



Title	日本人における遺伝性葉酸吸収不全症の研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14079
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77921
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Tozawa.pdf



学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

戸澤 雄介

学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

戸澤 雄介

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
患者背景	10 頁
方法	13 頁
結果	27 頁
考察	41 頁
結論	44 頁
謝辞	45 頁
利益相反	46 頁
引用文献	47 頁

【発表論文目録及び学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yusuke Tozawa, Shima Said Mohamed Ali Abdrabou, Natsuko Nogawa-Chida, Ritsuo Nishiuchi, Toshiaki Ishida, Yuichi Suzuki, Hideki Sano, Ryoji Kobayashi, Kenji Kishimoto, Osamu Ohara, Kohsuke Imai, Takuya Naruto, Kunihiro Kobayashi, Tadashi Ariga, Masafumi Yamada

A deep intronic mutation of c.1166-285T>G in *SLC46A1* is shared by four unrelated Japanese patients with hereditary folate malabsorption (HFM). *Clinical Immunology*, 2019 Sep 5:108256. [Epub ahead of print]

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yusuke Tozawa, Masafumi Yamada, Ritsuo Nishiuchi, Shima Said Mohamed Ali Abdrabou, Natsuko Nogawa, Ryoji Kobayashi, Osamu Ohara, Kunihiro Kobayashi, Tadashi Ariga.

The same deep intronic mutation of c.1166-285T>G in *SLC46A1* is responsible for hereditary folate malabsorption in two unrelated Japanese patients.

The 2017 Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2017.9.11-14, Edinburgh.

2. 戸澤雄介, 山田雅文, 西内律雄, Abdrabou Shima Said Mohamed Ali, 野川奈津子, 小林良二, 小原收, 小林邦彦, 有賀正

先天性葉酸吸収不全症の2例

第49回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2017.10.21-22, 金沢

3. 戸澤雄介, Abdrabou Shima Said Mohamed Ali, 野川奈津子, 西内律雄, 石田敏章, 佐野秀樹, 鈴木雄一, 小林良二, 小原收, 成戸卓也, 今井耕輔, 小林邦彦, 有賀正, 山田雅文

新たに診断した残存活性を有する遺伝性葉酸吸収不全症例と既報3症例との比較検討

第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会, 2019.2.3, 東京

要旨

【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泡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見られるホットスポットの可能性はある。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。新規変異と考えられた 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は課題であり、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。

【略語表】

Ab	Antibody
CSF	Cerebrospinal fluid
DDW	Distilled deionized water
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
HFM	Hereditary folate malabsorption
LCL	Lymphoblastoid cell lines
MCV	Mean corpuscular volume
MTX	Methotrexate
N. A.	Not analysed
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCFT	Proton-coupled folate transporter
PHA	Phytohemagglutinin
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
TBST	Tris buffered saline with 0.1% Tween®20

【緒言】

1. 葉酸の働きと吸収機構

葉酸は水溶性ビタミンの一種で，小腸から吸収されると 5-methyl tetrahydrofolate (5-MTHF)，THF に変換され，補酵素として働く．プリン，ピリミジン，メチオニンの合成に関与しており，DNA 合成，細胞分裂，アミノ酸代謝に重要な働きを起こす (Ulrich et al., 2008)．葉酸は哺乳類では生体内で生合成されないため，その供給は食物中に含まれる葉酸に依存している．

2. 原発性免疫不全症と遺伝性葉酸吸収不全症 (Hereditary folate malabsorption: HFM)

原発性免疫不全症は，遺伝子異常を背景に免疫系の異常が起こり，各種病原性微生物への易感染性を生じる疾患である．また，免疫学的脆弱性から通常は感染症の原因とならないような微生物による日和見感染症を来すこともある．近年の遺伝子解析技術の向上と，次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析によって，疾患原因遺伝子が次々と同定され，病態解明に長足の進歩がみられるようになった．2017 年に発表された，International Union of Immunodeficiency Societies による原発性免疫不全症は 9 つのカテゴリーに分類されており，(1) (重症) 複合免疫不全症 (細胞免疫および液性免疫の異常)，(2) 特徴的な所見や症候群を呈する複合免疫不全症，(3) 抗体産生不全症，(4) 免疫調節の障害，(5) 食細胞の数の減少あるいは機能不全症，(6) 内因性あるいは自然免疫異常，(7) 自己炎症性疾患，(8) 補体欠損症，(9) 原発性免疫不全症の表現型をとる疾患に分かれている (Picard et al., 2018)．

HFM はこの 9 つの分類カテゴリーのうち (2) 特徴的な所見や症候群を呈する複合免疫不全症に含まれ，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常染色体劣性遺伝性疾患である (Kronn and Goldman, 2017; Qiu et al., 2006; Zhao et al., 2007)．PCFT は上部小腸で発現しており，低 pH 環境下で水素イオンと共に葉酸を細胞内に取り込む分子である．また，PCFT は脈絡膜にも発現しており，葉酸の血液から髄液への移行に関与する．一方で血球系での PCFT の発現レベルは低く，発現の組織特異性がみられる．

HFM 患者では，葉酸の腸管からの吸収障害により葉酸が欠乏する生後 1, 2 か月から症状が出現することが多く，巨赤芽球性貧血，血小板減少，白血球

減少がみられ、汎血球減少となることもある。貧血は多くは大球性だが、慢性的な体調不良、合併症として感染症がある場合、鉄分不足があると正球性となり得る。また、免疫系の異常としては、T, B 両細胞の機能異常を有する複合免疫不全と、それに伴う低 γ グロブリン血症を呈する事が多いが、その程度は多彩である (Borzutzky et al., 2009; Erlacher et al., 2015; Zhao et al., 2017)。サイトメガロウイルス感染症やニューモシスチス肺炎などの重症感染症を生じることが多く、診断前の死亡例も報告されている (Jebnoun et al., 2001)。嘔吐、経口摂取不良、下痢などの消化管症状、体重増加不良も出現しやすい。こうした症状は重症複合免疫不全症の状態に似ており、誤診する恐れがある。また、葉酸の髄液移行障害による神経症状も HFM の特徴である。発達の遅れの他に、末梢神経障害、運動障害、運動失調、行動異常、認知障害、神経発達遅滞など様々な症状が出現する。早期に適切な治療が行われないと、多くの患者は重症で難治性のけいれんを起こし神経学的後遺症をきたす (Geller et al., 2002; Meyer et al., 2010; Shin et al., 2011)。

HFM の治療としては、葉酸製剤の筋注や静注が著効し、造血幹細胞移植は無効である。特に貧血、白血球減少、血小板減少、免疫異常、腸管症状は葉酸製剤の経静脈投与や大用量の経口内服によって早期に改善する。しかし、脳脊髄液中の適切な葉酸濃度に到達するには、複数回のモニタリングが必要になる (Torres et al., 2015)。乳児から 2 歳までの幼児はおよそ 100 nmol/l が正常範囲だが、5 歳までは 75 nmol/l になり、19 歳までは 65 nmol/l になる (Verbeek et al., 2008)。一般的には経口内服ではこの濃度まで達成するのは困難である。しかし、この脳脊髄液中濃度に到達しなくても正常発達を確認できる例もあり、治療目標については議論のあるところである。また、葉酸の形態は複数あるが、folic acid は葉酸のレセプターと強固に結合し、その結果 5-MTHF を血液から脳脊髄液へ輸送するレセプターを不活化すると推測されるため推奨されていない (Kamen and Smith, 2004)。望ましいものは主に体内で存在する 5-MTHF だが、静注製剤が存在しないため、本邦では folinic acid、レボホリナート等が候補に挙がる。

現在までの報告では 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、非常に稀な疾患である (Aluri et al., 2018; Atabay et al., 2010; Borzutzky et al., 2009; Diop-bove et al., 2013; Erlacher et al., 2015; Kishimoto et al., 2014; Lasry et al., 2008; Mahadeo et al., 2010, 2011; Manea et al., 2018; Meyer et al., 2010; Min

et al., 2008; Qiu et al., 2006; Shin et al., 2010, 2011; Tan et al., 2017; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2007). 国内からは HFM 疑いの数例の症例報告のみだったが，当科での *SLC46A1* 遺伝子の解析結果に基づく HFM 診断確定例の報告を 2014 年に行っている (Kishimoto et al., 2014). その後も 3 例の国内症例の相談があり，当科で解析を行った．

3. PCFT に関する背景知識

PCFT は葉酸のトランスポーターであり，分子量 459 の 12 回膜貫通型タンパク質である．PCFT は特に十二指腸，空腸上部に多く発現しており，腸管から血液内への葉酸取り込みに作用している．また，PCFT は脈絡叢にも発現しており，血液から脳脊髄液への葉酸の移行にも働いている．PCFT は低 pH 下で葉酸に対し高い輸送活性を示し，至適 pH は 5.0-5.5 と考えられる．pH の上昇に伴い輸送活性は顕著に低下し，生理的 pH である pH 7.4 の環境下では輸送活性はほとんど認めない (Zhao et al., 2017)．PCFT は細胞内外の H^+ の濃度勾配によって葉酸を輸送する．PCFT は酸化型葉酸に加え，還元型葉酸の 5-MTHF や抗葉酸剤の methotrexate (MTX) などの輸送に関わる．葉酸のトランスポーターは他にも reduced folate carrier (RFC), folate receptor alpha ($FR\alpha$) がある．RFC はユビキタスに発現しており，PCFT の分布している十二指腸，空腸上部にも存在するが，PCFT と異なり生理的 pH で最も高い輸送活性を示し，低 pH 下ではその活性はほとんど見られない (Hou and Matherly, 2014)．このため，主に腸管での葉酸吸収を担っているのは PCFT と考えられている． $FR\alpha$ は脈絡叢に主に分布し，脳脊髄液への移行に際し PCFT と協調して働いていると考えられている．

【患者背景】

HFM 患者 4 名はすべて孤発例で、相互の血縁関係がない日本人だった。両親はいずれも健康だった。

患者1：女兒，在胎37週1日，出生体重2272gとlight for dates児で，以前論文に症例報告している(Kishimoto et al., 2014)。生後3か月から持続咳嗽，体重増加不良が出現した。血液検査では，貧血，血小板減少，低ガンマグロブリン血症，および血清葉酸値が測定感度未満であることが判明した。骨髓検査では巨赤芽球性貧血の所見であり，胸部画像検査，喀痰PCR検査の結果からニューモシスチス肺炎と診断した。以上からHFMが疑われfolinic acidの静注により，症状は改善し，巨赤芽球性貧血，低ガンマグロブリン血症も改善した。

患者2：女兒で出生歴に特記異常は見られなかった。生後3か月頃に反復性嘔吐および成長障害が出現した。血液検査では貧血，血小板減少，低ガンマグロブリン血症があり，血清葉酸値が測定感度未満だった。骨髓検査により，巨赤芽球性貧血が判明した。folinic acidの静注と内服で症状が改善し，巨赤芽球性貧血，血小板減少，低ガンマグロブリン血症も改善した。

患者3：在胎35週4日で出生した男児で出生時の病的所見なく，出生時に施行した血液検査では正常な血球数だった。しかし生後2ヵ月で，胸水を伴う肺炎による呼吸不全と体重増加不良が出現したため，小児集中治療室に入院し，人工呼吸管理を受けた。血液検査では，汎血球減少，低ガンマグロブリン血症を認め，血清葉酸値が測定感度未満だった。骨髓検査所見は巨赤芽球性貧血だった。15 mg/dayのfolic acidを静注投与し，2週間以内に汎血球減少は解消したが，びまん性肺胞出血に起因する難治性呼吸不全が出現し，しばらくの間人工呼吸管理を要した。状態は徐々に改善し，folic acidの静注量を7.5 mg/dayに減量した。

患者1，2，3はいずれも非経口葉酸製剤補充後，成長と発達は正常化した。

患者4：女兒。出生歴に特記事項なし。生後8ヵ月でけいれん発作と肺炎が出現したが，それまでは成長障害や神経発達遅延は見られなかった。血液検査では，貧血がみられ，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。骨髓検査で，巨赤芽球性貧血が判明した。folic acidの経口投与と，IgG2が61 mg/dlと低下していたため免疫グロブリン投与と，抗生物質および抗てんかん薬を開始した。その後1ヶ月で肺炎と貧血から回復した。しかし10 mg/dayのfolic acid経口投与後，血清葉酸値は10.6 ng/mlに上昇したものの，それ以上の神経学的発達

はみられず，髄液葉酸濃度は依然として検出できなかった．そのため，経口内服を folic acid から 50 mg/day の folinic acid に切り替えたところ，髄液葉酸濃度が 3.7 ng/ml まで上昇した．けいれん発作を起こさず，70 mg/day の folinic acid 経口投与で神経学的発達の改善を示し始めた．

上記 4 名の臨床症状と検査所見のまとめを表に示す（表 1）．

表 1 本研究の HFM 患者 4 名のプロフィールと葉酸補充治療前の検査所見

MCV: mean corpuscular volume, CSF: cerebrospinal fluid,

PHA: Phytohemagglutinin, N.A.: not analysed.

患者	1	2	3	4
性別	女	女	男	女
発症年齢 (月)	3	3	3	8
呼吸器症状	ニューモシスチス 肺炎	なし	肺炎, 肺胞 出血	肺炎
神経症状	精神運動発達遅滞	なし	なし	けいれん発作, 精神運動発達遅滞
体重増加不良	あり	あり	あり	なし
巨赤芽球性貧血	あり	あり	あり	あり
White blood cell ($\times 10^9/l$)	6.1	4.7	5.1	7.1
Neutrophil ($\times 10^9/l$)	1.6	1.0	1.5	1.7
Lymphocyte ($\times 10^9/l$)	3.5	3.6	3.3	4.1
T-cell (%)	87.3	N.A.	55	N.A.
B-cell (%)	15.5	N.A.	44	N.A.
NK-cell (%)	6.9	N.A.	検出せず	N.A.
(CD4+CD45RA+)/CD4+ (%)	31.2	N.A.	N.A.	N.A.
Hemoglobin (g/dl)	5.9	2.7	3.2	8.9
MCV (fl)	92	84	82	87
Platelets ($\times 10^9/l$)	17	33	18	450
IgG (mg/dl)	97	25	184	329
IgA (mg/dl)	14	3.1	8	3
IgM (mg/dl)	22	2.8	8	111
Serum folate (ng/ml)	検出せず ^a	検出せず ^a	検出せず ^a	検出せず ^a
CSF folate (nM/l)	N.A.	N.A.	N.A.	検出せず ^a
Lymphocyte proliferation with PHA (Stimulation Index)	5529 cpm (4.8)	N.A.	32320 cpm (12.5)	N.A.

【方法】

遺伝子解析は国立大学法人北海道大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する規則に則り、本人と代諾者（親権者）に説明の上、承諾書を得て行った。また本研究は北海道大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行った（臨床研究番号：017-0409）。

末梢血単核球（Peripheral blood mononuclear cell：PBMC）の分離

ヘパリン加血液 5 ml を生理食塩水で 2 倍に希釈し、Histopaque®（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）4 ml に重層した。20℃, 1500 rpm, 30 分間遠心し、濃度勾配法によって分離された生理食塩水・血漿の層を吸引したのちに PBMC 層を採取した。1xPBS で 2 回洗浄・遠心を繰り返し、PBMC を得た。

DNA の抽出

採取したヘパリン加血液 300 μ l に対し、Lysis buffer（0.3 M NH_4Cl , 8 mM NaHCO_3 , 1 mM EDTA）を 4 ml 添加し、常温で 7 分間転倒混和し溶血した。4℃, 1500 rpm, 5 分間遠心した後に、1xPhosphate buffered saline（PBS; 137 mM NaCl , 8.1 mM Na_2PO_4 , 2.7 mM KCl , 1.5 mM KH_2PO_4 ）で 2 回洗浄した。細胞をエッペンドルフチューブに移し、SepaGene®（Eidia, Tokyo, Japan）を用いて、まず試薬Ⅰ（トリスー塩酸緩衝液）を 100 μ l 加え、suspend し、続いて試薬Ⅱ（チオシアン酸グアニジン）を 100 μ l 添加し、泡立っていない様にピペットで緩やかに混和した。次に試薬Ⅲ（吸着剤、クロロホルム 50%含有）を 700 μ l, 試薬Ⅳ（酢酸ナトリウム水溶液）を 400 μ l 分注し、乳濁化するまで約 10 秒間激しく震盪混和した。その後 12000 rpm, 15 分間遠心し、核酸を含む上層をピペットにより別のエッペンドルフチューブに分取した。試薬Ⅴ（酢酸緩衝液）を 60 μ l 加え、イソプロピルアルコールを 660 μ l 加え、軽く転倒混和した。12000 rpm, 15 分間遠心し、デカンテーションにより上清を除去し、70%エタノールを 1 ml 加え、軽く転倒混和した。再度 12000 rpm, 15 分間遠心しデカンテーションにより上清を除去し遠心乾燥させた。得られた核酸ペレットに 20-50 μ l の Distilled deionized water（DDW）を加えて、ヒーターで 60℃, 10 分間加温し溶解した後にそれぞれの DNA を 2 μ l ずつ使用して、NanoDrop Lite（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いて吸光分析法で濃度を測定した。

SLC46A1 の PCR 及びダイレクトシーケンス解析

患者 1, 2 の *SLC46A1* 遺伝子の各エキソンとその近傍イントロンのダイレクトシーケンス解析はかずさ DNA 研究所に依頼した. 患者 3, 4 の *SLC46A1* 遺伝子のダイレクトシーケンス解析は当科で施行した.

UCSC database から得た *SLC46A1* 遺伝子の配列 (RefSeq: NM_080669.5) をもとに作成したプライマーは表 2 の通りである. PCR はプライマー 10 μ M を 1 μ l ずつ, DDW を 3.6 μ l, betaine を 3.4 μ l, PrimeSTARMax® (Takara, Tokyo, Japan) を 10 μ l, 抽出した DNA を 10-50 ng/ μ l の濃度に調整して 1 μ l, あるいはコンタミネーションチェックのため DDW を 1 μ l 混交し, PCR 条件は denaturation 94°C-30 秒, annealing 58°C-30 秒, extension 72°C-50 秒, 30 サイクルとした. PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し, 増幅された目的のバンドを切り出し, QIAGEN Extraction kit® (QIAGEN, Germantown, MD) を使用した. バンド切片をエッペンドルフチューブに移し, Buffer QG を 430 μ l 加え, 50°C で加温しながら時折タッピングして 10 分間混合した. イソプロピルアルコールを 150 μ l を加えて混ぜ, コレクションチューブにスピнкаラムをセットし, 液体をスピнкаラムにアプライした. 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, ろ液を破棄した. スピнкаラムに Buffer QG を 500 μ l アプライし 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, ろ液を破棄した. スピнкаラムに Buffer PE を 750 μ l アプライし 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, ろ液を破棄した. 再度 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, スピнкаラムをエッペンドルフチューブの上に移し, DDW を 20-50 μ l アプライした. 1 分間静置したのち, 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, スピнкаラムを破棄して DNA を抽出した. PCR で使用したプライマーを最終濃度 6.4 pmol になるように加え, FASMAC 社に遺伝子解析を依頼した.

表2 *SLC46A1* の PCR 及びダイレクトシーケンス解析に用いたプライマーの配列

SLC46A1

Exon	Forward primer	Reverse primer
1	CCGCCGGACATTTAAGGAG	CAGTTACCCGCCACTACCAT
2a	GATTGTGGAACCCAGAGTGAG	ACCAAAGCAGAAAGCTGCATA
2b	TATGCAGCTTTCTGCTTTGGT	CAAAGACACAGGAATGAACCAC
3	AGACAAGGGCAGTCTCCATTC	ATGTGTTTGTGTTTGGCCACTT
4	GGTGAGGAAGGGGAGACATAG	AAGACACCCAGAGGGTAAGGA
5	GGAGGAGGTTTCAGGAGAGCTA	CCTAGACAGAGGCTGGGTCA

c.1166-285T > G mutation を直接検出するためのプライマー

Forward primer	Reverse primer
TTTCCCAGCACTTTCTCTGTG	CTATGTCTCCCCTTCCTCACC

塩基置換・アミノ酸置換のデータベースを用いた解析

SLC46A1 の塩基配列は UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), Mutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>) から得た。検出された塩基置換が既報の疾患関連変異や Single Nucleotide Polymorphism・Single nucleotide variant であるかどうかを確認するために, National Center for Biotechnology Information database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Exon Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), および Human Genome Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>) に照合した。

塩基置換やアミノ酸置換の影響を評価するために, 下記の各種ツールを利用した。スプライス変異を予測する Splice Site Prediction by Neural Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), アミノ酸置換がタンパク構造にもたらす影響をもとに予測する PolyPhen-2 アルゴリズム (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), 配列保存性をもとにアミノ酸置換がタンパク機能にもたらす影響を予測する SIFT アルゴリズム (<http://sift.jcvi.org/>), またこれらの影響を複合的に評価する Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) を用いた。また, Mutation Taster のサイトからアミノ酸の変化が隣接アミノ酸に与える影響を評価する Grantham score を調べた。

また、本研究で検出されたアミノ酸変化部位の種別保存性を調べるために、National Center for Biotechnology Information 内の HomoloGene のサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>) を利用した。

さらに、実験の進展により明らかになった、4例の HFM 症例に共通する deep intronic mutation, c.1166-285T>G がどのくらいの頻度で存在するのかを、国内のゲノムデータベースとして東北メガバンク

(<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) を、海外のゲノムデータベースとして The International Genome Sample Resource

(<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-project-publications>) を用いて検索した（検索は成戸卓也先生、今井耕輔先生に依頼し、施行頂いた）。

Total RNA の抽出・Reverse Transcription PCR (RT-PCR)・TA クローニング・発現 vector の作成

2x10⁶ cells の PBMC に TRIzol® (Life Technologies) 1 ml を加え、suspend した後に室温で 5 分間静置し、200 µl のクロロホルムを加えて激しく 15 秒間混和した。12000 rpm, 4°C, 15 分間遠心し、透明な上清を別のチューブに移した。500 µl のイソプロピルアルコール（2-プロパノール）を加え、室温で 2 分間静置した。12000 rpm, 4°C, 10 分間遠心し、上清を廃棄した後に 75%エタノール 1 ml を添加して激しく混和し、再度 12000 rpm, 4°C, 10 分間遠心した。室温で 10 分間乾燥させた後、RNase free water を 20 µl 加えて混和し、60°C, 10 分間で溶解し、total RNA を得た。cDNA を得るための逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit® (TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いた。逆転写反応時間は 37°C-15 分, 85°C-5 秒とした。RT-PCR は cDNA を 1 µl 用い、上記 PCR と同様の組成、PCR 条件で行なった。最初に RTF, RTR プライマーを用いて全長 (FL) *SLC46A1* cDNA の増幅を試みたが、特異的なバンドは増幅されなかったため、表 3 に示すプライマーを使用し、正常コントロール及び患者 1 の cDNA を用いて *SLC46A1* cDNA の前半部分と後半部分を別々に増幅し、クローニングした後に *SLC46A1* cDNA に一カ所存在する PvuII で切断されるサイトを用いて両者をつなぎ合わせることにした。

クローニングは TOPO-TA Cloning kit® (Life Technologies) を用いて行った。vector は pCR™2.1-TOPO®vector を使用した（図 1）。前半部分、後半部分の RT-PCR 産物を 1 µl, Salt solution を 1 µl, DDW を 3 µl と vector を 1 µl をやさしく混合し、室内温で 5 分間静置した。混合物のうち 2 µl を取り、on ice で解凍しておいた DH5α (Frontier institute, Ishikari,

Japan) に加え, 再び on ice で 5 分間静置した. 42℃に加温した恒温槽に 30 秒間入れヒートショックを与えた後に on ice に戻した. SOC 培地を 250 μ l 加え. バイオシェーカー® BR-40LF (TAITEC Corporation, Koshigaya, Japan) を用いて 37℃, 200 rpm で 1 時間振盪した. アンピシリン (50 μ g/ml) を添加した LB 培地プレートの表面に X-gal® (Promega, Madison, WI) を塗布した後に, 形質転換後のコンピテントセルを散布し, 37℃, 5%CO₂ で 18 時間培養した. インサートチェックは, 下記の方法でコロニーを直接 PCR で増幅することで確認した. すなわち, 形成された白色のコロニーを DDW に suspend し, このうち 1 μ l を使用して PCR を行った. 酵素は KAPA Taq HS ReadyMix with dye® (NIPPON Genetics) を使用し, プライマーは M13R プライマーと T7 プライマーを使用し, PCR 条件は denaturation 94℃-30 秒, annealing 58℃-30 秒, extension 72℃-1 分, 35 サイクルとした. 得られた PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し, 目的のサイズのバンドが形成されたかどうかでインサートチェックを行った.

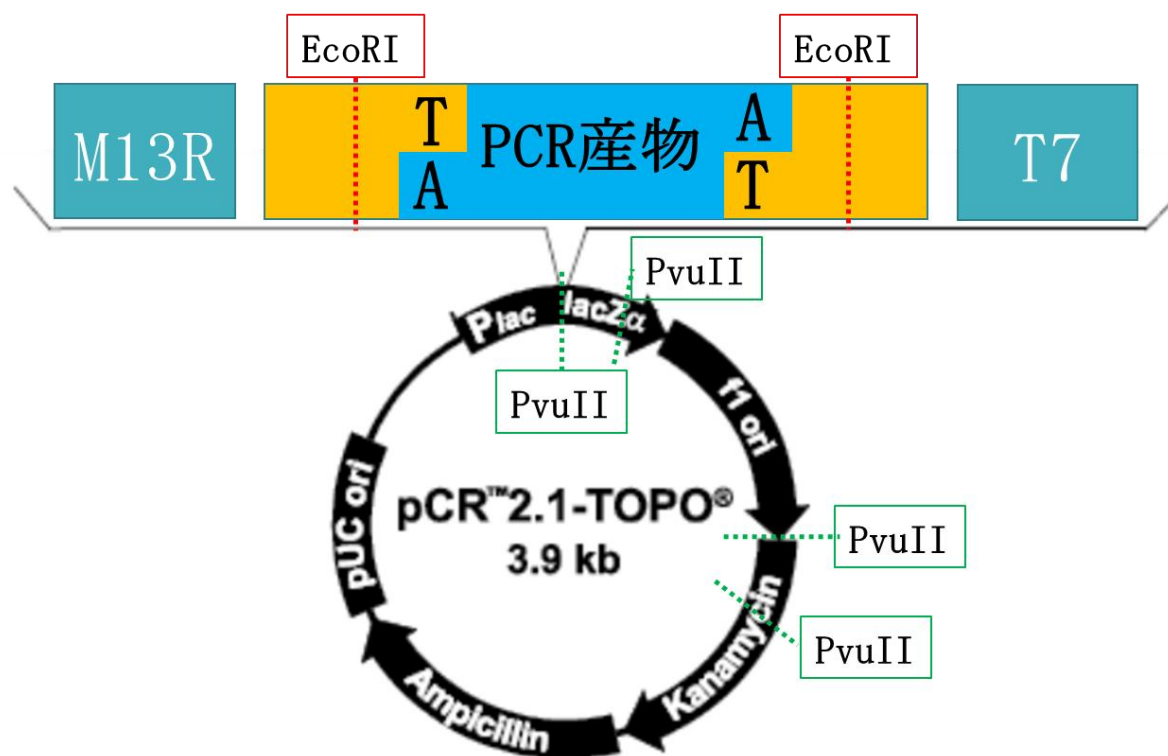


図1 TOPO-TA Cloning vector の構造と各プライマー・クローニングサイトの位置関係

(TOPO® TA Cloning® Kit user guide より引用, 一部改変)

TOPO-TA Cloning vector には PCR product 挿入部位の両側に EcoRI で切断可能な部位が存在する.

インサートの確認できたコロニーを培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit® (QIAGEN)を用いて plasmid を精製した. 具体的な方法は下記の通りである. すなわち, インサートの確認できたコロニーをアンピシリン (50 µg/ml) を加えた LB 培地 5 ml に入れ, バイオシェーカー® BR-40LF で 37°C, 200 rpm, 18-20 時間培養した後, 培養液の入ったチューブを 4°C, 1500 rpm, 5 分間遠心し, 上清をデカンテーションにより破棄した. Buffer P1 を 250 µl ペレットに加えてボルテックスして混和させた. 次に Buffer P2 を 250 µl 加え, チューブを数回転倒混和させた. そして Buffer N3 を 350 µl 加えて直ちにチューブを転倒混和させた. その後 850 µl ずつエッペンドルフチューブに移し, 4°C, 13000 rpm, 10 分間遠心した. 上清をマイクロピペットでコレクションチューブにスピncラムを乗せたものの上からアプライし, 4°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, ろ液を破棄した. スピncラムに Buffer PE を 750 µl アプライし, 4°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, ろ液を破棄した. 再度 4°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, スピncラムをエッペンドルフチューブの上に移し, DDW を 20-50 µl アプライした. 1 分間静置したのち, 20°C, 13000 rpm, 1 分間遠心し, スピncラムを破棄して plasmid DNA を抽出した. M13R と T7 プライマーで挿入配列の遺伝子解析を行い, *SLC46A1* の前半部分が挿入された plasmid と後半部分が挿入された plasmid を得た. 前半部分, 後半部分をそれぞれ EcoRI と PvuII (TaKaRa Bio Inc.) で切り出し, 得られた前半部分と後半部分を T4 DNA ligase (TaKaRa Bio Inc.) を行いてつなぎ合わせた後, EcoRI-FLF プライマーと BamHI-FLR プライマーで PCR をかけることで, 正常コントロール及び患者 1 由来の全長 *SLC46A1* cDNA を得た. PCR は PrimeSTAR® Max Premix を使用し, 条件を denaturation 94°C-30 秒, annealing 58°C-1 分, extension 72°C-2 分, 35 サイクルで行なった. TOPO-TA Cloning kit®を用いて TA クローニングを行い, 目的の全長配列が確認された plasmid を EcoRI で切断し, pcDNA3.1/HisC (Life Technologies) vector (図 2) は EcoRI で切断し CIP 処理も合わせて行ない, 全長配列と pcDNA3.1/HisC vector で ligation を行なった. これを DH5α に形質転換し T7 プライマーと BGH reverse (BGHR) プライマーでインサートチェックを行い, さらに F6 プライマーと BGHR プライマーで PCR し電気泳動することで方向を確認し, バンドが認められたコロニーでかつ順方向で挿入されているものを培養し, QIAprep Spin Miniprep Kit®を用いて plasmid を精製した. こうして, pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt (野生型), pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-G189V を得た

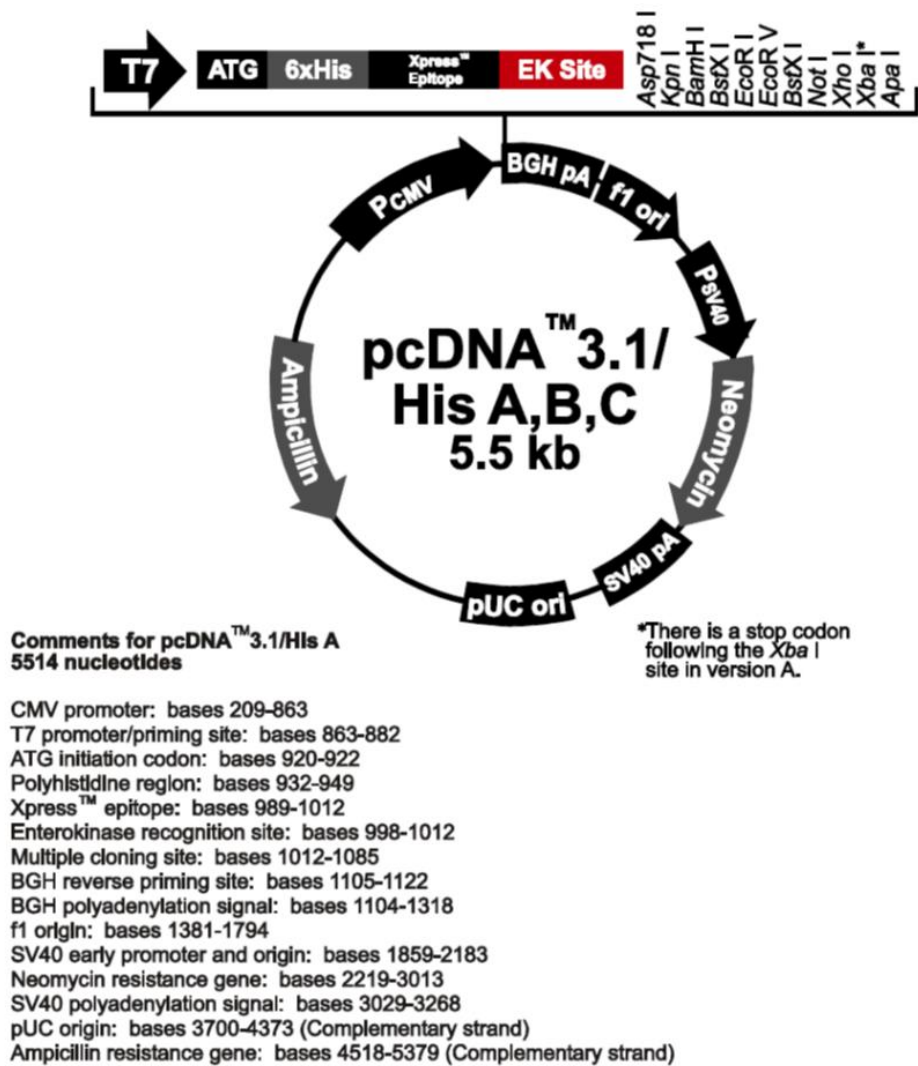


図 2 pcDNA™3.1/His vector の構造
 (pcDNA™3.1/His A, B, C user guide より引用)

Mutagenesis PCR による S318R および F392V 変異体の作成

今回の既報及び新規変異を有する *SLC46A1* 変異体(c. 954C > G, p. S318R 及び c. 1174T > G, p. F392V) を作成するため、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio Inc., Japan) を用いた Mutagenesis PCR を、pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt に対して行った。

Mutagenesis primers は下記の通りである。

mut C954G F ; TCACCAGGCTGCTGGCCCTGAAGCTC

mut C954G R ; CCAGCAGCCTGGTGAGGTAGGGGAGA

mut T1174G F ; TGCTCTCGTTTCTGCTGTGGCCTGTG

mut T1174G R ; GCAGAAACGAGAGCACCCCTGCTCTGT

PrimeSTAR MAX Premix (2x) を 25 µl, mut C954F F プライマーと mut C954G R プライマー, あるいは mut T1174G F プライマーと mut T1174G R プライマーを 1 µl ずつ, plasmid DNA を 10-100 pg/µl に調製して 1µl これを混合し、DDW を加えて計 50 µl とした。PCR を 98°C-10 秒, 55°C-15 秒, 72°C-35 秒としてこれを 30 サイクル行った。PCR 産物は以下の手順でエタノール沈殿を行い精製した。すなわちエッペンドルフチューブに PCR 生成物を 40 µl, DDW を 160 µl, 5 M の酢酸ナトリウム水溶液を 20 µl, 100%エタノール 500 µl を入れてボルテックスし、-30°C のフリーザーに 30 分静置した。その後 4°C, 15000 rpm, 10 分間遠心した。デカンテーションにより上清を破棄し、70%エタノールを 1 ml 加えてボルテックスし、4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心した。デカンテーションにより上清を破棄した後、真空乾燥機で完全に乾燥させた。滅菌した DDW を 10 µl 加え、65°C で 10 分間インキュベートし、ボルテックスした後 DNA 濃度を計測した。DH5α に形質転換し、コロニーを採取したものを培養し、plasmid を精製した。シーケンス解析によって *SLC46A1* 配列を確認した。こうして pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-S318R と pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-F392V を得た。

Ins168 bp 変異体作成

Deep intronic mutation, c.1166-285T > G により図 3 で示した 168 bp のイントロン 3 配列が cDNA レベルで挿入されることが示された。この挿入配列によりフレームシフトが生じ、59 bp 下流で終止コドンが生じるため、終止コドンまでの挿入配列を下記の方法で作成した (図 4)。

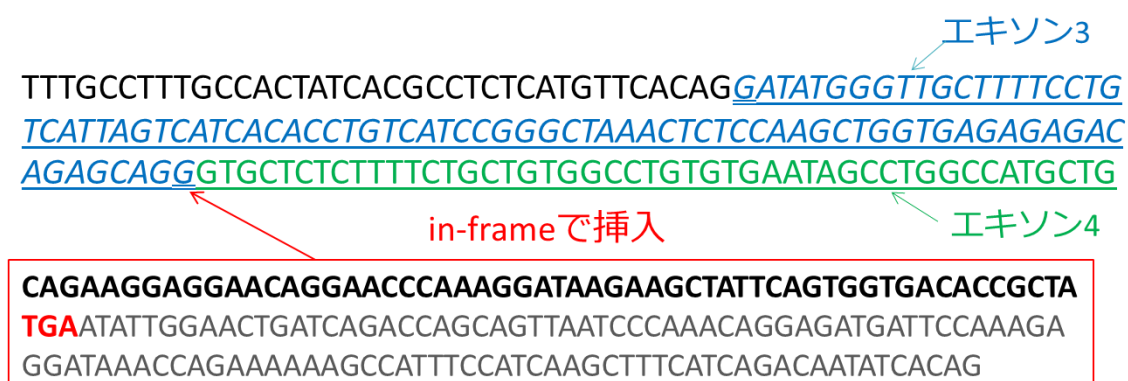


図3 ins168 bp を有する変異体の配列概念図

SLC46A1 の cDNA 配列の一部を示す. ins168 bp は青字下線で示したエキソン3と緑字下線で示したエキソン4の間に in-frame で挿入されているが、59 bp 下流で終止コドンが生じているため、太字で示した終止コドン TGA までの 59 bp を挿入した.

挿入すべき 59 bp を 4 つに分け、新しく 15 bp ずつ順番に付加していくためのプライマーを以下のように設計した.

SLC-insR1 ; CTGTTCTCCTTCTGCCTGCTCTGTCTCTCTC

SLC-insR2 ; TTATCCTTTGGGTTCTGTTCTCCTTCTGCC

SLC-insR3 ; CCACTGAATAGCTTCTTATCCTTTGGGTTCTCT

SLC-insR4 ; TTCATAGCGGTGTCACCACTGAATAGCTTCTT

pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt を用い、EcoRI-FLF と SLC-insR1 をプライマーとして得られた PCR 産物を TA クローニングし、インサートの確認できたコロニーを培養し、plasmid を精製した. 遺伝子解析で目的の配列が挿入されている plasmid を選択し、今度は EcoRI-FLF と SLC-insR2 をプライマーとして得られた PCR 産物を TA クローニングして、同様にして plasmid を精製し、挿入配列を確認した. 精製した plasmid を用いて同様の手法を EcoRI-FLF と SLC-insR3, さらに EcoRI-FLF と SLC-insR4 をプライマーとして用いて繰り返し、目的とする配列の挿入された plasmid を得た. 次に上述したのと同じ方法で目的の挿入配列を有する pcDNA3.1/HisC vector に乗せかえた.

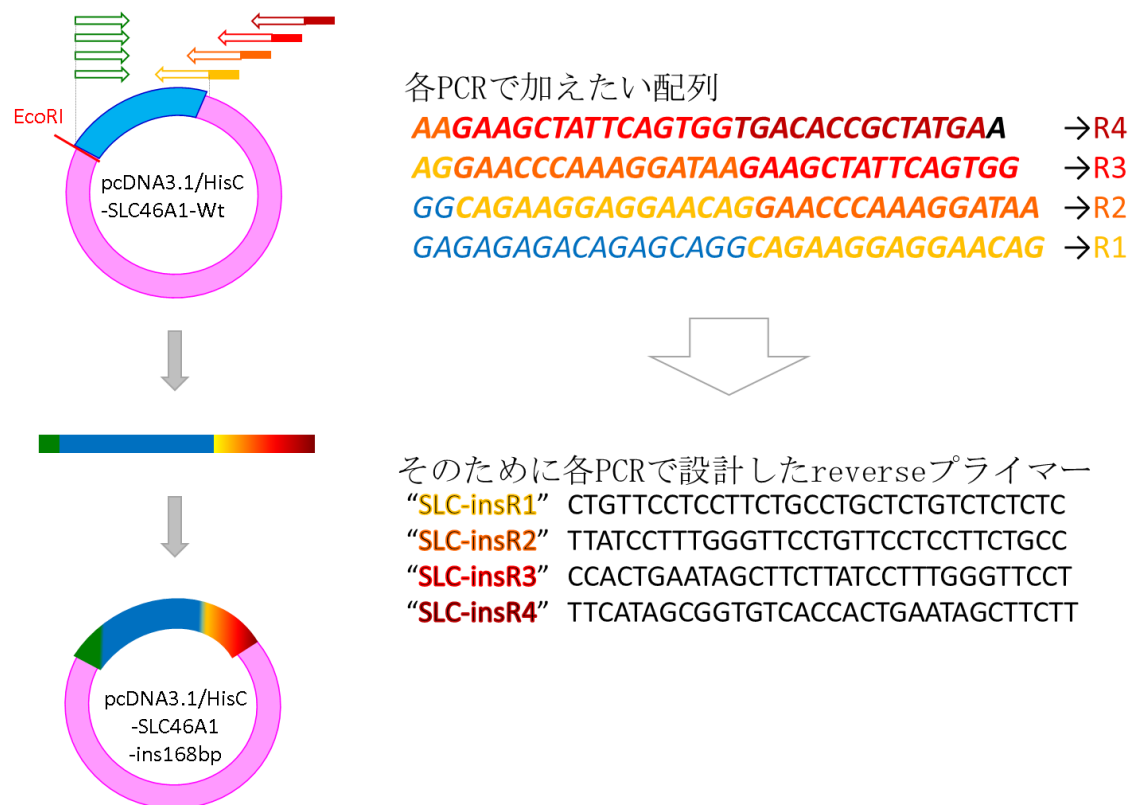


図 4 pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-ins168 bp 作成までの工程図

表 3 RT-PCR プライマーの配列

168 bp の挿入部付近を増幅するためのプライマー

Forward (F6) primer	Reverse (R6) primer
GATGCCTGGGTAGCTGAGAT	GTCAGAGTGGCTGGGTAGAG

168 bp の挿入があるアレルのみを増幅するプライマーと 168 bp の挿入がないアレルのみを増幅するプライマー

Forward (F2) primer	168-bp positive Reverse (posiR) primer	168-bp negative Reverse (negaR) primer
CCTTCTGGCTGCTAGCTTTG	ATGAAAGCTTGATGGAAATGG	AGCACCTGCTCTGTCTCTCT

SLC46A1 cDNA の前半部分を増幅するプライマー

FLF primer	Reverse (R2) primer
GTCCCAGGCAGCGAGTC	CCAGAAGGGGTTGGCATAAC

SLC46A1 cDNA の後半部分を増幅するプライマー

Forward (F3) primer	FLR primer
AGGCCCTAGTGTCGTTTTT	CTCCAGTTGCTTGGTGTTCA

TOPO-TA ベクターに *SLC46A1* cDNA をクローニングするためのプライマー

EcoRI-FLF primer	BamHI-FLR primer
GAATTCATGGAGGGGAGC	GGATCCTCAGGGGCTCTG

M13R プライマー	TAAAACGACGGCCAG
T7 プライマー	TAATACGACTCACTATAGGG
BGHR プライマー	TAGAAGGCACAGTCGAGG

HeLa 細胞への発現 vector の導入

HFM 患者でみられた *SLC46A1* 変異の影響を評価するために、HeLa 細胞に pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt または変異体を導入し、一過性に PCFT を発現させ解析を行った。具体的には、HeLa 細胞を 3×10^5 cells/ml の濃度で DMEM (Sigma) 10% FBS 2.5 ml に suspend し、6 ウェルプレートに移し、37°C, 5%CO₂ で 1 晩培養し接着させた。その後 Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.) 250 μ l に対し PCFT-Wt または変異体の DNA 4 μ g, トランスフェクションマーカーとして pEGFP-C2 (Takara Bio Inc.) DNA 0.8 μ g を入れてピペッティングにより混和した。TransIT®-LT1 (Mirus, Madison, WI) Reagent を室内温においたのち、十分にボルテックスしてから 14.4 μ l をそれぞれに加えて、ピペットで完全に混和した。室温で 30 分間静置してから 6 ウェルプレートにそれぞれ加えて、プレートを数回傾けて混合物が全体に均一にいきわたるようにしてから 37°C, 5%CO₂ で 36 時間培養した。0.25% Trypsin-EDTA® (Life Technologies) を添加して細胞を剥がし、DMEM 10% FBS を加えて細胞を回収した。導入効率はフローサイトメトリー法での GFP 陽性細胞の割合で評価した。

PCFT を一過性に発現させた HeLa 細胞の蛋白抽出と SDS-PAGE での展開

PCFT は細胞膜に発現する分子であるため、膜タンパクを評価するための下記の方法で蛋白を抽出した。すなわち、回収した細胞を 200 μ l の氷冷した 1xPBS で suspend し、100%トリクロロ酢酸 20 μ l を加えて素早く混合したのち、20 分間氷上に静置した。4°C 15000 rpm で 20 分間遠心し、上清を除去した。残ったペレットを 80 μ l の UTM (9M 尿素と 2%Triton-X100 と 5%メルカプトエタノール) で suspend し、超音波処理を行った。さらに 20 μ l の SDS 溶液 (1.5%SDS と 0.2M の pH 6.8 に調製した Tris と適量のブロモフェノールブルー) を加えた後にさらに超音波処理を加え、蛋白を抽出した。

12%の running gel と stacking gel を自作し、抽出した蛋白を 10 μ l ずつそれぞれアプライし、両脇に Kaleidoscope® (Bio-Rad, Hercules, CA) をマーカーとして 7 μ l アプライした。SDS-PAGE で展開後、Immobilon-P Transfer PVDF メンブレン® (Millipore, Billerica, MA) に 15V, 1 時間、セミドライ式ブロッキング装置・WSE-4020 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて電気泳動法で転写し、1xTris Buffered Saline with 0.1% Tween®20 (TBST; 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween®20) 5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った。

PCFT を一過性に発現させた HeLa 細胞の PCFT 発現解析

前述のとおりブロッキングを行ったメンブレンに抗体を反応させ、Western blot 法で解析を行なった。最初に、PCFT の N 端側に融合している Xpress を認識する抗体を用いて、PCFT 発現を評価した。1xTBST・5%スキムミルクで 5000 倍に希釈した Anti-Xpress Antibody (Ab) (Invitrogen, Carlsbad, CA) とを 4℃, 18 時間反応させた。その後 1xTBST で 3 回洗浄した。次に 1xTBST・5%スキムミルクで 2000 倍希釈した二次抗体, HRP Goat anti-mouse IgG Ab (BioLegend, San Diego, CA) を室温で 1 時間反応させた。1xTBST で 3 回洗浄し、化学発光には Amersham ECL Select™ Western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, U.K), または Pierce® Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) を用いた。発光したバンドは LAS-1000UV® (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出・撮影した。ほかの抗体で評価するために、メンブレンに Stripping buffer (2-ME 0.7 ml, SDS 2 g, 1 M Tris [pH 6.8] 6.25 ml, DDW 93 ml) を 4 ml 加えてラッピングし、65℃, 30 分湯煎した。1xTBST で 3 回洗浄後に 1xTBST・5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングした後で新たな抗体反応を行った。PCFT 特異的な抗体は Rabbit polyclonal Ab to HCP1/PCFT (Abcam, ab25134, Cambridge, UK) を用いた。1xTBST・5%スキムミルクで 500 倍に希釈して用い、1xTBST・5%スキムミルクで 2000 倍に希釈した二次抗体, HRP Donkey anti-rabbit IgG Ab (BioLegend) と反応させた。また, Loading control としては actin を用いた。1xTBST・5%スキムミルクで Monoclonal Anti-Actin Ab (Sigma, Saint Louis, MI) を 3000 倍に希釈して反応させ、メンブレンを洗浄後 1xTBST・5%スキムミルクで二次抗体, HRP Goat anti-mouse IgG Ab を 2000 倍に希釈して反応させた。さらに導入効率を反映した control として GFP を用い、GFP monoclonal Ab (Clontech, Mountain View, CA) を 1xTBST・5%スキムミルクで 20000 倍に希釈して使用し、1xTBST・5%スキムミルクで二次抗体, HRP Goat anti-mouse IgG Ab を 2000 倍希釈して使用した。評価に際しては画像解析ソフトウェア ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) を使用し、Wt の発現量を GFP の発現量で割ったものを 1 として、それぞれの変異体の発現量の割合を算出し、グラフ化した。

MTX-FITC を用いた変異 PCFT の葉酸取り込み能の解析

各 PCFT 変異体の葉酸輸送能の解析方法を検討した。既報では [³H]-MTX を取り込ませて、細胞処理を行い計測していた (Aluri et al., 2018; Qiu et al.,

2006; Shin et al., 2010, 2011; Zhao et al., 2008). 一方, MTX-FITC を用いて葉酸の輸送能を解析した報告もあり (Lasry et al., 2008), 今回は HeLa 細胞に pcDNA3.1/HisC Mock ベクター, pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt または各変異体を発現させ, MTX-FITC を取り込ませて, フローサイトメトリーで解析することとした. 導入効率マーカーとして汎用している EGFP は MTX-FITC と同一の波長域で分別困難であるため, 今回は CD20 ベクターとの共導入を行い, CD20-PE 抗体を用いることにより, 分別することとした. また pCMV-CD20 ベクターと pcDNA3.1/HisC-SLC46A1 ベクターの導入量を 1:5 にすることで, pCMV-CD20 ベクターが導入された HeLa 細胞には pcDNA3.1/HisC-SLC46A1 ベクターも非常に高い確率で導入されるように設定した. すなわち, HeLa 細胞を 3×10^5 cells/ml の濃度で DMEM (Sigma) 10% FBS 2.5 ml に suspend し 6 ウェルプレートに移し, 37°C, 5%CO₂ で 1 晩培養し接着させた. Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.) 250 µl に対し PCFT 変異体の DNA 2.5 µg, CMV-CD20 DNA 0.5 µg を入れてピペティングにより混和した. TransIT®-LT1 (Mirus, Madison, WI) Reagent を室内温においたのち、十分にボルテックスしてから 9 µl をこれに加えて, ピペットで完全に混和した. 室温で 30 分間静置してから 6 ウェルプレートにそれぞれ加えて, プレート为数回傾けて混合物が全体に均一にいきわたるようにしてから TransIT®-LT1 (Mirus, Madison, WI) を用いて, 各変異体と CMV-CD20 を 5:1 の割合で共導入し 37°C, 5%CO₂ で 48 時間培養した. HEPES-buffered saline (HBS) (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM dextrose [pH 7.4]) で 2 回洗浄し, バッファを除き, MES-buffered saline (MBS) (20 mM MES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM dextrose [pH 5.5]) 0.5 ml 単味か MTX-FITC (Life Technologies: M1198MP) を 0.5 µM の濃度で加えたものをそれぞれの well に加えて, 37°C で 2 分間静置した. 反応後は直ちに氷冷した HBS を 5 ml ずつ加えて冷却し, 冷却した HBS で 3 回洗浄した. 0.25% Trypsin-EDTA®を添加して細胞を剥がし, 回収した. 冷却した 1xPBS で 2 回洗浄し, CD20-PE (BD: 80225 Franklin Lakes, NJ) を 5 µl ずつ加えて 4°C で 30 分静置した. その後は冷却した 1xPBS で 3 回洗浄し, 細胞をフローサイトメーター (Beckman Coulter, Cytoflex) で解析した. 細胞を FSC と SSC のドットプロットでみられた生細胞にゲートをかけ, その分画を PE で展開し, CD20 陽性細胞にゲートをかけた. その分画の細胞を FITC で展開し, MTX 陽性細胞割合を算出した. 実験は 3 回行い, 平均±SD を算出し, Welch 法を用いて統計学的検討を行った. P 値が 0.005 未満の場合、統計的有意差があるとした.

【結果】

4 例の HFM 患者において様々な *SLC46A1* 変異が検出された.

患者 1：その両親の末梢血から DNA を抽出し，*SLC46A1* 遺伝子をダイレクトシーケンス解析したところ，患者 1 と母から未報告のヘテロアミノ酸置換 c. 566G > T, p. G189V が認められた．しかし，HFM は常染色体劣性遺伝疾患であり，患者 1 の変化が認められたアレルとは別のアレルにスプライス異常や部分欠損が存在する可能性を考えた．そこで次に正常コントロール，患者 1 とその両親の PBMC 由来の cDNA を用いて RT-PCR を行ない，TA クローンの遺伝子解析を行なったところ，c. 566G > T, p. G189V を有するクローンと，c. 566G の野生型だが本来存在しないはずの 168 bp がエキソン 3 の後ろにつながっているクローンを認めた．いずれのクローンもストップコドンまでつながっており，部分欠損の可能性は否定された．

そこで，168 bp 挿入の前後を増幅するプライマーと患者 PBMC 由来 cDNA を用いて RT-PCR を行なったところ，図 5 で示すように患者 1 と父のみで通常よりもサイズの大きなバンドが検出された．

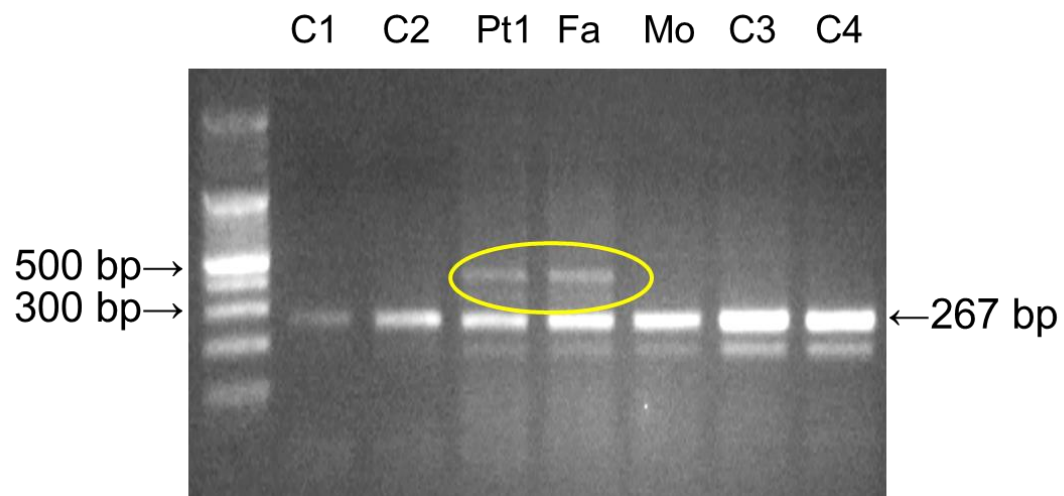


図5 患者1と父でのみ、予想されたサイズ（267 bp）よりも大きいバンド（黄色丸囲み）が検出された。

168bp の挿入の前後を増幅するプライマーを用いた RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動。

C1: Control 1, C2: Control 2, C3: Control 3, C4: Control 4, Pt1: Patient 1, Fa: Father, Mo: Mother

次にこのバンドの塩基配列を解析したところ、*SLC46A1* のエキソン 3 とエキソン 4 の間にイントロン 3 の配列が 168 bp 挿入されていることが判明した。また、患者 PBMC 由来の DNA を用いて挿入配列付近の遺伝子解析をすると、c.1166-285T > G の塩基置換を認めた。この塩基置換は挿入配列をもたない正常コントロール 50 人の解析では認めなかった (図 6)。

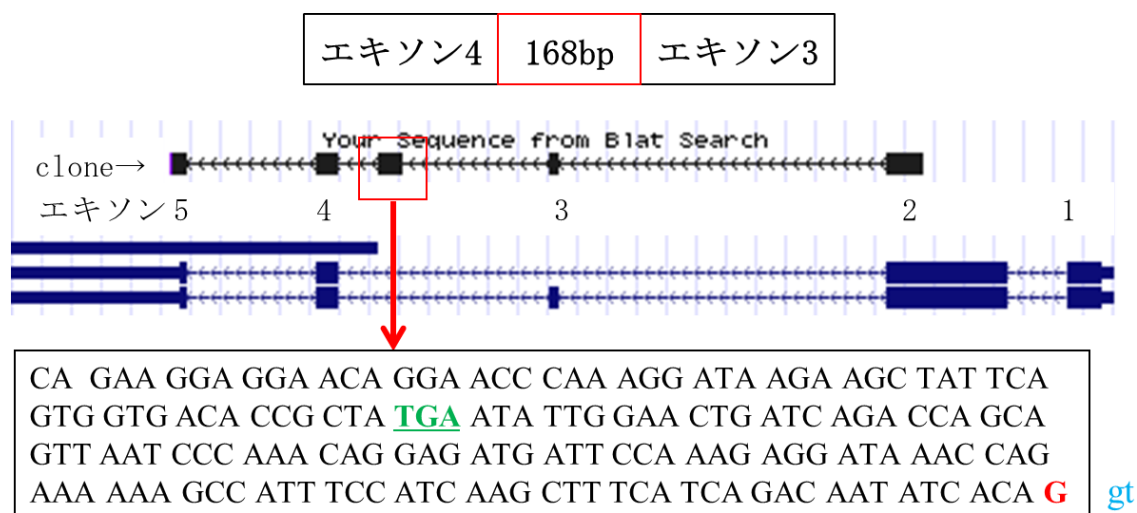


図 6 患者 1 とその父の *SLC46A1* のエキソン 3 とエキソン 4 の間に本来ならばスプライシングで抜けるはずのイントロン 3 の配列 168 bp が存在する。

患者 1 とその父に認められた *SLC46A1* の cDNA 後半部分のシェーマ赤字で示した部位が本来 t であるところが g に置換している。

この塩基置換について、Splice Site Prediction by Neural Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) を利用したところ、c.1166-285T > G 塩基置換によって、splice site の prediction が 0.08 から 0.91 に上昇した (表 4)。

表 4 インترون 3 にみられた塩基置換により、splice site の予測値が高くなっている。

数値は splice site の可能性を 0 から 1 までの値で表している。上段は塩基置換 c.1166-285T > G がない配列、下段は塩基置換がある配列。右はそれぞれの配列を入力した際の splice site として認識される予測値を表している。

	prediction
atcacatgtactttt	0.08
atcacaggtactttt	0.91

以上から、塩基置換 c.1166-285T > G によって splice 変異が生じ、イントロン 3 の一部だった 168 bp が挿入されることにより、挿入配列の 20 アミノ酸目で TGA 終止コドンとなる premature termination が生じるものと考えられた。従って、この deep intronic mutation は c.1166-285T > G, p.G389Afs*20 と考えられた。

次に、168 bp 挿入のある配列のみを増幅するプライマーと、168 bp 挿入のない配列のみを増幅するプライマーを設定し、患者 PBMC 由来 cDNA を用いて RT-PCR を行ない、それぞれのバンドの遺伝子解析を行なった。168 bp の挿入配列のない RT-PCR 産物からは母由来の c.566G > T シグナルのみが検出され、父由来の 168 bp の挿入配列がある RT-PCR 産物からは c.566G の野生型シグナルのみが検出された。従って、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、168 bp 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 (図 7)。

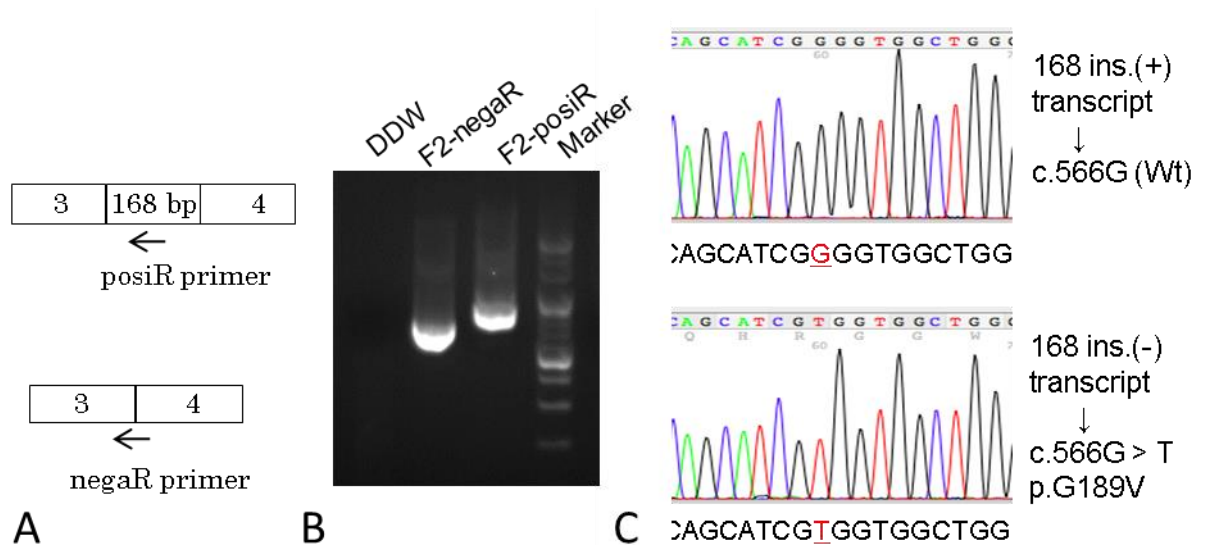


図 7 168 bp の挿入配列がある転写産物は父のアレルのみから由来し，168 bp の挿入配列のない転写産物は母のアレルのみから由来することが示された。

(A) 168 bp 挿入のある配列のみを増やすプライマー (posiR primer) と，168 bp 挿入のない配列のみを増やすプライマー (negaR primer) の設定。

(B) F2 プライマーと negaR プライマー，F2 プライマーと posiR プライマーを用いてそれぞれ RT-PCR を行い電気泳動した。

(C) 電気泳動で得られたそれぞれのバンドを gel extraction してシーケンス解析した。

以上の解析結果をまとめると，患者 1 は父由来の deep intronic mutation c.1166-285T > G, p.G389Afs*20 と母由来の c.954C > G, p.G189V の複合ヘテロ接合変異と考えられた。

患者 2 : 末梢血から DNA を抽出し, かずさ DNA 研究所を通じて *SLC46A1* 遺伝子のダイレクトシーケンス解析を行ったところ, エキソンとその近傍の塩基配列に異常はみられなかった. そこで, 次に患者 1 の解析手順と同様に splice の異常や partial deletion の可能性を考えて, cDNA の解析に進んだ. 患者 2 で患者 1 と同プライマーで RT-PCR を行ない, 産物を電気泳動したところ, 図 8 に示すようにコントロールよりも長いバンドのみが増幅され, シーケンス解析をしたところ, 患者 1 と同一のイントロン 3 の 168 bp の挿入を認めた.

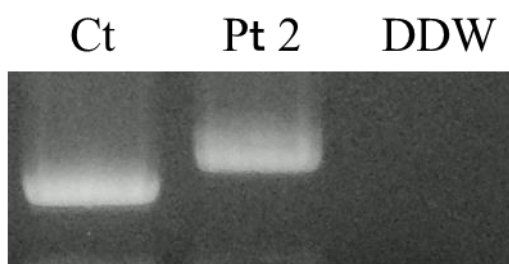


図 8 患者 2 の *SLC 46A1* の RT-PCR 産物はコントロールに比べて長いバンドのみが見られた.

患者 2 の患者 1 と同じプライマーを使った RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動.

Ct: Control, Pt2: Patient 2

そこで患者 2 と両親の末梢血から DNA を抽出して, 遺伝子配列を確認したところ, 図 9 に示すように c. 1166-285T > G を両親はヘテロで, 患者 2 はホモで持つ事が判明した. この結果から, 患者 2 は両親由来の c. 1166-285T > G, p. G389Afs*20 のホモ変異と考えられた.

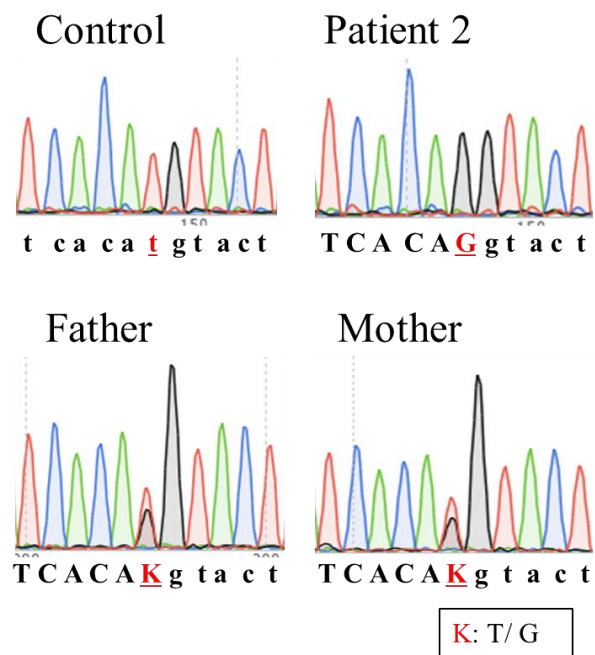
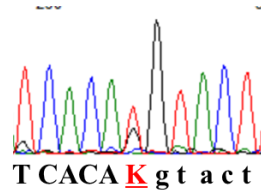


図9 両親とも c.1166-285T > G をヘテロで，患者2はホモで有していた．
患者2とその両親の *SLC46A1* c.1166-285 と近傍の塩基配列

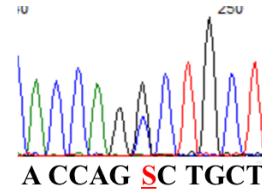
患者 3, 患者 4: これまでの 2 例の遺伝子配列解析で deep intronic mutation, c. 1166-285T > G が共通していたから, 患者と両親由来の PBMC から DNA を抽出し, 各エキソンのシーケンス解析と並行して c. 1166-285T > G の有無を調べるプライマーを用いて PCR で解析し, 遺伝子解析を行なった. すると, 患者 3 については図 10 に示すように患者 3 と父に c. 1166-285T > G のヘテロ接合がみられ, 患者 4 については図 11 に示すように患者 4 と母に c. 1166-285T > G のヘテロ接合がみられた. 患者 3 と母には既報変異 c. 954C > G, p. S318R のヘテロ接合がみられ (Zhao et al., 2007), 患者 4 と父にはこれまで SNP としても変異としても報告のない c. 1174T > G, p. F392V のヘテロ接合がみられ, いずれの患者も複合ヘテロ接合変異を有している可能性が考えられた.

c.1166-285T > G, p.G389Afs*20

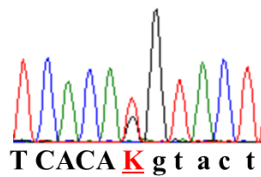
c.954C > G, p.S318R(既報変異)



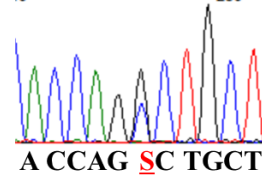
Patient 3



Patient 3



Father



Mother

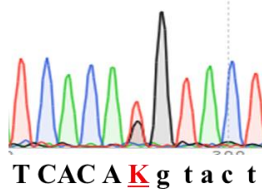
K: T/G

S: C/G

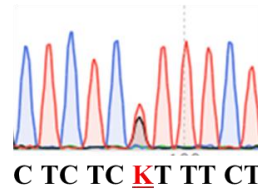
図 10 患者 3 は父由来の deep intronic mutation, c.1166-285T > G と母由来の既報変異 c.954C > G の複合ヘテロ接合変異と考えられた。
患者 3 と両親の遺伝子解析結果

c.1166-285T > G, p.G389Afs*20

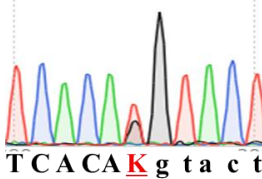
c.1174T > G, p.F392V (未報告)



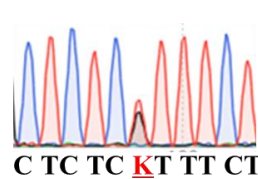
Patient 4



Patient 4



Mother



Father

K: T/G

K: T/G

図 11 患者 4 は母由来の deep intronic mutation c.1166-285T > G と父由来の未報告変異 c.1174T > G の複合ヘテロ接合変異の可能性が示唆された。
患者 4 と両親の遺伝子解析結果

次に、患者 1, 3, 4 で見られたアミノ酸置換がタンパク構造や機能に及ぼす影響について各種予測ソフトを用いて調べたところ、表 5 に示す通りいずれも影響は大きいと予測された。しかし、アミノ酸の変化が隣接アミノ酸に与える影響を評価した Grantham score は p. G189V, p. S318R がそれぞれ 109, 110 であり moderately radical という評価だったのに対し、患者 4 の p. F392V は 50 であり、conservative という評価だった。

表 5 アミノ酸置換がタンパク構造や機能に及ぼす影響について評価する予測ソフトの解析結果

患者	変異	Prediction software			
		SIFT score	PolyPhen-2 score	Mutation Taster	Grantham score
1	c.566G > T, p.G189V	0.00 (Affect protein function)	1.000 (Probably damaging)	0.999 (Disease causing)	109 (Moderately radical)
3	c.954C > G, p.S318R	0.00 (Affect protein function)	0.991 (Probably damaging)	0.999 (Disease causing)	110 (Moderately radical)
4	c.1174T > G, p.F392V	0.00 (Affect protein function)	0.999 (Probably damaging)	0.999 (Disease causing)	50 (Conservative)

また、図 12 に示す通り各患者で置換のみられたアミノ酸は種を超えて保存性が高いことが確認された。

	189	318	392
H.sapiens	QMALLESIGVAGMLASLLGG	AAQHLPYLTSLALKLLQYCLADAWVAEIG	LSKLVRETEQGALFSAVACVNSLAMLASG
M.mulatta	QMALLESIGVAGMLASLLGG	AAQHLPYLTSLVLKLLQHCLADAWVAEIG	LSKLVRETEQGALFSAVACVNNLAMLASG
C.lupus	QMALLESIGVAGMLASLLGG	AAQHLPYLTSLVGLRLLQHCLADTWVAEIG	LSKLVGKSEQGALFSSVACINSLAMLASG
B.taurus	QMALLESIGVAGMLASFIGG	AAQQLPYLTSLGLRLLQYCLADTWVAEIG	LSRLVRQSEQGALFSAACVNGSLAMLASG
M.musculus	QMALLESIGVAGTLASLLGG	AAQHLPYLTSLGLRLLQFCLADTWVAEIG	LSKLVSESEQGALFSAVACVNSLAMLASG
R.norvegicus	QMALLESIGVAGTLASLLGG	AAQHLPYLTSLGLRLLQFCLADTWVAEIG	LSKLVSESEQGALFSAVACVNSLAMLASG
G.gallus	QVAILEACLGAGMVASVGGG	AASYLAYLSLGLRLLQLCLEDTWVAEIG	LSKLVSETEQGALFASVACVEGLCSLVATG
D.rerio	QVAILEACLGAGMFASIIGG	AAKHLAYLTSLTGLRAMQCCELSWVALVG	LSKLVDPAEQGALFASVACVEGLCSLVSSG
C.elegans	QIAGVEGAIGLGGTVGFALSG	TTAAVLFLYELLRMKLM----SDGMLATLG	ISSLIDMQEQGKIFSVISLLEGITTLVATS
C.elegans	QIARLEGTISLGSTVGFALSS	TTIMSLALYFLK----NLGITDIRLAIFG	IATNVGEHERGLAFSLVAVIEALCNLTSSW
X.tropicalis	QVAILEACLGAGMVASIIGG	AAEHLTYLSLAGLRLFQLCLADSWVAEMG	LSKMVEEQGALFSSVACVEGLSYLLATA

図 12 患者 1, 3, 4 で置換のみられたアミノ酸 (G189, S318, F392) は複数種でも強い保存性を有していた。

各種変異体の PCFT 発現は、完全欠損から正常発現まで様々であった。

各患者でみられた変異が PCFT の発現に与える影響を調べるため、pEGFP-C2 と pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt, または各変異体を HeLa 細胞に共導入し、lysate を作成し、PCFT の発現をウェスタンブロット法で評価した。その際に pEGFP-C2 ベクターと pcDNA3.1/HisC-SLC46A1 ベクターの導入量を 1:5 にすることで、pEGFP-C2 ベクターが導入された HeLa 細胞には pcDNA3.1/HisC-SLC46A1 ベクターも非常に高い確率で導入されるように設定した。結果を図 13 に示す。Wt の PCFT 発現に比べて、168 bp 挿入変異体、S318R 変異体は PCFT 発現が欠損しており、G189V 変異体は若干の発現がみられるものの明らかに減少していた。一方で F392V 変異体は Wt とほぼ同等の PCFT 発現を示した。

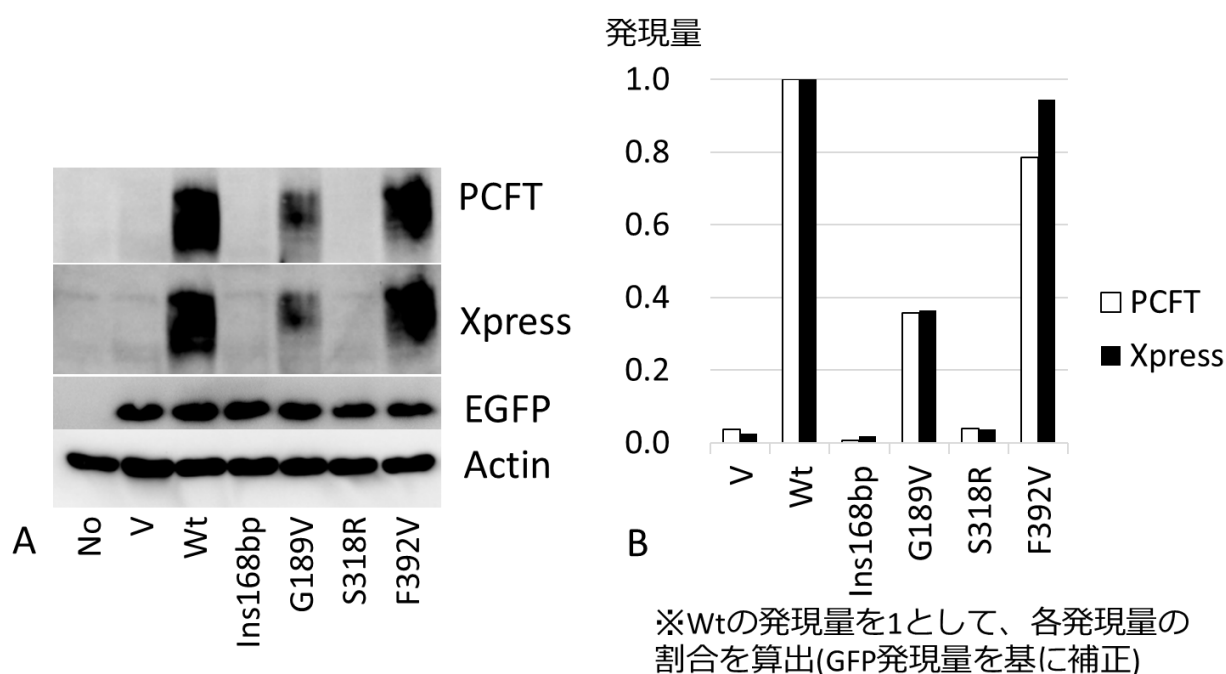


図 13 168 bp 挿入変異体、S318R 変異体は PCFT 発現が欠損しており、G189V 変異体は若干の発現がみられるものの明らかに減少していた。一方で F392V 変異体は Wt とほぼ同等の PCFT 発現を示した。

(A) HeLa 細胞に pEGFP-C2 および pcDNA3.1/HisC ベクター、pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt または各変異体を発現させた後ウェスタンブロット法で PCFT 発現を比較した。Actin をローディングコントロールとして、GFP を導入効率マーカーとして用いた。

(B) (A) のバンドについて ImageJ を用いて Wt/GFP を 1 として、それぞれの変異体の発現量を算出しグラフ化した。

No: 遺伝子導入していない HeLa 細胞, V: Mock ベクター

いずれの PCFT 変異体も MTX 取り込みは著明に低下していた.

今回解析した各種変異体の PCFT 発現は、完全欠損から正常発現まで様々であり、特に F392V 変異体は野生型とほぼ同等の PCFT 発現量を有していたことから、各変異体における葉酸輸送能の評価を行なった。HeLa 細胞に pcDNA3.1/HisC Mock ベクター、pcDNA3.1/HisC-SLC46A1-Wt または各変異体と CD20 ベクターとの共導入を行い、MTX-FITC を取り込ませフローサイトメトリーで解析したところ、Wt に対し、各変異体では MTX-FITC 陽性細胞の割合が著明に低下しており、いずれも MTX 輸送能がほぼ欠如することが示唆された (図 14)。

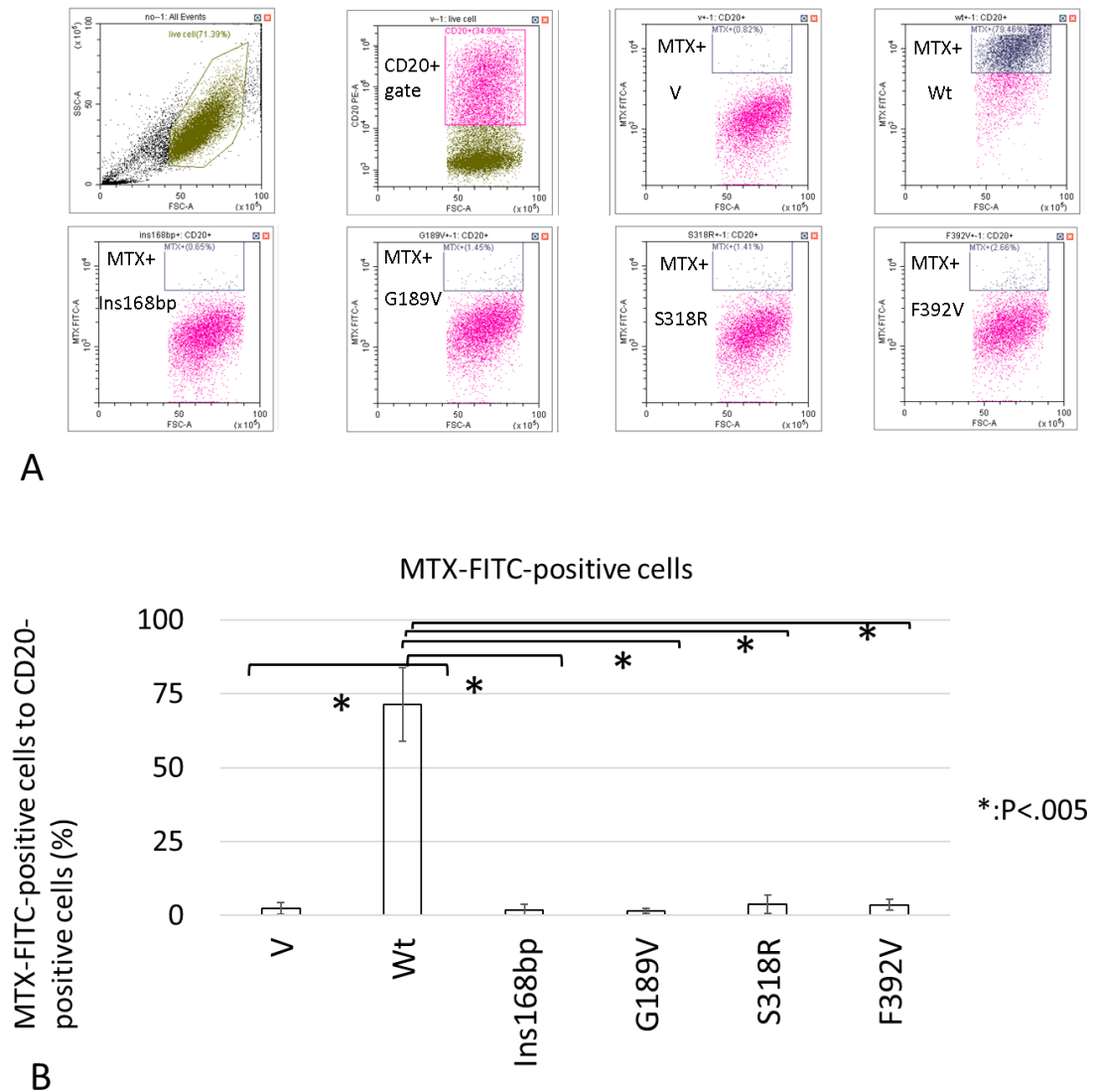


図 14 フローサイトメトリーを使った MTX-FITC の取り込み能は、全ての PCFT 変異体ではほぼ欠如していた。

(A)フローサイトメトリーを用いて PCFT の野生型あるいは変異体を発現した HeLa 細胞の MTX-FITC の取り込みを調べた。HeLa 細胞の内因性の影響を除くため、導入効率マーカーとして使用した CD20 陽性細胞にゲートをかけ、MTX-FITC 陽性細胞の CD20 陽性細胞に対する割合を調べた。

(B)変異体ごとの CD20 陽性細胞に対する MTX-FITC 陽性細胞の割合を示す。P 値は Welch の検定を用いて算出した。* : $p < 0.005$, エラーバーは 3 回の独立した実験の結果の標準偏差を示す。

【結果の小括】

本研究におけるこれまでの実験結果を以下に示す.

表 6 本研究における実験結果で判明した患者 4 名の *SLC46A1* 遺伝子変異

患者	変異 (由来)	形式
1	c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20 (父) c.566G > T, p.G189V (母)	複合ヘテロ接合変異
2	c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20 (両親)	ホモ接合変異
3	c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20 (父) c.954C > G, p.S318R (母)	複合ヘテロ接合変異
4	c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20 (母) c.1174T > G, p.F392V (父)	複合ヘテロ接合変異

表 7 本研究における PCFT 変異体の PCFT 発現, MTX 輸送能の解析結果

変異	PCFT発現	MTX取り込み
c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20	なし	ほぼ欠如
c.566G > T, p.G189V	低下	ほぼ欠如
c.954C > G, p.S318R	なし	ほぼ欠如
c.1174T > G, p.F392V	正常	ほぼ欠如

本研究では非血縁関係にある患者 4 名全例で deep intronic mutation, c.1166-285T > G, p.A389Gfs*20 が検出され, いずれも両親由来であった. 本変異の頻度を調べるため, 東京医科歯科大学成戸卓也先生, 今井耕輔先生に依頼し, 東北メガバンク (<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) と The International Genome Sample Resource (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-project-publications>) を用いて検索したところ, いずれのデータベースでも該当変異を認めなかった. 各変異体の解析において, PCFT 発現について F392V はほぼ正常だったが, MTX 取り込み能の解析からは, ほかの症例と同様に PCFT の機能はほぼ欠如していることが示された.

【考察】

本研究によって、これまで国内では非常に稀とされてきた HFM を 4 例見出し、解析を行うことで、*SLC46A1* のイントロン 3 にある deep intronic mutation, c.1166-285T > G が、血縁関係のない 4 人の日本人 HFM 患者に共通していることを明らかにした。この変異は mRNA レベルで 168 bp のイントロン配列の挿入を生じ、premature termination を引き起こす non-leaky なスプライス変異であり、PCFT 発現と葉酸輸送能の欠如に関連していた。また、この変異はいずれも de novo 変異ではなく、日本人集団に特有の創始者変異である可能性がある。国内外のゲノムデータベースを用いた検索では、この変異は検出されなかったが、国内 3500 人、国外 1000 人のデータベースであり今後のゲノムデータの蓄積によって、変異の出現頻度と人種差が明らかになってくると考えられる。この意味で、世界中で見られるホットスポット変異である可能性も残されている。deep intronic mutation は通常的全エクソン解析では見つからず、エクソンとイントロンの境界を検索しても見つからないため、エクソンとその近傍イントロンの DNA レベルの解析だけでなく、cDNA や蛋白レベルの解析から正確に診断する必要がある。今回解析した PCFT の蛋白発現は、血球系ではほとんどみられないために解析は困難であった。また、cDNA レベルでも増幅が弱いこともあって、全長の評価は困難であったが、様々なプライマー設定と RT-PCR の条件設定によって deep intronic mutation, c.1166-285T > G に起因することが特定できた。HFM は易感染性、易出血性を有する緊急性の高い疾患であり、今回の解析結果からは、HFM を疑う患者においてはこのイントロン部位を含めた解析を最初から行い、迅速かつ正確に診断していく必要がある。実際に、今回の患者 3, 4 の遺伝子解析の際には、全てのエクソン解析に加えて、ピンポイントで c.1166-285T > G の有無を検索するシーケンス解析を組み込んだことで、患者 1, 2 に比べて迅速に *SLC46A1* の変異部位を検索でき、早期に診断することが出来た。

また、本研究では当科で症例報告を行った G189V について機能解析を行っているが、これまでの研究では、本変異は人工的に作成したものを HeLa 細胞にトランスフェクションして PCFT の発現解析と [³H]-MTX の取り込みによる葉酸輸送能の解析を行っており (Zhao et al., 2012)、本研究の結果は先行研究の結果に矛盾しない結果だった。先行研究では実際に HFM を来した変異体との比較を行っていないが、本研究では、HFM を来す 4 種類の変異体と野生型の発現、葉酸輸送能の直接比較を行っており、G189V の PCFT 発現が

他の変異体に比べてどの程度障害されているかが明らかになった。

これまでの先行研究では, p. G147R, p. R376Q, p. P425R の 3 つのミスセンス変異は, 葉酸輸送能の残存した hypomorphic mutation であると報告されている (Kronn and Goldman, 2017; Mahadeo et al., 2010; Zhao et al., 2007). しかし, G147R と P425R の PCFT の発現は欠如しており, R376Q についても, 残存活性は [^3H]-MTX あるいは [^3H]-folate では示されず, [^3H]-ペメトレキセドでのみ示されたものであること, さらに, いずれの変異をもつ患者も HFM 症状が軽症ではなかったことから, hypomorphic mutation と結論づけるのは困難と考えた. 一方, 本研究では, p. F392V をヘテロで有する患者 4 は, 生後 8 か月時までに定期健診で指摘されるような成長障害、貧血などがみられなかったことに加え, F392V 変異体は Wt とほぼ同等の PCFT 発現を示したことから, 我々は当初, p. F392V は葉酸輸送能の残存した hypomorphic mutation である可能性を考えた. しかし, MTX-FITC の取り込み能はほぼ欠如しており, その可能性は否定的であった.

MTX-FITC の取り込みを利用した PCFT の機能解析は, 従来のアイソトープを用いた解析に比較して, 簡便かつより安全に検査を行う事ができる. また, CD20 陽性細胞にゲートをかけることで, HeLa 細胞の内因性の PCFT 発現の影響も抑えることができ, MTX-FITC 取り込み能の有無を判断するのに十分な識別能を得られる検査だと考えられた. 一方で, 葉酸輸送能を MTX-FITC 取り込み能で代用しているため, わずかな葉酸輸送能を有する変異体があった場合には検出が十分にできない可能性があり, 更に検討が必要と考えられた.

本研究では folic acid か folinic acid か病院によって異なる選択がされていた. folinic acid は folate の活性型に当たるもので, MTX 治療の強い副作用に対して使用が推奨されている (van Ede et al., 2001). HFM 患者も発症時には免疫不全状態, 重症感染症, 汎血球減少, 消化管機能障害などの危機的な状態を呈し, 血清葉酸値は測定感度未満の低値を示し得るため, folinic acid の投与が推奨される. 患者 3 は folic acid の静注療法中に人工換気を要するびまん性肺胞出血をきたしており, HFM においても, 特に初期治療においては folinic acid の静注によって迅速に血清葉酸値を上げ, 危機的状況を脱することが重要と考えた. folic acid は適応症として葉酸欠乏症の他, 葉酸欠乏や代謝障害が原因と考えられる悪性貧血, 顆粒球減少症などが含まれるが, folinic acid は注射・内服製剤共に適応は葉酸代謝拮抗剤の毒性軽減のみであり, HFM 患者においては適応外使用とならざるを得ない. folate は体内で生合成ができないため, HFM 患者では恒常的な補充が必要となる. 保険適応外で定期的に補充しなければならない状況は改善す

べき喫緊の課題であり，HFM に対する folinic acid の適応拡大が必要と考えられる．びまん性肺胞出血の発症メカニズムは不明だが，HFM の危機的合併症の一つであると認識する必要がある．

HFM はこれまで世界で 35 例の文献報告という極めてまれな疾患と考えられてきた．しかし，本研究によって日本人患者 4 例に共通する遺伝子変異があり，患者 3 のように，症状にも比較的幅があり，また症状も血液，呼吸器，感染症，神経発達と多方面に及びうる．このため，潜在的な患者数はもっと多いのではないかと推測する．本研究で明らかにした本疾患の特徴や遺伝子変異の情報を医療機関で共有し，疑わしい症例を迅速に診断することで，早期治療に繋がり症例を蓄積することで本疾患の更なる解析や病態の理解が進むことと考える．

【結論】

○本邦ではこれまで申請者らが確定診断し、論文発表した 1 例のみの報告だった HFM 患者を、新たに 3 名見出して解析したところ、全ての患者に deep intronic mutation, c.1166-285T > G がみられ、この変異が日本人における創始者変異あるいは世界中でみられるホットスポットである可能性を示した。

○HFM の原因としては今まで報告のされていない, c.1174T > G, p.F392V を認め、PCFT の発現は Wt と比べて同等程度あるものの、MTX 輸送能の欠如から、PCFT の機能が欠如している事を報告した。

○従来の PCFT 機能解析は、アイソトープを使用していたが、FITC で標識した MTX を使用することで、より安全かつ簡便に解析ができることを示した。一方で、MTX-FITC の取り込み能で葉酸輸送能を代用していることから、わずかな機能残存を検出できていない可能性があり、更なる検討が必要と考えられた。

○世界で 35 例の報告のみで非常に稀と考えられていた HFM だが、今回日本人の非血縁 4 家系でいずれも両親由来の複合ヘテロ接合変異が示された。潜在的な患者や保因者は多くいる可能性がある。また、明確な治療目標や治療薬の保険適応未承認など、検討すべき課題が多くあり、今後の一層の HFM 患者の情報集積と検討が望まれる。

【謝辞】

本研究の一部は JSPS 科研費 JP16K20871 と厚生労働科学研究費から助成を受けたものである。

今回の学位研究に当たり、ご協力を頂きました患者様および患者様のご家族に深く感謝いたします。また、患者様のご紹介を頂き、患者様の貴重な検体と詳細な経過や情報を提供して頂きました高知医療センター 西内律雄先生、兵庫県立こども病院小児がん医療センター血液・腫瘍内科 石田敏章先生、福島県立医科大学小児科 鈴木雄一先生、福島県立医科大学附属病院小児腫瘍内科 佐野秀樹先生、札幌北榆病院小児思春期科 小林良二先生、岸本健治先生（現在兵庫県立こども病院小児がん医療センター血液・腫瘍内科）、小林邦彦先生、ダイレクトシーケンス解析を施行して頂きましたかずさ DNA 研究所ゲノム推進事業部 小原収先生、患者に共通する deep intronic mutation, c.1166-285T>G がどのくらいの頻度で存在するのかを、国内外のゲノムデータベースから検索して頂きました東京医科歯科大学茨城県小児・周産期地域医療学講座 今井耕輔先生、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生涯免疫難病学講座 成戸卓也先生に感謝いたします。

本研究の機会を与えて頂きご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院小児科学教室 有賀正名誉教授、真部淳教授、本研究に関して様々なご協力・ご助言を頂きました北海道大学大学院医学院専門医学系生殖・発達医学講座小児科学分野の Shima Said Mohamed Ali Abdrabou 先生、北海道大学病院歯科治療センター第二診療室 野川奈津子先生をはじめ、私の研究を支えて下さった皆様に感謝いたします。特に研究手技の獲得とその応用、研究計画の設定と方針の確認、論文作成と内容の指導など、研究全般にわたりご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院小児科学教室 山田雅文先生のご尽力があつての研究だったと深く感謝しております。

誠にありがとうございました。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

Aluri, S., Zhao, R., Lubout, C., Goorden, S.M.I., Fiser, A., and Goldman, I.D. (2018). Hereditary folate malabsorption due to a mutation in the external gate of the proton-coupled folate transporter SLC46A1. *Blood Adv.* 2, 61-68.

Atabay, B., Turker, M., Ozer, E.A., Mahadeo, K., Diop-Bove, N., and Goldman, I.D. (2010). Mutation of the proton-coupled folate transporter gene (PCFT-SLC46A1) in Turkish siblings with hereditary folate malabsorption. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 27, 614-619.

Borzutzky, A., Crompton, B., Bergmann, A.K., Giliani, S., Baxi, S., Martin, M., Neufeld, E.J., and Notarangelo, L.D. (2009). Reversible severe combined immunodeficiency phenotype secondary to a mutation of the proton-coupled folate transporter. *Clin. Immunol.* 133, 287-294.

Diop-bove, N., Jain, M., Scaglia, F., and Goldman, I.D. (2013). Short Communication A novel deletion mutation in the proton-coupled folate transporter (PCFT ; SLC46A1) in a Nicaraguan child with hereditary folate malabsorption. *Gene* 527, 673-674.

van Ede, A.E., Laan, R.F.J.M., Rood, M.J., Huizinga, T.W.J., van de Laar, M.A.F.J., Denderen, C.J. van, Westgeest, T.A.A., Romme, T.C., De Rooij, D.-J.R.A.M., Jacobs, M.J.M., et al. (2001). Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A forty-eight-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* 44, 1515-1524.

Erlacher, M., Grünert, S.C., Cseh, A., Steinfeld, R., Salzer, U., Lausch, E., Nosswitz, U., Dückers, G., Niehues, T., Ehl, S., et al. (2015). Reversible pancytopenia and immunodeficiency in a patient with hereditary folate malabsorption. *Pediatr. Blood Cancer* 62, 1091-1094.

Geller, J., Kronn, D., Jayabose, S., and Sandoval, C. (2002). Hereditary folate malabsorption: Family report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. *81*, 51-68.

Hou, Z., and Matherly, L.H. (2014). Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr. Top. Membr.* *73*, 175-204.

Jebnoun, S., Kacem, S., Mokrani, C., Chabchoub, A., Khrouf, N., and Zittoun, J. (2001). A family study of congenital malabsorption of folate. *J. Inherit. Metab. Dis.* *24*, 749-750.

Kamen, B.A., and Smith, A.K. (2004). A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *56*, 1085-1097.

Kishimoto, K., Kobayashi, R., Sano, H., Suzuki, D., Maruoka, H., Yasuda, K., Chida, N., Yamada, M., and Kobayashi, K. (2014). Impact of folate therapy on combined immunodeficiency secondary to hereditary folate malabsorption. *Clin. Immunol.* *153*, 17-22.

Kronn, D., and Goldman, I.D. (2017a). Hereditary Folate Malabsorption. *GeneReviews [Internet]* *81*, 51-68. (accessed on 19 November 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1673/>)

Lasry, I., Berman, B., Straussberg, R., Sofer, Y., Bessler, H., Sharkia, M., Glaser, F., Jansen, G., Drori, S., and Assaraf, Y.G. (2008). A novel loss-of-function mutation in the proton-coupled folate transporter from a patient with hereditary folate malabsorption reveals that Arg 113 is crucial for function. *Blood* *112*, 2055-2061.

Mahadeo, K., Diop-Bove, N., Shin, D., Unal, E.S., Teo, J., Zhao, R., Chang, M.-H., Fulterer, A., Romero, M.F., and Goldman, I.D. (2010). Properties of the Arg376 residue of the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and a glutamine mutant causing hereditary folate malabsorption. *AJP Cell Physiol.* *299*, C1153-C1161.

Mahadeo, K.M., Diop-Bove, N., Ramirez, S.I., Cadilla, C.L., Rivera, E., Martin, M., Lerner, N.B., Diantonio, L., Duva, S., Santiago-Borrero, P.J., et al. (2011). Prevalence of a loss-of-function mutation in the proton-coupled folate transporter gene (PCFT-SLC46A1) causing hereditary folate malabsorption in Puerto Rico. *J. Pediatr.* *159*, 623-627.e1.

Manea, E., Gissen, P., Pope, S., Heales, S.J., and Batzios, S. (2018). Role of intramuscular levofolate administration in the treatment of hereditary folate malabsorption: Report of three cases. *JIMD Rep.* *39*, 7-12.

Meyer, E., Kurian, M.A., Pasha, S., Trembath, R.C., Cole, T., and Maher, E.R. (2010). A novel PCFT gene mutation (p.Cys66LeufsX99) causing hereditary folate malabsorption. *Mol. Genet. Metab.* *99*, 325-328.

Min, S.H., Oh, S.Y., Karp, G.I., Poncz, M., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2008). The clinical course and genetic defect in the PCFT gene in a 27-year-old woman with hereditary folate malabsorption. *J. Pediatr.* *153*, 435-437.

Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Crow, Y.J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., et al. (2018). International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J. Clin. Immunol.* *38*, 96-128.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* *127*, 917-928.

Shin, D.S., Min, S.H., Russell, L., Zhao, R., Fiser, A., and Goldman, I.D. (2010). Functional roles of aspartate residues of the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1); a D156Y mutation causing hereditary folate malabsorption. *Blood* *116*, 5162-5169.

Shin, D.S., Mahadeo, K., Min, S.H., Diop-Bove, N., Clayton, P., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2011). Identification of novel mutations in the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) associated with hereditary folate malabsorption. *Mol. Genet. Metab.* *103*, 33-37.

Tan, J., Li, X., Guo, Y., Xie, L., Wang, J., Ma, J., and Jiang, L. (2017). Hereditary folate malabsorption with a novel mutation on SLC46A1. *Medicine (Baltimore)*. *96*, e8712.

Torres, A., Newton, S.A., Crompton, B., Borzutzky, A., Neufeld, E.J., Notarangelo, L., and Berry, G.T. (2015). CSF 5-methyltetrahydrofolate serial monitoring to guide treatment of congenital folate malabsorption due to proton-coupled folate transporter (PCFT) deficiency. In *JIMD Reports*, pp. 91-96.

Ulrich, C.M., Reed, M.C., and Nijhout, H.F. (2008). Modeling folate, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *Nutr. Rev.* *66*, 27-30.

Verbeek, M.M., Blom, A.M., Wevers, R.A., Lagerwerf, A.J., van de Geer, J., and Willemsen, M.A.A.P. (2008). Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. *Mol. Genet. Metab.* *95*, 127-132.

Wang, Q., Li, X., Ding, Y., Liu, Y., Qin, Y., and Yang, Y. (2015). The first Chinese case report of hereditary folate malabsorption with a novel mutation on SLC46A1. *Brain Dev.* *37*, 163-167.

Zhao, R., Sang, H.M., Qiu, A., Sakaris, A., Goldberg, G.L., Sandoval, C., Malatack, J.J., Rosenblatt, D.S., and Goldman, I.D. (2007). The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood* *110*, 1147-1152.

Zhao, R., Qiu, A., Tsai, E., Jansen, M., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2008). The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol. Pharmacol.* *74*, 854-862.

Zhao, R., Shin, D.S., Fiser, A., and David Goldman, I. (2012). Identification of a functionally critical GXXG motif and its relationship to the folate binding site of the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1). *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *303*, 673-681.

Zhao, R., Aluri, S., and Goldman, I.D. (2017). The proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and the syndrome of systemic and cerebral folate deficiency of infancy: Hereditary folate malabsorption. *Mol. Aspects Med.* *53*, 57-72.