

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 *ATP7A* gene mutations in patients with Menkes disease and Occipital horn syndrome

Menkes 病と Occipital horn syndrome 患者における *ATP7A* 遺伝子の変異

氏 名 顧 艶紅

1993 年に Menkes 病の責任遺伝子—*ATP7A* が同定され、この疾患は細胞内の Golgi 体膜と細胞質膜における銅輸送の障害によって引き起こされることがわかった。*ATP7A* のゲノム DNA の全長は約 150kb で、cDNA は 23 のエクソンからなり、cDNA の翻訳領域は約 4500bp である。*ATP7A* がコーディングしている銅輸送 ATPase 蛋白—*ATP7A* は細胞内で銅のサイトソールから Golgi 体への輸送に関与している。Menkes 病の細胞では細胞の銅の吸収は正常であるが、*ATP7A* の欠損により、銅は細胞内のサイトソールに蓄積し、細胞外に分泌されない。小腸における銅輸送障害の結果、全身の銅欠乏になり、銅酵素の活性低下による重篤な症状を示す。

Menkes 病は中枢神経症状をはじめとする多臓器にわたり多彩な症状を呈する重篤な X 染色体劣性遺伝疾患である。生後 2-3 ヶ月の間に母体由来の銅は減少し、典型的な症状が現れ、診断される場合が多い。しかし、胎内あるいは新生児時期に発症の例もある。重症例では難治性痙攣が発症し、非経口銅補充をしないと多くは 3 歳までに死亡する。軽症の Menkes 病である occipital horn 症候群は独特な後頭部の骨の突出が特徴で、発症年齢は遅く、運動失調や関節・皮膚の過伸展、軽度知能障害等が見られる。Menkes 病の臨床検査の特徴は血清銅及びセルロプラスミンの低値、経口銅負荷で血清銅値の上昇が見られない、培養皮膚繊維芽細胞、培養羊水細胞の銅濃度高値などである。保因者は血液生化学的検査では異常は見られないが、培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度高値で診断できる場合が多い。しかし、培養細胞内銅濃度正常でも保因者でないとは限らない。Menkes 病は胎内～生後 2 ヶ

月以内にあるいは発症する前に銅補充治療を開始すれば神経障害の予防が期待できる例もあるが、膀胱憩室などの結合組織の異常の進行は防げない。

本症の責任遺伝子が発見されてから本症患者の遺伝子変異が同定できるようになった。患者の遺伝子変異が同定されれば、遺伝子解析を用いた保因者診断、出生前診断が可能になる。しかし、今までの報告は殆ど欧米患者の変異で、日本人患者の変異はまだ明らかではない。日本人の保因者診断、出生前診断の報告はまだない。日本人 Menkes 病の病態を明らかにし、遺伝子診断法を確立するために、本研究では 20 名の血縁関係のない日本人 Menkes 病患者と 2 名の血縁関係のない日本人 occipital horn 症候群患者の遺伝子を解析し、皮膚繊維芽細胞の銅濃度を測定した。さらに遺伝子解析と細胞内の銅測定を用いて、8 名の患者の母親と 4 名のおばに対し、保因者診断を行い、2 家系で出生前診断を実施した。本研究はすべて患者家族からの希望によって行ったもので、全例インフォームドコンセントを得た上で行った。

#### 1. Menkes 病患者及び occipital horn 症候群患者の遺伝子変異と培養繊維芽細胞の銅測定

臨床症状から診断された 20 名の血縁関係のない日本人 Menkes 病患者と 2 名の血縁関係のない日本人 occipital horn 症候群患者の白血球、株化リンパ球、臍帯あるいは培養皮膚繊維芽細胞から、genomic DNA と total RNA を抽出し、PCR と RT-PCR で *ATP7A* の各エクソンと cDNA を増幅し、一部の PCR 産物を SSCP でスクリーニングしてから direct sequencing を行った。

19 名の Menkes 病患者から 18 の異なった変異が見つかった。そのうち塩基の挿入と欠失は 6 名、ノンセンス変異は 7 名、ミスセンス変異は 3 名、スプライスサイト変異は 3 名であった。6 名の患者の変異がすでに報告された変異と同じであったが、残りの 12 変異は今までに報告されていない変異であった。RT-PCR 解析により、スプライスサイト変異を示した 3 名の Menkes 病患者では、変異近くの 1 つあるいは 2 つのエクソンが異常なスプライシングにより切り出され、正常の長さの cDNA がなかったことがわかった。また、20 名の Menkes 病患者の血清銅とセルロプラスミンが低値を示し、ノンセンス変異の患者も全例血清銅、セルロプラスミンは著明に低値であった。これらの変異による *ATP7A* は機能が著しく低下していると考えられた。20 名の Menkes 病患者のうち、11 名の培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度を測定したところ、遺伝子変異の種類と関係なく、細胞内に銅が著明に蓄積していた。

一方、1 名の occipital horn 症候群の患者はスプライスサイト変異であった。RT-PCR 解析でエクソン 6 がスプライシングされたセグメントが確認されたほか、正常な *ATP7A* cDNA も少量に存在することがわかった。この occipital horn 症候群の患者の遺伝子変異は Møller ら報告した occipital horn 症候群の患者と同じ変異であった。そこで、Real-time RT-PCR 法でこの occipital horn 症候群の患者の培養皮膚繊維芽細胞の正常な *ATP7A* mRNA の発現量を調べたところ、正常コントロールの 18–21%であった。しかし、Mølle らの患者の培養皮膚繊維芽細胞の正常 mRNA の発現量はコントロールの 2–5%と本例の発現量と異なった。本患者の培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度は Menkes 病患者と同様に高値を示し、occipital horn

症候群患者の診断に培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度測定が有用であることを示した。しかし培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度は本症の phenotype を示さない。また、血清銅・セルロプラスミン値の比較では Møller らの患者では低値であるが、本例では正常であった。これらの所見も同じスプライスサイト変異であっても患者により正常 *ATP7A* mRNA の発現量は異なることを示唆している。すなわち、occipital horn 症候群の患者においては正常な *ATP7A* mRNA の発現量によって Phenotype が違うという新しい知見を得た。

さらに、Menkes 病患者の遺伝子変異を同定する際に日本人 *ATP7A* 遺伝子における 25 個の多型を同定した。

残りの 1 名の Menkes 病患者と 1 名の occipital horn 症候群の患者では *ATP7A* の翻訳領域だけでなく 5'の上流領域と 3'非翻訳領域の 10 個の GTT 繰り返し配列も解析したが、変異は見つからなかった。

## 2. 遺伝子解析と培養繊維芽細胞の銅測定による保因者診断

Menkes 病患者の母親 8 名とおば 4 名の全血あるいは培養皮膚繊維芽細胞から genomic DNA を抽出し、遺伝子解析を行った。

8 名の母親のうち、6 名の母親と 1 名のおばは 1 本の変異アレルを持っており、保因者であると診断できた。保因者のうち、2 名で培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度測定を行い、銅濃度は Menkes 病患者と同様に高値を示し、遺伝子診断の結果を支持することができた。母親 2 名とおば 3 名は変異アレルを持っておらず、保因者でないことがわかった、そのうち 3 名で培養皮膚繊維芽細胞の銅濃度の測定を行い、いずれも正常の値を示した。また、血縁関係のない Menkes 病患者 2 名で遺伝子変異部位は同じであったが、1 名の母親は保因者で、もう 1 名の母親は保因者ではなかった。

## 3. 遺伝子解析と羊水細胞の銅測定による出生前診断

Menkes 病患者の 2 家系、2 胎児で出生前診断を行った。うち 1 家系の患者では遺伝子変異は同定されていたが、1 家系の患者は変異が見つからなかった患者である。羊水細胞から genomic DNA を抽出し、遺伝子診断を行った結果、1 人の男性胎児では変異アレルは見つからず、患者ではないと診断した。この胎児は出生後、健康であることが確認された。

典型的な臨床症状と臨床検査を呈するにもかかわらず、*ATP7A* での変異は見つからなかった Menkes 病患者家系では、培養羊水細胞の銅濃度測定で出生前診断を行った。発端者が Menkes 病であると診断された時、彼の母親がすでに妊娠 28 週目であった。羊水穿刺を行い、羊水細胞で胎児は男児であることがわかったため、培養羊水細胞の銅濃度を測定した。培養羊水細胞内の銅濃度はコントロールの羊水細胞より高く、胎児が Menkes 病患者であることが強く疑われた。胎児が妊娠 36 週に帝王切開で出生し、生後診断のために経口銅負荷試験を行った。銅負荷によっても血清銅、セルロプラスミン値はほとんど上昇せず、Menkes 病と診断し、生後 22 日目から早期のヒスチジン銅皮下投与治療を始めた。現在 3

歳で、精神運動発達は正常である。

以上の結果より、遺伝子変異が同定されていない Menkes 病患者の家系での出生前診断には培養羊水細胞の銅測定が有効であることが示された。

培養皮膚繊維芽細胞内の銅濃度の測定は Menkes 病と OHS 患者の診断に有用であるが、病気の重症度を評価することはできない。保因者では培養皮膚繊維芽細胞内の銅濃度は高値から正常までさまざまである。また、血清銅、セルロプラスミン値が正常だからと言って、OHS 患者や保因者ではないとは言い切れない。従って、患者、保因者と出生前診断の確定診断できるのは遺伝子検査である。

以上、本研究で得られた新しい知見は

- 1) Menkes 病患者で 12 個の新たな変異を同定した。
- 2) 日本人 *ATP7A* 遺伝子における 25 個の多型を同定した。
- 3) OHS 患者で同じスプライスサイト変異でも、培養皮膚繊維芽細胞の正常 mRNA の発現量や Phenotype が異なる。
- 4) 患者は同じ変異であっても、母親が保因者である場合と保因者ではない場合があることであって、25%の Menkes 病患者の変異は新生突然変異によるものであり、本研究成果は Menkes 病患者およびその家族に非常に有用であると思われる。