HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	日本人における遺伝性葉酸吸収不全症の研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	戸澤, 雄介
Description	配架番号：2544
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14079号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77920
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Tozawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　戸澤　雄介

学 位 論 文 題 名
日本人における遺伝性葉酸吸収不全症の研究
(Studies on hereditary folate malabsorption in Japanese patients)

【背景と目的】遺伝性葉酸吸収不全症（hereditary folate malabsorption; HFM）は葉酸の輸送体 proton-coupled folate transporter（PCFT）をコードする *SLC46A1* の機能喪失型変異に起因する原発性免疫不全症の一種であり，常染色体劣性遺伝性疾患である．現在までに 35 家系 25 種類の HFM 原因遺伝子変異が報告されているが，ほとんどは孤発例であり，発症は非常に稀である．国内では当科での *SLC46A1* 遺伝子の解析結果に基づく HFM 診断確定例の症例報告が 1 例のみである．同症例の PCFT 発現、及び機能解析とその後の新規 HFM 患者 3 名の解析を行い，責任遺伝子変異の特定と機能解析を行うことを目的とした．
【対象】国内の非血縁家系の 4 患者を対象とした．いずれも日本人であった．（患者 1）女児，生後 3 か月時に持続咳嗽と体重増加不良が出現し，貧血，血小板減少，低ガンマグロブリン血症があり，血清葉酸値は測定感度未満だった．骨髄検査で巨赤芽球性貧血あり，ニューモシスチス肺炎を合併していた．HFM が疑われ folinic acid の静注で症状，血液検査所見とも改善した．（患者 2）女児．生後 3 か月頃に反復性嘔吐，成長障害が出現した．貧血，血小板減少，低ガンマグロブリン血症があり，血清葉酸値は測定感度未満だった．骨髄検査で巨赤芽球性貧血があり，HFM が疑われた．Folinic acid の静注と内服を併用し，症状，血液検査所見とも改善した．（患者 3）男児．在胎 35 週 4 日で出生したが，血液検査で血球系の異常はみられなかった．生後 2 か月を過ぎて，肺炎，胸膜炎，呼吸不全，体重増加不良あり，小児集中治療室入院し，人工呼吸管理を受けた．汎血球減少と低ガンマグロブリン血症あり，血清葉酸値は測定感度未満だった．骨髄検査で巨赤芽球性貧血があり，HFM を考え folic acid を静注投与し，汎血球減少は改善したがびまん性肺胞出血による難治性呼吸不全が出現し，人工呼吸管理が続いた．その後は状態改善し，folic acid は減量した．以上の患者 1，2，3 は経静脈的に葉酸製剤投与後に成長，発達が正常化した．（患者 4）女児．成長発達歴に特記なし．生後 8 か月で肺炎とけいれん発作が出現した。軽度貧血あり，血清葉酸値は測定感度未満だったが，低ガンマグロブリン血症や血小板減少はみられなかった．骨髄検査で巨赤芽球性貧血だった．HFM が疑われ，folic acid 経口投与が始まった．肺炎，貧血は回復したが，神経学的発達が停滞し，髄液葉酸濃度は測定感度未満だった．そこで folinic acid の経口内服に切り替えたところ，髄液葉酸濃度が上がり始め，けいれん発作が止まり，神経学的発達の改善がみられた．
【方法】患者 1, 2, 3, 4 において *SLC46A1* の DNA や cDNA レベルの遺伝子解析を行なった．アミノ酸置換を生じる変異に関しては，その変化が蛋白の構造や機能に与える影響を各種ソフトウェアで予測した．各変異が蛋白発現に及ぼす影響の評価に関しては，各変異体の発現ベクターを作成し，HeLa 細胞に各変異体と導入効率のマーカーである pEGFP ベクターを共導入し，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 に各変異体と導入効率のマーカーである CD20 発現ベクターを共導入し，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。
【結果】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．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．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し，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．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.ここまでの結果から,患者3,4はエキソン解析に加え,初めから患者1,2で共通していた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．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．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.

【考察】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みられるホットスポットの可能性がある．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，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と考えられる．新奇変異と考えられたF392Vを持つ患者4は他の患者に比べて成長障害がなく、発症が遅い,貧血などの症状が軽いという機能残存を伺わせる変化だったが,MTX取り込み能は，他の変異体と同様にほぼ欠如していた.MTX-FITCを用いた解析はより安全かつ簡便に施行できる一方で，MTX-FITCの取り込み能を葉酸輸送能に代用しているため，わずかに機能が残存している場合の葉酸輸送能を検出可能かどうかが課題であり，更なる検討が必要である.

【結論】日本人の非血縁関係のHFM患者4名の解析を行い，deep intronic mutation c.1166-285T＞Gが全例に共通する事を見出し,発現解析からPCFTの発現が欠如しており,MTX－FITCの取り込み能の解析から，PCFTの葉酸輸送能が欠如していることを示した.