

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461532

研究課題名(和文) アミノ酸補充療法が適応になる自閉症・てんかん症候群のスクリーニング・診断系の確立

研究課題名(英文) Platform for conformation and screening of BCKDK deficiency; potentially treatable form of autism with epilepsy

研究代表者

坂本 修 (Sakamoto, Osamu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20333809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖ケト酸脱水素酵素キナーゼ(BCKDK)欠損症は自閉症にてんかんを合併する。罹患者の血中分岐鎖アミノ酸(バリン、イソロイシン、ロイシン)は著明に低下する。今回の研究は同症の生化学スクリーニング系、遺伝学的診断系の確立を目的とした。

- 1) BCKDK欠損症の遺伝子診断系の確立：従来型のサンガー法によるダイレクトシーケンスによる診断系を確立した。包括的診断系は全遺伝子のエクソーム解析を実施した。
- 2) 生化学的スクリーニング系の確立：新生児マススクリーニング集団(13万件)でロイシン+イソロイシンが45 nmol/L以下が3件あった。再検にて回復していたためいずれも栄養性の低下と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorders are a genetically heterogeneous. Reentry inactivating mutations in the BCKDK gene, which codes for the kinase responsible for the negative regulation of the branched-chain -keto acid dehydrogenase complex (BCKD), have been associated with a form. These patients and bckdk knockout mice showed abnormal plasma amino acid profiles (reduced BCAA values). These facts suggest that BCKDK deficiency might be screened biochemically. So we planned to establish the platform for conformation and screening of BCKDK deficiency.

Mutation analysis was performed to a case who showed slightly reduced BCAA values and marginal mental retardation. No substitution was found in BCKDK gene.

More than 130,000 newborns in Miyagi, Aomori and Yamagata prefecture were checked by newborn mass-screening among three years. The number of cases showed the low value of isoleucine + leucine (<45 nmol/L) was three. All of them was very low weight infants and showed normal value by second tests.

研究分野：小児科学

キーワード：分岐鎖アミノ酸・ 自閉症 新生児マススクリーニング

1. 研究開始当初の背景

自閉症とは社会性やコミュニケーション能力に欠陥を持った発達障害の1つであり、その25%にてんかんを合併する。遺伝的な要素が80~90%を占めると考えられている。遺伝的には異質性(heterogeneity)が大きく、これまで、自閉症の原因となる遺伝子として、SHANK2、IL1RAPL、NLGN4X、MECP2、KANTAL2、CHD8や、コピー数多型(CNV)が報告されている。先天代謝異常領域でも遅発型アルギニノコハク酸尿症やクレアチントランスポーター異常症などでは自閉症様症状を呈することが知られている。

2012年、自閉症にてんかんを合併する症例においてアミノ酸代謝に関連する酵素(分岐鎖ケト酸脱水素酵素キナーゼ; BCKDK)に障害があることが報告された(Novarino G, et al. *Sicence* 338:394-397, 2012)。

BCKDK 欠損症においては他の自閉症・てんかん症候群にはない特徴として、罹患者およびモデルマウスの血中アミノ酸プロファイルにおいて分岐鎖アミノ酸(BCAA; 具体的にはバリン、イソロイシン、ロイシン)の著明な低下を呈することが報告されている。BCKDK 欠損症患者でこのような特徴的な血中アミノ酸プロファイルを呈することは、臨床の場としては生化学的にスクリーニングができることを意味する。

また、BCKDK 欠損症モデルマウスにおいて早期からの食餌への BCAA 補充でてんかんの発症を予防できる可能性が示唆されている。BCAA は健康補助食品として入手が可能であり、臨床の場でも他の適応症(「肝不全」)ながら使用されていて、安全性が確立されている。つまり、これらの特徴は早期診断ができれば、早期から疾患特異的な治療が可能であることを意味する。

本邦では生まれてくる新生児全員に対してマス・スクリーニングが実施されている。マス・スクリーニング測定項目として「ロイシ

ン」がメイプルシロップ尿症(BCKDH 欠損症)の診断のためになされている(この場合はロイシン高値を指標としている)。従来の測定法(ガスリー法)では、「高値」であることを検出することは可能であったが、「低値」であることの検出は不能であった。しかしながら、現在は新生児マス・スクリーニングにタンデム質量計が導入されるにおよび「低値」であることの検出も可能となった。よってこの系を利用することで、早期診断ができる可能性がある。

2. 研究の目的

今回の研究は、新生児マススクリーニングのデータを用いて BCKDH 欠損症できる可能性があるか、できた場合に確定診断のありかたに関して検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) BCKDK 欠損症の遺伝子診断系の確立

BCKDK 欠損症の確定診断のために、従来型のダイレクトシーケンスによる診断系を確立する。

BCKDK 欠損症の個別の診断系の確立ののちには、BCKDK 欠損症と同様に「自閉症・てんかん症候群」を呈し、疾患個別性の高い治療法を有する疾患(アルギニノコハク酸尿症、クレアチントランスポーター欠損症など)を含めた包括的遺伝子診断系の確立を考える。

2) 生化学的スクリーニング系の確立

対象集団として「新生児マススクリーニング集団」および「自閉症・てんかん症候群の集団」より BCAA の低値を指標にピックアップし、上記の方法での確定診断を実施し、一般集団での頻度、患者集団での頻度を算出する

4. 研究成果

1) BCKDK 欠損症の遺伝子診断系の確立

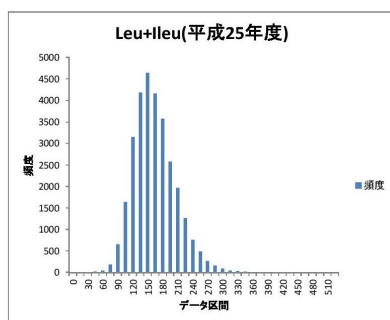
従来型のサンガー法による、ダイレクトシークエンスによる診断系を確立した。自閉傾向に血中 BCAA 軽度低下を呈した 1 例を解析したが、変異は認められず、栄養性の欠乏と診断した。

包括的診断系は、診断パネル系では候補遺伝子が増えた際の拡張性に乏しいことから、全遺伝子のエクソーム解析にて実施している。

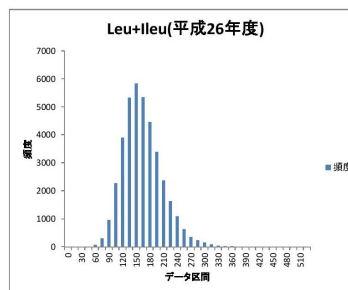
2) 生化学的スクリーニング系の確立

「新生児マススクリーニング集団」に関して H25 年度(29957 件)、H26 年度(38432 件)、H27 年度(H28 年 1 月まで;32222 件)のロイシン+イソロイシンを検討した。上記値が 45 nmol/L 以下の例が H25 年度 2 件、H26 年度 1 件、H27 年度 0 件であった。いずれも低出生体重児であり、再検にて回復していたため、栄養性の低下と考えられた。

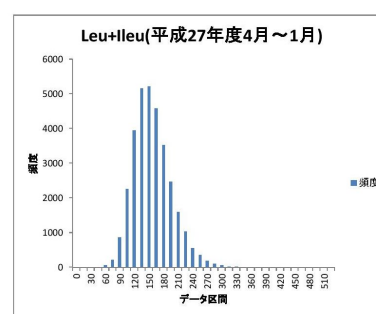
データ区間	頻度
0	0
15	0
30	2
45	15
60	36
75	194
90	651
105	1637
120	3146
135	4179
150	4644
165	4165
180	3584
195	2587
210	1969
225	1265
240	765
255	488
270	265
285	168
300	90
315	46
330	32
345	16
360	10
375	4
390	4
405	2
420	2
435	0
450	0
465	0
480	0
495	0
510	1
次の級	0



データ区間	頻度
0	0
15	0
30	1
45	10
60	67
75	287
90	946
105	2259
120	3898
135	5226
150	5847
165	5343
180	4453
195	3290
210	2357
225	1622
240	1096
255	624
270	359
285	225
300	153
315	75
330	39
345	19
360	16
375	7
390	7
405	4
420	1
435	0
450	1
465	0
480	0
495	0
510	0
次の級	0



データ区間	頻度
0	0
15	0
30	0
45	7
60	62
75	219
90	859
105	2257
120	3937
135	5161
150	5205
165	4585
180	3533
195	2466
210	1566
225	1034
240	545
255	348
270	188
285	102
300	57
315	25
330	16
345	11
360	6
375	5
390	2
405	2
420	3
435	0
450	0
465	0
480	0
495	1
510	0
次の級	0



「自閉症・てんかん症候群の集団」に関して、自施設での 5 年間のアミノ酸測定のべ 2310 件の再検討では、イソロイシンが基準値未満のものが 151 件であった。うち治療で蛋白摂取制限を行っているもの(アミノ酸代謝異常・有機酸代謝異常症)を除くとのべ 9 件(8 症例)であった。さらにこの中でバリンおよびロイシンも基準値未満のものはのべ 4 件(3 症例)であった。これらのアミノ酸のパターンを検討したところ BCAA のみではなく、フェニルアラニン、メチオニンなどの他の必須アミノ酸も低値であり、栄養性の低下と考えられた。

2012 年に BCKDK 欠損症による自閉症 3 例が報告されたのちに、同疾患の報告は 2014 年に

2 症例のみであり、かなり稀な疾患であると
考えらえる。そのため、自閉症やてんかんの
発症者から生化学的もしくは遺伝的に診断す
ることは可能ながら、効率が悪いことが予測
された。

新生児マススクローニング系においては 3
年間で 130,568 人がスクリーニングされた。
マススクリーニングではメイプルシロップ尿
症の診断のためロイシン+イソロイシンの測
定が標準的に実施されている。それを利用す
ること(つまり新たな測定項目の導入ではな
く、指標のみの導入)で上記値が 45 nmol/L
以下のものを 3 件ピックアップした。いずれ
も低出生体重児であり、再検にて回復してい
たため、栄養性の低下と考えられた。今回、
診断できた例はないものの、スクリーニング
系として、全国的に導入できる可能性が示唆
された。今後、栄養性のものの否定の高率化
のためには、既測定物質との比(例:フェニ
ルアラニン/(イソロイシン+ロイシン)>1)
の導入などが考えられる。

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)

[雑誌論文](計 9 件)

- 1) Sakamoto O, et al.: Phenotypic
Variability and Newly Identified
Mutations of the IVD Gene in Japanese
Patients with Isovaleric Acidemia. *Tohoku
J Exp Med.* 236:103-106, 2015
doi.org/10.1620/tjem.236.10. 査読あり
- 2) 坂本修、市野井那津子、呉繁夫: タンデ
ムマスによる新生児マススクリーニングで
発見されたコバラミン代謝異常症 C 型(CbIC)
の一例 *日本マススクリーニング学会誌*
25:83-87, 2015 査読あり
- 3) 大浦敏博、坂本修: シトリン欠損による
新生児肝内うっ滞症(Neonatal Intrahepatic
Cholestasis caused by Citrin Deficiency,

NICCD)の診断と治療 *日本マススクリーニン
グ学会誌* 25:11-15, 2015 査読なし

- 4) Vatanavicharn N, Liammongkolkul S,
Sakamoto O, et al.: Clinical
characteristics and mutation analysis of
propionic acidemia in Thailand. *World
Journal of Pediatrics* 10:64-68, 2014 doi:
10.1007/s12519-014-0454 -4. 査読あり
- 5) Sato H, ..., Sakamoto O, et al.: Early
replacement therapy in a first Japanese
case with autosomal recessive guanosine
triphosphate cyclohydrolase I deficiency
with a novel point mutation. *Brain Dev.*
36:268-271, 2014 doi:
10.1016/j.braindev.2013.04.003. 査読あ
り
- 6) Kimura M, Wakayama Y, Sakamoto O, et
al.: Successful treatment of cardiac
failure due to cardiomyopathy in propionic
acidemia by cardiac resynchronization
therapy and hemodialysis in a young adult.
Open J Pediatr 4:79-83, 2014 doi:
10.4236/ojped.2014.41011. 査読あり
- 7) Munakata M, Togashi N, Sakamoto O, et
al.: Reduction in glutamine/glutamate
levels in the cerebral cortex after
adrenocorticotrophic hormone therapy in
patients with west syndrome. *Tohoku J Exp
Med.* 232:277-283, 2014
doi.org/10.1620/tjem.232.277. 査読あり
- 8) Kitazawa H, ..., Sakamoto O, et al.:
Interstitial lung disease in two brothers
with novel compound heterozygous ABCA3
mutations. *Eur J Pediatr.* 172:953-957,
2013 doi: 10.1007/s00431-013-1977-8. 査
読あり
- 9) Imataka G, Sakamoto O, et al.: Novel
c.2216T > C (p.I739T) mutation in exon 13
and c.1481T > A (p.L494X) mutation in exon
8 of MUT Gene in a female with

methylmalonic acidemia. Cell Biochem
Biophys. 67:185-187, 2013 doi:
10.1007/s12013-013-9532-9. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

1)坂本修、市野井那津子、呉繁夫： タンデ
ムマスによる新生児マススクリーニングで
発見されたコバラミン代謝異常症C型(Cb1C)
の一例 日本先天代謝異常学会(平成27年11
月12-14日、大阪国際会議場、大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 修 (SAKAMOTO, Osamu)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20333809

(2)研究分担者

大浦 敏博 (OHURA, Toshihiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10176828

植松 貢 (UEMATSU, Mitsugu)

東北大学病院・講師

研究者番号：90400316

(3)連携研究者

なし