

201231185A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

遺伝性ポルフィリン症：新病型の診断法と
新しい診療ガイドラインの確立に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 野 創

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
遺伝性ポルフィリン症：新病型の診断法と新しい診療ガイドラインの確立に関する研究……………	1
中野 創	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝性皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断：新病型の診断法確立……………	11
中野 創	
2. 急性間欠性ポルフィリン症 (AIP) 病因遺伝子異常の発生ホットスポット ……………	15
大門 真	
3. 赤芽球 ALAS の酵素異常とポルフィリン代謝 ……………	19
近藤雅雄	
4. ALAS-E タンパク質のカルボキシル末端領域の機能の解析 ……………	27
古山和道	
5. 肝障害を伴う赤芽球性プロトポルフィリン症における <i>ABCG2</i> 遺伝子の 多様性についての検討に関する研究確立……………	33
竹谷 茂	
6. 遺伝性ポルフィリン症の光線過敏に対する新規治療薬の開発と有用性の検討……………	35
川田 暁	
7. 急性ポルフィリン症の遺伝子解析……………	39
前田直人	
8. 遺伝性皮膚ポルフィリン症の臨床研究……………	45
上出良一	
9. ポルフィリン症例相談窓口の全国展開……………	47
堀江 裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	49
IV. 主な研究成果の刊行物・別冊……………	51

略語及び用語の定義一覧

略語	省略していない表現 (英)	省略していない表現 (日)
AP	Acute porphyria	急性ポルフィリン症
AIP	Acute intermittent porphyria	急性間欠性ポルフィリン症
HCP	Hereditary coproporphyrria	遺伝性コプロポルフィリン症
VP	Variegate porphyria	多様性ポルフィリン症
CEP	Congenital erythropoietic porphyria	先天性赤芽球性ポルフィリン症
ADP	ALAD deficiency porphyria	ALAD 欠損性ポルフィリン症
EPP	Erythropoietic porphyria	赤芽球性プロトポルフィリン症
PCT	Porphyria cutanea tarda	晩発性皮膚ポルフィリン症
HEP	Hepato-erythropoietic porphyria	肝・骨髄性ポルフィリン症
ALAS	δ -Aminolevulinic acid synthase	δ -アミノプリン酸合成酵素
ALAD	δ -Aminolevulinic acid dehydratase	δ -アミノプリン酸合脱水酵素
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	ハイドロキシメチルビルラン合成酵素
PBGD	Porphobilinogen deaminase	ポルホビリノーゲン脱アミノ酵素
UROS	Uroporphyrinogen synthase	ウロポルフィリノーゲン合成酵素
UROD	Uroporphyrinogen decarboxylase	ウロポルフィリノーゲン脱炭素酵素
FECH	Freeochelatase	鉄導入酵素
ALA	δ -Aminolevulinic acid	δ -アミノレブリン酸
PBG	Porphobilinogen	ポルホビリノーゲン
HMB	Hydroxymethylbilane	ハイドロキシメチルビルラン

I. 総括研究報告

**遺伝性ポルフィリン症：新病型の診断法と
新しい診療ガイドラインの確立に関する研究**

研究代表者 中野 創 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

研究要旨

遺伝性ポルフィリン症はヘム合成系に關与する7つの酵素のいずれかの遺伝子異常によって発症する代謝異常症疾患群である。従来8病型が知られており、皮膚、消化器、神経症状を主徴とする全身性疾患である。本症は患者のQOLを著しく損ない、また根本的治療は未だ存在しないため、適切な対処がなされない場合には重篤な後遺症を残し、場合により致死的ともなりうる。しかし、一般医の認識は低く、正しく診断されている症例は極めて少ない。我々は平成21～23年度厚生労働科学省難治性疾患克服研究事業（以下、前研究）により、1次調査における本疾患群の推計患者数はわずかに208人に過ぎないが、患者個人のQOLは著しく低いことや、海外で最近報告された新たな病型、X連鎖優性プロトポルフィリン症（Xプ症）についてわが国では全く調査されていないこと、また、原因不明の急性肝不全で死亡した症例が、死後、家系分析と遺伝子診断によってポルフィリン症であることが確定されたが、正しい診断のもとに適切な生活指導が行われれば、死を防ぎ得たと考えられたことなど、問題点をいくつか明らかにした。そこで、これらの解決を目的として次の研究を計画した。1. Xプ症の診断法確立。2. 要観察症例のモニタリングによる致死的合併症回避。3. 遺伝子診断とタンパク質機能（酵素活性）診断との融合による新規重症度推定法の開発。4. 症例の新規リクルートの継続による臨床データライブラリーの構築。5. 新病型を盛り込んだ最新診療ガイドラインの早期公開。これら未だ取り組まれていない研究計画を遂行することによって、患者の生活を支援し、生命を守り、かつ、全ての有益な知見を国民社会全体に還元したい。なお、本研究では、研究対象が遺伝性疾患であることを考慮し、研究期間中を通じて常に患者の人権・プライバシー保護に十分配慮しながら研究を進めていく。

分担研究者

川田 暁 近畿大学医学部皮膚科教授
近藤雅雄 東京都市大学生命科学教授
前田直人 鳥取大学医学部消化器内科講師

2012年10月1日より

山陰労災病院内科第二内科部長
上出良一 東京慈恵会医科大学附属第三病院皮膚科教授

大門 真 山形大学医学部第三内科准教授

2013年2月1日より

弘前大学医学研究科内分泌代謝内教授
竹谷 茂 京都工芸繊維大学、工芸科学研究科
古山 和 東北大学医学部分子生物学分野准教授
堀江 裕 済生会江津総合病院病院長

研究協力者

澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授
難波栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター遺伝子探索分野教授
諏佐真治 山形大学医学部内科学第三講座助教
網中雅仁 聖マリアンナ医科大学予防医学教室講師
足立智英 東京都済生会中央病院部長
川原 繁 金沢赤十字病院部長
落合香織 北社会保険病院消化器内科医長

A. 研究目的

遺伝性ポルフィリン症はヘム合成系に関与する7つの酵素のいずれかの遺伝子異常によって発症する代謝異常症疾患群である。従来8病型が知られており、皮膚、消化器、神経症状を主徴とするが、致死の合併症が診療上の問題点である。我々は平成21~23年度厚生労働科学省難治性疾患克服研究事業(以下、前研究)により次の重要な知見を得、これに

よってさらなる研究継続の必要性が明確になった。1. 1次調査における本疾患群の推計患者数はわずかに208人に過ぎないが、患者個人のQOLは著しく低い。2. 遺伝子診断で確定診断が可能であるが、個々の遺伝子異常がどのようなメカニズムで多彩な症状を引き起こすのかがほとんど明らかになっていない。3. これまで知られる8病型とは別の原因遺伝子によって発症する新たな病型、X連鎖優性プロトポルフィリン症(Xプ症)が海外において確認された。一方、本邦においてはこの新病型の診断確実例は未だ報告が無いが、疑わしい症例が複数存在する。4. 原因不明の急性肝不全で死亡した症例が、死後、家系分析と遺伝子診断によってポルフィリン症であることが確定されたが、正しい診断のもとに適切な生活指導が行われれば、死を防ぎ得たと考えられた。5. 未だに有効性のエビデンスがある治療法がない。6. 罹患すると生涯にわたり症状が持続し、患者を含めた次世代以降も長期医療支援が必要であることが認識された。これらの知見を総合すると、本疾患群は研究奨励分野の対象疾患であるべき「希少性・原因不明・効果の治療法未確立・生活面での長期にわたる支障」の4要素を満たすとともに、適切な予防措置によって患者を死の転帰から救い得ることを明示している。そこで我々は、上記問題点の解決を目的として次の研究を計画した。1. Xプ症の診断法確立。2. 要観察症例のモニタリングによる致死の合併症回避。3. 遺伝子診断とタンパク質機能(酵素活性)診断との融合による新規重症度推定法の開発。4. 新規症例リクルートによる臨床データライブラリーの構築。5. 新病型を盛り込んだ最新診療ガイドラインの早期公開。これら、未だ取り組まれてない試みを遂行することによって、患者の生活を支援し、生命を守り、そして全ての有益な知見を国民社会全体に還元したい。

B. 研究方法

1. X プ症の診断法確立.

前研究で解析した骨プ症の症例中に、同症の原因遺伝子であるフェロケラターゼ遺伝子に変異が同定されなかった症例が存在するが、これらは新病型の X プ症である可能性が高い。そこで、これらの症例について、X プ症の原因遺伝子である ALAS 2 の遺伝子診断法を確立する。

2. 要観察症例のモニタリングによる致死的合併症回避.

将来の発症が確実なキャリアを遺伝子診断で見つけだし、光線防御や服薬指導など日常生活のサポートを行う。患者ネットワークや市民講座等を積極的に利用し、疾患の重要性を啓蒙する。既に経過観察中である患者についても継続して症状のモニタリングを行う。

3. 遺伝子診断とタンパク質機能（酵素活性）診断との融合による新規の重症度推定法の開発.

現時点では遺伝子診断によって診断は確定できるが、そのみでは必ずしも重症度を推定できるとは限らない。そこで、今回は遺伝子診断の結果と酵素活性測定の結果とともに、臨床症状をあわせて分析することによって、酵素の活性変化の程度と疾患重症度との関係を明らかにする。現在、骨プ症および遺伝性コプロポルフィリン症（遺コ症）の原因遺伝子産物であるフェロケラターゼおよびコプロポルフィリノーゲン酸化酵素の活性が患者末梢血リンパ球を用いて測定可能であるので、これを実施し前研究で得られた臨床データを比較検討する。δ-アミノレブリン酸合成酵素 2 (ALAS2) は赤芽球系の細胞でのみ発現しているため患者サンプルでの測定は難しいため、X プ症の確定診断症例を同定できた場合は、変異を導入した発現ベクターを利用してリコ

ンビナントタンパク発現させ、酵素活性を測定する。

4. 遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断の継続.

前研究の結果から国内の遺伝性ポルフィリン症の相当数は遺伝子診断による確定診断がなされていないことがわかった。従って、予後推定や重症合併症併発の危険性推定などが不十分である可能性が高い。そこで、継続して症例を収集して確定診断に務める。

(倫理面への配慮)

本研究では、健常人や患者のサンプルを用いるため、ヘルシンキ宣言を順守し、被検者の人権と利益の保護に配慮する。

1. データの管理・保管について

患者および医師の個人名など、個人情報に関わる情報と測定データは別途管理する。プライバシーに関わる情報は紙あるいは電子媒体で鍵のかかる保管庫で管理し、研究の終了と同時に焼却あるいは電氣的に消去する。測定データの管理は個人が特定できないように ID 番号で管理する。

2. インフォームド・コンセントについて

本研究におけるデータの収集および解析にあたっては、あらかじめ本研究の目的・内容・方法について記載された「説明書」、「同意書」および「同意撤回書」を作成し、それぞれの担当主治医により患者本人または家族の同意を得た上で行う。患者及び家族の解析結果については本疾患が遺伝性疾患であることを鑑みて、当人の要求があった場合にのみ担当主治医を介して報告するものとし、それ以外の場合は一切報告しない。

3. 情報公開について

解析により得られた新知見の公表にあたっては患者およびその家族のプライバシーを尊重し、匿名化するなど個人情報の厳格

な保護に留意する。

C. 研究結果と考察

1. X 症の診断法確立.

中野は X 症の遺伝子配列決定法ならびに MLPA 法による C 末端側エクソンのコピー数定量法を確立し、疑わしい症例 22 例につき解析を行った。原因遺伝子である ALAS2 遺伝子の塩基配列を通常のシーケンシング法で決定したが、変異は見出されなかった。女性例については ALAS2 分子の C 末端側に相当するエクソンの欠失が存在する可能性があったため、MLPA 法によるエクソンコピー数定量法を適用したが、異常は見出されなかった。古山は X 症患者で同定された ALAS2 遺伝子変異により ALAS-E タンパク質のカルボキシル末端は約 20 アミノ酸を欠失すると推定される事例をもとに ALAS-E タンパク質のカルボキシル末端領域がどのような機能を有するのかについて検討した。その結果、ALAS-E タンパク質のカルボキシル末端 20~33 アミノ酸の欠失は機能獲得型変異であることを示し、欠失断端の位置に依らず X 症の発症原因となるものと推定した。

2. 要観察症例のモニタリングによる致的合併症回避.

川田らは肝不全などの重症合併症を回避するために、光線過敏に対する新規治療薬の開発を行なった。化粧料の組み合わせを 2 種類にすると臨床的に有効とみなせる光線防御効果を有することが判明した。27 例の遺伝性ポルフィリン症患者に使用調査を行い、その有効性と安全性を確認した。さらに 2 種類の組み合わせについて比較したところ、有効性には差がなかったが、塗布方法、塗り心地、外観といった実用面で違いがみられた。堀江はポルフィリン症例の相談窓口を開設して全国からの相談に応じ、

さらに講演会でポルフィリン症が難病であることの普及に努めるとともにガイドブックの作製を行い関係機関に配布した。

3. 遺伝子診断とタンパク質機能(酵素活性)診断との融合による新規の重症度推定法の開発.

近藤は赤芽球 ALAS2 活性の異常を示す 2 つの疾患について、そのポルフィリン代謝について検討した。ALAS2 活性の異常高値を見る新しい型である X 症は、プロトポルフィリンの異常高値と赤芽球性プロトポルフィリン症(EPP)と同様の皮膚光線過敏症を見る。一方、ALAS 活性の異常低値が見られた鉄芽球性貧血症 46 例(殆どが X 連鎖性鉄芽球性貧血症, XLSA と推測される)では、ALAS の異常低値に対してポルフォビリノーゲンデアミナーゼ(PBGD)活性の高値並びにポルフィリン代謝産物の増量、とくにプロトポルフィリンの増量をみた。そして、赤血球遊離プロトポルフィリン(FEP)が 1000 μ g/dl RBC 以上を示した 4 例の患者では EPP と同様の皮膚の光線過敏症をみた。

そこで、FEP 値の変化と他のポルフィリン代謝関連物質、並びに肝機能や血液検査データとの関係を追及したところ、FEP と ALAS, FECH には有意な相関($p<0.05$)が認められた。また、ALAS と AST, ALT($p<0.01$)および AST と Ferritin, 血清鉄($p<0.05$)に有意な相関を認めた。さらに、因子分析の結果、FFP の変化が、尿中 ALA, ウロポルフィリン(UP), コプロポルフィリン(CP) I, CP III, ALAS, Ret, Ferritin, AST, ALT, MCH の変化と関連性のあることが明らかとなった。とくに FEP の変化は Ferritin と MCH の関連性が大きいことが示唆された。AST や ALT にも関連性が見出されたので、ALAS や肝機能との関連性も指摘され、重症度の推定に意義があ

ると考えられた。竹谷は薬剤輸送ポンプ ABCG2 がポルフィリン輸送体として機能するかどうかと肝障害を伴う Erythropoietic Protoporphyrin (EPP) 症患者における ABCG2 の多様性についての検討を行った。その結果、ABCG2 はポルフィリン輸送に関与するが、機能低下型 ABCG2 と肝障害の関係は認められないことを明らかにした。

4. 遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断の継続.

1) 中野と上出は前研究に引き続き遺伝性皮膚ポルフィリン症の症例を新規収集し、遺伝子診断を行った。今回新たに 10 家系の EPP 症例を収集し、FECH 遺伝子変異解析を行い 7 家系で FECH 遺伝子に変異を同定した。そのうち 3 症例で新規変異を認めた。

2) カンボジア人の光線過敏症につき診断依頼があり、臨床症状などからポルフィリン症、なかでも異型ポルフィリン症が疑われた。患者 2 人とその母親の唾液からゲノム DNA を抽出し、異型ポルフィリン症の原因遺伝子であるプロトポルフィリン酸化酵素遺伝子の塩基配列を調べたところ、臨床症状を有する発端者とその姉でホモのミスセンス変異が同定された。母親はヘテロであった。3) 孤発性の晩発性皮膚ポルフィリン症 4 症例について原因遺伝子であるウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素遺伝子につき変異解析を行ったが変異は同定されなかった。上出は所属施設における 23 家系、25 症例の EPP 症例を解析し、赤血球プロトポルフィリン値は 108 ~ 8,578 μ g/dlRBC で、ほとんどが 2,000 μ g/dlRBC 以下であり、3 名に肝障害が見られたことを明らかにした。16 名について FECH 遺伝子変異と臨床症状との関係を調べたが、変異の種類と臨床症状に相

関は認めなかった。前田は急性間欠性ポルフィリン症 (AIP) の責任酵素であるヒドロキシメチルビレンシンターゼ (HMBS)、および遺伝性コプロポルフィリン症 (HCP) の責任酵素であるコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (CPOX) の遺伝子解析を行った。その結果、AIP1 家系 1 例および HCP1 家系 1 例において新規の遺伝子変異を明らかにした。一方、生化学的に異常がなく臨床症状のみから急性ポルフィリン症が疑われた症例 (AIP 疑いの 1 家系 2 例) の解析では遺伝子変異は認められなかった。急性ポルフィリン症における遺伝子解析は診断の確定のみならず、家系内保因者の早期発見や将来の発症予防にも有効であることが示された。大門は同じ病因遺伝子異常を持つ 2 つの AIP 家系を経験し、その発生原因を解析した。本遺伝子の 6 個の単塩基多型 (SNP) を用いたハプロタイプ解析より、ホットスポットに起因する事を、明らかにした。この結果から本邦の症例でも今後の遺伝子解析では、今回同定した領域を含めたホットスポットの解析をより重点的に行うことが推奨される。

D. 結論

今回の研究により、遺伝性ポルフィリン症は臨床診断が極めて難しく、確定診断のためには遺伝子診断が必須であることが明らかになった。現在明らかになっている 9 病型の遺伝子診断法は確立したと言ってよいが、EPP, AIP においてもそれぞれの原因遺伝子に変異が認められない症例が存在するため、他の遺伝子が原因である可能性があり、今後の研究課題である。また、遺伝性がほとんど認められないとされている晩発性皮膚ポルフィリン症についても、本症が浸透率の低い遺伝性疾患であるという事実から、積極的に遺伝子診断を行うべきと考えられる。皮膚ポルフィリ

ン症の予防には、目下のところ紫外線防御しか方法がないが、ポルフィリン症の作用波長に有効なサンスクリーン剤の開発が進んでおり、光線過敏ならびにこれによって引き起こされる肝不全などの重症合併症の予防効果に期待ができる。重症度を推定するための生化学的あるいは分子生物学的方法も予後改善のために必要なものであるが、今回研究が緒に着いたばかりであり、さらに時間をかけて検討しなければならないと言える。一般医家に対する啓蒙もなお不十分であり、今回作成したポルフィリン症例のガイドブックに加え、インターネット等を利用するなど時代に即した普及法も展開する必要があると思われた。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中野 創. FILE 72 本当はポルフィリン症. 誤診されている皮膚疾患. 宮地良樹編. メディカルレビュー社 2013 : p308-311.
- 2) 中野 創. 晩発性皮膚ポルフィリン症(家族性)(fPCT). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo.20先天性代謝異常症候群(第2版)下, 日本臨床社, 2012 ; 193-197.
- 3) 中野 創. 肝赤芽球性ポルフィリン症(HEP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo.20先天性代謝異常症候群(第2版)下, 日本臨床社, 2012 ; 198-201.
- 4) 中野 創. 先天性赤芽球性ポルフィリン症(CEP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo.20先天性代謝異常症候群(第2版)下, 日本臨床社, 2012 ; 202-206.
- 5) 中野 創. 赤芽球性プロトポルフィリン症(EPP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo.20先天性代謝異常症候群(第2版)下, 日本臨床社, 2012 ; 207-211.
- 6) 中野 創. 多様化する光線過敏症. ヘム合成経路とポルフィリン症. MB Derma 2012; 191(4) : 25-30.
- 7) 中野 創. 肝障害と晩発性皮膚ポルフィリン症. Visual Dermatology 2012 ; 11(11) : p1168-1172.
- 8) 中野 創. 遺伝子診断と皮膚疾患. 日皮会誌 2012 ; 122(8) : 2057-2063.
- 9) 中野 創. 皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業遺伝性ポルフィリン症の全国疫学調査ならびに診断・治療法の開発に関する研究平成 23 年度総括・分担研究報告書, 2012:96-99.
- 10) 山田英明, 中尾由絵, 中野 創, 澤村大輔, 上出良一. 異型ポルフィリン症の1例. 臨床皮膚科 66 卷 11 号 2012: p865-869.
- 11) 近藤雅雄、網中雅仁、石塚昌宏 : 遺伝性ポルフィリン症の生化学診断法および診断基準案の作成、ALA-Porphyrin Science 1:33-43、2012.
- 12) 近藤雅雄、矢野雄三、浦田郡平 : 日本の遺伝性ポルフィリン症~1920年(第一例報告)から91年間(2010年)の集計、ALA-Porphyrin Science 2 : 印刷中、2012.
- 13) Kondo M: Abnormal Porphyrin Metabolism, Aminolevulinic acid – Science, Technology and Application, p.11-22, Tokyo Institute of Technology Press, 2012.

- 14) 近藤雅雄：ポルフィリンーヘム代謝異常症、ポルフィリンーヘム代謝異常症：概論、日本臨牀社、別冊日本臨牀、領域別症候群シリーズ No.20、先天代謝異常症候群（第 2 版）、P.165-175、2012.
- 15) 近藤雅雄、網中雅仁：遺伝性コプロポルフィリン症、血液症候群（I）、-その他の血液疾患を含めて-第 2 版、印刷中、日本臨牀社、2012.
- 16) 近藤雅雄、堀江裕：先天性ポルフィリン症、血液症候群（I）、-その他の血液疾患を含めて-第 2 版、印刷中、日本臨牀社、2012.
- 17) 網中雅仁、高田礼子、近藤雅雄：鉛中毒によるポルフィリン症、血液症候群（I）、-その他の血液疾患を含めて-第 2 版、印刷中、日本臨牀社、2012.
- 18) 近藤雅雄：ポルフィリン（コプロポルフィリン、プロトポルフィリン、ポルホビリノゲン）、内科 11（6）：印刷中、2013.
- 19) 近藤雅雄：尿中ポルフィリンとその前駆物質、臨床検査ガイド 2013-2014、印刷中、文光堂、2012.
- 20) 近藤雅雄：ポルフィリン症、内科学書、中山書店、印刷中、2013.
- 21) Furuyama K, Yamamoto M. Differential regulation of 5-aminolevulinate synthase isozymes in vertebrates. "Handbook of Porphyrin Science", ed. by Ferreira G.C., World Scientific Publishing Co. Inc., New Jersey, 2013, in press
- 22) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013, vol.92:p1-9.
- 23) Hiep NC, Kinohira S, Furuyama K, Taketani S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J Biochem.* 2012, in press
- 24) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol.* 2012, vol.40:p477-486.
- 25) Li B, Takeda K, Ishikawa K, Yoshizawa M, Sato M, Shibahara S, Furuyama K. Coordinated Expression of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 4 and Heme Oxygenase 2: Evidence for a Regulatory Link between Glycolysis and Heme Catabolism. *Tohoku J Exp Med.* 2012, vol. 228:p27-41.
- 26) Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibasaki A, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon- γ . *Peptides.* 2012, vol.37:p285-289.
- 27) 亜鉛—プロトポルフィリン：安全な食肉色素の開発のための基礎的研究 竹谷茂、Chau Tuan Thanh, *New Food Industry*, 2012;54(7):7-15.
- 28) Tamura R, Chen Y, Shinozaki M, Arai K, Wang L, Tang W, Hirano S, Ogura H, Mitsui T, Taketani S, Ando M, Kataoka

- TEudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit multiple steps in the NF- κ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012;201222(1): 207-211.
- 29) N.C. Hiep, S.Kinohira, K. Furuyama, S.Taketani: Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J. Biochem.* 2012;152(6): 509-519.
- 30) M. Sawamoto, T. Imai, M. Umeda, K. Fukuda, T. Kataoka, S. Taketani: The p53-dependent expression of frataxin controls 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage in cancerous cells. *Photochem. Photobiol.* in press.
- 31) M. Shiota, Y Yasuda, S. Taketani, (2012) Erythropoietin is involved in hemoprotein syntheses in developing human decidua. *Congenital Anomalies*, in press.
- 32) Kawada A, Kawara S, Nakano H. Erythropoietic protoporphyria. *Current Genetics in Dermatology, InTech, Croatia*, pp. 97-104, 2013
- 33) 急性間欠性ポルフィリン症 (AIP)
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 先天性代謝異常症候群 (第2版) 下. 日本臨牀社、2012、pp176-181
- 34) ALAD欠損性ポルフィリン症 (ADP)
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 先天性代謝異常症候群 (第2版) 下. 日本臨牀社、2012、pp182-184
- 35) 異型 (多様性) ポルフィリン症 (VP)
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 先天性代謝異常症候群 (第2版) 下. 日本臨牀社、2012、pp185-187
- 36) 遺伝性コプロポルフィリン症 (HCP)
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 先天性代謝異常症候群 (第2版) 下. 日本臨牀社、2012、pp188-190
- 37) 肝赤芽球性ポルフィリン症
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 血液症候群 (第2版) I. 日本臨牀社、2013、pp466-468
- 38) 急性間欠性ポルフィリン症
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 血液症候群 (第2版) I. 日本臨牀社、2013、pp469-475
- 39) 異型 (多様性) ポルフィリン症
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 血液症候群 (第2版) I. 日本臨牀社、2013、pp476-478
- 40) ALAD欠損性ポルフィリン症
前田直人
新領域別症候群シリーズ. 血液症候群 (第2版) I. 日本臨牀社、2013、pp479-481
- 41) 山田英明, 中尾由絵, 中野創, 澤村大輔, 上出良一: 異型ポルフィリン症の1例, *臨皮* 66, 865-869, 2012
- 42) 堀江 裕; 先天性ポルフィリン症例: 272-273, 2013. 中山書店. 先天性代謝異常ガイドブック. 総編集 遠藤文夫; 専門編集 山口清次、大浦敏博、奥山虎之
- 43) 堀江 裕、近藤雅雄; 骨髄性プロトポルフィリン症. 血液症候群 (第2版)、別冊、日本臨床。461-465、2013。

- 44) 近藤雅雄、堀江 裕；先天性ポルフィリン症 (Gunther 症) 血液症候群 (第 2 版)。別冊日本臨床。456-460、2013。
- 45) 堀江 裕；ポルフィリン症例の相談窓口の全国展開。ポルフィリン症ガイドブック。
- 46) 堀江 裕；肝性ポルフィリン症 臨床病態学 (第 2 版) 肝疾患。北村聖 総編集。P.147-148、2013。
- 47) 堀江 裕。今日の神経疾患治療指針 第 2 版。医学書院 編集 水澤英洋 ほか。P.770-773、2013
2. 学会発表・講演
- 1) 中野 創。教育講演 14 太陽紫外線環境と皮膚。遺伝性皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断。第 111 回日本皮膚科学会総会。平成 24 年 6 月 2 日、京都市。
- 2) 中野 創。皮膚科領域における最近の話題。県南地域皮膚科懇話会。平成 24 年 7 月 12 日、八戸市。
- 3) 中野 創、上出良一、錦織千佳子、川田 暁、澤村大輔。異型ポルフィリン症の遺伝子診断。第 34 回日本光医学・光生物学会。平成 24 年 7 月 28 日、神戸市。
- 4) 中野 創、上出良一、錦織千佳子、川田 暁、澤村大輔。異型ポルフィリン症：*PPOX* 遺伝子変異同定による確定診断。第 64 回日本皮膚科学会西部支部学術大会。平成 24 年 10 月 28 日、広島市。
- 5) 近藤雅雄：食生活と免疫強化、日本抗加齢医学会、SEMINAR 2012, Sunday, March 25, Tokyo, p.1-31、2012、東京。
- 6) 近藤雅雄：先天性ポルフィリン症の疫学、病態、臨床、平成 24 年度済生会医学・福祉共同研究発表会、2012、大阪。
- 7) 網中雅仁、近藤雅雄、高田礼子、山内 博：ポルフィリン症の病型と一般生化学検査所見との関連性、第 82 回日本衛生学会総会、日本衛生学雑誌 67(2):283,2012、京都。
- 8) 堀江裕、藤井康善、松岡宏至、岡本敏明、山内延広、前田直人、村脇義和、近藤雅雄：ポルフィリン症例の相談窓口の全国展開の経験～鑑別診断も含めて～、第 2 回ポルフィリン-ALA 学会プログラム・要旨集 p.14, 2012、東京。
- 9) 近藤雅雄：遺伝性ポルフィリン症第 1 例報告 (1920 年) から 91 年間(2010 年)の累積、第 2 回ポルフィリン-ALA 学会プログラム・要旨集 p.16, 2012、東京。
- 10) Furuyama K, Kaneko K, Fujiwara T, Harigae H, Shibahara S. Identification of the Novel Erythroid-Specific Enhancer in the First Intron of Human ALAS2 Gene; The Mutation Disrupting GATA Transcription Factor-Binding Site in the Enhancer Causes X-Linked Sideroblastic Anemia. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology; 2012; Atlanta, U.S.A.
- 11) 古山和道、金子桐子、藤原亨、張替秀郎、柴原茂樹。ヒト赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子における新たな赤芽球特異的エンハンサーの同定。第 85 回日本生化学会大会；2012；福岡
- 12) 竹谷 茂：鉄シャペロン *frataxin* 発現の *p53* による調節とミトコンドリアのヘム代謝の関係。2012.12. 福岡
- 13) 竹谷 茂：癌特異的 ALA 誘導性 Protoporphyrin の蓄積：酵素、遺伝

- 子発現および物質輸送からの検討。
日本農芸化学会 2013 年度大会 (シンポジウム) 2013.3. 仙台
- 14) 川原 繁, 川田 暁, 上出良一, 中野創, 近藤雅雄. 骨髄性プロトポルフィリン症の疫学二次調査結果報告. 111 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012.6.1-3
- 15) 藤田美幸, 川田 暁, 川原 繁, 中野創. 異型ポルフィリン症の 1 例. 63 回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 大阪, 2012.10.13-14
- 16) 平尾文香, 川田 暁, 川原 繁, 上出良一, 浅野 新, 寺村 崇. 遺伝性ポルフィリン症に対する新規光線防御剤の有用性 -第 2 報-. 63 回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 大阪, 2012.10.13-14
- 17) 遺伝性ポルフィリン症に対する新規光線防御剤の有用性と安全性
川田 暁, 川原 繁, 上出良一, 浅野新, 寺村 崇. 第 2 回光皮膚科学研究会, 名古屋, 2013.02.17
- 18) Kawada A, Hirao A, Sato M, Kawara S, Kamide R, Asano H, Teramura T. The effectiveness and tolerability of a combination of cosmetic foundations for photosensitivity in erythropoietic protoporphyria. 71st Annual Meeting of the American Academy of Dermatology, Miami, 2013.3.1-5
- 19) 前田直人, 村脇義和, 堀江 裕. 急性ポルフィリン症における遺伝子解析の意義. 第 16 回日本肝臓学会大会 JDDW 2012 (2012 年 10 月, 神戸) (ワークショップ)
- 20) 急性ポルフィリン症の臨床と遺伝子解析. 「ポルフィリン症」医学・福祉共同研究講演会 (2012 年 9 月, 大阪)
- 21) B 型肝炎/ポルフィリン症-ちょっとした話題の種-. 鳥取県西部医師会臨床内科医会 (2012 年 11 月, 米子)
- 22) 松崎大幸, 上出良一, 中野創: 当科における骨髄性プロトポルフィリン症の集計, 第 34 回光医学光生物学会 (神戸) にて口頭発表. 学会奨励賞 (医学領域) 授賞
3. 著書
- 1) Kawada A, Kawara S, Nakano H. Erythropoietic protoporphyria. Current Genetics in Dermatology, InTech, Croatia, 2013 : 97-104.
- G. 知的財産の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告

遺伝性皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断：新病型の診断法確立

研究代表者 中野 創 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

研究要旨

我々は難治性疾患克服研究事業（H21-23 年度）において遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断を行ってきたが、患者実数の把握、病態解明、治療あるいは遺伝カウンセリングにおいていまだ情報が不十分であることがわかった。今年度も引き続き皮膚型ポルフィリンの症例を全国から収集し、分子遺伝学的解析を行った。その結果、本邦の骨髄性プロトポルフィリン症では依然として新たな遺伝子変異が見つかり、遺伝子診断の必要性が確認された。また、従来の方法では変異検出が困難な症例において、エクソン定量解析法 MLPA 法を行い、ゲノム DNA レベルでのエクソン欠失を同定した。新病型である X 連鎖骨髄性プロトポルフィリン症についても MLPA 法による診断法を確立した。カンボジア人の異型ポルフィリン症に対して遺伝子診断を行い変異を同定したが、遠方から輸送される検体は唾液が質量ともに適当であった。また、晩発性皮膚ポルフィリン症 4 症例について遺伝子変異解析を行ったが変異は同定されなかった。遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断は、重篤な合併症を予防するためにも、今後も継続的に施行されるべきである。

A. 研究目的

遺伝性ポルフィリン症は先天的なポルフィリン代謝の異常により生じる、非常にまれな遺伝性疾患である。本症は 8 病型に分類されてきたが、近年、アミノレブリン酸合成酵素 2 型の異常による骨髄性プロトポルフィリン症である X 連鎖優性プロトポルフィリン症が分離され 9 病型になった。これらは臨床的に皮膚の光線過敏症状を主とする皮膚型ポルフィリン症と急性の神経症状を主とする急性ポルフィリン症とに大別されるが、遺伝子診断を行わなければ、確定診断が難しいものも含まれ、診療上の問題となってきた。現在、全ての病型で原因遺伝子が明らかになっているが、本邦においては散発的に遺伝子変異検索が行われてきたものの、患者実数の把握、病

態解明あるいは遺伝カウンセリングにおいて著しく支障があった。

そこで昨年度までの厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業において、骨髄性プロトポルフィリン症 (EPP) 36 家系について分子遺伝学的検索を行い、34 家系について通常のシーケンス法と遺伝子定量法である MLPA 法とを併用して、フェロケラターゼ (FECH) 遺伝子の変異を同定した。異型ポルフィリン症 (VP) 4 家系についてプロトポルフィリンノーゲン酸化酵素遺伝子の変異を同定し、診断を確定した。

しかし、本研究班で行ったポルフィリン症の全国実態調査の結果からは、確定診断がなされていない症例が相当数潜在していると考えられたため、本年度はさらに症例を収集す

るとともに、これまで診断確定できなかった症例においても新しい解析法を導入して変異検索を試みた。

B. 研究方法

皮膚型ポルフィリン症患者ならびに家族の末梢血 DNA を採取し、PCR 法を用いて疾患原因遺伝子を増幅し、オートシーケンサーで塩基配列を決定した。カンボジアからの検体は唾液からゲノム DNA を採取するキット (Oragene・DNA™, DNA Genotech 社) を用いた。一部の症例では末梢血白血球由来 RNA を採取し、一次構造解析を行った。また、ゲノム DNA における当該遺伝子のエクソンのコピー数を定量するために、MLPA 法を用いて解析を行った。遺伝子変異解析にあたって、倫理面ではヘルシンキ宣言や、政府および関連学会が制定した遺伝子解析研究に関するガイドライン等を順守した。また、研究実施施設における倫理委員会の承認も得た。

C. 結果

1) 本研究で新たに 10 家系の EPP 症例を収集し、FECH 遺伝子変異解析を行った。その結果、7 家系で FECH 遺伝子に変異を同定し得た。そのうち 3 症例で新規変異を認めた。変異を同定できなかった 3 家系例について、X 連鎖優性プロトポルフィリン症である可能性も考え、原因遺伝子である ALAS2 遺伝子の塩基配列を通常のシーケンシング法で決定したが、変異は見出されなかった。過去に経験した FECH 変異未検出例 19 家系についても同様に解析したが、変異は同定されなかった。女性例であったため、ALAS2 分子の C 末端側に相当するエクソンの欠失の可能性があったため、MLPA 法によるエクソンコピー数定量法を新規に確立し、適用したが、異常は見出されなかった。

2) カンボジア人の光線過敏症につき診断依頼があり、臨床症状などからポルフィリン症、なかでも異型ポルフィリン症が疑われた (図 1)。そのため遺伝子診断を行う必要が生じたが、遠隔地からの検体輸送であるため血液の冷蔵輸送は断念し、常温で輸送可能な唾液を検体として用いた。患者 2 人とその母親の唾液からゲノム DNA を抽出したところ、質量ともに検索に十分な DNA が得られた。異型ポルフィリン症の原因遺伝子である PPOX 遺伝子の塩基配列を調べたところ、臨床症状を有する発端者とその姉でホモのミスセンス変異が同定された。母親はヘテロであった。



図 1. 異型ポルフィリン症の手背。

3) 家族歴がないいわゆる孤発性の晩発性皮膚ポルフィリン症 4 症例について原因遺伝子である UROS 遺伝子につき変異解析を行ったが変異は同定されなかった。

D. 考察

1) EPP の遺伝子診断では依然新規の変異が

同定されており，生命予後を左右する肝障害と変異の種類との関係を明らかにするために，さらに症例を収集し，遺伝子変異解析を行う必要があると考えられる．臨床的に EPP が疑われたが，FECH 遺伝子に変異が同定されず，かつ ALAS2 遺伝子にも異常が見出されなかった 1 家系については，別の原因遺伝子を想定する必要があるとかがえられる．今回解析した EPP 症例のうち 1 症例は肝移植を必要とする骨髄症の家系について行ったものであり，原因遺伝子である FECH 遺伝子の 1 塩基欠失を発端者ゲノム DNA に同定し，遺伝子変異が全身の臓器に生じていることがわかった．このことは肝移植により患者を救命した後に骨髄移植を追加施行する必要があることを示しており，遺伝子診断による診断確定が根治的治療を計画するうえで必須の知見をもたらした．

- 2) カンボジアからの光線過敏症症例の診断依頼については，臨床症状以外に検査データはなく診断に苦慮したが，ポルフィリン症に合致する皮膚所見から異型ポルフィリン症が推定され，遺伝子診断によって診断確定することができた．今回用いた唾液由来のゲノム DNA 抽出キットは 1 週間程度の常温輸送後のサンプル調整であっても遺伝子診断に十分なクオリティーを持つ DNA が得られ，また，侵襲のない検体採取であるので今後の検体採取にも頻用されるべきものと思われた．
- 3) 晩発性皮膚ポルフィリン症は従来，非遺伝性の症例が大部分であると考えられてきたが，最近の知見によりその一部は遺伝性である可能性が示唆されている．欧米では約 10% が遺伝性とされている．今回 4 症例については変異が同定されなかったが，本病型は浸透率が低く，孤発例と思われる症例であっても遺伝子である可能性がありえ

るので，症例をさらに収集して検討する必要がある．

E. 結論

遺伝性ポルフィリン症は病型間で症状の重複があるため病型診断が難しく，診断確定のためには遺伝子変異検索による原因遺伝子の変異同定が必要である．重篤な合併症があり得るため遮光指導その他経過を十分に観察する必要があるが，遺伝子診断により診断が確定できれば，生活指導等によって合併症を防ぎえるため，遺伝子診断によって診断を確定し，必要に応じて合併症の予防策を講じなければならない．以上のことから，遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断は，症例の収集と並行して今後も継続的に施行されるべきと思われる．

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中野 創. FILE 72 本当はポルフィリン症. 誤診されている皮膚疾患. 宮地良樹編. メディカルレビュー社 2013 : p308-311.
- 2) 中野 創. 晩発性皮膚ポルフィリン症(家族性)(fPCT). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.20 先天性代謝異常症候群(第 2 版)下, 日本臨床社, 2012 ; 193-197.
- 3) 中野 創. 肝赤芽球性ポルフィリン症(HEP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.20 先天性代謝異常症候群(第 2 版)下, 日本臨床社, 2012 ; 198-201.
- 4) 中野 創. 先天性赤芽球性ポルフィリン症(CEP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.20 先天性代謝異常症候群(第 2 版)下, 日本臨床社, 2012 ; 202-206.

- 5) 中野 創. 赤芽球性プロトポルフィリン症 (EPP). 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo.20 先天性代謝異常症候群 (第2版) 下, 日本臨床社, 2012 ; 207-211.
- 6) 中野 創. 多様化する光線過敏症. ヘム合成経路とポルフィリン症. *MB Derma* 2012; 191(4) : 25-30.
- 7) 中野 創. 肝障害と晩発性皮膚ポルフィリン症. *Visual Dermatology* 2012 ; 11(11) : p1168-1172.
- 8) 中野 創. 遺伝子診断と皮膚疾患. 日皮会誌 2012 ; 122(8) : 2057-2063.
- 9) 中野 創. 皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業遺伝性ポルフィリン症の全国疫学調査ならびに診断・治療法の開発に関する研究平成 23 年度総括・分担研究報告書, 2012:96-99.
- 10) 山田英明, 中尾由絵, 中野 創, 澤村大輔, 上出良一. 異型ポルフィリン症の1例. *臨床皮膚科* 66 卷 11 号 2012: p865-869.

2. 学会発表・講演

- 1) 中野 創. 教育講演 14 太陽紫外線環境と皮膚. 遺伝性皮膚ポルフィリン

症の遺伝子診断. 第 111 回日本皮膚科学会総会. 平成 24 年 6 月 2 日, 京都市.

- 2) 中野 創. 皮膚科領域における最近の話題. 県南地域皮膚科懇話会. 平成 24 年 7 月 12 日, 八戸市.
- 3) 中野 創, 上出良一, 錦織千佳子, 川田 暁, 澤村大輔. 異型ポルフィリン症の遺伝子診断. 第 34 回日本光医学・光生物学会. 平成 24 年 7 月 28 日, 神戸市.
- 4) 中野 創, 上出良一, 錦織千佳子, 川田 暁, 澤村大輔. 異型ポルフィリン症: *PPOX* 遺伝子変異同定による確定診断. 第 64 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 平成 24 年 10 月 28 日, 広島市.

3. 著書

- 1) Kawada A, Kawara S, Nakano H. Erythropoietic protoporphyria. *Current Genetics in Dermatology, InTech, Croatia*, 2013 : 97-104.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし.

急性間欠性ポルフィリン症(AIP) 病因遺伝子異常の発生ホットスポット

研究分担者 大門 真 山形大学医学部内科学第三講座准教授

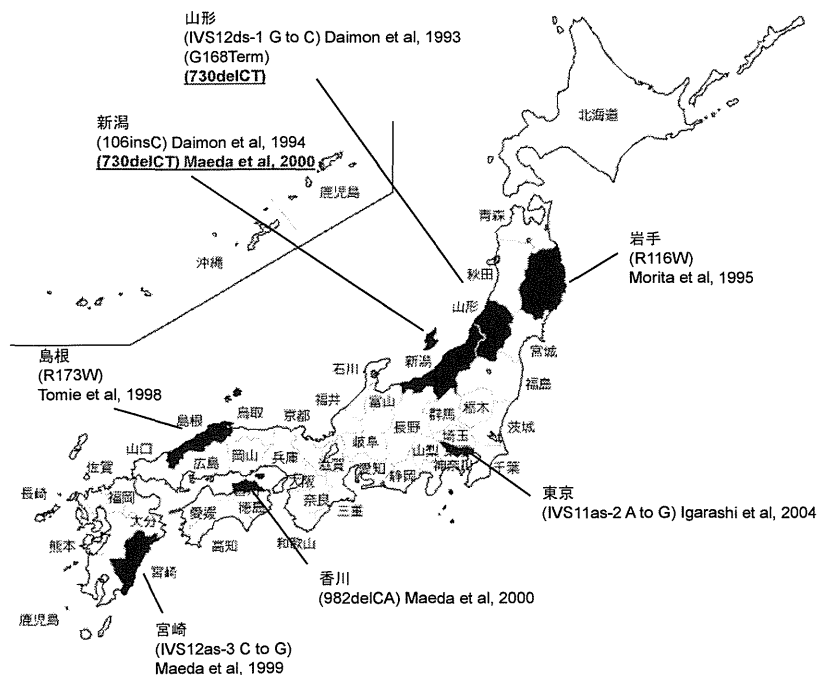
研究要旨

急性発作を主症候とする急性ポルフィリン症は、死亡にもつながる疾患であり、発症時速やかに、治療される必要がある。本症の1型である、急性間欠性ポルフィリン症(AIP)の病因遺伝子異常には、創始者効果は少なく、家系毎に遺伝子解析を行う必要があり、効果的な遺伝子解析システムの構築が望まれた。そこで、私達は、遺伝子解析システムの構築を行い、多くの症例でその有用性を実証してきた。そのなかで、同じ病因遺伝子異常を持つ2つの家系を認めたことより、その発生原因を解析した。本遺伝子の6個の単塩基多型(SNP)を用いたハプロタイプ解析より、ホットスポットに起因する事を、明らかにした。本邦の症例でも、ホットスポットに起因すると思われる遺伝子異常を認めたことより、今後の遺伝子解析では、この領域を含めたホットスポットの解析をより重点的に行う必要性が示唆された。

A. 研究目的

急性発作を主症候とする急性ポルフィリン症は、診断を誤り適切な治療を行わなかった場合、死亡にもつながる疾患であり、発症時速やかに、あるいは、発症前に診断されていることが望まれる。発症時の診断は、酵素異常にともなう各種ポルフィン体、および、その前駆物質の尿中および赤血球中の量を測定することより可能であるが、本疾患の病因遺伝子異常を持っているが未だ発症していない者（潜在者）の診断は、前述の検査では不可能なことが多い。潜在者の診断には、遺伝子診断が不可欠であるが、本疾患の病因遺伝子異常には特定のものがなく、家系毎に異なる病因異常をもっているのが通常である。すなわち、潜在者の診断を確実にを行うには、家系毎に病因遺伝子異常の解析をまず行い、その後、その遺伝子異常の有無により家系

図1. 本邦における急性間欠性ポルフィリン症家系の遺伝子異常



内の潜在者の診断を行う必要があり、私達は、本研究にて、遺伝子解析システムの構築を行い、多くの症例でその有用性を実証してきた（図1）。