

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
分担研究報告書

脳クレアチン欠乏症候群の分子遺伝学的診断に関する研究

分担研究者 新保裕子 神奈川県立こども医療センター 臨床研究所

## 研究要旨

治療可能な代謝疾患のひとつに脳内クレアチンが欠乏するクレアチン代謝異常症があげられる。クレアチン代謝異常症は、重度の精神遅滞を主要症状とし、てんかん、自閉症、重度の言語障害などの様々な臨床症状を有する。その先天的な原因として、クレアチン生合成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)の遺伝子の欠損が知られている。臨床症状を有する患者の脳を磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で調べて脳内クレアチン値の低下を確認することにより診断されるが、原因遺伝子を特定する手掛かりを得るには、尿や血清中のクレアチン関連化合物(特にグアニジノ酢酸/クレアチニン比、クレアチン/クレアチニン比)を測定する必要がある。本研究では、クレアチン代謝異常症が疑われる症例において、まず尿中のクレアチン関連化合物を HPLC 法で測定し、次いで血液から RNA、ゲノム DNA を抽出して遺伝子解析を行う。

### A. 研究目的

クレアチン代謝異常症は、重度の精神遅滞を主要症状とし、てんかん、自閉症、重度の言語障害などの様々な臨床症状を有する疾患である。海外におけるクレアチン代謝異常症の報告が多いが、日本での報告は当院で解析した数例にとどまる。その先天的な原因として、クレアチン生合成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)の遺伝子の欠損が知られている[1-3]。臨床症状を有する患者の脳を磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で調べて

脳内クレアチン値の低下を確認することにより診断されるが、原因遺伝子を特定する手掛かりを得るには、尿や血清中のクレアチン関連化合物(特にグアニジノ酢酸/クレアチニン比、クレアチン/クレアチニン比)を測定する必要がある。

2011年に当研究室において、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UV 検出器でポリマー系の陽イオンクロマトグラフィー用カラムを用いた生体試料中のクレアチン化合物の測定方法及びその方法を用いるクレアチン代謝異常症の患者のスクリーニング方法を開発し[4]、本邦の初症例を含むクレアチン代謝異常症 6 家系(SLC6A8 欠損症:5 家系、GAMT 欠損:1 家

系)の診断を行った[5-7]。生体試料分析において、SLC6A8 欠損症は尿中のクレアチン/クレアチニン比が上昇、GAMT 欠損症は尿、血漿、髄液中のグアニジノ酢酸濃度上昇を特徴とする。

尿のスクリーニング、脳内 MRS、遺伝子検査から早期診断、治療応用を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 尿中のクレアチニン関連化合物の測定

採取した尿は、直ちに凍結し、-80 で保存する。

HPLC 測定には、表面にカルボキシル基の付いたポリマー系ゲルが充填された弱酸性陽イオン交換カラム(Shodex YS-50)を用い、薄いリン酸またはギ酸の水溶液を溶離液として UV 210nm で検出する。まず、グアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニンの標準溶液(1~10 μM)を測定し、各成分について、濃度を X-軸、ピーク高さを Y-軸にとって検量線を作成する。

患者尿検体の測定は、凍結尿 500 μl に等量のアセトニトリルを添加後、氷上に静置し、遠心分離により蛋白を除去後の上清を 10~100 倍希釈し、評価する。

### 2. 遺伝子検査

末梢血液(EDTA2Na)5ml(3ml をゲノム DNA 抽出、2ml を RNA 抽出)に使用する。cDNA 合成には Primescript RT reagent kit (Takara)を用いる。

SLC6A8, GAMT, AGAT 各遺伝子の全コーディング領域をカバーするプライマーを独自に設計、プライマー内側特に 3' 側に SNP が入らないことを確認する。

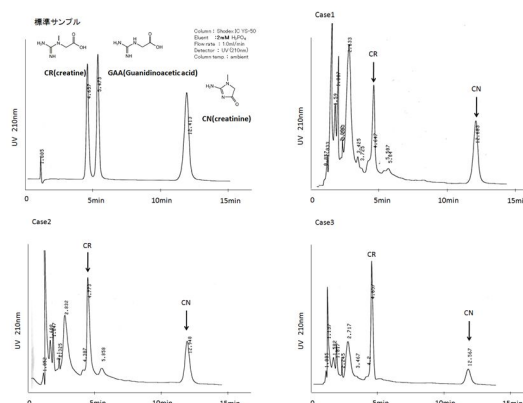
## C. 研究結果

臨床学的クレアチン代謝異常症が疑われた 3 症例(男児 2 名、女児 1 名)について尿中のクレアチン化合物を HPLC 法で測定した(表 1、図 1)。1 例(Case3)の男児に関して、尿中クレアチン/クレアチニン比が同年齢の正常上限値の約 3 倍上昇を認めた。2 例(Case1, 2)に関しては尿中クレアチン/クレアチニン、グアニジノ酢酸/クレアチニン比は正常範囲内であった。

表 1. 尿中クレアチン/クレアチニン比

Patient (year)	gender	クレアチン/クレアチニン比
Case1 (2y5m)	male	1.10 (ref.0.2-2.03)
Case2 (3y2m)	female	1.81 (ref.0.2-2.03)
Case3 (2y)	male	6.45 (ref.0.2-2.03)

図 1. クロマトグラム



## D. 考察

本研究期間にクレアチン代謝異常症が疑われた 3 患者の尿中のクレアチン化合物

物を測定したところ、1例(Case3)においてクレアチン/クレアチニン比の上昇を認めた。MRS検査では脳内クレアチン値の低下が認められたことにより、クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症が疑われた。

遺伝子検査により確定診断を行う。

## E. 結論

尿中のクレアチン関連化合物のHPLC測定は、クレアチン代謝疾患の診断に有用である。

## References

- [1] S. Stockler et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man Am J Hum Genet 58 (1996) 914-922.
- [2] C.B. Item et al. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans Am J Hum Genet 69 (2001) 1127-1133.
- [3] G.S. Salomons et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome Am J Hum Genet 68 (2001) 1497-1500.
- [4] T. Wada et al. A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes Amino Acids 43 (2012)

993-997.

[5]H. Osaka et al. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness Mol Genet Metab 106 (2012) 43-47.

[6]H. Kato et al. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8 Brain Dev (2013).

[7] T. Akiyama et al. A Japanese adult case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency JIMD Rep 12 (2013) 65-69.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX. J Hum Genet, 59 (2014) 408-410.

2) Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mol Genet Metab Rep.1 (2014) 133-138

3) Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita

S, Osaka H.

Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev.* (2014) [Epub ahead of print]

4) Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev.* 37(2015)243-249.

5) Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A novel two-nucleotide deletion in the ATP7A gene associated with delayed infantile onset of Menkes disease. *Pediatr Neurol.* (2014): 50:417-420

6) Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia. (2014): 50:99-100

## 2 . 学会発表

1) Shimbo H, Kurosawa K, Okamoto N, Ninomiya S, Wada T. Molecular genetic study of 75 patients with ATR-X syndrome in Japan. 64th American Society of Human Genetics . 2014.10.18-22 San Diego

2) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Akira Ohtake, Noriko Aida. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mitochondrial Medicine.* 2014.6. 4-7 Pittsburgh PA

3) Sasaki Y, Shimbo H, Osaka H. Regulation of osteoblast derived from dental pulp cells of cleidocranial dysphasia. 9th Biennial Conference of PDAA 2014.8.22-24 Singapore

4) Infantile Neuroaxonal Dystrophy 様の脳 MRI 所見を示した SLC9A6 変異を有する一例 山本亜矢子, 和田敬仁, 新保裕子, 松本直通, 小坂仁 56 回日本小児神経学会 平成 26 年 5 月 28-30 日 浜松

5) ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes の 1 例 池田尚広, 山崎雅世, 鈴木峻, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫, 新保裕子, 山形崇倫 56 回日本小児神経学会 平成 26 年 5 月 28-30 日 浜松

6) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療. 伊藤進、三宅勇平、下吹越航、新保裕子 第 42 回日本小児神経外科学会, 仙台, 2014 年 5 月

7) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療 伊

藤進、鈴木良介、三宅茂太、新保裕子 第  
10 回 craniosynostosis 研究会, 名古屋,  
2014 年 7 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許第 5662182 号

発明の名称： 生体試料中のアミン測定  
方法およびその方法を用いる患者のスク  
リーニング方法

特許権者： 地方独立行政法人神奈川県  
立病院機構

発明者： 和田敬仁、新保裕子、小坂仁

出願番号： 特願 2011-019561

出願日： 平成 23 年 2 月 1 日

登録日： 平成 26 年 12 月 12 日