

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461526

研究課題名(和文) 新生児スクリーニングで発見されるMCAD欠損症例の急性発症リスク評価に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of acute-onset risk of MCAD deficiency found by newborn screening

研究代表者

但馬 剛 (Tajima, Go)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・マス・スクリーニング研究室・室長

研究者番号：00432716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児突然死の原因となる MCAD 欠損症について、新生児マススクリーニング発見患者の急性発症リスク評価のため、A. 血中異常代謝産物濃度・B. 酵素活性・C. 遺伝子型に関するデータベースを構築した。3年間で新たに27例を診断し、累積診断数は61例となった。AとBは全般に良好な相関性を示したが、両者に乖離を示す一部症例が保有する変異酵素は、患者細胞を破碎する通常の活性測定法では活性低下が遮蔽され、培養細胞による脂肪酸代謝能の測定が有用であった。代表的な変異は主に C8-CoA への反応性が低下しているのに対し、これらの一部変異は C6-CoA への反応性の低下が主体であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to appropriately evaluate the risk of acute metabolic failure in patients with MCAD deficiency found by newborn screening, we have constructed a database of biochemical, enzymatic, and genetic information. We newly diagnosed 27 patients in the last 3 years, and the cumulative number of our diagnosis reached 61. Most cases showed good correlation between blood marker levels and enzymatic activities in sonicated lymphocytes. There were several cases showing dissociation between these indicators, and an assay of fatty acid oxidation by cultured lymphocytes successfully proved their enzymatic defects. In addition, their variant enzymes showed poor response toward C6-CoA, while the major variant enzymes toward C8-CoA. We have to integrate biochemical, enzymatic, and genetic findings to appropriately estimate risk of acute onset harbored by newborn screening patients, which is essential to avoid catastrophic outcomes.

研究分野：小児科学 先天代謝異常

キーワード：MCAD 欠損症 脂肪酸代謝異常症 新生児マススクリーニング タンデムマス 低血糖症 乳幼児突然死

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸β酸化障害によって乳幼児期の急死の原因となる中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症は、タンデムマス法による新生児マススクリーニングの効果が最も高いと考えられる疾患である。わが国では 1997 年に試験研究が開始され、これによって 2000 年に国内初例となる低血糖発症例が発見され、次いで 2001 年に 2 例目がマススクリーニングで発見された。我々はこれら最初期から、本疾患の酵素活性測定と遺伝子解析に取り組み、2012 年に試験研究期間が終了するまでに、発症患者 8 例/マススクリーニング 12 例/同胞検索 1 例を診断していた。2013 年度から全自治体でタンデムマス法への移行が始まり、1 年間で発症患者 1 例/マススクリーニング 6 例/同胞検索 4 例を診断。未発症患者の発見ペースが増加し、生化学的重症度と臨床的発症リスクを的確に評価する方法の必要性が高まっていた。

我々の検討では、指標となる血中異常代謝産物 (オクタノイルカルニチン;C8AC) 濃度とリンパ球 C8CoA 脱水素活性、遺伝子変異の間には、高い相関性が観察されていたが、

- ・ c. 757G>A (p. E253K) ホモ
- ・ c. 811A>G (p. K271E)/nul 複合ヘテロ

という遺伝子型の症例は、C8AC 高値の程度や持続に不釣り合いな、高い酵素活性を示し、特異な変異であることが示唆された。

また、2 番目に頻度が高い c. 50G>A (p. R17H) は、発症患者での同定例がなく、成熟タンパクには含まれない位置の変異であり、病因性が不明瞭であった。

2. 研究の目的

全国実施が実現したタンデムマス法による新生児マススクリーニングによる C8AC 高値例について、生化学的異常所見と酵素活性・遺伝子型の相関性に関する知見を増加させ、発症患者との比較に基づいて、発症リスクを的確に評価するためのデータベースを構築する。その中で、従来用いてきたリンパ球 C8CoA 脱水素活性測定では酵素機能障害の説明が難しい遺伝子変異について、機序を明らかにする。

3. 研究の方法

新生児マススクリーニングまたは各種症状の精査で、血中 C8AC 高値を指摘された症例について、リンパ球 C8CoA 脱水素活性 (Tajima G et al, J Chromatogr B, 2005) による診断を実施。低下を認めた症例には、責任遺伝子 ACADM 各エクソンの配列を直接シーケンス法で解析した。血中 C8AC レベルと、C8CoA 脱水素活性レベルに乖離を認めた症例・変異については、さらに解析を加えた。

4. 研究成果

(1) 患者診断実績と主な遺伝子変異

2014~2016 年度の研究期間中、新たに発症患者 2 例/マススクリーニング 26 例/同胞検索 1 例を診断し、我々による累積診断患者数は 61 例となった (図 1)。遺伝子解析では、以下のように比較的少数の変異が高頻度に認められた (*保因者相当例を含む解析 53 例中)。

c. 449_452delCTGA (p. T150Rfs)	20 例 23 アレル
c. 50G>A (p. R17H)	12 例 13 アレル
c. 1085G>A (p. G362E)	8 例 10 アレル
c. 157C>T (p. R53C)	6 例 6 アレル
c. 843C>T (p. R281S)	5 例 5 アレル

これら 5 種類の主要な変異のうち、c. 449_452delCTGA, p. G362E, p. R281S は残存活性の乏しい null variants であるのに対し、p. R53C は c. 449_452delCTGA との組み合わせで、急性発症例として最も高い 10.3% の残存活性を認めた変異である。一方、p. R17H は 2 番目に多く検出されているが、発症患者での同定例はない。

(2) C8AC 濃度・C8CoA 脱水素活性レベル

罹患者に、保因者あるいは正常個体 (偽陽性) と判定された例を加えた形で、リンパ球酵素活性 (健常対照群平均に対する % 表示) と初回濾紙血 C8AC 濃度との関係 (図 2) または精査時血清 C8AC 濃度との関係 (図 3) をまとめた。マススクリーニング陽性で罹患者と診断された大半の症例 (●) の分布は、初回濾紙血 C8AC と C8CoA 脱水素活性の間に負の相関を示し、この領域の下方には発症患者 (●) が分布した。上方には保因者 (▲) あるいは正常個体 (偽陽性; ×) と判定された新生児が分布したが、同様に上方への乖離が目立つにも関わらず、精査時血清でも基準値を上回る C8AC が続いていた新生児 7 例 (■) は、遺伝子解析の結果、p. E253K homo 1 例, p. E253K/null=1 例, p. K271E/null=2 例, c. 1231G>T (p. V411L)/null=1 例 (*1 例は他施設で複合ヘテロ変異同定済み, 1 例は解析未了) のように、p. E253K, p. K271E が 2 例ずつに検出された。

(3) p. E253K, p. K271E, p. V411L 変異の解析

(i) 基質 C8CoA 濃度に対する反応曲線

血中 C8AC レベルに比べて、リンパ球 C8CoA 脱水素活性が相対的に高くなる機序として、活性測定には大過剰の基質 C8CoA を使用していることから、生体内の生理的濃度域では反応性が低下する可能性を推測し、広範囲の C8CoA 濃度に対する反応曲線を比較検討した。通常基質濃度では健常者細胞と同等の活性を示した、p. E253K ホモ症例と p. V411L/null 症例のリンパ球で検討したが、対照との差異は見出されなかった (図 4)。

(ii) 培養リンパ球による脂肪酸代謝能測定
他に生体内反応系と異なるのは、脱水素反応に共役する電子受容体 electron transfer flavoprotein (ETF) の代わりに、人工電子受容体 ferrocenium hexafluorophosphate (FcPF₆) を用いている点であることから、ETF系での酵素反応を評価する必要があると考えられた。その方法として、安定同位体標識したパルミチン酸(dC16)を患者リンパ球の培養液に添加して、β酸化中間体の生成をLC/MS/MS法で定量する「脂肪酸代謝能測定」を試みることにした。

まず、血中C8ACが常に顕著な高値を示し、リンパ球C8CoA脱水素活性2.6%であった、null variantsの複合ヘテロ接合性患者で測定したところ、正常対照群との相違を最も鋭敏に示すのは、「短鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の生成量比」すなわちdC4/dC8(対照群の2.8%)という指標であった。この方法を患者細胞へ適用したところ、

p. E253K/null 症例 : dC4/dC8=0.9%
p. K271E/null 症例 : dC4/dC8=9.2%
p. Y411L/null 症例 : dC4/dC8=41.5%

という結果が得られ、各症例における血中C8ACレベルを説明し得る所見と考えられた。さらに、「C8 → C6」「C6 → C4」という2段階の反応性を比較したところ、

null/null 症例 :
dC6/dC8=6.3% < dC4/dC6=47.1%
p. E253K/null 症例 :
dC6/dC8=29.7% > dC4/dC6=3.2%
p. K271E/null 症例 :
dC6/dC8=94.9% > dC4/dC6=10.5%
p. V411L/null 症例 :
dC6/dC8=129.6% > dC4/dC6=34.5%

という結果となった。すなわち、これら3種類の変異では、主としてC6CoAに対する活性が低下していて、C8CoAに対する活性は保たれていると考えられた。

(iii) C8CoA脱水素活性とC6CoA脱水素活性
脂肪酸代謝能測定で観察された、C8CoAとC6CoAに対する反応性の乖離について、従来のリンパ球破碎液とFcPF₆を用いる測定系で検証を試みた。下掲の通り、我々の従来の検討では、C6CoAを用いる方法は、C8CoAを用いる方法に比べて、診断感度に劣る結果となっていたが、対象の3種類の変異については、この方法でもC6CoAに対する反応性の相対的な低下が認められた。

	C8CoA 活性 (%)	C6CoA 活性 (%)
null/null	0	6.5
p. R53C/null	10.1	21.2
p. R17H/null	11.0	14.3
p. R17H/p. R53C	46.6	49.1

p. E253K/null	32.2	24.1
p. K271E/null	70.4	33.2
p. V411L/null	80.8	64.7

しかしながら、C6CoA脱水素活性のレベルもなお、各症例の血中C8CoAレベルを説明するには高すぎるため、これらの変異は、FcPF₆を使用する測定系では、生体内での活性低下が正しく反映されないものと考えられた。

(4) p. R17H 変異の解析

我々が当初同定した p. R17H/null の症例が、リンパ球C8CoA脱水素活性=13.2%であったことから、アレル単位での相対活性としては25~30%程度と評価された。一方、強制発現系では約70%と大きな乖離を認めた。MCADタンパクの発現過程において、最初の25アミノ酸は「リーダーペプチド」であることが知られている。そこで p. R17H は、ミトコンドリアへの移行や、ミトコンドリア膜通過時に起こるとされるリーダーペプチド除去に影響する可能性が推測されたが、myc標識した強制発現タンパクの細胞内分布は野生型と同様であった(図5)。また、抗MCADポリクローナル抗体によるWestern blottingを行ったが、正常の43.7kDaに加えて46.6kDaのタンパクは確認されなかった(図6)。

p. R17H は日本人と韓国人での報告しかなく、まだ発症例は確認されていない。我々が診断した p. R17H アレル保有症例は、研究期間前の7例から5例増えて12例となっている。これらのうち(A)8例はnull variantsとの複合ヘテロで、(B)4例は比較的残存活性を有する変異との組み合わせとなっている。両群の初回濾紙血C8AC値とC8CoA脱水素活性(平均±SD)は(A)0.40±0.15nmol/mL, 14.0±4.1%, (B)0.28±0.11nmol/mL, 35.8±11.0%となった。マスキング発症例の発症リスクを評価する場合、これまでに診断した発症患者での分布と比較することになる。発症患者10例中9例はnull/nullという遺伝子型であり、初回濾紙血(発症後の分析,5例分)とC8CoA脱水素活性(平均±SD)は、2.08±1.10nmol/mL, 1.1±1.3%となった。しかし、1例はp. R53C/nullという遺伝子型(p. R53Cは欧米でも発症例に同定されている)で、初回濾紙血C8AC=0.62nmol/mL, C8CoA脱水素活性=10.3%であったことから、これを基準に考えると、p. R17H/null 症例の発症リスクを軽々に否定することは困難である。

p. R53C/null 症例は、急性期血清ではC8AC=5.97nmol/mLへの上昇を示しており、sick dayでの血清C8ACの上昇程度が、p. R17H/null 症例での急性発症リスクを評価する上で重要になると考えられる。我々が長期フォローしている p. R17H/null の1例については、sick dayを含めて血清C8ACの推移を観察してきた。その分布は0.64±0.65nmol/mL (n=28)となっており、急性代

謝不全のリスクは低いと思われるものの、幼少期のウイルス性胃腸炎罹患時などには、最高で C8AC=2.80 が観察されている。このようなデータを多数例で蓄積・共有することが、適切な診療・生活指導の実現に必要である。

(5) 考察

多数の国内症例の診断を通じて、我々のリンパ球 C8CoA 脱水素活性法は、新生児マススクリーニング陽性例の診断と生化学的重症度・発症リスクの評価に有用であるものの、特定の変異については正しく評価できないことが明らかとなった。人工電子受容体の使用が主な要因と考えられ、生理的電子受容体である ETF を介した反応を評価できる方法として、培養リンパ球による脂肪酸代謝能測定が有用であった。しかしながら、この方法はリンパ球破碎液による酵素活性測定に比べて煩雑であるため、偽陽性を含む多数の新生児マススクリーニング陽性例に対して一律に実施するのは、迅速性や実施体制の継続性などの点で困難を伴う。したがって、新生児マススクリーニング陽性例の確定検査としては、まずアシルカルニチン分析による血中 C8AC レベルの確認と、リンパ球 C8CoA 脱水素活性測定を実施すべきである。その結果、両者に乖離を認めた場合は、脂肪酸代謝能測定による酵素機能評価を追加実施するのが有用と考えられる。また、このような国内症例に関する生化学的・遺伝学的情報の集積を継続することによって、将来的には NBS 発見患者の多くが、遺伝子型情報だけで重症度・発症リスクを評価できるようになることが望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Screening of MCAD deficiency in Japan: 16 years' experience of enzymatic and genetic evaluation. *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 119, No. 4, 2016, pp. 322-328, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.10.007>.
- ② Hara K, Tajima G, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M: Significance of *ACADM* mutations identified from newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 118, No. 1, 2016, pp. 9-14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.10.011>.

015. 12. 011

- ③ 但馬剛, 津村弥来, 香川礼子, 岡田賢, 原圭一, 松本裕子, 栢田紗季, 森岡千代美, 吉井千代子, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介: タンデムマス新生児スクリーニング in 広島: 自治体事業化後の現状. *日本マススクリーニング学会誌*, Vol. 25, No. 1, 2015, pp. 75-82, 2015.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Screening of MCAD deficiency in Japan: 15 years' experience of enzymatic and genetic evaluation. 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, April 3-7, 2016.
- ② 但馬剛, 津村弥来, 香川礼子, 岡田賢, 原圭一, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介: 脂肪酸代謝異常症陽性例への対応: 見逃し例を出さないために. 第 43 回日本マススクリーニング学会学術集会, 札幌市, 2016 年 8 月 26-27 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://nrchd.ncchd.go.jp/massscreening/original/reference.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
但馬 剛 (TAJIMA, Go)
国立成育医療研究センター・研究所・室長
研究者番号: 00432716
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
岡田 賢 (OKADA, Satoshi)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究所・講師

津村 弥 (TSUMURA, Miyuki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究所・研究員

原 圭一 (HARA, Keiichi)
国立病院機構呉医療センター・小児科・医長

図1. C8CoA 脱水素活性による累積診断症例数

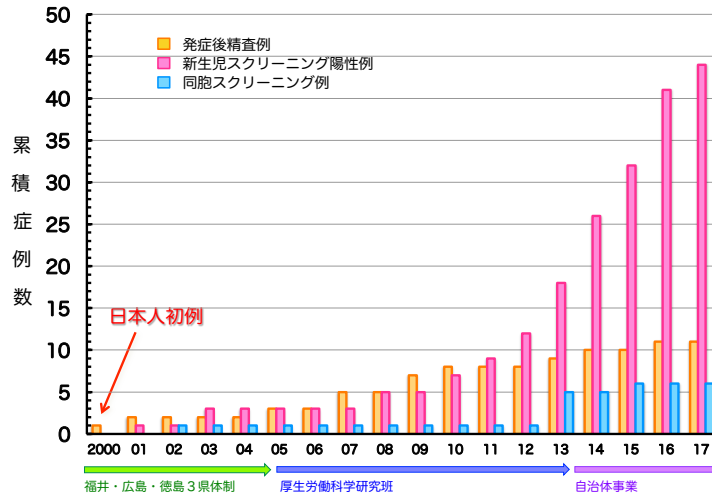


図2. C8CoA 脱水素活性と初回濾紙血 C8AC 濃度

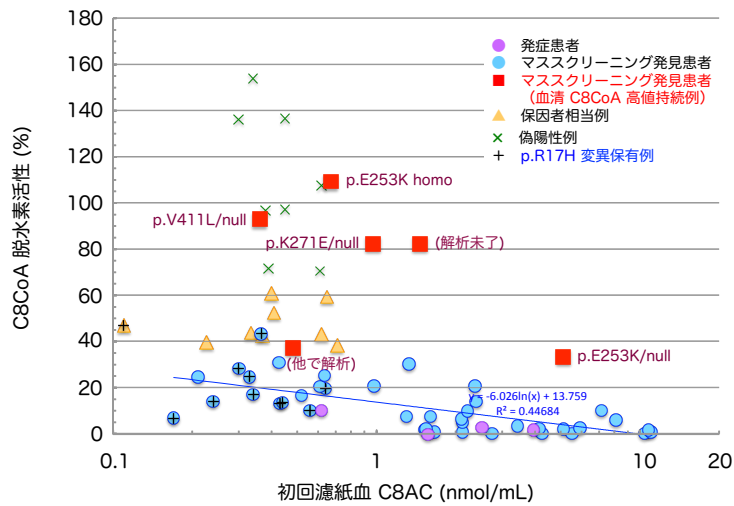


図3. C8CoA 脱水素活性と精査時血清 C8AC 濃度

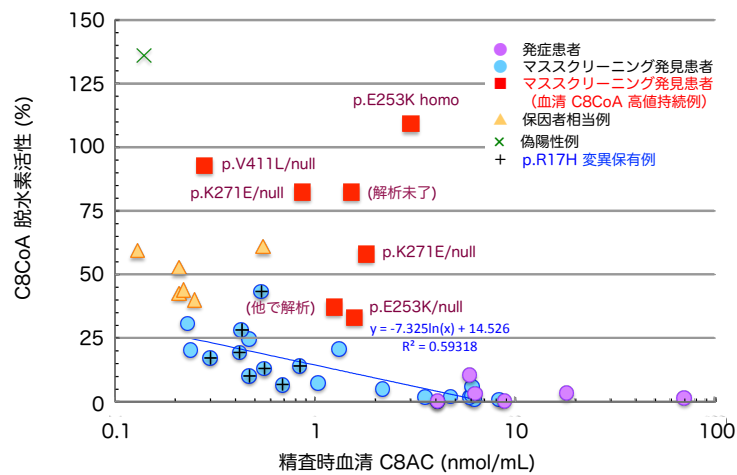


図4. 変異酵素 p.E253K, p.V411L の反応曲線

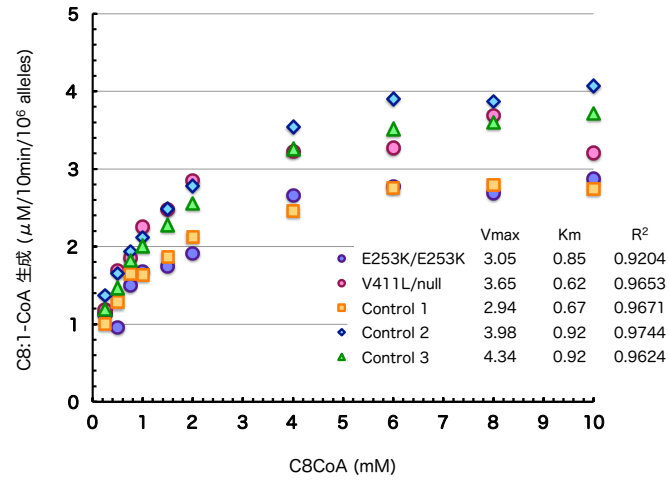
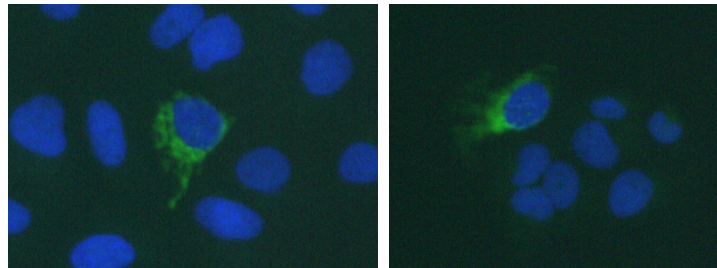


図5. Myc 標識した p.R17H 変異酵素の細胞内分布

(Hoechst / anti-Myc 染色)



野生型

p.R17H

図6. 変異酵素 p.R17H の Western blotting

