

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（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

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

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。その先天性の原因として、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。昨年度、臨床学的、尿中のクレアチン/クレアチニン比率、MRS 検査よりクレアチン代謝異常症（SLC6A8 欠損症）が疑われた1症例(男児)について、確定診断のため遺伝子検査を行った。その結果、exon1 に12塩基重複(c.196_207 dup, p.(Val66_Ala69insVGFA))が認められた。既知の報告はなく、新規変異と考えられる。クレアチンの取り込みを検討するため、患者由来の皮膚由来線維芽細胞を維持培養し、共同研究先に提供した。

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。その先天性の原因として、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た[4]。今までに本邦初症例を含むクレアチン代謝異常症7家系（SLC6A8欠損症:6家

系、GAMT 欠損:1 家系) の診断を行った [5-8] (表 1)。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。患者尿検体の測定は、凍結尿 500 μ l 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。

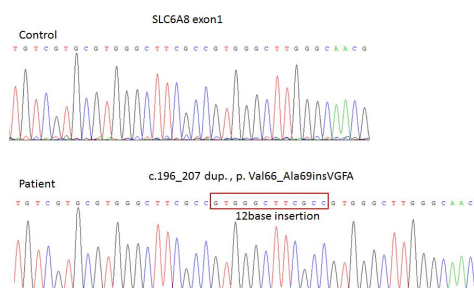
2. 遺伝子検査

末梢血液からゲノム DNA、RNA を抽出し、遺伝子解析に使用する。昨年度、臨床学的クレアチン代謝異常症が疑われた 1 症例(男児)について、尿中クレアチン/クレアチニン比の上昇(同年齢の正常上限値の約 3 倍)、脳 MRS 検査では脳内クレアチン値の低下が認められた。SLC6A8 欠損症が疑われ、確定診断のため遺伝子検査を行った。

C. 研究結果

臨床学的クレアチン代謝異常症が疑われた男児 1 症例の遺伝子検査結果、exon1 に 12 塩基重複 (c.196_207 dup, p.(Val166_Ala69insVGFA)) が認められた。(図 1)。

図 1. クロマトグラム



D. 考察

本研究期間に臨床学、生化学、MRS 検査よりクレアチン代謝異常症 (SLC6A8 欠損症) が疑われた 1 症例(男児)について、遺伝子学的に確定診断した。

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。遺伝学的に確定診断された症例に関しては、患者由来線維芽細胞を共同研究先に提供し、クレアチンの取り込みを検討し、機能解明を行う。

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.

[8] F. Nozaki et al. A family with creatine transporter deficiency diagnosed with urinary creatine / creatinine ratio and the family history: the third Japanese familial case. *No To Hattatsu* 47 (2015) 49-52.

G. 研究発表

1 . 論文発表

1) Omata T, Nagai JI, Shimbo H, Koizume S, Miyagi Y, Kurosawa K, Yamashita S,

Osaka H, Inoue K. *Brain Dev.* 2015 Dec 22 A splicing mutation of proteolipid protein 1 in Pelizaeus - Merzbacher disease.

2) Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Hashizume O, Nagatoishi S, Matsuo A, Sato T, Kudo T, Matsuhashi T, Murayama K, Ohba Y, Watanabe S, Kanno SI, Minaki D, Saigusa D, Shimbo H, Mori N, Yuri A, Yokoro M, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Ichimura T, Anzai JI, Kohzuki M, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Tohyomizu M, Tsumoto K, Nakada K, Bonventre JV, Ito S, Osaka H, Hayashi KI, Abe T. Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov 25.

3) Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Matsuhashi T, Matsuo A, Sato T, Oba Y, Watanabe S, Minaki D, Saigusa D, Shimbo H, Mori N, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Yuri A, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Kohzuki M, Anzai J, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Toyomizu M, Ito S, Osaka H, Hayashi K, Abe T. Mitochondrial Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J Exp Med.* 2015;236(3):225-32.

2 . 学会発表

1) H. Shimbo, H. Osaka, M. Tachikawa, S. Ohtsuki, S. Ito, T. Goto, Y. Tsuyusaki, N. Aida, K. Kurosawa, Y. Kurosawa, H. Kato, K. Takano, T. Wada. Molecular genetic study and urine analysis of Japanese patients with cerebral creatine deficiency syndromes. 65th American Society of Human Genetics 2015.10.6-10 in Baltimore

河野由美, 新保裕子, 小坂仁, 山形崇倫
57回日本小児神経学会 平成27年5月
28-30日 大阪

2)末梢神経障害を呈したニーマンピック病 C型の2例 溝部吉高, 露崎悠 新保裕子, 渡邊肇子, 佐藤睦美, 安西里恵, 市川和志, 井合瑞江, 山下純正, 後藤知英 57回日本小児神経学会 平成27年5月28-30日 大阪

4)「脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究班」の取り組み 和田敬仁, 小坂仁, 相田典子, 後藤知英, 露崎悠, 新保裕子, 加藤秀一, 高野亨子, 大槻純男, 伊藤慎悟, 立川正憲, 黒澤裕子 57回日本小児神経学会 平成27年5月28-30日 大阪

3)生直後より呼吸障害を認め、気管切開術を要した Pelizaeus-Merzbacher病 (PMD) の1例 植田綾子, 小池泰敬, 矢田ゆかり

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. SLC6A8 欠損症 6 家系 11 患者と GAMT 欠損症 1 患者の臨床像

Family	Family A				Family B				Family C			Family D		Family E		Family F		Family G			
CASE #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Gene	SLC6A8																		SLC6A8 + BAP31	GAMT	
Mutation	c.1681 G>C, p.Gly561Arg in exon 12				c.1663 C>T, p.Pro554Leu in exon 12				c.321_323del CTT, p.Phe107del in exon 2			c.514 T>C, p.Cys172Arg in exon 3		c.196_207 dup p.Val62_Ala69insVGA in exon 1		19-bp deletion SLC6A8(exon-3-12) (p.Val1100Phe*50 and Ile111Profs*73) c.578 A>G p.Gln193Arg in exon 6		c.393 G>C p.Gly131Arg in exon 3 (p.Val1100Phe*50 and Ile111Profs*73) c.578 A>G p.Gln193Arg in exon 6			
reference No.	6				8									5		7					
Inheritance	Maternal				Maternal				Maternal			Maternal		NA		de novo		NA			
Evaluated Age	6 Yr	4 Yr	2 Yr	20 Yr	17 Yr ♀	19 Yr	9 Yr	10 Yr	5 Yr	5 Yr	1 Yr 8 Mo	6 Yr	2 Yr	6 Yr	6 Yr	28 Yr ♀	38 Yr	38 Yr	38 Yr		
Sex	male	male	male	female (carrier)	male	male	male	female (carrier)	male	male	female (carrier)	male	female	male	female	male	male	male	female		
Decorational Age	28.6mo	28.5mo	40.6mo	40mo	NE	NE	NE	45mo	37mo	40mo	40mo	38mo	27mo	27mo	27mo	27mo	27mo	27mo	27mo		
Weight at Birth	2770g	2632g	2882g	2960g	NE	NE	NE	2922g	3164g	2980g	2852g	2472g	2472g	2472g	2472g	2472g	2472g	2472g	2472g		
Present	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
height (S.D.)	-0.6	-0.4	-3.2	-3.1	NE	-0.9	-2.1	-0.8	-2.1	-0.1	-2.2	-3.2	-0.9	-0.4	-4.4	-4.4	-4.4	-4.4	-4.4		
head circumference (S.D.)	-2.2	NA	-4.2	NA	NE	NA	1	-0.5	0.3	-0.4	0.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Motor Development	24 months	22 months	21 months	18 months	NE	NA	4y7mo	24 months	30 months	25 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months		
Independent Walking	24 months	22 months	21 months	18 months	NE	NA	4y7mo	24 months	30 months	25 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months		
Speech development	24 months	20 months	20 months	21 months	NE	NA	4y7mo	24 months	30 months	25 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months		
first words	24 months	20 months	20 months	21 months	NE	NA	4y7mo	24 months	30 months	25 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months	24 months		
level of speech	Words only	5 words only	5 words only	18 months	NE	No words	No words	Words only	A few words	no words	no words	no words	no words	no words	no words	no words	no words	no words	no words		
Seizure (age of onset)	Febrile Se (3y)	Febrile Se (2y10mo)	Febrile Se (2y10mo)	Epilepsy (1.5 Yr)	Epilepsy	frequent febrile seizures, and afebrile seizures: intractable epilepsy (10 Yr)	Febrile Se x1, Afebrile Se x1	Febrile Se x1	No seizures	No seizures	Febrile Se x1	No seizures	No seizures	No seizures	No seizures	Status epilepticus (4y)	Epilepsy (20mo)	Epilepsy (18mo)	Intractable epilepsy (18mo)		
ESS	No Se discharge	NA	No Se discharge	P/O-formant diffuse hyper	NA	No Se discharge	Sp at Rt-P	No Se discharge	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Brain MRI/CT	HCC	Normal (CT only)	Delayed myelination, HCC, small pituitary gland	NA	NA	Normal	Normal	NA	Normal	Normal (CT only)	NA	almost normal myelination, mild HCC	NA	Normal (slightly thin corpus callosum)	NA	Increased signal in globus pallidus on T2, delayed myelination, HCC, decreased volume of white matter, cerebellar vermian atrophy	NA	NA	Increased signal in globus pallidus on T2		
MRI Spectroscopy	decreased CR peak	NA	NA	NA	NA	decreased CR peak	decreased CR peak	NA	decreased CR peak	decreased CR peak	NA	decreased CR peak	NA	decreased CR peak	NA	decreased CR peak	NA	NA	decreased CR peak		
Characteristics	moderate ID, not autistic, understood simple order	severe ID, undetermined simple order	severe ID, restless, hyperactive	mod ID, Poor at writing in school, may be depressed	severe ID, sudden death due to unknown cause	severe ID, autism	severe ID, hypotonia	mod ID	moderate ID, not autistic, communicate by using words	moderate ID, not autistic, failure to thrive at newborn, communicate by using words and gestures	healthy, no signs or symptoms	not autistic, strabismus	healthy, no signs or symptoms	severe ID (no understanding of a simple order)	healthy, no signs or symptoms	severe ID, dystonia, hypertonic and atrophic, failure to thrive, increased ACT/A:T, sensorineural deafness	moderate ID, sudden death due to unknown cause	moderate ID, behavioral problems, movement disorders	severe ID, behavioral problems, movement disorders		
CR/Chn, CAI/Chn ratio	0X/0N 1.07 T	0X/0N 4.8 T	0X/0N 6.1 T	0X/0N 1.23 T	NA	0X/0N 1.82 T	0X/0N 1.81 T	0X/0N 0.41 T	0X/0N 1.82 T	0X/0N 1.28 T	NA	0X/0N 4.54 T	0X/0N 0.44 T	0X/0N 4.54 T	NA	0X/0N 1.56 T	NA	0X/0N 1.82 T			