

200926184A

厚生労働省科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

高プロリン血症の臨床的多様性の解明と新しい診断治療基準  
および長期フォローアップ体制の確立

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三淵 浩

平成 22 年 (2010) 年 5 月

## 目 次

I. 研究構成員	1
II. 総括研究報告書	3
高プロリン血症の臨床的多様性の解明と新しい診断治療基準および 長期フォローアップ体制の確立 主任研究者 三渕 浩	
III. 分担研究報告	13
Proline oxidase( <i>PRODH</i> )遺伝子と P5C dehydrogenase( <i>P5CDH</i> )遺伝子の 解析 分担研究者 遠藤 文夫	
IV. 第1回 三渕班会議プログラム	19
①疾患概要 ②会議資料スライド	
V. 第2回 三渕班会議プログラム	39
①会議資料スライド	
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表、研究成果の刊行物・別刷	55

## I. 研究構成員

高プロリン血症の臨床的多様性の解明と新しい診断治療基準  
および長期フォローアップ体制の確立

研究組織

	氏名	所属施設	職名
主任研究者	三淵 浩	熊本大学医学部附属病院 新生児学寄附講座	特任教授
分担研究者	遠藤 文夫	熊本大学大学院生命科学研究部 小児科学分野	教授
分担研究者	奥山 虎之	国立成育医療センター臨床検査部	部長
分担研究者	知念 安紹	琉球大学医学部病態解析医科学講座 育成医学分野	講師
分担研究者	安東 敏彦	味の素株式会社味の素研究所	部長
研究協力者	久原 とみ子	金沢医科大学総合医学研究所 人類遺伝学研究部門生化学	教授
研究協力者	井原 健二	九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野	准教授
研究協力者	城戸 淳	熊本大学大学院生命科学研究部 小児科学分野	大学院生
研究協力者	中村 賢二	熊本大学大学院生命科学研究部 小児科学分野	大学院生

## II. 総括研究報告

高プロリン血症の臨床的多様性の解明と新しい診断治療基準および長期フォローアップ体制の確立

主任研究者：三渕 浩 熊本大学新生児学特任教授

分担研究者：遠藤 文夫 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野教授  
奥山 虎之 国立成育医療センター臨床検査部部长  
知念 安紹 琉球大学医学部病態解析医科学講座育成医学分野講師  
安東 敏彦 味の素株式会社味の素研究所部長

研究協力者：井原 健二 九州大学医学部小児科講師  
久原とみ子 金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学研究部門  
生化学教授

#### 研究要旨

遺伝性高プロリン血症はⅠ型とⅡ型の2つのタイプに分類されている。いずれも常染色体劣性遺伝性でプロリン代謝経路に異常があり血中のプロリンが上昇する。Ⅰ型ではプロリン酸化酵素（POX）の異常、Ⅱ型では P5C 脱水素酵素（P5CDH）の異常が判明している。高プロリン血症Ⅰ型の症状は報告によって一定していない。難治性のけいれん、精神発達の遅れや統合失調症を示す症例があるが、臨床症状を全く示さない報告もある。男児においては神経学的異常を呈する可能性が高い。高プロリン血症Ⅱ型でも難治性のけいれん（B6 依存性など）や精神発達の遅れを示す症例と臨床症状を全く示さない報告がある。プロリン代謝異常と臨床症状との関連は不明な点が多く、発生頻度も不明であった。そこでわれわれは一次調査として全国の大学病院、基幹病院にアンケート調査を行い、高プロリン血症の実態を調査した。結果、高プロリン血症Ⅱ型1例が判明したが、Ⅰ型はアンケート調査では確認できなかったが、文献的には2例報告を認めた。従来の報告通り非常にまれな疾患であることが示唆されたが、無症状例である可能性も残る。頻度確認にはスクリーニングによる調査や健康人による調査が必要と考えられた。Ⅱ型の1例はインフルエンザ脳症を発症したことで診断されていた。このことは高プロリン血症Ⅱ型においては、けいれん閾値の低下、脳症感受性の亢進が示唆された。

別に、プロリン代謝に関連して新しい知見が報告されている。プロリン代謝と腫瘍の増殖、抑制、低栄養ストレス反応、子宮内胎児発育などである。

今後は健康人のスクリーニングを行うこと、発達障害、けいれんや統合失調症など比較的頻度の高い疾患の中での高プロリン血症の調査とともに、プロリン代謝と細胞レベルでの研究、ヒトでの子宮内発育遅延の研究との連携が臨床的に非常に重要なことと思われた。

#### A. 研究目的

これまで、遺伝性高プロリン血症はⅠ型とⅡ型の2つのタイプに分類されている。いずれも常染色体劣性遺伝性でプロリン代謝経路に異常があり血中のプロリンが上昇する。Ⅰ型ではプロリン酸化酵素（POX）の異常、Ⅱ型では P5C 脱水素酵素の異常が判明している<sup>1)</sup>。しかし、遺伝性高プロリン血症の正確な頻度は不明である。その理由として新生児期にスクリーニング

が実施されていないことにある。先進各国においても同様の状況である。小児における発達障害と高プロリン血症との関係、さらには成人における精神疾患（統合失調症、抑うつ症状）と高プロリン血症の関係が明らかにされたのはこの数年であり<sup>4)-6)</sup>、それまで血液中のプロリン値の変動は臨床医学ではあまり注目されてこなかった。技術的あるいは経費的な理由から血液中のプロリンを広範囲の集団で測定することも達成され

ていない。

臨床症状に関しても、I型高プロリン血症の症状は報告によって一定していない<sup>4)</sup>。難治性のけいれんや精神発達の遅れを示す症例があるが、臨床症状を全く示さない報告もある。男児においては神経学的異常を呈する可能性が高い。II型高プロリン血症でも難治性のけいれん（B6依存性など）や精神発達の遅れを示す症例と臨床症状を全く示さない報告がある<sup>7)8)</sup>。プロリン代謝異常と臨床症状との関連は不明な点が多かった。このことも血中プロリン値の測定がこれまでの新生児マススクリーニングの対象疾患として取り上げられてこなかったことから、プロリンの異常における症状の全体像の把握が遅れていたといえる（方法の項：図1参照）。

そこで本研究においてはコホート研究によって高プロリン血症の諸問題を観察する。また味の素株式会社において開発されたLC/MS法によるアミノ酸の測定法を採用しアミノ酸測定にかかるコストと被験者への負担（採血量が多いこと）を軽減することでこのようなコホート研究が可能になる。高プロリン血症の

（1）発生状況の現状把握、（2）新規の診断基準の作成、（3）簡易診断方法の開発、（4）今後のフォローアップ体制の試案提案を目的とする。

今後、タンデムマス法を利用した新規のマススクリーニングの進展や健康管理におけるアミノ酸の測定が普及するするとともに、血中プロリンの増加を伴う疾患における新規の診断基準の作成や有効な治療方法を確立していくものと思われる。

## B. 研究方法

様々な集団を対象として血中プロリン値の測定を行う。これまでに判明している高プロリン血症の臨床像と発生状況（図1）からみて新生児、学童期を中心とした小児期、成人期を対象年齢とした集団でのプロリン血症の観察を行う。

### （1）新生児期でのスクリーニング（タンデムマス法の利用）

平成20年までの新生児マススクリーニングの研究

において、熊本を中心とする九州地域において血液中のアミノ酸をタンデムマス法で測定する技術が確立している。本研究においては、新生児マススクリーニングの対象者のなかでこの研究の意義に同意し、血液中のプロリンの測定に同意した被験者において血液中のプロリンを測定する。予備的な検討において正常範囲などを検証するとともに次の段階では血液中のプロリン値からみた重症度判定、遺伝子変異の確定などを含む調査を実施する。これらの詳細な研究によって将来にわたって我が国で指針となりうる判定基準の作成を目指す。

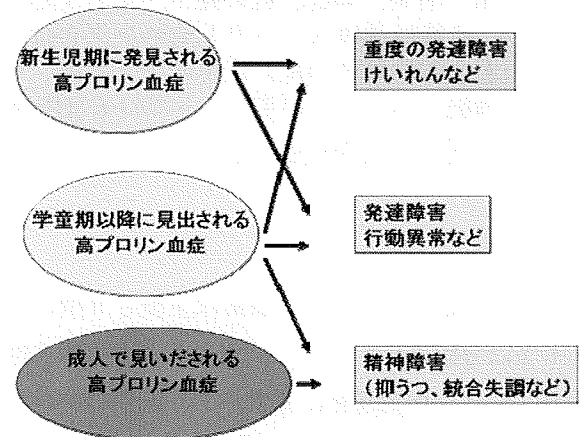
### （2）学童期前後での血中アミノ酸の測定（LC/MS法の利用）

インフォームドコンセントを得た小児において採血を行い、LC/MS法を用いて血中アミノ酸の測定を行う。同時に、アンケート調査によって社会的行動についての基礎的データを収集する。

### （3）成人におけるアミノ酸の測定

健康診断・人間ドックなどでインフォームドコンセントを得て採血を行いLC/MS法を用いて血中アミノ酸の測定を行う。同時に、アンケート調査によって社会的行動についての基礎的データを収集する。

図1 プロリン酸化酵素の活性的低下による高プロリン血症の臨床的観察の結果は多彩で様々な程度の障害の存在を示唆している



### （4）新規アミノ酸測定方法の臨床応用

現在のアミノ酸測定方法は高コストでかつ比較的大量の血液試料を必要としている。上述のように本研究では2種類の新規アミノ酸測定方法の臨床応用を検討す

る。その1はLC/MS（液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー）法である。この技術は味の素株式会社が開発したもので、これまでのアミノ酸分析方法と比較すると測定時間がおよそ10分の1、必要とする資料がおよそ10分の1で、測定コストはおよそ3分の1に下げることが可能である。種々のアミノ酸代謝異常症患者におけるアミノ酸プロファイルを詳細に検討するにはこれまでの測定方法ではコストと試料採取（量的問題）の点で困難があった。新規LC/MS方法は我が国で開発されたもので、この方法を用いて種々の疾患の病態を解明することは本研究での大きな目的の一つである。もう一つの方法は新生児スクリーニングで使用されるタンデムマス法である。この方法についても疾患発見に有用であるかの検証を行う。

研究の進め方としては以下の手順で行う。

- (1) 上記1～3の研究を進めるとともに文献調査、アンケート調査を実施し、我が国における高プロリン血症の発生状況を調査する。これらの研究から発生状況を把握する。
- (2) 高プロリン血症の発生状態をもとに本疾患のスクリーニングの有効な方法について検討する。
- (3) 長期フォローアップ体制を整えるとともに年長児～成人における症例の観察を進め、長期の治療あるいは支援体制の試案を作成する。
- (4) 研究グループを拡大し(3)で作成した体制案のパイロット試験としての実施を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では段階に応じた倫理面の配慮が必要である。最初の実態調査においては匿名化した調査を行い個人情報情報は保護される。資料の採取、保存においては文書によるインフォームド・コンセントを受ける。新生児のマススクリーニングにおいては被験者の健康保持、被害防止のため実名による検査が必要である。被験者の保護者に文書によるインフォームド・コンセントを受ける。学童期における調査では本人および保護者に

文書によるインフォームド・コンセントを受ける。成人における調査では本人に文書によるインフォームド・コンセントを受ける。検査結果については被験者の健康保持、被害防止につながる場合は本人に開示される。上記はすべて下記指針を遵守する。

### C. 研究結果

まず、患者実数把握のために全国の大学および基幹的病院1000施設に一次アンケート調査を行った。70%の回収率において、1例（高プロリン血症Ⅱ型）を確認した。高プロリンⅠ型は確認できなかった。高プロリン血症Ⅱ型の1例の2次調査において以下のことが明らかとなった。症例は4歳男児で両親血族結婚なし、兄が11カ月時にSIDSで死亡している。既往歴に特記すべきことなく、けいれんの既往もない。生来やや小柄であったが発達は正常であった。4歳1カ月時に発熱、全身けいれん、意識障害で某病院に入院。インフルエンザAと判明し、同時にインフルエンザ脳症と診断され高次医療機関に入院となっている。血液のアミノ酸分析でプロリン 2767 $\mu$ M、オルニチン 211 $\mu$ M、尿中 P5C 陽性が判明した。その後、症状は軽快したが上記アミノ酸異常は持続し、高プロリン血症Ⅱ型と診断されている。その後はけいれんはおこらなくなる。食事療法などの治療もせず経過観察中で、IQ 96で正常発達を認めている。遺伝子検査はなされていない<sup>9)10)</sup>。表1に概略を示す。

診断年齢、性別	4歳、男
家族歴	両親の血族結婚なし、兄が11カ月にSIDSで死亡
既往歴	特記すべきことなし けいれんの既往なし
発育歴	やや小柄、発達は正常
発症の状況	インフルエンザ脳症
血中プロリン値	非常に高い (2767 $\mu$ M)
尿中 P5C	陽性
その後の経過	けいれんなし 食事療法など治療なしで正常発達

表1：高プロリン血症Ⅱ型例の概要



高プロリン血症 I 型については日本で 2 例 1987 年を認めているが、90 歳と高齢であり、健康上の問題と 1991 年に報告されていることが文献調査においての因果関係は不明である。

明らかとなった<sup>11)12)</sup>。1987 年の報告は染色体異常を伴うもので、POX 活性の低下と高プロリン血症を認めているが、臨床症状との関連ははっきりしない。1992 年の報告は 9 歳女児で光過敏性てんかんを合併していた。7 歳よりけいれんと言葉、運動の障害が認められている。血中プロリンは正常値の 3-4 倍に上昇しており、尿中にはプロリンのみ高排泄であった。肝での POX 活性が正常対照の 23.5% に低下していた。プロリン制限食は効果がなかった。いずれも 20 年以上前の症例であり、その後の詳細は不明である。

健康人の調査では人間ドッグにおいて 500 人の血中アミノ酸を調査した。血中プロリン値は正規分布をとるが (51-271 $\mu$ M) 中には +2.5SD 以上の人がある。また老健施設において高プロリン血症疑い例 1 例

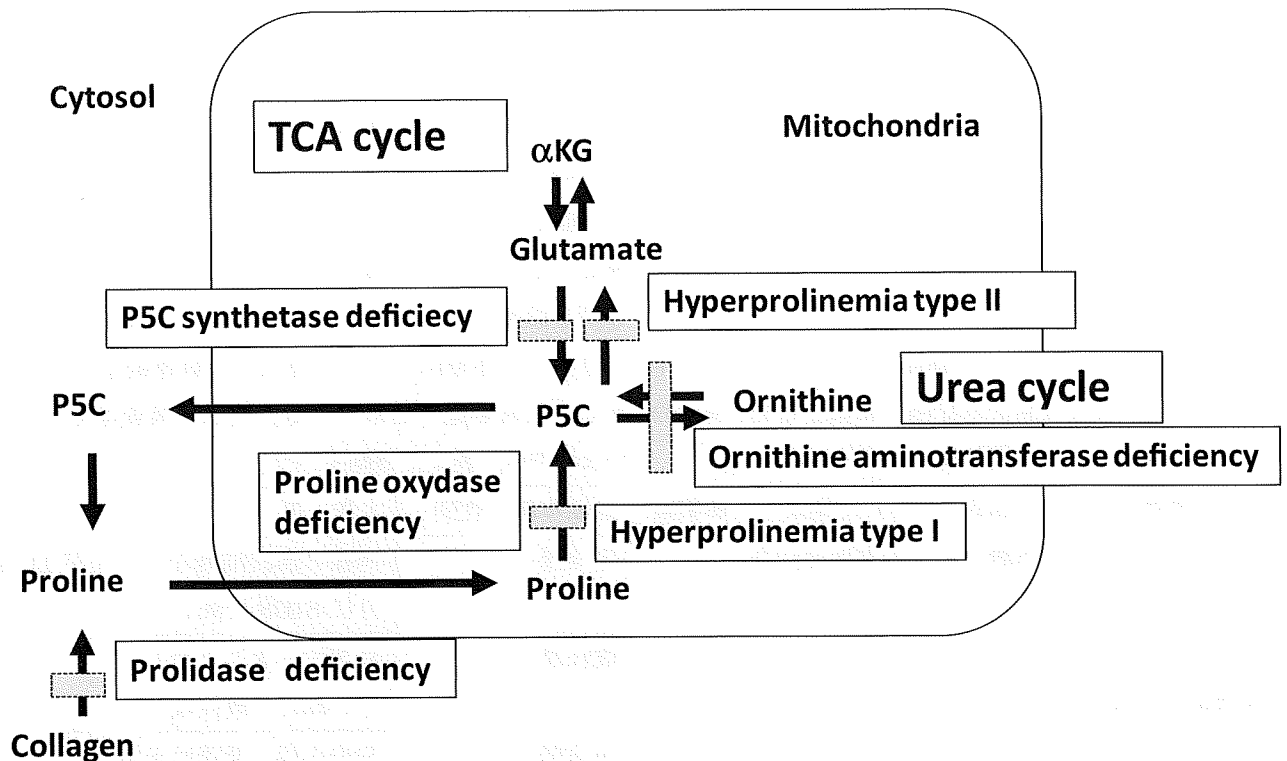


図 2：プロリン代謝マップ

D. 考察

遺伝性高プロリン血症には I 型 ([MIM239500]hyperprolinemia, type1) と II 型 ([MIM239510]hyperprolinemia, type2) の 2 つのタイプが記載されている。いずれもプロリン代謝経路に異

常があり、血中プロリンが上昇する (図 2)。I 型では proline oxidase が欠損している。II 型では  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) dehydrogenase が欠損している<sup>1)3)</sup> (表 2)。両酵素ともに遺伝子が同定され、いずれも常染色体劣性遺伝である<sup>13)14)</sup>。I 型高プロリン血症の臨床症状は報告によって一定していな

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

い。臨床症状を全く示さない例から、難治性けいれんか、非特異的な臨床症状あるいは無症状のために見逃や精神発達遅滞を示す例が報告されている。今回の調査ではまず遺伝性高プロリン血症の実態を把握し、個々の症例の状態を把握することが重要と考え、調査を行った。結果に示したように、II型患者のみ1例確認され、I型患者は今回の調査では発見されなかった。症例報告においては、20年前の症例が2例報告されたのみであった。このことは本疾患が非常にまれであるか、非特異的な臨床症状あるいは無症状のために見逃されているかと思われる。海外の報告では酵素の完全欠損例も報告されており、致死的であるためにまれな疾患となる可能性はない。また、海外の報告では、新生児スクリーニングがケベック行われ250万人の新生児で高プロリン血症は発見されなかった<sup>15)</sup>。症例報告の中では、精神運動発達遅滞、てんかん、自閉症の例で高プロリン血症と診断された例がある<sup>16)17)</sup>。したが

	P5C syntase	P5C reductase	OAT	Proline oxidase	P5C dehydrogenase	Prolidase
EC	None	EC1.5.1.2	EC2.6.1.13	None	EC1.5.1.12	EC3.4.13.9
Subcellular location	Mitochondrial inner membrane	Cytoplasm? membrane assoc	Mitochondrial matrix	Mitochondrial inner membrane	Mitochondrial matrix	Cytoplasm
Subunit size (kDa)	81	32/35	49	63	62	54.3
Structure	Hexamer	Homopolymer	Homohehexamer	Unknown	Homodimer	Homodimer
Cofactors	ATP, NAD(P)H	NAD(P)H	Pyridoxal phosphate	Unknown	NAD+	Mn2+, Co2+, Mg2+, Fe2+
Activity in tissues	Small intestine mucosa, colon Pancreas, Brain Thymus	Ubiquitous	Ubiquitous	Liver, Kidney, Brain	Ubiquitous	Ubiquitous
Disease association	Hypoprolinemia		Gyrate atrophy	HPI	HPH	Prolidase deficiency
Genbank accession	U76542/U68758	P32322		U79754 AF120278.1	U24266	
Map location	10q24.3 to 24.6	17/1	10q26	22q11.2	1p36	19q12 to 13.11
mRNA(kb)	3.6	1.8/1.85	2.0	2.4	3.2	2.1 to 2.2
ORF(bp)	2385/2379	957/960	1317	1800	1689	1479
Comments	Two isoforms results from alternative splicing	Two isoforms encoded by separate genes				

表2：プロリン代謝関連疾患の概要

って、本症は非常にまれでしかも非特異的な症状のために認識されていない例が多く、患者として把握されていないものと考えられる。診断基準については後述するが、発達障害の中に本症がいる認識のもとにアミノ酸検査を行うことが重要と考えられた。また、調査で明らかになったように、II型がインフルエンザ脳症の中で発見されている。インフルエンザ脳症は、インフルエンザウイルスによる重篤な合併症の一つで毎年、数百人の発症が報告されている。インフルエンザウイルスに対する免疫反応異常が主な病態であり、サイトカインストームにより、中枢神経障害や多臓器不

全をきたす。しかし、インフルエンザ脳症の中に、先天性代謝異常症が含まれていることが知られている。特にカルニチンや脂肪酸の代謝異常症では、ライ様症候群を引き起こすことがあり、インフルエンザがきっかけとなり発症することも少なくない。ミトコンドリア障害をきたす代謝障害であれば同じような脳症を起こす可能性がある。今回、II型においてインフルエンザ脳症と似たような症状を呈したことは興味深いことである。けいれん重積により発症しているが、後遺症なく生存していることより、けいれん閾値の低下など本来のインフルエンザ脳症の病態とは異なるも

のかも知れない。いずれにせよ高プロリン血症Ⅱ型において、無症状であってもけいれんリスクがあり、発熱など何らかの負荷がかかった時にその危険が増すものと考えられる。さらにインフルエンザ脳症において、高プロリン血症の可能性を考えておくことが重要である。

これまでの文献報告<sup>18)~31)</sup>から遺伝性高プロリン血症診断のプロセスを考える。高プロリン血症に特有な症状はないので、血中あるいは尿中のアミノ酸分析および尿中 P5C の検出が決め手となる。けいれんや発達障害、急性脳症などの報告もあり、このような症例では一般的なスクリーニングとして血中および尿中のアミノ酸分析を行う必要がある。血中プロリン値は高プロリン血症Ⅰ型において持続的に高値を示し、通常正常（51–271 $\mu$ M）の5–10倍（500–2600 $\mu$ M）と報告されている。Ⅱ型ではⅠ型より高く500–3700 $\mu$ Mで通常1500 $\mu$ M以上と報告されている。ただし、高乳酸血症を呈する疾患では2次的に高プロリン血症を合併することがあり注意を要する。Ⅰ型とⅡ型の鑑別は図2に示すようにⅡ型はP5C脱水素酵素の異常であり、P5Cが上昇し尿中にP5Cが排出される。したがって尿中にP5Cが検出されなければⅠ型、検出されればⅡ型と診断できる（表3）。

	症状	血中プロリン値 ( $\mu$ M)	尿中 P5C
正常		51–271	検出せず
Ⅰ型	無症状 けいれん 発達障害 急性脳症	500–2600	検出せず
Ⅱ型	無症状 けいれん 発達障害 急性脳症	500–3700 通常 1500 以上 (オルニチンの 上昇)	+ 尿 オルソア ミノベンズ アルデヒド 反応 尿 GC/MS

表3：遺伝性高プロリン血症の診断指針

尿中のP5Cの検出はオルソアミノベンズアルデヒド反応により尿が橙黄色の発色を呈する。最近はGC/MSを用いてP5Cの検出が可能である<sup>10)</sup>。また、Ⅱ型では血中オルニチンも上昇する。酵素活性の測定は培養リンパ球、末梢白血球、培養線維芽細胞を用いて可能である。また、遺伝子も単離されており、遺伝子解析も可能である。

治療指針については不明な点が多い。Ⅰ型はプロリン制限食が試みられ、血中プロリンの低下が達成されているが、その効果は不明である。無症状の例も多く、食事療法は必要ないとする意見もある。Ⅱ型については食事療法による血中プロリンの降下も困難とされ、その効果も不明である。

最後にプロリン代謝における最近の知見を文献から考察する。まずはPOX異常と発達障害、自閉症、統合失調症との関係は明らかになっている。22q11deletion syndromeにおいては*PRODH*遺伝子のヘテロの欠失を伴うことがほとんどである。プロリン高値を示す例があり、血中プロリンレベルとIQの間に逆の相関が見出された。*PRODH*遺伝子の両アレルの変異例での神経学的障害も報告されている。Afenjarらは既存の報告も含めて8例について検討している。全例に精神運動発達遅滞を認め、半数に自閉傾向、半数にけいれんを認めている。そこから、精神運動発達遅滞や自閉症、けいれんといった比較的頻度の高い疾患の中に高プロリン血症が隠れている可能性が高く、このような疾患においても血中プロリンを測定すべきと結論している。高プロリン血症Ⅱ型は難治性けいれんと精神発達遅滞を示すことで知られているが不明の点も多い。ラットでは血中のプロリン高値は脳内では酸化ストレスを誘導することが報告されている。このことは高プロリン血症が人においても何らかの神経学的機能異常を引き起こす可能性が高いことを示唆するものであろう。

さらに興味あることに、*PRODH*遺伝子異常と統合失調症が関連していることが明らかとなった。統合失調症のリンケージ分析で22q11部位が候補となり、実際22q11.2欠失症候群において統合失調症が合併症として認識されており、欠失部位の候補遺伝子として*PRODH*遺伝子が注目された。Jacquetらは*PRODH*遺伝

子の L441P、L289M 変異と統合失調症との関係を明らかにしている。その後も数々の変異が確認されている。POX 遺伝子の異常と脳の構造以上の関係も示唆されている。

もうひとつの重要な局面は、プロリン代謝と細胞増殖、抑制、分化に対する制御機構の関連である<sup>32)-38)</sup>。POX はアポトーシスや細胞周期の停止により、腫瘍形成、腫瘍増殖を抑制する。腫瘍細胞では POX の発現が抑制されており、POX の誘導が抗腫瘍薬の可能性があると示唆されている。上記のメカニズムは低栄養ストレスに対するプロリン代謝の役割とも関連している。プロリンは p53、PPAR  $\gamma$  (Peroxisome proliferators-activated receptor gamma)、mTOR (Mammalian target of rapamycin) によって誘導される。低栄養状態では mTOR で主に誘導され、細胞外マトリックスであるコラーゲンを分解することによって、ATP を産生し、細胞のエネルギーレベルを維持する。

さらにプロリン代謝と胎児の子宮内発育不全との関係が明らかにされつつある。ブタ、ヒツジにおいて羊水や胎盤内でのプロリンおよび POX 活性が低下すると胎仔の子宮内発育遅延がおこること、プロリン代謝産物から、胎盤の成長に重要なポリアミンが合成されることが明らかになった。

以上のようにプロリン代謝の重要性、高プロリン血症の病態は解明されつつあるが、その実態はまだまだ不明の点が多い。今後も正常集団の中の高プロリン血症の検索、発達障害や精神疾患の中での検索、診断後の長期のフォローが必要と思われる。本研究は短期間であったが上記方針の決定に貢献したものと考えられる。

#### E. 結論

高プロリン血症は日本人においても非常にまれな疾患であることが示唆されたが、無症状例や精神神経疾患の中に未診断で存在している可能性も高い。したがって頻度確認にはスクリーニングによる調査や健康人による調査と精神神経疾患などのハイリスク例での検査が必要と考えられた。今回の調査では高プロ

リン血症においては、けいれん閾値の低下、脳症感受性の亢進が示唆された。プロリン代謝と発達障害、精神疾患、腫瘍の増殖、抑制、低栄養、子宮内胎児発育などとの関連が明らかにされている。今後も継続して、これらのことを明らかにすることも、重要なことと思われた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

#### I. 参考文献

- 1) Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):2016S-2020S.
- 2) Endo F. Hyperprolinemia. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu.* 2001;(33):838-9.
- 3) Phang, J. M., Chien-an, A. H., Valle, D. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II.* New York: McGraw-Hill 8th ed. 1820-1838, 2001.
- 4) Humbertclaude, V., Rivier, F., Roubertie, A., Echenne, B., Bellet, H., Vallat, C., Morin, D. Is hyperprolinemia type I actually a benign trait? Report of a case with severe neurologic involvement and vigabatrin intolerance. *J. Child Neurol.* vol. 16, 622-623, 2001.
- 5) Afenjar, A., Moutard, M.-L., Doummar, D., Guet,

- A., Rabier, D., Vermersch, A.-I., Mignot, C., Burglen, L., Heron, D., Thioulouse, E., de Villemeur, T. B., Champion, D., Rodriguez, D. Early neurological phenotype in 4 children with biallelic PRODH mutations. *Brain Dev.* vol. 29, 547-552, 2007.
- 6) Jacquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., Bou, J., Petit, P., Champion, D., Frebourg, T. PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum. Molec. Genet.* vol. 11, 2243-2249, 2002.
- 7) Goodman, S. I., Mace, J. W., Miles, B. S., Teng, C. C., Brown, S. B. Defective hydroxyproline metabolism in type II hyperprolinemia. *Biochem. Med.* vol. 10, 329-336, 1974.
- 8) Pavone, L., Mollica, F., Levy, H. L. Asymptomatic type II hyperprolinaemia associated with hyperglycinaemia in three sibs. *Arch. Dis. Child.* vol. 50, 637-641, 1975.
- 9) Kato Y, Ihara K, Miyako K, Kuhara T, Inoue Y, Hara T. Acute encephalopathy associated with influenza virus infection in a patient with hyperprolinaemia type II. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(5):789-90.
- 10) Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Aug;855(1):42-50. Epub 2007 Mar 31.
- 11) Oyanagi, K., Tsuchiyama, A., Itakura, Y., Tamura, Y., Nakao, T., Fujita, S., Shiono, H. Clinical, biochemical and enzymatic studies in type I hyperprolinemia associated with chromosomal abnormality. *Tohoku J. Exp. Med.* vol. 151, 465-475, 1987.
- 12) Ishikawa, Y., Kameda, K., Okabe, M., Imai, T., Nagaoka, M., Minami, R. A case of type I hyperprolinemia associated with photogenic epilepsy. *No To Hattatsu* vol. 23, 81-86, 1991.
- 13) Campbell, H. D., Webb, G. C., Young, I. G. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* sluggish-A (proline oxidase) gene maps to 22q11.2, and is a candidate gene for type-I hyperprolinaemia. *Hum. Genet.* vol. 101, 69-74, 1997.
- 14) Hu, C. A., Lin, W.-W., Valle, D. Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* vol. 271, 9795-9800, 1996.
- 15) Auray-Blaos C, Cyr D, Drouin R. Quebec neonatal mass urinary screening programme: from micromolecules to macromolecules. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):515-21.
- 16) Afenjar, A., Moutard, M.-L., Doummar, D., Guet, A., Rabier, D., Vermersch, A.-I., Mignot, C., Burglen, L., Heron, D., Thioulouse, E., de Villemeur, T. B., Champion, D., Rodriguez, D. Early neurological phenotype in 4 children with biallelic PRODH mutations. *Brain Dev.* vol. 29, 547-552, 2007.
- 17) Di Rosa, G., Pustorino, G., Spano, M., Champion, D., Calabro, M., Aguenouz, M., Caccamo, D., Legallic, S., Sgro, D. L., Bonsignore, M., Tortorella, G. Type I hyperprolinemia and proline dehydrogenase (PRODH) mutations in four Italian

- children with epilepsy and mental retardation. *Psych. Genet.* vol. 18, 40-42, 2008.
- 18) Jacquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., Bou, J., Petit, P., Campion, D., Frebourg, T. PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum. Molec. Genet.* vol. 11, 2243-2249, 2002.
- 19) Flynn, M. P., Martin, M. C., Moore, P. T., Stafford, J. A., Fleming, G. A., Phang, J. M. Type II hyperprolinaemia in a pedigree of Irish Travellers (nomads). *Arch. Dis. Child.* vol. 64, 1699-1707, 1989.
- 20) Jaeken, J., Goemans, N., Fryns, J.-P., Francois, I., de Zegher, F. Association of hyperprolinaemia type I and heparin cofactor II deficiency with CATCH 22 syndrome: evidence for a contiguous gene syndrome locating the proline oxidase gene. *J. Inherit. Metab. Dis.* vol. 19, 275-277, 1996.
- 21) Goodman, B. K., Rutberg, J., Lin, W. W., Pulver, A. E., Thomas, G. H., Geraghty, M. T. Hyperprolinaemia in patients with deletion (22)(q11.2) syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* vol. 23, 847-848, 2000.
- 22) Jacquet, H., Berthelot, J., Bonnemains, C., Simard, G., Saugier-veber, P., Raux, G., Campion, D., Bonneau, D., Frebourg, T. The severe form of type I hyperprolinaemia results from homozygous inactivation of the PRODH gene. *J. Med. Genet.* vol. 40, e7, 2003.
- 23) Geraghty, M. T., Vaughn, D., Nicholson, A. J., Lin, W.-W., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Flynn, M. P., Valle, D., Hu, C. A. Mutations in the delta-1-pyrroline 5-carboxylase dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia. *Hum. Molec. Genet.* vol. 7, 1411-1415, 1998.
- 24) Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., Nebert, D. W. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* vol. 9, 421-434, 1999.
- 25) Baron, M. Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am. J. Hum. Genet.* vol. 68, 299-312, 2001.]
- 26) Bender, H.-U., Almashanu, S., Steel, G., Hu, C.-A., Lin, W.-W., Willis, A., Pulver, A., Valle, D. Functional consequences of PRODH missense mutations. *Am. J. Hum. Genet.* vol. 76, 409-420, 2005.
- 27) Chakravarti, A. A compelling genetic hypothesis for a complex disease: PRODH2/DGCR6 variation leads to schizophrenia susceptibility. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol. 99, 4755-4756, 2002.
- 28) Gogos, J. A., Santha, M., Takacs, Z., Beck, K. D., Luine, V., Lucas, L. R., Nadler, J. V., Karayiorgou, M. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nature Genet.* vol. 21, 434-439, 1999
- 29) Jacquet, H., Rapoport, J. L., Hecketsweiler, B., Bobb, A., Thibaut, F., Frebourg, T., Campion, D. Hyperprolinemia is not associated with childhood onset schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* vol. 141B, 192-only, 2006.

- 30) Li, T., Ma, X., Sham, P. C., Sun, X., Hu, X., Wang, Q., Meng, H., Deng, W., Liu, X., Murray, R. M., Collier, D. A. Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. *Am. J. Hum. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* vol. 129B, 13-15, 2004.
- 31) Liu, H., Heath, S. C., Sobin, C., Roos, J. L., Galke, B. L., Blundell, M. L., Lenane, M., Robertson, B., Wijsman, E. M., Rapoport, J. L., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol. 99, 3717-3722, 2002.
- 32) Liu Y, Borchert GL, Donald SP, Diwan BA, Anver M, Phang JM. Proline oxidase functions as a mitochondrial tumor suppressor in human cancers. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6414-22.
- 33) Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Phang JM. Proline oxidase, a p53-induced gene, targets COX-2/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor growth in colorectal cancers. *Oncogene.* 2008 Dec 4;27(53):6729-37.
- 34) Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids.* 2008 Nov;35(4):681-90.
- 35) Maxwell SA, Kochevar GJ. Identification of a p53-response element in the promoter of the proline oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):308-13.
- 36) Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Hu CA, Phang JM. Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene.* 2006 Sep 14;25(41):5640-7.
- 37) Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM. Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J Cell Biochem.* 2009 Jul 1;107(4):759-68.
- 38) Wu G, Bazer FW, Datta S, Johnson GA, Li P, Satterfield MC, Spencer TE. Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development. *Amino Acids.* 2008 Nov;35(4):691-702.

### Ⅲ. 分担研究報告



高プロリン血症の臨床的多様性の解明と新しい診断治療基準および長期フォローアップ体制の確立  
—Proline oxidase (*PRODH*) 遺伝子と P5C dehydrogenase (*P5CDH*) 遺伝子の解析—

分担研究者：遠藤 文夫 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野教授  
奥山 虎之 国立成育医療センター臨床検査部部長  
知念 安紹 琉球大学医学部病態解析医科学講座育成医学分野講師  
安東 敏彦 味の素株式会社部長

研究要旨

遺伝性高プロリン血症は I 型と II 型の 2 つのタイプに分類されている。I 型ではプロリン酸化酵素 (POX) の異常、II 型では P5C 脱水素酵素の異常が判明している。それぞれ *PRODH* 遺伝子と *P5CDH* 遺伝子にコードされていることが明らかになっている。*PRODH* 遺伝子は 22q11.2 領域にマッピングされ、mRNA は 2.4kb で ORF (open reading frame) は 1800bp である。一方、*P5CDH* 遺伝子は 1p36 領域にマッピングされ mRNA は 3.2kb で ORF は 1689bp である。

I 型高プロリン血症の症状は報告によって一定していない。難治性のけいれんや精神発達の遅れを示す症例があるが、臨床症状を全く示さない報告もある。II 型高プロリン血症でも難治性のけいれん (B6 依存性など) や精神発達の遅れを示す症例と臨床症状を全く示さない報告がある。プロリン代謝異常と臨床症状との関連は不明な点が多い。責任遺伝子の異常と臨床型との関係は欧米においては文献から整理すると、酵素活性が著しく障害される例において、発達障害、けいれん、統合失調症との強い関連が示唆された。軽度の活性低下においては統合失調症との関連はあるが、発達障害やけいれんとの関係は薄れている。日本における遺伝子解析も重要であるが、データはない。したがって我が国においても高プロリン血症の遺伝型、統合失調症における *PRODH* 遺伝子異常を明らかにすることは非常に重要であり、今回、その体制作りのための研究を行った。

A. 研究目的

これまで、遺伝性高プロリン血症は I 型と II 型の 2 つのタイプに分類されている。いずれも常染色体劣性遺伝性でプロリン代謝経路に異常があり血中のプロリンが上昇する。I 型ではプロリン酸化酵素 (POX) の異常、II 型では P5C 脱水素酵素の異常が判明している。臨床症状に関しても、I 型高プロリン血症の症状は報告によって一定していない。難治性のけいれんや精神発達の遅れを示す症例があるが、臨床症状を全く示さない報告もある。男児においては神経学的異常を呈する可能性が高い。II 型高プロリン血症でも難治性のけいれん (B6 依存性など) や精神発達の遅れを示す症例と臨床症状を全く示さない報告がある。プロリ

ン代謝異常と臨床症状との関連は不明な点が多かった。このことも血中プロリン値の測定がこれまでの新生児マススクリーニングの対象疾患として取り上げられてこなかったことから、プロリンの異常における症状の全体像の把握が遅れていたといえる<sup>1)2)</sup>。

そこで本研究においてはコホート研究によって高プロリン血症の諸問題を観察する。また味の素株式会社において開発された LC/MS 法によるアミノ酸の測定を採用しアミノ酸測定にかかるコストと被験者への負担 (採血量が多いことを軽減することでこのようなコホート研究が可能になる。高プロリン血症の (1) 発生状況の現状把握、(2) 新規の診断基準の作成、(3) 簡易診断方法の開発、(4) 今後のフォローアップ体制の試案提案を目的とする。

その中で本分担研究において遺伝子診断を行い、我

が国における高プロリン血症の遺伝子異常の状況、臨床症状との関連を明らかにする。

（倫理面への配慮）

## B. 研究方法

まず、全国の基幹病院にアンケート調査を行い、高プロリン血症の実態把握を行う。その中で遺伝子検査の希望があれば遺伝子検査を行い、遺伝子変異と臨床症状の比較、既存の報告（欧米例）との変異の違いを検討する。さらに様々な集団を対象として血中プロリン値の測定を行う。これまでに判明している高プロリン血症の臨床像と発生状況からみて新生児、学童期を中心とした小児期、成人期を対象年齢とした集団でのプロリン血症の観察を行う。そのなかでこの研究の意義に同意し、遺伝子解析に同意した被験者において遺伝子変異の確定などを含む調査を実施する。これらの詳細な研究によって将来にわたって我が国で指針となりうる判定基準の作成を目指す。

研究の進め方としては以下の手順で行う。

- （1） 高プロリン血症の原因遺伝子はI型ではプロリン酸化酵素（POX）の異常、II型ではP5C脱水素酵素の異常が判明している。それぞれ *PRODH* 遺伝子と *P5CDH* 遺伝子にコードされていることが明らかになっており、その遺伝子情報を入手し、正常遺伝子の各エクソンのPCR法による増幅、シーケンスを行う。
- （2） 文献調査により遺伝子変異を整理し、遺伝子変異リストを作成する。
- （3） 我が国おいての文献調査、アンケート調査を実施し、我が国における高プロリン血症の発生状況を調査する。これらの研究から発生状況を把握し、遺伝子解析が行われていない場合は同意のもとに遺伝子解析を行う。
- （4） スクリーニングでの発見例の遺伝子解析を行う。
- （5） 遺伝子変異と臨床症状の関係、既存の報告例との遺伝子変異を比較し、長期フォローアップ体制を整えるとともに年長児～成人における症例の観察を進め、長期の治療あるいは支援体制の試案作成の援助を行う。

本研究では段階に応じた倫理面の配慮が必要である。最初の実態調査においては匿名化した調査を行い個人情報は保護される。資料の採取、保存においては文書によるインフォームド・コンセントを受ける。新生児のマススクリーニングにおいては被験者の健康保持、被害防止のため実名による検査が必要である。被験者の保護者に文書によるインフォームド・コンセントを受ける。学童期における調査では本人および保護者に文書によるインフォームド・コンセントを受ける。成人における調査では本人に文書によるインフォームド・コンセントを受ける。検査結果については被験者の健康保持、被害防止につながる場合は本人に開示される。遺伝子診断に関しては臨床遺伝専門医による遺伝カウンセリングを行い、その後にインフォームド・コンセントにより、遺伝子診断を行う。遺伝情報は希望があれば当事者に開示されるが、厚労省指針によって行う。必要であれば複数回遺伝カウンセリングを行う。

上記はすべて厚労省指針を遵守する。

## C. 研究結果

まず、患者実数把握のために全国の大学および基幹的病院1000施設に一次アンケート調査を行った。70%の回収率において、1例（高プロリン血症II型）を確認した。高プロリンI型は確認できなかった。文献調査では20年異常前の症例で2例確認できた。遺伝子診断はいずれもなされていない。

文献調査により報告された原因遺伝子の概要、遺伝子変異と臨床症状を調査した<sup>3)4)</sup>。I型ではプロリン酸化酵素（POX）の異常、II型ではP5C脱水素酵素の異常が判明している。それぞれ *PRODH* 遺伝子と *P5CDH* 遺伝子にコードされていることが明らかになっている。*PRODH* 遺伝子は22q11.2領域にマッピングされ、15のエクソンからなり、mRNAは2.4kbでORF（open reading frame）は1800bpである。一方、*P5CDH* 遺伝子は1p36領域にマッピングされ15のエクソンからなり mRNAは

3.2kb で ORF は 1689bp である。それぞれの原因遺伝子の概要を表 1 に示した。

	高プロリン血症 I 型	高プロリン血症 II 型
原因遺伝子	<i>PRODH</i>	<i>P5CDH</i>
遺伝子座	22q11.2	1p36
エクソン数	15	15
大きさ	23.7kb	20kb
mRNA	2.4kb	3.2kb
ORF	1800bp	1689bp

表 1：原因遺伝子の概要

それぞれの遺伝子に関して、変異が報告されており、*PRODH* 遺伝子変異と酵素活性、臨床症状をを表 2 に示した<sup>5)-18)</sup>。

<i>PRODH</i> 遺伝子変異	酵素活性	臨床症状
L289M	mild	Normal, Schizophrenia
A455S	mild	Normal, Schizophrenia
A472T	mild	Normal, Schizophrenia
Q19P	moderate	Normal, Schizophrenia
A167V	moderate	Normal, Schizophrenia
R431H	moderate	Normal, Schizophrenia
R185W	moderate	Normal, Schizophrenia Psychomotor delay
D426N	moderate	Psychomotor delay
V427M	moderate	Normal, Schizophrenia
L441P	severe	Psychomotor delay Seizure Schizophrenia
R453C	Severe	Normal, Schizophrenia Psychomotor delay Seizure
T466M	Severe	Psychomotor delay Schizophrenia
Q521E	Severe	Schizophrenia
Q521R	increase	Schizophrenia

表 2：*PRODH* 遺伝子変異と臨床症状

高プロリン血症 II 型の原因遺伝子である *P5CDH* 遺伝子変異については表 3 に示す。

<i>P5CDH</i> 遺伝子変異	酵素活性	臨床症状
A7fs(-1)	Severe	Seizure
G521fs(+1)	Severe	Seizure
S352L	Severe	Seizure
P16L	Normal	Normal

表 3：*P5CDH* 遺伝子変異と臨床症状

#### D. 考察

遺伝性高プロリン血症には I 型（[MIM239500]hyperprolinemia, type1）と II 型（[MIM239510]hyperprolinemia, type2）の 2 つのタイプが記載されている。いずれもプロリン代謝経路に異常があり、血中プロリンが上昇する。I 型では proline oxidase が欠損している。II 型では  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) dehydrogenase が欠損している。両酵素ともに遺伝子が同定され、いずれも常染色体劣性遺伝である。I 型高プロリン血症の臨床症状は報告によって一定していない。臨床症状を全く示さない例から、難治性けいれん、精神発達遅滞、統合失調症を示す例が報告されている。II 型高プロリン血症は通常、難治性けいれんと精神発達遅滞を示すことで知られているが不明の点も多い。以上のように高プロリン血症の原因は解明されつつあるが、その実態は不明の点が多い。今回の調査では II 型患者のみ 1 例確認され、I 型患者は発見されなかった。文献調査では我が国において 2 例の I 型例が確認できたが、20 年以上前の症例であり、現在の状態については不明である。遺伝子検査は不可能であった。

海外の文献からの遺伝子変異を整理すると、表 2 に示すように、酵素活性が著しく障害される例において、発達障害、けいれん、統合失調症との強い関連が示唆されている。軽度の活性低下においては統合失調症との関連はあるが、発達障害やけいれんとの関係は薄れている。高プロリン血症は中枢神経に障害を引き起こしたり、けいれんの閾値を下げることは、まちがいないようであるが、統合失調症に関しては、II 型におい

てそのような合併症がないこと、血中プロリン値はI型より高いことより、高プロリン血症が単純な原因であるとは言えない。さらに、遺伝子の検討から、POX活性を上げる変異においても統合失調症と関連があることより、プロリン代謝と細胞増殖、抑制、分化に対する制御機構システムの中樞神経への関与が示唆される。日本における遺伝子解析も重要であるが、全くなされていない。遺伝子情報により、プライマーを作成し、HP I、HP II、統合失調症に関して遺伝子解析を予定している。日本人においても、海外と同じような変異が検出されるのか興味深い。今回の研究で高プロリン血症として認識されている例は少ないので、統合失調症における検索を優先して行うことが可能か検討したい。

#### E. 結論

高プロリン血症の症状は報告によって一定していない。したがって遺伝子診断と臨床症状との関連を明らかにすることは重要である。責任遺伝子の異常と臨床型との関係は欧米においては文献から整理すると、酵素活性が著しく障害される例において、発達障害、けいれん、統合失調症との強い関連が示唆された。軽度の活性低下においては統合失調症との関連はあるが、発達障害やけいれんとの関係は薄れている。日本における遺伝子解析も重要であるが、解析が行われていない。我が国において高プロリン血症の遺伝型、統合失調症における *PRODH* 遺伝子異常を明らかにすることは非常に重要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

#### I. 参考文献

- 1) Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. Inborn errors of proline metabolism. J Nutr. 2008 Oct;138(10):2016S-2020S.
- 2) Phang, J. M., Chien-an, A. H., Valle, D. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds.) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II. New York: McGraw-Hill 8th ed. 1820-1838, 2001.
- 3) Campbell, H. D., Webb, G. C., Young, I. G. A human homologue of the Drosophila melanogaster sluggish-A (proline oxidase) gene maps to 22q11.2, and is a candidate gene for type-I hyperprolinaemia. Hum. Genet. vol. 101, 69-74, 1997.
- 4) Hu, C. A., Lin, W.-W., Valle, D. Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. J. Biol. Chem. vol. 271, 9795-9800, 1996.
- 5) Afenjar, A., Moutard, M.-L., Doummar, D., Guet, A., Rabier, D., Vermersch, A.-I., Mignot, C., Burglen, L., Heron, D., Thioulouse, E., de Villemeur, T. B., Campion, D., Rodriguez, D. Early neurological phenotype in 4 children with biallelic *PRODH* mutations. Brain Dev. vol. 29, 547-552, 2007.
- 6) Jacquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., Bou, J., Petit, P., Campion, D., Frebourg, T. *PRODH* mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. Hum. Molec. Genet. vol. 11, 2243-2249, 2002.