

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16882

研究課題名（和文）酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症の新たな診断法開発と新規バイオマーカー同定

研究課題名（英文）Development of a new diagnostic method and identification of new biomarkers for acid sphingomyelinase deficiency

研究代表者

加藤 明英（Kato, Akie）

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90865718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ライソゾーム病の酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）は、本邦の難病医療において大きな対象疾患のひとつである。ASMDは希少性と症状多様性から診断が難しい。ASM低値を元に診断するが、従来は培養皮膚線維芽細胞を用いて、数ヶ月かけて1名の測定を行っていた。本研究では乾燥濾紙血を用いたタンデムマス分析による新規診断法を開発し、ハイリスクスクリーニングに対応可能な体制を整えた。具体的に、血液1滴・2日間で176名の測定を可能とした。

ASMDの酵素補充療法は神経症状には無効なため、さらなる病態解明が必要である。ASMD患者が1名であったため新規バイオマーカー同定には至らず、次なる課題とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した診断法の特徴は、検査に伴う侵襲性を軽減したことと、ハイリスクスクリーニングに対応可能とした点である。これにより、ASMDの早期診断・早期治療に寄与することができる。

新診断法を確立したことに加え、2つの臨床研究を通じて、統計学的解析を行うことにより、DBS中ASM活性の様々な特徴を明らかにした。主に、患者白血球数・リンパ球はASM活性と正の相関を示すため、軽症ASMD患者の偽陰性・保因者の偽陽性に関わる可能性があること、新生児においてASM活性は在胎週数・出生体重と正の相関を示すこと、を明らかとした。これらは初めての報告であり、診断を進めていく上で貴重な基盤となった。

研究成果の概要（英文）： Acid sphingomyelinase deficiency (ASMD), a lysosomal disease, is one of the major targets of intractable disease care in Japan; ASMD is difficult to diagnose due to its rarity and symptom diversity; diagnosis is based on low ASM activity, but conventionally, one patient was measured over several months using cultured skin fibroblasts. In this study, we developed a novel diagnostic method based on tandem mass analysis using dried blood spot (DBS) and established a system that can be used for high-risk screening. Specifically, 176 patients could be measured within one drop of blood and two days.

Since enzyme replacement therapy for ASMD is ineffective for neurological symptoms, further pathophysiological clarification is needed; since only one ASMD patient was included in the study, the identification of a novel biomarker was not achieved, and this will be the next subject of research.

研究分野：小児代謝学、新生児学

キーワード：酸性スフィンゴミエリナーゼ 乾燥濾紙血 タンデムマス ライソゾーム病

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症 (ASMD) はライソゾーム病のひとつで、小児慢性特定疾病と指定難病の疾患であり、本邦の難病医療において大きな対象疾患と言える。先天的に酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) が欠損していることにより、基質であるスフィンゴミエリンが蓄積し、肝機能障害・呼吸障害・関節痛・脂質異常に伴う血管系イベント・神経症状など、様々な症状を来す。疾患希少性と症状多様性により、臨床診断が難しい一方で、早期診断・早期治療が重要な疾患である。

当研究室は ASMD の精密検査施設であり、全国から検査依頼がある。研究開始当初は、患者の培養皮膚線維芽細胞を用いて ASM 活性を測定することにより診断していた。被検者へは皮膚切除の侵襲を伴い、培養のため診断に1~数ヶ月の期間を要する。一方で、乾燥濾紙血 (DBS) を用いた酵素活性測定法が開発され、技術的にはタンデム質量分析法によって血液数滴と2日間で測定が可能となった。ASMD の疾患頻度は 1/10,000~1/110,000 人であるが<sup>1,2)</sup>、本邦では ASMD 患者生存例はわずか数名である。これは罹患率に地域差があることを考慮しても、未診断例や診断がつかないまま死亡に至った例が多く存在する可能性を示唆しており、大きな問題である。

また、現段階で ASMD の神経症状 (筋力低下、運動発達遅滞、痙縮など) に有効な治療法はない。新たに開発された酵素補充療法は肝・肺・脂質異常などには良好な結果を示したが、中枢神経系には効果が認められなかった<sup>3)</sup>。神経症状にも効果のある新たな治療法の開発が必要である。新規バイオマーカーの同定は、病態のさらなる解明に繋がり新たな創薬シーズを生み出しうるものである。申請者と共同研究を行っている本学生体情報研究センターは、独自のリポミクス最先端技術を有する。逆走系キラルカラム/質量分析計 (MS) を用いて、リン酸化状態の異なるイノシトールリン脂質をアシル基 (脂質クオリティ) レベルの解析ができる定量性に優れた分析法を開発し、イノシトールリン脂質として約20年ぶりの新規分子であるリゾホスファチジルイノシトールリン酸群を発見している (特許申請中)。世界でここでしかできない技術を用いてリポミクス解析を行うことで、新たなバイオマーカーの発見につながる可能性は十分にあると考えている。

### 2. 研究の目的

- 1) DBS を用いたタンデム質量分析法による新たな診断法の開発
- 2) 新規バイオマーカー同定による ASMD 病態解明と新規治療法発見のための基盤作り

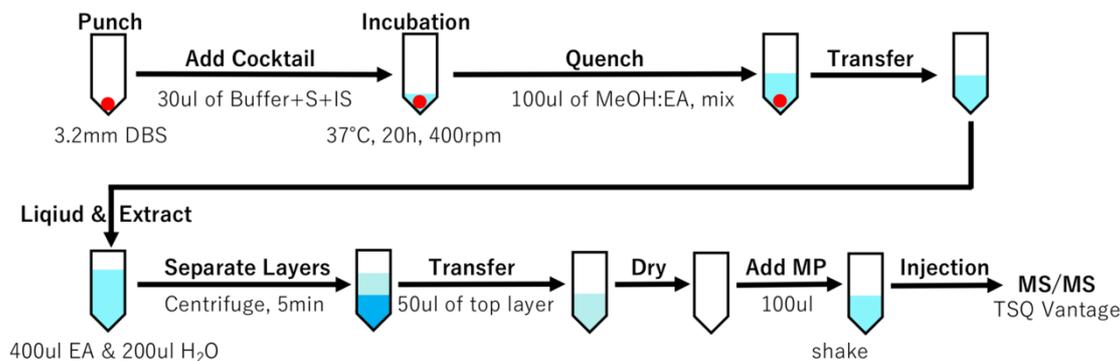
### 3. 研究の方法

DBS を用いたハイリスクスクリーニングに対応可能な検査法を開発するため、当科に入院した患者のうち同意の得られた方を対象に DBS を採取して ASM 活性測定を行う。目標数は200-300人とする。ポジティブコントロールとして、当研究室で ASMD の診断を行った患者のうち同意の得られた方を対象に ASM 活性測定を行う。また、ASMD 患者の血漿を用いて網羅的リン脂質解析を行い、新規バイオマーカーの同定を目指す。いずれも必要採血時の残余血液を使用し、本研究のために採血することはない。

#### 【ASM 活性測定法】

図1にDBSを用いた測定法を示す。DBSから1パンチ(3.2mm)を緩衝液中に再加水してASMを抽出し、基質(C6-スフィンゴミエリン)と内部標準(C4-セラミド)を加え20時間インキュベートする。次に生成物(C6-セラミド)を抽出し、質量分析計(TSQ Vantage)に注入して分析を行う。

図1 DBS の MS/MS 分析



DBS: Dried blood spot, S: Substrates, IS: Internal standard, MeOH: Methanol, EA: Ethyl acetate, MP: Mobile phase

<研究1「ライソゾーム病スクリーニングのパイロット研究」>

倫理承認番号 2091

【対象】

- ・秋田大学小児科に入院した小児 62 名（非 ASDM 患者：早産児 28 名、正期産児 24 名、他 10 名）
  - ・陽性対象として、過去に秋田大学小児科で診断した ASDM 患者 1 名
- を対象として、定期採血時に DBS を取得し、上記方法で ASM 活性を測定した。患者情報は診療録より取得した。

<研究2「新生児を対象としたライソゾーム病マス・スクリーニングのパイロット研究」>

倫理承認番号 2485

早産・集中治療が ASM 活性に与える影響を評価するため、秋田県の周産期センターである秋田赤十字病院新生児科と当科 NICU で共同研究を行った。

【対象】

- ・秋田大学 NICU あるいは秋田赤十字病院 NICU に入院した 244 名の新生児
  - ・陽性対象として、過去に秋田大学小児科で診断した ASDM 患者 1 名
- を対象とした。DBS 取得のタイミングは現行の新生児タンデムマススクリーニングと同じ（1 回目：日齢 4-6。2kg 未満の低出生体重児の場合は、2 回目：①生後 1 ヶ月、②2.5kg に達した時、③退院時、のいずれか早いタイミングで DBS 取得）とした。上記方法で ASM 活性を測定し、患者情報は診療録より取得した。

4. 研究成果

上記研究 1-2 を通して新診断法を確立し、ASMD ハイリスクスクリーニングに対応可能な体制を整えた。新旧診断法の比較を表 1 に示す。

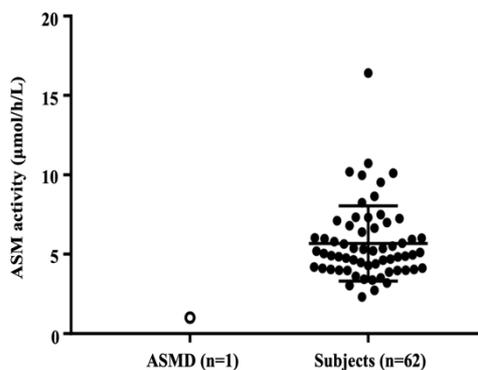
表 1：測定方法の比較

	検体	侵襲性	診断期間	検査可能数	検体移送
従来	fibro	皮膚切除	1-数ヶ月	1	培養液入り検体を常温発送
新規	DBS	採血1滴	2日	176	DBSを郵送

<研究1「ライソゾーム病スクリーニングのパイロット研究」>

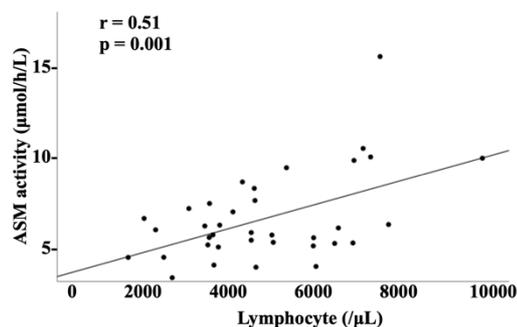
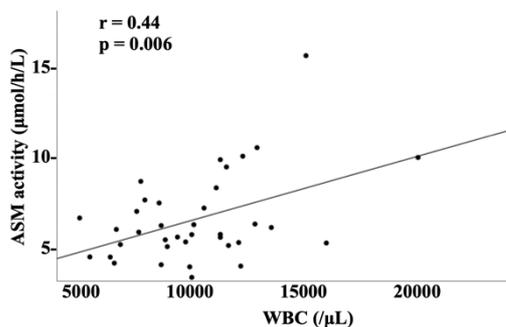
小児 62 名の ASM 活性分布を図 2 に示す。ASM 活性は Mean±SD = 5.7±2.4  $\mu\text{mol/h/L}$ （最小 2.3、最大 16.4、中央値 5.1）であり、カットオフ値 1.5<sup>\*</sup>を下回る検体はなかった。ASDM 患者は 1.0  $\mu\text{mol/h/L}$  でありカットオフ未満であることを確認した。

図 2 ASM 活性の分布



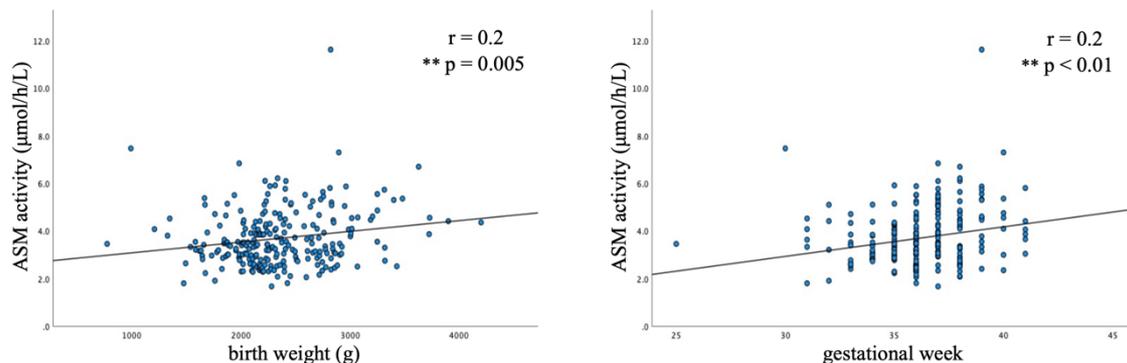
また、図 3 に示すように、ASM 活性と白血球数は有意な正の相関を示し、ASM 活性とリンパ球数は有意な正の相関を示すことを明らかにした（Pearson の相関検定）。これは、DBS での ASM 活性において、白血球数・リンパ球数は ①ASDM 軽症例の偽陰性、②保因者の偽陽性、に関わる可能性があるという臨床的意義がある。

図 3 ASM 活性と血球数の関係



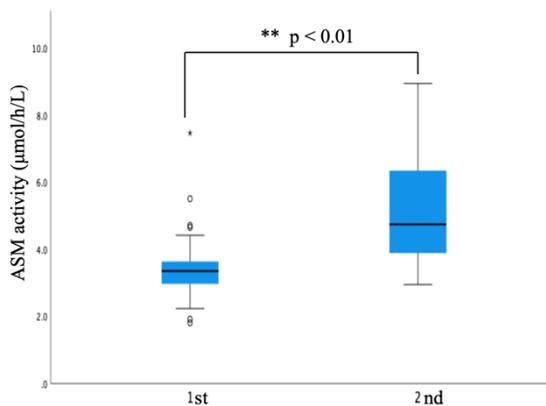
<研究2「新生児を対象としたライソゾーム病マス・スクリーニングのパイロット研究」>  
 244名の新生児の内訳は、在胎週数25-41週、出生体重773-4201g、男児134名・女児110名であった。ASM活性はMean±SD=3.7±1.2 μmol/h/L (最小=1.7、最大=11.6、中央値=3.4)であり、活性低値例は無かった。ASM活性に男女差は認めなかった。図4に示すように、ASM活性と出生体重、在胎週数は有意な正の相関を示した (Spearmanの順位相関関係検定)。

図4 ASM活性：出生体重と在胎週数の関係



また、2kg未満の低出生体重児で、2回DBSを採取した34名のASM活性を図5に示す。Wilcoxonの符号付き順位検定を行い、1回目よりも2回目の方が、有意にASM値は高値であった。このことと、前述の在胎週数が進むほどASM活性は有意に高いことを合わせると、未熟児であっても成長に伴う再採血は不要であると考えられる。

図5 低出生体重児34名：1回目と2回目のASM活性比較



### 【結語】

本研究における目的2つのうち、1つは達成し、1つは未達成である。

本研究では、延べ306名の非ASMD小児患者と、1名のASMD患者のDBSを用いて、新診断法を確立し、ハイリスクスクリーニングに対応可能な体制を整えた。また、検査において重要な偽陽性・偽陰性に関与する因子を見つけ、今までに報告のなかった早産児に関するDBS ASM活性についても明らかにした。本研究成果を用いて、今後はASMDハイリスクスクリーニングを展開し、早期診断・早期治療に寄与を続ける。

新規バイオマーカー同定に関しては、患者検体が1名のみであったため同定に至らず、今後の研究の課題として取り組み続ける次第である。

### 参考文献

- 1) Burton et al. J Pediatr, 190, 130-135, 2017.
- 2) Elliott et al. Mol Genet Metab, 118(4), 304-309, 2016.
- 3) Wasserstein et al. J Inherit Metab Dis, 41, 829-838, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akie Kato, Hiroki Nakanishi, Atsuko Noguchi, Hiroyuki Adachi, Kiichi Takahashi, and Tsutomu Takahashi.	4. 巻 49
2. 論文標題 A study of mass screening for acid sphingomyelinase deficiency; the relationship between enzyme activity and blood cell counts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Akita Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 121-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤明英
2. 発表標題 タンDEMマス質量分析法を用いた酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症のパイロット研究
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------