

## 綜 説

# ポルフィリン症の病態発現分子機序の新仮説： オンリーワンのモデルマウスの解析から見えるもの

森 政 之

信州大学学術研究院先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所  
ニューロヘルスイノベーション部門

## A Novel Hypothesis on the Molecular Pathogenesis of Porphyria that is Deduced from Studies of a Unique Model Mouse

Masayuki MORI

*Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Shinshu University*

**Key words:** Hereditary porphyria, model mouse, gene mutation, protein aggregation, endoplasmic reticulum stress

ポルフィリン症, モデルマウス, 遺伝子変異, タンパク質凝集, 小胞体ストレス

### I はじめに

ポルフィリン症はヘム生合成で働く酵素をコードする遺伝子の変異に起因する疾患の総称である。病態の発症機序には未だ不明な点が多く、治療法も限られている。筆者は、ある遺伝性白内障モデルマウスの研究を通じて、このマウスがヘム合成で働く遺伝子に突然変異を有し、ヒトのポルフィリン症患者に類似した肝・皮膚病態を呈する他に類を見ないモデルであることを見出した。さらに、その病態発現の分子機序として過剰ポルフィリン前駆体による細胞内でのタンパク質凝集が関与することを明らかとしつつある。本稿ではこれらの経緯を紹介する。なお、本内容は様々な学術領域に渡るため、領域外で馴染みのない読者のために、\*を付した専門用語の解説を脚注に補足した。

### II ポルフィリン症

#### A ヘムとポルフィリン

ヘムはポルフィリンと二価の鉄原子からなる錯体であり(図1)、ヘモグロビン、一酸化窒素合成酵素、カタラーゼ、チトクローム P450などのヘムタンパク

質の補欠分子族として、呼吸、シグナル伝達、酸化、解毒などの様々な生命機能に関与する、生体にとって必須の分子である。このようなヘムは細胞内でスクシニルコエンザイム A とアミノ酸の一種であるグリシンを原材料として、異なる酵素によって触媒される 8 段階の反応によって生合成される(表1)。

#### B ポルフィリン症

ポルフィリン症は、ヘム生合成を触媒する酵素を

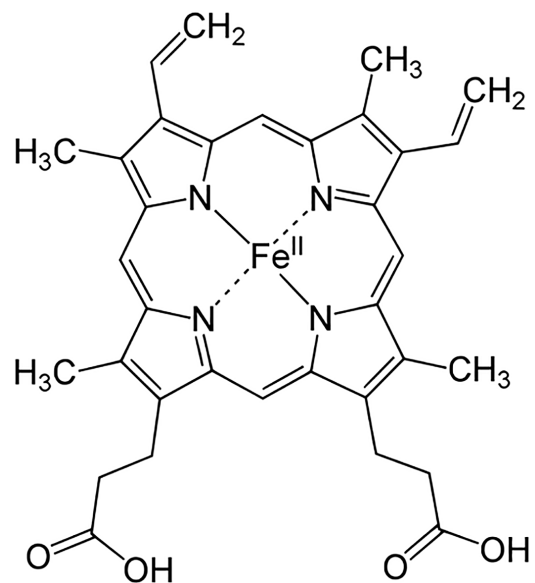


図1 ヘムの化学構造

Corresponding author: 森 政之 〒390-8621  
松本市旭3-1-1 信州大学学術研究院先鋭領域融合研究群  
バイオメディカル研究所ニューロヘルスイノベーション部門  
E-mail: masamori@shinshu-u.ac.jp

表 1 ヘム生合成段階と遺伝性ポルフィリン症

ヘム生合成段階	触媒酵素	病名	病型分類	遺伝子改変マウス
第1段階	アミノレブリン酸合成酵素 2	X連鎖優性プロトポルフィリン症	皮膚型	胎性致死 (ノックアウト)
第2段階	アミノレブリン酸脱水素酵素	アミノレブリン酸脱水素酵素欠損性ポルフィリン症	急性型	胎性致死 (ノックアウト)
第3段階	ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素	急性間欠性ポルフィリン症	急性型	離乳前致死 (ノックアウト)
第4段階	ウロポルフィリノーゲン合成酵素	先天性赤芽球性ポルフィリン症	皮膚型	症状あり (ノックアウトヘテロ+薬)
第5段階	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	晩発性皮膚ポルフィリン症	皮膚型	症状あり (ノックイン)
第5段階	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	肝性赤芽球性ポルフィリン症	皮膚型	胎性致死 (ノックアウト)
第6段階	コプロポルフィリノーゲン酸化酵素	遺伝性コプロポルフィリン症	急性型	胎性致死 (ノックアウト)
第7段階	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素	異型ポルフィリン症	急性型	糞尿所見のみ (ノックイン)
第8段階	フェロケラターゼ	赤芽球性プロトポルフィリン症	皮膚型	症状あり (ENU 誘発変異)

コードする 8 種の遺伝子のいずれかの変異に起因する疾患の総称である (表 1)。遺伝子変異により、そのコード産物である酵素の活性が低下し、ポルフィリン体あるいはその前駆体が体内組織に貯留することによって発症する。現在、変異遺伝子に基づき 9 つの病型に分類されている。いずれも非常にまれな遺伝性疾患であるが、各病型間で症状にオーバーラップがあり、診断が非常に難しい。より簡便には神経症状、精神症状、腹部症状を主徴とする急性ポルフィリン症と皮膚が日光に晒されたときに皮膚症状を引き起こす皮膚ポルフィリン症に分類されることもある。病態発現機序は不明であり、根治療法がない。本邦では厚生労働省により指定難病の一つとされ、全国の専門家からなる研究班において調査・研究が進められている。また、難病情報センター (<https://www.nanbyou.or.jp/entry/5545>) や患者の会 (<https://www.sakuratomonokai.com>) からの情報発信も行われている。

### C 遺伝性コプロポルフィリン症

ポルフィリン症の一つである遺伝性コプロポルフィリン症は、ヘム生合成系の第 6 段階であるコプロポルフィリノーゲンⅢからプロトポルフィリノーゲンⅨへの変換を触媒するコプロポルフィリノーゲン酸化酵素 (coproporphyrinogen oxidase; CPOX と略称される) をコードする CPOX 遺伝子の変異に起因する疾患である (表 1)。本症の患者からはこれまでに約 30 種の

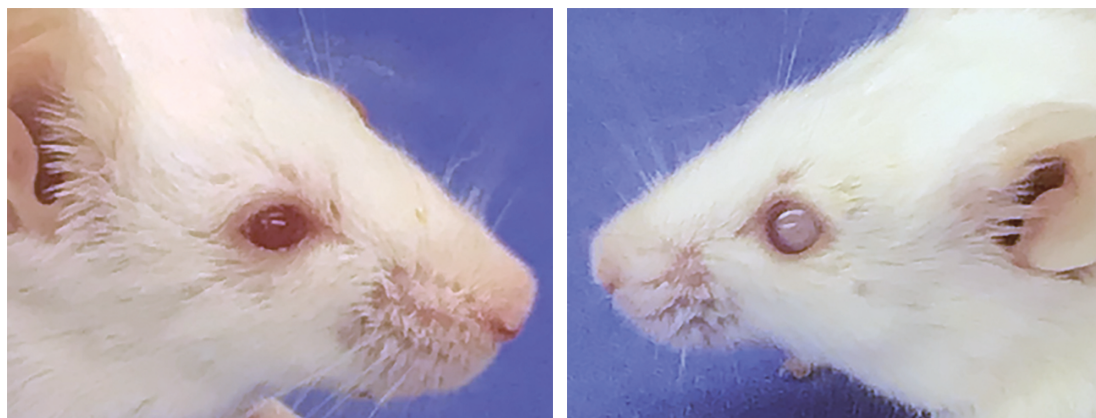
CPOX 遺伝子変異が同定されている<sup>1)</sup>。患者の体内組織には CPOX の基質であるコプロポルフィリノーゲンⅢが貯留し、これが糞尿中にも大量に排泄される。臨床所見として腹痛、嘔吐、便秘などの消化器症状、四肢脱力、痙攣、精神異常などの精神神経症状、高血圧、頻脈、発熱などの自律神経症状と、皮膚露出部での水疱形成、癬痕形成、色素沈着、皮膚の脆弱性などの光線過敏症、さらには肝障害が認められることもある。発症は思春期以降で、細胞内でのヘム要求性を喚起する薬物やアルコール摂取、内分泌性因子、飢餓、ストレス等の増悪因子が加わることで誘発される。

### Ⅲ ポルフィリン症のモデル動物の欠如

ポルフィリン症の病態発現機序の解明や治療法の開発にはモデル動物を用いた研究が必須である。しかしながら、ヒトのポルフィリン症の原因となる遺伝子変異や病態などを模倣する“良い”モデル動物は無かった<sup>2)</sup>(表 1)。従来、そのようなモデル確立の試みは原因遺伝子のノックアウトマウス\*の作出により行われていた。しかしながら、ヘムは生体にとって必須の分子であるため、この合成経路のどの段階であってもノックアウトアレル\*をホモ化して完全に遮断してしまうとマウスは胎生致死となる。一方、ノックアウトアレルと野生型 (正常型) アレルのヘテロ個体は野生型アレルホモ個体の 50 % 程度の十分な酵素活性を保

**遺伝子ノックアウトマウス**：遺伝子操作により 1 つ以上の遺伝子の機能を欠損させたマウス。従来はマウス胚性幹細胞 (embryonic stem (ES) 細胞) 中で相同組み換えを生じさせることで作製されていたが、近年は CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9) 系を用いたゲノム編集技術 (別項参照) により作製されることが多い。

**アレル**：1 つの遺伝子座につき、遺伝子の種類が複数存在する場合、これら一つひとつをアレル (対立遺伝子) と称する。



BALB/c (3か月齢 ♀)

BALB/c-*nct* (3か月齢 ♀)

図2 BALB/c-*nct*マウスにおける白内障

持するために病態を発現しない。異なる変異遺伝子をもつマウス同士を交配して酵素活性を低下させたり、ノックアウトアレルと野生型アレルのヘテロ個体にバルビツール酸系薬剤などのポルフィリン生合成需要を喚起する薬剤を連日投与して体内でのポルフィリン前駆体レベルを高めることで軽度な病態を一時的に発症させることができる例もあるが、有用性が高いとは言い難い。

#### IV ポルフィリン症モデルマウス発見の経緯

##### A 遺伝性白内障モデル BALB/c-*nct* マウス

BALB/c-*nct* マウスは、遺伝性白内障のモデルとして知られていた<sup>3)</sup>。雌雄ともに約3か月齢までに100%の個体が両眼のレンズ水晶体の白濁(=白内障)を自然発症する(図2)。*nct*はこのマウスの第一発見者を冠したNakano cataract<sup>4)</sup>が略されたもので、白内障の原因遺伝子を表している。BALB/cは一般的な医学研究などに使用されるアルビノ(白色)マウス系統である。すなわち、BALB/c-*nct*は*nct*白内障原因遺伝子をもつBALB/cマウス系統を意味する。BALB/c-*nct*における白内障は遺伝的に劣性の形質であり、*nct*をホモでもつマウスが白内障を発症する。

##### B *nct*の正体はコプロポルフィリノーゲン酸化酵素をコードする遺伝子の変異である

*nct*は自然突然変異遺伝子であることが分かっていた。そこで筆者は*nct*がどの遺伝子に生じたどのような変異なのかを明らかとすることを試みた。なお、

マウスを用いた研究については、全て信州大学動物実験計画書を提出し、動物実験委員会による審査を経て学長承認を得て行った。研究の結果、*nct*の正体はCPOXタンパク質をコードする遺伝子の一塩基置換変異\* (*Cpox*<sup>*nct*</sup>変異アレルと表記)であることを明らかとすることができた<sup>5)</sup>。この塩基変異の結果、BALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup>マウスのCPOXタンパク質の380番目のアミノ酸は野生型(例えばBALB/cマウス)でのアルギニンとは異なるロイシンに置換されている(図3A)。

興味深いことに、ヒトの遺伝性コプロポルフィリン症の一家系において、CPOXでの相同アミノ酸(ヒトでは391番目)におけるアルギニンからトリプトファンへの置換変異があり、そのためにCPOX酵素活性が野生型の約22%に低下していることが報告されていた<sup>1)</sup>。そこでBALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup>マウスを調査してみると、予想通りにCPOX活性が野生型の15%程度に低下していることが分かった(図3B)。*Cpox*遺伝子のノックアウトホモマウスがCPOX活性を完全に喪失するためにヘム合成が遮断されて胎生致死となってしまう<sup>6)</sup>のに対して、BALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup>変異遺伝子ホモ型マウスはこの残存活性があるために胎生致死とはならず発生、成長、繁殖すると考えられる。一方でこの大きなCPOX活性の低下のために、BALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup>マウスにおいては若齢時よりレンズや肝臓を含めて全身的に野生型マウスの100~500倍程

一塩基置換変異：ヒトやマウスの遺伝物質であるDNAの場合、グアニン(通常Gと表記される)、アデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)の4種類の塩基が、例えばグアニン(G)からチミン(T)のように別の塩基に置き換わってしまう突然変異のこと。

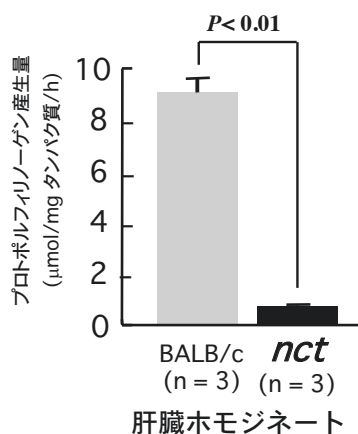
(A)

BALB/c ●● AGG AGA GGG C**G**G TAT GTG GAG ●● 遺伝子塩基配列  
 ●● アルギニン アルギニン グリシン アルギニン チロシン バリン グルタミン酸 ●● タンパク質アミノ酸配列

BALB/c-*nct* ●● AGG AGA GGG C**T**G TAT GTG GAG ●● 遺伝子塩基配列  
 ●● アルギニン アルギニン グリシン **ロイシン** チロシン バリン グルタミン酸 ●● タンパク質アミノ酸配列

380番  
アミノ酸

(B)



(C)

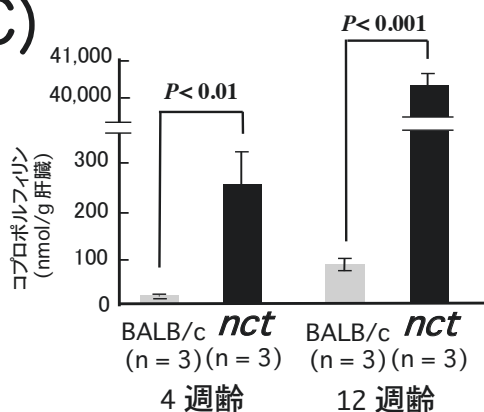


図3 BALB/c-*nct* マウスにおける (A) 遺伝子変異, (B) CPOX 活性の低下, および (C) コプロポルフィリンの貯留。詳細は既報<sup>5)</sup>を参照のこと。

度のコプロポルフィリンが貯留しており (図3 C), さらにヒトの遺伝性コプロポルフィリン症患者と同様に糞尿中にも大量のコプロポルフィリンを排泄していることも分かった<sup>5)</sup>。

#### V BALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup> マウスは皮膚と肝臓にも病態を呈する

以上の結果は, BALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup> マウスが臓器・組織レベルでもポルフィリン症状を自然発症している可能性を強く示唆した。そこでBALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup> マウスの臓器を病理学的に調査した結果, 雄に限定されていたものの, 遺伝性コプロポルフィリン症患者と同様に皮膚や肝臓にも病態を発症していることが分かった<sup>7)</sup>。皮膚に関しては, 2か月齢以降の一部の雄マウスに真皮層の線維化\*と肥厚, 皮下脂肪の薄化などの

強皮症様の病態が認められた (図4)。肝臓に関しては, 2か月齢以降の全ての雄マウスに肝細胞と細部核の肥大, 脂肪滴の貯留, マロリー体\*の形成, クッパー細胞\*の過形成などの重篤な病理変化が認められた (図4)。肝細胞が障害されていることは, 血液中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) のレベルが有意に上昇していることから確認された。一方, 雌の皮膚と肝臓にはどの月齢でも病理変化は認められなかった。このような病態発症の性差の原因は不明である。さらに, 握力低下 (図5), 便秘様症状, 乏尿など, ヒトのポルフィリン症の患者と類似した症状も呈することが分かった (未発表データ)。以上のデータはBALB/c-*Cpox*<sup>*nct*</sup> マウスが遺伝性コプロポルフィリン症患者を遺伝子変異, および病態の両面で模

**皮膚線維化:** 皮膚に膠原線維などの細胞外基質と称される物質が増加し, その結果, 皮膚が硬くなった状態。多くの場合, 活性化した真皮線維芽細胞から大量の細胞外マトリックス (とくにI型コラーゲン) が産生されることにより生じる。

**マロリー体:** ユビキチン化タンパク質, 中間径フィラメントであるケラチン8および18, p62等が不定形の構造物として蓄積した好酸性細胞質内封入体。アルコール性肝障害や肝細胞癌患者組織に認められる。

**クッパー細胞:** 肝臓を構成する細胞であり, 類洞に存在するマクロファージの一種。クッパー細胞の役割は多岐にわたり, 肝動脈や門脈から流れてきた異物や毒素, 老廃物などを細胞内に取込み, 消化分解や再利用を行うばかりでなく, サイトカインを産生し免疫反応を制御する機能も有する。



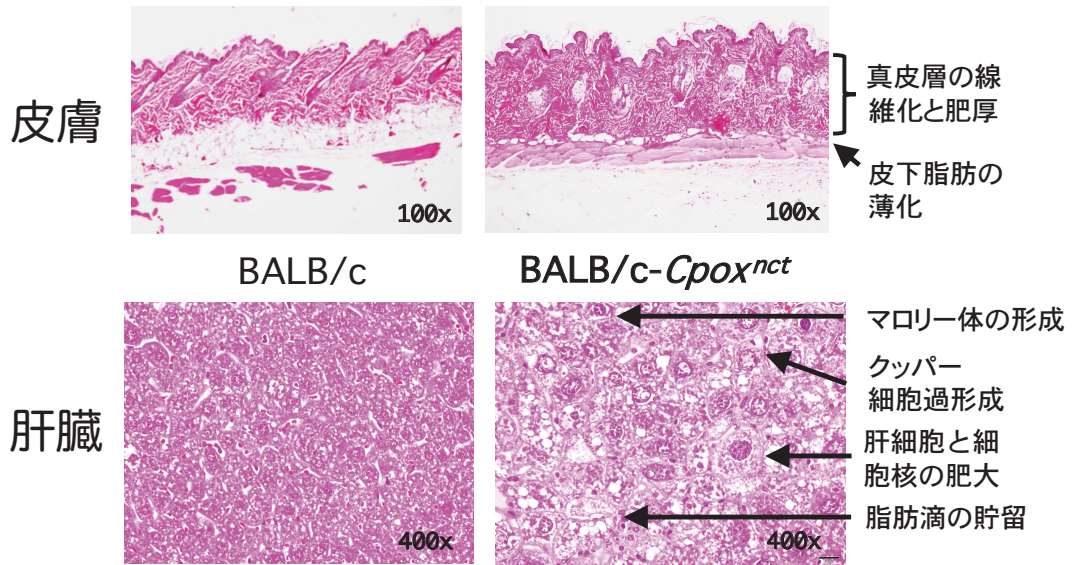


図4 3か月齢のBALB/c-*Cpox<sup>nct</sup>*雄マウスの皮膚と肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色病理像 (文献7より引用)

(A)



(B)

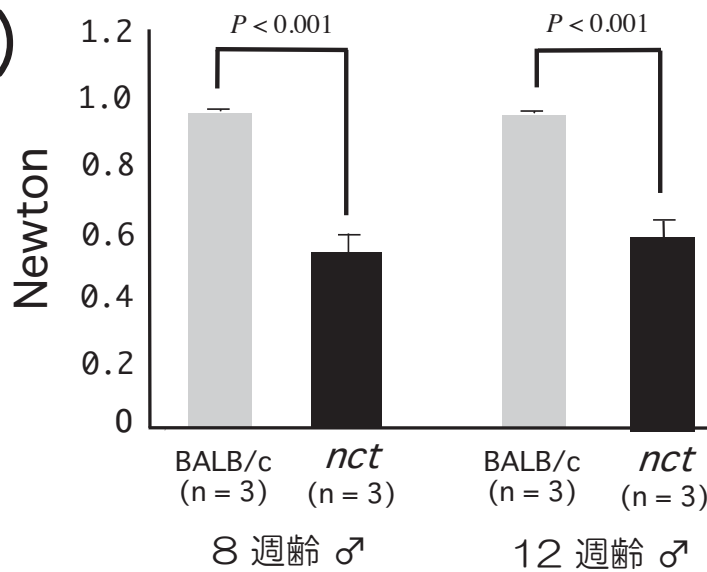


図5 BALB/c-*Cpox<sup>nct</sup>*マウスの握力低下。(A) 測定の様子。デジタルフォースゲージのグリッパにマウスを掴ませ、しっぽを手で後方に引っ張り、マウスがグリッパを離すまでに加わった握力の最大値を測定する。(B) 測定値の比較。

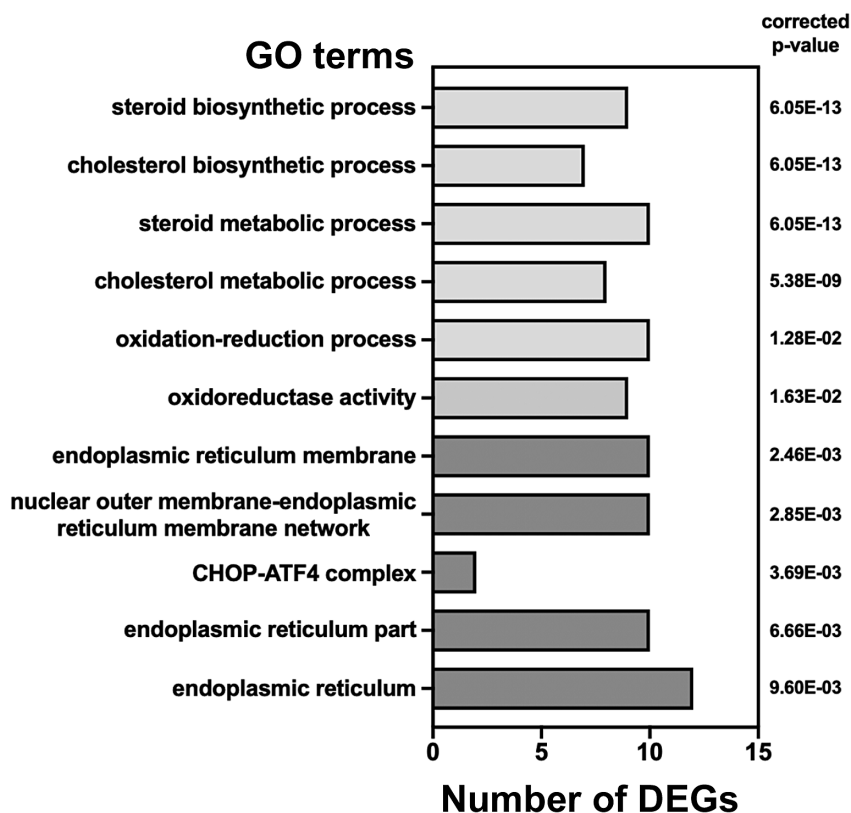


図6 BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスのレンズにおけるトランスクリプトームデータの発現差異遺伝子 (differentially expressed gene ; DEG) の遺伝子オントロジー (gene ontology ; GO) 解析の結果 (文献8より引用)。詳細は既報<sup>8)</sup>を参照のこと。

做する他に類を見ないモデルであることを示している。

## VI BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスの白内障発症にはレンズにおける小胞体ストレス応答の亢進が関与している

BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスにおけるコプロポルフィリンの慢性的かつ過剰な貯留が白内障や肝臓・皮膚病態を引き起こす機序は何だろうか？近年、様々な疾患病態の発症機序がトランスクリプトーム解析\*により明らかとされている。そこで、BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスのレンズのトランスクリプトーム解析を試みた<sup>8)</sup>。その結果、BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスのレンズにおいては、

小胞体ストレス応答\*が亢進していることを示すデータが得られた (図6)。小胞体ストレス応答の一部として細胞内でのメッセンジャーRNA (mRNA) からのタンパク質の翻訳が全体的に停止されるが、BALB/c-*Cpox<sup>net</sup>* マウスのレンズにおいても、その影響と考えられるクリスタリタンパク質の産生抑制が観察された。また、クリスタリンが凝集・不溶化もしていることが確認された。クリスタリンはレンズ繊維細胞の主要構成タンパク質であると同時に、他のタンパク質分子が正しい折りたたみをして機能を獲得するのを助ける分子シャペロンとしても機能している。得られたデータを総合すると、以下のような白内障発症機序が

**トランスクリプトーム解析**：細胞内または対象組織内における遺伝子転写産物 (メッセンジャーRNA ; mRNA) の全ての種類と量を解析すること。通常は大量のDNA塩基配列を高速に解読する装置である次世代シーケンサーを用いて取得した転写産物のリード数から遺伝子転写を定量化する。サンプルの遺伝子転写発現プロファイルをバイオインフォマティクス解析することで、病態の発症機序に関する手掛かりを得ることができる。

**小胞体ストレス**：細胞の小胞体内腔に高次構造の異常なタンパク質や正常な修飾を受けていないタンパク質が蓄積した状態のこと。このような折りたたみ不全タンパク質 (unfolded protein) は、変異タンパク質の発現、小胞体内のカルシウム枯渇、細胞への酸化ストレス、低グルコース状態や低酸素状態などの様々な生理的ストレスによって生じる。小胞体ストレスは細胞にダメージを与えるため、細胞にはこれを回避するシステムが備わっており、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response ; UPR) と呼称される。

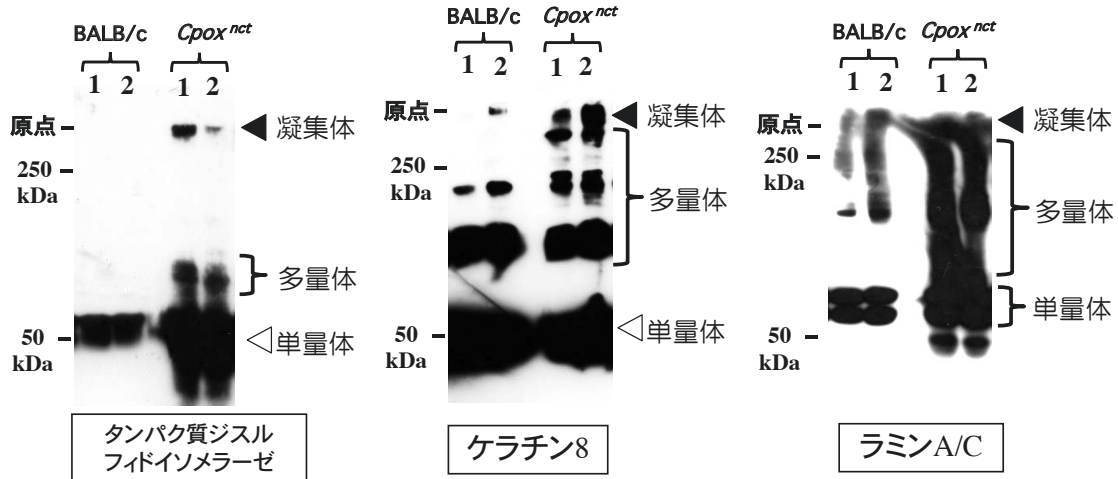


図7 3か月齢のBALB/c-*Cpox<sup>ncf</sup>*雄マウス肝臓のイムノブロットング解析像(文献7より引用)

想定される<sup>8)</sup>。レンズ内に慢性的かつ過剰に貯留したコプロポルフィリンがクリスタリンを含むタンパク質の変性や凝集を引き起こす。これらの変性・凝集タンパク質が小胞体ストレス応答を亢進させる。その結果、分子シャペロンであるクリスタリンの産生が抑制され、変性・凝集タンパク質の正常状態への復元が障害されてさらに蓄積し、小胞体ストレスを亢進させる。この悪循環が最終的に白内障の発症に帰結する。

### Ⅶ ポルフィリン症の発症機序の細胞内分子機序

BALB/c-*Cpox<sup>ncf</sup>*マウスでのコプロポルフィリンの貯留はレンズだけではなく肝臓にも生じていることから、肝臓においてもレンズと同様のタンパク質凝集が生じていることが想定された。この仮説を支持することとして、最近、培養肝細胞を用いた研究により、ポルフィリン前駆体がタンパク質と結合し、局所的に産生された活性酸素種とともにタンパク質の構造変換、凝集を生じさせることが報告された<sup>9)</sup>。そこでBALB/c-*Cpox<sup>ncf</sup>*マウスの肝臓内のタンパク質をイムノブロットング法\*により調査してみた。その結果、小胞体内においてタンパク質の折りたたみを触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、細胞質において細胞骨格を構成するケラチン8、核膜の裏打ちタンパク質であるラミンA/Cなど、様々な細胞内小器官のタンパク質が凝集体を形成していることが確認された

(図7)。これらのタンパク質は細胞と核の形態や恒常性の維持、遺伝子発現やタンパク質品質管理などに深く関与する。したがって、「これらを含めたタンパク質がコプロポルフィリンによって凝集されることでその機能が低下し、細胞の形態・機能が変化・攪乱され、BALB/c-*Cpox<sup>ncf</sup>*マウスの肝臓病態に帰結する」との機序が想定される。

### Ⅷ 今後の展望

ポルフィリン前駆体によるタンパク質凝集は、ポルフィリン症に認められる多彩な病態発現の機序をうまく説明できる可能性がある。この仮説が証明されたならば、それに立脚したポルフィリン症の医療の確立にもつながると期待されるが、それにはさらなる詳細な検証が必要である。ポルフィリン症患者においても貯留するポルフィリン前駆体により細胞内でタンパク質の変性や凝集が引き起こされているか否かの検証が必要である。また、変異遺伝子の違いにより発症するそれぞれのポルフィリン症の病態には違いもある。このような違いが、各疾患で貯留するポルフィリン前駆体の違いに起因する可能性も興味深い検証課題である。

遺伝性コプロポルフィリン症様病態を自然発症するBALB/c-*Cpox<sup>ncf</sup>*マウスは、病態発現の分子基盤を正確に理解し、本症の治療法を開発していく上で極めて有用なモデルである。一方、ヒト患者には白内障は認

イムノブロットング法：タンパク質の検出、特性評価、および定量に用いられる技術の一つ。実験手順は、最初にポリアクリルアミドゲル電気泳動により試料中のタンパク質を分離し、次に分離されたタンパク質をニトロセルロースまたはPVDFメンブランに転写(プロット)して固定する。検出には単純な抗原抗体反応を利用しており、抗体を用いる。まず、目的タンパク質を特異的に認識する1次抗体を反応させ、その後、標識2次抗体を1次抗体に結合させて抗原との複合体を検出する。その結果、目的タンパク質はメンブラン上でバンドとして可視化される。

められないこと、肝障害や皮膚症状の発症に性差は無いことなど BALB/c-*Cpox<sup>nct</sup>* マウスとヒト患者とでは病態発症特性が異なることも明らかとなってきた。これらの相違の原因は不明であるが、マウスから得られるデータをヒトに外挿する際には注意を要する。

9 種類のポルフィリン症については病因遺伝子変異

もよく分かっている一方で、良いモデルマウスは確立されていない。近年のゲノム編集\*の技術の発展によってヒトにおける病因遺伝子変異をマウスに再現することは容易となった。今後は有用なポルフィリン症モデルマウスが開発され、それらを用いた研究から新たな治療法の開発も進展することが期待される。

## 文 献

- 1) Lamoril J, Puy H, Whatley SD, et al: Characterization of mutations in the *CPO* gene in British patients demonstrates absence of genotype-phenotype correlation and identifies relationship between hereditary coproporphyrinuria and harderoporphyria. *Am J Hum Genet* 68: 1130-1138, 2001
- 2) Yasuda M, Desnick RJ: Murine models of the human porphyrias: Contributions toward understanding disease pathogenesis and the development of new therapies. *Mol Genet Metab* 128: 332-341, 2019
- 3) Matsuzawa A, Wada E: Retarded and distinct progress of lens opacification in congenic hereditary cataract mice, Balb/c-*nct/nct*. *Exp Eye Res* 47: 705-711, 1988
- 4) Nakano K, Yamamoto S, Kutsukake G, et al: Hereditary cataract in mice. *Jpn J Clin Ophthalmol* 14: 1772-1776, 1960
- 5) Mori M, Gotoh S, Taketani S, et al.: Hereditary cataract of the Nakano mouse: Involvement of a hypomorphic mutation in the coproporphyrinogen oxidase gene. *Exp Eye Res* 112: 44-50, 2013
- 6) Conway AJ, Brown F, Fullinaw RO, al: A mouse model of hereditary coproporphyrinuria identified in an ENU mutagenesis screen. *Dis Model Mech* 10: 1005-1013, 2017
- 7) 森 政之: 遺伝性コプロポルフィリン症マウスにおける病態発症機序の解明. *細胞* 53: 34-37, 2021
- 8) Liu C, Miyahara H, Dai J, et al: Involvement of increased endoplasmic reticulum stress in the development of cataracts in BALB.NCT-*Cpox<sup>nct</sup>* mice. *Exp Eye Res* 215: 108905, 2022
- 9) Maitra D, Bragazzi Cunha J, Elenbaas JS, et al: Porphyrin-induced protein oxidation and aggregation as a mechanism of porphyria-associated cell injury. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8: 535-548, 2019

(R 4. 1. 31 受稿)

---

ゲノム編集: 生物が持つゲノム DNA 上の特定の塩基配列を狙って変化させる技術。現在の主流は CRISPR-Cas9系を使用する方法で、疾患モデル動物の作出だけでなく、農作物、家畜、魚の改良などの多様な目的に応用されつつある。