

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

ウィルソン病診断の新しい方法，ATP7B活性の測定に関する検討

研究要旨

Wilson病は、ATP7B遺伝子により産生される銅輸送膜蛋白（P-type ATPase）の障害により生じると考えられる。本研究において筆者らは、Wilson病症例、Menkes病症例とその母親、および正常コントロールにおける細胞膜銅依存性ATPase活性の測定を行い、本法がWilson病の新しい診断法になりうるか否かを検討した。培養リンパ球細胞より膜成分を抽出し、銅依存性ATPase活性をATPの酸化的リン酸化の変化により測定した。その結果、Menkes病症例において銅依存性ATPase活性はコントロールの約30%程度に、Wilson病症例においては約45～60%に低下していた。本法がWilson病（Menkes病も含みうる）の新しい診断法になりうる可能性が示唆された。

研究協力者

清水教一、宇野久仁子、山口之利、青木継稔
(東邦大学医学部第2小児科)
逸見仁道、嶋武博之
(東邦大学医学部分子生物学)

研究目的

Wilson病は、肝臓、角膜および中枢神経などに銅の過剰な蓄積を認め、種々の臓器の障害を生じる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。その病態の中心は、肝臓における銅輸送膜蛋白ATP7B(P-type ATPase)の障害による銅の排泄障害であると考えられる。現在、血中あるいは尿中のセルロプラスミン値測定による本症のマススクリーニング・システムの確立が検討されており、パイロットスタディが全国の施設にて行われている。しかし、これらの検索により発見される年少例は、確定診断が困難なことが多く、一次スクリーニングより確定診断までをスムーズに行う事のできるシステムを完成することが必要である。筆者らは、Wilson病の非侵襲的確定診断法を開発することを目的として、末梢血細胞の細胞膜における銅依存性ATPase活性の測定法を検討した。Wilson病症例、銅欠乏性の遺伝性銅代謝異常症であるMenkes病および正常コントロールにおける測定結果を比較し、銅依存性ATPase活性の測定が、Wilson病の新しい診断法になりうるか否かを検討した。

研究方法

対象は古典的Menkes病症例1例とその母親（保因者）、Wilson病症例5例、および正常コントロール2例であった。
方法（銅特異的ATPase活性測定）：1)上記した対

象のリンパ球をEB virusにて不死化し培養した。2)細胞を溶解し、膜成分を抽出した。3)Sodium azide、ZnSO₄、Ouabainにて非特異的にATPase活性を阻害した。4)ATPおよびCuSO₄を加え、37 60分反応させ銅特異的ATPaseを活性化した。5)発色剤を加えA820nmを測定することにより、ATPの酸化的リン酸化の変化を測定した。

研究結果

1. 正常コントロールとして用いた培養リンパ球のATPase活性は、3種類のATPase阻害剤を加えることにより、前値の約20%に低下した。次に銅を加え反応させることにより、ATPase活性は上昇し、前値（阻害剤投与前）の約150%に達した。
2. Menkes病症例および保因者においてもコントロール同様ATPase阻害剤の投与により、ATPase活性は前値の約20%に低下した。銅負荷により共に活性は上昇したが、保因者にて前値（阻害剤投与前）の約80%、Menkes病症例にては約60%の上昇にとどまった。
3. 正常コントロールにおける銅負荷後の値を100%として、Menkes病、その保因者およびWilson病5症例のATPase活性を比較した。その結果、Menkes病症例は正常コントロールの $29.1 \pm 4.2\%$ に、保因者は $48.2 \pm 1.9\%$ に低下していた。Wilson病5症例は、それぞれ 46.8 ± 4.1 、 47.5 ± 4.6 、 48.2 ± 1.9 、 53.2 ± 7.4 、 56.1 ± 3.3 および $60.5 \pm 0.3\%$ と、Menkes病症例程ではないものの、やはり明らかに低い値を呈していた。

考察

正常コントロールの培養リンパ球において、ATPase阻害剤により低下したATPase活性が銅の投

与により上昇することより、銅特異的ATPaseの活性は、銅負荷前後の酸化的リン酸化の変化をみることにより測定が可能であった。銅輸送P-type ATPaseである、ATP7Aおよび7B蛋白の機能を、本法を用いて解析することができると考えられた。

今回、Wilson病症例5例において、その培養リンパ球における銅刺激によるATPase活性の上昇、すなわち銅特異的ATPase活性は、正常コントロールの約45-60%と明らかに低下していた。これは、ATP7B蛋白の機能障害を反映していると考えられる。本法はWilson病の原因となっている蛋白の機能を直接測定する方法であり、本症の診断に極めて有用であると考えられた。本研究においては培養リンパ球を使用した。現在末梢血より分離した白血球を用いて同様の実験を行っており、より簡便・敏速な測定が可能となると考えられる。

本法の問題点は、ATP7Aと7B蛋白の活性を同時に測定しており、両者を区別することができない点にある。また、銅刺激による活性上昇の程度が

Menkes病にて正常の約30%、Wilson病では約45-60%と、リンパ球における銅代謝にはATP7A蛋白がより強く機能していると推察された。Wilson病の診断をより正確・確実に行うには、選択的にATP7B蛋白の活性を測定する方法の開発が望まれる。今後、ATPase阻害剤の工夫や、抗ATP7A蛋白抗体などを用いてATP7A蛋白と7B蛋白の活性を分離する方法を検討する予定である。

結論

Wilson病、Menkes病、Menkes病保因者および正常コントロールの培養リンパ球の細胞膜における銅依存性のATPase活性を測定した。Menkes病症例において、銅依存性ATPase活性はコントロールの約30%程度に低下していた。Wilson病症例においては、約45-60%であった。これらの結果より、本法がWilson病(Menkes病も含みうる)の新しい診断法になりうる可能性が示唆された。