

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790708  
 研究課題名 (和文) リジン尿性蛋白不耐症における本邦での疫学調査および発症前診断にむけての研究  
 研究課題名 (英文) The epidemiological and genetic study for the presymptomatic diagnosis about Japanese lysinuric protein intolerance patients  
 研究代表者  
 野口 篤子 (NOGUCHI ATSUKO)  
 秋田大学・医学部・医員  
 研究者番号：70400497

## 研究成果の概要：

リジン尿性蛋白不耐症 (以下、LPI) の本邦における臨床像の詳細な実態を把握する目的で、本邦での疑い症例に対し遺伝子解析を施行し、かつ遺伝学的に確定診断された症例については臨床所見の追跡調査を行った。さらに遺伝子系と臨床型との関連の有無について検討を重ね、遺伝子型が将来の予後予測因子となるかどうか、治療法選択に有用な情報となりうるかどうかについて検討した。

現時点で 34 例の解析を施行、31 例で変異を確認した。2 例は解析困難症例で、現在も解析を続行中である。

一方臨床症状の調査においては、重度の精神発達遅滞や神経症状を有する新規罹患者がみられず、本疾患の早期診断、早期治療が広まりつつあることを示すものと思われた。本研究期間に同定した新規変異はなく、全てが当教室既報の変異と同一であり、本邦 LPI の遺伝子変異が日本人特有である (海外の変異とは種類の重なりがない) ことを更に裏付ける結果であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	150,000	2,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：

- 1) リジン尿性蛋白不耐症
- 2) SLC7A7
- 3) y<sup>+</sup>LAT-1
- 4) 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

リジン尿性蛋白不耐症(Lysinuric protein intolerance: 以下、LPI)は常染色体劣性遺伝を示す先天性代謝異常症である。1999年、本疾患の責任遺伝子(SLC7A7)が同定され、2000年には西欧の二つの研究グループと、申請者らの各研究グループがSLC7A7のゲノムDNA構造を明らかとした。その後申請者らは、この遺伝子情報をもとにして、当院および北東北地区の罹患者の遺伝子解析を施行した。得られた遺伝子型はどれも諸外国での報告とは異なっており、日本人の遺伝的異質性を示すものであった。本邦での臨床像および遺伝子型の分布を把握し諸外国と比較するため、2001年に行った臨床像調査では、診断確定までかなりの歳月を要し重篤化した例や治療に苦慮する例も散見された。更なる症例の蓄積と全体的な臨床像の把握は、早期発見や治療法の確立のために必須と思われ、本計画を立案した。

## 2. 研究の目的

- (1) 本邦におけるLPI症例の遺伝子型について、データを蓄積する。
- (2) 本邦LPI症例の臨床像の実態を把握し、遺伝子型との関連について検討する。
- (3) 表現型(もしくは遺伝子型)にあわせた適切な治療が選択できるような基盤をつくる。

## 3. 研究の方法

今までは、論文発表されてきた症例の一部を対象に、遺伝子解析および臨床像調査を行ってきたが、さらに対象を広げて調査を進めていった。専門学会での報告例をもつ、または当教室に直接、本遺伝子解析の依頼のあった医療機関と連携し、患者の遺伝子型と臨床型について調査した。

- (1) 遺伝子解析：  
同意が得られた症例に関して遺伝子解析を行い、変異の有無を確認した。
- (2) 遺伝子解析方法：  
患者の末梢血白血球または培養リンパ芽球から、ゲノムDNAを抽出し、申請者が決定したSLC7A7のゲノム構造情報をもとに、各エクソンを、イントロン部位に配置したプライマーを用いてPCR法によ

り増幅した。その後、ダイレクトシーケンシング法により、SLC7A7の塩基配列を、各エクソン-イントロン境界域の配列を含めて調べていった。変異と思われる部位がある場合は、mRNAレベルでの遺伝子構造を確認した。

(Noguchi A et al. Human Mutation 2000;15(4):367-72)

### (3) 臨床像調査：

申請者らが、遺伝子解析にて本疾患と確定診断した症例について、患者の詳細な臨床像についてアンケートを行った。アンケート用紙はA3一枚とし、各症状についての有無の記入と自由記述欄とからなる構成とした。具体的には、患者の性別、生年月日、発症年齢、臨床症状(小児期の高アンモニア血症発作、成長・栄養状態、成人期の腎症状、肺症状、免疫異常、骨症状など)、診断内容、治療内容などである。

### (4) データの統計解析：

得られたデータから、遺伝子型と表現型との関連性、治療方法、長期予後などについて検討を行った。

## 4. 研究成果

### <対象>

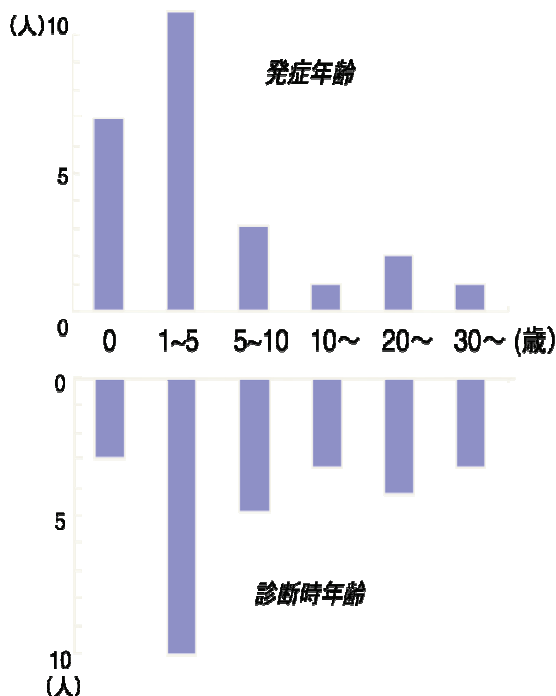
- a) 臨床的にLPIと診断された、34人の日本人LPI症例。各主治医からの依頼または当教室から申し出て主治医の了承を得た上で、遺伝子解析について各主治医から患者様への説明をし、文書での同意を得た。患者が小児(14歳以下)の場合にはその保護者に同意を得ている。34名のうち1名はLPIと異なる経過と尾思われたこと、遺伝子上も変異がみられなかったことから解析から除外した。また2名は無症状の症例であった。これらは同胞に罹患者がいたことから遺伝子解析を行い、診断に至っている。
- b) 上記対象のうち遺伝子解析にてSLC7A7に変異を同定し、臨床的にも症状を有する29人を対象に、各主治医にアンケート方式で臨床像の調査を依頼、27人で回答を得た(回答率93%)。

### <結果>

#### a) 患者プロフィール

患者の男女比は1:1、発症年齢は生後4ヶ月から38歳と個人差を認めた。実際にはグラフに示すように多くが乳幼児期の発症であった。成人発症とされている例のなかには幼少期の記録がないため詳細不明

のものも含まれている。一方診断時年齢は6ヶ月から41歳、診断までの期間は0ヶ月から37年、平均5.5年であった。また、28%の症例に近親婚を認めた。



### b) 臨床症状

臨床症状は多岐にわたる。欧米でのLPI症例で報告されている所見の一覧をアンケート用紙にまとめ、各症例での症状の有無について回答を得た。結果を表に示す。体重増加不良や低身長などの成長障害を8割近くに認めた。そのなかで、成人に達した症例群における最終平均身長とSDは男性  $155.8 \pm 8.0\text{cm}$ 、女性  $147.2 \pm 8.0\text{cm}$ 、体重は男性が  $45.0 \pm 10.8\text{kg}$ 、女性が  $40.2 \pm 4.4\text{kg}$  とやはり小柄であった。本疾患でたびたび認める蛋白嫌いの所見は9割の患者で確認された。ほか、高アンモニア血症による意識障害の既往は約半数にあった。てんかんや知的障害を合併した例では高アンモニア血症のエピソードがみられたこと、年少時診断例では知的障害の頻度が少ないことなどは、長期的な血中アンモニア高値が予後規定因子の一つであることを示唆するものであった。骨所見に関しては、頻回骨折例から軽度の骨粗鬆症まで様々であるが、低身長と相まって骨年齢の遅延も45%で観察された。免疫学的異常所見としては、ウイルス感染時の重症化、とくに麻疹罹患時の重症化を挙げた回答が3例あった。自己免疫疾患

		陽性数(A)	総回答数(B)	陽性率(A/B*100%)
身体所見	低身長	22	27	81.5
	体重増加不良	20	26	76.9
	薄い毛髪	9	23	39.1
	関節の過伸展	3	24	12.5
	肝腫大	17	24	70.8
	脾腫大	12	23	52.2
神経学的所見	高NH3血症による意識障害	15	27	55.6
	てんかん	8	27	29.6
	知的障害	15	26	57.7
	脳性麻痺症状	3	27	11.1
	筋緊張低下	4	24	16.7
	筋力低下	5	24	20.8
消化器所見	骨格筋萎縮	4	23	17.4
	蛋白嫌い	25	27	92.6
	嘔気、嘔吐発作	15	27	55.6
	反復する腹痛	4	25	16.0
	難治性の下痢	4	27	14.8
	肝実質障害	10	24	41.7
肺、腎所見	肺疾患(間質性肺炎)	3	25	12.0
	腎尿管管性アンドゥーシス	3	27	11.1
血液学的所見	末梢白血球減少	16	27	59.3
	貧血	12	26	46.2
	血小板減少	7	26	26.9
	出血傾向	4	27	14.8
	骨髄の白血球貪食所見	2	8	25.0
	骨髄細胞増多と巨核球の減少	3	8	37.5
骨所見	骨成熟の遅延	9	20	45.0
	骨折	5	23	21.7
	骨粗鬆症	10	19	52.6
	骨変形、変形性関節症	4	22	18.2
血液生化学所見	血中LDH上昇	24	26	92.3
	血中フェリチン上昇	16	23	69.6
免疫機能所見	易感染性	3	27	11.1
	ウイルス感染時の重症化	5	27	18.5
	免疫機能検査の異常	8	21	38.1
	自己免疫異常合併	3	24	12.5

(SLE など) 合併例も3例認めた。

血液生化学所見ではLDHの上昇が9割以上の例で、フェリチン上昇が7割で認められた。そのほか、自由記述において若年での脳梗塞発症例の報告も1例みられた。一方欧米で報告のあった膵炎やリンパ節へのアミロイド沈着、眼症状を呈した例はみられなかった。

### c) 維持療法

普段の蛋白摂取制限は72%の症例で行われていた。8割が効果ありと判定している。またアミノ酸補充については、医薬品として認可されていないにも関わらずL-シトルリンは70%もの症例で使用されており、やはり8割程度の主治医が効果ありと判定していた。Lアルギニンは54%で使用されていた。そのほか、安息香酸ナトリウム、フェニル酢酸、Lカルニチン、L-リジンの投与例があった。

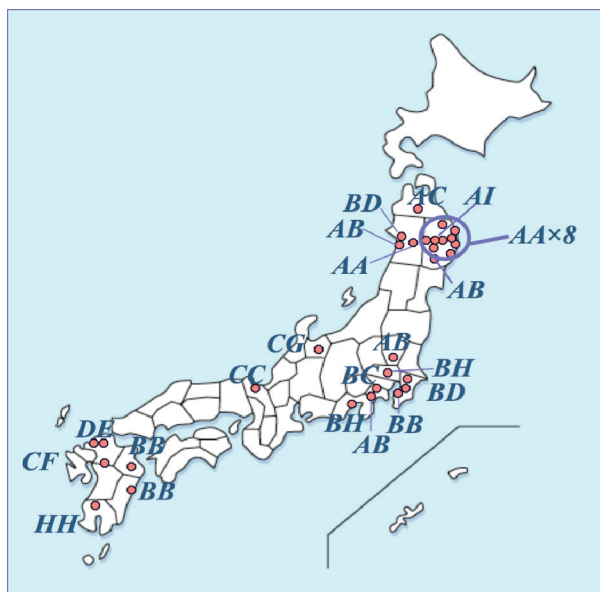
### d) 遺伝子解析

31例の遺伝子解析を試み、29例でSLC7A7遺伝子に変異を同定した。内訳は表に示す。アレル頻度は以前に東北地域での集積

が確認された R410X 変異が同様に最多であり、他ミセンス変異、スプライス異常、一塩基欠失など計 9 種が同定された。これらのなかで外国でも同定されているものは 1 種のみであり、8 種は本邦特有の変異であった。

本邦での変異の分布状況は図の如くである。R410X は関東～東北に集積する一方、S238F 変異は全国的に認められる。

mutation type	number of alleles	frequency (%)
A. R410X	25	43.1
B. S238F	13	22.4
C. 911+1G>A	7	12.0
D. 1284+1G>T	4	6.9
E. S489P	2	3.4
F. 1630 del C	1	1.7
G. 1673 del G	1	1.7
H. IVS3-IVS5del9.7kb	4	6.9
I. 1291 del CTTT	1	1.7
Total	58	100



e) 遺伝子型と臨床型との関連についての検討  
成長障害、肝脾腫、消化器症状、高アンモニア血症性の脳症、肝障害、腎障害、骨症状、神経症状、血液学的異常、免疫異常などの項目について各アレルごとの陽性頻度を算出した。アレル数が少ない変異も多いこともあり、統計学的有意差がでない項目が多かった。

しかし、その中で免疫学的異常については S238F 変異を持つ患者で有意に頻度が高かった。すなわち、S238F をホモまたはヘテロ接合で有する患者群 (A 群 : 9 名) では、免疫学的異常の割合が 88% (8 名) であったのに対し、S238F を有さない患者群

(B 群 : 18 名) では、免疫学的異常を呈する患者の割合は 11% (2 名) であり、両群間に (Fisher's exact probability test  $p=0.0035$ ) 有意差が得られた。ちなみに R410X ホモ接合の患者群 (C 群 : 9 名) でもその割合は 11% (1 名) であり、A 群との有意差がみられた。本変異については、将来的な免疫異常発症の予測因子となりうると推測される。

発症年齢、診断時年齢、治療期間などにおいて各群間での統計学的有意差は認めなかった (Mann-Whitney's U test)。

そのほか、治療方法、長期予後についての検討では統計学的に有意な結果は見いだせず、更なる症例の蓄積、および各症例における長期的な観察が必要であろうと思われた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[図書] (計 2 件)

### ①野口篤子、高橋勉

症例から学ぶ先天代謝異常症

『リジン尿性蛋白不耐症』(in press)

診断と治療社

### ②野口篤子、高橋勉

小児疾患診療のための病態生理 2

「リジン尿性蛋白不耐症」(in press)

東京医学社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 篤子 (NOGUCHI ATSUKO)

秋田大学・医学部・医員

研究者番号 : 70400497

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者