

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591221  
 研究課題名（和文） 遺伝子変異同定不可先天性銅代謝異常症患者の更なる分子遺伝学的検討  
 研究課題名（英文） Studies on the gene analysis of patients with Menkes disease and Wilson's disease  
 研究代表者 児玉 浩子（KODAMA HIROKO）  
 帝京大学・医学部・教授  
 研究者番号：00093386

研究成果の概要（和文）：先天性銅代謝異常症には銅欠乏障害を呈する Menkes 病と銅蓄積障害を呈する Wilson 病がある。そ責任遺伝子と責任蛋白は共に銅輸送 ATPase で Menkes 病は ATP7A、Wilson 病は ATP7B と命名されており、非常に類似している。本研究で ATP7A、ATP7B 遺伝子のプロモーター領域の一部を同定した。さらに Menkes 病 22 例および Wilson 病患者 10 例の遺伝子変異を明らかにした。また、翻訳領域では遺伝子変異のない患者 5 例プロモーター領域の解析、シャペロン遺伝子解析を行った。その中でプロモーター領域での変異を疑う Wilson 病患者が 1 名存在した。

研究成果の概要（英文）：

The responsible gene for Menkes disease and Wilson's disease are ATP7A and ATP7B, respectively. We analyzed the gene mutations in the responsible gene in 22 patients with Menkes disease and 10 patients with Wilson disease. Mutations in coding regions of the responsible gene were identified in 3 patients with Menkes disease and 2 patients with Wilson's disease. The gene of copper-chaperon proteins and the promoter genes of the responsible gene for the both disease were analyzed in patients with the both diseases who have no mutation in the responsible genes. A patient with Wilson's disease was suspected to have a mutation in the promoter region in the ATP7B gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1) Menkes 病 (2) Wilson 病 (3) 遺伝子解析 (4) プロモーター領域

1. 研究開始当初の背景  
 先天性銅代謝異常症には銅欠乏障害を呈する Menkes 病と銅蓄積障害を呈する Wilson 病がある。障害・症状は両疾患では全

く異なる。しかし、責任遺伝子と責任蛋白は共に銅輸送 ATPase で Menkes 病は ATP7A、Wilson 病は ATP7B と命名されており、遺伝子配列、蛋白構造、蛋白機能は非常に類似している。両疾患で障害・症状が全く異なるのは、ATP7A と ATP7B が発現・機能している臓器が異なるためである。

現在までに数多くの Menkes 病および Wilson 病患者の遺伝子解析を行っているが両疾患患者で責任遺伝子の全エクソンを解析しても、変異が同定されない患者が十数%いる。このような患者では、遺伝子のプロモーター領域や転写因子の異常が存在する可能性があるが、今まで報告はない。両遺伝子のプロモーター領域の塩基配列は徐々に解明されてきており、Sp1, AP-1, AP-2, E-box などの転写関連塩基配列やメタル反応性因子(MREs)の存在、転写因子 Ku-80 の関与が報告された (Oh WJ et al. Eur J Biochem 269; 2151-61, 2002)。

一方、近年、細胞内銅代謝機構も解明されつつあり、5つの銅輸送シャペロン蛋白が同定されている (De Bie P et al. The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1. J Heredity 96:803, 2005)。また、ATOX1 のノックアウトマウスは Menkes 病に極めて類似する病態・症状・所見を呈することが報告された (Hamza I et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(12): 6848-6852, 2001)。これらシャペロン蛋白異常症はヒトでは今まで報告されていないが、遺伝子変異が同定されない Menkes 病や Wilson 病患者にシャペロン蛋白異常が関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的として以下のことを明らかにする。

(1) ATP7A, ATP7B 遺伝子のプロモーター領域と転写因子を明らかにし今までの解析で遺伝子変異が同定されていない Menkes 病および Wilson 病患者細胞で検討を行う。

(2) 銅シャペロン蛋白の遺伝子解析を行い、遺伝子変異の有無を明らかにする。

(3) ATP7A の蛋白発現と銅濃度による診断方法を確立する。

これらの方法により原因遺伝子に変異が見つからない患者における診断方法となるものと思われる。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体

患者リンパ球及び皮膚線維芽細胞を採取したのち DNA 及び RNA 採取を行う。

### (2) 細胞培養

患者皮膚線維芽細胞及び EB 細胞にトランスフォームしリンパ球を培養、増殖した後 DNA 回収を行なう。

### ①皮膚線維芽細胞培養

10%FBS 含有 DMEM(SIGMA)にて培養、定期的に上清を交換する。confluent になった時点で細胞回収を 0.25%trypsin にて行ない DNA サンプルとする。

### ②リンパ球細胞培養

10%heat inactivated FBS 含有 RPMI1620 にて培養する。増殖を確認した後 DNA サンプルとして回収する。

### (3) genomic DNA 作成

患者全血、培養線維芽細胞及び培養リンパ球から DNeasy kit (QIAGEN)を用いて genomic DNA の作成を行なった。Genomic DNA は 4°Cにて保存した。

### (4) 関連遺伝子解析

#### ①PCR

患者より回収した genomic DNA をサーマルサイクラーにて PCR をかけ確認した後 sequence サンプルとして遺伝子解析に使用した。PCR プライマーはそれぞれ Table 1 のように設計した。PCR 試薬には Amplitaq 360(AB apply)を用いた。

Segment	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Location nt
5'-1	TGTGGCGAGCCCTGTTCTAA	CGGTGATTTTCTTCTGCTT	-1322 to -1222
5'-2	GGAAGAGCAGGAGTGAATGGA	TATCTCTTCTCTGCTGCTGGA	-1213 to -1114
5'-3	ATTGAGGAGGATGAGGAGGAT	TGAGCTTCTCTCTGAGGAGG	-1019 to -911
5'-4	TTCCTGTTTCTCTTTTCTTCT	AATCCAGTATGACAGGCTTCC	-248 to -167

Segment	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ATOX1-1	AGGAGCTGCTGAGAGAGGGG	TTCAGATGAGCATGAGGTC
2	AGGCTTGTGAGGATGCTGATGC	TCTGATGATGATGAGGATGC
3	TGACTGTGATTTTATGAGCTCA	AGCTGTCTGCTGCTGATGAC
44HL-1	AGAGGCTGCTGAGAGGGG	GCTCTGGGAGGAGGAGGCTC
2	AAGCTGAGGAGGAGGATGCTG	CTCTGATGAGGAGGAGGAGG
3	AGCTGAGGAGGAGGAGGAGG	AGGATGAGGAGGAGGAGG

Segment	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Location nt
5'-1	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-1349 to -1249
5'-2	GCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-1013 to -913
5'-3	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-713 to -613
5'-4	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-413 to -313
5'-5	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-113 to -13
5'-6	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-113 to -13
5'-7	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-113 to -13
5'-8	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	TGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	-113 to -13

Table 1. Primer design

#### ②Sequence

①で確認した PCR 産物を以下の条件 (Table 2) にて sequence 反応した後 AB3130x1 にて泳動、解析を行なった。

### (5) 銅濃度測定

#### ①肝臓中銅濃度

Wilson 病患者より肝臓細胞を生検し、銅

濃度測定を行なった。

②培養細胞中銅濃度測定

培養細胞を回収したのち Lowry 法にて蛋白を測定する。残りの細胞中の銅濃度を測定し、蛋白量辺りの銅濃度を換算する。

③銅濃度測定

乾燥重量を測定した肝臓はおよび培養細胞は濃硝酸を加えた後乾燥固定し、希硝酸を加え測定サンプルとした。測定サンプルは原子吸光を用いて銅濃度を測定した。

(6) ATP7A 蛋白質発現

培養細胞蛋白質を 5-20%Tris-HCL SDS ゲルにて泳動後 PVDF membrane に transfer した。転写した membrane は 5%blocking agent(GE Healthcare)で 1hr ブロッキング後 1000 倍に希釈した 1 次抗体にて over night で反応させた。0.05% Tween-20 TBS Buffer にて洗浄後 2 次抗体を 1hr 反応させ、ECL Plus Western Blotting Detection System で X 線フィルムにて検出を行った。

4. 研究成果

(1) Menkes 病患者における ATP7A 変異結果

本研究において新しい ATP7A 変異が見つかった。現在までに本研究室で確認された ATP7A 変異は多岐にわたっていることが確認された (Figure 1, Table 3)。46 例中同じ変異が同定されたのが 3 組あった。ATP7A の 23 ある Exon のうち Exon4、9、10、15 に比較的変異が多く認められた。また、ATP7A 遺伝子に変異の認められない患者は全体の 8%であった。変異の種類はほぼ同程度の確立であった (Table 4)。また、患者兄弟及び母親の診断を行なったところ、兄弟の約半分が Menkes 病であり、姉妹の約 60%が保因者であった。患者母親のうち 76%が保因者であった (Table 5)。このことから約 1/4 が突然変異により Menkes 病となっていると考えられる。

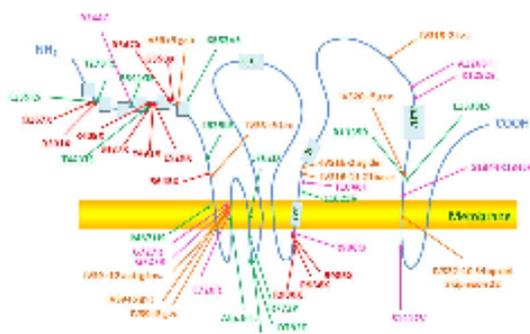


Figure 1 ATP7A 構造と変異

Table 3 Menkes 病患者における ATP7A 変異

Case No.	Mutation	%	Case No.	Mutation	%
1	1	100	14	6	100
2	2	100	15	6	100
3	2	100	16	8	100
4	3	100	17	3	100
5	3	40	18	6	100
6	4	10	19	6	100
7	5	10	20	8	100
8	6	10	21	2	100
9	7	10	22	2	100
10	8	10	23	2	100
11	9	10	24	2	100
12	10	10	25	2	100
13	11	10	26	2	100
			Total	100	100

Table 4 ATP7A 変異の種類

Type of mutation	No. of mutation	%
deletion	10	22.73
insertion	6	13.64
missense	10	22.73
stoploss	11	24.55

Table 5 Menkes 病患者の家族関係

		No.	%
母親	正常	20	26
	Carrier	6	8
兄弟	正常	7	18
	Menkes disease	6	16
姉妹	正常	3	17
	Carrier	5	16

(2) Wilson 病患者における ATP7B 変異結果

本研究において Wilson 病疑い患者から新しい変異が同定された。また、現在報告されている変異と同じ変異も見つめられた (Table 6)。また、期間中に変異が 1 つしか同定されなかった患者が存在した。

Table 6 ATP7B mutation

No.	Mutation	No.	Mutation
1	3111 G>T Arg738 Leu 2946 G>A Val716 Ile	12	3064 G>A Ser1021 Tyr Ser 1651 C>A Glu
3	3113 G>T Arg738 Leu	13	3122 G>A Arg964 Tyr
4	2764 G>T Val922 Gly	14	3107 G>C His1022 Gly, His Ile
5	2815 G>T Val725 Ile	15	1651 C>A Glu
6	2222 G>T Arg738 Leu 3155 del G	8	1612 L>U>G 1813 Gln1876 Ser
7	3111 G>T Arg738 Leu 2946 del C	14	3744 G>C Lys1243 His Ile Ser
8	1651 C>A Glu 3800 A>C Arg1226 Phe	12	1651 C>A Glu del
9	3111 G>T Arg738 Leu 2025 C>C Lys1040 Tyr		

また、Wilson 病疑いの患者で変異の認められなかった患者が存在した。変異が 1 つの患者の割合は約 18%で Menkes 病と比較するとその割合は高かった。

### (3) プロモーター領域の解析

Menkes 病および Wilson 病において変異の同定されなかった患者および変異の同定された患者についてプロモーター領域の解析を行った。ATP7A promoter 領域における polymorphism が同定された (Table 7)。また、同様に ATP7B promoter 領域の polymorphism の同定を行った (Table 8)。Wilson 病患者のみで -441/-427 del, -102 C>G が認められた。今後は更なる検体数の検討とこの変異が原因変異であるかの確認が必要である。ATP7A promoter 領域に関して変異は確認されなかった。

Table 7. ATP7A promoter region polymorphism

5' upstream region	
ins-1157C	del-921A
-129C - 109ACT → AG	ins-861C
-1010 - 1019CC → AA	-846 - 847GC → CG
-1034 → C	del-829G → AA
-1010G → C	-197G → A
del-971-970CC	del-146T
del-916 - 917GGG	-61 → T
del-927A	

Table 8. ATP7B promoter region polymorphism		
Polymorphism	Frequency (%)	
	Healthy individuals	Patients
ATGAGAG	100.0	100.0
del-441-427del	0.0	100.0
del-427C	0.0	100.0
-122AAGAGAGG	100.0	100.0
-122AAGAGAGG	75.0	100.0
-102AAG	100.0	100.0
del-97AAG	100.0	100.0
del-97AAG	100.0	100.0

### (4) シャペロン遺伝子の解析

Menkes 病患者において変異の同定されていない患者についてシャペロン遺伝子の解析を行った。しかしながら今回の解析においては遺伝子の変異は同定されなかった。

### (5) 銅濃度測定

Menkes 病患者、OHS 患者、保因者および正常の培養線維芽細胞中の銅濃度測定を行った。Menkes 病疑いの患者の中で遺伝子診断を行わなかった患者で銅濃度が高かった患者は Menkes 病と診断を行った。正常培養細胞に比べ Menkes 病患者、OHS 患者、保因者培養細胞中銅濃度は有意に高かった (Figure 2)。また、正常培養細胞に比べその範囲は広く、

個人差があることが考えられた。また、培養リンパ球中の銅濃度は培養線維芽細胞中銅濃度に比べその濃度は低かった。

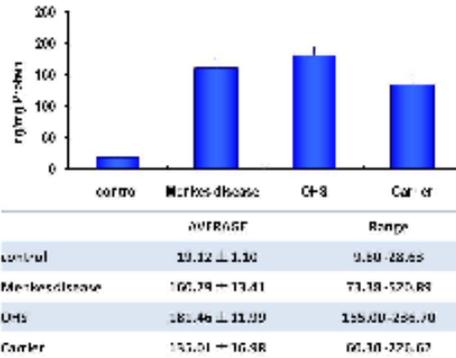


Figure 2. 培養線維芽細胞中銅濃度

Wilson 病疑い患者において肝臓生検を行い、肝臓中の銅濃度測定を行った。コントロールに比べ有意に肝臓中銅濃度が高かった (Figure 3)。しかし、劇症肝炎発症の Wilson 病患者では、肝細胞が脱落・壊死をきたしており、銅濃度が低くても Wilson 病でない判断することは難しいことが明らかになった。

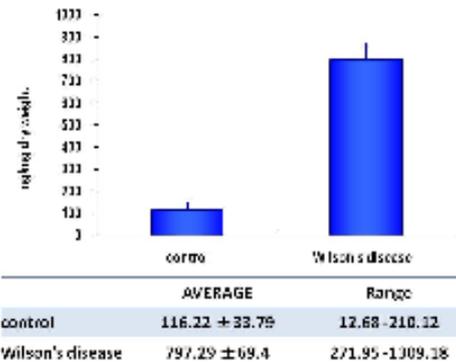


Figure 3. 肝臓乾燥重量中銅濃度

### (6) ATP7A タンパク質発現

遺伝子解析を行っていない患者と遺伝子解析を行った患者について培養線維芽細胞からタンパクを抽出し、ATP7A の発現と細胞中銅濃度の比較検討を行った (Figure 4)。コントロールに比べ Menkes 病と診断された患者では ATP7A 発現が低かった。タンパク発現が認められた患者についても細胞中銅濃度が高く、ATP7A 発現と細胞中銅濃度には関係が認められなかった。

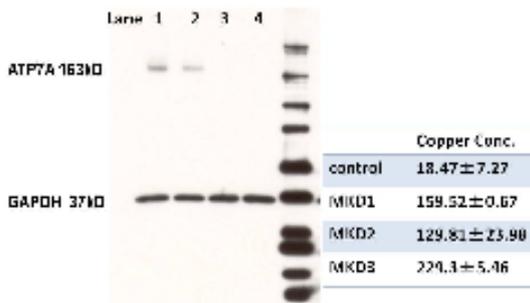


Figure 4. ATP7A mRNA levels and protein levels in control and mutant cells. Lane 1: control cells, Lane 2-4: Mutant cells (MKD1-3).

### (7) 考察

本研究において Menkes 病および Wilson 病におけるプロモーター遺伝子、シャペロン遺伝子解析を検討した。原因タンパク遺伝子に遺伝子変異の認められない患者でのプロモーター領域の遺伝子解析を行ったところ遺伝子変異は認められなかった。また、シャペロン遺伝子についても同様に変異は認められなかった。シャペロン遺伝子に関しては原因遺伝子変異の認められている患者についても検討を行う必要があると思われた。Menkes 病患者では培養細胞中銅濃度が高いが OHS 患者、保因者についても同様に細胞中銅濃度が高い結果得られた。このことから細胞中銅濃度と ATP7A 活性が比例しないと考えられた。タンパク発現についても同様のことが考えられた。これらのことから遺伝解析において変異が認められない、遺伝子解析を行わない患者に関してはタンパク発現による確認が重要であると考えられる。また、Menkes 病患者で突然変異が 1/4 程度認められることから Menkes 病患者と発見されない可能性が考えられた。

Wilson 病患者において変異が 1 つしか見つからない患者が存在する。これらの患者について Promoter 領域の検索を行ったが本研究においては変異が認められなかった。このことから、今後は promoter 領域で更なる上流を検索することに加え、転写因子の発現についての検索が必要であると考えられる。これらの転写因子のリン酸化の発現などが今後検討する課題である。また、肝臓内銅濃度と遺伝子変異の関連をさらに調べる必要があると思われる。

本研究において polymorphism を明らかとしたが、promoter 領域の明らかな変異が同定されなかったことはこれらの疾患に転写因子の違いが関係している可能性が示唆された。しかしながら早期の診断にはタンパク発現を確認することが有用な手段であることが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kodama H, Fujisawa C. Copper Metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics*. 1:42-52 2009
2. Nakagawa T, Inoue Y, Kodama H, Yamazaki H, Kawai K, Suemizu H, Masuda R, Iwazaki M, Yamamada S, Ueyama Y, Inoue H, Nakamura M Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep*. 20(2):265-70. 2008
3. Gu YH, Gu QJ, Xu SF, Sun HJ, Du SL, Kodama H. Genetic Variation in ATP7B Promoter and 5' UTR in Han Chinese Patients with Wilson's Disease. *Biomed Res Trace Elements* 18(3): 264-268 2007
4. Gu Y, Kodama H, Watanabe S, Kikuchi N, Ishitsuka I, Ozawa H, Fujisawa C, Shiga K. The first reported case of Menkes disease caused by an Alu insertion mutation. *Brain Dev*. 29(2):105-8 2007

[学会発表] (計 4 件)

1. Higher copper accumulation, a possible cause for hepatocellular carcinoma in patients with wilson disease Kodama H, Shiga K, Kaga F, Fujisawa C, Gu YH Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2008. 9.2-5 Lisboa, Portugal 2008
2. Studies on Mutations in ATP7A Gene in Male Patients and a Female Patient with Menkes Disease Hiroko Kodama, Chie Fujisawa, Yag-Hong Gu, Katsuaki Shiga, Fumiya Kaga. The 4th Congress of Asian Society for Plediatric Research 2008 5.3-6 Hawaii 2008
3. Identification of ATP7A mutations associated with Menkes disease Chie Fujisawa, Hiroko Kodama, Yag-Hong Gu, Katsuaki Shiga, Fumiya Kaga International Society For Trace Element Research in Human 2007

2007 10.21-26 Greece, Crete

4. メンケス病の遺伝子解析と母親の保因者率 小泉亮輔、鎌田和、加賀文彩、志賀勝秋、顧艶紅、藤澤千恵、児玉浩子 第 11 回ウィルソン病研究会 2007.5.12 東京

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児玉 浩子 (KODAMA HIROKO)  
帝京大学・医学部・教授  
研究者番号：00093386

### (2) 研究分担者

藤澤 千恵 (FUJISAWA CHIE)  
帝京大学・医学部・リサーチフェロー  
研究者番号：10393000

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：