

令和元年5月20日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08619

研究課題名(和文)日本人ポンペ病に対する新生児マススクリーニングおよびハイリスク群スクリーニング

研究課題名(英文) Newborn screening and high risk screening for Pompe disease in Japan

研究代表者

奥宮 敏可 (Okumiya, Toshika)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：50284435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は日本人新生児103,204例を対象にポンペ病のマススクリーニングを実施した。その結果、71例が基準値以下の酵素活性を示した。それらのA Glu遺伝子解析により、32例(45.1%)は[c.1726G>A;c.2065G>A]のホモ接合体で、内24例には変異は無く8例には各1個の変異が認められた。残る37(52.1%)例はヘテロ接合体で、内35例には変異は無く、2例にはそれぞれ2種類の変異が認められた。[c.1726G>A;c.2065G>A]多型を両アリルに持たない1症例は、2種類の変異を有していた。これらの遺伝子解析の結果から、3例の新生児が遅発型ポンペ病であるものと診断された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は日本人新生児103,204例を対象に、アジア人固有の多型[c.1726G>A;c.2065G>A]の迅速解析法と当該遺伝子多型の影響を低減したBa/Zn法、ならびに次世代シーケンサーによる遺伝子解析を技術基盤として、わが国初のポンペ病マススクリーニングを実施した。その結果、血液濾紙(Ba/Zn法含む)や培養線維芽細胞による活性測定だけでは、最終診断まで至らないことが示され、次世代シーケンサーを用いたA Glu遺伝子解析が有効であることが示唆された。この早期診断により、より速い治療介入が可能となり、患者のQOLやADLを顕著に完全できるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：We have performed newborn screening for Pompe disease with dried blood spots in Japanese population, from April 2013 to November 2016, in which 103,204 newborns were screened. 71 had low acid alpha-glucosidase (A Glu) activity. GAA sequencing showed that 32(45.1%) homozygotes and 37 (52.1%) heterozygotes for pseudodeficiency alleles [1726G>A; 2965G>A], respectively. Eight of 32 newborns with homozygous [1726G>A; 2965G>A] alleles had one mutation each. Two of 37 newborns with heterozygous [1726G>A; 2965G>A] alleles had two mutations each. Only one newborn who had two mutations did not harbor [1726G>A; 2965G>A] alleles. Based on these data, no infantile-onset Pompe disease was detected, and three newborns were diagnosed with potential late-onset Pompe disease. It was difficult to distinguish newborns with [1726G>A; 2965G>A] alleles from newborns with pre-symptomatic Pompe disease using A Glu assays in DBSS or fibroblasts, GAA gene sequencing was necessary.

研究分野：遺伝性代謝病の分子診断学

キーワード：ポンペ病 酸性 - グルコシダーゼ 新生児マススクリーニング 型糖原病 ライソゾーム病 乾燥 血液濾紙

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライソゾームに存在する加水分解酵素の1つが遺伝的に欠損することにより、当該酵素に対応する天然基質が体内に過剰に蓄積し様々な症状をきたす一連の疾患をライソゾーム病と称する。1991年、ゴーシェ病に対する酵素補充療法が開始されて以来、ファブリー病、ポンペ病(型糖原病)さらにムコ多糖症(、および型)等に対する組換え酵素製剤の研究開発が行われるに至った。国内ではゴーシェ病やファブリー病、ムコ多糖症に対する組換え酵素を用いた酵素補充療法が厚生省に承認され既に臨床に応用されている。これらの疾患に続く酵素補充療法の対象疾患としてポンペ病が注目され、組換え酵素製剤(Myozyme™)の使用が、わが国でも2007年に承認された。ポンペ病はライソゾームに存在する酸性-グルコシダーゼ(A Glu)の遺伝的欠損に起因する遺伝性代謝異常症(糖原病としても知られる)で、本酵素活性の顕減により骨格筋や心筋、肝を中心にグリコーゲンが過剰蓄積する疾患である。したがって、他の遺伝性欠損症と同様に、患者の早期発見が効果的治療法の要件と考えられる。本症の診断は、筋生検材料や培養繊維芽細胞を用いたA Glu活性の測定によって行われてきた。しかし、新生児スクリーニングの試料としてこれらの臨床材料を用いることは、患者への負担や長期におよぶ細胞培養期間の必要性等から事実上不可能である。そのため、他の新生児スクリーニングと同様に、採取が容易な血液試料を用いたA Glu活性測定が理想的とされるが、血液細胞(主に好中球)由来の類似酵素MG(maltase-glucoamylase)の存在により、特異的な酵素診断法は不可能であった。我々は、この問題を解決するため、経口糖尿病薬として開発されたアカルボースがMG活性を特異的に阻害することを利用し、それを混合白血球に応用してA Gluの特異的測定法を確立した(Okumiya T, et al. Mol Genet Metab, 2006)。

申請者らはプレ実験として健常日本人715例およびポンペ病患者18例から得た乾燥血液濾紙を用いて直径約3.2mmの血液ディスクに打ち抜き酵素活性を測定とした。測定には、人工蛍光基質(4MU-A Glc)を用い、血液ディスク中に含まれるA Gluにより遊離した4MUの蛍光強度を測定した。遺伝子多型(2つの遺伝子多型c.1726G>Aとc.2065G>Aから構成される10種類のディプロタイプ)の解析は活性測定に使用した後の血液ディスクをテンプレートとして用い、当研究室で確立したARMS法にて解析を行った。その結果、健常者の酵素活性分布は二峰性を示し、大多数を占める高活性グループとは別に一部患者活性領域と重なる低活性グループが約3.9%存在することが明らかとなった。遺伝子多型解析により、この低活性グループはc.1726Aとc.2065Aのホモ接合体(AAホモ接合体)であることが判明した(kumamoto S, et al. Mol Genet Metab, 2009)。このことは、アジア系人種を対象とした本症の新生児スクリーニングにおいては、この遺伝子多型の存在を考慮しなければならないことを意味し、現在の方法では多くの偽陽性を出してしまうことが推察された。

そこで、申請者らはAAホモ接合体と患者を明確に識別する分析技術を確立する目的で、反応溶液中に存在するヘモグロビンの影響とその回避策について検討した。その結果、ヘモグロビンは遊離した4MUの蛍光強度に直接影響を与え、著しくその値を低下させることが判明した。そこで、このヘモグロビンを効率的に除去する方法について検討を行った結果、水酸化バリウムと硫酸亜鉛を用いて酵素反応後の溶液からヘモグロビンを除去することで、高感度で信頼性の高いA Glu活性測定が可能となった(Ba/Zn法: Shigeto S, Mol Genet Metab, 2011)。

2. 研究の目的

AAホモ接合体の存在により、アジア系人種のためのポンペ病新生児スクリーニングは困難と考えられていた。この問題を解決するため我々はBa/Zn法を開発した。このBa/Zn法とARMS法を技術基盤として、アジア系人種のためのポンペ病スクリーニングシステムを構築した。本法は、まず血液濾紙を試料として従来法による一次スクリーニングを行い、約97%の健常者を除き、残りの約3%の症例を対

象に二次スクリーニングとして Ba/Zn 法を実施し、更に約 0.1%まで絞り込むことができると推定された。この約 0.1%の症例の遺伝子多型を解析し、もし[c.1726G;c.2065G/c.1726G;c.2065G]であれば、ポンペ病の可能性が極めて高いと判断し、それ以外の遺伝子多型の場合でも Ba/Zn 法のカットオフ値 4.0 以下の場合には、培養線維芽細胞を用いて A Glu 活性を測定し確定診断を行うこととした。全血からリンパ球(単核球)を分取して、それを酵素試料として酵素診断する方法も可能であるが、既にその方法は確定診断には適さないことを検証していたので利用しなかった。培養線維芽細胞を用いた A Glu 活性測定の基準値としては、健常者と異なる遺伝子多型毎の測定値、さらにポンペ病の臨床表現型毎の測定値が既に集積されているので、その値を用いて診断の根拠とした。

3. 研究の方法

熊本県(一部福岡県を含む地域)で出生した新生児を対象として、被検者の保護者あるいは代諾者に対して充分説明を行い文章による同意を得たうえで、被験者から得られた乾燥血液濾紙約例を用いて、我々が確立したスクリーニングシステムを用いてポンペ病のマスクリーニングを実施した。血液濾紙によるスクリーニングによりポンペ病が強く疑われる症例が認められた場合には、被験者の保護者あるいは代諾者の同意のもとに皮膚片を採取し、培養皮膚線維芽細胞を樹立した。この培養皮膚線維芽細胞を試料として A Glu 活性を測定し、基準値以下の場合にはポンペ病を疑う症例として、血液濾紙あるいは培養皮膚線維芽細胞からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサにより A Glu 遺伝子コーディング領域のフルシーケンスを行った。A Glu mRNA の発現レベルの解析には、患者の培養皮膚線維芽細胞を用い、参照遺伝子としてはヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を用い CP 法により評価した。

一次スクリーニングとしては、乾燥血液濾紙を専用のパンチング装置で、直径約 3.2mm の血液ディスクとして打ち抜き、その 1 枚を専用抽出液 100 μ L で抽出し、その抽出液 20 μ L を酵素試料としてマイクロプレートに入れ、さら 4.5 μ mol/L のアカルボースを含む 2.0 mmol/L 4MU- Glc、CP 緩衝液 (pH 4.0) を 40 μ L 添加し混和後、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。酵素反応後、反応停止液として 0.2% SDS 含有 0.2 mol/L グリシン - NaOH 緩衝液 (pH 10.7) を 190 μ L 添加し、A Glu 活性により遊離した 4MU の蛍光強度を、励起波長 360nm、蛍光波長 450nm としてマイクロプレートリーダーで測定した。

二次スクリーニングとしては、直径約 3.2mm の血液ディスク 1 枚を 1.5 ml のプラスチックチューブに入れ、そこに 3.0 μ mol/L のアカルボースを含む 2.0 mM 4MU- Glc、CP 緩衝液 (pH 4.0) を 60 μ L 添加し、10 分間激しく混和後、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。酵素反応後、0.15mol/L 水酸化バリウム溶液を 30 μ L 添加し、充分混和後、室温で 5 分間放置し、さらに 0.15 mol/L 硫酸亜鉛溶液を 30 μ L 添加し、充分混和後、室温で 10 分間放置した。水酸化バリウム溶液と硫酸亜鉛溶液により懸濁した反応液を 12,000rpm で 5 分間遠心し、その上清 90 μ L を取りマイクロプレートに移した。この上清に、反応停止液として 0.1% TritonX100 ならびに 0.2% SDS 含有 0.4 mol/L グリシン - NaOH 緩衝液 (pH 10.7) を 160 μ L 添加し、A Glu 活性により遊離した 4MU の蛍光強度を、励起波長 360 nm、蛍光波長 450 nm としてマイクロプレートリーダーで測定した。

培養皮膚線維芽細胞による A Glu 活生測定には人工蛍光基質 4MU- Glc ならびに天然基質であるグリコーゲンを用いた。人工蛍光基質による測定では、培養線維芽細胞ホモジネートを酵素試料として、一次スクリーニングと同様の方法で行った。なお、培養線維芽細胞には MG 活性が存在しないので半応液中にはアカルボースを加えなかった。グリコーゲンによる A Glu の測定では、天然基質であるグリコーゲンを基質として、培養線維芽細胞ホモジネートを反応させ、グリコーゲンから加水分解され遊離する微量のグルコース濃度を、我々の研究室で開発した超高感度なグルコース定量方法で検出し、

単位時間・単位蛋白質量当たりのグルコース遊離量を算出し、グリコーゲンの分解活性を求めた。

4．研究成果

2013年4月から2016年11月までに103,204件の新生児を対象にポンペ病のマススクリーニングを実施した。一次スクリーニングと二次スクリーニング(Ba/Zn法)で111例(0.108%)の症例まで絞り込むことができた。この症例数はプレ実験の成績と一致していた。この111例の中から、培養線維芽細胞によるA Glu活性測定ならびに次世代シーケンサにより3例の症例が遅発型ポンペ病と診断された。培養線維芽細胞による活性測定で明らかな低下が認められるものの次世代シーケンサによる遺伝子解析により既報の明らかな遺伝子変異が認められなかった症例は10例認められたことから、これらの症例では新たな遺伝子変異の存在も考えられるため注意深いフォローアップが必要と思われた。

10例中9例が、どちらかのアレルに[c.1726A;c.2065A]を有していたことから、ポンペ病発症に[c.1726A;c.2065A]多型が関与しているか否か調べるために、片側のアレルに病因遺伝子変異は同定されているが、もう一方のアレルに遺伝子変異が同定されていない患者由来の培養線維芽細胞をスクリーニングし、[c.1726A;c.2065A]多型を両方あるいは片側のアレルに有する症例を4例同定した。その内、1例は片側に既知の病因遺伝子変異を有しており、それとは異なるアレルに[c.1726A;c.2065A]多型と既知の多型を数個有していた。そこで、SDMにより、[c.1726A;c.2065A]を有するA Glu cDNAと[c.1726G;c.2065G]を有するA Glu cDNAに同定された既知の遺伝子多型(アミノ酸が置換するもの)をそれぞれ組み込み、発現コンストラクトを作製した。これらの発現コンストラクトをCOS-7細胞に導入し、様々なバリエーションA Glu酵素蛋白質を発現させ、ウエスタンブロッティングと酵素活性測定(人工蛍光基質とグリコーゲン基質)により、既知遺伝子多型と[c.1726A;c.2065A]のコンビネーションがA Glu酵素機能へ与える影響を調べた。その結果、アジア系人種に比較的高頻度に求められる既知の遺伝子多型が[c.1726A;c.2065A]と共存する場合には、細胞内に前駆体酵素は若干認められたが成熟体A Gluがほとんど発現されず、細胞内酵素活性は検出限界以下となることが判明した。このことから、従来まで単独ではポンペ病の原因とならないと考えられていた[c.1726A;c.2065A]多型は、他の遺伝子多型(アミノ酸置換するもの)と共存することで、A Gluの発現に著しい影響を与えることが証明された。このことは、従来までは各1つの病因遺伝子変異を両アレルに同定することで、病気の原因を説明してきたが、複数の多型が共存することで、いわば「複合型遺伝子多型」として働き、酵素活性に直接影響を与えるという、新たな遺伝性疾患の発症概念を提起するものである。

103,204件を対象に実施したポンペ病の新生児マススクリーニングにより顕著な活性低下を示した10症例は、培養線維芽細胞の酵素活性測定により、全症例ともに遅発型ポンペ病の可能性が示された。この中で遺伝子解析の結果、2つの既報の遺伝子変異を有していたのは3例だけであった。このことから、今回のマススクリーニングでポンペ病(遅発型)と確定診断された症例は3例とすることとした。しかし、既報以外の未知の遺伝子変異の存在を否定できないことから、残る7例に関してはポンペ病を完全否定することは危険であるものと考えられる。これらの症例が壮年期にポンペ病を発症しないことは否定できない。今回の研究成果から原因不明の神経筋疾患患者(成人)の中に、予想を上回るポンペ病が潜在している可能性が予想される。そこで、確定診断がなされていないが臨床症状として明らかに神経筋症状のある患者から得られた筋生検材料の凍結切片を試料として、酵素活性を測定する方法を確立した。現在、その方法を用いて年間約700例の患者のハイリスクスクリーニングを行っている。残念ながらその研究は現在進行中であり、結果は現時点で集計されていない。その成果が集積されれば、今まで確定診断されていなかった遅発型ポンペ病の頻度が明らかになり、神経内科領域へのポンペ病の除外診断の重要性を啓発することができるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) Momosaki K, Kido J, Yoshida S, Sugawara K, Miyamoto T, Inoue T, Okumiya T, Matsumoto S, Endo F, Hirose S, Nakamura K. Newborn screening for Pompe disease in Japan: report and literature review of mutation in the GAA gene in Japanese and Asian patients. *J Hum Genet* (in press), <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0603-7>, 2019.

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. 血液濾紙を用いたポンペ病患者の遺伝子解析. 第10回日本臨床検査学教育学会学術大会(松本市)2015年8月20日
- 2) 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. 遺伝性代謝病を対象とした組換え酵素製剤と化学シャペロンの併用療法の有効性. 第10回日本臨床検査学教育学会学術大会(松本市)2015年8月20日
- 3) 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病における遺伝子変異のホットスポットの解析. 第55回日本臨床化学会年次学術集会(大阪市)2015年10月31日
- 4) 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. ポンペ病に対する酵素補充と化学シャペロンの併用療法の分子メカニズム. 第55回日本臨床化学会年次学術集会(大阪市)2015年10月31日
- 5) 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. ガスリー濾紙からのゲノムDNAの抽出ならびにダイレクトシーケンス法の確立. 第62回日本臨床検査医学会学術集会(岐阜市)2015年11月20日
- 6) 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. 遺伝性代謝病に対する化学シャペロンのフォールディング制御の解析. 第62回日本臨床検査医学会学術集会(岐阜市)2015年11月21日
- 7) 石橋潤一, 奥宮敏可, 山中万次郎. 遺伝性代謝病発症への複合型遺伝子多型の関与. 第11回日本臨床検査学教育学会学術集会(神戸市)2016年9月1日
- 8) 石橋潤一, 西岡和輝, 奥宮敏可, 山中万次郎. ポンペ病発症におけるアジア人固有の遺伝子多型の関与. 第63回日本臨床検査医学会学術集会(神戸市)2019年9月3日
- 9) 石橋潤一, 奥宮敏可, 山中万次郎. 複数の遺伝子多型による単一遺伝子病発症の可能性. 第56回日本臨床化学会年次学術集会(熊本市)2016年12月3日
- 10) Okumiya T. New diagnostic and therapeutic approaches for Lysosomal diseases. Health Science Symposium between Kumamoto University and Naresuan University (Kumamoto) March 28, 2016
- 11) 田中智宏, 一ノ瀬祐果, 國宗勇希, 江良択実, 奥宮敏可. ポンペ病由来 iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導および機能解析. 第58回日本臨床化学会年次学術集会(名古屋)2018年8月25日
- 12) 國宗勇希, 奥宮敏可. 複数の遺伝子多型が共存すると遺伝子変異として働き単一遺伝子病の原因となる. 日本人類遺伝学会第63回大会(横浜)2018年10月12日
- 13) 國宗勇希, 山中万次郎, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病における遺伝子変異のホットスポットはスプライス異常をもたらす. 第65回日本臨床検査医学会学術集会(東京)2018年11月17日
- 14) Okumiya T. New Therapeutic Approach for Lysosomal Storage Disease. The 2nd Health Science Symposium between Naresuan University and Kumamoto University (Thailand) February 15, 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：細胞内酵素タンパク質の構造異常の正常化方法、細胞内酵素タンパク質の構造異常の検出方法、及び、遺伝性代謝病の治療方法ならびにその治療効果の予測・評価方法

発明者：熊本大学、奥宮敏可、西岡和樹、石橋潤一

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-087502

出願年：2016 年 4 月 25 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

中村公俊 (NAKAMURA KIMITOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号 30336234

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。