

本症の酵素欠損は Burri らによって 1981 年にはじめて証明されました[37]。彼女らはビオチン欠乏にしたラットから肝臓を採取し、apoPCC を部分精製し、それを HLCS の基質とするアッセイ法を用い酵素の性状を調べました。重症の患者ほど、HLCS のビオチンに対する K_m (酵素とビオチンの親和性の指標) の上昇が大きく、高ビオチン濃度下での線維芽細胞の PCC の活性の上昇が悪かったことから、HLCS のビオチンに対する親和性の低下が本症の病態にとって重要であるとしてきました[38]。

HLCS 欠損症の分子レベルでの理解を進めるため、著者らは 1990 年頃より HLCS 蛋白の精製から研究を開始しました。ラットの apoPCC を用いるアッセイ法はその調整が煩雑であり、基質の長期保存が不可能なことから、簡便なアッセイ法を考案しました。HLCS 患者のリンパ芽球に apoPCC が蓄積し、外来性の HLCS によって holoPCC となって活性化する事を利用しました。牛の肝から、HLCS をカラムクロマトグラフィーで 18,000 倍に精製すると、この酵素は分子量 6 万 4 千の蛋白であることが分かりました[39]。精製蛋白からペプチドのアミノ酸配列を決定し、ペプチドの情報を基に PCR プライマーを設計し、PCR によってスクリーニング用の DNA 断片を得ました。これを利用して、ヒト肝 cDNA ライブラリから、HLCS の cDNA を単離しました。このことによって、アミノ酸配列に相当する DNA 配列が分かりました。予想されたタンパク質は最長 726 アミノ酸(分子量 80,759)でした[40]。ヒトの HLCS に対する抗体を作成し、ヒト胎盤の細胞質画分でウエスタンブロットを行うと分子量、86 k、82 k、76 k の3本のバンドが検出され、N 末特異的な抗体を用いた検索の結果、それらは cDNA に見られた3カ所の翻訳開始点由来であると思われました[41]。ヒト HLCS は大腸菌の BirA という蛋白と相同性があります。BirA はビオチンレプレッサーとビオチン・アセチル CoA カルボキシラーゼリガーゼとして働く蛋白で大腸菌のビオチン合成調節と利用に必須な蛋白です。ノザンブロットによって、HLCS の mRNA を検出すると、5.7kb のバンドが調べた臓器全てに認められ、8.3kb のバンドは脳、胎盤、肺、骨格筋のみに認められました。HLCS mRNA は骨格筋、胎盤で高く発現していました[40]。

本症の遺伝子解析によって、日本人では、ロイシンからプロリンへのアミノ酸変異を起こす点変異 (Leu237Pro) とフレームシフトを起こし、活性ドメインのない異常蛋白を生じるグアニンの一塩基欠失 (delG1067) の2種類の変異がアレルの 50%ほどを占めることが明らかになりました[42]。他に、民族を越えて複数の患者に見いだされた変異として、Arg508Trp、Val550Met などが見つかりました[43, 44]。ヨーロッパ人を中心とする患者の解析結果では、多彩な変異が認められましたが、日本人で高頻度の2つの変異は見出されませんでした[45]。ヨーロッパ人の複数の患者に見つかった変異はイントロン 10 の変異 (IVS10+5G>A) で、私たちはこの変異によりスプライス異常がおこることを証明しました[46]。2009 年時点での変異解析のまとめは別ページにまとめてあります。

著者らは主な変異を発現ベクターに組み込み HLCS 欠損線維芽細胞に発現させ、変異酵素の酵素学的性状の検討を行ってきました[43, 47]。その結果、変異酵素にはビオチンに対する K_m が数倍以上に変化しているタイプと、 K_m の変化があまりなく、 V_{max} の異常が主である変異があることが分かりました。変異酵素のビオチンに対する K_m が変わらない変異を持つ患者でも生化学的異常や臨床症状は、ビオチンの大量投与によって劇的に改善する事が多いようです。このことは、ヒトの生理的状態でのビオチン濃度は正常の HLCS の K_m より低いことを示唆しています。また、ビオチン投与後の生化学データや臨床症状の改善の程度は、変異酵素の K_m の変化との相関はあまりなく、 V_{max} の異常の程度と相関する傾向が見られました。我々の症例による検討は、Burri らの結果とは異なり、HLCS 欠損症の病態における V_{max} の低下の重要性を示していると思われます。また、HLCS 欠損症においては、遺伝子型と表現型の比較的よい相関のある場合があることが分かりました。この一応の結論は、HLCS の患者さんが比較的若い時に得られたものですが、HLCS の遺伝子変異がはっきり分かる時代となってから 20 年が過ぎ、その後の患者さんの症状の推移が現在まとめられていないため、今回の厚生労働省の研究班では、アンケート調査などによってそれを明らかにしようとしています。

HLCS 欠損症は初期に報告された症例が主に、新生児期であったことから新生児型マルチプルカルボキシラーゼ欠損症と呼ばれることもありましたが。酵素診断法の確立[48]と遺伝子解析により非典型例が確実に診断されるようになった結果、新生児期以降の発症もかなりあることが分かってきました。

ビオチニダーゼ欠損症

ビオチン代謝異常症でよく研究されているもう一つの疾患がビオチニダーゼ欠損症です[49]。ビオチニダーゼ欠損症の発症時期は生後1週から2才にわたり、3ヶ月ごろが多いようです。新生児の発症が少ないため、遅発型マルチプルカルボキシラーゼ欠損症と呼ばれることもあります。症状としては、痙攣、筋緊張低下、運動失調、皮膚炎、脱毛、結膜炎などで、微妙にホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症とは違っています。病状の進行とともに半数の症例に難聴、視神経萎縮などの感覚神経障害が認められるようになることも多少違う様です。約8割の患者ではHLCS欠損症にも見られる特徴的な有機酸尿が認められ、症状がはっきりしなくても尿の検査から、臨床診断が可能です。遅発型マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の原因がビオチニダーゼであることを発見したのは、米国のBarry Wolf博士で、ビオチニダーゼ欠損症の研究は彼らのグループの功績がほとんどです[3]。ビオチニダーゼのcDNAはWolfらのグループによってクローニングされ[50]、その遺伝子は3番染色体3q25.1に存在しています[51]。ビオチニダーゼ欠損症の欧米人患者では欠失/挿入変異(G98:del7ins3)、ミスセンス変異(Arg538Cys、Gln456His)が高頻度変異として報告されています[52-54]。ビオチニダーゼ欠損症は日本人には非常に希と考えられます。これまで、マススクリーニングで見つかった一人の患者の遺伝子解析が報告されているだけです(Asp489Thrのホモ)[55]。昨年のビオチン代謝異常のアンケート調査で、ヘテロの変異がもう一人の小児に見つかっています。

ビオチン依存性大脳基底核症

サウジアラビアのOzandらは1998年ビオチン投与により症状が劇的に改善する常染色体劣性遺伝性と思われる神経疾患について報告しました[56]。大脳基底核に壊死を思わせるMRI(磁気共鳴映像)所見があり、急性脳症の症状で発症し、筋硬直、四肢麻痺等の症状も認められます。生化学的にはHLCS欠損症、ビオチニダーゼ欠損症にみられる所見を全く示さないのが特徴です。神経学的症状はビオチンを病初期の段階で投与することで、劇的に改善するという病気です。2005年、本症の一次的障害は、SLC19A3という、もともとはチアミンというビタミンを運ぶとされていたビタミン輸送蛋白であることが報告されました[57]。日本では、この病気はまだ報告がないと思われます。

(4) ビオチンが関係するその他の病気

掌蹠膿疱症(掌蹠膿疱症性骨関節炎)という病気は、手のひら、足の裏に多数の膿疱が出現、なかなか直らない、胸肋鎖骨関節、脊椎の関節炎がおこる病気ですが、その一部にビオチン投与で改善する例があることが分かっています。タレントの奈美悦子さんがこの病気にかかり有名になりました。このビオチンが有効な掌蹠膿疱症については、本荘第一病院の前橋賢先生が多くの症例を経験しています。ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症にみられる、代謝性アシドーシスが全身症状はあまり目立たず、免疫グロブリンの異常、T リンパ球を中心とする免疫のバランスの異常が示唆されている。ある一定の遺伝的背景を持つ人が軽度なビオチンの不足となった場合に、自己免疫病と類似する病態を示していると推定されます。

<title>

C ビオチン代謝異常研究班の課題(H22 年度)

<Body>

本研究の目的、研究計画は以下の、6 項目です。

(1) アンケートによる先天性ビオチン代謝異常症の実態調査

厚生労働省統計情報部保険統計局発行のリストから、小児科を併設する 100 床以上の病院、および小児科のみを標榜する 100 床未満の専門病院を対象として選択すると約 2200 施設となる。先天性ビオチン代謝異常症の症例の、ここ 10 年間の経験の有無、もし、患者をフォローアップしている場合は、現在の患者の状況と治療について調査する。

(2) アンケートによる栄養性ビオチン欠乏症の発生頻度の実態調査

先天性ビオチン代謝異常症への調査と同様の病因を対象に、先天性ビオチン代謝異常症以外の代謝性疾患、アレルギー疾患の治療のために、特殊ミルクの使用経験とそれによる、栄養性ビオチン欠乏症の症例の経験についても調査する。この集計より、年間あたりの栄養障害によるビオチン代謝異常症の発生頻度について推定をおこなう。

(3) HLCS、ビオチニダーゼに異常の見つからない患者における分子異常の探索

研究代表者は、これまで先天性ビオチン代謝異常症が疑われた患者において、2 つの確立した病因遺伝子、すなわち HLCS とビオチニダーゼに異常が見つからない症例の線維芽細胞 4 例、リンパ芽球 7 例を有している。米国の共同研究者の Zemleni 博士との共同研究で、これら培養細胞系における、ビオチントランスポーターのアッセイを行ったところ、線維芽細胞 1 例、リンパ芽球 1 例において活性が低下しているという結果を得ている。しかしながら、これら培養細胞のビオチントランスポーターの遺伝子はいまだ明らかではなく、ビオチントランスポーターの候補遺伝子の SLC16A1 に変異は見いだされていない。本申請期間中には、さらなるビオチントランスポーターの候補遺伝子の変異スクリーニングを行う。

(4) マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の症状を示した患者の鑑別診断法の確立

これまでのビオチン代謝異常は、まず患者の尿サンプルで特徴のある有機酸尿が検出されたあと、ビオチニダーゼ活性は、札幌の衛生研究所、血清ビオチン濃度は兵庫医大・病体生理研究所、ホロカルボキシラーゼ合成酵素の活性ないし、遺伝子の解析は千葉大で申請者が行っており、主治医は鑑別のために煩雑な手続きを踏む必要があった。本研究期間中に、現在 HLCS の遺伝子解析の窓口となっている、オーファンネットジャパンにおける、新たな受け入れ可能な業務として、HLCS の酵素活性と遺伝子変異のスクリーニング、ビオチニダーゼ活性と遺伝子変異のスクリーニング、血清ビオチン濃度測定を一括して引き受け、1ヶ月以内に結果を出す体制を構築したい。

(5) HLCS 欠損症の適切な治療法の提案

研究代表者がこれまで確定診断を行った症例について診断時以降の症状の変化、現在の状態、治療法についての調査を行う。本疾患においては、新生児期の重症度と、ビオチン投与に対する短期予後については、酵素活性の低下の程度ないし変異の種類と比較手良好な相関が認められているが、長期予後に関するデータがないので、これを明らかにする。その結果を基盤として、推奨される HLCS 欠損症における長期管理指針の提案を行う。

(6) ビオチン代謝異常症に関するウェブ上の情報サイトを開設する。

ビオチン代謝異常に関する研究成果と、本研究期間における成果について、広く情報を公開するため、ビオチンとその代謝異常症に関するウェブサイトの開設を行う。一般向けの情報と、診断と治療に関する医療関係者側の指針となる情報を提供する。

<Title>

文献リスト

<Body>

1. Sydenstricker V, DeVaughn S and Isbell H. Observations on the "egg white injury" in man. *J Am Med Assoc* 1942;118:1199-1200
2. Gompertz D, Draffan GH. Biotin-responsive beta-methylcrotonylglycinuria. *The Lancet* 1971;22-24
3. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7 ed. New York.: McGraw-Hill, 1995:3151-3177
4. Mock DM, deLorimer AA, Liebman WM, Sweetman L and Baker H. Biotin deficiency: an unusual complication of parenteral alimentation. *N Engl J Med* 1981;304:820-3
5. Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035-8
6. Vesely DL. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* 1982;216:1329-1330
7. Maeda Y, Kawata S, Inui Y, Fukuda K, Igura T and Matsuzawa Y. Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J Nutr* 1996;126:61-6
8. Zhang H, Osada K, Sone H and Furukawa Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1997;43:271-80
9. Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M and Furukawa Y. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1996;42:517-26
10. Watanabe T. Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr* 1983;113:574-81
11. Watanabe T, Dakshinamurti K and Persaud TV. Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J Nutr* 1995;125:2114-21
12. Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B and Ortega E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 1998;67:431-7
13. Zemleni J, Chew YC, Hassan YI and Wijeratne SS. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin: are biotin requirements being met? *Nutr Rev* 2008;66 Suppl 1:S46-8
14. Fujimoto W, Inaoki M, Fukui T, Inoue Y and Kuhara T. Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula. *J Dermatol* 2005;32:256-61
15. 藤本 亘. 【最近のトピックス 2005 *Clinical Dermatology* 2005】皮膚科医のための臨床トピックス アミノ酸調整粉末単独哺育に起因するビオチン欠乏症. *臨床皮膚科* 2005;59:142-144
16. 高野祐子, 梅林典子, 廣瀬伸一, 渡辺敏明, 吉田一郎 and 満留昭久. 特殊調製乳(S22)による栄養中にビオチン欠乏症を呈したメチルマロン酸血症の乳児例. *日本先天代謝異常学会雑誌* 1998;14:218
17. 虫本雄一, 長谷川有紀, 遠藤充, 小林弘典 and 山口清次. ビオチン欠乏症による2次性マルチプルカルボキシラーゼ欠損症7例の検討. *日本小児科学会雑誌* 2008;112:225
18. 阿部清美, 吉井啓介, 綾部匡之, et al. アレルギー疾患用ミルクの長期使用により、ビオチン欠乏に至った1例. *日本小児科学会雑誌* 2008;112:320
19. 西田豊, 牛久英雄, 蓮見純平 and 八木久子. MCT605ミルクによるビオチン欠乏症の1例. *日本小児科学会雑誌* 2008;112:1588
20. 寺林和也, 藤本徳毅, 藤井紀和, 立花隆夫 and 田中俊宏. ビオチン欠乏症の双子例. *皮膚の科学* 2009;8:571

21. 安田真里, 佐野ちひろ, 清澤秀輔, et al. ミルクアレルギー超低出生体重児に対する治療用ミルクによる養育中に生じたビオチン欠乏症の一例. 日本未熟児新生児学会雑誌 2009;21:630
22. 秋庭真理子, 高増哲也, 藤野歩, 犬尾千聡 and 栗原和幸. アミノ酸調整乳で哺乳され、ビオチン欠乏症と考えられた1乳児例. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌 2010;8:73
23. 洲崎玲子, 眞海芳史, 大関正彦, et al. ミルクアレルギー除去ミルク哺育中に生じたビオチン欠乏症の1例. 日本皮膚科学会雑誌 2010;120:707
24. 本間仁, 盆野元紀, 井戸正流, et al. 加水分解乳による完全人工乳栄養中にビオチン欠乏症を発症した1乳児例. 日本小児科学会雑誌 2010;114:344
25. 阿部博紀, 他. アミノ酸調製粉末(605z)によると思われるビオチン欠乏症の1例. 日本先天代謝異常学会雑誌 1991;7:172
26. Higuchi R, Noda E, Koyama Y, et al. Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula and hypoallergenic rice. *Acta Paediatr* 1996;85:872-4
27. 樋口隆造, 水越真里, 小山佳紀 and 他. アミノ酸調整粉末によるビオチン欠乏症の2例. 日本小児科学会雑誌 1996;100:1908-1912
28. 西原修美. 【ビタミンの基礎と臨床】ビオチンの臨床. *Modern Physician* 2007;27:1237-1241
29. 西原修美. 小児アトピー性皮膚炎患者の血清ビオチン値についての検討. 日本皮膚科学会雑誌 2007;117:57
30. 細谷まち子, 荒川泰子, 牛久英雄 and 高柳正樹. エレメンタルフォーミュラを使用中にビオチン欠乏をきたした2症例. 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 2002;16:54
31. 加瀬貴美, 森川玲子 and 新飯田裕一. ミルクアレルギー除去ミルク単独栄養児に生じたビオチン欠乏症の1例. 日本皮膚科学会雑誌 2006;116:800
32. 加瀬貴美, 森川玲子, 村本文男 and 新飯田裕一. ミルクアレルギー除去ミルク単独哺育によるビオチン欠乏症の1例. *臨床皮膚科* 2009;63:716-719
33. 河場康郎, 小西恭子, 岡田晋一, et al. 【内分泌・代謝】ビオチンを含有しないアミノ酸調製ミルク哺育により高乳酸・ピルビン酸血症を呈した1例. *小児科臨床* 2005;58:385-390
34. 真々田容子, 村田敬寛, 谷口歩美, et al. 牛乳蛋白アレルギー児に発症したアミノ酸調整粉末哺育によるビオチン欠乏症. *アレルギー* 2008;57:552-557
35. 後藤美奈, 大畑亮介, 伊藤恵子, et al. アミノ酸調整粉末の単独哺育中に生じた後天性ビオチン欠乏症の1例. *臨床皮膚科* 2009;63:565-569
36. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8 ed. Vol. 3. New York: McGraw-Hill, 2001:3935-3962
37. Burri BJ, Sweetman L and Nyhan WL. Mutant Holocarboxylase Synthetase: EVIDENCE FOR THE ENZYME DEFECT IN EARLY INFANTILE BIOTIN-RESPONSIVE MULTIPLE CARBOXYLASE DEFICIENCY. *J. Clin. Invest.* 1981;68:1491-1495
38. Burri B, Sweetman L and Nyhan WL. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1985;37:326-337
39. Chiba Y, Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y and Narisawa K. Purification and properties of bovine liver holocarboxylase synthetase. *Archiv Biochem Biophys* 1994;313:8-14
40. Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, et al. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nat Genet* 1994;8:122-128
41. Hiratsuka M, Sakamoto O, Li X, Suzuki Y, Aoki Y and Narisawa K. Identification of holocarboxylase

- synthetase (HCS) proteins in human placenta. *Biochim Biophys Acta* 1998;1385:165-171
42. Aoki Y, Suzuki Y, Sakamoto O, et al. Molecular analysis of holocarboxylase synthetase deficiency: a missense mutation and a single base deletion are predominant in Japanese patients. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:168-174
43. Aoki Y, Suzuki Y, Li X, et al. Characterization of mutant holocarboxylase synthetase (HCS): a K_m for biotin was not elevated in a patient with HCS deficiency. *Pediatr Res* 1997;42:849-854
44. Sakamoto O, Suzuki Y, Aoki Y, et al. Molecular analysis of new Japanese patients with holocarboxylase synthetase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:873-874
45. Aoki Y, Li X, Sakamoto O, et al. Identification and characterization of mutations in patients with holocarboxylase synthetase deficiency. *Hum Genet* 1999;104:143-148
46. Sakamoto O, Suzuki Y, Li X, et al. Diagnosis and molecular analysis of an atypical case of holocarboxylase synthetase deficiency. *Eur J Pediatr* 2000;159:18-22
47. Sakamoto O, Suzuki Y, Li X, et al. Relationship between kinetic properties of mutant enzyme and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency. *Pediatr Res* 1999;46:671-6
48. Suzuki Y, Aoki Y, Sakamoto O, et al. Enzymatic diagnosis of holocarboxylase synthetase deficiency using apo-carboxyl carrier protein as a substrate. *Clin Chim Acta* 1996;251:41-52
49. Wolf B, Heard GS. Biotinidase deficiency. *Adv Pediatr* 1991:1-21
50. Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, et al. Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem* 1994;269:6566-6570
51. Cole H, Weremowicz S, Morton CC and Wolf B. Localization of serum biotinidase (BTD) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics* 1994;22:662-3
52. Norrgard KJ, Pomponio RJ, Swango KL, et al. Mutation (Q456H) is the most common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States. *Biochem Mol Med* 1997;61:22-7
53. Pomponio RJ, Norrgard KJ, Hymes J, et al. Arg538 to Cys mutation in a CpG dinucleotide of the human biotinidase gene is the second most common cause of profound biotinidase deficiency in symptomatic children. *Hum Genet* 1997;99:506-12
54. Pomponio RJ, Reynolds TR, Cole H, Buck GA and Wolf B. Mutational hotspot in the human biotinidase gene causes profound biotinidase deficiency [see comments]. *Nat Genet* 1995;11:96-8
55. Pomponio RJ, Yamaguchi A, Arashima S, Hymes J and Wolf B. Mutation in a putative glycosylation site (N489T) of biotinidase in the only known Japanese child with biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 1998;64:152-4
56. Ozand PT, Gascon GG, Al Essa M, et al. Biotin-responsive basal ganglia disease: a novel entity. *Brain* 1998;121:1267-79
57. Zeng WQ, Al-Yamani E, Acierno JS, Jr., et al. Biotin-Responsive Basal Ganglia Disease Maps to 2q36.3 and Is Due to Mutations in SLC19A3. *Am J Hum Genet* 2005;77:16-26

資料2 ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の臨床

<Title>

ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の臨床

<Body>

1. 病因・発症機序
2. 臨床症状
3. 診断法
4. 治療
5. 合併症
6. 予後
7. 文献

1. 病因・発症機序

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCS) の活性低下によって起こる、常染色体性劣性の遺伝形式を示す先天性代謝異常である。日本での発生頻度は 100 万出生に数名程度と推定される(1)。HLCS 遺伝子は 1994 年に初めて蛋白の一次構造が明らかになり、日本人患者で変異が同定された(2)。HLCS は複数のカルボキシラーゼのアポ蛋白とヒストンへのピオチンの取り込み (共有結合) を触媒する酵素である。HLCS 活性の低下は、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) などの活性低下を招き、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症とも呼ばれる病態を示す(3)。本疾患は、単一の酵素欠損が結果として複数の代謝経路の酵素活性の低下を引き起こすことで非常に多彩な症状を示すことが特徴的である。

2. 臨床症状

日本人症例では、酵素活性の低下の著明な場合が多く、約半数は生後 2 日以内に発症している (4-5)。新生児期発症型の典型的な症状は、代謝性酸性血症 (アシドーシス) による多呼吸、呼吸障害、痙攣、哺乳障害、全身の皮膚炎 (図 4 Fig04) などである。アシドーシスは主に PCC と PC の低下が原因と思われる。皮膚炎は ACC の低下が一次的な原因で、そのため脂肪酸、リン脂質の合成異常があるために起こっていると考えられる。尿中有機酸は PCC、MCC、PC の欠損に由来するマルチプルカルボキシラーゼ欠損症に特徴的なパターンを示し、診断的価値が高い。



HLCS 酵素活性の低下の少ない軽症型では、皮膚炎、発育障害、痙攣、筋緊張異常が主な症状となり、乳児期から小児期の間に感染などのストレスが加わった際の全身状態の悪化した時に診断される例が多い(6-7)。皮膚または全身の易感染性または感染の重症化も見られることがある。

3. 診断法

新生児では、呼吸障害、痙攣、全身状態の悪化があれば、直ちに血液ガス、アンモニア、乳酸の測定を行う(図7、Fig07)。

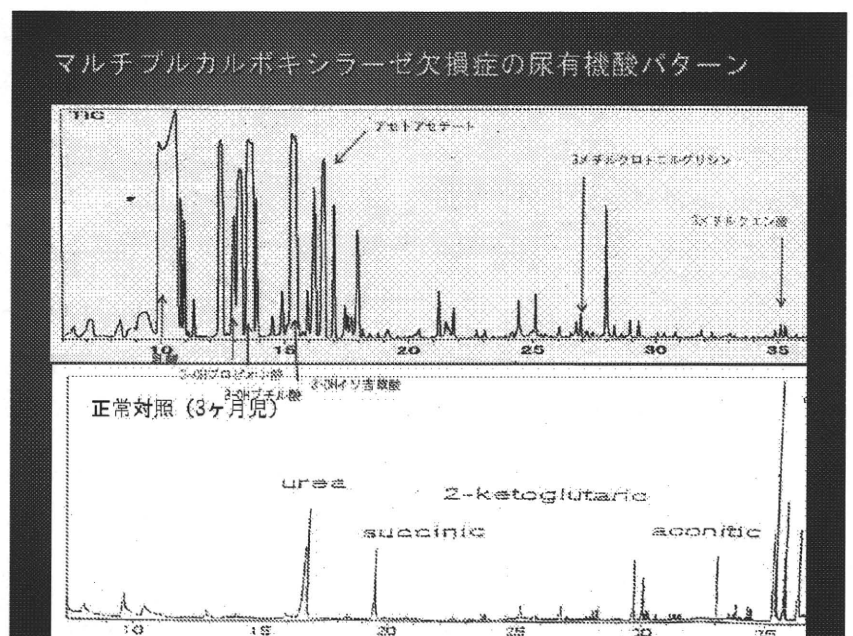
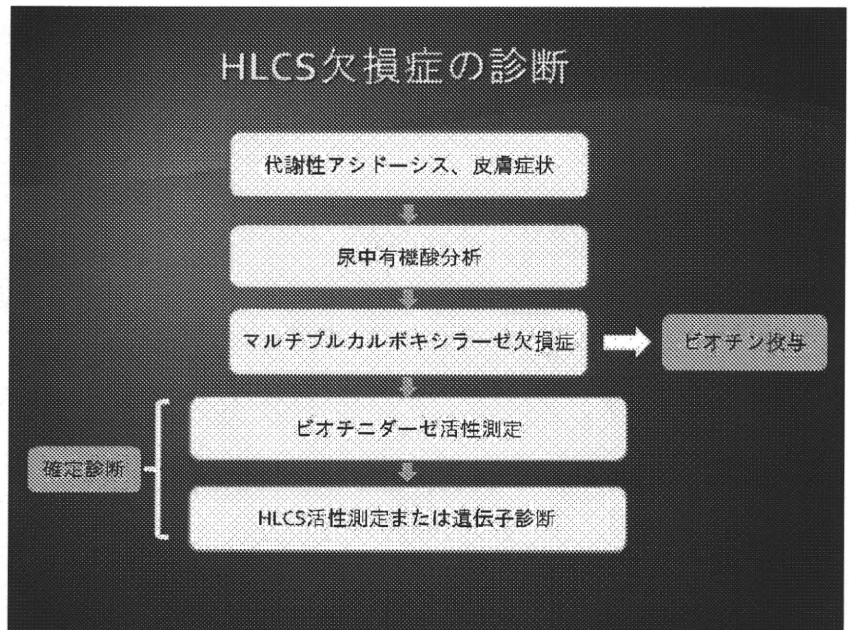
高度のアシドーシス、高乳酸血症、高アンモニア血症が認められた場合は、他の有機酸血症との鑑別も含め、まず尿中有機酸の分析をおこなう。本症では複数のカルボキシラーゼの活性低下を反映した有機酸パターンを示す。(図8、Fig08)すなわち、MCCの活性低下により、3-ヒドロキシイソ吉草酸、3-メチルクロネート、3-メチルクロニルグリシン。PCCの活性低下により、3-ヒドロキシプロピオネート、メチルクエン酸、チグリルグリシンが生じる。PCの活性低下は乳酸の上昇をきたす(図9、Fig09)。血中アミノ酸では、アラニンの上昇が見られる。ロイシンの高値がきっかけで診断された例もある。

鑑別診断としては、ビオチンダーゼ欠損症と栄養性ビオチン欠乏症が問題となるが、ビオチンの大量投与による治療を優先し、症状が安定してから行っても臨床的には問題がない。

アトピー性皮膚炎、アレルギーのある児に、ビオチン不含のペプチドミルクを長期にわたって投与した場合(8-9)や、メチルマロン酸血症の治療でS-22ミルクを投与されている場合に、栄養性ビオチン欠乏症となったという報告がある。

診断確定には、末梢血などから精製したDNAを用いて遺伝子診断が行われている。遺伝子診断で日本人患者の約90%が診断可能である。HLCS 遺伝子の蛋白翻訳領域を含むエクソンについて直接シーケンシングを行い変異のスクリーニングを行う。遺伝子診断はオーファンネット・ジャパン事に依頼する。

遺伝子異常が見つからない場合、末梢血から樹立したリンパ芽球におけるHLCS活性の測定を行う必要がある(10)。



4.治療

新生児期の代謝性アシドーシス、呼吸障害などには一般的なアシドーシスと生命維持のための治療に加え、ビオチンの10 - 50 mg/dayの静注または経口投与が必須である。実際には確定診断がつくまで、ビタミンの大量療法を行うことになる(ビオチン以外のビタミン:塩酸チアミン 100-200 mg/day、リボフラビン 100-300 mg/day、シアノコバラミン 1mg/day)。ビオチン投与により、数日以内に、急激な一般状態の回復、皮膚炎の改善などが期待できる。ビオチンによる治療開始が遅れなければ多くの症例は急性期を乗り切ることができる。一般状態の安定している時期は10 - 100mg/dayの経口投与を続ける。ビオチンの投与量が十分かどうかの鋭敏な指標は、尿中有機酸であり、臨床症状が見られない場合でも、有機酸尿が続く場合は、ビオチンの増量を考える。少なくともアシドーシス、高アンモニア血症を示さない様に十分なビオチンを投与する。ビオチンの過剰投与による中毒は報告がないので、効果が認められなければ、ビオチンの増量を積極的に行ってよいと思われる。ただし、100mg/day以上投与しても、HLCSの残存活性が低い患者では、症状が完全にコントロール出来ないこともある。

5.合併症

出生前からあるいは生後に、脳のCT等で脳室の拡大が認められることもある。これが、発育遅延などに関係しているかどうかは明らかではないが、ビオチン投与の効果が十分でないことを示唆する所見と考えられる。

6.予後

新生児期発症の症例でもビオチンの投与に反応し、新生児期を乗り切ったものは、生命の予後は悪くない。しかし、日本人で多い、高度な酵素活性低下を示す変異の例、たとえばLeu237Proと780delGの複合ヘテロ接合体では、尿中有機酸排泄が続く、皮膚炎、発達障害を示す可能性がある。乳児期以降発症の軽症例では、Val550MetやArg508Typなどの遺伝子変異をホモまたは複合ヘテロ接合体として持つことが多く、ビオチン投与により、ほとんど症状を示さずに経過する。症状が認められない場合でも、尿中有機酸が認められる場合は、ビオチンの効果が十分ではないと考えられ、感染症で急激に症状が悪化する可能性があるため、慎重な経過観察が必要である(11)。

遺伝子検査による本症の確定診断が出来るようになって、20年以上経過したが、これまで、ビオチン治療によってフォローされていた患者がどの様になっているかの系統的な調査はない。

7.参考文献

<Body>

1. 重松陽介:タンデム質量分析計による新生児代謝異常症マスキング.日本小児科学会雑誌 110:895-903, 2006.
2. Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y et al.: Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. Nature Genet 8: 122-128, 1994.
3. Wolf B: Disorders of biotin metabolism. In: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th ed. (ed by

Scriber CR et al.), p3935-3962, McGraw-Hill, New York, 2001.

4. Yang X, Aoki Y, Li X et al: Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency. *Hum Genet* 109: 526-534, 2001.
5. Sakamoto O, Suzuki Y, Aoki Y et al.: Relationship between kinetic properties of mutant enzymes and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency. *Ped Res* 46: 671-676, 1999.
6. 岡崎健一, 望月弘, 菊池健二郎他: 生後9ヶ月に発症したホロカルボキシラーゼ合成酵素異常によるマルチプルカルボキシラーゼ欠損症の男児例. *日本小児科学会雑誌* 110: 781-784, 2006.
7. 八木麻理子, 起塚庸, 西山敦史他: 保存新生児期ろ紙血でも異常が確認されたホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の1乳児例. *日本小児科学会雑誌*:111, 1061-1065, 2007.
8. 河場康朗, 小西恭子, 岡田晋一 他: ビオチンを含有しないアミノ酸調整ミルク保育により高乳酸・ピルビン酸血症を呈した1例. *小児科臨床* 50 :384-390, 2005.
9. 真々田容子, 村田敬寛, 谷口歩美 他: 牛乳蛋白アレルギー児に発症したアミノ酸調整粉末保育によるビオチン欠乏症. *アレルギー* 57 : 552-557, 2008.
10. Suzuki Y, Aoki Y, Sakamoto O et al.: Enzymatic diagnosis of holocarboxylase synthetase deficiency using apo-carboxyl carrier protein as a substrate. *Clin Chim Acta* 251: 41-52, 1996.
11. Suzuki Y, Yang X, Aoki Y et al.: Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS. *Hum Mutat* 26 : 5-290, 2005.

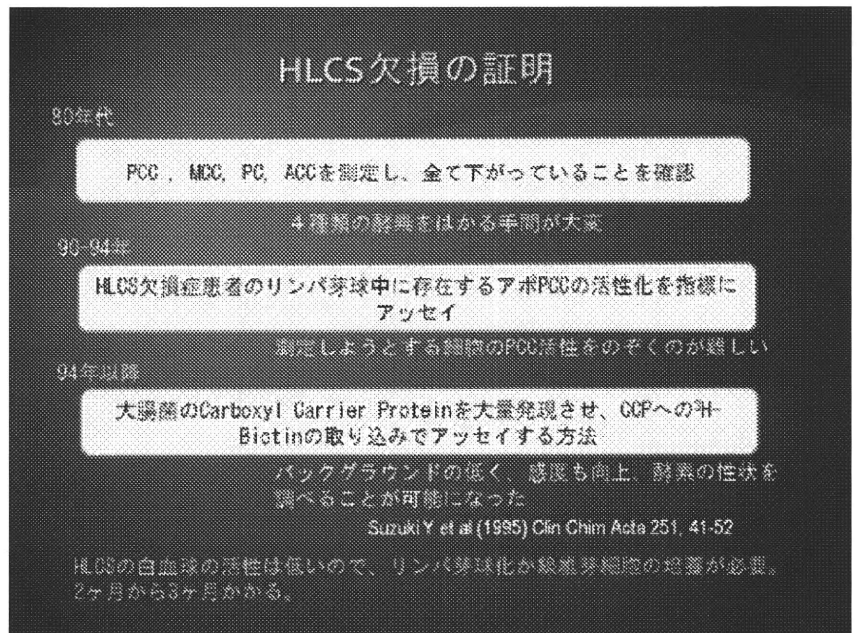
<Title>

ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の診断と分子遺伝学

<Body>

1. 診断法の変遷 (Fig10)

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCS) 欠損症の存在が確認された 1980 年には、HLCS 活性を直接測ることが難しかったため、複数のカルボキシラーゼ (PCC、MCC、PC 等) の酵素活性を患者さんの線維芽細胞などで測定する事によって、本酵素の低下を証明していた。1990 年代になり、HLCS 欠損患者のリンパ芽球 (患者の末梢血に EB ウイルスを感染させ、無限増殖する培養細胞ライン化したもの) に存在するアポ PCC を基質とし、診断しようとする患者細胞の抽出液を加え、PCC 活性の上昇によって HLCS の活性を測定する方法を開発した。1994 年以降は、大腸菌の Carboxy Carrier Protein (CCP) を組み替え DNA により大量発現させ、ビオチン化していない CCP への、ラジオアイソトープ標識したピオチンの取り込みを測定する方法で、非常に高感度、精度の高い HLCS 活性の評価が出来るようになった。



2. 年代別 HLCS 欠損症の確定診断法の実績 (Fig11)

1994 年 HLCS の一次構造の決定を境に、確定診断法は酵素診断から、遺伝子診断へ大きく変わった。図11に示すように 2005 年以降は、遺伝子診断のみで確定診断を行っている。



3. ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の確定診断の実施状況

臨床的にマルチプルカルボキシラーゼ欠損症が疑われて、HLCS の酵素診断または遺伝子診断を行った例の件別のまとめを図 12 に示す(Fig12)。2008 年までに 55 件行っており、ほぼ、日本全国に分布している。そのうち、HLCS の診断が確定した例は、25 件であった。

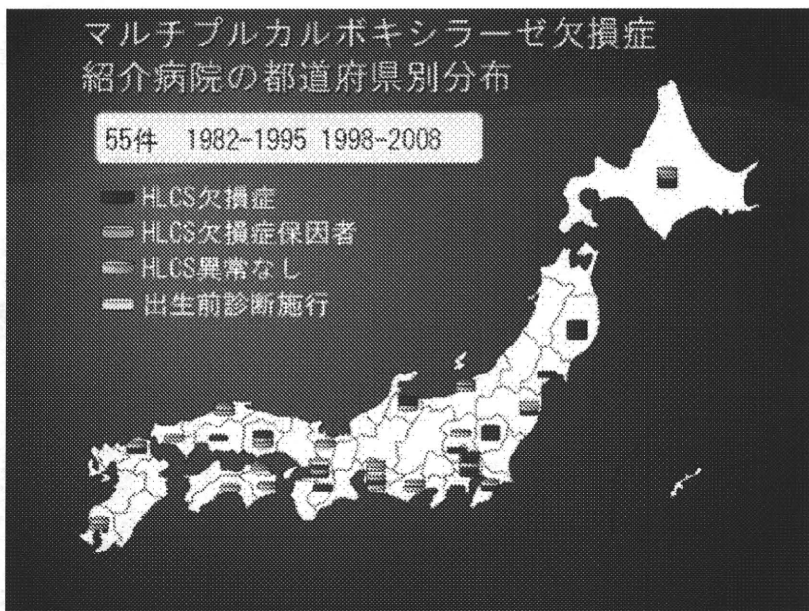


図 13 は HLCS 欠損症の患者が確認されている家系数を示している(Fig13)。2008 年までに 22 家系で遺伝子異常が確認されている。



4. 日本人ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の遺伝子変異(Fig14)

22 家系のうち、21 家系について、遺伝子変異の検索を行った結果、42 アレルのうち 93%にあたる 39 アレルについての遺伝子変異が同定された(図 14)。大きな欠失変異と考えられるものは 1 アレルあったが、その他は一塩基の置換、挿入、欠失である。

日本人の変異で最も多いものは、L237P (237 番目の Leucine が Proline に置換)で、42 アレルのうち 12 アレル、29%を占めている。次いで、780delG(開始コドンの一番目の塩

基から数えて 780 番目の塩基の G の一塩基欠失)で 10 アレル 24%を占めている。この 2 つで日本人の変異アレルの約半数の変異が占められている。この 2 つの変異は、日本人以外に見つかったことはなく(次項参照)、付随する多型

日本人HLCS欠損症家系とHLCS遺伝子の変異

Hokkaido	R360S	780delG
Iwate1	L237P	780delG
Iwate2	L237P	780delG
Iwate3	L237P	not found
Miyagi	L237P	L237P
Fukushima	L237P	780delG
Tochigi	L470S	942insA
Tokyo1		
Tokyo2	L237P	780delG
Tokyo3	L237P	not found
Tokyo4 (enzyme assay only)		
Chiba	L237P	R508W
Saitama	780delG	R360S
Toyama	780delG	L470S
Toyama	L237P	not found
Aichi	L237P	large deletion
Osaka1	R565X	R506W
Osaka2	L237P	942insA
Nara	780delG	D715G
Hyogo	780delG	T462N
Hiroshima	2256delT	(IVS7-16AT)
Fukuoka	780delG	R506W

マーカーによるハプロタイプが常に同じであることから、日本人における創始者効果の変異と考えている。複数のアレルに見出されている、R508WとV550Mという変異は、他の民族の患者でも見つかっており、付随しているハプロタイプも複数あることから、再発性の変異 (recurrent mutation) と考えられる。これまでの実績から、日本人の DNA 診断では、HLCS 遺伝子異常が 2 つのアレルともに見逃す可能性は 1%ほどと推定される。

5. 日本人以外のホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の遺伝子変異 (Fig15)

日本人以外の患者の解析についてのまとめを図 15 に示している。R508W と V550M が複数の民族で見つかっており、日本人の例もあることから、再発性の変異ということがいえる。北欧を中心にみつかった IVS10+5G>A は mRNA のスプライス異常をおこすイントロンの変異で (図 16、Fig16)、正常の mRNA も存在するため、無症状や非常に軽いホモ接合体の患者が存在することが分かっている (図 19、Fig19)。この変異はフェロー諸島 (図 17、Fig17) の患者の全員にみつかっており、この島での HLCS 欠損症の頻度は、例外的に高く、創始者効果をしめす変異の典型例である (図 18、19: Fig18、Fig19)。

日本人以外の症例の変異

欧州			アジア		
Sweden	IVS10+5G>A	IVS10+5G>A	Lebanon	delThr610	delThr 610
Danish	IVS10+5G>A	IVS10+5G>A	Turkey	G581E	G581E
Faroe Isl.	IVS10+5G>A	IVS10+5G>A	Malaysia	Y456C	ND
Faroe Isl.	IVS10+5G>A	IVS10+5G>A	Taiwan	R508W	R508W
Germany	IVS10+5G>A	1876delT			
Germany	V333E	D634Y			
Germany	D571N	V547G			
France	IVS10+5G>A	2279delC			
Spain	T461I	ins1340C			
Spain	1998G>A	2130G>A			


アメリカ合衆国 (Dupuis et al 1996)		
P1		
P2	R508W	ND
P3	L216R	V363D
P4	V363D	R508W
P5	R508W	D571N
P6	R508W	R508W
P7		ND
P8		ND
P9	G618E	ND

IVS10+5G>A 変異

- スウェーデン症例は発症が 8 歳と遅く、ピオチン投与による尿有機酸の正常化に 3 ヶ月以上かかった非典型的な症例である。(Holme E et al. (1988) J Inher it Metab Dis)
- スウェーデン症例は IVS10+5G>A 変異のホモ接合体であった。
- この変異はスプライシングエラーを起こすことが実験的に示された。低いレベルの正常の mRNA の発現も確認された。(Sakamoto O et al. (2000) Eur J Pediatr)

フェロー諸島

- 1000年以上にノルウェーのハイキングが移住。
- 長期間孤立しておりこの 200 年で人口が数千人より 4 万 5 千人にまで拡大した。
- 劣性遺伝病が比較的多い。糖尿病 III 型でも founder mutation が存在し、罹患率が約 3500 人に一人である。(Santer R et al. Eur J Hum Genet, 2001)




- Homozygote for IVS10+5G>A
- Hetrozygote for IVS10+5G>A

フェロー諸島 IVS10+5G>A のホモの父が無症状だった家系

調査時年齢	遺伝子型	有機酸尿	症状
Father 27 y	IVS10+5G>A/IVS10+5G>A	+	無症状
Mother 21 y	IVS10+5G>A/-		
Proband 1 y 2 M	IVS10+5G>A/IVS10+5G>A	+	4ヶ月時に発症 ピオチンの投与

IVS10+5G>A 変異による HLCS 欠損症

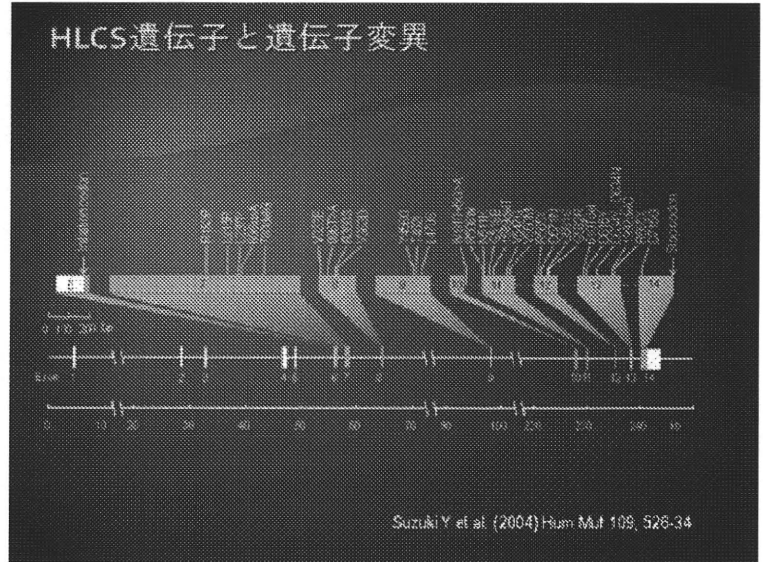
- ヨーロッパに高頻度に存在し、この変異をもつアレルは同じハプロタイプを示した。
- IVS10+5G>A 変異のホモ接合体がフェロー諸島に 3 人存在し、この島での HLCS 欠損症の罹患率が高いことが示唆された。
- IVS10+5G>A 変異のホモ接合体は臨床的にばらつきがあり、無症状の成人例も同定された。



- Asymptomatic homozygote
- Homozygote for IVS10+5G>A
- Hetrozygote for IVS10+5G>A

6. ホロカルボキシラーゼ合成酵素遺伝子変異の遺伝子上の分布(Fig20)

これまで見つかった HLCS 遺伝子の変異を遺伝子構造上に示したのが図 20 である。アミノ酸翻訳領域のほぼ全長にわたって、均等と言ってよいほど分布しているが、N 末端に近い変異は見つかっていない、正確なアミノ酸の数はまだ分からないが、N 末の数十アミノ酸が欠失しても酵素活性は影響をあまり受けないと思われる。



7. 変異と表現型の関係

変異と患者の重症度、予後などとの相関があるかどうか、発症時期と変異の関係、変異を導入した蛋白を試験管内に発現し、アポ CCP 蛋白のビオチン化に対する酵素活性での検討を行ってきた。その結果のまとめを図 21、22 に示す (Fig21, Fig22)。この結果をふまえて、HLCS の病型を図 23 (Fig23) のように 4 群に分類できるのではないかと考えている。変異と長期予後については、これまで系統的な調査がないため、2010 年の時点では不明である。

(文責 鈴木洋一)

変異酵素の特性

変異	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg)	酵素の特性	発症時期	ビオチン反応性
Wild Type	224	144			
Val363Asp	240	5.3	Km正常型		
Val333Glu	347	2.3	Km正常型		
Arg183Pro	129	2.4	Km正常型		
Leu237Pro	99.5	1.7	Km正常型	新生児期	限定的
Leu216Arg	315	0.6	Km正常型		
Gly581Ser	9920	3.4	Km異常型	新生児期	良好
Val55GMet	943	10.0	Km異常型	1才	良好
delThr610	649	10.9	Km異常型	2才	良好

HLCS欠損症における遺伝子型と表現型の相関

- 発現実験で調べた酵素のVmaxやKmは生体内での酵素の働きをある程度予測できそうである。
- 発症時期は、生理的なビオチン濃度での酵素活性の程度に依存する。
- Vmaxの低い酵素では、ビオチン投与に対する反応が限定的である。
- Kmが大きくVmaxも大きい場合、新生児期に発症するがビオチン投与の効果がある。
- 遺伝子型から、発症時期、ビオチン反応性を予測できる場合がある。
- IVS10+5G>A変異は遅発型であり、表現型の幅が広い。

HLCS欠損症におけるサブタイプ

サブタイプ	発症時期	ビオチン反応性	ビオチン必要量	遺伝子型の例
1	新生児期	良好	高い	G581S
2	新生児期	限定的	高い	L237P
3	乳幼児期	良好	低い	delThr610
4	乳幼児期	限定的	低い	IVS10+5G>A

III. 研究成果に関する刊行物

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
鈴木 洋一	食物アレルギーの乳幼児へのアミノ酸調節粉末投与の際はビオチンの補充を	アレルギー	59(11)	1587-1588	2010
Kamada F他18名	A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene	J Hum Genet	56(1)	34-40	2011
Onouchi Y他38名	Common variants in CASP3 confer susceptibility to Kawasaki disease	Hum Mol Genet	19(14)	2898-2906	2010
Undarmaa S 他12名	Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes	J Hum Genet	56(6)	342-349	2010

食物アレルギーの乳幼児へのアミノ酸調整粉末投与の際は ビオチンの補充を

千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学
鈴木洋一

ビオチンは、水溶性のビタミンであり、ヒトでは4種類あるカルボキシラーゼの補酵素として働いている。先天代謝異常症であるホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)欠損症や、ビオチン摂取量の不足によって、カルボキシラーゼ活性が低下すると複数の代謝経路の代謝異常が起こり、マルチプルカルボキラーゼ欠損症と言われる症状を呈する。栄養性のビオチン欠乏症は、従来起こりにくく、臨床的に問題となるのは稀と考えられてきた。しかし、近年、食物アレルギーの治療のためアミノ酸調整粉末のみで数カ月栄養した乳児を中心に、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の症状を示したとする論文、学会発表が散見されるようになった。現在市販されているアミノ酸調整粉末には、ビオチンが添加されていないためにビオチン欠乏症が起こるのである。筆者は、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の鑑別診断のため、HLCS遺伝子の遺伝子診断を行ってきたことから、興味を持ち、近年のアミノ酸調整粉末栄養によるビオチン欠乏症の報告例について文献検索を行った。

ビオチン欠乏症の診断が確実で論文等になっている報告等を藤本らが自件例とともに2005年にまとめている¹⁾。表は2005年以降の症例報告も含めてまとめたものである。学会発表のみで情報が不足しているため表に含めることが出来ないビオチン欠乏症の報告もあり、2008年の小児科学会では、虫本ら7例の報告、他に2例の症例報告があった。2009年には1例、2010年はすでに3例の学会報告がなされている。これらのことは、食物アレルギーの低年齢化と有病率の上昇によって、アミノ酸調整粉末で栄養される乳児が増加していることを反映しているのではないかと推定される。新生児-乳児消化管アレルギー疾患研究会が最近発表した「新生児-乳児消化管アレルギー診断治療指針」においても食物アレルギーの治療として、アミノ酸調整粉末の利用が薦められている。ガイドラインの発表でさらに利用が増えることも考えられる。

ミルクへのビオチンの添加は、現在、食品衛生法で認められていない。アミノ酸調整粉末へのビオチンの添加が認められるまで、消化管アレルギーの治療に当たる医師は、アミノ酸調整粉末の利用の際にビオチン欠乏症の予防に注意すべきことを提案したい。

筆者は、平成22年度の厚生労働省の難治性疾患克服研究事業「ビオチン代謝異常症の鑑別診断法と治療方法の開発」の研究において、アミノ酸調整粉末投与によるビオチン欠乏症の発生状況の全国調査を予定している。アレルギー学会の会員諸氏の調査への協力を願う次第である。

(ビオチン代謝異常のホームページ <http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/pubheal/biotin>)

Received: October 7, 2010. Accepted: October 7, 2010

利益相反 (conflict of interest) に関する開示: 著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

鈴木洋一: 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学 [〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1]

E-mail: ysuzuki@faculty.chiba-u.jp

表 治療用ミルクによるビオチン欠乏症の報告

No	年	年齢	性	ミルク	血清ビオチン (ng/ml)	有機酸尿	報告者	文献
1	1991	3カ月	男	EF	ND	+	阿部	1)
2	1996	11カ月	男	EF	1.5	+	樋口	1)
3	1996	5カ月	男	EF	1.4	+	樋口	1)
4	1998	14日	男	S-22	2.4	+	高野	1)
5	2001	4歳	女	EP	NT	NT	西原	1)
6	2001	11カ月	男	NOB	1.7	NT	西原	1)
7	2002	4歳	男	EF	1.6	+	細谷	1)
8	2002	5カ月	女	EF	1.8	+	細谷	1)
9	2004	5カ月	男	EF	1.6	+	藤本	1)
10	2005	4カ月	女	?	1.6	+	河場	2)
11	2007	4カ月	女	EF	ND	+	真々田	3)
12	2009	5カ月	女	NMA1	0.4	+	後藤	4)
13	2009	5カ月	男	MHP	NT	NT	加瀬	5)

EF：エレンタールフォーミュラ，S-22：有機酸代謝治療用ミルク，MHP：エビトレス，
NMA1：ニューMA-1，NOB：のびやか，NT：施行せず，ND：検出感度以下

文献

- 1) Fujimoto W, Inaoki M, Fukui T, Inoue Y, Kuhara T: Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula. J Dermatol 2005; 32: 256-61
- 2) 河場康郎, 小西恭子, 岡田晋一, 飯塚俊之, 宇都宮靖, 神崎 晋, 他. 【内分泌・代謝】ビオチンを含有しないアミノ酸調整ミルク哺育により高乳酸・ビルビン酸血症を呈した1例. 小児科臨床 2005; 58: 385-90
- 3) 真々田容子, 村田敬寛, 谷口歩美, 長谷川有紀, 鈴木徹臣, 幸田恭子, 他. 牛乳蛋白アレルギー児に発症したアミノ酸調整粉末哺育によるビオチン欠乏症. アレルギー 2008; 57: 552-7
- 4) 後藤美奈, 大畑亮介, 伊藤恵子, 福井 徹, 井上義人, 久原とみ子, 他. アミノ酸調整粉末の単独哺育中に生じた後天性ビオチン欠乏症の1例. 臨床皮膚科 2009; 63: 565-9
- 5) 加瀬貴美, 森川玲子, 村本文男, 新飯田裕一: ミルクアレルギー除去ミルク単独哺育によるビオチン欠乏症の1例. 臨床皮膚科 2009; 63: 716-9

ORIGINAL ARTICLE

A genome-wide association study identifies *RNF213* as the first Moyamoya disease gene

Fumiaki Kamada¹, Yoko Aoki¹, Ayumi Narisawa^{1,2}, Yu Abe¹, Shoko Komatsuzaki¹, Atsuo Kikuchi³, Junko Kanno¹, Tetsuya Niihori¹, Masao Ono⁴, Naoto Ishii⁵, Yuji Owada⁶, Miki Fujimura², Yoichi Mashimo⁷, Yoichi Suzuki⁷, Akira Hata⁷, Shigeru Tsuchiya³, Teiji Tominaga², Yoichi Matsubara¹ and Shigeo Kure^{1,3}

Moyamoya disease (MMD) shows progressive cerebral angiopathy characterized by bilateral internal carotid artery stenosis and abnormal collateral vessels. Although ~15% of MMD cases are familial, the MMD gene(s) remain unknown. A genome-wide association study of 785 720 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed, comparing 72 Japanese MMD patients with 45 Japanese controls and resulting in a strong association of chromosome 17q25-ter with MMD risk. This result was further confirmed by a locus-specific association study using 335 SNPs in the 17q25-ter region. A single haplotype consisting of seven SNPs at the *RNF213* locus was tightly associated with MMD ($P=5.3\times 10^{-10}$). *RNF213* encodes a really interesting new gene finger protein with an AAA ATPase domain and is abundantly expressed in spleen and leukocytes. An RNA *in situ* hybridization analysis of mouse tissues indicated that mature lymphocytes express higher levels of *Rnf213* mRNA than their immature counterparts. Mutational analysis of *RNF213* revealed a founder mutation, p.R4859K, in 95% of MMD families, 73% of non-familial MMD cases and 1.4% of controls; this mutation greatly increases the risk of MMD ($P=1.2\times 10^{-43}$, odds ratio=190.8, 95% confidence interval=71.7–507.9). Three additional missense mutations were identified in the p.R4859K-negative patients. These results indicate that *RNF213* is the first identified susceptibility gene for MMD.

Journal of Human Genetics (2011) 56, 34–40; doi:10.1038/jhg.2010.132; published online 4 November 2010

INTRODUCTION

'Moyamoya' is a Japanese expression for something hazy, such as a puff of cigarette smoke drifting in the air. In individuals with Moyamoya disease (MMD), there is a progressive stenosis of the internal carotid arteries; a fine network of collateral vessels, which resembles a puff of smoke on a cerebral angiogram, develops at the base of the brain (Figure 1a).^{1,2} This steno-occlusive change can cause transient ischemic attacks and/or cerebral infarction, and rupture of the collateral vessels can cause intracranial hemorrhage. Children under 10 years of age account for nearly 50% of all MMD cases.³

The etiology of MMD remains unclear, although epidemiological studies suggest that bacterial or viral infection may be implicated in the development of the disease.⁴ Growing attention has been paid to the upregulation of arteriogenesis and angiogenesis associated with MMD because chronic ischemia in other disease conditions is not always associated with a massive development of collateral vessels.^{5,6} Several angiogenic growth factors are thought to have functions in the development of MMD.⁷

Several lines of evidence support the importance of genetic factors in susceptibility to MMD.⁸ First, 10–15% of individuals with MMD

have a family history of the disease.⁹ Second, the concordance rate of MMD in monozygotic twins is as high as 80%.¹⁰ Third, the prevalence of MMD is 10 times higher in East Asia, especially in Japan (6 per 100 000 population), than in Western countries.³ Familial MMD may be inherited in an autosomal dominant fashion with low penetrance or in a polygenic manner.¹¹ Linkage studies of MMD families have revealed five candidate loci for an MMD gene: chromosomes 3p24–26,¹² 6q25,¹³ 8q13–24,¹⁰ 12p12–13¹⁰ and 17q25.¹⁴ However, no susceptibility gene for MMD has been identified to date.

We collected 20 familial cases of MMD to investigate linkage in the five putative MMD loci. However, a definitive result was not obtained for any of the loci. We then hypothesized that there might be a founder mutation among Japanese patients with MMD because the prevalence of MMD is unusually high in Japan.¹⁵ Genome-wide and locus-specific association studies were performed and successfully identified a single gene, *RNF213*, linked to MMD. We report here a strong association between MMD onset and a founder mutation in *RNF213*, as well as the expression profiles of *RNF213*, in various tissues.

¹Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ²Department of Neurosurgery, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ³Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ⁴Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ⁵Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ⁶Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan and ⁷Department of Public Health, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

Correspondence: Dr S Kure, Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Miyagi, Sendai 980-8574, Japan.

E-mail: kure@med.tohoku.ac.jp

Received 30 September 2010; accepted 1 October 2010; published online 4 November 2010