

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590679

研究課題名(和文) ポンペ病新生児スクリーニングにおけるアジア人固有の遺伝子多型の影響とその回避策

研究課題名(英文) The effect of the Asian-specific polymorphisms on newborn screening of Pompe disease and new diagnostic approaches for the disease.

研究代表者

奥宮 敏可 (Okumiya, Toshika)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：50284435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポンペ病(酸性 α -グルコシダーゼ欠損症)の新生児スクリーニングに、アジア人固有の遺伝子多型(c.1726Aとc.2065Aのホモ接合体)が影響することを示すと共に、その遺伝多型に影響されない新規診断法を開発した。この方法を技術基盤としてアジア人を対象としてポンペ病の新生児スクリーニング法を確立し、約60,000の日本人新生児から10例の遅発型ポンペ病を同定した。この発症頻度は、従来からの報告の約10倍であった。全症例とも遅発型であったことから、原因不明の神経・筋疾患患者から得られた病理組織検査用の筋生検凍結切片を用いた酵素診断法を確立し、現在、ハイリスクスクリーニングを実施している。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the high frequency (3.9%) of acid α -glucosidase pseudo-deficiency, c.[1726G>A; 2065G>A] homozygote in Asian populations complicated newborn screening for Pompe disease on dried blood spots. We established Ba/Zn method which can be separated between the pseudodeficiency and true Pompe disease. On the base of Ba/Zn method, we have established newborn screening system and tested about 60,000 Japanese newborns. We identified 10 patient with late-onset Pompe disease. Since all patients were late-onset forms, we established an enzymatic diagnostic system using frozen sections of muscle biopsy from neuromuscular diseases who did not undergo definitive diagnosis, and we now are doing high risk screening with the diagnostic system.

研究分野：臨床化学、分子遺伝学

 キーワード：ライソソーム病 ポンペ病 酸性 α -グルコシダーゼ 新生児マススクリーニング 遺伝子多型 ハイリスクスクリーニング 神経・筋疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) ポンペ病のための酵素補充療法ならびに早期診断の必要性

ライソソームに存在する加水分解酵素の1つが遺伝的に欠損することにより、当該酵素に対応する天然基質が体内に過剰に蓄積し様々な症状をきたす一連の疾患をライソソーム病と称する。1991年、ゴーシェ病に対する酵素補充療法が開始されて以来、ファブリー病、II型糖尿病(ポンペ病)さらにムコ多糖症(I、VIおよびII型)等に対する組換え酵素製剤の研究開発が行われるに至った。国内ではゴーシェ病やファブリー病、ムコ多糖症に対する組換え酵素を用いた酵素補充療法が厚生省に承認され既に臨床に应用されている。これらの疾患に続く酵素補充療法の対象疾患としてポンペ病が注目され、組換え酵素製剤(Myozyme™)の使用が、わが国でも2007年に承認された。

ポンペ病はライソソームに存在する酸性 α -グルコシダーゼ(AcGlu)の遺伝的欠損に起因する遺伝性代謝異常症(II糖原病としても知られる)で、本酵素活性の顕減により骨格筋や心筋、肝を中心にグリコーゲンが過剰蓄積する疾患である。したがって、他の遺伝性欠損症と同様に、患者の早期発見が効果的治療法の要件と考えられる。本症の診断は、筋生検材料や培養繊維芽細胞を用いた AcGlu 活性の測定によって行われてきた。しかし、新生児スクリーニングの試料としてこれらの臨床材料を用いることは、患者への負担や長期におよぶ細胞培養期間の必要性等から事実上不可能である。そのため、他の新生児スクリーニングと同様に、採取が容易な血液試料を用いた AcGlu 活性測定が理想的とされるが、血液細胞(主に好中球)由来の類似酵素MG(maltase-glucoamylase)の存在により、特異的な酵素診断法は不可能であった。我々は、この問題を解決するため、経口糖尿病約として開発されたアカルボースがMG活性を特異的に阻害することを利用し、それを混合白血球に應用して AcGlu の特異的測定法を確立した(Okumiya T, et al. Mol Genet Metab, 2006)。

(2) ポンペ病新生児スクリーニングに対するアジア人固有の遺伝子多型(c. 1726Aとc. 2065Aのホモ

接合体: AAホモ接合体)の影響およびその回避策の検討

我々は健常日本人715例およびポンペ病患者18例から得た乾燥血液濾紙を用いて直径約3.2mmの血液ディスクに打ち抜き、測定試料とした。測定には、人工蛍光基質(4MU-A α Glc)を用い、血液ディスク中に含まれる AcGlu により遊離した4MUの蛍光強度を測定した。遺伝子多型(2つの遺伝子多型c. 1726G>Aとc. 2065G>Aから構成される10種類のディプロタイプ)の解析は活性測定に使用した後の血液ディスクをテンプレートとして用い、当研究室で確立したARMS法にて解析を行った。その結果、健常者の酵素活性分布は二峰性を示し、大多数を占める高活性グループとは別に一部患者活性領域と重なる低活性グループが約4%存在することが明らかとなった。遺伝子多型解析により、この低活性グループはc. 1726Aとc. 2065Aのホモ接合体(AAホモ接合体)であることが判明した(kumamoto S, et al. Mol Genet Metab, 2009))。このことは、アジア系人種を対象とした本症の新生児スクリーニングにおいては、この遺伝子多型の存在を考慮しなければならないことを意味し、現在の方法では多くの偽陽性を出してしまうことが推察された。

そこで、我々はAAホモ接合体と患者を明確に識別する分析技術を確立する目的で、反応溶液中に存在するヘモグロビンの影響とその回避策について検討した。その結果、ヘモグロビンは遊離した4MUの蛍光強度に直接影響を与え、著しくその値を低下させることが判明した。そこで、このヘモグロビンを効率的に除去する方法について検討を行った結果、水酸化バリウムと硫酸亜鉛を用いて酵素反応後の溶液からヘモグロビンを除去することで、高感度で信頼性の高い AcGlu 活性測定が可能となった(Ba/Zn法: Shigeto S, Mol Genet Metab, 2011)。

2. 研究の目的

(1) 血液濾紙によるポンペ病の新生児スクリーニング法の開発

AAホモ接合体の存在により、アジア系人種のためのポンペ病新生児スクリーニングは困難と考えられていた。この問題を解決するため我々はBa/Zn法を開発した。このBa/Zn法と

ARMS法を技術基盤として、アジア系人種のためのポンペ病スクリーニングシステムを構築した。本法は、先ず血液濾紙を試料として従来法による一次スクリーニングを行い、約97%の健常者を除き、残りの約3%の症例を対象に二次スクリーニングとしてBa/Zn法を実施し、更に約0.03%まで絞り込んだ。この約0.03%の症例の遺伝子多型を解析し、もし[c.1726G;c.2065G/c.1726G;c.2065G]であれば、ポンペ病の可能性が極めて高いと判断し、それ以外の遺伝子多型の場合でもBa/Zn法のカットオフ値4.0以下の場合には、培養線維芽細胞を用いてA α Glu活性を測定し確定診断を行った。全血からリンパ球(単核球)を分取して、それを酵素試料として酵素診断する方法も可能であるが、我々は既にその方法は確定診断には適さないことを検証していたので利用しなかった。培養線維芽細胞を用いたA α Glu活性測定の基準値としては、健常者で異なる遺伝子多型毎の測定値、さらにポンペ病の臨床表現型毎の測定値が既に集積されているので、その値を用いて診断の根拠とした。

3. 研究の方法

(1) 血液濾紙によるポンペ病の新生児マススクリーニングの実施

①研究対象

熊本県(一部福岡県を含む地域)で出生した新生児を対象として、被検者の保護者あるいは代諾者に対して充分説明を行い文章による同意を得たうえで、被験者から得られた乾燥血液濾紙約60,000例を用いて、我々が確立したスクリーニングシステムを用いてポンペ病のマススクリーニングを実施した。血液濾紙によるスクリーニングによりポンペ病が強く疑われる症例が認められた場合には、被験者の保護者あるいは代諾者の同意のもとに皮膚片を採取し、培養皮膚線維芽細胞を樹立した。この培養皮膚線維芽細胞を試料としてA α Glu活性を測定し確定診断した。ポンペ病と診断された場合には、血液濾紙あるいは培養皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、A α Glu遺伝子のフルシークエンスを行った。A α Glu mRNAの発現レベルの解析には、患者の培養皮

膚線維芽細胞を用い、参照遺伝子としてはヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を用い $\Delta\Delta$ CP法により評価した。

②方法

1) 一次および二次スクリーニング

一次スクリーニングとしては、乾燥血液濾紙を専用のパンチング装置で、直径約3.2mmの血液ディスクとして打ち抜き、その1枚を専用抽出液100 μ Lで抽出し、その抽出液20 μ Lを酵素試料としてマイクロプレートに入れ、さら4.5 μ mol/Lのアカルボースを含む2.0 mmol/L 4MU- α Glc、CP緩衝液(pH 4.0)を40 μ L添加し混和後、37°Cで24時間インキュベートした。酵素反応後、反応停止液として0.2%SDS含有0.2 mol/L グリシン-NaOH緩衝液(pH 10.7)を190 μ L添加し、A α Glu活性により遊離した4MUの蛍光強度を、励起波長360nm、蛍光波長450nmとしてマイクロプレートリーダーで測定した。

二次スクリーニングとしては、直径約3.2mmの血液ディスク1枚を1.5 mlのプラスチックチューブに入れ、そこに3.0 μ mol/Lのアカルボースを含む2.0 mM 4MU- α Glc、CP緩衝液(pH 4.0)を60 μ L添加し、10分間激しく混和後、37°Cで24時間インキュベートした。酵素反応後、0.15mol/L 水酸化バリウム溶液を30 μ L添加し、充分混和後、室温で5分間放置し、さらに0.15 mol/L 硫酸亜鉛溶液を30 μ L添加し、充分混和後、室温で10分間放置した。水酸化バリウム溶液と硫酸亜鉛溶液により懸濁した反応液を12,000rpmで5分間遠心し、その上清90 μ Lを取りマイクロプレートに移した。この上清に、反応停止液として0.2%SDS含有0.4 mol/L グリシン-NaOH緩衝液(pH 10.7)を160 μ L添加し、A α Glu活性により遊離した4MUの蛍光強度を、励起波長360 nm、蛍光波長450 nmとしてマイクロプレートリーダーで測定した。

2) 培養皮膚線維芽細胞を用いたA α Glu活性測定(人工蛍光基質4MU- α Glcならびにグリコーゲン基質による測定)

培養皮膚線維芽細胞によるA α Glu活性測定には人工蛍光基質4MU- α Glcならびに天然基質

であるグリコーゲンを用いた。

人工蛍光基質による測定では、培養線維芽細胞ホモジネートを酵素試料として、一次スクリーニングと同様の方法で行った。なお、培養線維芽細胞にはMG活性が存在しないので半応液中にはアカルボースを加えなかった。グリコーゲンによるA α Gluの測定では、天然基質であるグリコーゲンを基質として、培養線維芽細胞ホモジネートを反応させ、グリコーゲンから加水分解され遊離する微量のグルコース濃度を、我々の研究室で開発した超高感度なグルコース定量方法で検出し、単位時間・単位蛋白質量当たりのグルコース遊離量を算出し、グリコーゲンの分解活性を求めた。

3) その他の分子細胞生物学的解析

その他、スクリーニングにより同定された患児から得られた培養線維芽細胞内のA α Glu蛋白質の量ならびに質的变化は抗ヒトA α Glu抗体によるウエスタンブロッティングにより解析した。また、患者遺伝子のダイレクトシーケンスにより複数の未知の塩基置換が認められた場合には、Site-directed mutagenesis (SDM)により発現コンストラクトを作製し、酵素機能への影響を調べた。さらに、スプライス異常が予想された場合には、cDNAをシーケンスするとともに、その異常トランスクリプトの発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 血液濾紙によるポンペ病の新生児マススクリーニングの成果

現在までに約60,000件の新生児をスクリーニングしたところ、一次スクリーニングで約1,300例が陽性となったが、二次スクリーニング(Ba/Zn法)で89例(約15分の1)まで絞り込むことができた。この89例の内、皮膚を採取したのは37例で、その皮膚から培養線維芽細胞を樹立し、A α Glu活性測定により確定診断を行い、10例の症例がポンペ病であると判断した。この89例の中には培養線維芽細胞による確定診断が必要と思われる症例が含まれることから、事実上の患者数は10例を上回るものと思われる。これら10例の患児のA α Glu遺伝子の

ダイレクトシーケンスの結果では、明らかな病因変異遺伝子が両アリアルに同定された症例は認められなかった。また、10例中1のみが[c. 1726G;c. 2065G/c. 1726G;c. 2065G]で、2例は[c. 1726A;c. 2065A/c. 1726A;c. 2065GA]のホモ接合体で、7例は[c. 1726G;c. 2065G/c. 1726A;c. 2065A]のヘテロ接合体であった。10例中9例が、どちらかのアリアルに[c. 1726A;c. 2065A]を有していた。

(2) ポンペ病発症への[c. 1726A;c. 2065A]多型の関与

10例中9例が、どちらかのアリアルに[c. 1726A;c. 2065A]を有していたことから、ポンペ病発症に[c. 1726A;c. 2065A]多型が関与しているか否か調べるために、片側のアリアルに病因遺伝子変異は同定されているが、もう一方のアリアルに遺伝子変異が同定されていない患者由来の培養線維芽細胞をスクリーニングし、[c. 1726A;c. 2065A]多型を両方あるいは片側のアリアルに有する症例を4例同定した。その内、1例は片側に既知の病因遺伝子変異を有しており、それとは異なるアリアルに[c. 1726A;c. 2065A]多型と既知の多型を数個有していた。そこで、SDMにより、[c. 1726A;c. 2065A]を有するA α Glu cDNAと[c. 1726G;c. 2065G]を有するA α Glu cDNAに同定された既知の遺伝子多型(アミノ酸が置換するもの)をそれぞれ組み込み、発現コンストラクトを作製した。これらの発現コンストラクトをCOS-7細胞に導入し、様々なバリエーションA α Glu酵素蛋白質を発現させ、ウエスタンブロッティングと酵素活性測定(人工蛍光基質とグリコーゲン基質)により、既知遺伝子多型と[c. 1726A;c. 2065A]のコンビネーションがA α Glu酵素機能へ与える影響を調べた。その結果、アジア系人種に比較的高頻度に求められる既知の遺伝子多型が[c. 1726A;c. 2065A]と共存する場合には、細胞内に前駆体酵素は若干認められたが成熟体A α Gluがほとんど発現されず、細胞内酵素活性は検出限界以下となることが判明した。このことから、従来まで単独ではポンペ病の下人とならないと考えられていた[c. 1726A;c. 2065A]多型は、他の遺伝子多型(アミノ酸置換するもの)と共存することで、A α Gluの発現に著しい影響を与えることが

証明された。このことは、従来までは各1つの病因遺伝子変異を両アレルに同定することで、病気の原因を説明してきたが、複数の多型が共存することで、いわば「複合型遺伝子多型」として働き、酵素活性に直接影響を与えるという、新たな遺伝性疾患の発症概念を提起するものである。

(3) 病理組織検査用の凍結切片を用いたポンペ病のハイリスクスクリーニング

約60,000件を対象に実施したポンペ病の新生児マススクリーニングにより同定された10症例は、培養線維芽細胞の酵素活性測定による確定診断により、全症例ともに遅発型ポンペ病と診断された。このことは、原因不明の神経筋疾患患者(成人)の中に、予想を上回るポンペ病が潜在している可能性が予想された。そこで、確定診断がなされていないが臨床症状として明らかに神経筋症状のある患者から得られた筋生検材料の凍結切片を試料として、酵素活性を測定する方法を確立した。現在、その方法を用いて年間約700例の患者のハイリスクスクリーニングを行っている。その成果が集積されれば、今まで確定診断されていなかった遅発型ポンペ病の頻度が明らかになり、神経内科領域へのポンペ病の除外診断の重要性を啓発することができるものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① 山中万次郎, 山川智弘, 奥宮敏可. ファブリー病に対する化学シャペロンの分子機構の解析. 日本臨床化学会九州支部会誌 24 (2014) 52-55 (査読無)
- ② 井手俊明, 岡田侑也, 奥宮敏可. アジア人固有の遺伝子多型の影響を受けないポンペ病の新規診断法の確立. 日本臨床化学会九州支部会誌 22 (2012) 26-32 (査読無)
- ③ Shigeto S, Katafuchi T, Okada O, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FV, Reuser AJ, Okumiya T. Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. Mol. Genet. Metab. 103 (2011) 12-17(査読有).
- ④ 岡田侑也, 片渕達也, 奥宮敏可. 変異蛋白質に対する化学シャペロンの効果に関する解

析. 日本臨床化学会九州支部会誌21 (2011) 65-69 (査読無)

- ⑤ 岡田侑也, 重藤翔平, 奥宮敏可. ポンペ病の酵素診断に影響するアジア人固有の遺伝子多型の解析. 日本臨床化学会九州支部会誌21 (2011) 70-73 (査読無)

[学会発表] (計18件)

- ① 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. ガスリー濾紙からのゲノムDNAの抽出ならびにダイレクトシーケンス法の確立. 第62回日本臨床検査医学会学術集会(岐阜市), 2015年11月20日
- ② 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. 「遺伝性代謝病に対する化学シャペロンのフォールディング制御の解析」第62回日本臨床検査医学会学術集会(岐阜市), 2015年11月20日
- ③ 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病における遺伝子変異のホットスポットの解析. 第55回日本臨床化学会年次学術集会(吹田市), 2015年11月1日
- ④ 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. ポンペ病に対する酵素補充と化学シャペロンの併用療法の分子メカニズム. 第55回日本臨床化学会年次学術集会(吹田市), 2015年11月1日
- ⑤ 石橋潤一, 山中万次郎, 西岡和輝, 奥宮敏可. 血液濾紙を用いたポンペ病患者の遺伝子解析. 第10回日本臨床検査学教育学会学術大会(松本市), 2015年8月20日
- ⑥ 西岡和輝, 石橋潤一, 奥宮敏可. 遺伝性代謝病を対象とした組換え酵素製剤と化学シャペロンの併用療法の有効性. 第10回日本臨床検査学教育学会学術大会(松本市), 2015年8月20日
- ⑦ 山中万次郎, 西岡和輝, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病に対する新生児マススクリーニング法の確立と遺伝子解析. 第61回日本臨床検査医学会学術集会(福岡市), 2014年11月23日
- ⑧ 西岡和輝, 山中万次郎, 奥宮敏可. ポンペ病に対する化学シャペロン療法 第二報: 酵素補充との併用療法の分子メカニズム. 第61回日本臨床検査医学会学術集会(福岡市), 2014年11月23日
- ⑨ 奥宮敏可, 山中万次郎, 西岡和輝. ポンペ病に対する化学シャペロン療法 第一報: NB-DNJは変異酵素の細胞内プロセッシングを正常化する. 第61回日本臨床検査医学会学術

集会(福岡市), 2014年11月23日

- ⑩ 山中万次郎, 西岡和輝, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病に対する新生児マススクリーニング法の確立. 第54回日本臨床化学学会年次学術集会(文京区), 2014年
- ⑪ 西岡和輝, 山中万次郎, 奥宮敏可. ポンペ病に対する化学シャペロンの効果並びにその分子メカニズムの解析. 第54回日本臨床化学学会年次学術集会(文京区), 2014年9月6日
- ⑫ 山中万次郎, 西岡和輝, 百崎謙, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病に対する新生児マススクリーニング法の確立と遺伝子解析. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会(大田区), 2014年9月7日
- ⑬ 西岡和輝, 山中万次郎, 山川智弘, 奥宮敏可. ポンペ病に対する酵素補充療法と化学シャペロンによる併用療法の分子メカニズム. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会(大田区), 2014年8月21日
- ⑭ 山中万次郎, 西岡和輝, 百崎謙, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥宮敏可. 日本人ポンペ病に対する新生児マススクリーニング法の確立と遺伝子解析. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会(大田区), 2014年8月21日
- ⑮ 山川智弘, 山中万次郎, 井出俊明, 奥宮敏可. アジア人におけるポンペ病の新生児スクリーニング法の開発. 第8回日本臨床検査学教育学会学術大会(吹田市), 2013年8月27日
- ⑯ 山川智弘, 片渕達也, 山中万次郎, 奥宮敏可. 遺伝性代謝病における変異蛋白質に対する化学シャペロン効果の分子メカニズム. 第8回日本臨床検査学教育学会学術大会(吹田市), 2013年8月27日
- ⑰ 井出俊明, 山川智弘, 奥宮敏可. ポンペ病の血液濾紙を用いた酵素活性測定法の問題

点と改善策. 第7回日本臨床検査学教育学会学術大会(名古屋市), 2012年8月23日

- ⑱ 山川智弘, 井出俊明, 奥宮敏可. ポンペ病における化学シャペロンの効果とその分子メカニズムの解析. 第7回日本臨床検査学教育学会学術大会(名古屋市), 2012年8月23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥宮 敏可 (OKUMIYA TOSHIKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 50284435

(2) 連携研究者

中村公俊 (NAKAMURA KIMITOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号30336234

遠藤文夫 (ENDO FUMIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号00176801

奥山虎之 (OKUYAMA TORAYUKI)

国立成育医療センター・臨床検査部・部長

研究者番号40177192

大竹明 (OHOTAKE AKIRA)

埼玉医科大学・医学部小児科学講座・教授

研究者番号00203810

久保亨 (KUBO TORU)

高知大学・医学部附属病院・講師

研究者番号80325422