

氏 名	むろ い じゅん こ 室 井 純 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1758 号
学位授与の日付	平 成 13 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
研 究 科・専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3- hydroxy- 3- methylglutaryl CoA lyase (HE) deficiency (日本人3ヒドロキシ3メチルグルタリル酸尿症の分子生物学的および臨床的解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 藤 田 潤 教 授 中 畑 龍 俊

論 文 内 容 の 要 旨

3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル尿症は、ロイシン異化経路の最終段階で、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) をアセト酢酸とアセチル CoA に分解する HMG-CoA リアーゼ (HL) の遺伝的欠損症で、新生児あるいは乳児期に、低血糖、けいれん、意識障害などで発症する常染色体劣性遺伝性の有機酸代謝異常症である。非常にまれな疾患で、本邦では現在まで5例の報告があるのみである。本症の臨床経過や遺伝子変異との関係など不明な点が多く、特に日本人においては全く検討されていなかった。本研究で、私は日本人5例全例の患児の臨床症状と遺伝子変異の解析を行った。

患児より樹立した線維芽細胞およびEBウイルスで株化したリンパ芽球から、ゲノム DNA を抽出し HL 全長 cDNA をプローブとしてサザンブロッティングを行った。また線維芽細胞および培養リンパ芽球から total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HL cDNA の全長を増幅した。PCR 産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した。

エクソン7の欠失のホモ接合体1例、ミスセンス変異 G835A のホモ接合体1例、ナンセンス変異 C922T のホモ接合体1例、G835A とエクソン5内に新たなスプライスサイトを生じる A434T の複合ヘテロ接合体1例、スプライス変異の252+1G 欠失のホモ接合体1例であった。これらの変異はこれまで報告のあった変異とは異なり、また変異のほとんどは private mutation と思われた。2症例で認められた G835A の変異が日本人において比較的頻度の高い変異である可能性があったため、PCR-RH7P にて検討した。正常日本人300人において検討したが、変異は認められず、その遺伝子頻度は600分の1以下であると思われた。個々の変異について、変異ベクターを作製し発現実験をおこなった。EBウイルスで株化した患者リンパ芽球に変異ベクターをリポフェクタミン法にて導入し、一過性の発現で HL の酵素活性を測定した。コントロールとして正常の HLcDNA を用いた。HL の残存酵素活性はエクソン7の欠失、C922T はゼロで、他の変異でも活性の低下がみられた。

5例全例、臨床症状は同じであったが、初発年齢が生後1日から1年3ヶ月であった。発症時期が早期であった症例では、発現実験による酵素活性はなく、残存活性があるものほど、発症時期は遅い傾向にあった。

また正常人のリンパ球において、エクソン5と6の欠失がおこる alternative splicing を検出した。またこの alternative splicing は、正常の線維芽細胞、肝臓、心臓、腎臓の各組織にても認められた。発現実験にて酵素活性はなかったが、その生理学的意義は不明である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル尿症は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) をアセト酢酸とアセチル CoA に分解する HMG-CoA リアーゼ (HL) の遺伝的欠損症による極めて稀な有機酸代謝異常症である。本症の臨床経過や遺伝子変異との関係など不明な点が多く、特に日本人においては全く検討されていなかった。本研究で、日本人5例全例の患児の臨床症状と遺伝子変異の解析を行った。線維芽細胞および培養リンパ芽球からゲノム DNA を抽出してサザン

法を行い、また total RNA より RT-PCR、シーケンシングにより cDNA の塩基配列を決定した。エクソン 7 の欠失のホモ接合体 1 例、G835A のホモ接合体 1 例、C922T のホモ接合体 1 例、G835A と A434T の複合ヘテロ接合体 1 例、252+1G 欠失のホモ接合体 1 例であった。個々の変異について、変異ベクターを作製し、EB ウイルスで株化した患者リンパ芽球にリポフェクタミン法にて導入後、一過性の発現で HL の酵素活性を測定した。5 例とも臨床症状は類似していたが、残存活性の高いものほど、発症時期が遅い傾向にあった。以上の研究は本症の病態解明に貢献し、その自然歴と遺伝子変異との関連の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年 8 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。