

200936239A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性ビオチン代謝異常症における分子遺伝学的方法による

病態解析および迅速診断法の開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 坂本 修

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

研究代表者 坂本修	-----	3
-----------	-------	---

II. 参考資料

1. 一次アンケート	-----	9
------------	-------	---

2. 二次アンケート	-----	11
------------	-------	----

III. 研究成果に関する刊行物	-----	13
------------------	-------	----

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	坂本 修	東北大学病院小児科	講師
研究分担者	大浦 敏博	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 (仙台市立病院小児科)	非常勤講師 (科長)
研究協力者	但馬 剛 小川 真司 小林 弘典	広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学 千葉大学医学部附属病院小児科 島根大学医学部小児科	助教 助教 助教
事務局	坂本 修	東北大学病院小児科 〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1 TEL 022-717-7287 FAX 022-717-7290 e-mail oskamoto-thk@umin.ac.jp	

I . 総括研究報告

研究代表者 坂本修

先天性ビオチン代謝異常症における分子遺伝学的方法による

病態解析および迅速診断法の開発

研究代表者 坂本修（東北大学病院小児科 講師）

研究要旨

イソ吉草酸尿症(IVA)は GC/MS により診断された最初の先天性有機酸代謝異常症として記念碑的な疾患である。C5 を指標としてタンデムマスでのスクリーニングが可能である。欧米ではスクリーニング例において軽症型のコモン変異が報告されている。本邦での IVA の正確な頻度は現在のところ不明である。今回、我々は日本人症例 3 例について遺伝子解析を実施した。3 例とも両アレルに変異検出できた。3 例で共通する変異は見出せなかった。

分担研究者

大浦敏博（仙台市立病院小児科科長）

A. 研究目的

先天性ビオチン代謝異常症はビタミン依存症のひとつである。

ビオチンはビタミン B 群に属する水溶性ビタミンであり、生体内では各種カルボキシラーゼの補酵素として働く。ヒトには 4 種類のカルボキシラーゼの存在が知られており[プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC)、メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)]、PCC、MCC はアミノ酸代謝、PC は糖新生、ACC は脂肪酸合成の重要な酵素である。

先天性ビオチン代謝異常症の代表はホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) 欠損症、ビオチニダーゼ (BD) 欠損症である。これら 2 疾患では先述の 4 種類のカルボキシラーゼ活性が同時に低下し、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 (MCD) と称される病態を呈する。新生児期から乳児期早期に著明な代謝性アシドーシス、難治性湿疹などで発症する。

本邦での疾患頻度としてこれまで 100 万人に 1 人と考えられてきたが、タンデムマスによる新生児マススクリーニング試験研究によると 20 万人に 1 人とされており、軽症型・非典型例などがこれまで見逃されている可能性がある（例：知的障害・難聴などの神経疾患、難治性アトピー性湿疹・乾癬などの皮膚疾患）。それらの軽症型・非典型群での典型群とは違った変異スペクトラムの存在が示唆される。さらに本邦においては BD 欠損症のまとまった報告がない状態である。

この現状に鑑み、本研究においては以下を目的とする。

- ①本邦での HCS 欠損症、BD 欠損症に関する疫学調査
- ②日本人 HCS 欠損症の遺伝子診断系の構築と変異スペクトラムの解析
- ③日本人 HCS 欠損症の高頻度変異の迅速遺伝子診断系の構築
- ④日本人 HCS 欠損症軽症型・非典型群の頻度把握と変異スペクトラムの解析

B. 研究方法

- ①本邦での HCS 欠損症、BD 欠損症に関する疫学

調査

疫学調査のため、国内の小児科を有する病院にアンケート調査を実施した。

一次調査の対象は日本小児科学会専門医研修施設として申請・登録されている 512 施設に、該当症例の 2000 年以降の経験の有無についてアンケートハガキを送付した。

該当症例に関して、二次調査を実施した。

②日本人 HCS 欠損症の遺伝子診断系の構築と変異スペクトラムの解析

疫学調査にて遺伝子診断未確定例および HCS 欠損症疑診例に関し、全翻訳領域を PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基解析を実施した。

③日本人 HCS 欠損症の高頻度変異の迅速遺伝子診断系の構築

高頻度変異である p. L237P に対し、融解温度分析法による変異解析系 (Lightcycler 法) を構築した。

④日本人 HCS 欠損症軽症型・非典型群の頻度把握と変異スペクトラムの解析

疫学調査および新規 HCS 欠損症診断例のなかから軽症型・非典型群に関し変異スペクトラムの解析を実施した。

C. 研究結果

①本邦での HCS 欠損症、BD 欠損症についての疫学調査

疫学調査のため、国内の小児科を有する病院にアンケート調査を実施した。

一次調査の対象は日本小児科学会専門医研修施設として申請・登録されている 512 施設に、該当症例の 2000 年以降の経験の有無についてアンケートハガキを送付した。回答は 380 施設から得られた (回収率 74.2%)。結果として 12 施設で HCS 欠損症 (17 症例)、BD 欠損症 (1 症例) が確認された。

該当症例に関して、二次調査を実施した。2/4 現在で HCS 欠損症 14 例 (10 家系)、BD 欠損症 1 例について返信があった。

HCS 欠損症

- 同胞例 3 家系 (6 症例)
- 診断の時期および主たる受診内容
 - ・新生児期の重篤なアシドーシス発作 8/14
 - ・乳児期の重篤なアシドーシス発作 3/14
 - ・その他
 - ・タンデムマスによるスクリーニング 1/14
 - ・同胞例のため出生後の診断 2/14
- 診断のための実施した特殊検査
 - ・タンデムマスによるアシルカルニチンプロファイル 2/14
 - ・尿中有機酸分析 13/14
 - ・酵素診断 8/14
 - ・遺伝子診断 12/14

BD 欠損症

- 診断の時期そのときの主たる受診内容
 - ・乳児期の重篤なアシドーシス発作 1/1
- 診断のための実施した特殊検査
 - ・尿中有機酸分析 1/1
 - ・酵素診断 1/1
 - ・遺伝子診断 1/1

②日本人 HCS 欠損症の遺伝子診断系の構築と変異スペクトラムの解析

疫学調査の 10 家系においてはすべて遺伝子診断がなされていた。

●変異頻度 (10 家系 (20 アレル) に対して)

c. 53-16A>T	1/20
c. 655insA	1/20
c. 710T>C (p. L237P)	7/20
c. 780delG	6/20
c. 1080A>C (p. R360S)	2/20
c. 1385C>A (p. T462N)	1/20
c. 1693C>T (p. R565X)	1/20

また、他の疾患(プロピオン酸血症)と化学診断されながらも当該遺伝子(*PCCA*, *PCCB*)に変異がみられなかった症例(新生児死亡例)において、HCS欠損症疑診断例として、HCS 遺伝子の全長シーケンスを実施した。高頻度変異(p. L237P)に加え、新規の変異 (p. Y230X) を検出した。

③日本人 HCS 欠損症の高頻度変異の迅速遺伝子診断系の構築

高頻度変異である p. L237P に対し、融解温度分析法による変異解析系 (Light Cycler 法) を構築した。ゲノムから一時間以内に同変異の有無に関し診断できるようになった。

④日本人 HCS 欠損症軽症型・非典型群の頻度把握と変異スペクトラムの解析

疫学調査でタンデムマスにて指摘された未発症例が存在した。この変異は c. 53-16A>T/ c. 2259delT であり、特に c. 53-16A>T のスプライシングにおける関連から、この症例は軽症型・非典型群の可能性があると考えられた。

D. 考察と結論

本邦において先天性ビオチン代謝異常症に関連した先行した易学的調査として、多田らの「有機酸代謝異常症の全国調査(昭和 60 年度厚生省心身障害者研究報告書)」(1976-1984 年)、高柳らの「先天性有機酸代謝異常症全国調査(1990-1999 年)」(日本マス・スクリーニング学会雑誌 19: 243-248, 2009)がある。それぞれ HCS 欠損症として 2 症例、11 症例と報告されている。今回は報告例が 17 例と、報告例が増えている。

本研究で見られるように HCS 欠損症の診断においてはほぼ全例で、尿有機酸分析と遺伝子診断がなされている。HCS 遺伝子の単離が 1994 年であったことから、症例報告の増加の背景として遺伝子診断による確定診断率の上昇が推測される。HCS

欠損症をはじめとした先天性ビオチン代謝異常症は診断さえつけば、ビオチン大量療法が大半の例で奏功する。現在その確定診断は遺伝子診断に依存しており、HCS 欠損症では特定の変異の迅速な診断系の確立が、有用であることが確認できた。

今回タンデム質量測定器(タンデムマス)によるスクリーニング未発症例の存在が確認された。本邦においてはタンデムマスの導入が、欧米の先進諸国に比して遅れをとっている。実際、今回の疫学調査に含まれている他の乳児期発症例において、新生児期のマス・スクリーニングのろ紙をレトロスペクティブに確認したところ診断可能であったと報告されている(日本小児科学会雑誌 111:1061-1065, 2007)。本研究から、少なくとも乳児期発症例や軽症例・非典型例の診断への契機としてタンデムマスによる新生児スクリーニングが有用であることが確認された。

さらに、タンデムマスの試験研修においては先天性ビオチン代謝異常症の頻度は 20 万に 1 人とされている(タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針 特殊ミルク情報 42 号別冊 2006)。そこから推定される本邦での発症頻度は年間 5 人であり、前述の多田ら、高柳ら、今回の疾患ベースの頻度と乖離しており、診断に至らない症例の存在が推定される。その意味においても、タンデムマスによる新生児スクリーニングの導入が先天性ビオチン代謝異常症の予後を大きく変える可能性が示唆された。

今回の結果を踏まえ、先天性ビオチン代謝異常症の診断と治療のフローチャートをしめす。

E. 研究発表

論文発表

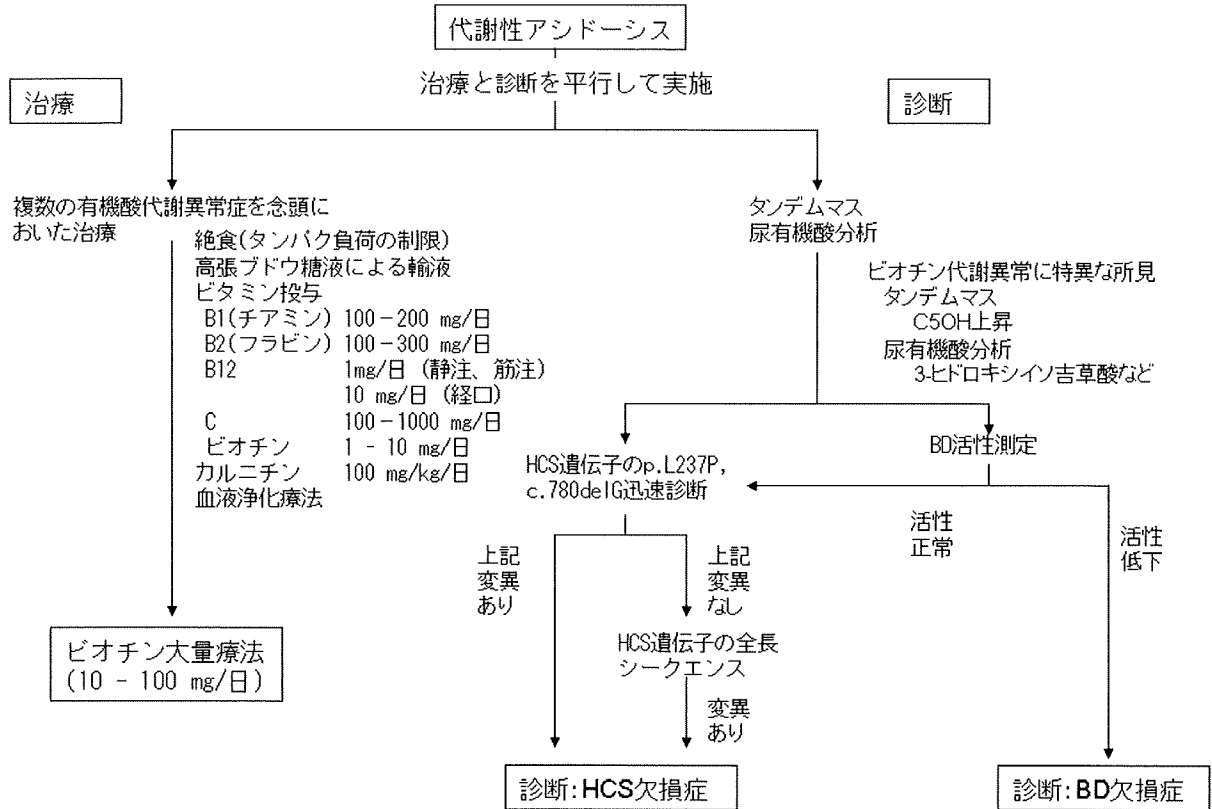
坂本修 ビオチン代謝異常症 小児内科 41 (増刊):398-400, 2009

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

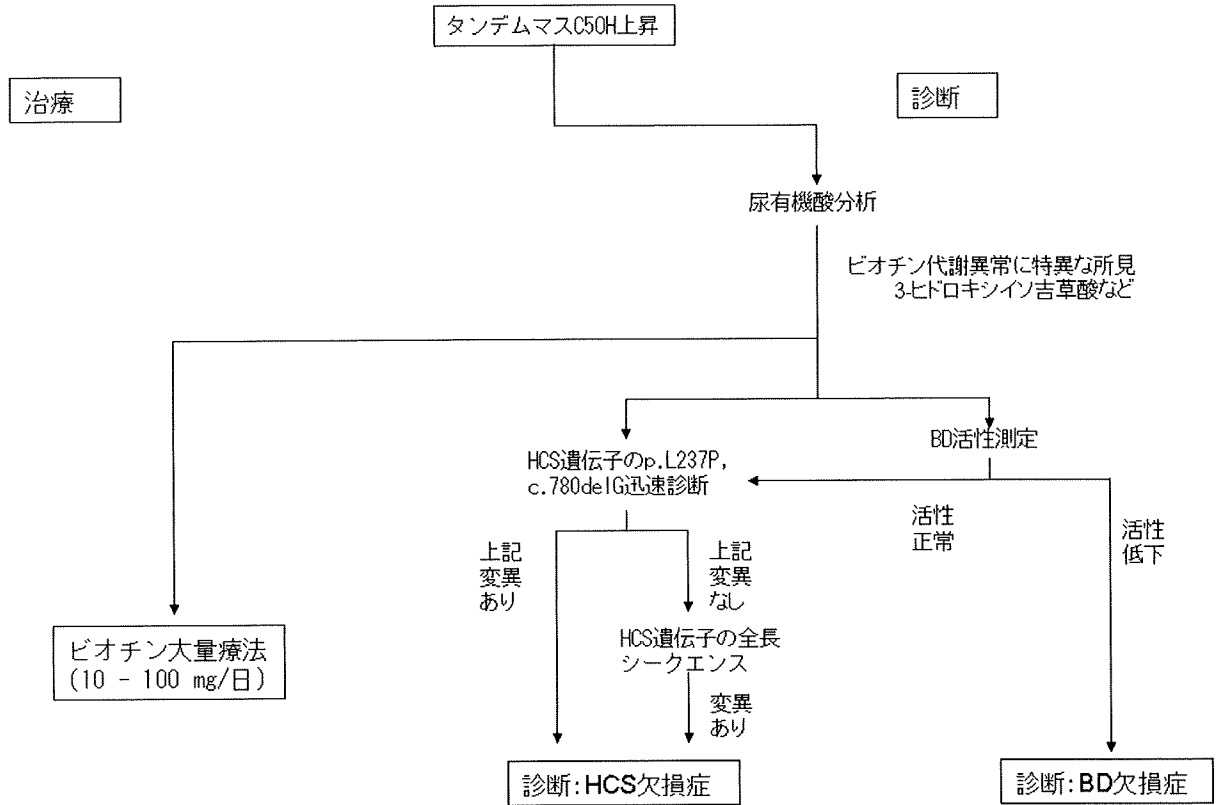
診断・治療のためのフローチャート

タンデムマス未実施症例(新生児早期発症例を含む)



診断・治療のためのフローチャート

タンデムマス実施、未発症症例



Ⅱ. 参考資料

1. 一次アンケート

診療科 責任者様

拝啓

秋冷の候、皆様にはますます御健勝のこととお慶び申し上げます。

さて、今回厚生労働科学研究（難治性疾患克服研究事業）研究課題名「先天性ピオチン代謝異常症における分子遺伝学的方法による病態解析および迅速診断法の開発」（研修責任者：坂本修 東北大学病院講師）では該当疾患（ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症、ピオチニダーゼ欠損症）の全国調査を実施させて頂く事となりました。本調査では、患者数の推計、診断・治療・予後の実態を把握し、治療法の標準化をはかることを目的とします。

つきましては、ご多忙中誠に恐縮に存じますが、貴診療科における該当患者経験数をご記入いただき、2009年12月31日までにご返信下さいますよう、お願い申し上げます。なお、患者数は過去10年間（2000年以降）を目安としますが、それ以前でもご経験がございましたらご記入をお願いいたします。該当患者ご経験ありの場合、後日二次調査票を送らせて頂きますので、重ねてご協力お願い申し上げます。

ご不明の点がございましたら、下記事務局までお問い合わせください。

敬具

2009年12月

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1
東北大学病院小児科 坂本修
Tel: 022-717-7287, Fax: 022-717-7290

小児希少難病患者数全国疫学調査

以下の疾患の経験症例数（過去の経験例、死亡例を含む）をご記入ください。該当症例がない場合は、0名とご記入の上、ご返送下さいますようお願い申し上げます。

ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症（HCS欠損症） _____ 名

ピオチニダーゼ欠損症 _____ 名

貴施設名・科： _____

記載者ご氏名： _____

記載年月日 2009年 月 日

ご協力いただきありがとうございました。

Ⅱ. 参考資料

2. 二次アンケート

Ⅲ. 研究成果に関する刊行物

研究成果の刊行に関する刊行物

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
坂本 修	ビオチン代謝異常症	小児内科	41 増刊	398-400	2009

IV. 先天性代謝異常症-16

ビオチン代謝異常症

Disorders of biotin metabolism

坂本 修*

SAKAMOTO Osamu

① はじめに

ビオチンはビタミン B 群に属する水溶性ビタミンである。種々の食品に含まれており、腸内細菌でも合成されるため、通常の状態ではビオチンが欠乏することはない。生体内でビオチンは各種カルボキシラーゼの補酵素として働く¹⁾。ヒトには4種類のカルボキシラーゼの存在が知られており、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC), メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) はアミノ酸代謝, ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) は糖新生, アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) は脂肪酸合成の重要な酵素である。ビオチン欠乏・代謝異常ではこれらの活性が同時に低下するマルチプルカルボキシラーゼ欠損症 (MCD) と称される病態を呈する。

またビオチンによりいくつかの酵素の発現が誘導されることや、核内のヒストンのビオチン化が報告されており、ビオチンが epigenetics な発現調整にもかかわっている可能性が示唆されている²⁾。

ビオチン代謝異常症のひとつであるホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) 欠損症は前項に譲り、本項ではそれ以外のビオチン代謝異常症・関連疾患、欠乏症を記述する。

● ビオチニダーゼ欠損症

① 基本病因, 発生機序

ビオチニダーゼはビオチンが結合している蛋白からビオチンを遊離させる酵素であり (図), ビオチニダーゼ欠損症はビオチンの再利用の障害をき

たす¹⁾。

日本ではきわめてまれである^{3,4)}が、欧米では新生児スクリーニングの対象疾患であり、約 60,000 人に 1 例の頻度である⁵⁾。残存活性により Profound 型 (<10%) と Partial 型 (10~30%) に大別される。遺伝形式は常染色体劣性遺伝であり、欧米の症例を中心としたビオチニダーゼ遺伝子 (BTD) の病因変異の解析ではいくつかの変異が高頻度変異として報告されている⁶⁾。

② 基本病態

HCS は PCC・MCC・PC・ACC のアポ体のリジン残基にビオチンを共有結合させ、ホロ体 (活性体) とする反応を触媒する (図)。この蛋白結合型のビオチンを再利用するため、各種プロテアーゼがビオチン (ビオチニルリジン) あるいはビオチニルペプチドの段階にまで分解したのち、ビオチニダーゼがこれらを最終的に分解してビオチンを遊離させる。ビオチニダーゼが欠損するとビオチンの再利用の障害をきたし、PCC・MCC 活性低下による有機酸血症、PC 活性低下による高乳酸血症を呈する。皮膚症状は ACC の活性低下による脂肪酸合成の障害が関連していると推測されている。

③ 臨床症候

未治療の Profound 型の発症年齢は生後 1 週~10 歳にわたり、3 か月前後が多い¹⁾。そのため比較的新生児期に発症の多い HCS 欠損症を早発型 MCD, ビオチニダーゼ欠損症を遅発型 MCD と呼称することもある。一部に成人期においても無症状の例もある⁷⁾。

症状としては大きく神経症状と皮膚症状に分けられる⁸⁾。神経症状としてけいれん、筋緊張低下、運動失調などでの発症が多い。ときに呼吸障害、喉頭性喘鳴、無呼吸がみられることもある。皮膚症状としては湿疹性の皮疹、脱毛、真菌性皮膚炎、

* 東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座
小児病態学分野
〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1
TEL 022-717-7287 FAX 022-717-7290
E-mail: osakamoto-thk@umin.ac.jp

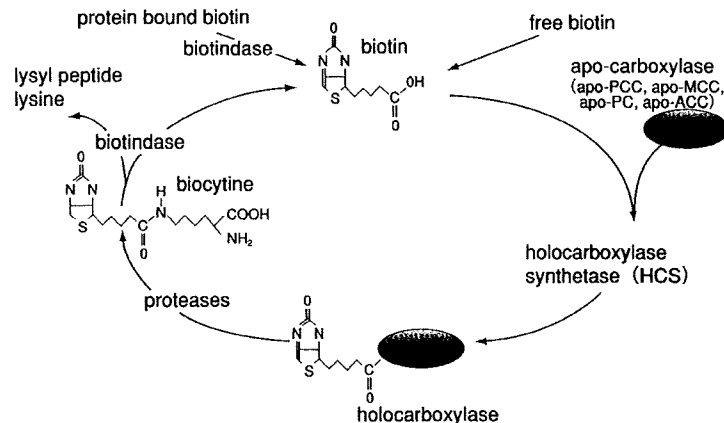


図 ビオチンサイクル：カルボキシラーゼのHCSによるカルボキシラーゼのビオチン化とビオチン再利用のためのビオチニダーゼによる遊離反応

結膜炎などがみられる。Partial型では感染などストレスがかかったときのみに症状を呈する。

④ 診断のための臨床検査

尿有機酸分析ではHCS欠損症と同様のMCDに特徴的なパターンを呈する(3-ヒドロキシプロピオン酸、メチルクエン酸、3-ヒドロキシイソ吉草酸、3-メチルクロトニルグリシン、乳酸)。血液検査では代謝性アシドーシス、高アンモニア血症、高乳酸血症などが認められる。タンデム質量分析計によるアシルカルニチン解析では3-ヒドロキシイソバレリルカルニチン(C5-OH)の増加の所見となる。血中ビオチン濃度は低下から正常下限程度である⁹⁾。

鑑別すべき疾患として、ビオチン欠乏症、HCS欠損症、プロピオン酸血症(PCC欠損症)、メチルクロトニルグリシン尿症(MCC欠損症)があげられる。確定診断は血清ビオチニダーゼ活性測定によりなされる。欧米での新生児スクリーニングでは乾燥濾紙血を用いて酵素活性を測定している。

⑤ 治療

薬理量のビオチン(5~20 mg/日)の経口投与により臨床的、生化学的にも著効をみる。

⑥ 合併症の病態生理

未治療のProfound型では病状の進行とともに難

聴、視覚障害などの感覚神経障害も加わる。これらはビオチン大量投与でも改善が得がたいとされる。HCS欠損症では同様の症状がみられないため、ビオシチンが発症にかかわっていると推測されている。

⑦ 症状経過、予後

新生児スクリーニングにおいて発見され、発症前治療されていた症例では正常な発達が期待できる⁹⁾。進行例での難聴、視覚障害については症状の改善が得られにくい。

●ビオチン輸送体欠損症

生後18か月時に脱毛、皮疹、感染時のアシドーシス、高乳酸血症で発症したビオチン輸送体欠損症と推測される症例が報告されている¹⁰⁾。尿有機酸分析はMCDの所見であり、ビオチン大量投与で軽快している。細胞内へのビオチンの取り込みは正常の10%であるが、ビオチン輸送体のひとつであるSMVTの遺伝子解析では変異は認められていない。

●ビオチン反応性基底核障害(biotin-responsive basal ganglia disease: BBGD)

1998年にOzandらにより、新しい疾患概念として報告された¹¹⁾。小児期にけいれん、昏迷、摂食困難、外眼筋麻痺を呈する亜急性脳症で発症し、

IV. 先天性代謝異常症

進行性に筋固縮, ジストニア, 対麻痺を呈する。頭部 MRI で両側尾状核頭部に中心性壊死性の病変を認める。超大量のビオチン内服(5~10 mg/kg/日)により数日以内に臨床的な改善が認められる。尿有機酸分析で MCD の所見は認められず, ビオチニダーゼ・各種カルボキシラーゼの活性低下もみられないため, 中枢に特異的なビオチン輸送体の障害が推測されていた。最近になりチアミン(ビタミン B₁) 輸送体 (hTHTR2) をコードする遺伝子 *SLC19A3* に変異があることが報告された¹²⁾。*SLC19A3* は脳以外でも発現しており, なぜ BBGD で症状が神経症状に限られるのか, チアミン輸送体異常でありながら¹³⁾, なぜビオチンで奏効するのかなど未だ不明である。症例は現在のところ中近東からの報告のみである。

●ビオチン欠乏症

「日本人の食事摂取基準」によるとビオチンの目安量は成人で 45 μg/日である。ビオチン欠乏として近年しばしば散見するのは食物アレルギー治療に関連した症例である^{14,15)}。わが国ではビオチンが食品添加物として認められていないため, アレルギー治療用ミルクなどへの添加がなされていない。ビオチン欠乏症では難治性の湿疹や下痢を呈する。食物アレルギーが基礎にある場合には, これらをアレルギー症状の悪化と判断して対処されることが多い。尿有機酸分析で MCD のパターンを呈することが診断の契機となるため, 特殊な栄養管理下において前記の症状が認められる場合には, 尿有機酸分析の実施が薦められる。HCS 欠損症やビオチニダーゼ欠損症との鑑別を要するが, これらは薬理量(mg 単位)のビオチンを必要とするのに対し, ビオチン欠乏症では通常量(μg 単位)のビオチン内服で奏効する。

<関連 Web site>

- Gene Review
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gen&part=biotin>

文献

- 1) Wolf B : Disorders of biotin metabolism. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Dis-*

ease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp3935-3962, 2001

- 2) Pacheco-Alvarez D, Solórzano-Vargas RS, León-Del-Río : Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res* **33** : 439-447, 2002
- 3) Oizumi J, Hayakawa K, Inuma K, et al : Partial deficiency of biotinidase activity. *J Pediatr* **110** : 818, 1987
- 4) Pomponio RJ, Yamaguchi A, Arashima S, et al : Mutation in a putative glycosylation site (N489T) of biotinidase in the only known Japanese child with biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* **64** : 152-154, 1998
- 5) Wolf B : Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis* **14** : 923-927, 1991
- 6) Hymes J, Stanley CM, Wolf B : Mutations in *BTD* causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* **18** : 375-381, 2001
- 7) Baykal T, Gokcay G, Gokdemir Y, et al : Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *J Inher Metab Dis* **28** : 903-912, 2005
- 8) Thoene J, Baker H, Yoshino M, et al : Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. *N Eng J Med* **304** : 817-820, 1981
- 9) Moslinger D, Stockler-Ipsiroglu S, Scheibenreiter S, et al : Clinical and neuropsychological outcome in 33 patients with biotinidase deficiency ascertained by nationwide newborn screening and family studies in Austria. *Eur J Pediatr* **160** : 277-282, 2001
- 10) Mardach R, Zemleni J, Wolf B, et al : Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J Clin Invest* **109** : 1617-1623, 2002
- 11) Ozand PT, Gascon GG, Al Essa M, et al : Biotin-responsive basal ganglia disease : a novel entity. *Brain* **121** : 1267-1279, 1998
- 12) Zeng WQ, Al-Yamani E, Acierno JS, et al : Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in *SLC19A3*. *Am J Hum Genet* **77** : 16-26, 2005
- 13) Subramanian VS, Marchant JS, Said HM : Biotin-responsive basal ganglia disease-linked mutations inhibit thiamine transport via hTHTR2 : biotin is not a substrate for hTHTR2. *Am J Physiol Cell Physiol* **291** : C851-859, 2006
- 14) Higuchi R, Noda E, Koyama Y, et al : Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula and hypoallergenic rice. *Acta Paediatrica* **85** : 872-874, 1996
- 15) Fujimoto W, Inaoki M, Fukui T, et al : Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula. *J Dermatol* **32** : 256-261, 2005

