



Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting diabetes and neurodegenerative disease

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 良和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1526

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 249号	学位授与年月日	平成 9年 3月 7日
氏 名	高 橋 良 知		
論文題目	Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease (糖尿病と神経変性疾患の原因となるセルロプラスミン遺伝子のナンセンス変異)		

博士(医学) 高橋良知

論文題目

Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease

(糖尿病と神経変性疾患の原因となるセルロプラスミン遺伝子のナンセンス変異)

論文の内容の要旨

[はじめに]

セルロプラスミン (Cp) は、 $\alpha 2$ 糖蛋白に属し血漿中の銅の95%を結合している。この蛋白は、multi-copper oxidase として働き、肝臓で合成され分泌される前に銅が取り込まれる。しかしながら、Cp の生物学的な働きは未だ明らかとはされていない。我々は、晩発性の神経変性疾患を伴う異なる家系での分子生物学的な解析から、病因として Cp 遺伝子の異常を報告した。無セルロプラスミン血症は新たなヒトの遺伝病として認識されつつあり、Cp の鉄代謝における重要性が注目されてきている。今回、無セルロプラスミン血症における新たな遺伝子異常、ならびに本症の臨床的な特徴と遺伝子異常との関係について検討した。

[患者ならびに方法]

症例は45才女性。数カ月に及ぶ歩行障害と呂律の回りにくさ訴えて来院。31才より糖尿病を罹患している以外には特に健康に問題はなかった。一般身体所見には異常はなく、神経学的には軽度の小脳失調と構音障害を認め、明らかな網膜変性を認めた。T2強調 MRI 画像では、大脳基底核、視床、歯状核、肝臓に信号強度の低下を認めた。血清生化学検査では血清鉄低値、フェリチン高値であり、血清 Cp は検出されず、肝生検にて鉄の蓄積を認めている。近親婚の家族歴があり、患者の弟には、長期間にわたる糖尿病の既往があったが、神経学的には異常なく、早期の網膜変性を認めた。本例での遺伝子異常を明らかとする目的で① western blotting、②末梢血白血球より抽出したゲノム DNA を用いた polymerase chain reaction(PCR) による解析、③ dideoxy-termination 法による塩基配列の決定、④ restriction fragment length polymorphism(RFLP) による PCR 産物の検討を行った。

[結 果]

western blotting 上、患者および患者の弟では血清 Cp は検出されず、臨床的にヘテロと考えられる患者母では、正常コントロールに比べ約半分の量の Cp が検出された。

各エキソンに対する PCR では、正常コントロールと比べ増幅産物の大きさに差は認められず、dideoxytermination 法により塩基配列の決定を行ったところ第15エキソンの2630番の guanine が adenine に変わる点突然変異を認め、この変異により TGG(Trp)→TAG(Ter)となることが明らかとなった。他のエキソンの塩基配列には異常は認められなかった。またこの変異は、NcoI 制限酵素認識部位 (CCATGG) を消失させることより、エキソン15の PCR 増幅産物の NcoI による RFLP を行った。この結果、正常コントロールでは、PCR 増幅産物 (107bp) は、NcoI にて完全消化され72bp と35bp の二本のバンドとして認められたが、患者と弟では消化されず、western blotting で heterozygote と考えられた患者母では部分消化を受け計三本のバンドが認められた。

[考 察]

近親婚の家族歴を有する点、多クローンを検索しても正常の第15エキソンの配列が得られなかった点、他のエキソンの配列に異常が見られなかった点など、これらの点はこの遺伝子異常の homozygosity を示すものである。これまでの研究から、Cp では銅が取り込まれることでカルボキシル基末端の銅を含む50アミノ酸残基の oxidase domain に立体構造の変化が起こり活性を持つとされているが、本例で合成される Cp 蛋白ではこの部を欠き、結果的に銅の取り込みができず酵素活性を欠き、速やかな分解が起こると考えられた。また臨床的には、本例は無 Cp 血症に随伴した神経症状、糖尿病、網膜変性の三徴を示すが、糖尿病の発症がこれまでの報告と異なり早期に発症している。本例を含めこれまでの報告例は Cp を完全に欠損しており糖尿病の早期発症は遺伝子異常の部位による差によるものではなく環境要因と宿主の鉄蓄積に対する反応性の差によるものではないかと考えられた。

[結 論]

無セルロプラスミン血症の新たな家系での遺伝子異常について報告した。すでに報告された2つの遺伝子変異とは異なる新たな変異であった。

論文審査の結果の要旨

1987年に本学神経内科において家族性アポセルロプラスミン欠損症の世界で最初の症例が見出された (H. Miyajima *et al.*, *Neurology* 37: 761-767, 1987)。この患者は当時51歳の女性で、血清の鉄 ($24 \mu\text{g/dl}$, 正常70-150 $\mu\text{g/dl}$)、銅 ($7 \mu\text{g/dl}$, 正常70-160 $\mu\text{g/dl}$)、セルロプラスミン ($<0.6\text{mg/dl}$, 正常17-37 mg/dl) の顕著な低下とフェリチンの著しい上昇 (2100ng/ml , 正常10-90 ng/ml)、肝臓、脳への異常な鉄の蓄積等が認められた。血清にアポセルロプラスミンは全く検出されず、肝臓への銅の蓄積はあるにしても軽度 ($17.3 \mu\text{g/g}$, 正常5.2-13.7 $\mu\text{g/g}$) であった。セルロプラスミン (別名フェロオキシダーゼ I) は血漿中の銅の約95%を結合している銅蛋白質であり、以前からそのフェロオキシダーゼ活性 ($4\text{Fe}^{2+} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$) でもって鉄代謝に関与すると推定されていた。特に、組織から血液への鉄の動員にはこのフェロオキシダーゼ活性による2価鉄の酸化が必須であることが肝臓の灌流実験で示されていた。したがって以上の結果は、家族性アポセルロプラスミン欠損症は先天的なセルロプラスミン遺伝子の異常による二次性鉄蓄積症であり、蓄積した鉄 (特に Fe^{2+}) が関与する機構で生じる酸素ラジカルによる細胞障害が本症の神経症状や糖尿病 (インスリン依存性) の原因であることを示唆した。この研究は、鉄代謝の動態と機構の解明という観点からも、ウイルソン病等別の原因による金属代謝異常症との比較という観点からも極めて重要なものであった。

申請者は、この分野の専門家である米国ワシントン大学小児科の J.D. Gitlin 教授の研究室に半年間留学して本症例のセルロプラスミン遺伝子の解析を行い (参考論文2)、帰国後更に別の家族性アポセルロプラスミン欠損症 (1994年に長崎大学で見出された) の遺伝子解析を行った (主論文)。その結果、前者では19個のエキソンからなるセルロプラスミン遺伝子の第7エキソンへの5塩基の挿入によりフレームシフトが生じて446番目のコドンが終止コドン TAA になっており、後者では第15エキソンの G → A 点突然変異のために本来トリプトファンをコードしていた858番目のコドン TGG が終止コドン TAG になっていることが明らかになった。1046個のアミノ酸残基からなるセルロプラスミンがフェロオキシダーゼ活性を持つためには、C末端50アミノ酸の部分への銅の結合が必要とされている。申請者が解析した2例のアポセルロプラスミン欠損症のいずれにおいてもこの部分を欠く変異アポセルロプラ

スミンが合成されていると演繹された。臨床所見、病理所見、検査成績に加えて、本研究においてセルロプラスミン遺伝子の変異が同定されたことで、アボセルロプラスミン欠損症は常染色体劣性遺伝の鉄代謝異常症と認知されるに至り、鉄代謝におけるセルロプラスミンの不可欠の役割が実証された。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) 組織に蓄積した鉄による細胞障害の機構
- 2) アボセルロプラスミン欠損症における血清フェリチン上昇の機構
- 3) アボセルロプラスミン欠損症では血清中の銅が著しく低下しており、一方組織への銅の蓄積はないことに関連して、摂取した銅の行方、胆汁への銅排泄増加の有無、組織への銅の蓄積が起こらない理由
- 4) 脳への鉄の蓄積の理由。血清蛋白質であるにもかかわらず血液-脳関門を通過して脳でも働いているセルロプラスミンの欠損のためと考えるのか
- 5) Ferrokinetic study において、貧血がある患者での骨髓への鉄の取り込みが正常対照と余り変わらないのは何故か
- 6) セルロプラスミン C 末端領域にある “trinuclear copper cluster” とは具体的にどのような構造を指すのか
- 7) C 末端側の領域を欠く変異アボセルロプラスミンは患者の血清中に検出されるのか、もし細胞内で処理されるとすれば推定される処理機構

これらの質問に対する申請者の応答は適切であり、問題点もよく理解していた。その上、研究そのものは医学的に大きな意義がある新しい知見を得ていると高く評価された。以上により、本論文は博士(医学)の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新

副査 教授 筒 井 祥 博 副査 助教授 龍 浩 志