

論文要旨

Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in *SLC25A13* gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency

〔 *SLC25A13* 遺伝子におけるレトロトランスポゾン様挿入を含む 13 種の新規変異
同定ならびに citrin 欠損症で見いだした 30 種の変異頻度 〕

田畑 文子

【序論および目的】

ヒト 7 番染色体に座位する *SLC25A13* 遺伝子がコードする蛋白質 citrin は 675 個のアミノ酸からなり、ミトコンドリア内膜上で、肝型アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体 aspartate glutamate carrier (AGC) として、代謝の要で機能する。常染色体劣性の遺伝性疾患である citrin 欠損症は多彩な症状を呈し、主に 2 つの病態：肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD) と成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) を示すことが知られている。NICCD 患者の症状は通常 1 歳までに消失するが、その後見かけ上健康な時期を経て、成人期に高アンモニア血症に基づく意識障害や行動異常などを示す CTLN2 に移行する例があることが明らかになりつつある。これまで CTLN2 に対し、高濃度糖質の投与による脳浮腫治療薬の危険性を明らかにする一方、有効な治療として肝移植が試みられてきた。

Citrin 欠損症は日本で発見された疾患である。今回、私たちは日本人症例と同じ変異を持つ中国・韓国・ベトナム人症例（以上 4 国を東アジアと総称する）や、これらの人種とは異なる変異を持つイスラエル人症例や白人症例を見いだした。これまで多数の citrin 欠損症を診断し、19 種の *SLC25A13* 変異を同定してきたが、まだ数%の allele における変異は明らかでない。

本研究では、国内外の citrin 欠損症を分子遺伝学的に確定診断した結果、*SLC25A13* 遺伝子上にレトロトランスポゾン様の挿入変異を含む 13 種の新規変異を同定した。さらに、既知の変異と合わせた 30 種の変異について頻度検索を行ったので、併せて報告する。

【材料および方法】

[材料] インフォームドコンセントにより書面で同意を得た後、患者あるいは家族の末梢血から、通常の方法により DNA を抽出した。一般集団の解析では、すでに同意の得られた genomic DNA、あるいは連結不可能匿名化された濾紙血サンプルから抽出した genomic DNA を用いた。また、citrin の mRNA や蛋白質の発現解析には、培養皮膚線維芽細胞あるいは肝臓組織を用いた。

[方法] 新規変異は主に RT-PCR および genomic DNA-PCR 産物を sequencing により同定し、PCR/RFLP などによる診断法を確立した。既知変異 12 種の頻度検索は、GeneScan 法や SNaPshot 法を用いたマルチ DNA 診断法 (Yamaguchi et al. Hum Mutat 2002) により解析した。一方、*SLC25A13* 遺伝子の intron 15 に存在する microsatellite DNA 多型マーカーである D7S1812 のハプロタイプピングは GeneScan 法 (Kobayashi et al. Nat Genet 1999)、他の多型解析は PCR/RFLP 法などを用いて行った。変異転写物は 3'-RACE System (Gibco BRL) を用いて解析した。さらに、変異 citrin 蛋白質の発現は、抗 citrin 抗体を用いた Western blotting (Yasuda et al. Hum Genet 2000) により解析した。

なお、本研究は、鹿児島大学医学部倫理委員会の承認を受けて行った。

【結果と考察】

1. 新規変異同定

(1) 挿入変異：日本人 CTLN2 症例で同定した[XIX]:IVS16ins3kb は、*SLC25A13* の intron 16 内に、6 染色体上にある遺伝子 (*C6orf68*) の cDNA が逆向きに挿入され、挿入配列の両側には *SLC25A13* の intron 16 に由来する 17 塩基の繰返しがあることから、レトロトランスポゾン様挿入変異であると考えられ、挿入配列内に poly(A) 添加シグナル AATAAA が存在し、insert 内で転写の終結が生じていた。この症例では、exon 17 と 18 を含まず 584 アミノ酸をコードする短い変異 citrin mRNA が合成されていると推察されたが、citrin 蛋白質の発現は検出できなかった。

(2) Splice site 変異：日本人 CTLN2 症例で見いだした新規変異[XXII]:Ex1-1G>A では、Exon 1 の最後の塩基が G から A へ変化していた。この症例ではアミノ酸に変化はないが、citrin mRNA ならびに蛋白質の発現は検出できなかった。また、intron 15 の 1 番目の G が T に変わる変異[XXV]: IVS15+1G>T は、mRNA において Exon 16 が欠失し ([Ex16del]), 485 番目のグリシンからフレームシフト (fs) が生じ 491 番目に stop codon が出現する (G485fs491X)。ユダヤ人 NICCD 症例で見いだした intron 13 の 2 番目の塩基が T から G へ変わる[XXVI]:IVS13+2T>G は、mRNA を検出できなかった (mRNA [-])。いずれも splicing site prediction (SSP) score は、[XXII]では 0.95 から <0.4 へ、[XXV]では 0.98 から <0.4 へ、[XXVI]では 0.99 から <0.4 へとそれぞれ低下していた。

(3) ナンセンス変異と欠失変異：日本人 NICCD 症例で、16 番目のコドンであるグルタミン酸が stop codon になる[XVII]:E16X、また 360 番目のコドン・アルギニンが stop codon になる [XXVIII]:R360X を同定した。[XXVIII]は、白人 NICCD 症例でも検出された。一方、日本人 CTLN2 症例で 1146 番目の塩基 A が欠失する変異[XXIII]: 1146delA (R383fs407X)、白人 NICCD 症例で 1374 か 1375 番目の塩基 G が欠失する変異[XXX]:1374/5delG (A459fs507X) を同定した。

(4) ミスセンス変異：日本人 CTLN2 症例で 546 番目のコドン・トレオニンがメチオニンに置換する [XII]:T546M、531 番目のコドン・グリシンがアスパラギン酸に置換する [XVI]:G531D、イスラエル人 NICCD 症例で 446 番目のコドン・トレオニンがプロリンに置換する[XVIII]:T446P、パキスタン人 NICCD 症例で 588 番目のコドン・アルギニンがグルタミンに置換する[XXIX]:R588Q を見いだした。

2. 変異頻度

SLC25A13 変異 30 種のうち 21 種を日本人症例で同定したが、そのうち 7 種 ([I], [II], [III], [V], [X], [XVI], [XIX]) は中国・韓国・ベトナム人症例でも同定できた。東アジア人以外の症例で 8 種の変異を見いだしたが、そのうち 1 種は日本人と白人症例に共通する唯一の変異であった。日本人症例では、[I]と[II]が高頻度に見られ、これら 2 種類を合わせると日本人症例全 allele の約 70% を占める。変異[XIX] が日本・中国・韓国人症例で比較的多くの家系 (それぞれ 22・6・8 家系) で検出されたので、一般集団の頻度検索を行ったところ、日本 (1/1372)、中国 (0/2641)、韓国 (0/2228) で 1 名の保因者が発見された。この結果、既知の変異と今回見出した変異を併せて考えると、日本における *SLC25A13* 変異を持つ保因者頻度は 21/1372 (1/65)、変異ホモ接合体頻度は 1/17,000 と計算された。

【結論】

今回、1 種類の挿入変異、3 種類の splice site 変異、2 種類のナンセンス変異、2 種類の欠失変異、5 種類のミスセンス変異の併せて 13 種類の新規変異を見いだした。その結果、citrin 欠損症は日本人特有な疾患でなく、洋の東西を問わず世界中に患者が存在することが判明した。人種によって変異の特異性が見られるが、東アジア諸国で共通に存在する変異が存在することや、新規レトロトランスポゾン様の挿入変異が日本・中国・韓国で共通して見いだされたことは、人類遺伝学的にも興味深い。東アジア諸国では保因者が多く、その頻度と人口から計算すると、少なくとも 10 万人の変異ホモ接合体が存在すると推定されるが、まだ日本以外での患者発見数は非常に少ない。したがって今後、本疾患の周知が重要であると考えられる。Citrin 欠損症患者の多くでは、離乳期から特徴的な「糖質を嫌い、蛋白質・脂質を好む」食癖が認められている。日本を除く東アジア諸国の食習慣が citrin 欠損症の病態発症をマスクしている可能性もあり、食癖と病態についてより一層の調査研究が必要であると考えられる。

Citrin 欠損症を早期に診断することは、病態の理解に基づいた適切な治療を行う上で重要であり、CTLN2 の発症予防ならびに予後を改善するために必要不可欠であると考えられる。日本人の変異ホモ接合体頻度 (1/17,000) は、NICCD 発症率 (1/17,000-34,000) とほぼ一致するが、CTLN2 発症率 (1/100,000-230,000) とは大きな解離がある。したがって、NICCD の症状消失後、CTLN2 発症に至る分子機構と要因 (遺伝的背景と環境因子) の解明は重要であり、詳細な追跡調査が必要である。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 668 号	氏名	田畑文子
審査委員	主査	竹内 亨	
	副査	佐野 輝	河野 嘉文

Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in *SLC25A13* gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency

〔 *SLC25A13* 遺伝子におけるレトロトランスポゾン様挿入を含む 13 種の新規変異同定
ならびに citrin 欠損症で見いだした 30 種の変異頻度 〕

Citrin 欠損症は、生後 1 歳までに肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD) を発症し、見かけ上健康な時期を経て、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) を引き起こす。*SLC25A13* がコードする citrin は、肝型 mitochondrial aspartate glutamate carrier として代謝の要で機能する。そのため、citrin 欠損症では、細胞質で aspartate が欠乏状態になる一方、ミトコンドリアへの NADH 還元当量の輸送障害を来し、多彩な症状が出現する。CTLN2 は予後不良の疾患として知られてきたが、最近その原因が糖質の毒性にあることが分かってきた。高アンモニア血症に対する対症療法が症状の悪化を招き、脳浮腫治療薬の投与で死に至る、つまり高濃度糖質の大量投与により、iatrogenic disease になっていたと考えられる。Citrin 欠損症では、早期の遺伝子診断と疾患の理解が誤治療を回避することに繋がり、1 つの予防法となる。多彩な症状と時期によって異なる病態を呈するため、citrin 欠損症の確定診断は容易ではない。また、19 種の既知変異では、完全に診断することはできない。

本論文は、citrin 欠損症が疑われた症例の確定診断を行おうとする過程で、13 種の新規 *SLC25A13* 変異を同定し、既知変異を含む 30 種の変異に対する頻度検索を行い、その特徴を報告したものである。

解析された検体は、インフォームドコンセント (紙面で同意) を得た後、あるいは連結不可能匿名化された後に用いられており、本研究は生命倫理・遺伝子解析の倫理委員会 (鹿児島大学医学部および大学院医歯学総合研究科、各臨床施設) の承認を受けて実施されていた。

本論文で明らかにした知見の概略は以下のとおりであった。

- (1) 日本人を中心にユダヤ人、白人、アラブ人症例から、新規に、1 種の挿入変異、2 種の欠失変異、3 種の splice site 変異、2 種のナンセンス変異、5 種の実義変異が同定された。
- (2) 唯一、ナンセンス変異の 1 つ [XXVIII]:R360X のみが、日本人と白人症例で共通に認められた。残りの変異は、東アジア人とそれ以外で異なっていた。
- (3) 新規変異のうち、日本人 CTLN2 症例で明らかにされたレトロトランスポゾン様挿入変異 [XIX]:IVS16ins3kb は、日本人の citrin 欠損症で 5 番目に高頻度に存在する変異であった。
- (4) さらに、変異 [XIX] は、日本人以外、中国・韓国人症例においても、比較的高頻度に認められた。
- (5) 日本・中国・韓国において変異 [XIX] に対する保因者検索を行い、日本人でのみ 1 名の保因者を見だし、日本人では中国と同じように、いずれかの変異を持った保因者が 1/65 と高頻度に存在する結果が得られた。

以上の結果に基づき、citrin 欠損症は日本人特有の疾患ではなく、変異は異なるが洋の東西を問わず、世界中に患者が存在すること、一方、既知変異 [I]: 851del4 と同様に新規変異 [XIX]: IVS16ins3kb がすべての東アジア人症例に見られることから、これらの変異は日本列島が朝鮮半島や中国大陸と陸続きだった古い時代に、東アジアのどこかで生じた可能性があることを考察しており、人類遺伝学的にも重要な知見である。さらに、東アジア諸国では保因者が高頻度に存在するが、日本以外での患者発見数は非常に少ないため、本研究成果は多大な情報を提供するものであると考えられ、本論文は学位論文として価値のあるものと認定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 668 号	氏名	田畑文子
審査委員	主査	竹内 亨	
	副査	佐野 輝	河野 嘉文

主査および副査の3名は、平成20年5月23日、学位請求者 田畑文子 に対して、論文の内容について質疑応答を行うとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 論文に *SLC25A13* 変異の数がいろいろと記載されているが、整理するとどうなるのか。

(回答) 既知変異19種と新規変異13種合計32種のすべてを鹿児島大学分子病態生化学分野で同定した。そのうち変異[XXXII]では、mRNAでエクソン3が完全に欠失することを見いだしているが、まだDNA上の変異部位を同定していないため、論文の2つの表 (Table 1 および 2) には入れていない。さらに、変異[XIII]は変異[]の下流にあり、citrin 蛋白質への寄与はないと考えられるため、Table 2 から除いた。つまり、32種 - 2種 = 30種の変異頻度解析結果を論文の Table 2 に示した。

質問2) 新規変異[XIX]同定に至った経緯は？ 何か特徴があったのか？

(回答) 臨床所見ならびに生化学解析データ (血漿 citrulline、arginine、threonine/serine 比の上昇、血中 pancreatic secretory trypsin inhibitor 高値、肝臓特異的 argininosuccinate synthetase 活性の低下、脂肪肝、特異な食癖など) から、P557 症例が CTLN2 であると強く疑われたため、新規変異の検索を行い、[XIX]の発見同定に至った。

質問3) Genotype と Phenotype に関連があるのか。

(回答) 今のところ、それらの間で関連性は見いだしていない。

質問4) NICCD と CTLN2 は同じ *SLC25A13* 変異によって生じるが、NICCD から CTLN2 に移行した症例は存在するのか。

(回答) CTLN2 発症患者が新生児期に NICCD を発病していたということは、数症例で分かっており、論文にも報告されている。また一方、NICCD と診断された症例が今後どのような経過を辿るのかは、現在長期追跡調査 (平成15年度から、厚生労働省・成育医療研究事業に参画) を行っているところである。

質問5) NICCD で症状が消失し、自然に良くなる時期があるのはどうしてか。

(回答) 本当の理由はまだ分かっていないが、新生児期から乳児期への成長発達に伴い、各種代謝系の酵素が発現変化し、代償機構が働いている可能性がある。例えば NADH シヤトルには、citrin 関与の malate-aspartate (MA) シヤトルの他に、グリセロリン酸 (GP) シヤトルがある。ヒトの肝臓では、MA シヤトルが主に機能しており、GP シヤトル活性は低い。GP シヤトルの発現亢進、あるいは citrin 類似蛋白質 aralar の発現などが認められれば、citrin 欠損を代償する可能性はあると考えられる。

質問6) 黄疸や胆汁うっ滞を起こすメカニズムは解明されているのか。

(回答) これも本当の理由はよく分かっていない。ビリルビンの他に γ -glutamyl transferase, alkaline phosphatase, total bile acid など上昇していることを考慮すると、胆汁排泄の未熟性から胆汁うっ滞性黄疸に類似した病態になっている可能性や、ビリルビン合成に NAD(P)H が必要であることから、ビリルビン合成が亢進している可能性が考えられる。また、NICCD では直接ビリルビン優位の黄疸が認められており、直接ビリルビンの総胆管への排泄は ATP 依存性トランスポーターが担っていることから、エネルギー代謝に関わる citrin の欠損により ATP の産生レベルが低下し、直接ビリルビンの総胆管への排泄能力が低下する可能性を示した論文もある。

質問 7) 鹿児島県では、毎年 1 万 5 千人の出生があり、小児科医は citrin 欠損症の認識も高い。しかし、今まで診断し得た NICCD 症例は 2 例だけである。保因者頻度が 65 人に 1 人、変異ホモ接合体の割合が 1 万 7 千人に 1 人であるなら、少なくとも 2 年間に 1-2 人診断されてもいいのだが、実際の患者発生数と頻度の間に解離があるのはなぜか。

(回答) NICCD は最近発見・命名された病態であり、自然治癒する症例も少なくないため、自宅で経過観察されて見過ごされている可能性がある。一方、すべての変異ホモ接合体が NICCD を発症しない可能性もあるのではないかと考える。

質問 8) 先の質問 7) に関連して、疾患遺伝子の場合、淘汰されている可能性があるのですが、必ずしもハーディ・ワインバーグの法則に従うとは限らないのではないかと。

(回答) まだ不明な部分もあるが、CTLN2 が成人発症であること、また見かけ上健康な成人が存在すること (CTLN2 の同胞 13 例、NICCD 症例の親 5 例) などから、本疾患の変異遺伝子は生殖年齢を超えて伝わるので、やはりハーディ・ワインバーグの式が使えると考える。

質問 9) 国際的に肝細胞、線維芽細胞などの臨床的サンプルを取り扱っているが、インフォームドコンセントの取り方や遺伝子倫理委員会の承認はどうしているのか。

(回答) 本研究は、鹿児島大学 (医学部および大学院医歯学総合研究科) 倫理委員会の承認を受けて、citrin 欠損症に関する説明文書と同意書を作成して実施している。肝細胞を用いた解析は日本人症例に限られているが、特に肝移植手術に際して、確定診断を行う必要があるため、臨床施設 (各施設の倫理委員会承認) で説明を行い、遺伝子解析研究の同意書を得ている。一方、国外サンプルに関しては、英訳・中国語訳した文書と同意書を作成して、対応している。

質問 10) Western blot 解析に用いた抗体のエピトープはどこか。

(回答) Citrin の N-half 領域 (1-285) に対するポリクローナル抗体をウサギで作成した。

質問 11) 線維芽細胞を用いた実験があったが、citrin の発現は肝臓特異的ではないのか。

(回答) 肝臓、心臓、腎臓と比較すると発現量は少ないが、線維芽細胞にも citrin は発現している。

質問 12) NICCD でも肝移植症例が 4 例いるが、重篤な病態には特有な遺伝子変異があるのか。

(回答) 特有な遺伝子異常はない。3 例は [II]/[II]、1 例は [II]/[XIX] の compound heterozygote であり、多くの症例で見られる頻度の高い変異であった。

質問 13) NICCD で特定のアミノ酸が上昇するが、それによって何か (脳など) 障害はでるのか？

(回答) はっきりとしたことは分かっていないが、今後さらなる検討が必要である。

質問 14) CTLN2 でアンモニア上昇時、結局どのような治療をすればよいのか。

(回答) アルギニン投与が有効であることはすでに報告されており、また分枝アミノ酸製剤 (BCAA) の投与も有効であると考え。低蛋白質・高糖質食は避け、彼らの好む食事組成 (蛋白質 : 脂質 : 糖質のエネルギー比として、2 : 4 : 4) にする。脳浮腫の場合、glyceol の代わりに、mannitol を使う。

質問 15) 論文中の Private mutation の意味は何か。

(回答) 唯一、1 家系だけで見つかった稀な変異という意味である。

質問 16) 最後に、管理栄養士として、本研究が役立ったか？ 今後どう活かせるのか。

(回答) Citrin 欠損症の研究を通して、食習慣が、遺伝子レベルで捉えられるという考え方を持てることができ、遺伝子異常などの疾患と関わっていることもあることが分かった。今後、生活習慣病などの栄養指導や食事療法を考えていく上で、大いに役立つと考える。

以上の結果から、3 名の審査委員は、学位請求者本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。