

令和元年5月9日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08958

研究課題名(和文) ムコ多糖症II型に対する新生児スクリーニングと確定診断法の開発

研究課題名(英文) Development of screening and diagnostic assay for mucopolysaccharidosis type II

研究代表者

真嶋 隆一 (Mashima, Ryuichi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臨床検査部・専門職

研究者番号：00401365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずムコ多糖症II型の原因酵素活性測定系を確立するためLC-MS/MSを利用したイズロン酸-2-スルファターゼの酵素活性の測定法を検討した。多重反応モニタリングを用いた複数疾患同時測定系の構築を念頭に分離と検出の条件を検討し、日間誤差値が良好となる条件を設定した。次に本疾患のバイオマーカーであるグルコサミノグリカンに酸性メタノール条件下で2糖に化学分解し、デルマタン硫酸とヘパラン硫酸の誘導体としてLC-MS/MSで定量した。さらに他のライソゾーム病酵素活性法を開発するため、上記の分析条件を一部変更して最終的に11疾患の酵素活性の同時測定を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開始当時において、ムコ多糖症II型患者の酵素活性は少なくとも日本国内においてほとんど蛍光法で測定されていた。従ってLC-MSで測定する有用性を示した本研究の成果は臨床検査学および分析化学的に学術的特色がある。本研究の結果、LC-MS法を採用することで、遺伝的に酵素活性値が低いが発症しないことが知られている被検者を適切に正常と判定することや、複数疾患を同時に測定可能となった。本研究成果により正確な診断と早期発見が可能になったことから、患者における治療上の大きなメリットがあり、医療経済的効果がある。また新生児スクリーニングに応用された場合、公衆衛生的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mucopolysaccharidosis type II (MPS-II, OMIM 309900) is an X-linked disorder characterized by visceral disorder, bone deformation, CNS involvement, as well as an accumulation of glycosaminoglycan in the body. MPS-II is caused by a deficiency of iduronate-2-sulfatase enzyme activity. In this study, thus, we aimed to establish an assay procedure for enzyme activity and biomarkers for MPS-II using LC-MS/MS. First, to quantify the enzyme activity, a 3 mm punch of DBS was incubated with substrate and internal standard. After 20 h of enzyme reaction at 37 °C, the enzyme reaction products were extracted and quantified using LC-MS/MS. For the quantification of dermatan sulfate and heparan sulfate, dried urine was reacted in methanolic 3M HCl at 65 °C for 75 min. The reaction products were quantified using LC-MS/MS. In both assays, the population of MPS-II-affected individuals was separated from that of controls, demonstrating that diagnosis of MPS-II may be performed with one of these methods.

研究分野：臨床検査学

キーワード：ムコ多糖症II型 酵素活性 バイオマーカー LC-MS/MS

### 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症（Mucopolysaccharidosis）は先天代謝異常症であり、病型に応じた原因遺伝子が同定されている遺伝性疾患である。このうち最も多い病型はヨーロッパおよびアメリカのコーカソイド系ではムコ多糖症Ⅰ型であることが知られている。これに対して日本およびアジアで発見されるムコ多糖症の50%はムコ多糖症Ⅱ型である。本疾患の原因遺伝子がイズロネート-2-スルファターゼと同定されたことにより、以前効果的と考えられていた骨髄移植に代わり酵素補充療法が開発され、多く用いられるようになってきている。

一般的に治療法が確立されている小児疾患においては、患者を早期発見し、治療を迅速に行うことが治療成績の向上のために重要である。このことは、すでに一般の小児科医の共通の認識となっている。特にムコ多糖症を含めたライソゾーム病は症状が全身で認められ、かつ症状は不可逆的な変性疾患であるため、早期発見と早期治療が必要である。こうした背景から、新生児期に精度良く患者を発見する方法論の開発が希求されてきた。歴史的には、1960年代に考案された乾燥ろ紙血検体（一般に Guthrie card として知られる）から酵素を抽出し、蛍光物質である 4MU と結合した基質を用いて、酸性条件下で酵素活性を測定する方法が考案されている。この方法は簡便であり、測定装置も汎用蛍光プレートリーダーのため、安価に測定できる利点がある。しかし、バックグラウンドが高いなどの問題点があり、特に酵素活性値が低い場合に判定が難しい場合が多いことが指摘されている。なおムコ多糖症の蓄積物質はグルコサミノグリカンであり、これは分子量数万のポリマーである。従って特にスクリーニングを目的とする場合、定量が容易である酵素活性を測定することが一般的である。

### 2. 研究の目的

ムコ多糖症Ⅱ型は日本では約5万人に1人の割合で発見される先天代謝異常疾患である。最近の研究成果により、酵素補充療法をはじめとした種々の治療法が開発されている。従って現在では、ムコ多糖症Ⅱ型は早期に発見して治療する疾患であると考えられている。この際に重要なことは早期発見の技術である。ムコ多糖症Ⅱ型の原因酵素であるイズロネート-2-スルファターゼ活性は、これまで

蛍光基質を利用して測定されてきたが、正常下限値の健常者と患者の酵素活性値による区別が難しかった。そこで本研究では、最近開発された高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

(LC-MS/MS) による酵素活性測定法の分析バリデーションを実施するとともに、臨床検体を用いたカットオフ値の推定を行った。さらに化学診断を目的として尿中マーカーの測定法を検討した。

表1 LC-MS法（本法）と従来法の比較

	本法	従来法
検体	乾燥ろ紙血	同左
装置	LC-MS	蛍光プレートリーダー
基質	合成基質	蛍光標識基質
アッセイ速度	やや遅い	早い
バックグラウンド	低い	やや高い
特徴	擬陽性が少ない	擬陽性が多い

### 3. 研究の方法

本研究ではムコ多糖症Ⅱ型の原因酵素であるイズロン酸-2-スルファターゼの迅速かつ高感度な測定法の開発を試みた。分析バリデーションを実施するとともに、少数例の臨床検体を使用して、臨床検査学に有用なカットオフ値の推定を行なった。バイオマーカーである尿中デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸は、被験者の尿を乾燥後、メタノール性 3M 塩酸下で反応させた後、LC-MS/MS で定量した。以下に各研究項目における方法を記載した。

#### 【MPS-II 酵素活性測定系の確立】

まず既報に従い、ムコ多糖症Ⅱ型の原因酵素であるイズロン酸-2-スルファターゼの酵素活性の測定法を検討した。まず 3 mm DBS 1 枚を 96 ウェルプレートに打ち抜き、これを酵素源と

した。次に、ライソゾーム酵素活性測定に最適な pH 5 の緩衝液中で溶解した基質(250  $\mu\text{M}$ )と反応生成物に対する内部標準物質(5  $\mu\text{M}$ )の混合物を添加した(30  $\mu\text{L}$ )。この溶液を 37°C にて 20 時間、攪拌しながら反応させた。酵素反応終了後、得られた生成物を酢酸エチルを溶媒として有機相に抽出したのち、溶媒を窒素気流下で乾固後、LC-MS/MS の移動相に溶解して酵素反応生成物を定量分析した。酵素活性値は内部標準物質の濃度を基準とし、 $\mu\text{mol/h/L blood}$  で算出した。

#### 【バイオマーカー測定系の確立】

ムコ多糖症 II 型を発症した場合、患者尿中にはデルマタン硫酸とヘパラン硫酸が蓄積する。本研究ではこれらのバイオマーカーの LC-MS/MS での測定法を検討した(図 4)。患者から尿を採取し、この一部(100  $\mu\text{L}$ )を遠心エバポレーターで乾固する。この後、塩酸メタノール(Sigma)を加え、65°C で 75 分間、正確に反応させた。室温に冷却後、溶媒を再度遠心エバポレーターで除去し、LC-MS 用の移動相に再懸濁した。一部を LC-MS/MS に注入し、逆相モードで分離分析を行った。デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸は、MRM モードにおいて、 $m/z$  426>236 および 384>162 で検出した。定量にはそれぞれの標準品を使用した。

#### 【LC-MS/MS を用いたライソゾーム病酵素活性法の開発】

平成 29 年度中盤からは、ムコ多糖症 II 型以外のライソゾーム病原因酵素の活性測定系の開発を進めた。これまでにムコ多糖症としては I、II、IIIB、IVA、VI、VII 型が、ライソゾーム病としてはポンペ病、ファブリー病を含めた他の疾患の原因酵素の測定法が論文報告されている。そこで、本研究においても、これらの原因酵素の活性測定法を検討した。

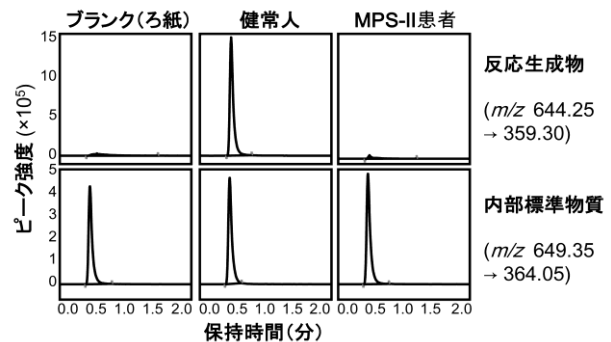


図 2 臨床検体を用いた MPS-II 酵素活性の測定

#### 4. 研究成果

##### 【LC-MS/MS による酵素活性測定系の確立】

まず既報に従いムコ多糖症 II 型の原因酵素であるイズロン酸-2-スルファターゼの酵素活性の測定法を検討した(図 2)。LC-MS/MS を用いた測定方法では、多重反応モニタリング(MRM)を用いた複数疾患同時測定系の構築が容易である。そのためまず、質量分析装置の条件を最適化したのち、検討して最適なイオン化条件を検討した。予備検討の結果から、酵素反応測定に添加する基質がイオン源において熱分解を受け、人為的生成物がに生じることが分かった。そのため、研究開始時にはサンプル注入法としてフローインジェクション法を検討したが、最終的には LC-MS/MS 法で定量することとした(図 3)。こうした予備検討の結果、健常人と罹患者のサンプルを分析したところ、両群の酵素活性値は良好に分離された。従って本法は臨床検査学的に有用なイズロン酸-2-スルファターゼの活性測定法であると結論された。

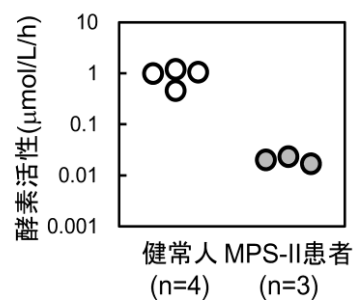


図 3 MPS-II 患者検体の酵素活性

##### 【バイオマーカーの測定系の確立】

尿中グルコサミノグリカンはムコ多糖症のバイオマーカーとして診断に利用されている。本研究ではポリマーであるグルコサミノグリカンを酸性メタノール条件下で 2 糖に化学分解し、

LC-MS/MS での測定が容易である化合物の誘導体に変換後、定量した。デルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸は-COOH の立体配置のみが異なる異性体であるため、分離手法を種々検討した結果、本研究では逆相クロマトグラフィーを使用することとした (図4)。健常人および患者の尿中のデルマトン硫酸とヘパラン硫酸濃度を測定したところ、患者で有意な上昇を認めた。

#### 【LC-MS/MS を用いたライソゾーム病酵素活性法の開発】

ムコ多糖症 II 型を含めたライソゾーム病の罹患頻度は一般的に約 5-10 万分の一程度のものが多い。そのため複数疾患の同時測定が可能であればスクリーニングの効率が上昇する。そこで他疾患の酵素反応生成物および内部標準物質の測定が可能か検討したところ、LC 条件を一部変更することで最終的に 11 疾患の酵素活性の同時測定が可能となった。

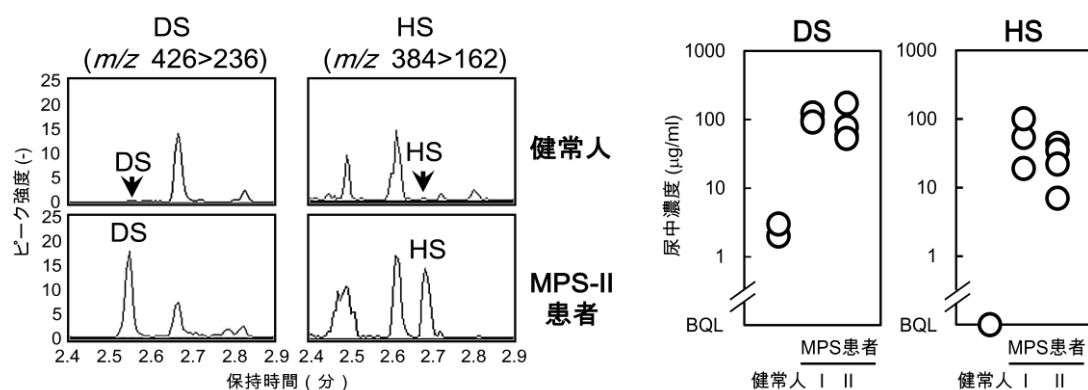


図4 尿中デルマトン硫酸とヘパラン硫酸のLC-MSによる測定。

DS、デルマトン硫酸；HS、ヘパラン硫酸；BQL、定量限界以下 (below quantitation limit)。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

1. Kosuga M, Mashima R, Hirakiyama A, Fuji N, Kumagai T, Seo JH, Nikaido M, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Okuyama T. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase. *Mol Genet Metab*. 2016 Jul;118(3):190-7. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.05.003.
2. Mashima R, Tanaka M, Sakai E, Nakajima H, Kumagai T, Kosuga M, Okuyama T. A selective detection of lysophosphatidylcholine in dried blood spots for diagnosis of adrenoleukodystrophy by LC-MS/MS. *Mol Genet Metab Rep*. 2016 Mar 18;7:16-9. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.02.007.
3. Mashima R, Sakai E, Tanaka M, Kosuga M, Okuyama T. The levels of urinary glycosaminoglycans of patients with attenuated and severe type of mucopolysaccharidosis II determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab Rep*. 2016 Apr 22;7:87-91. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.03.009.
4. Mashima R, Sakai E, Kosuga M, Okuyama T. Levels of enzyme activities in six lysosomal storage diseases in Japanese neonates determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab Rep*. 2016 Aug 31;9:6-11. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.08.007.
5. Mashima R, Okuyama T, Minireview on Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase, *J Rare Dis Res Treat*. 2016;2:43-46.
6. 田中美砂、真嶋隆一、坂井英里、中島英規、熊谷淳之、小須賀基通、奥山虎之、「極長鎖脂肪酸含有リン脂質を指標とした高速液体クロマトグラフィー/三連四重極質量分析法 (LC/MS/MS) による副腎白質ジストロフィー(ALD)診断法の開発」日本マス・スクリーニング学会誌 (2016) 26:79-84.
7. Yamamoto T, Shimojima K, Matsufuji M, Mashima R, Sakai E, Okuyama T. Aspartylglucosaminuria caused by a novel homozygous mutation in the AGA gene was identified by an exome-first approach in a patient from Japan. *Brain Dev*. 2017 May;39(5):422-425. doi: 10.1016/j.braindev.2016.12.004.
8. Mashima R, Okuyama T. Enzyme activities of  $\alpha$ -glucosidase in Japanese neonates with pseudodeficiency alleles. *Mol Genet Metab Rep*. 2017 Jul 7;12:110-114. doi:

- 10.1016/j.ymgmr.2017.06.007.
9. Fukuhara Y, Fuji N, Yamazaki N, Hirakiyama A, Kamioka T, Seo JH, Mashima R, Kosuga M, Okuyama T. A molecular analysis of the GAA gene and clinical spectrum in 38 patients with Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab Rep*. 2017 Oct 31;14:3-9. doi: 10.1016/j.ymgmr.2017.10.009.
  10. Mashima R, Ohira M, Okuyama T, Tatsumi A. Quantification of the enzyme activities of iduronate-2-sulfatase, N-acetylgalactosamine-6-sulfatase and N-acetylgalactosamine-4-sulfatase using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab Rep*. 2017 Dec 21;14:36-40. doi: 10.1016/j.ymgmr.2017.12.001.
  11. 真嶋隆一、坂井英里、小須賀基通、奥山虎之、「複数疾患同時測定系によるライソゾーム酵素活性測定法の検討」日本マス・スクリーニング学会誌 (2017) 27:69-75.
  12. Mashima R, Maekawa M, Narita A, Okuyama T, Mano N. Elevation of plasma lysosphingomyelin-509 and urinary bile acid metabolite in Niemann-Pick disease type C-affected individuals. *Mol Genet Metab Rep*. 2018;15:90-95.
  13. Fukuhara Y, Cho SY, Miyazaki O, Hattori A, Seo JH, Mashima R, Kosuga M, Fukami M, Jin DK, Okuyama T, Nishimura G. The Second Report on Spondyloepimetaphyseal Dysplasia, Aggrecan Type: A Milder Phenotype than Originally Reported. *Clin Dysmorphol*. 2018 Aug 17. doi: 10.1097/MCD.0000000000000241.
  14. Ohira M, Okuyama T, Mashima R, Quantification of 11 enzyme activities of lysosomal storage disorders using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab Rep*. 2018, 17:9-15.
  15. Mashima R, Maekawa M, Lipid biomarkers for the peroxisomal and lysosomal storage disorders: their formation, metabolism, and measurement, *Biomark Med*. 2018;12(1): 83-95.

[学会発表] (計 24 件)

1. 真嶋隆一、坂井英里、小須賀基通、奥山虎之、「多疾患同時測定系によるライソゾーム酵素活性測定法の検討」第 43 回日本マス・スクリーニング学会学術集会 (札幌) 2016/8/26-27.
2. 真嶋隆一、田中美砂、坂井英里、中島英規、熊谷淳之、小須賀基通、奥山虎之、「極長鎖脂肪酸をバイオマーカーとした副腎白質ジストロフィーの臨床検査法の開発」第 41 回日本医用マスペクトル学会年会 (名古屋) 2016/9/15-16.
3. 真嶋隆一、小須賀基通、櫻庭均、奥山虎之、「ムコ多糖症 II 型の原因遺伝子である *IDS* 遺伝子の日本人家系における解析例: 16 の新規変異を含む 65 例の解析結果」第 21 回ライソゾーム病研究会 (東京) 2016/9/30-10/1.
4. 真嶋隆一、坂井英里、田中美砂、小須賀基通、奥山虎之、「LC-MS/MS によるライソゾーム酵素活性測定法の検討」第 58 回日本先天代謝異常学会総会 (東京) 2016/10/27-29.
5. 坂井英里、真嶋隆一、田中美砂、小須賀基通、奥山虎之、「LC-MS/MS を用いたムコ多糖症患者の尿中グリコサミノグリカンの測定」第 58 回日本先天代謝異常学会総会 (東京) 2016/10/27-29.
6. Mashima R, Levels of enzyme activities in six lysosomal storage disorders in random Japanese neonates using LC-MS/MS, 5<sup>th</sup> Asian Congress for LSD Screening, Tokyo, Japan, 2016/10/25-26.
7. Mashima R, Sakai E, Kosuga M, and Okuyama T, Levels of enzyme activities in six lysosomal storage disorders in random Japanese neonates using LC-MS/MS, 13th WORLDSymposium, San Diego, USA, 2017/2/13-17.
8. 真嶋隆一、奥山虎之、「質量分析法を用いたライソゾーム病複数疾患同時測定系の検討」第 65 回日本質量分析総合討論会 (つくば) 2017/5/17-19.
9. 真嶋隆一、奥山虎之、「複数のライソゾーム病原因酵素活性の同時測定系の検討」第 59 回日本脂質生化学会 (京都) 2017/6/15-16.
10. 真嶋隆一、奥山虎之、「質量分析法を用いたライソゾーム病酵素活性測定系の検討」第 44 回日本マススクリーニング学会学術集会 (秋田) 2017/8/17-18.
11. 真嶋隆一、奥山虎之、「LC-MS/MS によるライソゾーム病酵素活性の同時測定」第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (東京) 2017/8/28-29.
12. 真嶋隆一、大平麻里、辰巳暁哉、奥山虎之、「質量分析法を利用したライソゾーム病酵素活性測定法について」第 59 回日本先天代謝異常学会 (川越) 2017/10/12-14.
13. Mashima R, Kosuga M, and Okuyama T, Enzyme activities in six lysosomal storage diseases in Japanese neonates determined by LC-MS/MS, 65<sup>th</sup> Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, USA, 2017/6/4-8.
14. Mashima R, Okuyama T, Enzyme activities in six lysosomal storage diseases in Japanese neonates determined by LC-MS/MS, ICIEM 2017, Rio de Janeiro, Brazil, 2017/9/5-8.

15. Mashima R, Enzyme activities of LSDs in a Japanese neonatal population, APHL Newborn Screening and Genetic Testing Symposium, New Orleans, USA, 2017/9/10-13.
16. Mashima R, Okuyama T, Quantification of enzyme activities of lysosomal storage disorders in a neonatal population using mass spectrometry, 14<sup>th</sup> WORLDSymposium, San Diego, USA, 2018/2/5-9.
17. 真嶋隆一、坂井英里、大平麻里、田中美砂、奥山虎之、「成育医療における質量分析法の貢献」第66回日本質量分析総合討論会（大阪）2018/5/15-17.
18. 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之、「LC-MS/MSによるライソゾーム病酵素活性の同時測定：ID2S, GALN,およびARSB酵素活性測定によるMPS II, IVA, VIのスクリーニングへの応用」第45回日本マススクリーニング学会学術集会（大宮）2018/8/17-18.
19. 真嶋隆一、「質量分析法を使ったライソゾーム酵素活性測定系の検討」第58回日本臨床化学会年次学術集会（名古屋）2018/8/24-26.
20. 真嶋隆一、大平麻里、奥山虎之、「LC-MS/MSによるライソゾーム病酵素活性の同時測定：ID2S, GALN,およびARSB酵素活性測定によるMPS II, IVA, VIのスクリーニングへの応用」日本人類遺伝学会第63回大会（横浜）2018/10/11-13.
21. 大平麻里、真嶋隆一、奥山虎之、「LC-MS/MSによるライソゾーム病酵素活性の同時測定」第60回日本先天代謝異常学会総会（岐阜）2018/11/8-10.
22. Mashima R, Ohira M, Okuyama T, Quantification of the enzyme activities of ID2S, GALN and ARSB using LC-MS/MS, 66<sup>th</sup> Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Diego, USA, 2018/6/4-7.
23. Mashima R, Ohira, M, Okuyama T, Determination of the enzyme activities of ID2S, GALN and ARSB using LC-MS/MS, SSIEM Annual symposium, Athens, Greece, 2018/9/4-7.
24. Mashima R, Ohira, M, Okuyama T, Quantification of 11-plex LSD enzyme activity using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 15<sup>th</sup> WORLDSymposium, Orlando, USA. 2019/2/3-7.

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔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

(2)研究協力者  
 なし