

論文要旨

Genetic analysis of the ferrochelatase gene in eight Japanese patients from seven families with erythropoietic protoporphyria

〔 骨髄性プロトポルフィリン症の日本人7家系
8症例におけるフェロケラターゼ遺伝子の解析 〕

猿渡 浩

【序論および目的】

骨髄性プロトポルフィリン症 (EPP) は日光過敏や肝機能障害を特徴とする常染色体優性遺伝疾患で, フェロケラターゼ (FECH) 遺伝子の先天性異常によりヘム合成酵素であるフェロケラターゼ活性が欠損あるいは低下し, プロトポルフィリンがヘムに変換されず生体内, 主に骨髄で赤血球中に蓄積し, 関連する部位での障害を引き起こす. これまで 90 種以上の遺伝子変異が報告されているが, 本邦では遺伝子レベルでの報告はわずか6例にとどまっている.

今回我々は, 当施設で経験したEPPの7家系8症例について遺伝子検索を行うと同時に, 酵素活性に影響を及ぼすとされるイントロンの一塩基多型 (SNP), IVS3-48 (intron3 の 3' 末端から 48 番目に存在する SNP) について日本人正常コントロール 152 例を調査した.

【材料および方法】

臨床所見と赤血球中プロトポルフィリン値からEPPと診断された非血縁7家系のEPP患者8名 (親子2名含む) とそのリンパ球を研究対象とした. リンパ球から抽出した全 mRNA より cDNA を作成した後, PCR 法にて FECH cDNA を増幅しアガロースゲル電気泳動によりサイズを確認した. また Genomic DNA を抽出し, PCR 法にて特定部位を増幅し塩基配列を決定した. さらに IVS3-48SNP を患者8例と正常コントロール 152 人について解析した. SNP は正常配列は認識せず変異のある配列のみを認識する制限酵素を用いて DNA を切断し, 断片の泳動パターンによって変異の有無を解析した.

【結果】

EPP患者8名の遺伝子解析の結果、2種類の遺伝子異常が確認された。一つはintron9の5'末端の塩基のG→Aの変異で、直前のexon9が完全に欠損していた。もう一つはintron4の3'末端から4番目の塩基がA→Gに変異しており、intron4とexon5の間に”TAG”の3塩基が挿入されていた。いずれの変異も既に報告されているパターンであった。また一例は3カ所のSNPのみで、有意な変異は見出せなかった。

IVS4-48SNPのパターンはT/T, T/C, C/Cの3種類で、症例は8例全てC/Cであった。また正常コントロール152人中103人、67.8%がT/Cであった。

【結論及び考察】

EPP患者8例のFECH遺伝子において、intron9の5'末端におけるG→A (IVS9-1G-to-A)とintron4の3'末端から4番目のA→G (IVS4-(-)4A-to-G)、2種類の変異を見出した。前者ではexon9が完全に欠損しており、これはIVS9-1G-to-Aによりスプライスの異常が生じたためと考えられた。後者ではexon5の5'末端にフレームシフトを伴わない3塩基挿入がみられた。

5家系6人の患者でIVS9-1G-to-Aの変異がみられた。同じ変異は日本人の16家系中6例で報告されている。我々の症例6例は鹿児島県出身で、過去の報告例は隣県宮崎出身であった。この地理的分布から、これらの家系は共通の祖先に由来する可能性が考えられた。

EPPは常染色体優性遺伝の遺伝形式であるが、多くのキャリアでFECH活性は50%以下で、上記の遺伝子変異以外の要素の存在が考えられる。その一つとしてスプライス異常の原因となるIVS3-48T-to-Cの一塩基多型が報告されており、Cアリルを有するものは正常のTアリルを有するものより活性が低くなることが示されている。本研究では、EPP患者8例では全例がC/Cのhomozygoteで、健常人コントロール152例では67.8%でC/T heterozygoteであった。この頻度はフランス人における11%という報告と比べて極めて高率で、日光過敏を有する日本人ではEPPの精査が重要であると考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 653 号	氏名	猿渡 浩
審査委員	主査	河野 嘉文	
	副査	坪内 博仁	出雲 周二

Genetic analysis of the ferrochelatase gene in eight Japanese patients from seven families with erythropoietic protoporphyria

〔 骨髄性プロトポルフィリン症の日本人7家系
8症例におけるフェロケラターゼ遺伝子の解析 〕

骨髄性プロトポルフィリン症 (EPP) はフェロケラターゼ (FECH) 遺伝子の先天的異常によりヘム合成酵素であるフェロケラターゼ活性が低下し、プロトポルフィリンがヘムに変換されず生体内に蓄積し、日光過敏や肝機能障害などの症状を呈する常染色体優性遺伝疾患である。本論文は、EPP の7家系 8 症例について遺伝子検索を行うと同時に、酵素活性に影響を及ぼすとされるイントロンの一塩基多型 (SNP)、IVS3-48 (intron3 の 3' 末端から 48 番目に存在する T → C の SNP) について日本人正常コントロール 152 例を調査し、新知見を報告したものである。

臨床所見と赤血球中プロトポルフィリン値から EPP と診断された非血縁 7 家系の EPP 患者 8 名 (親子 2 名含む) を対象とした。リンパ球から抽出した cDNA および genomic DNA の特定部分を PCR 法にて増幅し、制限酵素にて変異の有無をスクリーニングし、遺伝子配列をダイレクトシーケンス法で解析した。IVS3-48 の解析は患者 8 例と健常人コントロール 152 人を対象として、同様に制限酵素を用いて変異の有無を解析した。

EPP 患者 8 名の遺伝子解析の結果、2 種類の遺伝子異常が確認された。一つは intron9 の末端の塩基の G → A の変異で、これにより直前の exon9 が完全に欠損していた。もう一つは intron4 の 3' 末端から 4 番目の塩基の A → G の変異で、この結果 intron4 と exon5 の間に "TAG" の 3 塩基が挿入されていた。いずれの変異も既に報告されているものであった。また一例では 3 カ所の SNP がみられるのみで、有意な変異は検出されなかった。IVS3-48 は患者全 8 例で C/C homozygote であった。また正常コントロール 152 人の IVS3-48 のアリル構成は T/T, T/C, C/C の 3 種類で、67.8% が変異 C アリルを有していた。

上記のように本論文では、EPP 患者 8 例のフェロケラターゼ遺伝子において 2 種類の変異を同定している。また IVS3-48 に C アリルを有している頻度は 67.8% であったと報告した。これはフランス人における約 11% という報告と比べて極めて高率で、IVS3-48 T → C SNP はフェロケラターゼ酵素活性に影響を及ぼすとの過去の報告と併せて、日光過敏を有する日本人においては EPP を考えた精査が重要であると考察している。

以上のように多くの症例を遺伝子レベルで正確に解析しており、また酵素活性に影響を及ぼす SNP の保有率が高かったことから、日本人における潜在的な EPP の存在を示唆している。これらの知見は臨床上極めて重要なもので、本論文は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 653 号	氏名	猿渡 浩
審査委員	主査	河野 嘉文	
	副査	坪内 博仁	出雲 周二
<p>主査および副査の3名は、平成19年1月29日、学位申請者 猿渡 浩君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1： 臨床症状としては小児期に発症する日光過敏のようだが、なぜ痛みを伴うのか。 回答： 蓄積したポルフィリン体に光が当たることにより活性酸素などが発生するため、血管やその周囲の組織を強く損傷するためである。</p> <p>質問 2： 特に痛覚神経を刺激するような物質が発生することはないのか。 回答： これまでのところそのような研究結果は報告されていない。</p> <p>質問 3： 小児期のうちに発見され診断がつく例は多いのか。 回答： 小児期(3~4歳頃)に日光過敏に気付かれるが、成人になって初めて受診する例も多い。</p> <p>質問 4： Intron 上のポイントミューテーションでなぜ exon が欠落するのか。 回答： スプライシングの際、small nuclear ribonucleo protein(snRNP)などの蛋白が intron の両端など特定の部位に結合することにより、exon が認識される。従って intron の両端などに変異が存在すると snRNP などの蛋白が正しい部位に結合できず、それに関連する exon が認識されないままスプライシングが進み特定の exon が欠落する。</p> <p>質問 5： “TAG”の3塩基が挿入されていた症例であるが、その挿入により実際に酵素活性の低下があったのか。 回答： この症例では酵素活性を直接測定していない。しかしプロトポルフィリン値が実際に上昇していることから、それを触媒する酵素すなわちフェロケラターゼの活性が低下していることが示唆される。</p> <p>質問 6： Homozygote の変異を持つ Pt. 4 であるが、症状が重篤であったり発症が非常に早かったなどの臨床的な特徴はあったのか。 回答： 肝機能障害はなかったが、唯一小児期のうちに受診している症例であり、早くから日光過敏の症状が強く出ている。</p> <p>質問 7： 劇症肝炎など致死的な肝障害を伴う例もあるが、この症例の中で肝障害のある症例の肝障害の程度はどうか。 回答： 検査上、肝障害を示す所見があり消化器内科で経過観察されているが、今のところ日常生活を送っている。</p> <p>質問 8： EPP における致死的な肝障害にはフェロケラターゼ遺伝子のプロモーター領域のメチル化が関与しているとの論文があるが、この点は検討したか。 回答： 今回は検討していない。今後の研究の参考にさせていただきたい。</p>			

質問 9: フェロケラターゼの活性はどのように測定したのか。

回答: フェロケラターゼを研究している施設に依頼した。

質問 10: SNP が酵素活性に影響していることを証明した研究はあるのか。

回答: 変異なし・ヘテロ変異・ホモ変異で酵素活性に差があることをフランスの施設が報告している。

質問 11: 同じ変異が鹿児島・宮崎から多く出ているが、この近辺が多いというようなことは一般に言われているか。

回答: 日本の各県毎の EPP 症例数をまとめた論文があるが、特に地域差は出ていなかった。

質問 12: 多くの変異が報告されているが、変異の種類によって赤血球中あるいは血漿中のプロトポルフィリン値における特徴はあるのか。

回答: 現時点では変異の種類とプロトポルフィリン値の関係をまとめた論文は見受けられない。

質問 13: 皮膚においては活性酸素による組織障害は考えやすいが、(光の届かない)肝臓での障害はどのようなメカニズムか?

回答: 単なる蓄積による障害も予想されるが、肝臓における詳細は調査していない。

質問 14: 活性酸素が組織障害を起こしているのであれば、抗酸化剤などで予防は可能か。

回答: 皮膚においては遮光という最も簡便で確実な予防法があるので、それ以外の方法は現実にはされていない。

質問 15: 予防薬としてβカロテンなどがあるようだが今回の症例では使用していたか。

回答: 全例、遮光のみで対処できており、βカロテンなどは使用していない。

質問 16: フェロケラターゼの活性が全くないという症例はあるのか。

回答: そのような症例報告は今のところ報告されていない。

質問 17: ヘム合成経路に異常があるのであれば、ヘムが低下し、ヘモグロビンも低くなるのか。

回答: 貧血を呈した症例はなかった。

質問 18: 日常生活で遮光以外には何か指導をしているか。

回答: 肝機能障害を見逃さないために、症状の観察や定期的な血液検査を勧めている。

質問 19: IVS3-48SNP の調査対象はどういう人か。

回答: 遺伝子検索の承諾を得られた健常人ボランティアを対象とした。

質問 20: IVS3-48SNP は鹿児島では多いのか。

回答: 当科のデータよりも低い割合の報告もあるが、東北地方からの報告でほぼ同等の結果があり、特に鹿児島が高いとは考えていない。

質問 21: 酵素活性はどの程度低下すると臨床症状が発現するのか。

回答: 具体的な数字は示されていないが、少なくとも 50%程度までは発症しない。

以上の結果から、3名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。