

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K07795
研究課題名（和文）乾燥ろ紙血プロテオミクス解析を用いた原発性免疫不全症の新生児スクリーニング法開発

研究課題名（英文）Development of newborn screening method for primary immunodeficiency disorders using dried blood spot proteomics

研究代表者
八角 高裕（Yasumi, Takahiro）
京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00511891
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、原発性免疫不全症（PID）の新生児スクリーニング法確立に向けた基礎検討として、特に疾患責任蛋白質の発現低下により診断が可能な疾患を対象として、新生児の乾燥ろ紙血（DBS）検体から疾患責任蛋白質を同定・定量評価する手法の確立を試みた。健康新生児と成人由来検体の比較を行ったところ、直接測定による既報通りの蛋白発現プロファイルが確認され、本解析法の定量性が確認された。続いて、健康新生児検体とPID疾患患者由来検体を比較したところ、疾患責任蛋白質の発現低下に加え、表現型を反映する疾患関連蛋白質の発現変動により診断が可能な疾患が多数存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性免疫不全症（PID）は、免疫関連遺伝子の異常により重篤な感染性や難治性炎症を来す予後不良の先天性疾患群である。根治療法として造血細胞移植が施行され、分子標的薬や遺伝子治療も開発されているが、予後改善には新生児スクリーニングによる発症前診断が不可欠である。現在、代謝性疾患を中心とした新生児スクリーニングが乾燥ろ紙血（DBS）検体を用いて行われているが、本研究により同じDBS検体を用いたプロテオミクス解析により様々なPID疾患に対するスクリーニング検査の可能性が示された事により、新生児スクリーニング対象疾患の拡大と早期診断・治療による予後改善に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Newborn screening using dried blood spot (DBS) samples have greatly contributed to public healthcare by detecting patients with genetic disorders in their newborn period. In this project, we explored an applicability of non-targeted quantitative proteomics analysis for newborn screening of genetic diseases using DBS. The DBS protein profiling clarified that the protein levels encoded by nearly 3000 genes including 1106 listed in Online Mendelian Inheritance in Man could be monitored in healthy newborn samples and were useful in screening of patients with primary immunodeficiency disorders. The results indicate that the non-targeted quantitative protein profiling of DBS samples could forge a new path for the screening of genetic disorders.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：原発性免疫不全症 新生児スクリーニング 発症前診断 乾燥ろ紙 プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症 (PID : Primary Immunodeficiency Diseases) は、免疫関連遺伝子の異常により重篤な感染性や難治性炎症を来す予後不良の疾患群である。根治療法として造血細胞移植が行われ、遺伝子治療も模索されているが、重症例ほど乳児期早期に発症し、死亡例や後遺症を残す症例が多い。診断法の進歩により発症後の診断は迅速化しているが、それにより患者予後が大きく改善している訳では無い。一方、発端者と比較して、その後に出生し発症前診断された同胞症例の予後は格段に良い事はよく知られた事実である。以上より、PID 患者の予後改善には新生児スクリーニングによる発症前診断が不可欠である。

PID の迅速診断法としては、フローサイトメトリーによる疾患責任蛋白質の発現解析が一般的である。責任蛋白質発現の低下しない症例も少数存在するが、その様な症例の多くは軽症であり、発症前診断の必要性は高くない。責任蛋白質発現が低下する症例ほど重症である事から、特に緊急性の高い PID 患者の発症前診断を目的として、疾患責任蛋白質発現解析による新生児スクリーニングが有用であると考えられる。

新生児スクリーニングの実用化には、検体採取・輸送・保存が容易である必要があり、既に先天性代謝性疾患スクリーニングに用いられている乾燥ろ紙血 (DBS : Dried Blood Spots) 検体の利用が理想的である。しかし、大量に含まれるアルブミンなどの影響により、従来の解析手法を用いて PID 責任分子の様な微量蛋白質を検出することは困難であった。この問題を克服する目的で最先端プロテオミクス技術を用いた予備検討を行ったところ、DBS 検体から多くの PID 責任蛋白質の検出が可能である事を確認していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児 DBS 検体を用いた PID 責任蛋白質の定量評価系を構築し、将来的な新生児スクリーニングの実用化を通じて、PID 患者の発症前診断と予防的・先制的治療へと繋げることである。申請者のグループは、ノンターゲットプロテオーム解析の手法を用いて、DBS 検体から数千種類に及ぶ微量タンパク質の発現を定量評価する系の構築に成功しており、評価可能なタンパク質には多数の PID 責任・関連分子が含まれている。この手法は特異抗体に依存せず多数のタンパク分子の同時評価が可能であるため、多種多様な PID 疾患の同時評価が可能であり、コストと作業効率を大幅に改善することが可能であると同時に、将来的には他の疾患領域を含めた稀少遺伝性疾患の発症前スクリーニングへと繋がる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

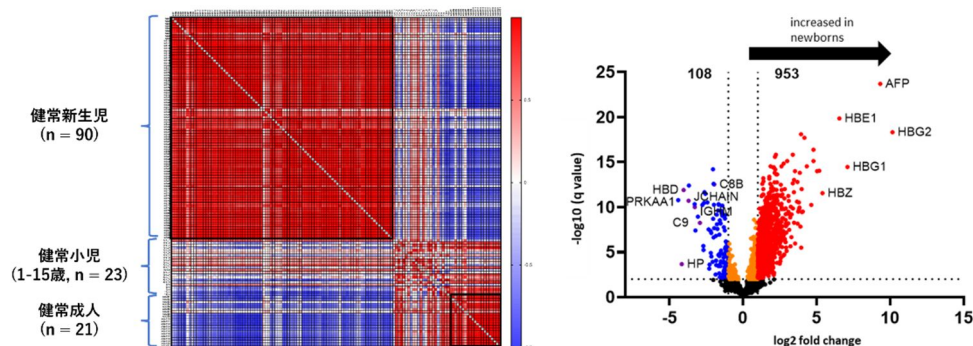
はじめに、各年代 (新生児期・乳幼児期・学童期・青年期以降) の健常人 DBS 検体を用いて蛋白発現プロファイルを確認し、蛋白発現の年齢による変化を捉えられる事を確認すると共に、PID 関連タンパク分子の標準発現量を設定する。続いて、PID 患者 DBS 検体のプロテオーム解析を行い、既存の専門的な解析結果や最終的な遺伝子解析結果との照合により疾患スクリーニング法としての有効性を確認する。

4. 研究成果

健常人サンプルの解析

健常新生児・小児 (1~15 歳)・成人の検体を用いた蛋白発現プロファイル解析により、健常新

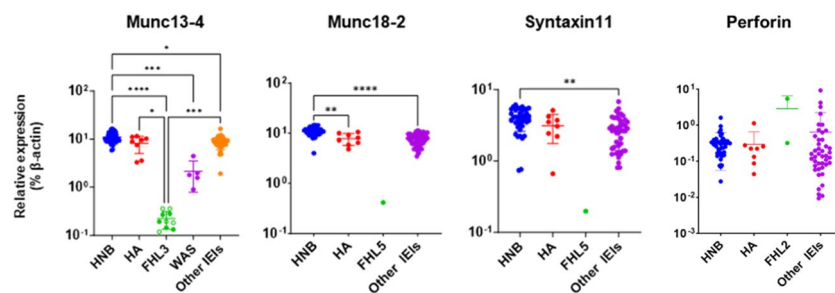
生児検体と健常成人検体が明確に区別される事、1~15歳の検体には個人差があるが加齢と共に成人の発現プロファイルに近づいていく事、が確認された。加えて、新生児と成人検体の比較では、新生児検体では胎児ヘモグロビンやAFPの発現が高く、補体成分の発現が低いことが確認され、これは直接計測法による既報告データと同じであり、本解析法の定量性を担保する結果であると考えられた。



PID 患者検体を用いた検討

様々な PID 患者の DBS 検体を用いて本解析法の疾患スクリーニング法としての可能性を評価したところ、家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型 (FHL3)・4 型 (FHL4)・5 型 (FHL5) 患者検体において明らかな疾患責任蛋白質の発現低下・欠損が確認され、その有効性が確認された。特に FHL3 に於いては、先天性代謝疾患の公的スクリーニング用に採取された発症前 DBS 検体に於いても責任蛋白質の発現低下・欠損が確認され、新生児スクリーニング法としての有用性が確認された。その他、慢性肉芽腫症患者や X 連鎖無ガンマグロブリン血症患者検体に於いても疾患責任蛋白質の発現低下・欠損が確認されている。更に、疾患責任蛋白質の発現評価が不能である疾患に於いても、疾患特有の表現型 (好中球・T 細胞・血小板の低下など) を反映した蛋白発現プロファイルが確認され、間接的スクリーニング法としての有用性が確認された。

以上の成果は論文化して medRxiv に公開すると共に、現在専門誌に投稿中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仁平寛士, 川島祐介, 大西秀典, 小原収, 八角高裕, 他
2. 発表標題 ろ紙血プロテオームを用いた先天性免疫異常症に於ける新規バイオマーカー
3. 学会等名 第6回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八角高裕
2. 発表標題 プロテオーム解析による新たな新生児スクリーニング法開発
3. 学会等名 第7回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------