

PCFT (SLC46A1) 新規変異による遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) の解析

山田雅文¹⁾、千田奈津子¹⁾、有賀 正¹⁾、岸本健治²⁾、小林良二²⁾、小林邦彦²⁾、小原 収³⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科小児科学

2) 札幌北楡病院小児科

3) 公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

研究要旨

遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) は、消化管での葉酸吸収障害と中枢神経系への輸送障害により生後 1~3 ヶ月頃より巨赤芽球性貧血、易感染性や神経症状を生じる先天性疾患である。常染色体劣性遺伝形式を示し、proton-coupled folate transporter (PCFT) をコードする *SLC46A1* 遺伝子の異常が報告されているが、本邦からは未報告である。今回、臨床的に HFM が疑われた患者において *SLC46A1* 解析を行ったところ、母由来で Gly189Val アミノ酸置換を生じるミスセンス変異 c.566G>T と、父由来の deep intronic mutation, c1166-285T>G のヘテロ接合体であることが判明した。後者は exon 3 と exon 4 の間に 168 bp の intron 3 の挿入配列を生じ、挿入配列内で premature termination を来していると考えられた。いずれも発現が著明に低下することによる機能喪失型変異であると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) では、生後早期より巨赤芽球性貧血に加えて易感染性や神経症状で発症し、迅速な診断・治療開始と適切な治療の継続がなければ致死的感染症で死亡したり、不可逆的な神経学的後遺症を来す可能性の高い遺伝性疾患である。proton-coupled folate transporter (PCFT) をコードする *SLC46A1* 遺伝子の異常が報告されているが、世界的にみても 23 例の報告のみで (図 1) 本邦からの報告はない。また、IUIS による原発性免疫不全症 (PID) 分類には含まれておらず、PID を専門とする施設においても診断されずに見逃されている可能性は否定できない。今回、臨床的に HFM と診断された患者において、HFM の責任遺伝子として報告されている *SLC46A1* 遺伝子に加え、葉酸 transport に関わる reduced folate carrier (RFC) をコードする *SLC19A1* 遺伝子についても遺伝子レベルで検討し、さらには蛋白レベルでの発現や葉酸 transport

機能について解析を行い、疾患の原因、病態を明らかにすることを目的とした。

B. 症例と研究方法

(症例)

4 ヶ月女児。

在胎 37 週体重 2,272g で出生。1 ヶ月健診で異常を指摘されず、新生児期より人工栄養が開始になった。家族歴に特記事項なく、血族婚なし。同胞は兄 2 人で健康であった。生後 3 ヶ月より咳嗽持続、哺乳不良、体重減少、貧血、血小板減少があり、前医入院。体重は 4,042g と 1 ヶ月で 300g の減少がみられた。SpO₂ 83% (room air) と酸素濃度の低下を認めた。皮膚は蒼白で追視、頸定はみられず、表情に乏しかった。胸部 X 線写真ではすりガラス様で喀痰 PCR で *Pneumocystis jiroveci* が検出され、*Pneumocystis* 肺炎と診断した。血液検査では白血球数、好中球数、リンパ球数の減少はなく、リンパ球

分画も naïve T 細胞分画を含めて大きな異常はみられなかったが、PHA, ConA 刺激下のリンパ球幼若化反応は著明に低下し、ほぼ無反応であった。高度の貧血と血小板減少がみられた。血清 IgG は 97 mg/dl と著減し、葉酸は <0.5 ng/ml と感度以下であったが、ビタミン B12 は正常範囲であった。

(研究方法)

正常コントロール、患者、患者両親より採取したヘパリン血より比重遠心法で末梢血単核球(PBMC)を分離した。

DNA 解析: PBMC より genomic DNA を抽出し、かずさ DNA 研究所において *SLC46A1* と *SLC19A1* の各 exon とその近傍 intron について direct sequence 法で遺伝子解析を行った。*SLC46A1* についてはさらに intron 3 配列の解析を行った。

cDNA 解析: PBMC から抽出した total RNA より cDNA を作成し、*SLC46A1* RT-PCR を行った。

さらに TA cloning を行い、各 clone の配列を解析した。

Transient transfection による両親由来変異体の PCFT 発現の解析: 全長の *SLC46A1* cDNA Wild-type (Wt), +168 bp (父 mutant), Gly189Val (母 mutant) を作成し、pcDNA3-His vector に乗せかえることにより標識部位に対する抗体でも認識できるようにした。細胞は HeLa を用い、Wt, mutants 間で導入効率が同程度であることを EGFP-V の cotransfection で確認した。whole cell lysate を抽出し、Western blot 解析を行った。C 端を認識する抗 PCFT 抗体に加え、N 端の標識部位に対する抗 Xpress 抗体でも発現を解析した。

コントロールと患者の Epstein-Barr virus 不死化 B (EBV-B) 細胞株を樹立し、葉酸欠乏培地で 7 日間培養後 0、6、12、30、3000nM の葉酸を加え、細胞増殖を解析した。

(倫理面への配慮)

患者の個人情報ならびに臨床データの全ては、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野(以下、本講座)の主治医が厳重に管理する。特に遺伝情報については、その守秘義務を厳格に遂行し、研究結果を発表する場合は個人を識別できないように患者名等を符号化し、本講座において患者連結を行う。

C. 研究結果

遺伝子レベルの解析:

DNA レベルの解析で *SLC19A1* 遺伝子には異常がみられなかったが、*SLC46A1* 遺伝子には Gly189Val アミノ酸置換を生じる塩基置換 c.566G>T をヘテロ口で認め、母由来であった。Gly189 は種を超えて保存されていた。Gly189Val は SNP としても疾患に関連した変異としても未報告で、健常人 300 人にもみられなかった。SIFT、及び Polyphen-2 software を用いた解析からも疾患に関連した変異である可能性が考えられた。一方父由来の allele を確認するために患者 *SLC46A1* cDNA の TA cloning を行ったところ、exon 3 と exon 4 の間に 168 bp が挿入されていた(図 2)。この挿入配列を挟むような primer を作成して RT-PCR を行ったところ、患者と父のみに 168 bp が挿入された産物を認めた(図 3)。この 168 bp 挿入が生じると、アミノ酸レベルでは Ala389 以降異常アミノ酸配列が続き、20 番目で stop codon により翻訳が停止すると考えられた。挿入配列は intron 3 由来であることが判明した。次に、なぜこの挿入配列を生じるのかを明らかにするために挿入配列とその近傍の DNA 配列を解析したところ、挿入配列の 3'端の塩基 T が G に置換されていた(c.1166-285T>G)(図 4A)。Splice site prediction software

(http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) を用いた解析からは、塩基置換部位の 3'側に隣接した

配列 gt が splice donor site として認識されることにより挿入が生じることが示唆された (図 4B)。さらに、患者 PBMC 由来 cDNA を用い、挿入配列の有無に特異的な RT-PCR を行い、父由来 allele からは 168 bp の挿入された配列しか生じず、母由来 allele からは 168 bp の挿入された配列は生じないことが示された。

各 PCFT mutant の蛋白レベルでの発現の解析：

次に、全長の *SLC46A1* cDNA Wild-type (Wt), +168 bp (父 mutant), G189V (母 mutant) を HeLa 細胞に transient transfection し、各 mutant の蛋白レベルでの発現を解析した。今までの報告と同様、HeLa 細胞の endogenous PCFT の発現はほとんど検出されず、一方 Wt では glycosylation によると考えられる幅の広い PCFT の発現がみられた (図 5A, B)。Gly189Val mutant では著明に発現が低下していたが、わずかな発現を認めた。+168 bp mutant では C 端を認識する抗 PCFT 抗体では予想通り発現は確認できなかったが、N 端の標識部位を認識する抗 Xpress 抗体では、Wt よりも低い位置にバンドがみられた。これが挿入配列によって premature termination を生じたために truncate した産物なのか、さらに degradation されたものであるかについては今回の解析では明らかにできなかった。

EBV-B 細胞株を用いた葉酸欠乏下での増殖

コントロールと患者の EBV-B 細胞株を、葉酸欠乏培地で 7 日間培養後 0、6、12、30、3000nM の葉酸を加え細胞増殖を解析したところ、コントロールでは 6 nM の葉酸濃度でも細胞増殖の低下がほとんどみられなかったが、患者では葉酸濃度が低くなるのに比例した細胞増殖の低下が観察され、EBV-B 細胞株においても患者の葉酸吸収能障害が示唆された。

葉酸投与開始後の臨床経過

経過中みられた症状と入院時の検査結果より臨床的に HFM と診断した。葉酸の経口投与を速やかに開始したが明らかな改善がみられず、葉酸の静脈内投与 (iv) に変更したところ、血球系の改善がみられた。肺炎像も消失し、PHA, ConA 刺激下のリンパ球幼若化反応も正常化した。体重、神経発達の catch-up も葉酸 iv 開始後から速やかにみられた。血清 IgG 値は葉酸 iv 開始 5 か月後より上昇し、生後 14 ヶ月より年齢相当となった。

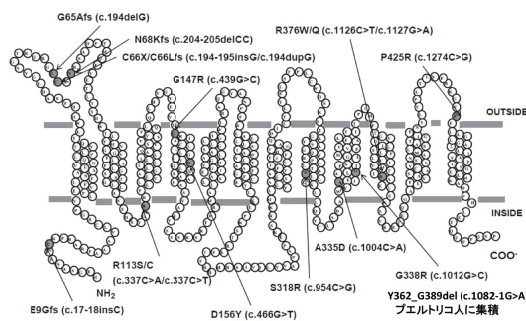


図 1 既報の *SLC46A1* 変異

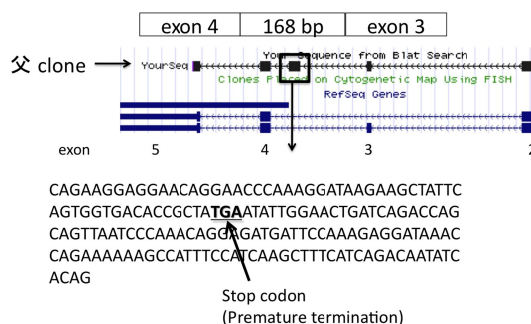


図 2 父由来 allele の TA cloning による解析

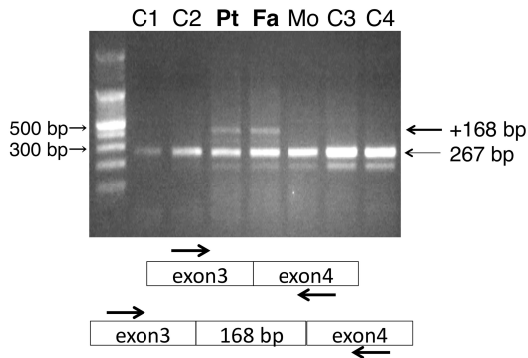
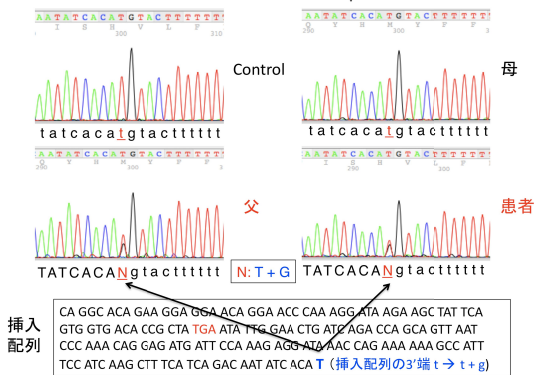


図3 挿入配列を挟むRT-PCRとそのダイレクトシーケンス解析

A



B

Donor site predictions				
Start	End	Score	Exon	Intron
242	256	0.91	ATCACAG	gtactttt

Scoreなし atcacatgtactttt

図4 (A) 挿入配列とその近傍の DNA レベルのダイレクトシーケンス解析

(B) Splice site prediction software による解析

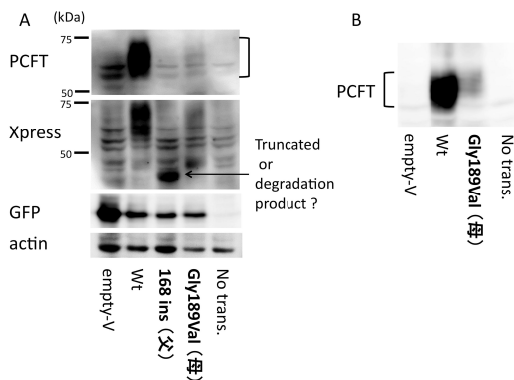


図5 (A) 父、母 mutant の Western blot 法による PCFT 発現解析

(B) 母 mutant の Western blot 法による PCFT 発現解析

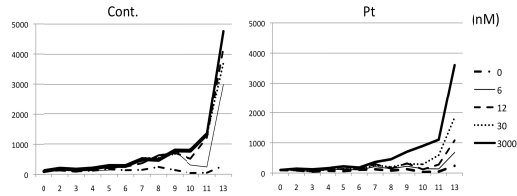


図6 EBV-B細胞株を用いた葉酸欠乏下での増殖の解析

D. 考察

本症例は *SLC46A1* 遺伝子の新規 compound heterozygous mutations による HFM 症例であり、いずれも PCFT 発現が著明に低下することが機能喪失の主因になっていると考えられた。Gly189Val mutant を random mutagenesis で人工的に作成した研究 (Am J Physiol Cell Physiol, Zhao, 2012) では、今回の報告と同様に PCFT 発現は若干認められるものの葉酸 transport 能は完全に欠損していた。Gly189に隣接する Ile188 は葉酸結合 pocket を形成し、また Glu185 は proton coupling に関わることが示唆されており (Am J Physiol Cell Physiol, Unal, 2009)、この領域は葉酸 transport に重要であると考えられた。したがって、Gly189Val mutant は PCFT の発現低下に加え、機能自体の喪失も有している可能性がある。

SLC46A1 遺伝子変異に起因する HFM 症例は本邦からは未報告であったが、本症例のような deep intronic mutation を有している場合には、通常の DNA 解析のみでは見逃されてしまっている可能性がある。貧血や神経症状を呈する原発性免疫不全症患者においては本疾患も積極的に疑い、注意深く解析していく必要がある。

血球系への葉酸吸収については主に RFC が機能すると考えられるが、今回の研究で、葉酸欠乏下においては PCFT も重要な役割を果たしている可能性が示唆され、今後さらに検討を行っていく必要がある。

E. 結論

今回報告した症例は、*SLC46A1* 新規遺伝子変異による本邦初の HFM 症例である。世界的にみても稀な疾患であり、IUIS の PID 疾患に分類されていないことから馴染みがなく見逃されている可能性がある。貧血や神経症状を呈する免疫不全症患者においては本疾患も念頭に置く必要がある。迅速な診断と効果的な治療の開始とその維持が重要と考えられる。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

第7回日本免疫不全症研究会(2014年1月25日)
複合免疫不全を呈した *SLC46A1* 新規変異による先天性葉酸吸収不全症
千田奈津子、山田雅文、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原収、有賀正

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

1. Qui A, et al. (2006) Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* 127:917-928.

2. Desmoulin SK, et al. (2012) The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther.* 13:1355-1373.
3. Mahadeo KM, 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.
4. Zhao R, et al. (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.
5. Zhao R, et al. (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:C673-C681
6. Unal ES, et al. (2009) Role of the glutamate 185 residue in proton translocation mediated by the proton-coupled folate transporter *SLC46A1*. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C66-C74.