese patients with hereditary folate malabsorption (HFM)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108256 ~ 108256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	戸澤 雄介 (Tozawa Yusuke)		
研究協力者	Mohamed Ali Abdrabou Shima Said (Mohamed Ali Abdrabou Shima Said)		
研究協力者	山田 雅文 (Yamada Masafumi)		
研究協力者	西内 律雄 (Nishiuchi Ritsuo)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石田 敏章 (Ishida Toshiaki)		
研究協力者	鈴木 雄一 (Suzuki Yuichi)		
研究協力者	佐野 秀樹 (Sano Hideki)		
研究協力者	小林 良二 (Kobayashi Ryoji)		
研究協力者	岸本 健治 (Kishimoto Kenji)		
研究協力者	小原 収 (Ohara Osamu)		
研究協力者	今井 耕輔 (Imai Kosuke)		
研究協力者	成戸 卓也 (Naruto Takuya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 邦彦 (Kobayashi Kunihiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関