

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16853

研究課題名(和文) 遺伝性銅代謝異常症の新規原因遺伝子の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel gene causing genetic disorder of copper metabolism

研究代表者

吉田 健司 (Yoshida, Takeshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50790557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、従来の疾患と異なる特徴を持つ遺伝性銅代謝異常症の家系において、新規遺伝子CTR1に異常があることを見出した。CTR1は細胞内に銅を取り込む役割を持つ。患者由来線維芽細胞では銅の取り込みが低下していることが分かった。次に、CTR1の機能をより詳細に解析するため、細胞外に銅を排出するATP7A遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立した。その細胞株を用いて、患者と同じ遺伝子異常が銅の取り込みを障害することを示した。以上のことから、今回の研究によりCTR1が新たな遺伝性銅代謝異常症に関与している可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性銅代謝異常症は、ATP7A異常に伴うメンケス病とオクシピタルホーン症候群、ATP7B異常に伴うウィルソン病が知られているが、今回の研究により新たにCTR1異常が遺伝性銅代謝異常症に関与している可能性を示した。新規疾患の発見という点に加えて、銅トランスポーターCTR1の生体内での機能解明にも寄与するため、学術的意義が高いと考えられる。また、本研究がさらに発展すれば、銅代謝異常症の診断や治療に結びつく可能性があり、大きな社会的意義も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In a family with a hereditary copper deficiency different from any known disease, abnormality of CTR1 gene was identified. CTR1 is responsible for transporting copper into cells. Copper uptake in the patient's fibroblasts was diminished. To further analyze CTR1, we established a cell line without ATP7A, which exports copper outside of cells. Using the cell line, we demonstrated that CTR1 abnormality observed in the patients disturbed copper transport. In conclusion, this study revealed the possibility of an association between CTR1 and a novel hereditary copper deficiency.

研究分野：小児神経学

キーワード：銅代謝異常症 遺伝性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

銅は人にとって不可欠な微量元素であり、銅イオンを含む蛋白はミトコンドリア電子伝達系やヘモグロビン合成といった生体内で重要な役割を担っている。銅欠乏症状を来す遺伝性銅代謝異常症としてはメンケス病が代表的である。メンケス病の責任遺伝子である ATP7A は、細胞質からゴルジ体への銅輸送および細胞外への銅分泌の役割を担っている。ATP7A が障害されると、脳、皮膚、造血系といった様々な組織で銅欠乏症状を呈する。一方、細胞内に銅を輸送するトランスポーターCTR1 と疾患との関連は十分には解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究に先立って、メンケス病と異なる特徴を持つ銅欠乏症の家系において、CTR1 をコードする遺伝子に複合ヘテロ接合性バリエント (ミスセンスバリエントとナンセンスバリエント) を同定した。本研究では、同定されたバリエントが銅代謝異常と関連があるかどうかを、分子生物学的手法を用いて証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

患者線維芽細胞や様々な細胞株において、原子吸光度計を用いて細胞内への銅輸送を解析した。さらに、CTR1 の機能をより詳しく評価するために、銅を細胞外に排出する ATP7A をノックアウトした細胞株 (ATP7A-KO 細胞株) を樹立した。CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、ATP7A-KO 細胞株に患者で同定されたバリエントを導入し、バリエントごとの銅取り込み機能を解析した。

## 4. 研究成果

患者由来線維芽細胞を高濃度銅を含む培地で培養した結果、患者ではコントロールと比較して細胞内への銅輸送が低下していた (図 1A)。また、患者線維芽細胞に野生型 CTR1 を強制発現させると (患者+レスキュー)、細胞内への銅輸送の改善を認めた (図 1B)。さらに、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies 社) を用いたエネルギー代謝解析では、患者線維芽細胞では基礎呼吸、最大呼吸ともに蛋白濃度で補正した酸素消費速度が、コントロールと比較して有意に低下していた。以上のことから、患者細胞では銅欠乏により、ミトコンドリア関連銅蛋白の機能が低下している可能性が示唆された。

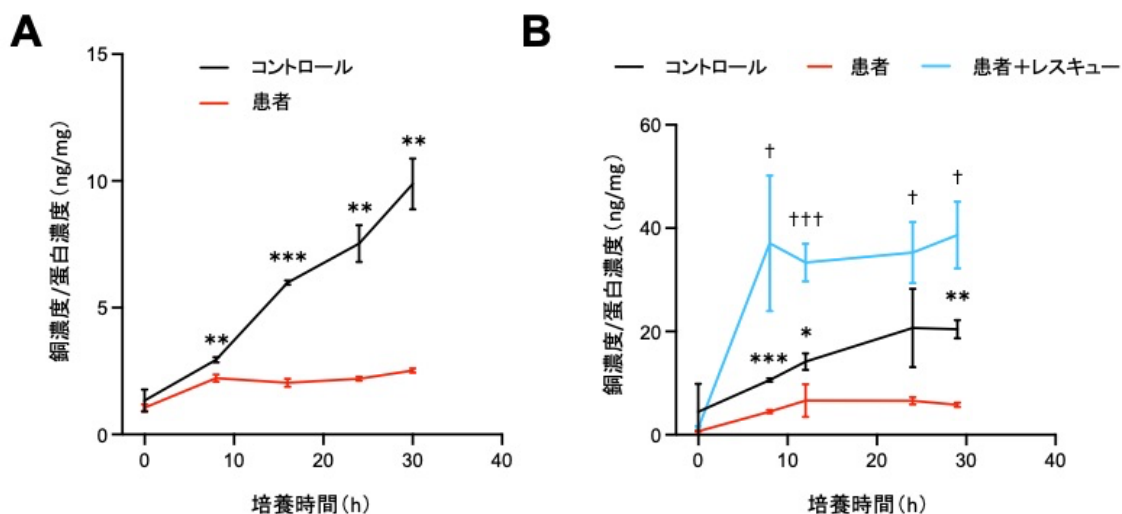


図 1: 線維芽細胞における細胞内銅濃度。サンプルの蛋白濃度で補正。平均±標準偏差 (n=3)。

次にバリエントごとの機能を評価するため、野生型、患者ミスセンスバリエント、患者ナンセンスバリエント、知的発達症の論文で報告されているミスセンスバリエント (既報ミスセンス)

の4種類のCTR1を強制発現させた細胞において、銅輸送実験を実施した。強制発現系ではナンセンスバリエントの細胞において、銅輸送の著明な低下を認めた(図2A)。一方、患者ミスセンスバリエントでは有意な変化が認められなかった。

細胞内に輸送された銅はATP7Aによって細胞外に排出されることで、細胞内銅濃度が調節されている。CTR1の機能を正確に評価するために、ATP7Aをノックアウトした細胞株を樹立した。さらに、CRISPR-Cas9ゲノム編集によりCTR1に患者ミスセンスバリエントを導入し、銅輸送実験を実施した。その結果、患者ミスセンスバリエントを導入した細胞株では、野生型CTR1と比較して有意な低下を認めた(図2B)。

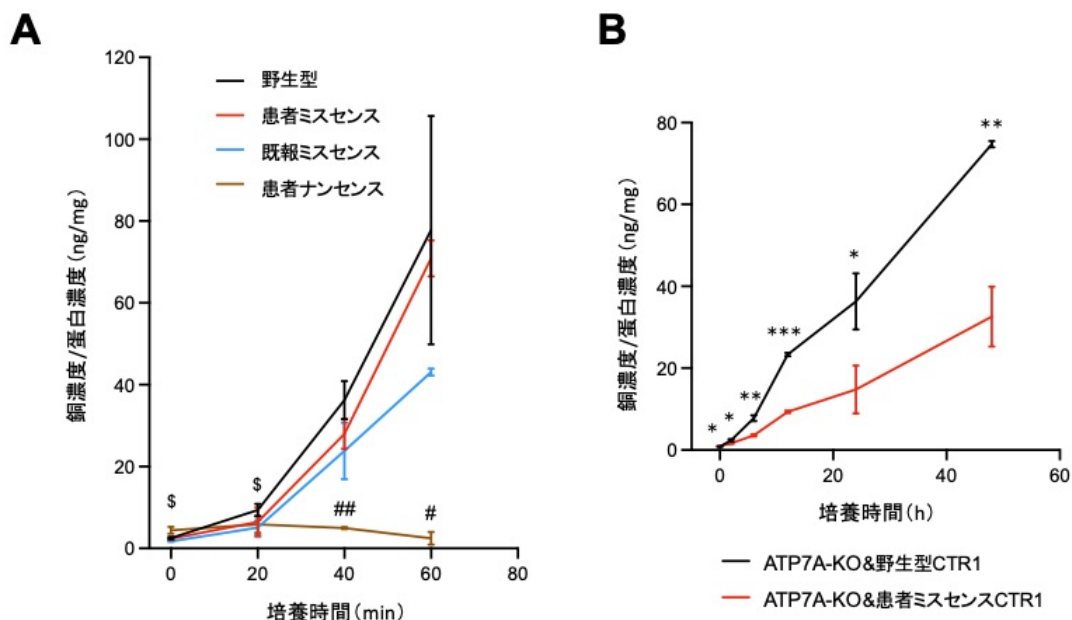


図2: (A) 各種CTR1強制発現細胞における細胞内銅濃度。平均±標準偏差 (n=3)。 (B) ATP7Aノックアウト細胞における細胞内銅濃度。平均±標準偏差 (n=3)。

以上の結果から、患者で同定されたミスセンスバリエントとナンセンスバリエントは細胞内への銅輸送を障害し、その結果、臨床的に問題となる銅欠乏を来す可能性が示唆された。

本研究の制限として、1家系での解析であり今後さらなる家系の集積が必要であることと、*in vitro*での解析のみであり、実際の生体内で起きている病態とは異なる可能性があることなどが挙げられる。

本研究の成果として、CTR1が新規銅代謝異常症に関連する可能性が示唆された。今後、同様の患者を蓄積することにより遺伝型表現型相関が明らかになり、銅代謝異常の理解が深まり、未診断患者の正確な診断や治療法開発に結びつくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舞鶴賀奈子、吉田健司、粟屋智就、井手見名子、林貴大、矢野直子、甲良謙伍、佐々木彩恵子、西川絹子、横山淳史、滝田順子
2. 発表標題 銅トランスポーターCTR1異常による新規遺伝性銅欠乏症の病態解明
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------