

平成22年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590658
 研究課題名（和文） 家系内遺伝子検索による先天性銅代謝異常症（ウイルソン病）の
 予防医学的研究
 研究課題名（英文） Preventive medical screening involving familial genetic testing of ATP7B in
 order to discover presymptomatic patients in families with Wilson's disease patients.
 研究代表者
 中山 憲司（NAKAYAMA KENJI）
 北海道立衛生研究所・健康科学部・研究主査
 研究者番号：30442594

研究成果の概要（和文）：本研究は、近年、北海道内で発見されたウイルソン病（WND）患者を有する家系と、新規に発見された患者家系に関して、WND 病因遺伝子である ATP7B の遺伝子解析を行うことにより、家系内検索という観点から、発症前患者を発見することを目的として実施された。さらに、WND モデル動物を用いて、ゲノミクス解析とプロテオーム解析技術を導入して、新たな簡易診断法の開発に着手した。

研究成果の概要（英文）：In these preventive medical studies, the following researches were performed: 1) the discovery of presymptomatic patients in families with Wilson's disease patients using familial genetic screening of ATP7B; and 2) an attempt to develop novel methods for early and presymptomatic detection of Wilson's disease using both genome and proteome analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
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：社会医学・公衆衛生学 健康科学

キーワード：①母子保健，②分子予防医学，③ウイルソン病，④銅代謝異常症，⑤ATP7B，
 ⑥遺伝子診断，⑦プロテオーム解析。

1. 研究開始当初の背景

ウイルソン病（WND）は、およそ3万人に1人の割合で発症する常染色体劣性遺伝形式をとる先天性の銅（Cu）代謝異常疾患である。日常生活において摂取されるCuが、正常に肝臓から胆汁中に排泄されず、肝臓・脳・腎臓・角膜などに多量に蓄積し、重度の障害を起こすと考えられている。多量に蓄積したCuにより、小児期に重い肝障害（肝炎・

肝硬変）や、震えや言葉が聞き取れなくなるなどの中枢神経障害を呈する。小児期の慢性肝疾患としては最も頻度が高いことから、18歳未満の場合、小児慢性疾患医療費助成の対象に指定されている。WNDでは、第13番染色体に位置するATP7Bと呼ばれるCuの細胞内輸送を担う膜蛋白質（トランスポーター）の遺伝子に異常が認められる。その遺伝子異常によって、Cu トランスポーターの機

能が障害され、肝細胞内から肝細胞外（胆汁中）への正常な Cu の排泄が阻害され、肝臓や脳に多量の Cu が蓄積すると考えられている。また、Cu 結合タンパク質であるセルロプラスミン (Cp) への Cu の供給も障害され、その生成が阻害されている。1993 年の ATP7B 遺伝子の発見以来、現在までに数多くの病因変異が報告されている。現在までに報告された変異は 300 種を越え、ATP7B 遺伝子全領域に分散し、その様相も極めて多様なために、変異遺伝子型と病態との関連性に関する研究はほとんど進展していない。

WND は、無治療で放置すれば、不幸な転帰をとる重篤な疾患である。しかしながら、WND は治療可能な病気である。一般的には、D-ペニシラミンや塩酸トリエンチンなどの Cu キレート薬を空腹時に経口服用して Cu を排泄させることにより、病状を改善したり、発症を予防することが出来る。従って、WND 患者を早期に発見し、これらの治療を開始することが出来れば、肝障害や中枢神経障害等の重篤な症状の発症を回避することが可能である。そのため、早期診断・早期治療の実用化が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究においては、近年、北海道内で発見された WND 患者を有する家系と、今後、新規に発見される患者家系に関して、WND 病因遺伝子である ATP7B の遺伝子解析を行うことにより、家系内検索という観点から、発症前患者を発見すると共に、本邦に特異的な遺伝子変異に着目し、限定した遺伝子型と病態との関連性に関して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

WND の遺伝子解析に関しては、加藤らの論文 [Y. Katoh, K. Nakayama, et al. *Familial genetic analysis of copper transporting P-type ATPase (ATP7B) gene in Wilson's disease*, *Biomed Res Trace Elements*, **17**, 406-411 (2006)] に従って実施した。遺伝子解析は、末梢血より DNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法により ATP7B 遺伝子の全エクソン領域について実施した。ヒト ATP7B 遺伝子は第 13 染色体上に存在し、21 個のエクソンより構成されていることから、各エクソンのサイズを考慮して 24 プライマーセットを用いて各エクソン領域を増幅した。ATP7B-エクソン領域の塩基配列の解析には、BLAST Searches より Human P-type ATPase ATP7B mRNA (Accession No. U03464, 1997) および Homo sapiens chromosome 13 (Accession No. 16189300, 2001) の塩基配列とアミノ酸配列のデータを使用した。解析した ATP7B の塩

基配列のアライメントは Gene Works を用いて行ない、塩基及びアミノ酸の変異箇所を特定した。

臨床所見の解釈、さらには、遺伝カウンセリングに関しては、連携研究者の東邦大学医学部第二小児科の清水教一講師に実施して頂いた。

4. 研究成果

(1) 家系内遺伝子検索による発症前 WND 患者の早期発見

本研究の目的は、新たに WND 患者が見出された家系において、ATP7B の家系内遺伝子検索を実施することにより、発症前患者の早期発見を試みることであった。

近年、カナダのアルバータ大学の Cox らは、WND の発生頻度に関して、サルデニア島 (イタリア)、中国、そして日本においては、他の地域よりも高く 1 万人に 1 人であると報告している (National Center for Biotechnology Information. OMIM: online Mendelian inheritance in man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/277900>). 研究期間中の WND 遺伝子検索に関する医療機関等からの問い合わせ頻度は、おおよそ 2-3 週間に 1 回 (道内で 3-4 ヶ月に 1 回) となり、当初の予想を遙かに超えるものとなった。この問い合わせ件数の多さは、Cox らが報告したように本邦が、1 万人に 1 人以上の発症頻度を有する世界 3 大発症地域の 1 地域であることを間接的に支持する事象と考えられた。また、受理した WND 解析依頼調査票の対象年齢も、1 歳 6 ヶ月から 52 歳までと非常に幅広くなっており、本疾患の発症・診断は小児期に限定されるものではないことが、改めて確認された。

家系内の遺伝子解析は、8 家系、17 名に対して実施された。家系内遺伝子検索によって重篤な症状の発症前に発見出来た症例は 1 症例で、新規患者 (5 歳) の年長 (8 歳) 同胞例であった。また、5 名の保因者も確定することが出来た。保因者の中には、血中セルロプラスミン (S-Cp) が正常値 (> 20mg/dL) を示す症例も多く、S-Cp 値単独での保因者判定は難しいことが明らかとなった。また、血液検査などから WND が強く疑われたにも係わらず、遺伝子検索で一つの病因変異しか検出されず確定診断出来なかった家系は 3 家系確認された。1 家系では同胞例も患者と同じ病因変異を有していたことから、連携研究者から尿中銅濃度の追跡検査の指示が出されている。WND が疑われたにも係わらず病因変異が全く検出されなかった家系は 1 家系認められた。

家系内遺伝子検索を実施することにより、家族内の発症前患者を早期に発見することが可能なばかりでなく、同胞例の WND 疑い

を明確に否定出来ることも重要な情報源となることが明らかとなった。また、本邦では報告のない欧州型の病因変異である P840L と T977M が、本研究で検出された。今後、人類遺伝学的に興味深い知見になると期待される。

残念ながら、平成 21 年度に予定していた臨床研究の総括は、平成 21 年 4 月に始まった新型インフルエンザの全世界的流行（パンデミック）により臨床現場が混乱したため、予定していた情報収集が出来なかった。非常に限られた情報となってしまったが、本研究の成果に関しては、和雑誌での論文発表を予定している。

(2)WND モデルラット血液のゲノミクス解析

WND の確定診断には、病因遺伝子である ATP7B の遺伝子解析が重要な情報となっている。しかし、病因変異は既に 300 種を越えており、WND の遺伝子診断には、21 エクソンからなる 4395bp という巨大な全エクソンの解析が必須となっている。この膨大な遺伝子解析には、少なくとも数週間の時間を要することから、迅速で簡便な確定診断法の開発が急務となっている。そこで本研究では、WND のモデル動物である Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットを用いて、病因遺伝子の変異によってもたらされる特徴的な mRNA の発現に着目し、新しい簡易診断法の開発に向けた予備的研究を実施した。その結果、LEC ラット末梢血では、有意に ATP7B mRNA 発現量が増加していることが明らかとなった。本知見は、WND の迅速で簡便な確定診断法の一つとなる可能性があると考え、この現象に着目して更に実験を実施している。本知見の発見に関しては、学会①および②で発表を行うと共に、現在、洋雑誌に論文を投稿中である。

(3)WND モデルラット尿のプロテオーム解析

研究代表者は、WND モデル (LEC) ラット尿中タンパク質の二次元電気泳動を行い、対象ラットと比較することによりタンパク質構成が極めて異なる事実を明らかにした。そこで、本知見の臨床応用を図ることを目的として、採尿方法、尿の保管方法などの検討を実施した。そして、臨床現場でも対応可能な簡易な前処理法をデザインし、表面改良型レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析装置 (SELDI-TOF-MS) を用いて尿検体のプロテオーム解析を試みた。その結果、離乳直後より LEC ラットに特徴的な複数の低分子量バイオマーカの存在が明らかとなり、それらを用いた早期診断法の可能性が示唆されている。本研究成果については 2010 年度に、

下記学会で発表を行っている。

中山憲司, 深瀬優, 志和美重子. 「SELDI-TOF-MS を用いたウイルソン病バイオマーカの探索-モデル動物を用いた試み-」, 第 14 回ウイルソン病研究会学術集会, 2010 年 5 月 8 日, 東京都 (東邦大学医療センター大森病院).

本知見に関しても、さらにデータ解析を行い、順次、学会発表と論文発表を実施していく予定である。

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 2 件)

① N. Shishido, K. Nakayama, M. Nakamura. Determining the status of copper in the urine of Long-Evans Cinnamon rats and patients with Wilson's disease. *Asahikawa Medical College Research Bulletin*, **9**(1), (2009). 査読無

② K. Nakayama and M. Tamura. What is the true origin of the bright red-orange autofluorescence in the hepatocytes? *Hepatology*, **51**, 1083-1084 (2010). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 中山憲司, 加藤芳伸, 清水教一, 奥井登代, 澤田幸治, 青木継稔. 「RT-PCR 法によるウイルソン病簡易診断の可能性 - モデル動物を用いた試み -」, 第 13 回ウイルソン病研究会学術集会, 2009 年 5 月 13 日, 東京都 (東邦大学医療センター大森病院)

② 中山憲司, 加藤芳伸, 清水教一, 奥井登代, 松本耕三, 澤田幸治, 青木継稔. 「LEC ラットを用いたウイルソン病簡易診断法の探索」, 第 19 回 LEC ラット研究会学術集会, 2009 年 6 月 27 日, 東京都 (帝京大学附属病院)

[図書] (計 2 件)

① 中山憲司 著, (社)北海道総合研究調査会 発刊, しゃりばり, 2008 年
ヒト先天性銅代謝異常症のウイルソン病について (その 1) 3 月号
(<http://www.hit-charivari.com/article/data/p0102.html>)

② 中山憲司 著, (社)北海道総合研究調査会 発刊, しゃりばり, 2008 年
ヒト先天性銅代謝異常症のウイルソン病について (その 2) 5 月号
(<http://www.hit-charivari.com/article/data/p0128.html>)

〔その他〕

ホームページ等

北海道立衛生研究所刊行物情報

<http://www.iph.pref.hokkaido.jp/Kankobutsu/Kankobutsu-Menu.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 憲司 (NAKAYAMA KENJI)

北海道立衛生研究所・健康科学部・研究主査
研究者番号：30442594

(2)研究分担者（1名）

加藤 芳伸 (KATOH YOSHINOBU)

北海道立衛生研究所・生物科学部・主任研究員
研究者番号：00414326

(3)連携研究者（3名）

鈴木 智宏 (SUZUKI TOMOHIRO)

北海道立衛生研究所・生物科学部・研究職員
研究者番号：10414327

澤田 幸治 (SAWADA YUKIHARU)

札幌医科大学病理学第一講座・非常勤講師
研究者番号：80111128

清水 教一 (SHIMIZU NORIKAZU)

東邦大学・医学部・第二小児科・講師
研究者番号：60256740

(4)研究協力者（1名）

田村 守 (TAMURA MAMORU)

中華人民共和国・精華大学医学院・教授
研究者番号：80089888