

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

Wilson病マススクリーニングにおけるATP7B遺伝子解析および  
蛋白活性測定的位置づけとその方略に関する検討

研究要旨

Wilson病診断のためのATP7B遺伝子解析と銅特異的ATPase活性測定の方略を検討した。さらに本症マススクリーニング・システムにおけるこれらの方法の位置づけについての検討を行った。ATP7B遺伝子解析は、まず高頻度に認められる変異をARMSなどを用いてスクリーニングすることにより効率よく解析が行えると考えられた。銅特異的ATPase活性測定は、診断に有効であることが示唆されたが、現時点においてはリンパ球を培養する必要が問題点であり、また今後は症例数を増やしての検討が必要であると考えられた。これらの診断法は、Wilson病マススクリーニングにおいて、非侵襲的確定診断法として有効であると考えられた。

研究協力者

清水教一，竹下由紀子，宇野久仁子，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、常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。肝臓、角膜および中枢神経などの種々の臓器に銅の過剰な蓄積による障害を生じる。本症は、ATP7B遺伝子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。その病態の中心は、肝臓における銅の排泄障害であると推測されている。本症の診断は、血中セルロプラスミン値の低下、尿中銅排泄量の増加あるいは肝細胞中への銅の蓄積の証明などにて行われている。しかし、今後マススクリーニングにより発見されると予想される年少例は、確定診断が困難なことが多く、可能な限り非侵襲的な確定診断法を確立することが必要である。

本研究において筆者らは、Wilson病の診断法としてのATP7B遺伝子解析と銅依存性ATPase活性測定について、本症マススクリーニングにおける位置づけと方略を検討した。

研究方法

1. ATP7B遺伝子解析

対象は、Wilson病症例20例であった。

方法：1) 患者末梢血よりgenomic DNAを抽出した。2) このDNAに対して、PCR-SSCP法などを用いて変異を有するexonを検索した。3) 変異の生じる可能性の高いexonよりdirect sequence法にて変異を検索した。4) 最終的には変異を有すると考え

られるexonの塩基配列を決定し、変異を同定・確認した。

2. 銅特異的ATPase活性測定

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, ZnSO<sub>4</sub>, Ouabainにて非特異的にATPase活性を阻害した。4)ATPおよびCuSO<sub>4</sub>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の酸化リン酸化の変化を測定した。

研究結果

1.Wilson病症例に対するATP7B遺伝子の構造解析を行った結果、13種類の変異が同定された。内訳は、missense mutationが7種類、1塩基欠失が、4種類、1塩基挿入が1種類およびスプライシング異常が1種類であった。そのなかで、2874delC, Arg778Leu, Ala875Val, 2302insCおよび2662delGが比較的高頻度に認められた。

2.正常コントロールにおける銅負荷後の値を100%として、Wilson病症例における銅特異的ATPase活性を比較した。その結果、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 ± 0.3%と、明らかに低い値を呈していた。

## 考察

Wilson病症例に対する遺伝子診断は、既知の比較的頻度の高い変異についてまずスクリーニングを行うことにより、効率よく行えると考えられる。本症の遺伝子変異は、点突然変異と1塩基挿入・欠失がほぼ同じ頻度にて認められるため、それらの変異の同定にはAmplification refractory mutation system (ARMS)が有効であると考えられた。本法は、PCR反応においてプライマーの3'末端の塩基が変化するとアニーリングしない特徴を利用している。既知の遺伝子変異に対して、変異部位が3'端になるようにオリゴヌクレオチドを、一つはwild type、もう一方はmutantの塩基配列を持つように2種作成する。他方は共通プライマーを用いる。これらを用いて一つの変異検索に関して2種のPCR反応を行い、どちらのプライマーを用いた反応にて増幅がなされるかをみる。すなわち、その部位が正常であればwild typeのみ、homozygousな変異であればmutantのみ、そしてheterozygoteであれば両方とも増幅される。現在筆者らは、Wilson病において比較的頻度が高い、2302insC (exon 8)、2514delA (exon 10)、2662delG (exon 11)、2874delC (exon 13)、R778L (exon 8)、A874V (exon 11)、R920G (exon 12)、G1187S (exon 16)およびN1270S (exon 18)の9種類の変異についてARMSによる解析を行っている。この方法により、全alleleの60-70%の変異を同定できると考えられる。

また、培養リンパ球における銅特異的ATPaseの

活性の測定は原因蛋白の機能を直接測定する方法であり、その低下を証明することにより本症を診断することが可能であると考えられた。しかし、本法はATP7Aと7B蛋白の活性を同時に測定しており、今後は選択的にATP7B蛋白の活性を測定する方法の開発が望まれる。

ATP7B遺伝子解析および銅特異的ATPase活性測定を用いたWilson病診断の方略を図1に示す。ARMSとダイレクト・シーケンス法を中心として遺伝子解析を行い、変異が同定されない症例に対しては培養リンパ球を用いた活性測定を行うことにより診断が可能であると考えられる。また、これらの方法は必要とする技術、時間およびコストの問題により、一次あるいは二次スクリーニングに用いるのは困難であるが、非侵襲的な確定診断法として有用であると考えられる(図2)。

## 結論

Wilson病診断のためのATP7B遺伝子解析と銅特異的ATPase活性測定の方略と、本症マススクリーニングにおける位置づけについての検討を行った。遺伝子解析は、まず高頻度に認められる変異をスクリーニングすることにより効率よく解析が行えると考えられた。また、銅特異的ATPase活性測定も診断に有効であると考えられた。これらの診断法は、Wilson病マススクリーニングにおいて、非侵襲的確定診断法として有効であると結論した。

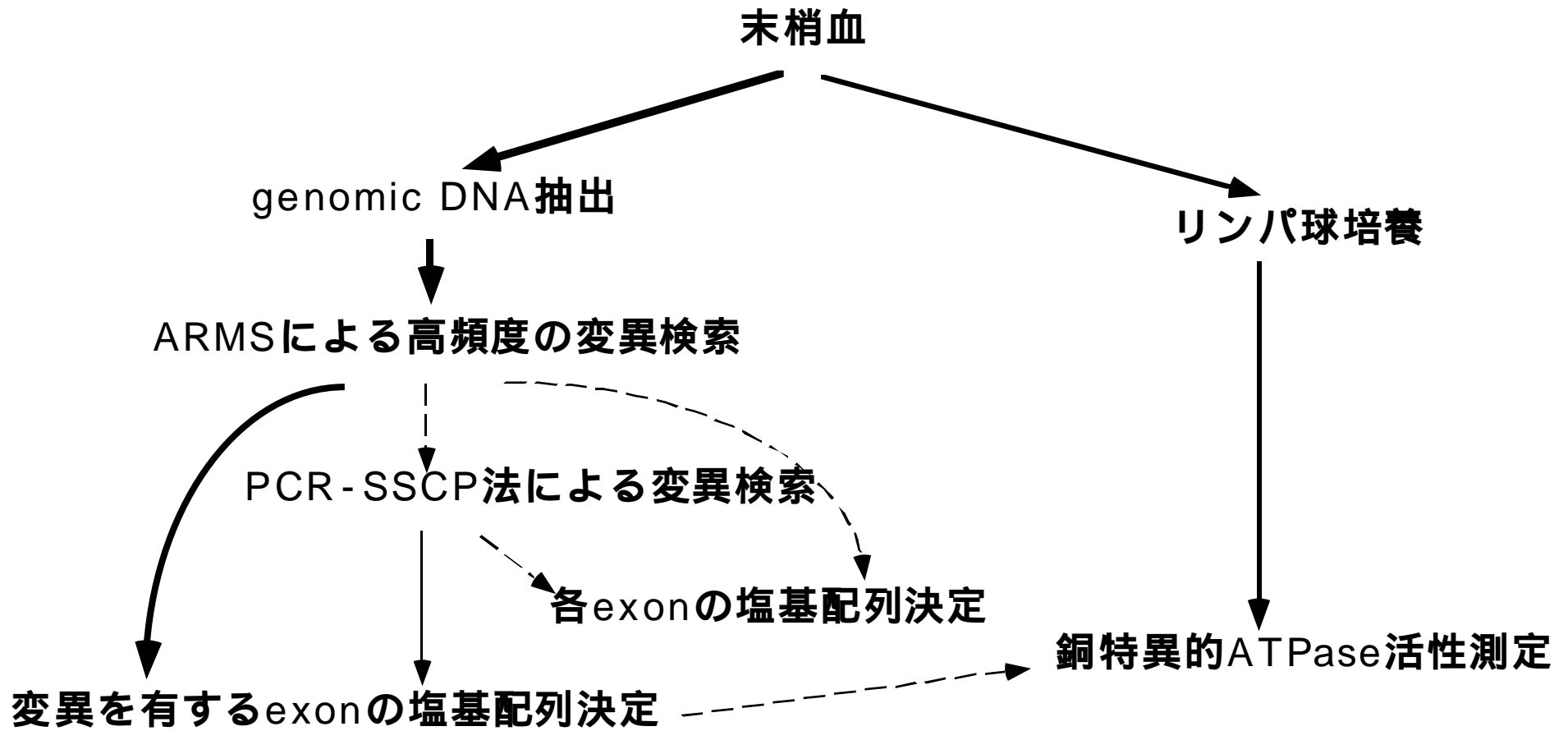


図1. Wilson病診断における遺伝子解析およびATPase活性測定の方略

### 一次スクリーニング

- i) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
- ii) 乳幼児期血中活性型セルロプラスミン値測定  
(濾紙血)



### 二次スクリーニング

- i) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
- ii) 血中活性型セルロプラスミン値測定
- iii) 尿中銅排泄量測定



### 確定診断

#### 1. 3歳以降

- i) 肝銅含量測定 and/or 胆汁中銅排泄量測定
- ii) 尿中銅含量測定
- iii) 遺伝子解析
- iv) ATP7B 活性測定

#### 2. 1.5～3歳未満

- i) 肝銅含量測定
- ii) 遺伝子解析
- iii) ATP7B 活性測定

図 2. Wilson 病マススクリーニングにおける ATP7B 遺伝子解析および蛋白活性測定の位置づけ