

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10066

研究課題名（和文）糖原病III型のグリコーゲン蓄積を制御する治療法の開発

研究課題名（英文）For a treatment of glycogen storage disease type III by controlling glycogen accumulation

研究代表者

大久保 実 (Okubo, Minoru)

（財）冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60241238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖原病III型では、グリコーゲンの分解に重要な「グリコーゲン脱分枝酵素」が生まれつきないために、グリコーゲンが徐々に臓器に蓄積していきます。この疾患は、AGLという遺伝子の塩基配列に違いがあるために発症します。日本人患者の遺伝的・臨床的特徴を明らかにしました。遺伝子検査を用いて幼少時から正確な診断をつけ、しっかりと臨床経過を追跡しグリコーゲンの蓄積を抑えていくことが、病気の進行を抑えることにつながります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私どもは、日本人糖原病III型の遺伝子配列（AGL変異）の違いを調べて、日本人に多いものと世界的に多いものを見つけました。その違いにより臓器障害の違いが起こるので、患者ごとに病気の進行を抑える方法が異なる可能性を示しました。

日本人の糖原病III型の特徴を明らかにしました。1）肝障害が進行して、肝硬変に進むことが多い。肝癌が発生することがある。2）継続した肝臓の画像診断が肝癌の早期発見に有用である、3）日本人に特定のAGL遺伝子変異が比較的高頻度に認められる。

研究成果の概要（英文）：Patients with glycogen storage disease type III (GSD III) are unable to breakdown glycogen due to the inborn deficiency of glycogen debranching enzyme caused by mutations in the AGL gene. Glycogen gradually accumulates in their organs. Genetic and clinical features in Japanese patients with GSD III are characterized. Precise diagnosis by using genetic tests in early ages and close follow-up are keys to prevent the development of organ damages and glycogen accumulation in later ages.

研究分野：小児医学

キーワード：グリコーゲン

1. 研究開始当初の背景

(1) グリコーゲン¹⁾はエネルギーを保存するための基質として、生体の恒常性に重要な役割を果たしている。グリコーゲンを分解してエネルギーを取り出す代謝過程に、グリコーゲン脱分枝酵素 glycogen debranching enzyme (GDE)が働いている。この酵素は肝臓と筋肉組織に発現しており、AGL 遺伝子によってコードされている。GDE が欠損した疾患が、糖原病 III 型 (glycogen storage disease type III)である。この先天性代謝異常症では、肝臓や筋肉に異常なグリコーゲンが蓄積して、肝障害や筋萎縮・心筋症が発症する¹⁾。グリコーゲン分解によるグルコースの供給が障害されるため、低血糖症が生じる。さらに脂質異常症・高尿酸血症など多彩な代謝異常を呈する。糖原病 III 型は常染色体劣性遺伝病である。

(2) 私どもは初めて AGL 遺伝子変異を同定し²⁾、日本とさまざまなエスニックグループの糖原病 III 型患者を分子遺伝学的に解析し報告してきた。しかし、GDE が同じように完全欠損していても、グリコーゲン蓄積による臓器障害の程度については、患者ごとに大きく異なっている。この原因はよくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) 糖原病 III 型では、年齢が進むにつれてグリコーゲン蓄積が進行し、臓器障害が起こってくる。しかし、GDE が同じように完全欠損していても、グリコーゲン蓄積による臓器障害の程度は、患者ごとに大きく異なっている。この原因を明らかにすれば、糖原病 III 型の治療法の開発に役立つと考えられる。

(2) 欧米の報告では、肝腫大と肝障害は思春期以降進行が止まり、肝硬変への進行は少ないとされている³⁾。一方、アジア系では肝硬変が多いとされている。私どもの日本人例でも、肝硬変まで進行する例が多い。糖原病 III 型のグリコーゲン蓄積を制御する治療法の開発を目指して、本研究は糖原病 III 型の AGL 遺伝子変異と臨床症状の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既報⁴⁾のように、患者の末梢血からゲノム DNA を調製し、プロモーター領域と 35 個のエクソンで構成される AGL 遺伝子を 9 つの領域に分けて LA-PCR 増幅し、PCR 産物を DNA シーケンサーで直接塩基配列決定した。

(2) 上記の方法で変異が検出できなかった症例には、次世代シーケンサーを用いた re-sequencing を行った。さらに、全エクソン シーケンスを行い、AGL 以外の別の遺伝子に原因があるかどうかを、ゲノムワイドに網羅的な遺伝子変異検索を行った。

(3) 遺伝子変異を同定できた患者の臨床像を比較検討した。

4. 研究 成果

- (1) 日本人患者の遺伝子解析を行い、これまでに報告にない *AGL* 遺伝子変異を 2 つ同定した (図 1)。2 家系ともに、二つの異なる *AGL* 遺伝子変異を両親から受け継いで、複合ヘテロ接合体となって糖原病 III 型を発症していた。

患者 A は、新奇な一塩基欠失(c.3378delA)と、既報のスプライシング変異 IVS32-12 A>G との複合ヘテロ接合体であった。

患者 B は、新奇な二塩基欠失(c.382_383delAC)と、既報のナンセンス変異 p.Q869* との複合ヘテロ接合体であった。

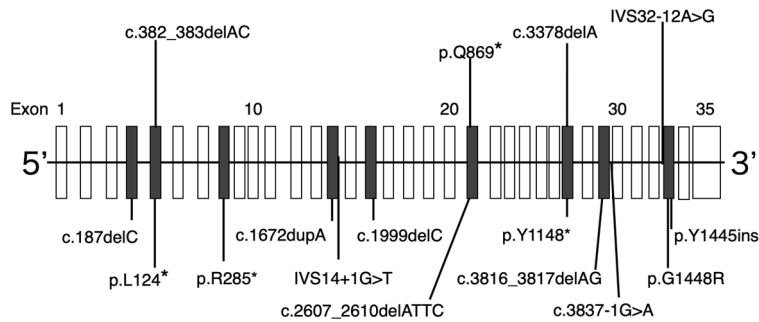


図 1. 日本人糖原病 III 型の *AGL* 変異 ~ 点変異と小さな欠失

上段に本研究で同定した変異を示す。

下段は私どもがこれまでに報告した日本人変異。

- (2) *AGL* 変異 IVS32-12 A>G は、私どもが日本人で報告したスプライシング変異⁵⁾で、その後様々なエスニックグループの患者で診断され、世界各地から報告されている(図 2 左)。

AGL のハプロタイプ解析は、遺伝子変異のオリジンを知る手立てになることが知られている。異なる地域で診断された IVS32-12 A>G 変異のハプロタイプを調べると、変異の載っているハプロタイプが異なっていた。これは、変異が 1 回ではなく、複数回起こっていることを意味している。つまり、それぞれの地域の IVS32-12 A>G 変異は独立して起こったこと、IVS32-12 の Adenine は変異が起り易い hot spot であることを示唆している。

したがって、この変異は、世界のどこにおいても *AGL* 遺伝子変異を調べる際には、注目すべきものと言える。例えば、サウジアラビアの糖原病 III 型ではこの変異が高頻度であることが報告された。

- (3) IVS32-12 A>G 変異のホモ接合体の臨床像は、筋症状がなく(あったとしても軽度で)肝機能障害が主体である亜型である。この理由としては、筋組織では正常なスプライシンがある程度行われて、GDE 酵素活性が筋肉に残存していることが推測されている。しかし、この亜型の長期予後は明らかにならなかった。私どもではこの亜型を長期フォローしている。臨床経過の中で、肝障害が進行して肝硬変となり、肝癌発生の原因になっていた。発癌が患者の長期予後を左右するので、定期的な肝臓の画像評価(腹部エコー・造影 CT)が重要であった。

- (4) *AGL* 遺伝子変異の地理的分布についてみると、東南アジア地域では、私どもが最初に同定した IVS14+1 G>T のスプライシング変異の報告が他施設からもあり、最も多い(図 2 右)。東南アジア地域以外からの報告は未だない。したがって、IVS14+1G>T 変異は、東南

アジアで共通の祖先から受け継がれた創始者効果(founder effect)によって広がっている可能性が高い。AGL の創始者効果は、私どもの報告したカナダ在住のイヌイットにも見られる⁶⁾。

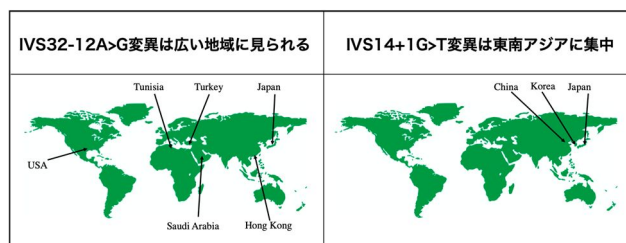


図2. AGL 遺伝子変異の分布

- (5) AGL がグリコーゲンを分解する際には2段階の過程をとる(図3)。まず、トランスフェラーゼ作用で、分枝の α -1,4結合しているグルコース残基3つを丸ごと本幹へ転移する。次に、グルコシダーゼ作用で本幹から α -1,6結合で枝分かれしているグルコース残基を切断する。1つの酵素がこの2つの作用を有している。大部分の糖原病III型患者では、2つの酵素活性が両方ともに失われている。

私どもは、この2つの酵素活性の片方だけが欠失した患者を見出し、遺伝子変異を同定していた⁷⁾。この変異では、トランスフェラーゼ活性に重要な620番目のアミノ酸がロイシンからプロリンに置換しており(p.L620P)トランスフェラーゼ活性だけが障害されていた。

L620P変異をもつ患者を新たに見つけて、その臨床像を検討した。その結果は、二つの活性が失われている大部分の患者と臨床症状には明らかな差は認めなかったが、さらに長期に経過をフォローしたい。

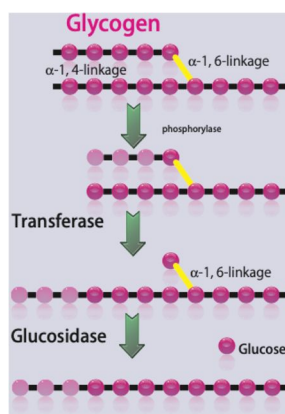


図3. グリコーゲン脱分枝酵素の持つ2つの酵素作用～トランスフェラーゼとグルコシダーゼ

- (6) 従来の方でAGL 遺伝子変異が特定できなかった患者で、次世代シーケンサーを用いたre-sequencingを行ってみると、片方のアレルに大きな欠失が存在する可能性が示唆された例があった。他方のアレルは正常なので、従来の方では検出することが困難であった。しかし、依然としてAGL 遺伝子に変異が見つからない例もあった。

- (7) グリコーゲン脱分枝酵素は細胞内で作用するため、GDE 酵素を点滴などで体外から細胞内に補充することは困難である。また、遺伝子工学を利用して、ゲノム DNA を修復することも AGL 遺伝子では未だ実現していない。現在の治療としては、小児期に低血糖症が頻繁に起こると発育障害が生じるため、コーンスターチの内服や夜間に経鼻からグルコース補充を行うことで低血糖予防を行っている。成人期には、グリコーゲンの蓄積量を減らすために、食事の炭水化物を減らし、蛋白質を増やしている。こうした食事による介入で、臓器へのグリコーゲン蓄積量を極力減らすようにしている。
- (8) 私どもは、日本人糖原病 III 型の遺伝子配列 (AGL 変異) の違いを調べて、日本人に多いものと世界的に多いものを報告してきた。この違いにより臓器障害の違いが起こるので、患者ごとに病気の進行を抑える方法が異なる可能性がある。日本人の糖原病 III 型の特徴は、1) 肝障害が進行して、肝硬変に進むことが多い。肝癌が発生することがある。2) 継続した肝臓の画像診断が肝癌の早期発見に有用である。3) 日本人に特定の AGL 遺伝子変異が比較的高頻度に認められること。である。
- (9) 遺伝子検査を用いて幼少時から正確な診断をつけ、しっかりと臨床経過を追跡しグリコーゲンの蓄積を抑えていくことが、病気の進行を抑えることにつながる。糖原病 III 型の後期合併症として、肝硬変への進行と肝癌の発生が問題となってきた。今後の研究でさらに患者の予後改善をめざしたい。

【引用文献】

1. 大久保実 (2012). "糖原病 型." *日本臨牀*, 新領域別症候群シリーズ 19: 47-50.
2. Okubo, M., et al. (1996). "A novel donor splice site mutation in the glycogen debranching enzyme gene is associated with glycogen storage disease type III." *Biochem Biophys Res Commun* 224: 493-499.
3. Chen, Y. T. (2001). Glycogen storage diseases. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn.* C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle (eds). New York, McGraw-Hill. 1: 1521-1551.
4. Okubo, M., et al. (2000). "Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene are responsible for glycogen storage disease type IIIa in Japan." *Hum Genet* 106: 108-115.
5. Okubo, M., et al. (1998). "A novel point mutation in an acceptor splice site of intron 32 (IVS32 A-12-->G) but no exon 3 mutations in the glycogen debranching enzyme gene in a homozygous patient with glycogen storage disease type IIIb." *Hum Genet* 102: 1-5.
6. Rousseau-Nepton, I., et al. (2015). "A founder AGL mutation causing glycogen storage disease type IIIa in Inuit identified through whole-exome sequencing: a case series." *CMAJ* 187: E68-E73.
7. Endo, Y., et al. (2009). "Egyptian glycogen storage disease type III-Identification of six novel AGL mutations, including a large 1.5kb deletion and a missense mutation p.L620P with subtype IIIc." *Clin Chem Lab Med* 47: 1233-1238.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大久保実	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 9
3. 書名 新臨床内科学（第10版）（矢崎義雄、監修）第6章 代謝・栄養疾患 6. 先天性糖質代謝異常症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----