

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10065

研究課題名(和文) ウィルソン病の統合的早期確定診断と銅含有小胞の細胞傷害における役割

研究課題名(英文) Integrative early definitive diagnosis of Wilson disease and a role of copper storage vesicle in cellular injury

研究代表者

松浦 晃洋 (Akihiro, Matsuura)

藤田医科大学・その他部局等・教授

研究者番号：70157238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本にある大型放射光施設を用いて、試料作成技術の工夫により試料作成技術の工夫により安定した銅元素イメージング法を確立した。遺伝子変異解析法の改良、銅の生化学的定量の工夫と合わせより精度の高い診断が可能となった。特に、生化学的解析には充分量がない場合でも残余病理組織を用いることで銅の蓄積の有無を評価できる。小児期の発症前・軽症・早期の症例の把握に極めて有用である。また、発症前の動物モデル及び新生児期において、銅の増加があるが傷害を生じない病態がある。銅の分離隔絶が細胞傷害の制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指定難病(番号171)であるウィルソン病は、他の難病とは違って治療法がある。早期軽症例ではかなりの病勢のコントロールが可能である。一方では、治療薬は完治をもたらさない。生涯にわたる服用コンプライアンス、食事制限、肝硬変に進展すると肝機能低下、劇症化(溶血発作)の可能性など難しい問題がある。肝硬変に進行し精神神経症状をきたすと適切な治療法がない。早期発見治療が良好な予後をもたらすかは不確定である。本研究により症例が蓄積すれば明らかになり、病態の正確な把握に大きな貢献をする。さらなる診断治療法の開発に向け、社会的な要請に応えるバックボーンとして大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Wilson disease (WD) is an inherited disorder of copper overload that results in severe liver failure and neurological defects if untreated. Although effective treatments are available to prevent or reverse many manifestations, the diagnosis is still challenging because of diverse symptoms and inevitable difficulties in laboratory tests, such as ATP7B genotyping, biochemical liver copper measurement, and histochemical copper staining techniques. To improve the diagnostic ability, we established two-dimensional copper mapping technique for pathological examination using synchrotron-generated brilliant X-ray. We introduce this synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF) analysis to pathological tissue sections for evaluating copper status of WD and suspected cases. Combination of genotyping, biochemical measurement, and SR-XRF copper imaging helps to diagnose patients with early, mild and presymptomatic WD and to distinguish it from other copper accumulated disorders.

研究分野：病理学、遺伝病、放射光診断応用

キーワード：シンクロトロン放射光 銅代謝異常 遺伝子解析 生化学的解析 組織元素イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルソン病 (WD) は遺伝性の銅過剰症である。Kinner Wilson が 1912 年に報告した時点では全例致死であった。キレート剤の開発導入により治療可能な最初の肝臓病となった。検査の進歩もあり、早期発見と早期治療により生命予後が大幅に改善した。いくつかの挑戦がある。成人で精神神経症状を呈する例の治療コントロールの難しさ (薬剤無効、予後不良)、遺伝子解析の問題 (陰性例・未検例の存在)、肝銅含有量の未測定 (生検なし or 採取量が少なく測定不能)、日本全国で必ずしも均てん化された適切な診療が提供されているとは言えないなどである。このような状況を打開するため、私たちは日本最初の Wilson 病診療ガイドラインを策定し診断治療の標準化を進めてきた。初期の小児例は薬剤治療反応性が良いが、生涯に渡る服薬が必要で、進行し肝硬変を来すと生活の質は良くない。また、慢性肝不全や劇症例では肝移植以外が救命が困難などの問題もある。つまり、患者・家族の病気の正確な理解が十分でなく、服薬コンプライアンスを含め、成長に伴った内科等の診療科への移行やガイドラインの普及が急務である。個々の検査手法自体は一定のレベルにあるが、全ての症例で確定診断に必要な検査が行われてはいない。視診・触診・聴診などの理学所見と簡単な血液検査 (件機能検査) のみでは確定診断には至らない。視診・触診・聴診などの理学所見と原因不明 (ウイルス、中毒以外) の肝機能異常が持続する場合に WD を疑われ、血清銅・セルロプラスミン・尿中銅が測定される。時には、遺伝子解析や肝組織の生化学的銅定量を行わずあるいは結果が確認できなくとも WD として治療されている例が少なからずある。ある地方基幹病院の成人症例を検討した所、ATP7B 変異と銅定量の両者による確定は約半分で、銅定量が行われていない例もある。WD としてキレート剤治療されている症例の中に false positive が含まれている可能性もある。

蛍光 X 線分析 XRF は物性化学 (太陽電池・半導体の基板など)、地球惑星科学 (小惑星イトカワ)、環境学 (土壌汚染)、考古学 (ダ・ヴィンチの絵画)、犯罪捜査 (カレー事件) に頻用される元素分析の手法である。日本は素粒子物理の実験のため加速器研究が盛んで、大型加速器の高輝度光源が世界各国と比べ圧倒的に容易に利用可能である。私たちは日本人症例 ATP7B 変異の最初の報告 (Yamaguchi ら Hum Mut 1998) した。その後、遺伝子診断や生検組織の銅定量がなかなか普及しないことに気づいた。2005 年 SPring-8、2010 年 Photon Factory にて犯罪捜査や環境汚染への応用に触れ、科研費の挑戦的萌芽研究および基盤研究 C の支援を受け、高輝度 X 線を用いて微小領域の銅元素を特異的に検出し、銅イメージングによる病理診断への可能性に気づき、昆虫 cuprosome の生物学的役割の知見も加味し、本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

WD は症例が余り多くないため、進行期や劇症型の重篤かつ致死病的病態が理解されておらず、「がん」やコモンディーズにおける Precision Medicine (最適化医療) のような個別化した医療は行われていない。遺伝子解析の精度アップ、銅の生化学的定量、最近確立したシンクロトロン放射光 X 線による銅定量イメージング法を併せて、微量の生検残余試料に応用することで、本疾患を早期に正確に診断し、適正な治療を行う事が急務であり、特に、小児期に WD を完全に捕捉し、成人発見の難治性の神経型・慢性肝不全型としての頻度を下げることが目的とする。

世界最高レベルのシンクロトロン光科学を実践医学に応用することを目標とする。具体的には、試料作成の標準化、集光素子の改良、高感度検出器の装着など各種の測定条件・試料作成などを最適化し、既存の余剰試料である病理組織を対象に、再現性の高い放射光診断手法を確立し、多数症例に施行することで、問題点を把握し、遺伝子・生化学検査と併せ、高精度の統合診断を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

I. 方法論

1. 遺伝子解析は 21 個のエクソンを PCR で増幅し Sanger 法で両鎖を読んで reference 配列と比較して病原変異検出を行う。2. 肝生検組織の生化学的解析 (ICP-AES や原子吸光法) は常法を用いて行う。3. 放射光施設を用いた組織中の銅の定量的イメージングは、蛍光 X 線分析を用いて行う。原理は、高輝度 X 線照射により内殻電子が励起され光電子として放出され軌道に空孔が生じる。即座に外殻電子が落ち込んで (遷移) 空孔を埋める。遷移の際に放出される X 線を二次 X 線ないし蛍光 X 線と呼ぶ。蛍光 X 線のエネルギーは元素に固有のため、厳密に元素特異的な情報を抽出・解析が可能である。

II. 研究対象

研究の対象として、現状では、診断が難しい 発症前ウイルソン病、ATP7B 変異陰性例、針生検のみの症例などを対象に、遺伝子解析の高精度化 (NGS 解析など)、生化学銅測定の改良、シンクロトロン放射光を用いた銅イメージングを行い合わせた統合診断を行う。小児期早期にウイルソン病の診断を試みる。銅イメージングにおける微小領域の銅の定量基準値を設定し、新しい診断基準の作成を行う。

III. 銅と細胞傷害

鉄はフェリチン含有構造物によって周囲と隔絶され毒性発現が抑制される。銅の細胞傷害機序や制御機構は明らかではない。細胞傷害のない銅蓄積細胞に新規の構造物 (銅貯留小胞 copper storage vesicle, CSV) がみられる。CSV はフェリチン含有構造物より繊細な fine granular

pattern を呈し、銅の細胞傷害抑制に関わる可能性がある。新生児・発症前 WD ヒト及びモデル動物肝細胞における CSV と細胞傷害の関連を調査する。

4. 研究成果

I. ATP7B 遺伝子検査法の改良

ATP7B 遺伝子は巨大な遺伝子で、現在、解析は 21 個のエクソンとその両端近傍のプライミングサイトの変異を検出している。約 15%の臨床的に明かな WD において、病原変異 DV が検出されていない。新規変異の場合には非病原変異 NDV か否かの判定は困難である。この問題を解決するため、遺伝子解析手法を工夫する。まず、イントロンを含めた全領域の塩基配列を決定し、日本人・東洋人集団における出現頻度を明らかにする。コピー数多型 CNV の有無を MLPA 法にて検出する。次世代シーケンサー-NGS を用いた target re-sequencing 法により、より重複度を高めることで、サンガー法を凌駕できるかどうかを検討することも考慮する。ATP7B 以外の銅代謝関連遺伝子変異の有無を検討する。例えば、CTR1, Cox17, CCS, COMMD1 など。明白な家族歴がある症例で同意が得られる場合には、両親、患者の NGS による全ゲノムシーケンスを行うことも考慮する。1998 年の日本におけるウィルソン病変異の報告後に、2019 年 8 月まで集積した症例及び疑い検索例が 21 家系、57 名 (114 アリル) を検索し、遺伝学的に WD と確定したものは 20 例、probable 例 (DV/none) が 2 例、DV はないが明らかな遺伝子構造異常があるもの 2 例。両アリルとも完全に atp7b 配列に異常のない症例が 2 例であった。

II. 銅の生化学的定量

原子吸光法、ICP-発光分析による生化学的定量を行い確実な参照値を得る。組織量が十分でない場合は困難である。現在、質量分析顕微鏡による解析法を試行中である。

III. 放射光 X 線による組織・細胞の銅イメージング

ウィルソン病変例の病変組織、健常組織を全国の協力医療機関から、当該機関での倫理委員会承認のもとに、被験者・代諾者 (家族) の同意を得て採取した試料を収集した (50-60 症例)。銅の組織化学染色を行ったが、確立した肝硬変になって初めて顆粒状に検出されるが、ほとんどの部位および早期・発症前は染色されない。銅や鉄代謝に異常のない試料を陰性対照とする (30 例)。微量元素元素は健常人の組織含有量について、元素イメージングの基準値はないので、標準試料を用いて検量線を作成し、症例を蓄積して設定中である。

IV. CSV 分画の抽出と精製、性状解析

銅イメージングにより、銅蓄積細胞、組織から銅貯留小胞 CSV を濃縮することを試みた、膜と細胞質を含む二つに分画されることがわかった。銅の多い疎画分を選び、共存する元素を解析している。しかしながら、精製過程でのロスがかなり大きいので、より大量の CSV を含む試料から抽出、濃縮、精製を行う所存である。CSV に局在する脂質、蛋白についても、質量分析の専門家と相談して解析中である。

V. 総括

シンクロトロン放射光 X 線を用いた組織銅イメージングにより、必ずしも銅の正化学的定量が行われなくとも、少量の切片があれば測定可能となった。また、測定手法の工夫を行うことで (特許出願中)ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからの切片を用いて、定量が可能となった。臨床検査、遺伝子検査に加え、銅の生化学的定量と放射光銅イメージングは代替可能と考えている。組織切片の微量元素が位置情報と量の違いを含め検討可能となった。典型的なウィルソン病では相当程度に高い濃度の銅蓄積があるので、原理的には検出器の感度が上がれば、光源輝度の問題は制御可能と考えている。今後は、ラボベンチに設置可能な機器の開発を行う予定である。国外企業から共同研究の問合せがあり検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuura A, Kinebuchi M	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of Copper Accumulation in the Liver of Chronic Bile Stasis by Synchrotron Radiation X-ray	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 32-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuura A, Kinebuchi M	4. 巻 1
2. 論文標題 Evaluation of treatment for inherited disorders of copper metabolism by copper imaging using synchrotron radiation X-ray	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of International Copper Meeting	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松浦晃洋、杵淵 幸	4. 巻 1
2. 論文標題 メンケス病の銅治療効果の判定	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ウイルソン病研究会誌	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 杵淵 幸, 松浦晃洋	4. 巻 46
2. 論文標題 X線を用いた難病の臨床診断の実際と、新たに視えてきた病態	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 X線結像光学ニューズレター	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinebuchi M, Matsuura A	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical evaluation of copper-histidine treatment for a genetic disease caused by a copper-transporter deficiency using synchrotron radiation-generated X-ray fluorescence	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the Congress of the International Commission for Optics	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura A, Kinebuchi M	4. 巻 41S
2. 論文標題 Precise diagnosis of presymptomatic Wilson disease by integrating synchrotron X-ray	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Trace Elem Med Biol	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura A, Kinebuchi M	4. 巻 3
2. 論文標題 Medical application of synchrotron radiation: high precision diagnosis of diseases due to specific elements abnormality	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 KEK Synchrotron radiation CDR	6. 最初と最後の頁 231-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura A, Kinebuchi M	4. 巻 20
2. 論文標題 Current status of Wilson disease in Japan 2017: challenges toward precise diagnosis by synchrotron-generated X-ray	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 239-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松浦晃洋、杵渕 幸	4. 巻 21
2. 論文標題 Menkes病のヒスチジン銅による治療の限界はどこにあるかー中間報告ー	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ウィルソン病研究会誌	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松浦晃洋、杵渕 幸、鎌田義正、北澤淳一	4. 巻 22
2. 論文標題 Wilson病とnon-WD銅蓄積状態における組織銅の局在の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ウィルソン病研究会誌	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Matsuura A, Kinebuchi M
2. 発表標題 Evaluation of treatment for inherited disorders of copper metabolism by copper imaging using synchrotron radiation X-ray
3. 学会等名 Copper 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦晃洋、杵渕 幸
2. 発表標題 ウィルソン病の高精度診断
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦晃洋、杵渕 幸、鎌田義正、北澤淳一
2. 発表標題 Wilson病とnon-WD銅蓄積状態における 組織銅の局在の検討
3. 学会等名 第22回日本ウイルソン病研究会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦晃洋、杵渕 幸、鎌田義正、北澤淳一、笠原群生、義岡孝子、梅津守一郎、藤澤知雄、乾あやの
2. 発表標題 ウイルソン病の肝移植時摘出肝組織の予備的解析
3. 学会等名 第23回日本ウイルソン病研究会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuura A, Kinebuchi M
2. 発表標題 Tissue, cellular and subcellular localization of copper in metabolic copper disorder
3. 学会等名 The XIIIth International Society of Trace Element Research and Medicine (ISTERH 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦晃洋、杵渕 幸
2. 発表標題 Menkes病のヒスチジン銅による標準治療の限界はどこにあるか
3. 学会等名 第21回ウイルソン病研究会 学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuura A, Kinebuchi M
2. 発表標題 Precise diagnosis of presymptomatic Wilson disease
3. 学会等名 The 16th International Symposium of Trace Elements in Man and Animals
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kinebuchi M, Matsuura A
2. 発表標題 Clinical evaluation of copper-histidine treatment for a genetic disease caused by a copper-transporter deficiency
3. 学会等名 The 24th Congress of International Commission for Optics (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松浦晃洋、杵淵 幸、鎌田義正、北澤淳一
2. 発表標題 Wilson病とnon-WD銅蓄積状態における銅局在
3. 学会等名 第22回日本ウィルソン病研究会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuura A, Kinebuchi M, Nomura Y, Kimura S
2. 発表標題 Evaluation of standard treatment for congenital copper deficiency by synchrotron radiation
3. 学会等名 The 107th Annual Meeting of the Jap Soc Pathol
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuura A, Kinebuchi M
2. 発表標題 Evaluation of tissue copper status in human metabolic copper disorders by synchrotron X-ray
3. 学会等名 The 11th International Copper Meeting: Copper2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 試料保持体及び微量元素検出方法	発明者 松浦晃洋、杵渕 幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-184562	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>【政策提言】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ウイルソン病診療ガイドライン2015（日本小児栄養消化器肝臓学会、日本移植学会、日本肝臓学会、日本小児神経学会、日本神経学会、日本先天代謝異常学会、ウイルソン病研究会、ウイルソン病友の会編 2015年） 診療ガイドライン策定委員 ・非介入研究ガイドラインの普及を目指した検証と中央IRBの基盤整備および運用に関する研究（令和元年度 中央IRB促進事業）

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杵渕 幸 (Kinebuchi Miyuki) (30244346)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	