



74

---

日本人A P R T欠損症の病因配列を標的とした  
遺伝子診断法とスクリーニング法の開発

---

研究課題番号 02454513

平成<sup>3</sup>~~2~~年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

平成4年5月



研究代表者 鎌谷直之

(東京女子医科大学・医学部) 痛風センター

日本人APRT欠損症の病因配列を標的とした遺伝子診断法と  
スクリーニング法の開発

目次

はしがき

I	研究組織、経費 .....	1
II	研究成果 .....	2
III	発表論文リスト .....	8
IV	論文別冊 .....	11

## はしがき

遺伝病、なかでも内科領域の遺伝病は本研究グループの長年のテーマであり、これまでも同じ分野でいくつかの重要な成果をあげてきた。なかでも adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 欠損症に関しては日本人に特有のタイプの存在を明らかにし、ホモ接合体の確実な診断法を開発発表した。それを基礎に、多くの APRT 欠損症患者を診断し、世界全発表例の過半数は我々の診断したものである。しかし、ヘテロ接合体の確実な診断法が未だ開発されていなかったことが問題であった。さらに、最近の医学の動向を考慮すると、本新患に遺伝子診断法を導入し実用化することは重要なことである。

もともと、本疾患の研究については我々は世界でも最先端を走っていると自負していたが、今回研究費の助成を基にした研究の成果により、知識と理解は格段に深まった。これまでネックであった上記の2つの問題点が解決され、本疾患のどのような診断依頼にも応じられるようになった。

なお本研究の一部は、いくつかの他の研究グループとの共同研究による成果である。それについては、発表論文リストによりご参照いただきたい。

また、研究分担者として記されていないが、大塚早苗氏の注意深い実験なしには本研究は全く不可能であったことを書き記しておきたい。さらに、当センターの柏崎禎夫所長のあたたかい励ましと御支持、他の職員、並びに本学の御助力に深く感謝します。

平成4年5月

鎌谷直之

## I. 研究組織、経費

### 1. 研究組織

研究代表者：鎌谷直之（東京女子医科大学医学部・助教授）

研究分担者：山中 寿（東京女子医科大学医学部・講師）

箱田雅之（東京女子医科大学医学部・助手）

### 2. 研究経費

平成2年度 3,500,000

平成3年度 3,200,000

## II. 研究成果

### a. はじめに

遺伝病は医学において重要な疾患である。しかし、特に本邦ではこれまで遺伝病はあまり重視されてこなかった。その一つの理由は日本人には注目をひく遺伝病がなかったからである。例えば欧米人ではコーカソイドには嚢胞性線維症という極めて重要視されている遺伝病がある。アルファー1-アンチトリプシン欠損症、medium chain acyl-CoA dehydrogenase欠損症も同様である。ユダヤ人においてはTay-Sachs病、Niemann-Pick病、Gauscher病が重視されている。黒人その他の熱帯、亜熱帯の住民ではヘモグロビンに関する遺伝病（サラセミアやヘモグロビン異常症）が重要な疾患である。これらの疾患が重視されている理由はその頻度が特定の集団において極めて高いためである。日本人にはそのような頻度の高い遺伝病が知られていなかった。本研究の結果、Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 欠損症が日本人において頻度の高い疾患であることがわかった。

本研究の目的はAPRT欠損症の遺伝子診断法とスクリーニング法の開発であった。その目的はほぼ100%達成された。その内容については以下に解説したい。

さらに、本目的を追究する課程でいくつかの極めて重要な発見と方法の開発があった。APRT欠損症のヘテロ接合体のスクリーニング法を体細胞突然変異を利用するという、独創的な方法で解決した。その結果、遺伝疾患診断の新しい方法が開発されただけでなく、体細胞突然変異の頻度やメカニズムに関して重要な発見がなされた。

### b. 本研究を始めるまでの知識

我々がかねてより日本人の2,8-dihydroxyadenine (DHA) 尿路結石症の多くがAPRT酵素活性が部分的に欠損していることから、その診断法

開発のためにT細胞法を開発し、診断を進めてきた。

APRT欠損症とはプリン代謝の酵素であるadenine phosphoribosyltransferase (APRT)をコードしている遺伝子座のgermline突然変異により、APRT酵素が体内で欠損になった状態を言う。それにより2,8-dihydroxyadenine (DHA)の結晶尿をきたし、DHA尿路結石や、腎不全症を合併する。腎發育不全や、頻発する尿路感染症、間質性腎炎などの合併も報告されている。

ホモ接合体であっても無症状の例がある（無症候性APRT欠損症）。しかし、無症候性であっても尿中にはDHA結晶が絶えず排泄されていることが多い。発見される症例のほとんどは尿路結石の症状（疝痛、血尿、尿閉など）を間欠的に繰り返す（間欠期）。重症の例では慢性腎不全にいたり、生命の維持には透析療法等を必要とする（慢性腎不全期）。

APRT遺伝子座は第16染色体の長腕にあるのでAPRT欠損症は常染色体性の遺伝形式を取る。APRT欠損症は表現型から2型に分類されている。タイプIはホモ接合体であり、APRT完全欠損症である。タイプIIはホモ接合体であり、部分欠損症である。以前は部分欠損症で症状を来たす例（タイプII）はタイプIのヘテロ接合体と考えられたが、その後の研究によりタイプIIはタイプIとは異なった種類の対立遺伝子を持っていることがわかっている。タイプIIは日本人のみに報告されており（日本人全患者の約75%）、タイプIは日本人、ヨーロッパ人、アラブ人、米国黒人に報告されている。通常遺伝学では同じ遺伝子座の2つの対立遺伝子が同じものであるときをホモ接合体、異なったものであるときをヘテロ接合体と言っているが、ここでは2つの対立遺伝子のどちらも病因遺伝子であるときをホモ接合体、片方が病因遺伝子で、もう片方は正常の遺伝子であるときをヘテロ接合体ということにする。なぜなら臨床的立場からはこのような定義のホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別が最も大切であるからである（臨床症状を来たすか否かに関

係するから)。

常染色体性劣性遺伝の場合、一人の患者は2つの病因対立遺伝子を持ち、さらにそれぞれの対立遺伝子のヘテロ接合体も存在するのでそれらの判別は複雑である。タイプI、IIのような表現型からの分類では本質を完全に理解することは難しい。むしろ病因対立遺伝子を分類し、病因対立遺伝子の組み合わせによって現される遺伝子型と表現型との対応を考えたほうがよい。2種類の病因対立遺伝子 $APRT^*J$ 、 $APRT^*Q0$ が存在し、その組み合わせの違いにより遺伝子型の違いが説明でき、それと表現型との対応が説明できる。この分類は後述する診断法にも関係する。 $APRT^*J$ 対立遺伝子は日本人のみに存在が報告されており、 $APRT^*Q0$ 対立遺伝子は各集団に報告されている。 $APRT^*J/APRT^*J$ 、 $APRT^*Q0/APRT^*Q0$ 、という単純なホモ接合体のほかに $APRT^*J/APRT^*Q0$ という遺伝子型(compound heterozygote)の存在も確認されている。

分子生物学的研究により $APRT^*J$ 対立遺伝子は、日本人の $APRT$ 病因遺伝子の68%を占め、単一の塩基置換(コドン136のATGからACGへのミスセンス突然変異)を持つ。ハプロタイプの分析によりこの塩基置換を持つ病因遺伝子は全て極めて古い、単一のgermline突然変異に由来すると考えられている。

症例は、我が国からの報告が圧倒的に多い。日本以外ではヨーロッパを中心に約36人の報告があるが、一か国からの報告は10家系に満たない。我々が診断依頼を受けたものだけでも $APRT$ 欠損症のホモ接合体と診断されたのは73家系、90人である。これ以外にも本邦から発表されているホモ接合体が28家系、30人あり、更に $APRT$ 欠損症は確実ではないが、DHA結石だけの報告が少なくとも7家系ある。従って、本邦では合計少なくとも101家系、120人の $APRT$ 欠損症のホモ接合体が発表されており、DHA結石のみの発表を加えると更に多い数となる。上記のデータから世界では156人の $APRT$ 欠損のホモ接合体が発表され

ており、その内120人（約77%）は日本人である。

日本人の場合DHA結石症の多くの患者のAPRT活性はゼロではない。これは、前述のようにAPRT\*Jが存在するからである。APRT\*Q0を持つヘテロ接合体はAPRT\*Jのホモ接合体と同じくらいのAPRT活性を示すが、前者は発症せず、後者は発症する。従って、日本人の場合酵素活性を測定するだけではAPRT欠損症を正しく診断することはできない。確実なホモ接合体の診断法はT細胞法による末梢血T細胞のアデニン類似体への感受性試験である。即ち、末梢血より単核細胞を分離しPHAとIL-2の存在下で増殖させる。これに6-methylpurine (1  $\mu$ Mくらい)、2,6-diaminopurine (10  $\mu$ Mくらい)などのアデニン類似体を入れ、細胞が死んでしまえば正常またはヘテロ接合体、死なずに増殖すればホモ接合体と診断する。次に赤血球溶血液のAPRT活性を調べ完全欠損症であればタイプI、ホモ接合体であるにもかかわらず完全欠損症でないならばタイプIIと診断する。酵素活性のレベルでの診断は信頼できない。

### c. ヘテロ接合体の確実な診断法の開発

上記のような事がこれまでの研究でわかっていた。我々が平成2-3年度に行なった研究によって明らかになった成果を以下に記す。そのほとんどは既に論文として発表されているので、詳細は論文を直接参照して欲しい。論文のリストは本冊子に別に掲げてある。この項では要点のみを記す。

最大の成果の一つはAPRT欠損症のヘテロ接合体が確実に診断できるようになったことである（発表論文リスト6）。それまでは家系図と酵素活性からおおよその予想はたつが、確実な診断はできなかった。箱田を中心とした研究により、ヘテロ接合体を確実に診断する方法として体細胞突然変異法が開発された。このユニークな方法は、体細胞突然変異がAPRT遺伝子座に起きて欠損となったT細胞をクローニング



するのである。通常ヘテロ接合体の細胞は正常の対立遺伝子を持つため表現型としては正常である。しかし、まれに体内で正常の対立遺伝子に体細胞突然変異が起きヘテロ接合体の体細胞がホモ接合体の体細胞のようになる。このように突然変異を起こした体細胞は2,6-diaminopurineでクローニングできる。箱田他はこのような突然変異細胞がAPRTのヘテロ接合体体内には $10^{-4}$ 程度という驚くべき高頻度で検出されることを見いだした（発表論文リスト6）。これらの変異細胞のAPRT遺伝子には確かにDNAの変化があるので、体細胞突然変異によることは疑いがない。正常人432人の血液中の約30億個の細胞中にはわずか2個しか見いだせなかったため、正常とヘテロ接合体を誤診することはありえない。

もともと癌細胞の癌遺伝子、癌抑制遺伝子、B細胞の免疫グロブリン遺伝子には体細胞突然変異が起きていることが知られていたが、このように一般の細胞の常染色体遺伝子座でも、高頻度に体細胞突然変異が起きていることが示され、それが遺伝疾患の保因者の診断に応用できることが初めて証明された。

#### d. 突然変異遺伝子の分析

APRT\*J対立遺伝子については上記のように突然変異がわかっていた。APRT\*QO対立遺伝子はいくつかの異なったgermline突然変異に由来することがわかった。ほとんどはコドン98のTGGからTGAへのナンセンス突然変異（発表論文リスト5）、及びexon 3の4塩基の挿入（発表論文リスト9）である。APRT\*QO対立遺伝子の突然変異の種類も限られており、約96%の病因対立遺伝子はわずか3つの突然変異により説明される（発表論文リスト9）。

#### e. ヘテロ接合体頻度の測定

ヘテロ接合体頻度は、酵素活性の測定によっても推定されている。

しかし、タイプIIのヘテロ接合体は酵素活性測定では検出できないため、上記の体細胞突然変異法によってもヘテロ接合体のスクリーニングが実施されている（発表論文リスト6）。いずれもサンプル数は必ずしも十分とはいえないが、上述のヘテロ接合体頻度1.2%はこれらの方法によっても妥当な値であるといえる。

#### f. 遺伝子診断法の開発

上記のように日本人のAPRT欠損症の対立遺伝子の約96%はわずか3つの突然変異により説明できるので、これを用いた遺伝子診断法を開発し実用に供した（発表論文リスト7, 6）。しかし、ここで強調したいのは、ホモ接合体診断（即ち被験者が症状を来たしうるかどうか、あるいは治療の対象となるかどうか）に最も信頼できるのはT細胞法であるということである。

### III. 発表論文リスト

1. Hakoda, M., Nishioka, K. and Kamatani, N. Homozygous Deficiency at an autosomal locus *aprt* in somatic cells in vivo Induced by two different (germinal-somatic and somatic-somatic) mechanisms. *Cancer Res.* 50, 1738-1741, 1990
2. Kamatani, N., Kuroshima, S., Yamanaka, H., Nakashe, S., Take, H. and Hakoda, M. Identification of a compound heterozygote for adenine phosphoribosyltransferase deficiency (*APRT\*J/APRT\*Q0*) leading to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. *Hum. Genet.* 85, 505-509, 1990
3. Kamatani, N., Kuroshima, S., Hakoda, M., Palella, T.D. and Hidaka, Y. Crossovers within a short DNA sequence indicate a long evolutionary history of *APRT\*J* mutation. *Hum. Genet.* 85, 600-604, 1990.
4. Ishidate, T., Igarashi, S. and Kamatani, N. Pseudodominant transmission of an autosomal recessive disease, adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Pediatr.* 118, 90-91, 1991
5. Mimori, A., Hidaka, Y., Wu, V.C., Tarle, S.A., Kamatani, N., Kelley, W.N., and Palella, T.D. A mutant allele common to the type I adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japanese subjects. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 102-107, 1991
6. Hakoda, M., Yamanaka, H., Kamatani, N. and Kamatani, N. Diagnosis of heterozygous states for adenine phosphoribosyltransferase deficiency based on detection of in vivo somatic mutants in blood T cells: Application to screening of heterozygotes. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 522-562, 1991

7. Kawaguchi, R., Higashimoto, H., Hikiji, K., Hakoda, M., and Kamatani, N. Detection of the most common mutation of adenine phosphoribosyltransferase deficiency among Japanese by a non-radioactive method. *Clin. Chim. Acta* 203, 183-190, 1991
8. Hakoda, M., Kamatani, N., Ohtsuka, S. and Kashiwazaki, S. Germline and somatic mutations leading to adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII. Part B: Structural Biochemistry, Pathogenesis, and Metabolism.* (Harkness, R.A., Elion, G.B. and Zöllner, N. eds.) Prentice-Hall, New York, 1991 pp87-90
9. Kamatani, N., Hakoda, M., Otsuka, S., Yoshikawa, H. and Kashiwazaki, S. Only three mutations account for almost all defective alleles causing adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japanese patients. *J. Clin. Invest.* in press.