

日本人ウィルソン病の遺伝子変異

(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患に関する研究)

荒島真一郎¹, 山口昭弘², 福士 勝², 藤田晃三²

要 約：札幌市では新生児濾紙血セルロプラスミン(CP)測定によるウィルソン病(WND)のマス・スクリーニングを平成7年4月より実施しており、スクリーニング陽性者に対する確定診断法としての応用を目的に、WND遺伝子; *ATP7B*の直接塩基配列解析を併せて行なってきた。WND患者24家系(日本人23家系, 韓国人1家系)について、イントロン境界を含めた全21エクソン領域の塩基配列を決定した結果、日本人に特徴的な15種類の遺伝子変異と、3種類の共通変異(欧米人2種類, 中国人1種類)を認め、48アレル全てに責任遺伝子変異の候補を同定できた。日本人WND遺伝子変異の特徴として、比較的頻度の高い4種類の共通変異(個々の頻度は10.4-16.7%)が存在し全体の54%(26/48アレル)を占めること、遺伝子変異をホモ接合体として有するのは2/24名(8.3%)のみで大部分が様々な組合せの複合ヘテロ接合体であること、およびATP作用領域を中心とする8つのエクソンに94%(45/48アレル)の変異が集中することがわかった。

この結果を踏まえ、新たなWND12家系について変異の集中する8つのエクソンについて直接塩基配列解析を行なったところ、79%(19/24アレル)に新たな3種類の変異を含め責任遺伝子変異の候補が同定され、8/12名(67%)に両アレルの変異を決定できた。

見出し語：ウィルソン病, 新生児マス・スクリーニング, *ATP7B*, 遺伝子解析

研究方法：WND患者36家系(日本人35家系, 韓国人1家系)の末梢血リンパ球あるいは乾燥濾紙血から調整したDNA試料を用い、PCR直接塩基配列解析により*ATP7B*の遺伝子変異を決定した(蛍光オートシーケンサ; 日立SQ5500型)^{1,2)}。この内、最初の24家系については全21エクソンの塩基配列を決定し³⁾、残りの12家系については、変異の集中する8つのエクソン; 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16および18について塩基配列解析を行なった。WND患者の内訳は、臨床診断に基づくものが32名、残り4名は幼児期のCP低値を指標としたスクリーニングにより発見された例である⁴⁻⁷⁾。

結 果：WND遺伝子; *ATP7B*の全21エクソン領域の塩基配列を決定したWND患者24家系(日本人23家系, 韓国人1家系; 臨床診断21名, スクリーニング陽性3名)の解析結果から、日本人に特徴的な15種類の遺伝子変異(Y594X, A803T, 2511delA, A874V, 2659delG, R919G, 2871delC, P992L,

G1035V, 3282delC, G1186S, D1267A, D1296N, V1297I, 4097delTG)と、3種類の共通変異(欧米人2種類; 2299insC, N1270S; 中国人1種類; R778L)が認められ、48アレル全てに責任遺伝子変異の候補を同定できた(図1, 表1)。

日本人WND遺伝子変異の特徴として、比較的頻度の高い4種類の共通変異(R778L; 14.6%, 2871delC; 16.7%, G1186S; 12.5%, N1270S; 10.4%)が存在し全体の54%(26/48アレル)を占めること、遺伝子変異をホモ接合体として有するのは2/24名(8.3%)のみで大部分が様々な組合せの複合ヘテロ接合体であること、およびATP作用領域を中心とする8つのエクソン; 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16および18に94%(45/48アレル)の変異が集中することがわかった(図2)。変異の番号について、当初報告された*ATP7B*cDNAのnt1039-nt1056の間に3bp余分の配列があり⁸⁾、その後、誤りが確認されたため⁹⁾、これ以降の塩基およびアミノ酸番号が、従来よりも-3および-1小さくなっている。

¹北海道大学小児科, 北海道教育大学札幌校, ²札幌市衛生研究所,

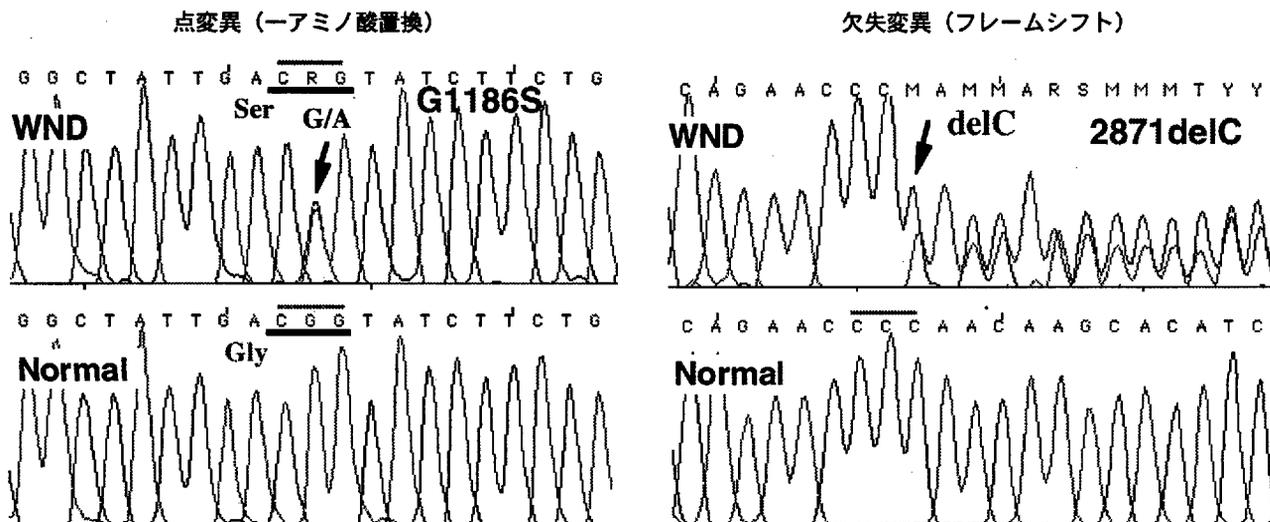


図1. ウィルソン病における ATP7B遺伝子変異の検出
- 濾紙血試料のPCR直接塩基配列解析 -

表1. 我国におけるウィルソン病24家系の遺伝子変異
- whole sequences of 21 exons were determined -

Mutation	Identified		Allele		Wilson Disease Patients (N=24)																							
	Ex	Domain	No	%	1	6	8	12	16	18	24	26	29	32	35	42	44	48	53	55	59	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Y594X	5	Cu 6	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2299insC*	8	Tm 4	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R778L*	8	Tm 4	7	14.6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A803T	9	after Tm 4	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2511delA	10	Td	3	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A874V	11	Td	2	2.1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2859delG	11	Td	2	4.2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R919G	12	Tm 5	3	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
2871delC	13	Tm 6	8	16.7	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	+	+	-	-	-	-	-
P992L	13	Tm 6	1	2.1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1035V	14	Ph	2	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3282delC	15	ATP loop	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
G1186S	16	ATP pocket	6	12.5	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
D1267A	18	ATP hinge	2	4.2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1270S*	18	ATP hinge	5	10.4	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1296N	18	ATP hinge	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V1297I	18	ATP hinge	1	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4057delTG	20	after Tm 7	1	2.1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total			48	100																								

*Common mutations to
R778L: Chinese
N1270S: Italian, Turkish

#32,42,59,C5: Early infantile onset with hepatopathy
#8: Fulminant hepatitis at 13y
#55&#C7: Cirrhosis at 8 and 10y, respectively

#C2,3,4: detected by infantile screening
#32: Korean
■ Nonsense or Frame shift mutations

この結果を踏まえ、新たなWND12系（臨床診断11名、スクリーニング陽性1名）について変異の集中する8つのエクソンの直接塩基配列解析を行なったところ、新たな4種類の変異（G881D, K1010T, A1063V, 3787delG）を含め79%（19/24アレル）に責任遺伝子変異の候補が同定され、8/12名（67%）に両アレルの変異を決定できた（表2）。

考 察：現在、WNDのスクリーニングについては、CP低値を指標とした新生児濾紙血あるいは幼児期の濾紙血や尿を用いる方法が、本研究班を中心に各地で検討されている。札幌市では、WNDマス・スクリーニングを目的とした幼児期の新たな採血あるいは採尿システムを構築することは、理想的では

July, 1997

37 Reported from European, Mid Eastern and Chinese

3 Common*

15 Japanese specific

Identified in this study

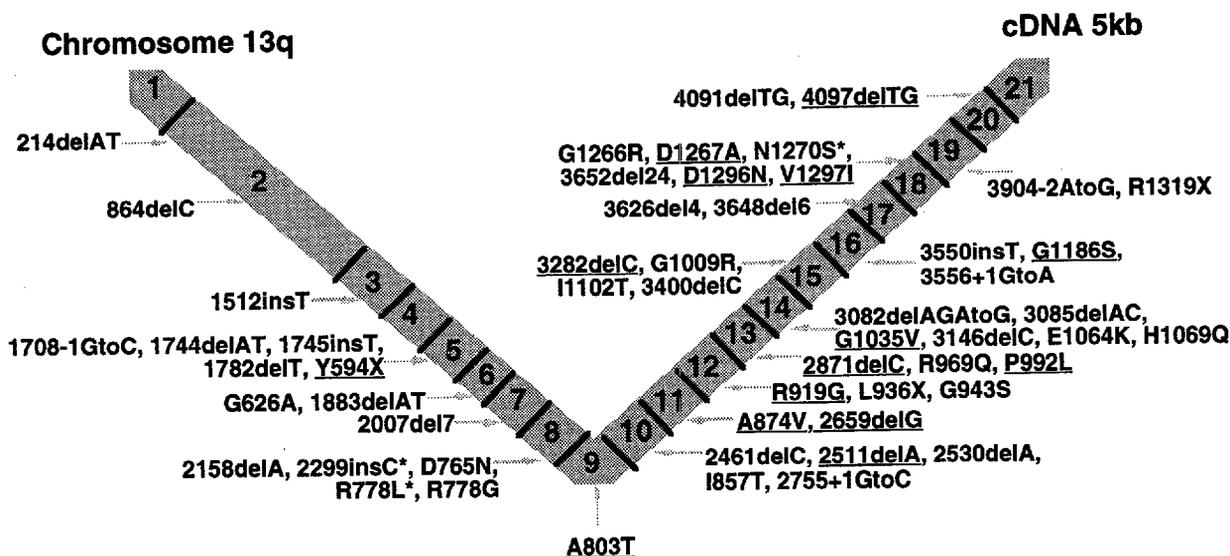


図2. ウィルソン病における ATP7B 遺伝子変異の分布

表2. 新たな日本人ウィルソン病12家系に対する遺伝子変異のスクリーニング結果

- 1st step screening: for exon 8,10,11,12,13,14,16,18 -

Mutation	No	Ex	ID No. of the Patients with Wilson Disease											
			C2944	C2945	C2987	C2988	C2989	C3088	C3117	C3119	C3120	C3172	C3123	C3215
2299insC	2	8			+							+		
R778L	4	8	+		+	+								+
A874V	1	11				+								
G881D*	1	11											+	
R919G	1	12											+	
2871delC	2	13					+					+		
P992L	1	13										+		
K1010T*	1	13						+						
A1063V*	1	14												+
G1186S	1	16		+										
3787delG	1	18		+										
N1270S	1	18											+	
D1296N	1	18						+						
V1297I	1	18							+					
total	19 / 24		?						?	?	??			

*: Novel mutation

■ Frame shift mutation

?: Not identified the responsible mutation

Original cDNA sequences were corrected by removing extra 3bp between nt1039-1056 and resulted in -1 AA numbers^{8,9)}

あるが現実には多くの困難を伴うことから、新生児期、既にC P 低値を示す可能性の高い早期発症型のWNDをターゲットとして、現行の新生児マス・スクリーニングに組み入れた形で実施している。平成7年4月から、平成9年12月末までに、48,355名の新生児をスクリーニングし1名が精査となったが、ATP7B遺伝子変異は認められず、CPも生後2か月の時点で正常化し、これまで患児は発見されていない¹⁰⁾。

CP低値は、元々、WNDの酵素障害を直接的に反映するものではないことから、確定診断のためには、尿中銅排泄および肝銅含量など総合的な評価が必須である。しかしながら、肝への銅蓄積途中にある発症前の症例では、いずれも境界領域を示す場合も多いことから、遺伝子変異解析により確定診断が可能となることの意義は、スクリーニング陽性例にとって特に大きいものと考えられる。

全エクソン領域を決定したWND24家系の遺伝子解析から、日本人WND変異の特徴として、いろいろな変異を様々な組合せで有する複合ヘテロ接合体がほとんどであることがわかった。このことはWNDが臨床的にも変化に富む疾患であることを説明するものと考えられ、重大な蛋白レベルの障害が予想されるフレームシフト変異が早期発症例に多く認められるなど、ある程度の臨床型と遺伝子型との関係が示唆されている(表1)³⁾。今後、新たなWND患者例あるいはスクリーニングによるCP低値例についての解析をさらに積み重ねて行くと共に、遺伝子型と臨床型との関係については環境因子等も踏まえた考察が必要であろう。

日本人遺伝子変異の集中する8つのエクソンの直接塩基配列解析により、効率的に遺伝子変異を検出できることが、新たなWND12家系の解析から確認できた(表2)。責任遺伝子変異を確定できなかった4名(3名は残りアレル、1名は両アレル)については、他のエクソン領域も解析する必要があるが、WNDのように、様々な遺伝子変異を有する疾患に対しては、変異の集中するエクソンに対する直接塩基配列解析が最も効果的な確定診断へのアプローチと考えられた。

謝辞

患児試料解析の貴重な機会を与えて頂きました、千葉こども病院；高柳正樹先生、札幌医大小児科；堤裕幸先生、群馬大学小児科；田畑雅彦先生、福井医大小児科；畑郁江先生、防衛医大小児科；乾あやの先生、独協医大小児科；山崎修子先生、横浜市立大学小児科；菊池信行先生、島根医大小児科；木村正彦先生、横浜港湾病院小児科；藤岡憲一郎先生、北海道社会保険中央病院小児科；中山承代先生、北海道大学神経内科；松浦徹先生、函館五稜郭病院小児科；遠藤満智子先生、東北大学小児科；大浦敏博先生、東京警察病院消化器センター；鈴木剛先生、久留米大学小児科；吉田一郎先生、に深謝致します。

文献

1. Yamaguchi A, et al. Human Mutation: Online #116,1997.
2. 山口昭弘, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌: 7, 104,1997.
3. 山口昭弘, 他: 日本先天代謝異常学会雑誌: 13, 488, 1997.
4. 大浦敏博, 他: 日本先天代謝異常学会雑誌: 12, 195, 1996.
5. 春木英一, 他: 厚生省心身障害研究「効果的なマス・スクリーニングの施策に関する研究」平成8年度研究報告書, 142-145, 1997.
6. 菊地信行, 他: 日本先天代謝異常学会雑誌: 13, 486, 1997.
7. 畑 郁江, 他: 厚生省心身障害研究「効果的なマス・スクリーニングの施策に関する研究」平成9年度研究報告書, (本報告書掲載) 1998.
8. Bull PC, et al.: Nature Genet 5: 327-36, 1993.
9. Petrukhin K, et al.: Hum Mol Genet 3: 1647-56, 1994.
10. 荒島真一郎, 他: 厚生省心身障害研究「効果的なマス・スクリーニングの施策に関する研究」平成8年度研究報告書, 152-153, 1997.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要 約:札幌市では新生児濾紙血セルロプラスミン(CP)測定によるウィルソン病(WND)のマス・スクリーニングを平成7年4月より実施しており、スクリーニング陽性者に対する確定診断法としての応用を目的に、WND 遺伝子; ATP7B の直接塩基配列解析を併せて行ってきた。WND 患者 24 家系(日本人 23 家系, 韓国人 1 家系) について、イントロン境界を含めた全 21 エクソン領域の塩基配列を決定した結果、日本人に特徴的な 15 種類の遺伝子変異と、3 種類の共通変異(欧米人 2 種類, 中国人 1 種類)を認め、48 アレル全てに責任遺伝子変異の候補を同定できた。日本人 WND 遺伝子変異の特徴として、比較的頻度の高い 4 種類の共通変異(個々の頻度は 10.4-16.7%)が存在し全体の 54%(26/48 アレル)を占めること、遺伝子変異をホモ接合体として有するのは 2/24 名(8.3%)のみで大部分が様々な組合せの複合ヘテロ接合体であること、および ATP 作用領域を中心とする 8 つのエクソンに 94%(45/48 アレル)の変異が集中することがわかった。

この結果を踏まえ、新たな WND12 家系について変異の集中する 8 つのエクソンについて直接塩基配列解析を行なったところ、79%(19/24 アレル)に新たな 3 種類の変異を含め責任遺伝子変異の候補が同定され、8/12 名(67%)に両アレルの変異を決定できた。