原著 1

分子遺伝学的検査にて本邦初の変異と家族内発症が明らかになった Lesch-Nyhan variantの一家系

松田 安史¹⁾ 山田 裕一²⁾ 若松 延昭²⁾
三澤 美和³⁾ 江川 克哉³⁾ 山内 高弘¹⁾
中村真希子⁴⁾ 長谷川 弘⁴⁾ 市田 公美⁴⁾
上田 孝典¹⁾

要 約

Lesch-Nyhan 症候群 (LNS) は若年より重症の高尿酸血症, 不随意運動, 精神遅滞, 自咬症等を呈する非常に稀な伴性劣性遺伝の症候群である。これはプリンサルベージ酵素の hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) が先天的に完全欠損することで発症する症候群であるが, 中には部分欠損に留まり LNS の様に症状が強く表れない HPRT 部分欠損症 (Lesch-Nyhan variant) も存在する。今回我々は若年で高尿酸血症・痛風を主訴に紹介受診された男性患者と, 患者同様, 若年発症の高尿酸血症を持つ男性同胞 2 人に対して HPRT 遺伝子や HPRT 活性等の検討を詳細に行い, 全員が Lesch-Nyhan variant であると診断するに至った症例を経験した。HPRT 遺伝子の各エクソンを PCR にて増幅し直接塩基配列決定法にて分析したところ, 3 兄弟とも 59 番目の塩基に A から T に変わる単塩基置換 (c.59A>T) が認められ 20 番目のコドンでアミノ酸がアスパラギン酸からバリンに変わるミスセンス変異 (p.D20V) と HPRT 活性の低下が認められた。また

母親がこの遺伝子変異をヘテロで持つ保因者であることも判明した。Lesch-Nyhan variant における HPRT 遺伝子の単塩基置換はこれまで世界で 120 例の報告があり本変異も 1991 年に米国で 1 例報告されている。しかしそれは単発の報告に留まっており, 家族内発症での本変異の報告はなく, かつ本邦での本変異は初といった点で非常に有意義と考え今回報告した。

緒 言

Lesch-Nyhan 症候群 (LNS, MIM300322) は男児 10 万人に 1 人と非常に稀な重症の伴性劣性遺伝の症候群である¹⁾。hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT, EC 2.4.2.8) が先天的に完全欠損することにより高尿酸血症, 不随意運動, 精神遅滞, 自咬症等を呈する^{2,3)}。しかし, その中には LNS の様に症状が強く表れない HPRT 部分欠損症 (Lesch-Nyhan variant, MIM300323) も存在する⁴⁾。さらに Lesch-Nyhan variant は, LNS に特異的である自咬症が見られないが幅広い神経症状を付随する HPRT-related neurological

受付: 2015 年 3 月 11 日, 受理: 2015 年 7 月 13 日

1) 福井大学医学部血液・腫瘍内科

2) 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

3) 長浜赤十字病院 糖尿病・内分泌内科

4) 東京薬科大学 病態生理学教室

Yasufumi Matsuda, Takahiro Yamauchi,
Takanori Ueda

Yasukazu Yamada, Nobuaki Wakamatsu

Miwa Misawa, Katsuya Egawa

Makiko Nakamura, Hiroshi Hasegawa,

Kimiyoshi Ichida

Key words: Lesch-Nyhan variant, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), 高尿酸血症, 伴性劣性遺伝, phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)

連絡先: 山内 高弘 〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月 23-3 福井大学医学部血液・腫瘍内科

dysfunction (HRND) と、高尿酸血症のみで神経症状や行動障害を伴わない HPRT-related hyperuricemia (HRH) に分類される。今回我々はその HPRT 部分欠損症が一家系に生じている症例を経験したので、分子遺伝学的解析、酵素学的解析及び文献的考察を加えて報告する。

症 例

19歳男性。主訴は高校生の時から続く高尿酸血症、痛風。2012年4月から近医にてフェブキソスタット 10mg/日が処方されており尿酸は改善傾向にあったが、肥満や甲状腺機能異常、生活習慣の偏りもなく、患者（次男）を含む男性同胞3人が同様の高尿酸血症・痛風を発症し、更に兄（長男）には発達障害も認められたため遺伝学的素因を含め精査・加療を行う目的で同年7月当院紹介受診となった。既往歴・生活歴に特記すべき点はないが、他人との会話がやや苦手で集団に十分なじめないというコミュニケーション上の軽度の問

題がある。家族歴としては兄に生後10ヶ月の時点でてんかん・発達障害、10代より高尿酸血症が認められる。弟（三男）も小学生の時より高尿酸血症が認められていたが発達には正常である。両親・祖父母・従兄弟姉妹に明らかな高尿酸血症はない。身体所見上は左拇趾外側に腫脹が認められる以外明らかな異常なし。採血・尿検査の結果を Table 1 に示す。尿酸値の上昇が認められるが腎障害はなく、また高尿酸血症の病型は尿酸クリアランスが正常で、尿中尿酸排泄量が増加していたことから産生過剰型と判定された。

方 法

高尿酸血症・痛風を同胞間で若年発症していることより遺伝性の HPRT 欠損症を強く疑い、患者およびその家族の末梢血を用いて遺伝子解析など精査を行った。なお本検査に関してはその内容や発表を含む情報の扱い等に関して御本人、御兄弟、保護者に書面上で説明し、同意と署名を得た上で

Table 1 Laboratory findings

WBC	1,900 / μ l	Na	135 mEq/l	ALP	307 U/l
Neutrophil	35.7%	K	5.0 mEq/l	γ -GTP	11 U/l
Eosinophil	1.2%	Cl	100 mEq/l	LAP	67 IU/l
Basophil	0.0%	Ca	9.6 mg/dl	ChE	281 U/l
Lymphocyte	56.0%	IP	3.8 mg/dl	LDH	291 U/l
Monocyte	7.1%	BUN	14 mg/dl	CK	212 U/l
RBC	379×10^4 / μ l	Cr	0.94 mg/dl	T-Cho	111 mg/dl
Hb	13.4 g/dl	UA	13.9 mg/dl	TG	30 mg/dl
Ht	39.5%	TP	7.2 g/dl	BS	81 mg/dl
Platelet	23.8×10^4 / μ l	ALB	4.6 g/dl	FT4	1.34 ng/dl
		T-Bil	0.8 mg/dl	FT3	2.59 pg/ml
		AST	29 U/l		
		ALT	16 U/l		
Uric acid clearance	9.3 ml/min (7.3~14.7)*				
Urinary excretion	1.435 mg/Kg/h (0.483~0.509)				
Creatinine clearance	101 ml/min (83~146)*				

* 成人の平均体表面積(m²)は1.73を使用

行っている。また本学倫理審査委員会の見解として本報告に関しては2015年7月現在で倫理審査の必要性は無しと判断されている。遺伝子解析に関しては愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所「ヒトとヒト材料を対象とする研究」倫理委員会で承認されている。

ゲノムDNAは全血0.2mlよりQIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて調整した後、既報⁵⁾に準じて、HPRT遺伝子の9つのエクソンを含むDNA断片を8つに分けてそれぞれの大きさに段階的な差が検出できるようにデザインしたprimerを用いてPCR増幅した。PCR増幅には主にAmpliTaQ Gold (Roche Molecular Systems)のシステムを利用し、用途(特にexon1の増幅)に応じてGC-RICH PCR System (Roche Molecular Systems)を使用した。PCR断片は、低融点アガロースゲル(UltraPure Low Melting Point Agarose, Invitrogen)で電気泳動後、断片を含むゲルを切り出してフェノール抽出し、ポリエチレングリコール沈澱法で精製後、主にPCRに使用したprimerで直接塩基配列を決定(ダイレクトシーケンシング)した。mRNA(NM_000194)はQuickPref Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare)を用いて全血0.025mlから精製し、First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare)を利用して一本鎖cDNAに逆転写した。この一本鎖cDNAからHPRTの全翻訳領域を含むcDNA断片をPCR増幅して、精製後特異primerでダイレクトシーケンシングした。各々のDNA断片の塩基配列は、主として、GenomeLab, Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kitを用いて反応を行い、GenomeLab, GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA)で決定している⁶⁾が、変異部位の詳細については旧法のマニュアル法⁷⁾でも確認している。

同時に測定した赤血球中のHPRTおよびadenine phosphoribosyltransferase (APRT)の酵素活性は、それぞれ¹⁴C-hypoxanthine, ¹⁴C-adenineを用いて生

成した¹⁴C-IMP, ¹⁴C-AMPを測定し、赤血球溶血液のヘモグロビン濃度を基準にしてnmol/min/mgHbで算出した⁸⁾。

また臨床症状との相関性が期待される血中phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)濃度も測定した。従来はPRPPを基質とする酵素を利用して、放射性同位体標識プリン塩基から生成するプリン体の放射活性を測定し間接的にPRPP量を算出していたが、今回は赤血球溶血液20μLにTris-HCl緩衝液を加え、加熱・遠心分離後の上清をろ過し、ろ液5μLを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計LC-MS/MS (AgilentG6410)に注入することで直接測定した⁹⁾。

結 果

Fig.1にHPRTゲノム分析のダイレクトシーケンシングの結果を示す。罹患3兄弟では全て、59番目の塩基AがTに変わる単塩基置換(c.59A>T)が見られ、20番目のコドンでアミノ酸がアスパラギン酸からバリンに変わるミスセンス変異(p.D20V)が同定された。母親は3兄弟と同様の変異ゲノムと正常ゲノムを合わせ持つヘテロ接合体であり、欠損症の保因者と考えられた。

3兄弟のmRNAからRT-PCR法で増幅したcDNAの分析(Fig.2)でも、ゲノム解析でみられたと同一の変異(c.59A>T, p.D20V)が同定され、3兄弟間でmRNA発現量の差も認められなかった。一方母親のcDNAの分析では、正常のmRNAのみの発現が観察された。

HPRT遺伝子の変異に伴い、赤血球溶血液を用いた*in vitro*のHPRT活性は検出限度以下に低下しており、基質のPRPP濃度が上昇していた。PRPP濃度が上昇すると通常APRT活性は安定化し上昇するが⁷⁾、本症例ではAPRT活性は正常値のままであった。また、兄、弟のHPRT活性、PRPP濃度、APRT活性の結果は共に患者と同程度の値であった。変異の保因者である母親の酵素活性はHPRT, APRT共に正常値であった(Table 2)。

Fig.1 Genome analysis of a Lesch-Nyhan variant family with 3 sibling cases. A DNA fragment including exon 2 of *HPRT1* was PCR-amplified using primers a and b, and sequenced directly with primer c by the manual sequencing method⁸⁾. One base substitution (c.59A>T) was identified from 3 sibling patients and their mother was diagnosed as a heterozygous carrier, showing both A and T bands at the mutation site. The mutation was observed more clearly by the manual sequencing method than the automated one.

Table 2 Enzymatic Activities of HPRT, APRT and PRPP in red blood cells

	HPRT (nmol/min/mg hemoglobin)	APRT (nmol/min/mg hemoglobin)	PRPP* (nmol/ml)
Mother	1.57±0.18	0.56±0.11	---
Elder brother	<0.05	0.63±0.05	5.7
Proband	<0.05	0.59±0.12	6.2
Younger brother	<0.05	0.58±0.09	5.4
Control	1.76±0.28	0.42±0.10	0.8±0.3**

* 過去の症例では、完全欠損:40.8, 33.4 nmol/ml, 部分欠損:7.7 nmol/ml
** 健常男性のコントロール

Fig.2 Analysis of mRNA from the Lesch-Nyhan variant family members.

The entire coding region of *HPRT1* cDNA (807 bp) was amplified by RT-PCR from the mRNA⁸⁾. The same mutation as detected in the genome was found in mRNA from the 3 siblings, but only normal mRNA was expressed in their mother.

考 案

HPRTはヒポキサンチンやグアニンがPRPPと共にイノシンーリン酸 (IMP) やグアノシンーリン酸 (GMP) にサルベージされる反応を触媒する酵素であり, それによりヒポキサンチンの尿酸への代謝は抑制される. 一方APRTはアデニンがPRPPと共にアデノシンーリン酸 (AMP) にサルベージされる反応を触媒する酵素である. HPRTが欠損すると, その基質であるヒポキサンチンやグアニン, PRPPが増加する. PRPPが増加すると, HPRT同様それを基質としているAPRTは安定化し活性が高くなることが予想されたため, HPRT活性とPRPP濃度に加えAPRT活性も測定した.

Table 2に示す様に, HPRT活性は母親では正常であったのに対し, 3兄弟では検出限度以下と, 完全欠損症例と同程度に低下していた. しかし

APRT活性は母親と比較しても有意差を認めず, 通常HPRT活性が欠損した患者に見られる本酵素活性の上昇は認めなかった. またPRPP濃度に関しても3兄弟では全て上昇していたが, 過去のHPRT完全欠損症例 (40.8, 33.4 nmol/ml) と比較すると明らかにその上昇度が小さく, むしろ過去の部分欠損症例 (7.7nmol/ml) とほぼ同程度の値であった. これに関しては, *in vitro*ではHPRT活性は完全欠損症例と同程度の低値であっても実際に*in vivo*ではある程度の活性を持って機能していたため, その基質であるPRPP濃度がそこまで上昇しなかったと推測された. また, HPRTの変異タンパク質は安定性が低いため比較的早く分解されること¹⁰⁾や, HPRT活性が完全欠損の様に見えていてもその培養線維芽細胞はヒポキサンチンとグアニン代謝に関してある程度の能力を有してい

たとする報告があること¹¹⁾もその推測を支持すると考えた。そのためAPRTの安定化も起きず、活性は正常範囲に留まったと推測された。以上により、本症例はHPRT部分欠損症 (Lesch-Nyhan variant) と診断された。見方を変えると本症例は、*in vitro*ではHPRT活性値よりもPRPP濃度の上昇度が臨床症状に相関していることを実証する良い例と言える。

母親のHPRTのゲノムはヘテロ接合体ではあったが、正常mRNAのみの発現がみられ (Fig.2), その酵素活性は正常値を示した。この現象はHPRT欠損症では一般的で、通常X染色体は1つの細胞で1つしか活性を持たないように片方のアレルが不活化されているが、正常なアレルの方を不活化し変異アレルが活性を持っているHPRT欠損細胞は血液細胞への分化の段階で選択的に淘汰されるため、正常なアレルが活性を持つ細胞のみが生き残り、その結果が赤血球中のHPRT活性値に反映されたと考えられる¹²⁾。

HPRT遺伝子変異の報告は600例を超えており大部分の家系で異なった変異が発見されている。Jinnah等は271例の解析からHPRT遺伝子変異について以下の4つの結論を導いている¹³⁾。1、比較的Hot spotと考えられる部位はあるが変異は遺伝子全体に及ぶ。2、ある変異が原因で特有の症状を示すという様な遺伝子型と表現型の関連はない。3、臨床症状の軽い部分欠損症では酵素機能が残存する様な変異が原因となっている。4、変異の種別は大まかな臨床症状の差異を示すにすぎない。本症例においては兄に発達障害が認められたが、患者本人には軽度のコミュニケーション障害のみで他に明らかな異常はなく、弟は年齢相応の発達状況と、症状に差異が認められた。しかし上記2、4に示される内容が、兄弟間で遺伝子変異が同じであっても、その症状の差異を説明するものとして挙げられると考えられる。

LNSは10万人に1人と非常に稀な疾患であるが、HPRT部分欠損症 (Lesch-Nyhan variant) を起こす突然変異はLNSの4.15分の1と更に頻度が低下すると報告されている¹⁴⁾。そのためLesch-Nyhan

variantはLNSよりも稀な疾患と考えられ、それが家族内発症する頻度は更に低下すると考えられる。現在LNSのウェブサイトにてHPRT遺伝子の変異報告がされているが (<http://www.lesch-nyhan.org>), それによると、HPRTの部分欠損症であるLesch-Nyhan variantでは本症例の様なpoint mutationが120種類 (2015年3月の時点で) 報告されている。

本症例で見られた遺伝子変異は1991年に米国からLesch-Nyhan variantの原因変異として既に一例報告があり、解析にてHPRT活性が低下している事が証明されているものであるが¹⁵⁾、本症例は前述の様に家族性に変異が確認されかつ3兄弟全員がLesch-Nyhan variantと診断された点で非常に稀であり、変異自体も本邦では初の報告になると考えられる。

今回我々は本邦初の家族性に発症し、同じ変異を持ちながら症状は異なるLesch-Nyhan variantの症例を報告した。長男はHRNDの範疇に入ると考えられるも三男はHRH、発端者である次男はその判断が困難である。今後は兄弟間の症状の差異やPRPP濃度等について更に継続した検討が必要になっていくと考えられる。なお本論文の要旨は第46回日本痛風・核酸代謝学会総会 (東京, 2013年2月) で発表し、臨床経過の詳細については別に報告した¹⁶⁾。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示

本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 花岡 繁: 先天代謝異常 Lesch-Nyhan 症候群. 小児内科増刊号 35: 508-509, 2003.
- 2) Lesch M, Nyhan WL: A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. Am J Med 36: 561-570, 1964.
- 3) Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN: Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. Science 155: 1682-1684, 1967.

- 4) Kelley WN, Rosenbloom FM, Henderson HE, et al: A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 57:1735-1739, 1967.
- 5) Yamada Y, Nomura N, Yamada K, et al: Molecular analysis of HPRT deficiencies: An update of the spectrum of Asian mutations with novel mutations. *Mol Genet Metab* 90:70-76, 2007.
- 6) Yamada Y, Nomura N, Yamada K, et al: Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiencies: *HPRT1* mutations in new Japanese families and PRPP concentration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33:218-222, 2014.
- 7) Yamada Y, Goto H, Ogasawara N, et al: Molecular analysis of five independent Japanese mutant genes responsible for HPRT deficiency. *Hum Genet* 90:379-384, 1992.
- 8) 山田裕一, 野村紀子, 若松延昭: HPRT欠損症の遺伝子解析: 新たな6変異とアジア人変異の総括. *痛風と核酸代謝* 31:31-40, 2007.
- 9) Hasegawa H, Shinohara Y, Nozaki S, et al: Hydrophilic-interaction liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of erythrocyte 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* 976-977:55-60, 2015.
- 10) 鎌谷直之: プリン代謝酵素異常症の遺伝子診断. *東京女子医科大学雑誌* 64:296-304, 1994.
- 11) Bakay B, Nissinen E, Sweetman L, et al: Utilization of purines by an HPRT variant in an intelligent, nonmutilative patient with features of the Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Res* 13:1365-1370, 1979.
- 12) Hakoda M, Hirai Y, Akiyama M, et al: Selection against blood cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan heterozygotes occurs at the level of multipotent stem cells. *Hum Genet* 96:674-680, 1995.
- 13) Jinnah HA, DeGregorio L, Harris JC, et al: The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat Res* 463:309-326, 2000.
- 14) 山中 寿, 鎌谷直之, 藤森 新, 他: HPRT部分欠損症の診断と発生頻度に関する検討. *プリン・ピリミジン代謝* 18:148-152, 1994.
- 15) Davidson BL, Tarle SA, Antwerp MV, et al: Identification of 17 Independent Mutations Responsible for Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) Deficiency. *Am J Hum Genet* 48:951-958, 1991.
- 16) 三澤 美和, 福家 智也, 児玉 憲一, 他: おのおの異なる病態を示した Lesch-Nyhan variants の3兄弟. *高尿酸血症と痛風* 22:80-83, 2014.

The first case of familial Lesch-Nyhan variant in Japan revealed by molecular genetic examination

Yasufumi Matsuda¹⁾Nobuaki Wakamatsu²⁾Katsuya Egawa³⁾Makiko Nakamura⁴⁾Kimiyoichi Ichida⁴⁾Yasukazu Yamada²⁾Miwa Misawa³⁾Takahiro Yamauchi¹⁾Hiroshi Hasegawa⁴⁾Takanori Ueda¹⁾

Lesch-Nyhan disease is sex-linked recessive disorder of children occurring at a very young age and a rare condition that results in severe hyperuricemia, motor disability, developmental delay, and self-injurious behavior. These conditions are attributed to congenital deficiency of the enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), and individuals with less severe problems are called Lesch-Nyhan variants (LNV). We diagnosed a young man who had hyperuricemia and gout, and his two brothers who also had hyperuricemia as LNV. Molecular analysis of the

three brothers clarified a point mutation of c.59A>T (p.D20V) in their HPRT gene (*HPRT1*) and their enzymatic activities were under the detection limits. Their mother was heterozygous for the mutant *HPRT1*. Regarding point mutations of *HPRT1* in LNV, 120 cases have been reported. The point mutation of c.59A>T had already been reported in 1991 in The United States, but it was only a single case. We have detected the mutation in one family, and this is the first report from Japan.

1) Department of Hematology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan

2) Department of Genetics, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan

3) Department of Endocrinology and Metabolism, Nagahama Red Cross Hospital, Shiga, Japan

4) Department of Pathophysiology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo, Japan

Key words : Lesch-Nyhan variant, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), hyperuricemia, X-linked recessive disorder, phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)