

42

日本人に広く分布する疾患遺伝子の頻度測定と、
他人種における広がりに関する研究

研究課題番号 63480196

平成元年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

平成 2 年 5 月



研究代表者 鎌谷直之
(東京女子医科大学リウマチ痛風センター)

日本人に広く分布する疾患遺伝子の頻度測定と、
他人種における広がりに関する研究

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	10
IV 論文別冊	11

は し が き

遺伝病、なかでも成人が関係するプリン代謝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上げてきた。最近になり、本研究で関係する adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 欠損症にテーマを絞ってきたが、その理由は本疾患が単にもう一つの病気という以上の意味を持つからである。ARPT 欠損症が特に日本人に多く、他の人種では極めて報告が少ないという事実がその意味を象徴的に示している。この特殊性を説明する仮説は2つある。一つは、本当に日本人で頻度が高いということであるが、さらにもう一つの仮説として、この疾患については日本で医学が最も進んでいるという可能性もある。もし前者の可能性が正しければ、その理由を解明することは医学上のみならず、生物学的にも極めて重要なことである。もし後者の可能性が正しければ、研究を進めることにより他の国の人々の健康と幸福に貢献できる。

我々はこの疾患の研究について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もとにした研究の成果により、知識と理解は格段に深まった。本報告書によりその成果の内容を報告したい。

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の部分もある。それについては発表論文リストにより御参照いただきたい。

また、研究分担者として記されていないが、黒島祥子氏の忍耐と注意力を兼ね備えた、たぐい稀な実験遂行能力なくしてはこの研究の進行は全く不可能であつたらう事を書き記しておきたい。さらに、当センターの他の職員、並びに本学のあたたかい励ましと御支持がなければ、やはり本研究は実現不可能であつた。ここに感謝の意を表したい。

平成2年4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（同 上 ・助手）

箱田雅之（同 上 ・助手）

河井和夫（同 上 ・助手）

2. 研究経費

昭和63年度 3,200千円

平成元年度 2,800千円

Ⅱ. 研 究 成 果

a. はじめに

本研究の課題は、APRT欠損症の疾患遺伝子の頻度を測定することであったが、それは日本人におけるAPRT欠損症の特殊性の原因を解明するための一連の研究の一環として掲げたものであった。本研究の進行と共に、思わぬ重大な成果がいくつもあり、研究の途上で、その到達目標点を当初のものよりはるかに上に設定せざるを得なかったのは、嬉しい誤算であった。従って、頻度測定の方法も開発し、実際に行なうこともできたが、それ以上に予期せぬ事実を見だし発表した。中でも、1. 遺伝子の解析により APRT*J の変異が起きた時期を推定できた（13万年と計算された）事は、その方法の独創性の点でも重要であるのみならず、常識を打ち破る成果である（manuscript submitted for publication）。さらに、2. 我々のこれまでの研究では同定できなかった APRT*J/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ患者を初めて同定しえた（発表論文リスト7）。この成果は、APRT欠損症の全体を表す遺伝子型の表を遂に完成に導いた点で重要である。3. APRT欠損症のヘテロ接合体の体内に、ホモ接合となった体細胞が多数存在すること、さらに、正常人の体内にさえホモ接合となった体細胞が極めて稀ながら存在し、しかもそれがヘテロ接合体の確実な診断法になることを発見した（発表論文リスト6）。この最後の成果は体細胞遺伝学的にも大きな発見である。

このように、上記の成果は、いずれをとっても医学上、患者や保因者の診断法として重要であるばかりか、生物学的にも極めて大きな意味を持つ。

b. 本研究を始めるまでの知識

本論にはいる前に、これまで我々の得た成果を簡単に説明せねばならない。我々は欧米人の2,8-dihydroxyadenine（DHA）尿路結石症患者がすべてAPRT完全欠損症であるのに比較して、日本人の同症患者の多くはホモ接合体であるにもかかわらず、部分欠損症である事を見だし、これを日本人型APRT

欠損症と呼んだ。

このような日本人型 APRT 欠損症は部分欠損なので、当然のことながら赤血球の酵素活性を測るだけではホモ接合体かどうか分からない。これは、正常人の酵素活性でも大きくバラつくうえに、完全欠損症のヘテロ接合体もこれと変わらない酵素活性を示すからである。まず、この日本人型 APRT 欠損症のホモ接合体を正しく診断することが大切だと考え、T細胞法による診断法を確立した。これは、被験者の末梢血よりT細胞を得、これを PHA と interleukin 2 で培養した後に 6-methylpurine または 2,6-diaminopurine に対する感受性を見る方法である。これらの薬剤は adenine の類似体であり、APRT が機能しているときのみに細胞毒となる。ポイントはこの検査が生きた細胞における APRT 酵素の function を見る点であり、試験管内の酵素活性を測るのではないということである。この方法を用いると、完全欠損症であろうが、日本人型酵素欠損症であろうがホモ接合体とその他を完全に区別できる。そして、ホモ接合体のみが DHA 結石症を起こすということを間違いなく証明できるのである。

そこで、日本人型酵素欠損症はなぜ酵素活性はあるのに、細胞内で酵素が機能しないのであろうかという疑問に突き当たる。そこで、この酵素を部分精製して調べた結果、PRPP に対する親和性が極めて低いことがわかった。そして、日本人型 APRT 欠損症で合成される変異酵素は、試験管内の酵素活性測定で用いられる高濃度の PRPP の存在下では十分反応が起こるが、正常細胞内での極めて低い PRPP 濃度では反応が起こらない。

そこで我々は色々の証拠から、1985年、表1の遺伝子型を提案した。それによれば、ほとんどすべての APRT 対立遺伝子は、3つのタイプに分けられる。即ち、APRT*1、APRT*J、APRT*Q0 である。それぞれ、正常、日本人型欠損症、完全欠損症に関係した対立遺伝子でありその3つから繰り返しを許して2つを取る組み合わせの種類は表1のように、6通りになる。そして、この遺伝子型によって細胞がアデニン類似体に対して感受性か抵抗性か、また DHA 尿路結石症にかかるか否かが決定されるという仮説である。

この仮説は現在完全に証明されており、ただ本研究開始以前には APRT*J/APRT*Q0 のみが同定されていなかった。本研究により、この遺伝子型を持つ個体が間違いなく同定され（発表論文リスト7）、表は完成した。

遺 伝 子 型	疾患の有無	
<u>APRT*Q0/APRT*Q0</u>	(+)	
<u>APRT*1/APRT*Q0</u>	(-)	
<u>APRT*J/APRT*J</u>	(+)	
(<u>APRT*J/APRT*Q0</u>)	(+)	この遺伝子型の存在が今回証明された。
<u>APRT*1/APRT*J</u>	(-)	
<u>APRT*1/APRT*1</u>	(-)	

診断法の開発と、遺伝子型の確定法の確立により、多くの検体が診断依頼の目的で我々のもとに寄せられた。我々は分子生物学的方法によりAPRT*Jの突然変異配列を同定することを試みた。Michigan 大学Hidaka 他との共同研究でAPRT*Jに codon 136 の ATG to ACGの置換が見いだされ、これに見合った Met to Thr のアミノ酸置換が我々によって確認された。ここは、PRPPを基質、又は産物とする多くの酵素に共通に見られる類似配列であり、PRPP結合部位と考えられる。その中でアミノ酸置換があることにより、PRPPに対してくっつきにくい変異酵素がつくられるとおもわれる。

しかし、不思議なことは日本人患者の約80%に見られるAPRT*J 対立遺伝子すべてにこの同じ変異が見られることである。我々は、この理由を、共通祖先遺伝子説に求めた。APRT*Jのすべてが単一の突然変異をもとに起こったと考えるのである。それと異なった説明としては、1.ホットスポット説、2.疾患変異限定説、などがある。

以上が、我々の本研究を始めるまでの我々の研究成果であった。

c. APRT欠損遺伝子の頻度の推定

この研究の本来の目的である、APRT欠損症の頻度測定については新たに

二つの方法を開発した。それを用いて実際に日本人集団での頻度測定を行った。未だサンプルが少ないために、確実な頻度を推定するためには十分でない。しかし、原理的には全く方法は確立した。

確実な頻度測定のためにはヘテロ接合体を正しく同定する方法が不可欠である。我々はこれまでにAPRT欠損症のヘテロ接合体を同定するための確実な方法を発表していた。これはB細胞株を樹立した後2,6-diaminopurine 抵抗性の突然変異株を選択する方法である。これは確かに確実な方法ではあるが、しかし欠点は判定に時間がかかることと技術的に難しいということである。今回、末梢血のT細胞中にDAP抵抗性細胞を検索するという方法でこの問題を解決した。即ち、末梢血より単核細胞を分離し、これをPHA、interleukin2を用いて増殖させ、feeder cellの存在下でDAP抵抗性のクローンを得る方法である。驚くべきことに、このように体細胞突然変異を起こした細胞はヘテロ接合体の体内に多数存在するのである（発表論文リスト6）。この詳細については後述するが、いずれにせよこのような方法によって確実にヘテロ接合体を判定する比較的簡便な技術が確立された。研究協力者の一人箱田は400名ほどの一般人の中から2名のヘテロ接合体をこの方法で同定した（Hakoda et al. manuscript in preparation）。しかしこの程度のサンプル数ではまだ信頼のおける頻度を算出するには少ない。また、T細胞による判定法も、欲を言えばこれでもまだ少し技術的に煩雑すぎ、もう少し簡便な方法の確立を望みたいところである。

ヘテロ接合体を同定する第二の方法は遺伝子診断である。これはAPRT*J 遺伝子を持つものについては既に完成した。しかし、APRT*Q0 の対立遺伝子を持つものについては、突然変異部位が同定されていないためまだこれはできない。この方法が、すべて日本人患者を対象とする診断法となるためには、あとわずかの研究が必要とされる。

日本人以外の人種における頻度については、サンプルをようやく得てPCRによるヘテロ接合体の同定の作業を始めた。

d. APRT*J/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ個体の診断法の開発と、その同定

前述のごとく、DHA 尿路結石症の中に APRT*J/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ個体があることは我々が予想していた。しかし、その確実な診断法がなかったためそれを同定することは不可能であった。今回の研究によって、方法が開発され、APRT*J/APRT*Q0 の個体を持つ DHA 尿路結石尿の患者を診断することができた。そして、今までにこのような遺伝子型を持つ家系を 6 家系診断した。このようにして、表 1 はすべて埋まり、これが仮説ではなく事実であることが完全に証明された。

APRT*J/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ個体の診断法は複雑であるが、以下のような方法である。

1. まず、両親より B cell line を樹立し、DAP 抵抗性の突然変異細胞を選択する。ヘテロ接合体の個体からは必ずこのような変異クローンが選択できる。このクローンの APRT 活性を測る。これらのクローンが完全欠損症であるならば、そのヘテロ接合体はまず間違いなく APRT*1/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ。もし、完全欠損でないならば、まず間違いなく APRT*1/APRT*J の遺伝子型を持つ。さらに確認のために、遺伝子を抽出して PCR をおこない、APRT*J の対立遺伝子を持つと診断された個体が実際に塩基配列で特異的な変異を持つことを証明する。実際上は、これほど念を入れる必要はないが、一家系において我々は念には念を入れ、以上の方法により APRT*J/APRT*Q0 の遺伝子型を持つ個体が DHA 尿路結石症を発症することを証明した（発表論文リスト 7）。実際上は、家系調査の必要はなく、被験者がホモ接合体であることを、末梢血 T 細胞を用いて証明し、その DNA を用いて PCR 法で、その個体が APRT*J と non-APRT*J 両方の対立遺伝子を持っていることを証明すればよい。しかし、これで面倒な問題は極めて低頻度で存在する major gene change による APRT*Q0 の配列である。我々の経験では、そのような配列はわずかに 1% しかなく、今までに問題になったことはない。これからもし有ったとしても、Southern blott を行なえばほぼ解決できる問題である。

e. APRT*J 対立遺伝子の、突然変異発生時期の推定

すべての APRT*J 対立遺伝子が共通の祖先遺伝子に由来することはまず間違いない事実である（それについての討論は、我々のこれまでの論文にかかれてある）。もしそうならば、連鎖の法則により、交差がなければすべて APRT*J 対立遺伝子が共通の連鎖する多型マーカーを持つはずである。しかも、この突然変異部位の近傍に多型部位を見つけることができれば、それとの連鎖は極めて強いはずであるから、余程長い時間が経たないと交差はほとんど起こらないはずである。実際この近傍の多型部位として少なくとも4箇所があるが、その内、2つは極めて多型性が強い。APRT*J 遺伝子について、その多型を調べるとほとんどが同じ haplotype と連鎖することがわかる。しかし、遠方の多型部位とは交差があったことが証明され、交差対立遺伝子の頻度より、少なくとも13万年が経過していると計算される（manuscript submitted for publication）。これは、交差確立が平均的であったこと、等いくつかの条件を入れて計算されたものであるが、正確ではないとはいえ全く的外れとは思われない。日本人の間にそれほど広く分布する病気の遺伝子が、それほど長い歴史を持つということは、多少誤差があることを割り引いて考えても驚くべきことである。

f. 体細胞突然変異の検出

ヘテロ接合体の診断法を開発する仮定で、我々は極めて重大なことを発見した。それは、体細胞突然変異が極めて頻繁に起こっているという事実である。しかも、これは in vitro の現象ではなく、in vivo で起こっていることなのである。即ち aprt^{+/-} の遺伝子型の個体のT細胞の中にはDAP抵抗性となった突然変異細胞が 1.3×10^{-4} の確率で存在する（発表論文リスト6）。これが、本当の遺伝子変化による突然変異細胞であることは酵素活性の消失や、遺伝子の変化で証明できる。近年、ある癌の原因は体細胞突然変異であることが示されているが、APRT 遺伝子座にもこれだけの頻度で体細胞突然変異が起きているというのは驚くべきことである。我々は、これが単にAPRT

欠損症のヘテロ接合体の診断に使えるだけでなく、発癌を含めた体細胞突然変異のヒトにおける意味を解明するために極めて有用であると考えられる。

g. 今後の課題

まず、APRT*J以外の残りの遺伝子APRT*Q0を解明する必要がある。我々は、APRT*Jと並行してAPRT*Q0遺伝子のハプロタイプも分析したが、多くのAPRT*Q0遺伝子は共通のハプロタイプを持つことがわかった。従って、APRT*Q0の対立遺伝子も多くは共通の配列を持つと思われる。しかし、明らかに他のAPRT*Q0の対立遺伝子と異なった配列を持つものが1つあることは、Southern blot pattern が正常と異なることでわかる。

次に、これらの対立遺伝子が他の人種で有るかどうかをさらに势力的に調べる必要がある。それには、さらに簡便な方法を開発する必要がある。

次に、体細胞遺伝子突然変異については、どのような突然変異が起きているかをSouthern blot 法や、遺伝子配列のレベルではっきりさせる必要がある。

表 1 APRT 遺伝子座に関する遺伝子型と表現型の対応

遺 伝 子 型	疾患の有無	アデニン類似体 に対する抵抗性
<u>APRT*Q0/APRT*Q0</u>	(+)	resistant
<u>APRT*1/APRT*Q0</u>	(-)	sensitive
<u>APRT*J/APRT*J</u>	(+)	resistant
<u>APRT*J/APRT*Q0</u>	(+)	resistant
<u>APRT*1/APRT*J</u>	(-)	sensitive
<u>APRT*1/APRT*1</u>	(-)	sensitive

Ⅲ. 発表論文リスト

1. Hidaka, Y., Tarle, S.A., Fujimori, S., Kamatani, N., Kelley, W.N. and Palella, T.D. Human adenine phosphoribosyltransferase deficiency: Demonstration of a single mutant allele common to the Japanese. *J. Clin. Invest.* 81, 945-950, 1988
2. Kamatani, N., T. Sonoda and Nishioka, K. Distribution of the patients with 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis and adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japan. *J. Urol.* 140,1470-1472, 1988
3. Kamatani, N., Kuroshima, S., Terai, C., Hidaka, Y., Palella, T.D. and Nishioka, K. Detection of an amino acid substitution in the mutant enzyme for a special type of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency by sequence specific protein cleavage. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 325-331, 1989
4. Takeuchi, F., Kamatani, N., Nishida, Y. and Miyamoto, T. Erythrocyte adenine PRPP availability in two types of APRT deficiency using silicon oil method. *Purine Metabolism in Man-VI, Part A.* (Mikanagi, K., Nishioka, K. and Kelley, W.N. eds.) Plenum, New York pp 35-41
5. Kamatani, N., Kuroshima, S., Terai, C., Hakoda, M., Nishioka, K. and Mikanagi, K. Diagnosis of genotypes for adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency. *Purine Metabolism in Man-VI, Part A.* (Mikanagi, K., Nishioka, K. and Kelley, W.N. eds.) Plenum, New York pp 51-58
6. 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.* in press.
7. 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.* in press.