

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860818

研究課題名(和文)先天性ピリミジン代謝異常症の診断・治療体制の確立

研究課題名(英文)Diagnostic method for inborn errors of pyrimidine metabolism

研究代表者

中島 葉子 (NAKAJIMA, Yoko)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70598309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天性ピリミジン代謝異常症の臨床像は多様であり、5FU関連抗癌剤投与で副作用を呈することが知られているが、未だ報告数は少なく疾患頻度や遺伝子変異等の詳細は不明である。本研究では、UPLC-MS/MSを用いた尿中ピリミジン代謝物網羅的定量法を確立し、遺伝子検査によるピリミジン代謝異常症の診断システムを構築した。遺伝子解析の結果、 β -ウレイドプロピオナーゼ欠損症では全例でUPB1遺伝子R326Q変異を有しており、うち70%の症例は同変異のホモ接合であった。健常人の検討では日本人におけるR326Qの保因者率は2%であり推定される本疾患頻度は少なくないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inborn errors of pyrimidine degradation pathway have wide clinical aspects and show very severe side effects of 5-fluorouracil related anticancer drugs. However, the details of these diseases, such as disease frequency or genetic mutations are unclear, because the number of reported patients is limited.

In this study, we established the diagnostic system for inborn errors of pyrimidine degradation pathway by simultaneous analysis of urinary pyrimidine metabolites using UPLC-MS/MS followed by genetic analysis. The genetic analysis revealed that UPB1 R326Q mutation was identified in all patients with beta-ureidopropionase deficiency and 70% of these patients were homozygote of this mutation. Population study showed that 2% of healthy Japanese were carrier of the R326Q mutation. This result showed that beta-ureidopropionase deficiency is not as rare as generally considered in Japan.

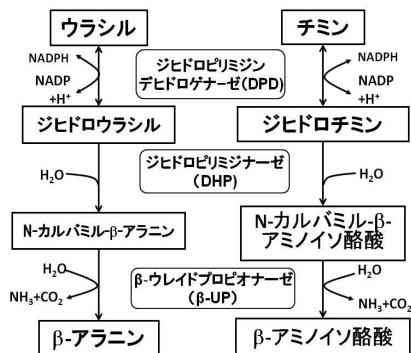
研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ピリミジン代謝異常症 尿中ピリミジン代謝物分析 5-フルオロウラシル ハイリスクスクリーニング
UPLC-MS/MS 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

先天性ピリミジン代謝異常症は、核酸の重要な構成成分であるウラシル、チミンなどのピリミジン塩基を分解する過程に先天性酵素欠損を有する疾患群で(図1)、臨床像は多彩で無症状例からてんかん、知能障害、自閉症などを示すことが知られている。これらの症状は重症度も様々で特異性に欠け、簡便な検査法が無いことから診断が難しく、原因不明の神経疾患などとして経過観察されている例も多数あることが予想される。

図1:ピリミジン代謝経路



また、5-FUなどのピリミジン系抗癌剤もピリミジン分解経路で分解されるため、この経路の代謝異常症患者に同抗癌剤が投与されれば致命的な副作用を呈する可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では、ピリミジン代謝異常症の網羅的スクリーニング法の確立、各酵素の責任遺伝子検査等による確定診断、確定診断された症例の臨床像の集約的解析、5-FU 致死性副作用の発現予防のための投与前スクリーニング検査の検討を行い、ピリミジン代謝異常症に対する総合的診断体制を確立する。

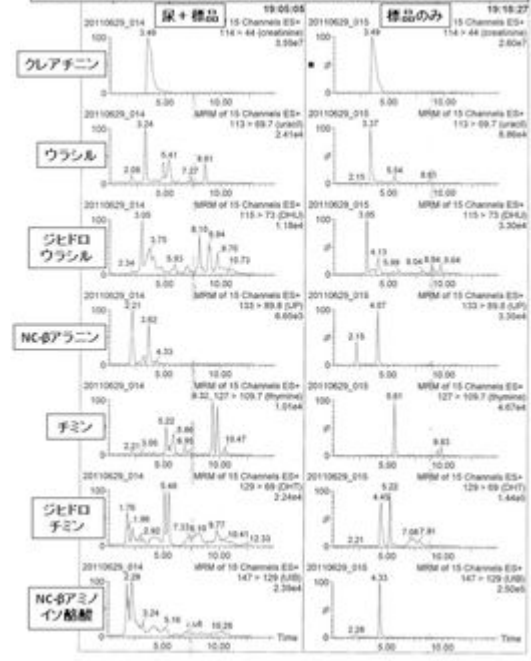
3. 研究の方法

1) HPLC-MS/MS を用いたスクリーニングから遺伝子診断による確定診断に至る総合的症例発見システムの構築:

ピリミジン代謝異常症の診断には GC/MS を用いたウレアーゼ処理法による尿中代謝プロ

ファイル検査が有用であるが、測定時間、前処置などの面で簡便とは言えない。本研究では UPLC にタンデム型質量分析計を接続した機器を用いて尿中ピリミジン分解経路関連 6 物質のピーク同定を可能とした(図2)。これを用いてピリミジン代謝異常症 3 疾患の一斉分析スクリーニング法を確立し、これまでの代謝プロファイル検査と組み合わせることで、さらに多数の測定検体を正確に測定できる検査システムを確立した。

図2: LC-MS/MSを用いたピリミジン関連物質一斉分析



この検査システムを用いて、原因不明の神経症状を呈する患者などに対してハイリスクスクリーニングとして尿中ピリミジン代謝物分析を施行し、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) 欠損症、ジヒドロピリミジンナーゼ (DHP) 欠損症、β-ウレイドプロピオナーゼ (β-UP) 欠損症の尿分析パターンを示した症例に関して、各酵素の責任遺伝子解析にて確定診断を行う。

4. 研究成果

尿中又は尿濾紙中のウラシル、チミンおよびその代謝産物である ジヒドロウラシル、ジヒドロチミン、N-カルバミル-β-アラニン、N-カルバミル-β-アミノイソ酪酸とクレア

チニンをタンデム質量分析計のMRMモードで検出した。UPLCの条件はODSカラムの1種であるACQUITY UPLC HSS T3カラムを使用し、溶媒は1%ギ酸水溶液とアセトニトリルとのグラジエント分析を行うことでこれらの物質を同時に分離し、各物質のピーク形状良好なクロマトグラムを得た。各分析物質に対してそれぞれ対応する安定同位体でラベルしたISを用いることで各物質の検量線は良好な直線性を示した。研究期間中に尿中ピリミジン分析を施行した症例は142例、国内外の施設で代謝プロファイル検査等によりスクリーニングされ遺伝子検査依頼があった症例は、-UP欠損症34例(うち日本人14例)、DHP欠損症6例(うち日本人3例)、DPD欠損症1例であった。本国以外の症例はマレーシア1症例を除きすべて中国人症例だった。解析の結果、-UP欠損症では全症例でUPB1遺伝子R326Q変異を有しており、うち70%は同変異のホモ接合であった。健常人の検討では日本人のR326Qの保因者率は2%であった。DHP欠損症は全例コンパウンドヘテロ変異で、6例中3例で1アリルにDPYS遺伝子Q334Rを認めた。DPD欠損症は尿中ピリミジン分析では疾患パターンを示したが、遺伝子変異は検出されず確定診断に至らなかった。研究期間中に当施設では本疾患を発見できなかったが今後も継続的に疑い症例の尿中ピリミジン分析スクリーニングを施行していく予定である。

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4件)

Nakajima Y, Meijer J, Zhang C, Wang X, Kondo T, Ito T, Dobritzsch D, Van Kuilenburg AB.
Altered Pre-mRNA Splicing Caused by a Novel Intronic Mutation c.1443+5G>A in the

Dihydropyrimidinase (DPYS) Gene. 査読あり

Int J Mol Sci. 2016 Jan 12;17(1) doi: 10.3390/ijms17010086

前田 康博, 中島 葉子, 伊藤 哲哉
UPLC-MS/MSによるピリミジン代謝異常症スクリーニング法について。査読無し

JSBMS Letters (1881-5464)40巻1号 Page4-10 2015.03

Nakajima Y, Meijer J, Dobritzsch D, Ito T, Meinsma R, Abeling NG, Roelofsen J, Zoetekouw L, Watanabe Y, Tashiro K, Lee T, Takeshima Y, Mitsubuchi H, Yoneyama A, Ohta K, Eto K, Saito K, Kuhara T, van Kuilenburg AB.

Clinical, biochemical and molecular analysis of 13 Japanese patients with β -ureidopropionase deficiency demonstrates high prevalence of the c.977G > A (p.R326Q) mutation. 査読あり

J Inherit Metab Dis. 2014 Sep;37(5):801-12

Meijer J, Nakajima Y, Zhang C, Meinsma R, Ito T, Van Kuilenburg AB.

Identification of a novel synonymous mutation in the human β -ureidopropionase gene UPB1 affecting pre-mRNA splicing. 査読あり

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2013;32(12):639-45. doi: 10.1080/15257770.2013.847189.

[学会発表](計6件)

中島葉子, Judith Meijer, 張春花, 渡邊順子, 久原とみ子, 伊藤哲哉, André B.P. van Kuilenburg

-ウレイドプロピオナーゼ欠損症30例における分子遺伝学解析: 東南アジアにおけるコモン変異 R326Qの発見

日本人類遺伝学会 2015年10月14-17日 東京

前田康博, 後藤加奈, 中島葉子, 前田葉子, 堀田祐志, 片岡智哉, 川出義浩, 伊藤哲哉, 木村和哲

UPLC-MS/MSによるピリミジン塩基代謝物の定量によるピリミジン代

謝異常症スクリーニング
日本医用マススペクトル学会 2015
年9月17日 浜松

Yoko Nakajima

Clinical, biochemical and molecular
analysis of 30 children with
-ureidoproionase deficiency
demonstrates high prevalence of
the c.977G>A (p.R326Q)
mutation

16th international Symposium on
Purine and Pyrimidine Metabo-
lism in Man
2015 7 June New York

Yoko Nakajima, Judith Meijer,
Chunhua Zhang, Yoriko Watanabe,
Tomoko Lee, Hiroshi Mitsubuchi,
Kaoru Eto, Tomiko Kuhara,
Tetsuya Ito, Andre van Kuilenburg
High prevalence of the mutation
R326Q in 30 children with
-ureidoproionase deficiency in East
Asia

日本小児神経学会 2015年5月30
日 大阪

中島葉子、伊藤哲哉

ピリミジン代謝異常症のハイリスク
スクリーニング in Aichi
先天性ピリミジン代謝異常症の診断
と5-フルオロウラシル薬物代謝に関
する研究

九州先天代謝異常症ネットワーク会
議 2015年5月9日 熊本

中島葉子、Judith Meijer, Doreen
Dobritzsch, 渡邊順子、久原とみ子、
三淵浩、李知子、衛藤薫、伊藤哲哉、
Andre van Kuilenburg

ウレイドプロピオナーゼ欠損症の
臨床的・生化学的・分子生物学的検
討と p.R326Q 変異頻度

日本先天代謝異常学会 2014年11
月14日 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 中島葉子 (NAKAJIMA Yoko)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号: 70598309

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：