

表 1 当院における末期腎不全の原因疾患

腹膜透析導入患者(n=31)	人数 (移植に重複)	腎移植患者(n=36)	人数 (透析に重複)
異・低形成腎	11(5)	異・低形成腎	10(5)
先天性ネフローゼ	4(1)	若年性ネフロン癆	7(1)
慢性糸球体腎炎	2	多発性嚢胞腎	4
新生児・乳児期ショック	2	巣状分節性糸球体硬化症	4
後部尿道弁	2(1)	先天性ネフローゼ	3(1)
結節性硬化症	2(1)	慢性糸球体腎炎	3
ネフロン癆	1(1)	後部尿道弁	1(1)
巣状分節性糸球体硬化症	1	結節性硬化症	1(1)
糸球体嚢胞症	1(1)	Wilms腫瘍	1
ブルーベリー症候群	1	糸球体嚢胞症	1(1)
腎血管性高血圧	1	メチルマロン酸血症	1
多発性嚢胞腎	1		
尿細管異形成	1		
Wilms腫瘍	1		

#### 4. 前記2名の患者の診断動機

症例1：19歳女性

両側低・異形成腎のため、生直後に呼吸器管理と約1週間の腹膜透析を実施。その後腹膜透析を離脱するも次第に腎機能が低下し、9歳時に当院紹介となる。10歳時に腹膜透析導入、11歳時に母より生体腎移植を実施。その際に右耳の聴力低下を指摘され、さらに感染を繰り返す耳瘻孔によりBOR症候群と疑われ、11歳時に遺伝子検査によりExon6 497T>Aのナンセンス変異を指摘され診断に至った。

症例2 2歳女児

右低形成腎、左嚢胞性多発性異形成腎により月齢1.5Mに腹膜透析導入となる。成長に伴い、耳介変形が目立ち始め耳瘻孔も発見。家族歴を聴取したところ、父に難聴と幼少期の頸瘻の手術の既往があることが判明し(腎に異常なし)、BOR症候群を疑われて、遺伝子検査によりExon12にc. 1254del1ATの変異を指摘され診断に至った。その後耳鼻科の早期介入が可能となり、定期的な検診が開始された。それにより、聴力低下を防ぐために頭部を強打しないように注意する、中耳炎を早期発見・治療するなどの適切な対応が取ることが可能となった。

これら2名の患者は、BOR症候群の診断が当院でなされた。ともに、耳鼻科的異常が、BOR症候群を疑

わせる契機となり発見にいたった。

#### D. 考察

小児腎臓病学会の統計調査委員会からの報告によれば、1998年から2005年の8年間に末期腎不全になり、腹膜透析導入、腎移植、あるいは血液透析導入となった15歳未満の小児患者は469名いた。そのうちBOR症候群の診断名が付いたものは2名含まれていた。一方、本症候群の腎合併症である低・異形成腎は169名おり全体の35%を占めていた。

(日児腎誌 22 ; 132-139. 2010)

我々の施設の全57名のデータでは、低・異形成腎は原因疾患の36%であり、統計調査委員会からの報告の割合と同様であった。さらに、我々の結果からはBOR症候群は低・異形成腎の9.5%を占める可能性があり、これを統計調査委員会からの報告に当てはめると、わが国では1998年から2005年の8年間にBOR症候群により16名の児が末期腎不全にいたった可能性があると推定された。

本研究班の一昨年の全国調査の結果では、BOR症候群における腎奇形の合併は、全体で91例中27例(29.7%)、小児科管理患者に限れば42名中18名(43%)が腎合併症を伴っていた。実際、昨年本研究班で報告した当院にて管理中の13名のBOR症候群の患者中で腎合併症を呈した患者は5名であり(38%)、一昨年の全国調査の結果とほぼ同等であった。また、5名中2名が前述のように小児期に末期腎不全に進行している。また、一昨年の本研究班の推測によれば全国に250名のBOR症候群の患者がいることが推定されており、腎合併症をもつ患児を30%と見積もると腎合併症をもつBOR症候群はわが国に、最低75名はいることが推定される。また、それらの患者のうち、20~40%が小児期に末期腎不全に至るとすると、その人数は15~30名となる。

今回の推定からは、小児末期腎不全患者の中に多くの未診断のBOR症候群が存在している可能性が示唆された。本症におけるQOLは、腎機能障害と難

聴により著しく損なわれる。小児末期腎不全患者におけるBOR症候群の確定診断を進めることは、難聴の進行への対応や難聴そのものへの早期介入を可能とせしめ、本症の患児のQOL改善に貢献するであろう。そのため、本症の患者が受診する可能性が高い診療科である小児科と耳鼻咽喉科の綿密な連携が本症の予後改善に重要である。しかしながら、本稿に述べたように、当院の症例も、「本症の存在を知っていて疑う」ということが第一ステップである。そのためにも耳鼻咽喉科医や一般小児科医の間でも本症への認識が不足しており本調査の結果を論文や学会発表等で、今後も広く公表し啓発する必要がある。

## E. 結論

わが国の小児末期腎不全患者の中に多くの未診断のBOR症候群が存在している可能性がある。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Kamei K, Nakanishi K, Ito S, Saito M, Sakamoto M, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Iijima K, Yoshikawa N; for the Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. Long-Term Results of a Randomized Controlled Trial in Childhood IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011, 6:1301-7
- ② Ito S, Kamei K, Ogura M, Sato M, Fujimaru T, Ishikawa T, Udagawa T, Iijima K. Maintenance therapy with MMF after rituximab in pediatric patients with steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2011, 26:1823-8
- ③ Kamei K, Ito S, Shigeta T, Sakamoto S, Fukuda A, Horikawa R, Saito O, Muguruma T, Nakagawa S, Iijima K, Kasahara M. Preoperative dialysis for liver transplantation of methylmalonic acidemia. *Ther Apher Dial*, 2011, 15:488-92

- ④ Harada T, Kaneko T, Ito S, Hataya H, Nariai A, Mori M, Yokota S. Superior mesenteric artery syndrome : risk factor for duodenal involvement in Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Int*. 2011, 53:630-3
- ⑤ Harada T, Ito S, Sasaki T, Kunisaki R, Shiojima H, Ogawa M, Yokota S. GI involvement of sigmoid mucosal erosion in a 13-year-old girl with microscopic polyangiitis. *Gastrointest Endosc*. 2011, 74:937-9
- ⑥ Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N, Nagai T, Ikezumi Y, Fujita N, Ito S, Iijima K, Kitagawa T. Age, gender, and body length effects on reference serum creatinine levels determined by an enzymatic method in Japanese children: a multicenter study. *Clin Exp Nephrol*, 2011, 15:694-9
- ⑦ Kobayashi I, Kubota M, Yamaada M, Tanaka H, Ito S, Sasahara Y, Whitesell L, Ariga T. Autoantibodies to villin occur frequently in IPEX, a severe immune dysregulation, syndrome caused by mutation of FOXP3. *Clinical Immunology*, 2011, 141:83-9
- ⑧ Otsubo K, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Tsuge I, Imaizumi M, Sasahara Y, Hayakawa A, Nozu K, Iijima K, Ito S, Horikawa R, Nagai Y, Takatsu K, Mori H, Ochs H, Miyawaki T. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like CD(4)+CD25(+)+CD127(low) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. 2011, 141:111-20
- ⑨ Ito S, Ikeda H, harada T, Kamei K, Takahashi E. Cyclophosphamide followed by Mizoribine as maintenance therapy against refractory steroid dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26:1921-2
- ⑩ 亀井宏一, 小椋雅夫, 佐藤舞, 石川智朗, 藤丸拓也, 宇田川智宏, 六車崇, 中川聡, 堀川玲子, 笠原群生, 伊藤秀一. 一歳未満の急性血液浄化療法 *日本小児科学会雑誌*2011, 115 : 1307-1313
- ⑪ 亀井宏一, 小椋雅夫, 佐藤舞, 石川智朗, 藤丸拓也, 宇田川智宏, 六車崇, 中川聡, 堀川玲子, 笠原群生, 伊藤秀一. 一歳未満の急性血液浄化

療法 日本小児腎不全学会雑誌2011, 31 : 229-231

The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. Fukuoka, Japan, 2011.6.2.

- ⑫ 佐藤舞, 藤丸拓也, 石川智朗, 宇田川智宏, 小椋雅夫, 亀井宏一, 伊藤秀一, 堤晶子. 急性腎障害から回復することなく末期腎不全に移行した乳児の3例 日本小児腎不全学会雑誌 2011, 31 : 89-92
- ⑬ 伊藤秀一. 小児急性肝不全に対する人工肝補助療法 医工学治療 2011, 23 : 71-74
- ⑭ 宇田川智宏, 小椋雅夫, 亀井宏一, 尾田高志, 伊藤秀一. Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES)で発症した容連菌感染後急性糸球体腎炎の一男児例 小児高血圧研究会誌2011, 8 : 37-43
- ⑮ 小椋雅夫, 亀井宏一, 堤晶子, 野田俊輔, 佐藤舞, 藤丸拓也, 石川智朗, 宇田川智宏, 伊藤秀一. 難治性ネフローゼ症候群におけるリツキシマブの恩恵 骨合併症の見地から 日本小児腎臓病学会雑誌 2011, 24 : 31-35
- ⑯ 亀井宏一, 佐藤舞, 石川智朗, 藤丸拓也, 堤晶子, 野田俊輔, 宇田川智宏, 小椋雅夫, 伊藤秀一: ステロイド投与による血清シスタチンC測定値への影響. 日本小児科学会雑誌 2011 ; 115 : 74-76
- ⑰ 亀井宏一, 堤晶子, 野田俊輔, 石川智朗, 佐藤舞, 藤丸拓也, 宇田川智宏, 小椋雅夫, 大橋牧人, 磯部英輔, 土井房恵, 川田容子, 源規安, 伊藤秀一: 無酢酸透析液が有用であった生後5ヶ月の男児例. 日本透析医学会雑誌 2011, 44 : 87-92
- ⑱ 亀井宏一, 伊藤秀一, 飯島一成. 採尿を必要としないイヌリンクリアランスの測定の試み 日本腎臓学会誌 2011, 53 : 181-188

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- ① Ito S, Udagawa T, Ogura M, Mayumi S, Kamei K, Iijima K. Efficacy of Maintenance Therapy with Mycophenolate Mofetil after Rituximab for Steroid-Dependent Nephrotic Syndrome. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting. Denver, USA, 2011.5.2
- ② Ito S. Treatment for Refractory Nephrotic Syndrome; Other Immunosuppressive Drugs.

- ③ Ito S, Kamei K, Udagawa T, Ogura M, Fujimaru T, Ishikawa T, Sato M, Fujinaga S, Iijima K. National survey of rituximab treatment for childhood idiopathic nephrotic syndrome. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. Fukuoka, Japan, 2011.6.2.
- ④ 伊藤秀一, 石川智朗, 藤丸拓也, 佐藤舞, 小椋雅夫, 亀井宏一, 河合利尚. 関節炎の疑いで紹介され発見されたFabry病の一男児例. 第21回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2011.10.14
- ⑤ 伊藤秀一, 佐古まゆみ, 斎藤真梨, 佐藤舞, 藤丸拓也, 小椋雅夫, 亀井宏一. 我が国の小児急性血液浄化療法の実態調査. 第33回日本小児腎不全学会学術集会, 焼津, 2011.10.21

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

耳鼻科的観点からのBOR症候群の遺伝子診断法の確立と診療体制モデル構築  
に関する研究

研究分担者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター  
聴覚障害研究室長

研究要旨

鰓弓耳腎（Branchio-oto-renal（BOR））症候群は、頸瘻・耳瘻孔・外耳奇形などの鰓原性奇形、難聴、腎尿路奇形を3主徴とする症候群である。本年度の研究ではBOR症候群に対する新たな診療体制モデルの構築を目的とした。具体的には、遺伝相談の提供が可能な施設から距離が離れた地域に居住する患児とその両親と地域の担当医が、良質な遺伝相談を受けるためのシステムを開発することを目的とした。このための試みとしてPanasonicのHD映像コミュニケーションシステムを用いて、距離の離れた診療施設の医師との間で遺伝相談のシミュレーションを行った。この結果、実際の対面での遺伝相談とほぼ同様の内容を再現できることが判明した。今後、このようなシステムを臨床に導入することで遺伝相談の普及と効果が促進されると考えられた。

A. 研究目的

鰓弓耳腎（Branchio-oto-renal（BOR））症候群は、頸瘻・耳瘻孔・外耳奇形などの鰓原性奇形、難聴、腎尿路奇形を3主徴とする症候群である。BOR症候群の欧米での頻度は4万人に1人とされ、小児高度難聴の2%を占めるとされている。本症の原因には、遺伝的要因が関与していると考えられ、遺伝子検査の結果を患者に報告する際には、その結果に基づいた診療に関する内容についても説明する必要がある。その中には、子どもへの遺伝の可能性なども含まれ、広い意味で遺伝相談に含まれる。患児とその家族は遺伝子検査を

受けて、その結果の説明を受けるためには多くの場合は2回、そのような検査と説明のできる施設を訪問しなければならず、患児の自宅から遠距離である場合は負担が大きい。また、説明の際には患児とその両親のみでなく、両親の理解が得られれば日常の診療を担当する医師も同席して、その担当医が原因と病態とそれに基づく診療について理解を高めるとともに、患児とその両親がどこまで理解できているかも知っておくことが望ましい。しかし、距離が離れた施設の複数の医師、患者の全員の都合を合わせて一堂に会する機会を設けることは多くの場合困難である。この問題を

解決するために最新のインターネット通信技術を用いた映像コミュニケーションシステムが近年開発された。本年度は、このシステムが将来、診療に活用できるかどうかを検証することを目的とした。

## B. 研究方法

Panasonic の HD 映像コミュニケーションシステムを用いて、距離の離れた診療施設の医師（神奈川県立こども医療センター耳鼻咽喉科、小河原昇医師）との間で遺伝カウンセリングのシミュレーションを行った。本システムはインターネットにおける仮想の専用線である VPN（バーチャルプライベートネットワーク）を介しており、さらに音声および画像の信号を 2 段階の暗号化しているため情報の漏洩の心配がなく、安全性が高いことが大きな特徴である。さらに、フルハイビジョンシステムを光通信を介して使用しているため、画像や音声を鮮明かつリアルタイムで交信できる。そのため、実際に対面して会話しているのと同様の状況で遺伝相談を進めることもできることも大きな特徴である。

### （倫理面への配慮）

本研究を含めた研究計画は、国立病院機構東京医療研究センター、国立成育医療研究センター、神戸大学の倫理審査委員会において承認済みである。

## C. 研究結果

本システムでは、据え置きのカメラによる対面のコミュニケーションのみでなく、サブカメラを用いてより細かい資料も映して相手に供覧することもできた。

これは BOR 症候群の診療においては、外耳や頸部を映して確認することで、実際にどのような形態であるかをよく理解できる点で特に有用であった。

また、サブ画面表示により相手が実際にどのように見えているかもリアルタイムに確認できて、意志の疎通障害を予防できた。

さらに手元のパソコンに画面を切り替えることも可能であり、これはオーディオグラムなどの資料をその場で両施設の間で同時に確認しながら協議することもできて有用である。

事前に説明資料を電子メールで送付して、それをプリントアウトして相手の手元に準備してもらうことで、詳しい説明を理解しやすく行うことも可能であった。

このようにして実際の遺伝相談のシミュレーションでは、対面での遺伝相談とほぼ同様の状況を再現できることを確認できた。

## D. 考察

これまで遠距離の移動と関係者の予定を調整することが困難であるため、患者とその診療に関わる医師が一堂に会する説明には大きな制限があったが、最新のインターネット通信技術を用いた映像コミュニケーションシステムを用いることで、この問題点を解決できる可能性が示された。これは、遺伝相談のような専門性の要求される医療の普及において大きく役立ち、総合的診療体制の確立のためのモデルとなると考えられた。

## E. 結論

遺伝子検査施設から遠隔地に居住する BOR 症候群の患児、両親、担当医師に対して遺伝子検査の内容や結果の説明を最新のインターネット通信技術を用いた映像コミュニケーションシステムを用いて行うことは、患者側および医療者側の双方の負担を軽減し、診療効果の向上に役立つと考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Fujinami Y, Mutai H, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T. A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J Pharmacol Sci* (in press)

Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomoari I, Kakishima H, Taiji H, Usami SI, Okuyama T, Matsunaga T. Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation. *BMC Med Genet*. 2011, 12:135

Mizutari K, Nakagawa S, Mutai H, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T. Late-phase recovery in the cochlear lateral wall following severe degeneration by acute

energy failure. *Brain Res*. 1419: 1-11, 2011

Cui Y, Sun GW, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, Kaga K, Ogawa K. Acoustic overstimulation-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 268 (7), 973-978, 2011

大原卓哉、泰地秀信、守本倫子、本村朋子、松永達雄. OTOF 遺伝子変異を認める Auditory neuropathy spectrum disorder の乳幼児例における人工内耳装用効果. *Audiology Japan* 54 (4) 289-297, 2011

松永達雄. 難聴. In: 泉孝英・編集. 今日の診療のために ガイドライン外来診療 2012 日経メディカル開発:東京, 印刷中

松永達雄. ステロイド依存性感音難聴. *JOHNS* 27 (9) 1352-1353, 2011

松永達雄. Auditory Neuropathy の遺伝子 Clinical Neuroscience 29 (12) 1409-1411, 2011

### 2. 学会発表

Minami S, Nanba K, Mutai H, Matsunaga T. Genotype and phenotype correlation in GJB2 mutations (DFNB1): (analysis of protein structure). 35 th annual midwinter research meeting of ARO. February 25-29, 2012. San Diego, California, USA

仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代. 側頭骨 CT で両側蝸牛神経管狭窄を認めた小児難聴症例の検討. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011 年 5 月 19-21 日. 京都市

守本倫子、大原卓也、本村朋子、松永達雄、泰地秀信. 両側蝸牛神経低形成による小児難聴症例の検討. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011 年 5 月 19-21 日. 京都市

有本友季子、仲野敦子、松永達雄、工藤典代. SOX10 遺伝子の変異を認めた Waardenburg 症候群の 2 症例. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011 年 5 月 19-21 日. 京都市

南修司郎、松永達雄、増田佐和子、臼井智子、藤井正人、加我君孝. WFS1 遺伝子変異と GJB2 遺伝子変異を併せもった遺伝性管音難聴の 1 家系. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011 年 5 月 19-21 日. 京都市

進藤彰人、徳丸裕、松永達雄、藤井正人、加我君孝. 長期経過後に頬部に転移した嗅神経芽細胞腫の 1 例. 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会. 2011 年 6 月 23-24 日. 松本市

松永達雄. シンポジウム「難聴治療に対する遺伝学的検査の impact」. 補聴器に関して. 第 3 回難聴遺伝子の研究会. 2011 年 7 月 2 日. 東京

泰地秀信、守本倫子、松永達雄. 蝸牛神経低形成の小児例における聴覚検査所見. 第 56 回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 2011 年 10 月 27-28 日. 福岡市

臼井智子、増田佐和子、石川和代、鶴岡弘美、松永達雄. 早期に発見された低音障害型難聴乳児をきっかけに判明した、まれな遺伝性難聴の一家系. 第 56 回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 2011 年 10 月 27-28 日. 福岡市

渡部高久、松永達雄、井上泰宏、小川郁. KCNQ4 遺伝子変異を認めた両側性高音障害型感音難聴の一症例. 第 56 回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 2011 年 10 月 27-28 日. 福岡市

森貞直哉、橋本総子、大坪裕美、付学軍、石森真吾、忍頂寺毅史、橋村裕也、貝藤裕史、鈴木直大、松永達雄、飯島一誠. MLPA 法で診断しえた *EYAI* 変異による branchio-oto-renal (BOR) 症候群の 3 家系. 第 56 回日本人類遺伝学会大会. 2011 年 11 月 10-12 日. 千葉市

岡本康秀、松永達雄、川戸美由紀、加我君孝、小川郁. Pendred 症候群の患者数把握のための全国調査による検討. 第 21 回日本耳科学会. 2011 年 11 月 24-26 日. 沖縄県宜野湾市

松永達雄、新正由紀子、山本聡、難波一徳、務台英樹、加我君孝. 温度感受性 Auditory Neuropathy における OTOF 遺伝子の新規特異的変異の同定. 第 21 回日本

耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

増田佐和子、臼井智子、松永達雄. 小児一側性難聴のCT所見と聴覚検査所見. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

難波一徳、新谷朋子、藤井正人、加我君孝、松永達雄. Auditory Neuropathyの原因として同定された新規変異型OPA1蛋白質の予測構造を用いた病的メカニズムの解明. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

務台英樹、泰地秀信、宇佐美 真一、松永達雄. dHPLC法を用いた日本人難聴者におけるミトコンドリア遺伝子多型解析. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

藤井正人、松永達雄、平川治男、三澤逸人、吉田晴郎、丸中秀格、永井知幸、魚住真樹、田中藤信. 加齢に伴う難聴患者のQOLと追調査研究—国立病院機構感覚器ネットワーク研究から—. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

仲野敦子、有本友季子、有本昇平、松永達雄、工藤典代. 両側性難聴と一側性難聴における画像所見の相違—蝸牛神経管

狭窄を中心に—. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

浅沼聡、安達のどか、坂田英明、松永達雄、山嵜達也、加我君孝. 蝸牛神経形成不全症例の検討. 第21回日本耳科学会. 2011年11月24-26日. 沖縄県宜野湾市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
鰓弓耳腎(BOR)症候群の発症頻度調査と遺伝子診断法の確立に関する研究  
分担研究報告書

新規遺伝子変異の網羅的解析手段の確立

研究分担者 貝藤裕史 神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野こども発育学部門

研究要旨

鰓弓耳腎(BOR)症候群の原因遺伝子としてはすでにこれまでに *EYA1*、*SIX1* が報告されている。しかしながらこれまでの変異検出率は両者をあわせても 80% 不足であり、決して良好とは言えない。この原因として我々は、遺伝子解析手法の問題が大きいのではないかと推測し、mRNA を用いた RT-PCR 法や Long-PCR 法など、これまでに用いられることのなかった最新の技術を駆使して原因遺伝子変異の同定に努めた。これらの手法により、直接シーケンス法などこれまでの解析手法では明らかにできなかった変異をいくつか同定しえた。しかしこのような最新の手法を用いてもまだ変異を同定し得ない患者が少なからず存在することから、*EYA1*、*SIX1* 以外にも BOR 症候群の原因遺伝子が存在する可能性がある。今後我々は array 解析などの新たな手法を用いて新規原因遺伝子の有無につきさらに検討を加える予定である。

A. 研究目的

これまでの報告では、BOR 症候群患者における *EYA1* 遺伝子変異検出率は 30-70% に過ぎず、決して良好とはいえない。我々は本研究において高い変異検出率を得るための *EYA1* 遺伝子変異網羅的解析方法を確立した。これを用いて、臨床的に BOR 症候群と診断された患者の遺伝子変異の有無についてひきつづき検討を行った。

B. 研究方法

*EYA1* 遺伝子変異の網羅的解析を行うため、昨年度までに我々が確立した以下の方法を用いて検討を行った。

1) PCR および直接シーケンス法を用いたゲノム DNA の解析

*EYA1* の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域に関して、従来行われてきた直接シーケンス法により解析を行った。

2) MLPA 法によるゲノム DNA の解析

BOR 症候群は常染色体優性遺伝性疾患である。このためヘテロ接合体の広範囲欠失は上述した直接シーケンス

法では検出が不可能である。このような場合には multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法によりその変異を検出することが可能となる。

3) mRNA を用いた RT-PCR 法による解析

ゲノム DNA からの解析を行っても変異が同定されなかった場合でも、イントロン内の変異によってスプライシング異常がおこり疾患が発症することがある。我々はすでに Gitelman 症候群など他疾患でこのような症例を経験し、報告してきた。*EYA1* 遺伝子は末梢血単核球でも mRNA 発現を認めるため、RT-PCR 解析が可能である。

4) *EYA1* 以外の先天性腎尿路奇形の責任遺伝子についての解析

上記 1)~3) で *EYA1* 遺伝子変異が同定されなかった症例について、その他の先天性腎尿路奇形の責任遺伝子についても同様に解析を追加した。解析方法は上記と同様で、また解析遺伝子については各症例の表現型から選定した。

### C. 結果

臨床的に BOR 症候群と診断された 18 家系 23 症例において遺伝子の解析を行った。その結果、6 家系に EYA1 遺伝子の変異を同定しえた。うち 2 家系は PCR および直接シーケンス法を用いたゲノム DNA の解析から、残る 4 家系には MLPA 法により数エクソンにわたるヘテロ接合体広範囲欠失を同定しえた。また、3 家系では EYA1 以外の遺伝子(染色体)異常を同定した。残る 9 家系については EYA1 およびその他の先天性腎尿路奇形の責任遺伝子に明らかな変異を同定し得なかった。

### D. 考察

本研究で以下の点が明らかとなった。

(1)BOR 症候群における EYA1 遺伝子変異には、exon 単位の広範囲欠失がしばしばみられる。この変異はこれまでの PCR 法および直接シーケンス法では同定し得ないため、責任遺伝子変異が見逃されてきた可能性がある。

(2)BOR 症候群に典型的な表現型を有していても、EYA1、SIX1 以外の遺伝子に変異を有する症例がある。これは BOR 症候群の疾患スペクトラムが広範囲にわたることを改めて示唆するものである。

(3)BOR 症候群に典型的な表現型を有していても、現在明らかにされている先天性腎尿路奇形に関する遺伝子のいずれにも変異を有さない症例がある。

疾患発症に関与する責任遺伝子の同定にはこれまでに数多くの手法が用いられてきている。今回の研究で我々は、EYA1 をはじめとした、先天性腎尿路奇形に関する既知の遺伝子について種々の手法を用いた解析を行ってきたが、それでも変異を同定するに至らなかった症例が半数以上存在した。現在このような症例に対し、DNA マイクロアレイを用いて新たな責任遺伝子の同定を行っているところである。

### E. 結論

我々が確立した網羅的解析手法を用いても EYA1 をはじめとした既知ので

責任遺伝子に変異が認められない BOR 症候群患者が存在することが改めて明らかとなった。BOR 症候群の発症機序や病態解明を明らかにするためには遺伝子変異の同定は必須であり、今後 DNA マイクロアレイや exome 解析など最新の遺伝子解析技術を用いて BOR 症候群に関与する新規遺伝子の同定研究を継続する必要があるものと思われる。

### F. 研究発表

#### 1) 論文発表

1. Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Hashimura Y, Kaito H, Sako M, Iijima K, Yoshikawa N. Validity of the Oxford classification of IgA nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*. 2011 Dec 2. [Epub ahead of print]

2. Chikamoto H, Hattori M, Kuroda N, Kajiho Y, Matsumura H, Fujii H, Ishizuka K, Hisano M, Akioka Y, Nozu K, Kaito H, Shimizu M. Pretransplantation combined therapy with plasmapheresis and rituximab in a second living-related kidney transplant pediatric recipient with a very high risk for focal segmental glomerulosclerosis recurrence. *Pediatr Transplant*. 2011 Nov 30. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01610.x. [Epub ahead of print]

3. Shima Y, Nozu K, Nozu Y, Togawa H, Kaito H, Matsuo M, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N. Recurrent EIARF and PRES with severe renal hypouricemia by compound heterozygous SLC2A9 mutation. *Pediatrics*. 2011 Jun;127(6):e1621-5. Epub 2011 May 2.

4. Kanda K, Nozu K, Kaito H, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ninchoji T, Hashimura Y, Matsuo M, Moritz ML. The relationship between arginine vasopressin levels and hyponatremia following a percutaneous renal biopsy in children receiving hypotonic or isotonic intravenous fluids. *Pediatr Nephrol*. 2011 Jan;26(1):99-104. Epub 2010 Oct 16.

5. 石森真吾, 大坪裕美, 橋本総子, 牟禮岳男, 中川卓, 橋村裕也, 貝藤裕史, 飯島一誠, 松尾雅文. 高血圧と神経症状を認めた慢性腎臓病の 3 例: 日本小児腎不全学会雑誌 31 巻 320-322

6. 竹田雅, 石村武志, 三宅秀明, 田中

一志, 藤澤正人, 石森真吾, 橋村裕也,  
貝藤裕史, 飯島一誠.小児腎移植にお  
けるバルガンシクロビルの使用経験.

日本小児腎不全学会雑誌31巻197-199

7. 佐藤泰征, 佐々木聡, 岡本孝之,  
伊東広臨, 楠幸博, 鈴木昭, 深澤雄一  
郎, 大坪裕美, 橋村裕也, 貝藤裕史,  
飯島一誠, 有賀正.学校検尿により発  
見されたフィブロンネクチン関連腎症  
の1例.日本小児腎不全学会雑誌31巻  
156-158

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌	出版年等
Ohtsubo H, <u>Morisada N</u> , <u>Kaito H</u> , Nagatani K, Nakanishi K, <u>Iijima K</u>	Alport-like glomerular basement membrane changes with renal-coloboma syndrome	Pediatric Nephrology	2012 Feb 21. [Epub ahead of print]
Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, Osawa M, <u>Okuyama T</u>	Newborn screening for Pompe disease in Japan	Molecular Genetics and Metabolism	104(4):560-565, 2011
Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomari I, Kakishima H, Taiji H, Usami S, Okuyama T, <u>Matsunaga T</u>	Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation	BMC Medical Genetics	12:135, 2011

# Alport-like glomerular basement membrane changes with renal-coloboma syndrome

Hiromi Ohtsubo · Naoya Morisada · Hiroshi Kaito · Koji Nagatani · Koichi Nakanishi · Kazumoto Iijima

Received: 26 October 2011 / Revised: 20 January 2012 / Accepted: 23 January 2012  
© IPNA 2012

## Abstract

**Background** Autosomal dominant mutations in paired box gene 2 (*PAX2*), on chromosome 10q24, are responsible for renal coloboma syndrome (RCS). The role of *PAX2* in glomerular basement membrane (GBM) formation and maintenance remains unknown.

**Case-diagnosis** We report a case of a 13-year-old Japanese girl who had both optic disk coloboma and renal insufficiency. Her father and sister also had both coloboma and renal dysfunction. Renal pathological findings revealed a basket-weave pattern of the GBM, which was compatible with Alport syndrome, but type IV collagen  $\alpha 5$  staining was normal. The patient's findings of coloboma and renal dysfunction suggested that she had RCS, and genetic analysis

revealed a *PAX2* heterozygous mutation in exon 2 (c.76dup, p.Val26Glyfsx27) without any mutations of *COL4A3*, *COL4A4*, and *COL4A5*, which are responsible for autosomal and X-linked Alport syndrome.

**Conclusions** *PAX2* mutations may result in abnormal GBM structure.

**Keywords** Renal-colombia syndrome · *PAX2* · Glomerular basement membrane · Type IV collagen · Podocyte

## Introduction

Renal-coloboma syndrome (RCS, OMIM 120330) is a rare autosomal dominant disorder associated with paired box gene 2 (*PAX2*, 10q24) heterozygous mutations [1]. *PAX2* is a nuclear transcriptional factor and is highly conserved among species [2]. In the fetal period, *PAX2* is expressed in the otic and optic vesicles, spinal cord, hindbrain, mesonephros, and metanephros in the embryonic kidney. *PAX2* is one of the central regulators for early-stage kidney development, but the precise mechanisms of *PAX2* for kidney development have not been fully clarified. RCS is characterized by ocular and renal abnormalities. Renal malformations include hypoplasia, dysplasia, vesicoureteral reflux (VUR), multicystic dysplastic kidney, and horseshoe kidney [3]. Renal histopathological findings in RCS have been reported, including oligomeganephronia that is induced by a reduction in nephron number in the RCS kidney. However, there are no previous reports of obvious glomerular basement membrane (GBM) changes as evaluated by electron microscopy. We report here for the first time remarkable GBM changes with RCS due to *PAX2* mutation, which are similar to those found in Alport syndrome.

H. Ohtsubo · N. Morisada (✉) · H. Kaito · K. Iijima  
Department of Pediatrics,  
Kobe University Graduate School of Medicine,  
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku,  
Kobe 650-0017, Japan  
e-mail: morisada@med.kobe-u.ac.jp

H. Ohtsubo  
e-mail: tsubo@med.kobe-u.ac.jp

H. Kaito  
e-mail: hkaitoh@med.kobe-u.ac.jp

K. Iijima  
e-mail: iijima@med.kobe-u.ac.jp

K. Nagatani  
Department of Pediatrics, Uwajima City Hospital,  
Uwajima, Japan  
e-mail: npnsr835@yahoo.co.jp

K. Nakanishi  
Department of Pediatrics, Wakayama Medical University,  
Wakayama, Japan  
e-mail: knakanis@wakayama-med.ac.jp

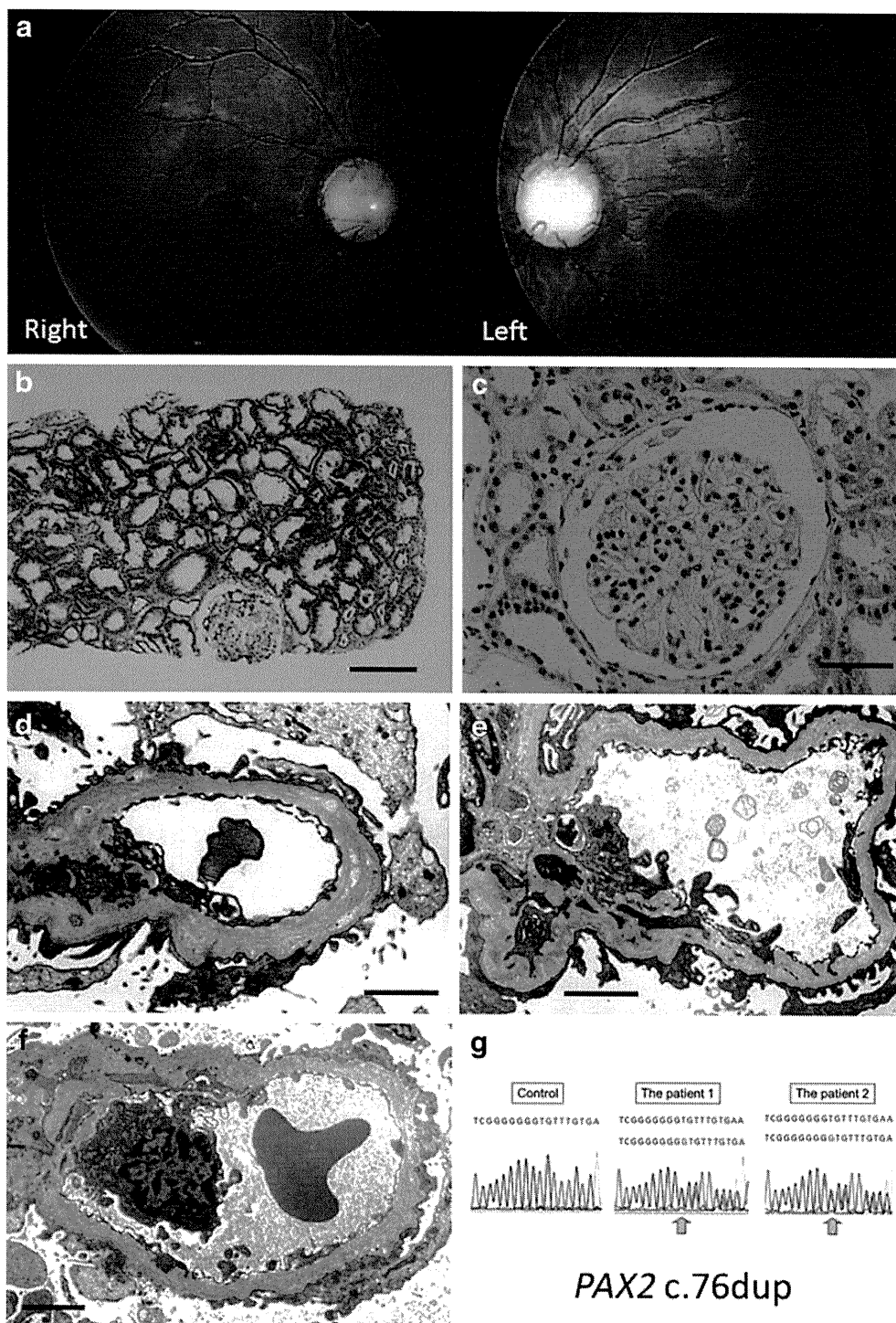
**Case report**

**Patient 1**

A 6-year-old Japanese girl visited our hospital because of mild proteinuria. We found that she also had bilateral optic disk coloboma (Fig. 1a). At the age of 13 years, laboratory findings showed that her blood urea nitrogen (BUN) level

was 26 mg/dl, serum creatinine (SCr) level was 0.97 mg/dl, and creatinine clearance (CrCl) was decreased to 59.1 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Urinary protein was slightly increased (0.3 g/day), especially urinary β2 microglobulin (1,000 μg/l, normal range <230 μg/l), but she had no hematuria. Ultrasonography revealed left renal atrophy (kidney size 64 × 35 mm), but the right kidney size was normal (81 × 37 mm). Her eye and renal abnormalities were compatible

**Fig. 1** Fundus photographs from patient 1 (a): bilateral optic discs are enlarged. Renal pathological findings in patient 1 (b–c): Light microscopy shows that the number of glomeruli is small (b), periodic acid-methenamine-silver (PAM) staining, original magnification ×100, scale bar=100 μm), but hypertrophy or proliferative lesions cannot be seen in the glomeruli (c), periodic acid-Schiff (PAS) staining, original magnification ×400, scale bar=30 μm). Electron microscopy shows thickening, which is compatible with a basket-weave appearance in the glomerular basement membrane (GBM) in patient 1 (d) and patient 2 (e). GBM findings are similar to a genetically confirmed case of Alport syndrome by *COL4A3* homozygous mutation (f) (original magnification ×5,000, scale bar=2 μm). Genetic analysis (g) shows that both patients have a *PAX2* mutation (c.76dup)



with RCS, but the precise cause of her renal insufficiency was unknown.

## Patient 2

Patient 2 is patient 1's elder sister, and she had left renal atrophy detected soon after birth. At the age of 4 months, eye abnormalities including optic disk coloboma and macular hypoplasia were found. At the age of 10 months, mild proteinuria (0.4 g/day) and VUR were detected, and at the age of 5 years, she received a surgery for VUR. However, her proteinuria did not disappear and her renal function deteriorated. She had a renal biopsy performed at the age of 6 years, and electron microscopy showed that the glomeruli had diffuse thickening accompanied by a basket-weave formation of the GBM, which was compatible with Alport syndrome. She was diagnosed with Alport syndrome on the basis of renal histological findings; however, hematuria never appeared during her course, and genetic analysis was not performed at that time.

## Family history

The patients' father also had coloboma and renal failure, but his funduscopic findings and cause of his renal dysfunction were unknown because he died after receiving four renal transplantations. The paternal grandfather had left renal atrophy, but his renal function was preserved and he did not have coloboma. Others in the family showed no renal disorder. None of their relatives had hearing loss.

## Renal histology and genetic analysis

To confirm the cause of renal insufficiency, we performed renal biopsy in patient 1. Light microscopy findings showed that the kidney was oligonephronic but not enlarged (Fig. 1b, c). Immunofluorescent staining showed no significant abnormalities. Electron microscopy showed thickening and thinning of the GBM (Fig. 1d), similar to patient 2 (Fig. 1e). The patients' GBM findings are similar to a genetically confirmed case of Alport syndrome (Fig. 1f). The eye abnormality, oligonephronic kidney, and family history indicated that patient 1 suffered from RCS. To confirm this diagnosis, we performed genetic analysis of *PAX2* for both patients and their paternal grandfather after obtaining informed consent. We detected a c.76dup heterozygous mutation in exon 2 of *PAX2* (Fig. 1g) in the siblings but not the grandfather. This frameshift mutation induces an amino acid change from valine to glycine and introduces a premature stop codon (p.Val26Glyfsx27). To exclude the possibility of complicating Alport syndrome, we performed type IV collagen staining of glomeruli for patient 1 and observed that the  $\alpha 5$  chain [ $\alpha 5$  (IV)] staining pattern was normal.

Furthermore, we sequenced the genes *COL4A4* (2q35-q37), *COL4A3* (2q36-q37), and *COL4A5* (Xq22), which are responsible for autosomal recessive, dominant, and X-linked Alport syndrome. No mutations or significant variants were detected in either patient. Based on the presence of a heterozygous *PAX2* mutation in both patients with normal immunohistochemistry for  $\alpha 5$  (IV) and the absence of significant sequence variation in any of the genes encoding type IV collagen proteins found in the GBM, we concluded that the GBM changes resulted from *PAX2* haploinsufficiency in our patients.

## Discussion

We identified that our patients had a *PAX2* heterozygous mutation in exon 2 (c.76dup, p.Val26Gly fsx27). Although there is no genotype–phenotype correlation in RCS, this is the most frequent mutation of *PAX2* [4]. This frameshift mutation leads to haploinsufficiency of the *PAX2* protein. The *Pax2*<sup>1Neu +/-</sup> mutant mouse is a model of RCS that has a heterozygote 1-bp insertion in *PAX2* [5], [6], and it has been reported that heterozygous mutations of *PAX2* induce apoptotic cells in the fetal kidney and reduce branching of the ureteric bud. As a result, *PAX2* heterozygous mutations induce renal hypoplasia [7]. Oligomeganephronia is induced by renal hypoplasia and *PAX2* mutation [8], and there are few reports regarding the association with oligomeganephronia and GBM changes [9]. Although the number of glomeruli in patient 1 was decreased, glomerular enlargement was not observed. The causes of our patients' renal insufficiency are unknown, but reducing renal mass may induce this condition.

Laminin, type IV collagen  $\alpha 3$  ( $\alpha 3$  [IV]) chain,  $\alpha 4$  ( $\alpha 4$  [IV]) chain, and  $\alpha 5$  (IV) are major components of the GBM. Laminin is produced by both podocytes and endothelial cells, and  $\alpha 3$  (IV),  $\alpha 4$  (IV), and  $\alpha 5$  (IV) originate only from podocytes [10]. A host of transcription factors, especially WT1 and *PAX2*, play a significant role in modulating podocyte maturation. Although *PAX2* is essential for embryonic renal formation, a decrease in *PAX2* and increase in WT1 in the embryonic kidney are also necessary for further differentiation of podocytes [11]. Therefore, *PAX2* mutation may result in abnormal GBM production in podocytes, but further investigations are required to clarify this issue.

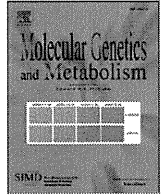
In conclusion, this is the first report of Alport-like GBM changes in RCS due to *PAX2* mutation. It is unknown whether *PAX2* haploinsufficiency leads to GBM changes, as observed in the siblings in this study. Our observations may lead to an improved understanding of the pathogenesis of RCS.

**Disclosure** The authors declare that they have no competing financial interests and no funding sources to disclose.



## References

1. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR (1995) Mutation of the *PAX2* gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9:358–364
2. Martinovic-Bouriel J, Benachi A, Bonnière M, Brahim N, Esculpavit C, Morichon N, Vekemans M, Antignac C, Salomon R, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T, Gubler M-C (2010) *PAX2* mutations in fetal renal hypodysplasia. *Am J Med Genet A* 152:830–835
3. Schimmenti LA (2011) Renal coloboma syndrome. *Eur J Hum Genet* 19:1207–1212
4. Cheong HI, Cho HY, Kim JH, Yu YS, Ha IS, Choi Y (2007) A clinico-genetic study of renal coloboma syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 22:1283–1289
5. Favor J, Sandulache R, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Spörle R, Schughart K (1996) The mouse *Pax2*<sup>1Neu</sup> mutation is identical to a human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13870–13875
6. Porteous S, Torban E, Cho NP, Cunliffe H, Chua L, McNoe L, Ward T, Souza C, Gus P, Giuliani R, Sato T, Yun K, Favor J, Sicotte M, Goodyer P, Eccles M (2000) Primary renal hypoplasia in humans and mice with *PAX2* mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of *Pax2*<sup>1Neu</sup> +/- mutant mice. *Hum Mol Genet* 9:1–11
7. Nishimoto K, Iijima K, Shirakawa T, Kitagawa K, Satomura K, Nakamura H, Yoshikawa N (2001) *PAX2* gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia. *J Am Soc Nephrol* 12:1769–1772
8. Salomon R, Tellier AL, Attie-Bitach T, Amiel J, Vekemans M, Lyonnet S, Dureau P, Niaudet P, Gubler MC, Broyer M (2001) *PAX2* mutations in oligomeganephronia. *Kidney Int* 59:457–462
9. Morita T, Wenzl J, McCoy J, Porch J, Kimmelstiel P (1973) Bilateral renal hypoplasia with oligomeganephronia: quantitative and electron microscopic study. *Am J Clin Pathol* 59:104–112
10. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL (2009) Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 20:1471–1479
11. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2002) Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83:253–307



## Newborn screening for Pompe disease in Japan

Eri Oda<sup>a,b</sup>, Toju Tanaka<sup>a</sup>, Ohsuke Migita<sup>a</sup>, Motomichi Kosuga<sup>a,\*</sup>, Masaru Fukushi<sup>c</sup>, Toshika Okumiya<sup>d</sup>, Makiko Osawa<sup>b</sup>, Torayuki Okuyama<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Laboratory Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

<sup>c</sup> Sapporo City Institute of Public Health, Faculty of Life Sciences, Sapporo, Japan

<sup>d</sup> Department of Biomedical Laboratory Sciences, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 July 2011

Received in revised form 5 September 2011

Accepted 5 September 2011

Available online 10 September 2011

#### Keywords:

Pompe disease

Acid alpha-glucosidase

Dried blood spots

Newborn screening

Genetic polymorphism

### ABSTRACT

Pompe disease is caused by a deficiency of acid alpha-glucosidase (GAA) that results in glycogen accumulation, primarily in muscle. Newborn screening (NBS) for Pompe disease has been initiated in Taiwan and is reportedly successful. However, the comparatively high frequency of pseudodeficiency allele makes NBS for Pompe disease complicated in Taiwan. To investigate the feasibility of NBS for Pompe disease in Japan, we obtained dried blood spots (DBSs) from 496 healthy Japanese controls, 29 Japanese patients with Pompe disease, and five obligate carriers, and assayed GAA activity under the following conditions: (1) total GAA measured at pH 3.8, (2) GAA measured at pH 3.8 in the presence of acarbose, and (3) neutral glucosidase activity (NAG) measured at pH 7.0 without acarbose. The % inhibition and NAG/GAA ratio were calculated. For screening, samples with  $GAA < 8\%$  of the normal mean,  $\% \text{ inhibition} > 60\%$ , and  $NAG/GAA \text{ ratio} > 30$  were considered to be positive. Two false positive cases (0.3%) were found, one was a healthy homozygote of pseudodeficiency allele (c.1726G>A). The low false-positive rate suggests that NBS for Pompe disease is feasible in Japan.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pompe disease (glycogen storage disease type II) is an autosomal recessive lysosomal storage disorder characterized by deficiency of lysosomal enzyme acid alpha-glucosidase (GAA, EC3.2.1.20). Pompe disease is progressive, with massive accumulation of glycogen in lysosomes. The clinical manifestations are variable, depending on age at onset, range of organ involvement, and rate of progression. Patients with infantile-onset Pompe disease have severe cardiomegaly and generalized skeletal muscle weakness, and die before the age of 2 years old. Patients with juvenile- and adult-onset Pompe disease have mainly skeletal muscle involvement and often progress to respiratory failure [1,2].

Enzyme replacement therapy with recombinant human GAA can be used to treat patients with Pompe disease and has been shown to prolong survival, reverse cardiomyopathy, and improve motor function [3–5]. The best motor function outcomes have been achieved after early initiation of enzyme replacement therapy, which underscores the need for early diagnosis [4,6–8]. However, early diagnosis of Pompe disease is difficult because of the low index of suspicion and the lack of specificity in early symptoms. Until recently,

demonstration of deficient GAA activity in dried blood spots (DBSs) was not possible because of interference from the isoenzyme maltase glucoamylase (MGA), which is abundant in neutrophils. However, the identification of acarbose as an effective inhibitor of MGA has permitted evaluation of GAA activity in blood samples, including DBSs, on filter paper [5,9–13]. These methods were shown to reliably identify patients with Pompe disease in a large pilot program in Taiwan [13].

It is reported that pseudodeficiency allele reduces GAA activity but causes no symptoms of the disease [14,15]. Pseudodeficiency alleles are known as c.1726G>A (p.G576S) variant in cis with c.2065G>A (p.E689K), also as c.[1726A; 2065A]. The alleles almost segregate together. Substitution c.2065G>A (p.E689K) reduces GAA activity by 50% at most. On the contrary, substitution c.1726G>A (p.G576S) reduces the activity to such extent that it falls into the patient range. Pseudodeficiency allele is more frequent in Japanese population than in other populations studied to date [14], and this may complicate issue in NBS of Pompe disease with Japanese population. According to the article of NBS in Taiwan, the presence of the GAA pseudodeficiency alleles made NBS in Taiwan complicated [15]. Therefore, NBS may require modification to distinguish a healthy homozygote of pseudodeficiency allele from Pompe disease patients by using a new cut-off value in the screening procedure in Japanese population. Herein, we report the GAA activity and presence of the sequence variant c.1726G>A (p.G576S) in the GAA gene in 520 DBSs collected from 400 healthy Japanese newborns, 96 healthy adults, 29 patients with Pompe disease, and 5 obligate carriers.

\* Corresponding author at: Department of Laboratory Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan. Fax: +81 33 416 0181.

E-mail address: [kosuga-mo@ncchd.go.jp](mailto:kosuga-mo@ncchd.go.jp) (M. Kosuga).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

DBSs (Advantec®, ToyoRoshi Kaisha Ltd., Japan) were obtained from 29 Japanese patients with Pompe disease (two infants, 14 juveniles and 13 adult phenotypes; age range: 3 months–67 years old), 496 healthy Japanese controls (400 newborns aged 3–5 days old, 96 adults aged 18–62 years old) and 5 obligate carriers (33–46 years old). DBSs were dried at room temperature and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in plastic bags until analysis. Informed consent was obtained from all subjects or family members. All samples were prepared and analyzed in accordance with the protocols approved by the ethics committee of the National Center for Child Medical Health and Development.

### 2.2. Reagents

A Big Dye Terminator kit was purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Acarbose, 4-methylumbelliferone (4MU) and 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ D-glucopyranoside (4MUG) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ampdirect™ Plus was obtained from Shimadzu (Kyoto, Japan) and rTaq DNA polymerase was purchased from Takara (Shiga, Japan). Other chemicals (all from Sigma-Aldrich or Wako, Osaka, Japan) were of reagent grade.

### 2.3. Frequency of pseudodeficiency alleles

Both pseudodeficiency alleles c.[1726A; 2065A] almost segregate together. Substitution c.2065G>A (p.E689K) reduces GAA activity by 50% at most. On the contrary, substitution c.1726G>A (p.G576S) reduces the activity to such extent that it falls into the patient range. Therefore, we tested for the presence of the s sequence variant only c.1726G>A (p.G576S).

A 1.2-mm diameter disk from each DBS was obtained using Uni-Core™ and placed in a sample tube, into which 10  $\mu\text{L}$  Ampdirect™ Plus (including polymerase chain reaction (PCR) buffer and dNTPs), 0.5 units rTaq DNA polymerase, and a set of specific primers (each 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) were added to produce a reaction mixture of total volume 20  $\mu\text{L}$ . The sequences 5'-AGG GAG GGC ACC TTG GAG CCT G-3' and 5'-GCA GAG GCC CCA ACC TTG TAG G-3' were designed as forward and reverse primers for amplification of the single nucleotide polymorphism (SNP) c.[1726G] of the GAA allele. PCR was performed using denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min; 30 cycles of amplification with denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $58^{\circ}\text{C}$  for 30 s and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s; and final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. DNA sequencing analysis was performed on amplified products by direct sequencing with the Big Dye Terminator kit on an ABI PRISM 3100 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The DBSs were also analyzed for the sequence variant c.1726G>A (p.G576S) in the GAA gene using PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Sample preparation and PCR was performed as described above, using the sequences 5'-AGG GAG GGC ACC TTG GAG CCT G-3' and 5'-GGG AGG CGA TGG CTT CGG TCA AG-3' as the forward and reverse primers, respectively, for amplification of the SNP c.[1726G] of the GAA allele. For PCR-RFLP, the PCR-amplified product (5  $\mu\text{L}$ ) was placed in a sample tube, into which 14  $\mu\text{L}$  of Neb buffer (50 nM potassium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT; pH 7.9) and 1  $\mu\text{L}$  of *AluI* enzyme were added to give a reaction mixture of total volume 20  $\mu\text{L}$ . This mixture was then incubated for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. GAA activity

For determination of GAA activity, a modified protocol based on the fluorometric assay developed by Chamoles et al. [9] was used. Briefly, a disk of 3.0 mm in diameter obtained from each DBS by Uni-Core™ was placed in a sample tube and 360  $\mu\text{L}$  of water was added, followed by

gentle mixing for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$  on a rocking platform. A 70 mM stock solution of the synthetic substrate 4MUG in dimethyl sulfoxide (Wako) was prepared in advance. Substrate solutions consisting of 1.4 mM 4MUG at pH 3.8 and pH 7.0 were prepared in 40 mM aqueous sodium acetate buffer and 40 mM sodium acetate buffer, respectively. Enzyme reactions at pH 3.8 and pH 7.0 were carried out in 50  $\mu\text{L}$  of substrate solution, 10  $\mu\text{L}$  of deionized water, and 40  $\mu\text{L}$  of DBS extract. For enzyme reactions in the presence of an inhibitor, the water was replaced with 10  $\mu\text{L}$  of 2.7  $\mu\text{M}$  acarbose. These reagents were incubated for 20 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with covering with sealing film (Sumitomo Bakelite Co.). The DBS extract for blanks was incubated separately and combined with the other reagents at the end of the incubation period, immediately followed by addition of 200  $\mu\text{L}$  of 150 mM ethylene diamine triacetic acid (EDTA) (pH 11.5) to all wells.

A 4MU standard curve was prepared on every plate by mixing aqueous standards (100  $\mu\text{L}$  per well) in the range 0.00 to 3.13  $\mu\text{M}$  with EDTA solution (200  $\mu\text{L}$  per well). Eight different standards per curve were used in duplicate. The relative fluorescence (excitation 355 nm, emission 460 nm) of each well was measured using a Wallac 1420-011 Multilevel Counter (PerkinElmer, Turku, Finland). The fluorescence readings were corrected for the blank and the results were compared with the fluorescence of a 4MU calibrator. The absolute amount of whole blood per spot cannot be determined accurately, but is comparable among samples. Therefore, the enzymatic activities are expressed as nmol of substrate hydrolyzed per punch per hour.

For Pompe disease screening, three assays were performed: (1) total GAA activity (tGAA) measured at pH 3.8, (2) GAA activity measured at pH 3.8 in the presence of acarbose, and (3) total neutral glucosidase activity (NAG) measured at pH 7.0 without acarbose. The % inhibition [(tGAA-GAA)/tGAA] and NAG/GAA ratio were calculated using data from these assays.

## 3. Results

### 3.1. Frequency of pseudodeficiency allele

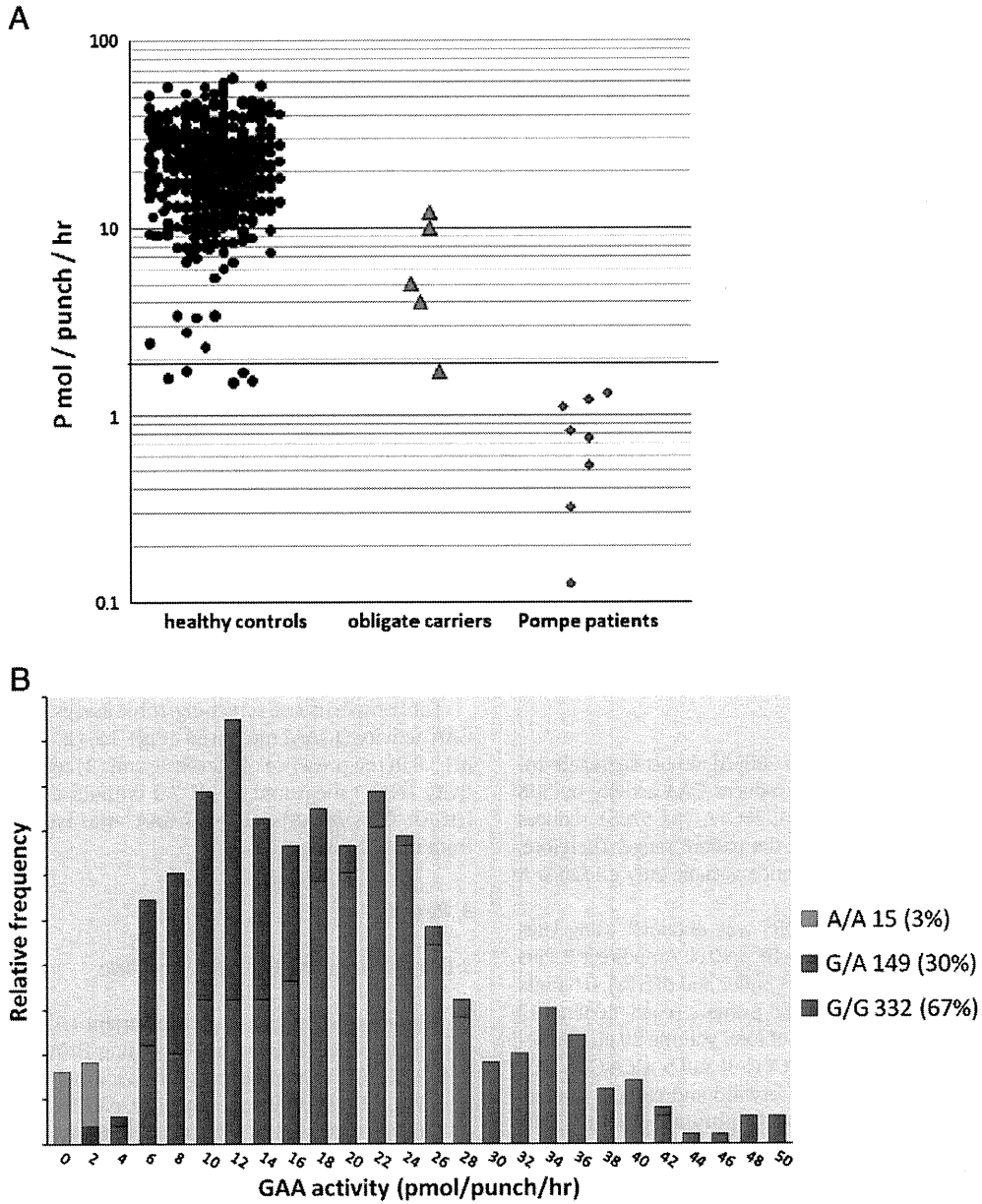
The presence of the sequence variant c.1726G>A (p.G576S) in the GAA gene was examined in DBSs using DNA sequencing analysis and PCR-RFLP. The results were as follows: among Pompe disease patients ( $n=29$ ), 16 (55.1%) had sequence c.1726G/G (G/G), 10 (35%) had c.1726G/A (G/A), and 3 (10%) had c.1726A/A (A/A); among obligate carriers ( $n=5$ ), 3 (60%) had G/G, 2 (40%) had G/A, and among 496 healthy controls, 332 (67%) had G/G, 149 (30%) had G/A, and 15 (3.0%) had A/A. These data are similar to those in previous reports. The A/A allele occurred at a significantly higher frequency (10%) in the patients than in controls (3%).

### 3.2. GAA activity

GAA activities measured with 4MU in the presence of acarbose in DBSs were as follows. The average GAA activity in the 496 healthy controls was 21.6 pmol/punch/h (range 1.3–63.4, Fig. 1A). The distribution of GAA activity based on the frequency of the three alleles is shown in Fig. 1B. A cut-off point for the GAA activity of 8% of the normal average (1.7 pmol/punch/h) identified 29 patients (100%), 5 healthy homozygotes of pseudodeficiency allele (33%), 1 obligate carrier (20%), and no healthy control without pseudodeficiency allele.

### 3.3. NAG/GAA ratio

The averages (range) of the NAG/GAA ratios were 5.0 (0.9–30.8) for healthy control without pseudodeficiency allele, 25.2 (14.6–57.6) for healthy homozygotes of pseudodeficiency allele, 22.3 (11.1–39.5) for obligate carrier, and 89.4 (41.9–222.3) for patients with Pompe disease. A cut-off value of 30 identified 29 patients (100%), 12 healthy



**Fig. 1.** Correlation between GAA activity (pmol/punch/h) and genotype. (A) A log scale of GAA activity (pmol/punch/h) in healthy controls, obligate carriers, and patients with Pompe disease. A cut-off point shows with red bar (1.7 pmol/punch/h). (B) GAA activity (pmol/punch/h) in G/G (no sequence variant of c.1726G>A in the GAA gene) G/A (heterozygote sequence variant), and A/A (homozygote sequence variant) cases.

**Table 1**  
Positive results in screening for healthy controls, obligate carriers, and patients with Pompe disease.

Cut-off point		Healthy controls (with pseudodeficiency allele)	Obligate carriers	Pompe patients
Single screening	GAA (% of nM/mean) < 8%	1.0% 5/496 (5)	20% 1/5	100% 29/29
	NAG/GAA > 30	2.4% 12/496 (10)	40% 2/5	100% 29/29
	% inhibition > 60	2.8% 14/496 (12)	20% 1/5	100% 29/29
Combination screening (double marker screening)	% inhibition > 60	1.0% 5/496 (5)	20% 1/5	100% 29/29
Combination screening (triple marker screening)	NAG/GAA > 30	2.4% 12/496 (10)	40% 2/5	100% 29/29
	Meet the above condition	(5)		
	GAA (% of nM/mean) < 8	0.20% 1/496	20% 1/5	100% 29/29
	% NAG/GAA > 30			
	% inhibition > 60			
	Meet the above condition	(1)		