

ATP7Bに新規変異の同定されたWilson病男性患者の除銅治療の評価 A novel mutation and evaluation of anti copper treatment in a male patient with Wilson disease

野村唯^a、豊田秀徳^b、熊田卓^b、服部亜衣^a、巽康彰^a、林久男^{a, c*}
Yui Nomura, Hidenori Toyoda, Taku Kumada, Ai Hattori,
Yasuaki Tatumi, Hisao Hayashi

^a愛知学院大学 薬学部 薬物治療学講座
*Laboratory of Medicine, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University,
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan*

^b大垣市民病院 消化器内科、
*Department of Gastroenterology, Oogaki Municipal Hospital, Japan.
4-86 Minaminokawa-cho, Oogaki, Gifu 503-8502, Japan*

^cメイトウホスピタル 内科
*Internal Medicine, Meito Hospital
3-1911 Kamiyashiro, Meito-ku, Nagoya 465-0025, Japan*

A 20-year-old male patient with Wilson disease has received penicillamine treatment for 9 years. The second study included gene analysis for copper toxicosis and assessment of anti-copper treatment. The patient was homozygous for a novel mutation of c.3787delG in *ATP7B* gene. Biochemically, liver function was almost normalized except for hypoceruloplasminemia. Liver structures showed macronodular cirrhosis without inflammation. There were compound deposits of copper and iron in hepatocellular dense bodies. Because toxic copper remained in the liver, the patient should be treated with the same regimen for a while. Hypoceruloplasminemia could induce further iron accumulation, which need venesection for this side effect of anti-copper treatment.

Keywords: ATP7B, Wilson disease, copper, mutation

はじめに

Wilson病 (WD) は遺伝性銅代謝異常症の代表的疾患である。第13染色体長腕 (13p14.3) に座位するWilson病遺伝子の異常により肝細胞内銅輸送膜蛋白 (ATP7B) が働かず、肝細胞からの胆汁中への銅排泄が障害される。未治療では小児期より肝に銅が蓄積し、肝障害の進展とともに大脳基底部、角膜、腎などにも銅蓄積を生じる。

臨床的には肝硬変、Kayser-Fleischer (KF) 輪、錐体外路障害、腎障害を主病変・主症状とする。小児期は肝型が多く、思春期以降は神経型が多くなる¹⁾。多彩な臨床像を示すWDにおけるATP7B遺伝子解析はもっとも信頼性の高い診断法である²⁾。また、本症では銅結合蛋白であるセルロプラスミンの合成障害があり、血清セルロプラスミンは低値となる。従って、診断は低セルロプラスミン

Corresponding author.
Hisao Hayashi, MD
Tel: +81 52 757 6778; Fax: +81 52 757 6799
E-mail address: hhayashi@dpc.agu.ac.jp

ン血症、尿中銅排泄過多にてなされるが、肝組織の銅含量の著増も有用である。本症には銅のキレート薬であるペニシラミンや新規薬剤が開発されているため、肝硬変に進展する各種慢性肝疾患のなかでも、治療開始後には予後の改善される重要な病態である。

症例

20歳の男性。初発は11歳で、38.4℃の発熱、白血球；17600/mm³、ヘモグロビン；7.8g/dL、総ビリルビン；12.4mg/dLにて入院となる。血清セロプラスミン2.5mg/dL、神経症状はないがKF輪あり。溶血発作より発症したWDと診断された。

その後、下記の除銅治療を受ける。20歳になり小児科より消化器内科への転科を機に、生検を含めた肝臓の評価と遺伝子学的検討として*ATP7B*の解析について書面による同意が得られた。この遺伝子解析は愛知学院大学薬学部とメイトウホスピタルの倫理委員会の許可を得て行った。

初期治療；ペニシラミン（商品名：メタルカプターゼ）治療が500mg/日より開始された。2週間後に800mgへ増量、現在も800mgで治療継続中である。

最近の血液検査所見；白血球；5500/mm³、ヘモグロビン；14.0g/dL、総ビリルビン；0.4mg/dL、アルブミン；4.9g/dL、AST；30IU/L、ALT；40IU/L、セロプラスミン；3.1mg/dL。

遺伝子解析法

- (1) 患者の全血からgenomic DNAをQIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出したgenomic DNAを吸光度計により濃度を測定し、25ng/μLに調整してPCRに用いるtemplate DNAとした。
- (2) Polymerase Chain Reaction(PCR)
template DNAから*ATP7B*をコードする全21exonと5'側の非翻訳部位を含む1000~9000bpの領域(6領域)に分けて、PCR法にて増幅した(1st PCR)。次に、1st PCRで増幅された各々の領域をさらに200~700bpの領域(21領域)に分け、PCR法にて増幅した。また、templateは1st PCR productsを20倍希釈したものを用いた。なお前述の1st PCRの酵素はKOD FX (TOYOBO) を、2nd PCRの酵素にはPhusion Hot Start II (FINNZYMES) を使用し、PCR装置にはi cycler (BIO RAD)を用いた。
- (3) PCR productsの確認
1st PCR反応液3μLに6×loading dye (TOYOBO) 1μLとTE2μLを加え、ピペッティングを行い、0.7% agarose gelを用いて100V、30分間電気泳動した。2nd PCR反応液5μLに6×loading dye

(TOYOBO) 1μLを加え、ピペッティングを行い、1.5% agarose gelを用いて、100V、30分間電気泳動した。なおagarose gelにはエチジウムブロマイドを最終濃度0.5μg/mLになるように加え、Print graph (UV:312nm) (ATTO) にて増幅されたDNA断片を確認した。2nd PCR productsを25倍希釈したものをtemplate DNAとして以下のSequencingに用いた。

(4) Sequencing

Cycle sequencingはBigDye terminator v3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてPCRを行った。cycle sequencing反応液をAgencourt CleanSEQ (Beckman Coulter) により精製した。精製したsampleを3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でSequence反応を行った。

(5) 遺伝子変異の検索

Sequenceで得たデータを健常人の遺伝子配列と比べ、変異の有無を確認した。

遺伝子解析結果

この患者の*ATP7B*でみられた2つの変異を示す (Fig. 1)。第一の変異であるExon2は1216番目の塩基TがGに変異しており(ホモ接合体)、アミノ酸の406番目のSerine (S) がAlanine (A) に変化する。この変異はaverage heterozygosityが0.483よりSNPsと考えられる(Reference cluster ID:rs1801243)。第二の変異であるExon18は3787番目の塩基Gがdeletionし(ホモ接合体変異)、これにより1263番目のアミノ酸がAlanine (A) からProline (P) にframe shiftし、さらにアミノ酸1329番目にstop codonができて翻訳が途中で終了する。これにより*ATP7B*構造が変化する明らかな疾患起因性の変異であった。他のexon領域については変異がみられなかった。

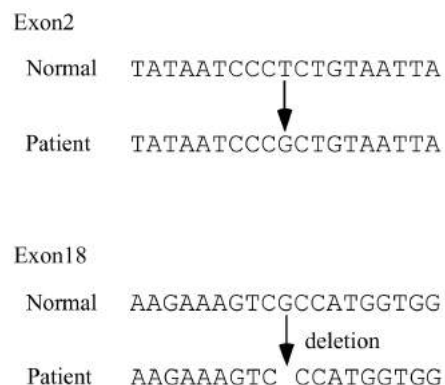


Fig. 1
DNA sequences of normal subject and patient
As indicated by arrows, a deletion was detected in the patient.

肝臓の組織像

肝生検で得られた組織をホルマリン固定して、光学顕微鏡検査用の標本を作製した。

肝細胞が全体に腫大し、細胞核の空胞変性が散見される。肝細胞壊死、炎症細胞浸潤など、実質・間質ともに炎症所見は乏しい。但し、線維染色では門脈域から幅の狭い索状の繊維が伸長し、門脈—門脈結合の像があり (Fig. 2)、粗大結節性の肝硬変を示唆する。銅と鉄染色は陰性である。除銅治療後のWDの肝組織として矛盾しない。

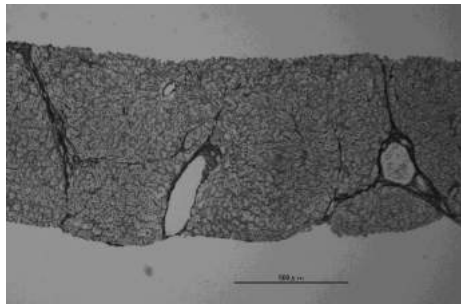


Fig. 2
Light microscopic picture of the liver (Gitter stain)
Fine fibers are extended from portal tracts to parenchymal tissues. Some of them form portal-portal bridging, suggesting macronodular cirrhosis.

肝組織の電子顕微鏡および微小領域元素分析

- (1) 肝組織の一部を電子顕微鏡・微小領域元素分析用に、グルタル液で前固定し、0.1% オスミウム酸で30分の後固定をした。型のごとくエポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成し、つぎに述べる観察に供した。
- (2) 透過電子顕微鏡像
鉛染色標本を透過型電子顕微鏡で観察した。Fig. 3で示すように、肝細胞の配列は不規則で、肝細胞内に多数の顆粒 (lysosomes) が観察される。他の細胞内小器官には形態的变化は見られない。
- (3) 微小領域元素分析

金メッシュに乗せた超薄切片をカーボン補強して元素分析装置を備えた透過型電子顕微鏡で検鏡した。肝細胞内の電子密度の高い顆粒 (lysosomes) に電子を照射し発生するX線を分析したところ銅と鉄の局在が確認された (Fig. 4)。その結果、これらの顆粒の多くに銅や鉄が蓄積していることが推定される。

WDは銅代謝異常症であり、肝臓には大量の銅が蓄積する。この患者はすでに長期の除銅治療を受けており、肝細胞からの銅の排除は進んでいるは

ずである。銅の残存は治療がまだ不十分であることを示唆する。鉄については、生理的所見のほかに、除銅治療の継続による低セルロプラスミン血症のために貯まった可能性が考えられる。

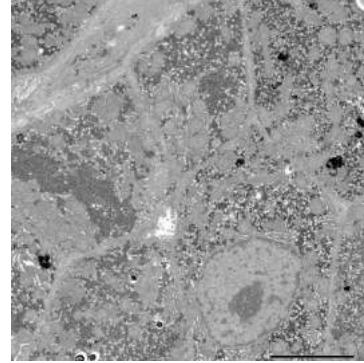


Fig. 3
Electron microscopic picture of the liver stained by uranyl acetate and Pb solution
There are electron dense bodies scattered throughout cytoplasm of hepatocytes. Other organelles other than lysosomes look normal.

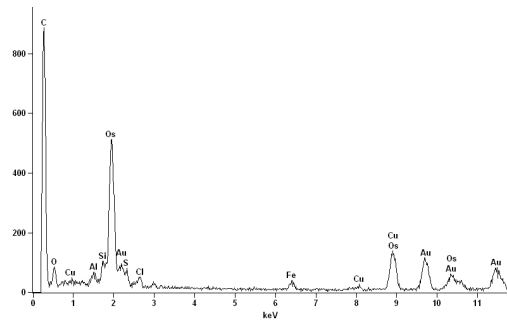


Fig. 4
X-ray microanalysis of hepatocellular dense body
X-ray spectrum after electron exposure to a dense body shows two specific X-rays of Fe and Cu, indicating remained Cu and accumulated Fe in lysosomal system.

考察

この患者のATP7Bのexon18のホモ接合体変異、c.3787delG (p.A1263PfsX1329) は3787番目のGがdeletionするため、1263番目のアミノ酸がAlanine (A) からProline (P) に変化し、さらにアミノ酸1329番目にstop codonができて翻訳が途中で終了する。これによりATP7B構造の変化を伴うことが予測される新規の疾患起因性変異であった⁹⁾。WDの責任遺伝子は世界各地から多数の変異が報告されている。この患者で同定された稀な変異のホモ接合体保有はこの地域特有の変異が血族結婚により生まれたと考えられる。今後の家族調査によりその背景

を明らかにしたい。地域、民族に特有な新規変異は今後とも発見されるであろう。

このWD患者の肝組織で毒性のある銅と鉄の蓄積について光学顕微鏡と電子顕微鏡レベルで差異の見られたのは両者の感度の違いである。肝細胞のライソゾームに銅の残存が確認されたことは、まだ除銅治療が不十分であることを物語る。現在の治療薬ペニシラミンはWDにおける第一選択薬であるため更なる継続が望まれる。Walshにより開発されたペニシラミンは、本剤2分子が血清銅1分子と結合して可溶性のキレートを形成し、尿中排泄を促進する。血清銅濃度の減少に伴い、組織内の銅が血清中に遊離し、脳、肝、腎、角膜等の臓器内から銅が排除される。過剰な銅が体内から排除されたあとも維持治療により食事由来の銅の沈着を防ぐ効果もある。しかし、ペニシラミンは投与中に出現する種々の副作用が問題視されている³⁾。

現在ではペニシラミン以外に、トリエンチン（商品名：メタライト）と酢酸亜鉛（商品名：ノベルジン）が認可されている。トリエンチンは銅イオンと1対1で錯体を形成し、銅の尿中排泄を促す。ペニシラミンに不耐性な患者に対する薬剤として認可された。キレート力はペニシラミンに劣るが、治療開始後の神経障害の一過性増悪の少ない利点があり、神経型に対する第一選択薬であるとの見解もある。一方、酢酸亜鉛は腸管上皮に吸収されるとその亜鉛元素がメタロチオネインを誘導する。食物より吸収された銅はメタロチオネインと結合して腸上皮細胞に留まり、細胞の剥離脱落により糞便に排泄される。その結果、腸管レベルで銅の体内流入を阻害する。この薬剤は銅の吸収を抑制するが、体内銅を積極的に排泄させる能力はないので、維持治療期の治療薬の一つである³⁾。

軽度の鉄の蓄積は生理的な側面もあるが、除銅治療に伴う低セルロプラスミン血症により誘導された可能性もある。体内貯蔵鉄は血清フェリチン値に反映されるので、これを経時的に測定する。鉄過剰症に至ってもキレート薬を中止する必要はなく、瀉血で対応可能である⁴⁾。

まとめ

ペニシラミン治療中のWD男性患者を再評価する機会を得た。本症の責任遺伝子である*ATP7B*の解析から、新規遺伝子変異3787delGのホモ接合体保有者であることを明らかにした。患者の肝機能は除銅治療早期より正常化し、肝組織像からも炎症は完全に消退しており、治療によく反応していた。しかし、銅はまだ残存していたので初期治療の継続が求められる。男性患者ではキレート薬による除銅治療中に低セルロプラスミン血症に続発する鉄蓄積が発生しやすいので注意が必要である。

引用文献

1. 青木継稔, Wilson病の病態生理と臨床—分子病態、臨床像、診断および治療. 医学のあゆみ 216 :808-814 (2006).
2. 清水教一, わが国におけるWilson病の遺伝子異常と遺伝子診断. 医学のあゆみ 216:803-807 (2006).
3. 林 久男, 鈴木理恵, 涌澤伸哉, ウイルソン病とその薬物治療. YAKUGAKU ZASSHI 124:711-724 (2004).
4. Shiono Y, Wakusawa S, Hayashi H, Takikawa T, Yano M, Okada T, Mabuchi H, Kono S, Miyajima H. Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. Am J Gastroenterol 96:3147-3151 (2001).
5. Tatsumi Y, Hattori A, Hayashi H, Ikoma J, Kaito M, Imoto M, Wakusawa S, Yano M, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Okada T, Kaneko S. Current state of Wilson disease patients in central Japan. Intern Med 49:809-815 (2010).