

ライソゾーム病治療の臨床的研究

- ①骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後に関する研究
- ②ハンター症候群患児における酵素補充療法の効果の長期観察
- ③ゴーシェ病 III 型の骨髄移植症例の長期経過とムコソルバン療法導入の試み

分担研究者：渡邊 順子（久留米大学 准教授）

研究要旨

I-Cell 病、ゴーシェ病 III 型に対する同種骨髄移植の長期経過（それぞれ移植後 20 年、25 年）、およびハンター症候群に対する 42 ヶ月間の酵素補充療法の有効性を臨床的に評価した。いずれの治療法も早期に開始することで、臨床症状の改善を認め一定の効果があることが確認された。著効を示す症状、限定的効果にとどまる症状、無効な症状の差が見られた一方で、神経症状など有効な根治療法のない現状にあつては、臨床症状の進行を緩和するためには選択肢の一つとなりうると考えられる。

研究協力者

加藤俊一 東海大学・教授
矢部普正 東海大学・准教授
酒井規夫 大阪大学・准教授
大友孝信 大阪大学小児科
大野耕策 山陰労災病院・院長
成田 綾 鳥取大学・大学院
岡田純一郎 久留米大学小児科、助教
弓削健太郎 久留米大学・助教
高瀬隆太 久留米大学小児科・助教
大平智子 久留米大学小児科・研究生
芳野 信 久留米大学・客員教授

③ゴーシェ病 III 型症例に行なった治療の長期経過および有効性、今後の治療戦略について検討した。

B. 研究方法

対象は、①1 歳 2 ヶ月時に、実姉をドナーとして同種骨髄移植を行われた 20 歳の I-Cell 病の女性、②酵素補充療法を行なっている 9 歳 5 か月および 4 歳 7 か月のハンター症候群(重症型)兄弟（年齢はいずれも酵素補充療法開始時）、③4 歳時に実兄をドナーとして骨髄移植が行われた 25 歳のゴーシェ病 III 型の女性。

A. 研究目的

ライソゾーム病に対しては、現在、様々な治療が開発されているが、いずれの疾患も希少疾患であること、症例ごとに臨床経過、重症度が様々であることから、治療の有効性を評価するためには個別の症例の詳細な検討が重要である。当科でフォロー中の①ムコリピドーシス

(I-cell 病)、②ムコ多糖症 II 型（ハンター病）、

C. 研究成果

① I-cell 病患者に 1 歳 2 ヶ月時、同種骨髄移植を行った。移植後、末梢血リンパ球の GlcNAc-1-phosphotransferase 活性は最大 2.28 倍、 α -mannosidase、 β -hexosaminidase 活性はそれぞれ最大 4.8 倍、2.8 倍まで上昇し、10 歳頃までは精神運動発達の獲得が見られたがその後は退行し 20 歳で呼吸不全のため死亡した。I-cell

病患者に対する骨髄移植は一定の生化学的改善をもたらし、臨床症状の進行緩和効果がある可能性がある。

② ハンター症候群(重症型)兄弟 2 名に 42 か月にわたり酵素 (イデュルスルファーゼ) 補充療法を行った。その結果、著効を示す症状 (心筋肥大、肝脾腫大) と限定的効果にとどまる症状 (関節拘縮など)、無効な症状 (中枢神経) の差が見られた。また、治療開始年齢が若いほど効果も大きい傾向があり、早期の治療開始が予後の改善に重要と考えられる。

③ ゴーシェ病 III 型患者の同種骨髄移植後の経過を観察し、治療効果を評価した。生後 9 ヶ月で喉頭痙攣などを発症、3 歳 7 ヶ月で本症と診断、4 歳 0 か月で骨髄移植を受けドナー細胞の持続的生着が確認された。神経症状の発症が早かったわりには思春期半ばからの神経症状の進行は相対的に遅いと考えられ、骨髄移植によって修飾された可能性が考えられた。眼球運動の異常は比較的軽度で、骨病変や肝脾腫に対する有効性は確認されたものの、神経症状については進行を緩和させるものの、効果は限定的と考えられた。今後は、眼球運動やミオクローヌスの改善を指標に、本症例に対してムコソルバンの効果を検証していく予定である。

D. 結論

I-Cell 病、ゴーシェ病 III 型に対する同種骨髄移植、ハンター症候群に対する酵素補充療法は、臓器によっては有効性を認めるものの、特に神経症状に対しては効果が限局的であり、根治療法とはなりにくい。ただし有効な根治療法のない現状にあっては、臨床症状の進行を緩和するためには選択肢の一つとなりうると考えられる。今後、より有効な治療法の開発が望まれ、ゴーシェ病 III 型に対してはシャペロン療法としてのムコソルバン療法に期待する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara M, Matsuishi T, Yoshino M, et al. : An adult patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. *Brain Dev.* 2013 May;35(5):462-5.
- 2) Mitobe S, Yoshino M, Sakuraba H, et al. : Mutant α -galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma globotriaosylsphingosine level. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2012 Jul 14. [Epub ahead of print]
- 3) Harada H, Yoshino M, Ikeda H, et al. : Laronidase replacement therapy improves myocardial function in mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 2011; 103: 215-219.
- 4) 芳野 信 : ライソゾーム病の病態におけるサイトカインなど生物活性物質の役割 ライソゾーム病—最新の病態、診断、治療の進歩—。衛藤義勝 責任編集. 診断と治療社 (東京) 2011 ; 35-37. 総頁数 274.

2. 学会発表

- 1) 渡邊順子、矢部晋正、加藤俊一、大友孝信、酒井則夫、賀佐伸省、松石豊次郎、芳野 信 : 骨髄移植を受けた I-cell 病の長期予後. 第 115 回日本小児科学会 2012.4.20-22 (福岡)
- 2) 高瀬隆太、大平智子、渡邊順子、須田憲治、松石豊次郎、芳野 信 Hunter 症候群患児に対する Idursulfatase 補充は心室中隔、左室後壁肥厚を改善する. 第 115 回日本小児科学会 2012.4.20-22 (福岡)
- 3) Mitobe S, Togawa T, Tsukimura T, Doi K, Noiri E, Akai Y, Saitou Y, Yoshino M, Takenaka T, Sakuraba H. Mutant alpha-galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma lyso-Gb3 level. The 54th Annual Meeting of Japanese

Society for Inherited Metabolic Diseases.
November 11-17, 2012, Gifu

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

- 4) 渡邊順子、矢部普正、加藤俊一、大友孝信、酒井規夫、賀佐伸省、祐川（早川）和子、芳野 信：骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後 第 53 回日本先天代謝異常学会 2011.11.24-26（千葉）
- 5) 渡邊順子、大平智子、加藤俊一、矢部普正、酒井規夫、大友孝信、芳野 信：骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後 第 15 回日本ライソゾーム病研究会 2010.12.10-11（東京）
- 6) 芳野 信、大平智子、岡田純一郎：ライソゾーム蓄積病の病態におけるサイトカインなど生体活性物質の役割 第 15 回日本ライソゾーム病研究会 2010.12.10-11（東京）
- 7) 弓削康太郎、芳野 信、渡邊順子：ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2013.9.26（東京）
- 8) 渡邊順子、大矢崇志、松石豊次郎、芳野 信：ゴーシェ病 III 型の骨髄移植症例 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2012.10.4（東京）
- 9) 高瀬隆太、渡邊順子、岡田純一郎、芳野 信：ムコ多糖症 II 型の酵素補充療法の効果の長期観察 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2011.9.28（東京）
- 10) 渡邊順子、大平智子、加藤俊一、矢部普正、酒井規夫、大友孝信、芳野 信：骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2010.12.9（東京）

新しい診断法の開発（酵素補充療法）

分担研究者 奥山 虎之（国立成育医療研究センター臨床検査部）

研究要旨

ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、新生児マス・スクリーニングが注目されている。我々は、治療可能なライソゾーム病を対象にした血液ろ紙検体による簡便かつ迅速なスクリーニング法の開発を目標とした。平成 22-23 年度はポンペ病のスクリーニング検査を開発・実用化し、国立成育医療研究センターにおけるパイロットスタディの結果の検討後、ポンペ病有料マス・スクリーニングを開始した。平成 24 年度以降は、ハーラー症候群、ハンター症候群、ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病のライソゾーム病 5 疾患を対象として、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer による酵素活性値の同時測定の開発を行った。その結果、すべてのライソゾーム酵素活性測定において健康対照者と患者を鑑別することが可能となった。

A. 研究目的

ライソゾーム病に対する根治的治療法に酵素補充療法と造血幹細胞移植がある。どちらの治療法も症状が進行する以前に開始することにより最大の治療効果が得られるため、ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、特に新生児マス・スクリーニングの開発が注目されている。我々は、まずライソゾーム病のひとつであるポンペ病を対象とし、ろ紙微量血液検体を用いた酵素活性測定を可能とし、新生児マス・スクリーニングへの応用を目的とした。さらに、我が国で酵素補充療法による治療が可能であるライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素をろ紙微量血液検体を用いて同時測定することにより新生児マス・スクリーニングを可能とする測定系の確立を目標とした。

B. 研究方法

ポンペ病スクリーニング法の開発では、健康対照者 496 名、ポンペ病保因者 5 名およびポンペ病患者 29 名の血液ろ紙中の酸性 α グルコシダーゼ（GAA）酵素活性値を人工蛍光基質を用いて測定した。また GAA 酵素活性の低値を示すが、治療の必要のない集団である、pseudodeficiency（偽欠損）の頻度を p.G576S 多型解析により調べた。さらに、本検査法によるポンペ病新生児マス・スクリーニングを国立成育医療研究センターで出生した新生児を対象に 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。

ライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定の開発は、ろ紙微量血液検体を用いて、ハーラー症候群、ハンター症候群、ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病の各ライソゾーム酵素を

Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer（Advanced Liquid Logic 社、米国）による 4 MU 法により同時測定を行った。本研究は、平成 22 年 11 月 30 日に「ライソゾーム病の新生児スクリーニング検査」、独立行政法人国立成育医療研究センター倫理委員会に承認されている。

C. 研究結果

GAA 活性のカットオフラインを正常コントロールに対して 8%、NAG/GAA 比のカットオフラインを 30 倍以上、障害率のカットオフラインを 60%以上として、すべてを満たす場合にスクリーニング陽性とする、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency15 症例中 1 症例と 保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、患者群と Pseudodeficiency（偽欠損）および健康対照者を分けることが可能であった。正常対照者 469 例のうち、Pseudodeficiency（偽欠損）は 15 例であり、全体の約 3 パーセントであった。

国立成育医療研究センターでのパイロットスタディ対象者となったのは 361 名であり、そのうち 15 名が一次スクリーニング陽性と診断された。これらの陽性例の 1726G>A (G576S) の GAA 遺伝子多型解析を行った結果、14 例は pseudodeficiency（偽欠損）に矛盾しないホモ接合体であった（対象者の 3.9%）。1 例はヘテロ接合体であったため、リンパ球での GAA 活性測定、GAA 遺伝子検査を行ったところ、GAA 活性値は 15%で、GAA 遺伝子変異は認められなかった。

ライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定の開発では、284 名の正常対照群と 70 名のライ

ソゾーム病患者群(ハーラー症候群 4名、ハンター症候群 15名、ゴーシェ病 2名、ポンペ病 31名、ファブリー病 18名)から得られたろ紙検体を対象とした。対照群と患者群のそれぞれのライソゾーム酵素活性平均値は、 α -L-イズロニダーゼ 23.6 (9.3-41.9) および 2.1 (1.4-2.6) $\mu\text{mol/L/h}$ 、イズロネート酸-2-スルファターゼ 27.7 (15.2-51.3) および 8.3 (3.9-12.1) $\mu\text{mol/L/h}$ 、酸性 α -グルコシダーゼ 22.3 (9.4-46.6)、4.9 (2.3-8.3) および 5.7 (2.6-15.5、pseudodeficiency 群) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 α -ガラクトシダーゼ 32.5 (1.3-90.5)、4.6 (1.9-8.9)、および 7.4 (2.7-19.2、女性保因者) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 β -グルコセレブロンシダーゼ 10 (4.7-22.1) および 1.93 (1.6-2.2) $\mu\text{mol/L/h}$ であった。

D. 考察

ろ紙微量血液検体を用いたポンペ病スクリーニング法により、患者群と正常群は明確に鑑別可能であった。Pseudodeficiency (偽欠損) の鑑別には、G576S の多型解析を併用することで可能であり、これら方法を用いてポンペ病新生児マス・スクリーニングを開始した。ライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素をろ紙微量血液検体を用いて同時測定することにより、対照群と患者群のライソゾーム酵素活性平均値は明らかに違いがみられた。しかしポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の鑑別には他法の併用が必要と考えられた。

E. 結論

ろ紙微量血液検体を用いたポンペ病スクリーニング法が可能となった。ライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素活性同時測定により正常対照群とライソゾーム患者群の鑑別が可能であったが、ポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の診断には検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi S, Okuyama T, Ohki H, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2010 Oct 28.
- 2) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, et al. Japan Elaprased(R) Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated

Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab.* 2010;99:18-25.

- 3) Furukawa Y, Okuyama T, Iwasa K, et al. Cervical pachymeningeal hypertrophy as the initial and cardinal manifestation of mucopolysaccharidosis type I in monozygotic twins with a novel mutation in the alpha-1-iduronidase gene. *J Neurol Sci.* 2010 Dec 20.
- 4) 奥山虎之:「ライソゾーム病の診断」特集「わが国のライソゾーム病の病因、病態、診断治療」:血液フロンティア Vol.20, No.4,47-50,2010.
- 5) 小須賀基通、奥山虎之:「先天代謝異常症の遺伝学・遺伝相談」見逃せない先天代謝異常、小児科臨床ピクシス 23,197-201,2010.
- 6) Oda E, Tanaka T, Migita O, et al. Newborn screening for Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab.*104:560-565,2011.
- 7) Furujo M, Kubo T, Kosuga M, et al. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI. *Mol Genet Metab.* 104:597-602,2011
- 8) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, et al.: Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Metab.* 103:12-17,2011.
- 9) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, et al. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab.* 2012:107:513-520.
- 10) Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, et al. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene *SLCO2A1* and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis. *J Dermatol Sci.* 2012:68:36-44.
- 11) Hwu WL, Okuyama T, But WM, et al. Current diagnosis and management of mucopolysaccharidosis VI in the Asia-Pacific region. *Mol Genet Metab.*2012:107:136-144.
- 12) D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, et al. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *Eur J Pediatr.*2012; 171:911-919.
- 13) Tajima G, Sakura N, Kosuga M, et al. Effects of idursulfase enzyme replacement

therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. *Mol Genet Metab.* 2013;108:172-7.

2. 学会発表

- 1) 田尾絵里子、徐朱玟、四元淳子、小須賀基通、田中藤樹、大森美香、川目裕、Dong-kyu Jin、奥山虎之. 日韓のムコ多糖症における新生児マス・スクリーニングに関する意識調査. 第 37 回 日本マス・スクリーニング学会. 横浜、2010.8.29
- 2) 中島英規、小須賀基通、巽国子、藤直子、藤本純一郎、奥山虎之、濾紙血検体を用いたライソゾーム酵素活性測定法の開発. 第 37 回 日本マス・スクリーニング学会. 横浜、2010.8.28.
- 3) 中島英規、小須賀基通、藤直子、巽国子、藤本純一郎、奥山虎之、タンデムマス質量分析器を用いたポンペ病の診断法の開発. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会・第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、大阪、2010.10.22.
- 4) Tao-Nishida Eriko, See Joo-Hyun, Sohn Young-Bae, Yotsumoto Junko, Kosuga Motomichi, Tanaka Toju, Omori Mika, Kawame Hiroshi, Jin Dong-Kyu, Okuyama Torayuki WHAT DO YOU THINK OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY AND NEWBORN SCREENING FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS? OPINIONS FROM PATIENTS AND FAMILIES OF PATIENTS IN JAPAN AND KOREA Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) ANNUAL SYMPOSIUM 2010、イスタンブール、2010,8.
- 5) ライソゾーム病マス・スクリーニングの試みと遺伝カウンセリング. 田中 あけみ、鈴木 健、奥山 虎之、藤川 研人、坂口 知子、小田 絵里、藤 直子、斎藤 三佳、澤田 智、北川 照男. 第 55 回 人類遺伝学会、大宮、2010.10.28.
- 6) Motomichi Kosuga, Eri Oda, Toju Tanaka, Kazuhiro Kida, Torayuki Okuyama. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.
- 7) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、小田絵里、奥山虎之. 国立成育医療研究センターにおける新生児型ポンペ病マススクリーニングパイロットスタディの結果報告. 第 38 回 日本マス・スクリーニング学会、福井、2011.10.29.
- 8) 小須賀基通、木田和宏、藤 直子、小田絵里、奥山虎之. 乳児型ポンペ病新生児スクリーニングのパイロットスタディ. 第 53 回 日本先天代謝異常学会・第 10 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、千葉、2011.11.26.
- 9) Kosuga M, Kakee N, Hirakiyama A, Fuji N, Kida K, Okuyama T. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.
- 10) 藤直子、小須賀基通、開山麻美、荒木尚美、五十嵐仁美、木田和宏、奥山虎之. Liquid Logic Newborn Screening Analyzer を用いた新生児スクリーニング. 第 54 回 日本先天代謝異常学会、岐阜、2012.11.16.
- 11) M. Kosuga, Fuji N, Kida K, Okuyama T. Newborn screening for infantile Pompe disease: Report of a pilot study in National Center for Child Health and Development, The American Society Of Human Genetics 62nd Annual Meeting, Nov. 8 2012, San Francisco, USA.
- 12) Kosuga M, Fuji N, Kida K, Okuyama T. Newborn Screening for infantile-onset Pompe disease in National Center for Child Health and Development. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 17th Japanese Society of Lysosomal Storage Disorders Joint Meeting, October. 4-6, 2012. Tokyo, Japan.
- 13) Tanaka A, Okuyama T., Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M. Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4. 2013.
- 14) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之: 5 つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第 116 回 日本小児科学会学術集会学会、広島、2013.4.19.
- 15) 奥山虎之: ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題(シンポジウム). 第 40 回 日本マス・スクリーニング

学会学術集会、大阪、2013.8.24.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ライソゾーム病の新生児スクリーニングに関する研究 並びに Fabry 病のハイリスクスクリーニングの研究

分担研究者：北川照男（公益財団法人 東京都予防医学協会理事長）

研究協力者

鈴木 健（公財）東京都予防医学協会
藤川研人（公財）東京都予防医学協会
石毛信之（公財）東京都予防医学協会
穴澤 昭（公財）東京都予防医学協会
大和田操（公財）東京都予防医学協会
大橋十也 東京慈恵会医科大学小児科
井田博幸 東京慈恵会医科大学小児科
衛藤義勝 東京慈恵会医科大学小児科
田中あけみ 大阪市立大医学部小児科

【はじめに】

ライソゾーム病は細胞内の小器官ライソゾームの中に分布する酵素の先天的な異常に基づく疾患であり、他の遺伝性代謝病と同様に出生後酵素の基質が徐々に蓄積していろいろな症状を呈するのが特徴である。従って、先天代謝異常症と同様に蓄積された基質を同定するか、酵素活性の異常を証明して診断される。しかし、ライソゾーム病での酵素基質の蓄積は、主に細胞内で起こるので血漿を検体として用いても良い診断結果が得られないことが多く、むしろ尿を検体として用いたほうが良い結果を得られることが少ない

（例：Fabry 病 (FD)における尿 GL3 やムコ多糖症における尿 GAG の測定など）。また、酵素活性の測定も患者において欠損している酵素の活性を天然基質で測定できることは稀であって、蛍光基質等を使用して類似酵素と共に目的とする酵素の活性を測定して診断を試みる事が多く、そのために類似酵素を阻害薬で inhibition したり、目的とする酵素を抗体で捕捉して活性を測定してスクリーニングする。それでも pseudo enzyme

deficiency の問題もあるので、診断には注意が必要である。

従って、上記の点について検討しながら平成 22 年には Pompe 病、Hurler-Scheie 病および Hunter 病の新生児スクリーニングについての研究を行い、平成 23 年度には Pompe 病について酸性 α -グルコシダーゼを抗体で捕捉して活性を測る方法と混在する類似酵素の活性を阻害薬で抑えて目的とする酵素を測定する方法とを比較する研究を行った。平成 24 年度はハイリスクスクリーニングで発見した FD の重症度を検討し、平成 25 年度は、これまで濾紙血液の酵素を用いてライソゾーム病をスクリーニングする場合、検体の試料が少ないために試料の incubation time を 20 時間としているものが多いので、スクリーニングのための至適条件について研究した。従って、本稿では各年度別の研究の概要と考察を記載し、最後に総括をまとめて記述した。

1 平成 22 年度：Pompe 病、Hurler-Scheie 病および Hunter 病の新生児スクリーニング法の研究

【研究の概要】

1. Pompe 病のスクリーニング法

Pompe 病はライソゾーム酸性 α -glucosidase (LGAA) の異常症であるので血中に存在する酸性 maltase-gluco-
amylase (MG) や中性 α -glucosidase C をアカルボースを加えて阻害し、LGAA の活性を測定した。Chamoles らの競合酵素阻害法で検査すると共に、抗 LGAA 抗体を用いて LGAA のみを捕捉し、そ

の酵素活性を測定する immuno-capture enzyme assay 法 (Umapathysivam 法) で測定して、何れの方法が Pompe 病を新生児期にスクリーニングするのに優れているかを比較検討した。

2. Hurler-Scheie 病 (MPS I 型) のスクリーニング法

本症はライソゾーマル α -iduronidase (ID) の異常症であり、類似酵素を saccharic acid-1-4-lactone を加えて阻害し、4MU-iduronide を基質として血漿と共に incubate し、ID を測定した。

3. Hunter 病 (MPS II 型) のスクリーニング法

α -Iduronide-2-sulfatase (IDS) の先天異常症である Hunter 病のスクリーニングは、この酵素 (IDS) のポリクローナル抗体を使用して、マイクロプレートウェルに固相化して捕捉し、蛍光基質 4MU-sulfate を加えて IDS を測定した。

【研究成績と考察】

新生児を対象とした Pompe 病の試験的一次スクリーニングに使用した免疫捕捉法による濾紙血液 GAA 活性の測定法は、Chamoles らの方法よりもより簡便で容易に測定できる上に、患者の GAA 活性値は正常対象と比較して明らかに低値を示しており、患者の診断を速やかに行うことができた。従って、この免疫捕捉法で一次スクリーニングを行い、陽性を示した例について本法と Chamoles らの方法を併用して二次スクリーニングを行えば、より精度の高いスクリーニングが可能となると思われる。しかし、pseudodeficiency と Pompe 病との鑑別は遺伝子検査以外の方法では不可能であった。

MPS I 型、MPS II 型の新生児スクリーニングは、それぞれの疾患で活性が低下する方法で酵素を測定すれば早期発見が可能である。しかし、MPS I 型も II 型も神経症状を伴う症例があり、これに対して酵素補充療法は効果が乏しく、スクリーニングの有用性は少ない。従って、一般の新生児集団に新生児スクリーニングを行う場合はこの点

について予め行政や新生児の家族の理解を得ておくことが必要であろう。

II 平成 23 年度：乾燥濾紙血液を用いた糖原病 II 型の酵素学的スクリーニング法の研究：免疫捕捉酵素活性測定法と競合酵素阻害法の比較研究

【研究の概要】

本研究は大阪市立大学小児科グループとの共同研究の形式で実施した。すなわち、予めインフォームドコンセントが得られた、2009 年 11 月から 2010 年 10 月の間に同大学病院で出生した 485 例の新生児について、GSD II のスクリーニング検査を行った。また、某病院でフォローアップされていた、既知の GSD II 患者 4 例の乾燥濾紙血液 (以下 DBS) を、正常新生児の LGAA 活性測定値と対比する目的で本研究に使用した。患者 4 例の病型は、乳児型 2 例、成人型 1 例、病型不明 1 例であった。

【考察】

今回の研究結果から、我々が試みた免疫捕捉法と、従来から用いられている競合阻害法の両者を比較した結果、感度は両法とも 100% であり、特異度は、免疫捕捉法では 97.3%、競合阻害法では 96.7% と高い数値であったので、いずれの方法とも GSD II の新生児スクリーニングに使用可能と思われた。また、これまでに報告されている、免疫捕捉法における捕捉時の酵素活性の低下は、患者の発見には影響しないと考えられた。免疫捕捉法は競合阻害法と比較して、捕捉した LGAA の活性を直接測定しており、また、類似酵素を阻害する手順が不要で、手技が簡便である点が優れていると考えている。

しかし、我々が経験している患者は 4 例に過ぎず、遅発型の患者の経験も少なく、今後さらに多くの患者や新生児の検査を行って結論を得たいと考えている。また、ELISA 法による LGAA 蛋白を濾紙血液で測定する方法を確立して、免疫捕

捉法および競合阻害法と合わせてより精度の高いスクリーニング法に発展させたいと考えている。

III 平成 24 年度：ハイリスクスクリーニングで発見された FD 患者の CKD 重症度に関する研究

【研究の概要】

FD は慢性腎臓病 Chronic Kidney Disease (CKD) の一疾患であり、腎不全を予防するには、本症に似た症状を呈する症例について早い時期にスクリーニングして、早期に治療を開始する必要がある。

CKD の重症度分類は、2012 年に日本腎臓学会が改訂し、より使用し易いものになった。本症が疑われる症状や家族歴が認められるために、FD か否かの検査を依頼されて、本症と診断した患者の CKD staging を新しい分類に従って検討し、若干の成果を得たので報告する。

【対象と研究方法】

全国の病院・クリニックから依頼された FD が疑われる症状や家族歴のある症例 202 名の酵素補充療法開始前の随時尿と血漿を研究対象とすると共に、健常成人 432 名の随時尿および 211 名の血漿を研究対象とした。

【方法】一次スクリーニングは、尿 α -gal A 蛋白を ELISA 法で測定し、尿 globotriaosylceramide (GL-3) をタンデム質量分析計 (MS/MS) で測定した。

この検査で陽性のものは血漿 α -gal A 蛋白測定に加えて α -gal A 活性を Chamoles 変法で測定した。最終的に FD 患者と診断された症例については、主治医から臨床診断名、治療状況等の報告を受け、これをもとにこれらの症例の CKD の stage 分類を行い検討した。

【研究結果と結語】

ハイリスク症例のスクリーニング成績は、男性

105 名のうち最終結果を得たのは 88 名で、古典型 49 例、心型亜型 7 例、腎型亜型 5 例、正常 27 名であり、女性 97 名のうち最終結果を得たのは 76 名で、古典型 40 例、心型亜型 9 例、腎型亜型 5 例、正常 22 名であった。

男性の FD と診断された 58 症例の 46.6% の症例は、予後が最も良好なグループで、17.2% は最もリスクの高いグループであった。また、予後良好なグループの症例の 63.2% は 29 歳未満であり、若い年齢の者が多く、最もリスクの高い予後不良群ではその 60% が 50 歳以上であった。また、54 例の女性の 68.1% が予後良好なグループであり、11.8% が予後不良のグループであった。従って、FD が疑われる症例はなるべく早くにスクリーニングして遅くとも 30 歳までに検査をして診断するのが良いと思われた。

IV 平成 25 年度：濾紙血液を用いたライソゾーム病 (Fabry 病、糖原病 II 型、ムコ多糖 I 型・II 型) の酵素活性測定によるスクリーニング法の検討—特に反応時間について

【研究の概要】

濾紙血液を用いたライソゾーム病の酵素診断における至適条件の設定を目的として大阪市大小児科を受診した新生児 36 名の濾紙血液、健常成人 12 名の血漿、白血球を対象に類似酵素阻害法、および酵素免疫捕捉法を用いて、1. 至適基質濃度、2. 酵素免疫捕捉法の測定効率、3. 至適反応時間：2~20 時間、4. 防腐剤添加の影響等について検討した

【結論】

その結果、各々のライソゾーム病の酵素活性測定する場合、活性測定反応時間は 37°C、2 時間~4 時間が最も良く、従来から行われている 37°C、20 時間の反応時間では正しい測定値が得られない結果であり、反応時間は 2~4 時間の反応が良いと考えられた。

【平成 22～25 年度の総括】

これまでの研究では、幾つかのライソゾーム病のスクリーニングにおいて、類似酵素を inhibition して目的とするライソゾーム酵素活性を測定する方法と、ライソゾーム酵素の抗体で目的とする酵素を capture し、混在する類似酵素の影響を除外する方法を、同時に検討した報告は少ない。

本研究の結果によると、inhibition assay 法と immuno-capture enzyme assay 法との精度には大きな差はなく、何れの方法を用いても良いように思われた。しかし、ライソゾーム病はライソゾーム酵素の異常に基づく疾患なのでその診断結果を確認する時は、白血球などの細胞を用いて行う方が良いと思われる。

ファブリー病・ポンペ病のスクリーニング研究

分担研究者：遠藤 文夫 熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野 教授

研究要旨

ファブリー病とポンペ病はそれぞれ α ガラクトシダーゼと酸性 α グルコシダーゼの欠損によって発症する先天代謝異常症である。われわれは、酵素活性のろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたスクリーニングのパイロットスタディを行った。

A. 研究目的

ファブリー病はライソゾーム酵素である α ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。また、ポンペ病は酸性 α グルコシダーゼの欠損によって発症する。近年これらの疾患に対して酵素補充療法が導入され、患者の治療が可能になった。そのため、ファブリー病とポンペ病の早期発見と早期治療が重要となってきた。しかし、ファブリー病の症状は多様であるため、早期の診断は困難であることも少なくない。また、乳児型ポンペ病は乳児期早期に治療を開始しなければ予後が不良であると考えられている。我々は、H22-25年度にわたって、新生児におけるろ紙血検体を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングを行った。また、H22-25年度にわたって、心不全、腎不全、脳梗塞などのファブリー病を疑われる臨床症状を呈する成人のファブリー病ハイリスク者の酵素活性の測定を行った。

B. 研究方法

ファブリー病とポンペ病のスクリーニングにおいて、Chamolesらの方法を改変し、ろ紙血検体の α ガラクトシダーゼ酵素活性と酸性 α グル

コシダーゼ酵素活性とを測定した。平成18年8月から現行の新生児マススクリーニングに加えて、説明と同意に基づいたファブリー病のマススクリーニングを開始した。この測定法を利用して、心不全、腎不全、脳梗塞などのファブリー病を疑われる臨床症状を呈する成人のファブリー病ハイリスク者の酵素活性の測定を行った。

また、平成25年4月からはポンペ病のマススクリーニングも追加した。ファブリー病では、スクリーニング陽性者とその家族に遺伝カウンセリングをおこなったうえで、ダイレクトシーケンス法を用いた α -ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。また、ポンペ病においてはBa/Zn法を用いた酵素活性の測定と、皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性の測定によって解析を行った。皮膚線維芽細胞における酵素活性測定においては、4MU- α -D-Glucopyranoside基質とグリコーゲン基質のそれぞれを用いた活性を別個に測定し、確定診断を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と、保護者へ

の説明と同意に基づいて行った。活性低値の新生児に対して、説明と遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

熊本県ならびに協力自治体において、現行の新生児マススクリーニングに加えて、ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行った。ろ紙血を用いた α ガラクトシダーゼ活性と酸性 α グルコシダーゼ活性の測定法を用いて、説明と同意に基づいた新生児スクリーニングを行った。

ファブリー病のスクリーニングでは、遺伝子解析を含めた精密検査を行った。本研究では約387,000名中82名の酵素活性の異常低値者が明らかになった。活性低値の新生児と家族に対して、遺伝カウンセリングを行い、 α ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。その中で古典型ファブリー病に認められる変異は、5名の男児に認められた。また、ファブリー病を発症しうると考えられる変異は23名の男児に認められた。これらのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約8,400名に1名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約39,000名に1名であると推定された。

また、ファブリー病で見られる症状である腎不全、心不全、脳血管障害、四肢の痛みなどを持つ、ファブリー病のハイリスク者約9,200名の α ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。39名にファブリー病を発症しうる遺伝子変異を認め、12名に古典型の遺伝子変異を認めた。これとは別に23名のE66Q変異を認めた。また、ハイリスク者の解析では、腎不全患者、心不全患者、脳血管障害患者におけるファブリー病の頻度は、それぞれ約270人に1人、78人に1人、197人に1人であった。

さらに、平成24-25年度において、成人のファブリー病患者においてDS3スコアリングを用いたファブリー病スクリーニングによって発見された患者の予後の検討をおこなった。すると、酵素補充治療前にスコア15点以上の患者では、治療開始後もスコアの平均点は約5点悪化していた。一方、酵素補充治療前のスコア15点未満の患者では、スコアの平均点が約1点改善しており、少なくとも臨床症状の悪化を防ぐことができていることがわかった。すなわち、スクリーニングによる早期発見は、臨床症状が軽度なうちに行う必要があることが明らかになった。

また、平成24-25年度において、ポンペ病のスクリーニングでは、約7,500検体中に1名の遅発型のポンペ病患者を認めた。ポンペ病のpseudo deficiencyと考えられるスクリーニング陽性者は11名であった。Ba/Zn法を用いることにより、pseudo deficiencyによる偽陽性者を著しく減らすことができた。

D. 考察

このスクリーニングによってわが国におけるファブリー病の頻度を推定することができた。また、簡便で安価な酵素測定法を用いることで、ファブリー病の発症前の診断も容易となった。また、ポンペ病においてもBa/Zn法を用いることにより新生児スクリーニングを効率的に行うことが可能になった。

ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングは臨床的にも研究対象として有用であるため、今後もパイロットスタディを継続する予定である。さらに、成人のファブリー病のハイリスク者とされる心疾患・腎疾患・脳血管障害患者における本法を用いたファブリー病のスクリーニング

は、早期発見と治療に有用と考えられる。ポンペ病の遅発型の成人期におけるスクリーニングも同様に可能であり、ポンペ病のスクリーニングを行うことにより、発症早期に酵素補充などの治療が可能になると考えられた。

E. 結論

ろ紙血を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングは、簡便で安価な検査法として有用であると考えられた。さらにファブリー病とポンペ病の安価で簡便な診断法の開発とわが国における疾患頻度の推定を行った。また、本疾患を疑ったときに簡便に試みることができる検査法としても利用されている。このスクリーニング検査は、ファブリー病とポンペ病の症状が軽度なうちにおこない、早期発見されると、酵素補充治療の効果も期待できた。一方、ファブリー病とポンペ病のスクリーニングや遺伝カウンセリングにおいて配慮すべき点も少なくない。スクリーニング検査を慎重に行うことによってファブリー病とポンペ病患者の予後を改善できると考えている。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J. Hum. Genet.* 58, 285-292 (2013)
- 2) Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *Plos One* 8, e56387 (2013)
- 3) Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection. *Pediatr Int.* 55, 775-778 (2013)
- 4) Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. *Eur J Neurol* (2013 in press)
- 5) Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn screening for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
- 6) Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. *Springerplus.* (2013 in press)
- 7) Fujisawa D, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Clinical features and management of organic acidemias in Japan. *J. Hum. Genet.*

- (2013 in press)
- 8) Kido J, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Takayanagi M, Matsuo M, Yoshino M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Long-term outcome and intervention of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis.* 35, 777– 785 (2012).
- 9) Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34, 566-570 (2012)
- 10) Katsuren K, Nakamura K, Ohta T Effect of body mass index-z score on adverse levels of cardiovascular disease risk factors. *Pediatr Int.* 54, 200-204 (2012)
- 11) Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for lysosomal disorders. *Am J Med Genet.* 157, 63-71 (2011)
- 12) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJJ, 13) Okumiya T Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol. Genet. Metab.* 103, 12-17 (2011)
- 13) Mochida T, Tanaka T, Shiraki Y, Tajiri H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Okamoto M, Endo F. Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in diabetes mellitus. *Mol Genet Metab.* 103, 406-409 (2011)
- 14) Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S. Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet.* 55, 259-61 (2010)

ファブリー病レジストリー

分担研究者：大橋 十也（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター センター長）

研究要旨

稀少疾患である Fabry 病に対するレジストリーを作成する事で、日本人患者における背景、臨床的特徴、合併症、治療への反応性などを評価する。今回、我々は慈恵医大における Fabry 病患者に対するレジストリーを作成し、横断研究を行った。

研究協力者氏名：

森本 剛（兵庫医科大学 内科学総合診療科教授）

診療録より収集した。前向きについては診療録に
合わせて以下の項目を設定した。

6ヶ月毎評価

A. 研究目的

Fabry病はライソゾーム酵素である α ガラクトシダーゼAが先天的に欠損または活性低下することによりおこる稀少疾患である。稀少疾患であるが故にレジストリーを作成し臨床情報を集約する事が重要である。世界的には現時点で酵素製剤を製造販売している製薬企業主導による大きなレジストリーが2つ存在している。しかしながら企業とは独立した形で行われる大規模な臨床研究は十分になされていない。今回我々は慈恵医大を受診しているFabry病患者のレジストリーを独自に作成し、その患者背景や臨床的特徴に対する横断研究を行った。

・アンケート形式による臨床情報の収集

・血液検査、尿検査、心電図

1年毎評価

・心エコー、頭部MRI

（倫理面への配慮）

レジストリーは専門機関に依頼し作成したものであり、Web サイト上に保管されている。患者情報流出防止の観点からも、従来のローカルコンピューターにおけるデータ保存より優れている。

B. 研究方法

慈恵医大にFabry病の診断のもとで過去に受診または現在も受診をしている患者のうち、レジストリーへの登録の同意が得られた患者のみを登録した。

患者情報について、後ろ向きについては過去の

C. 研究結果

2012年9月の時点で27名の男性患者、32名の女性患者の合計59名が登録された。

それぞれの年齢の中間値は男性が38歳、女性が44歳であり有意に男性患者が低年齢であった。それぞれのフォローアップ期間の中間値は男性で9年、女性で5年であった。

α ガラクトシダーゼA酵素活性は男性では

0.73nmol/hr/mg、女性で38.2nmol/hr/mgであり有意差が認められた。

遺伝子異常はprivate mutationが中心であり、男女間での明らかな傾向はみられなかった。

腎機能の評価として、クレアチニン (Cr)、推算糸球体濾過量(eGFR)、尿中蛋白/Cr比を使用した。それぞれ、Crは男性0.83mg/dl、女性0.64mg/dl(P<0.01)、eGFRは男性83.1ml/min/1.73m²、女性80.4ml/min/1.73m²(P=0.8)、尿中蛋白/Cr比は男性0.09、女性0.054(P=0.06)であった。

心肥大を心エコーで評価した。左室重量係数(LVMI)は男性で121.2g/m²、女性で85.7g/m²と男性での心肥大の傾向が認められた。各種弁膜症については男女差は認められなかった。

D. 考察

この横断研究では日本人ファブリー病患者において、男性患者が女性患者に比べて低年齢であること、酵素活性は男性で有意に低い事、男性は女性よりも心肥大傾向である事が示された。

今回の我々の結果はレジストリー作成に際しての、2012年の9月の時点での横断研究であり非常に限定された結果であった。更に、後ろ向きデータについても欠損が多いことも問題であった。今後は治療への反応性なども含めた評価が必要となり、アンケートや定期的な検査のアラートシステムなどを活用した前向きデータの収集が重要となる。

E. 結論

レジストリーによる臨床研究は Fabry 病などの稀少疾患では非常に重要である。

今後は前向きにデータの欠損を最小限にしながら収集する事が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究報告書

Ⅱ. 病態解析

ALD の遺伝子表現型連関

分担研究者：辻 省次 東京大学神経内科 教授

研究要旨

副腎白質ジストロフィー(ALD)は,*ABCD1* を原因遺伝子とし, 多彩な表現型を認めるが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 表現型修飾因子同定のため, まずは, *ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* を候補遺伝子として, 検出された variants と表現型との関連解析を行った. 日本人 ALD 症例の表現型との関連が示唆される variants が同定されたものの, 十分な結果とはいえず, 次に, ペルオキシソームで機能する遺伝子群を表現型修飾因子の候補遺伝子と考え, Exome 解析を行い, 検出された variants と表現型との関連解析を行うこととした. コントロール 369 例での解析が終了し, 今後 ALD 症例の解析も行う予定.

分担研究者氏名：

- ・松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生
- ・三井 純 東京大学神経内科 特任助教
- ・石浦 浩之 東京大学神経内科 助教
- ・Budrul Ahsan 東京大学神経内科
特任研究員
- ・吉村 淳 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任助教
- ・土井 晃一郎 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任講師
- ・後藤 順 東京大学神経内科 准教授
- ・鈴木 康之 岐阜大学医学教育開発センター
教授
- ・下澤 伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援センター 教授
- ・小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学
リソース研究センター 教授
- ・西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科 教授
- ・森下 真一 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

A. 研究目的

ALD は多彩な臨床病型を呈するが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 予後不良な大脳型 ALD に対しては, 早期の造血幹細胞移植が有効である可能性があり, 大脳型を発症しやすい背景因子を同定すれば, 臨床上有用である. 多彩な臨床病型を規定する遺伝的修飾因子の探索を行うことが目的である.

B. 研究方法

Step1 として, *ABCD1* の機能に影響を与える可能性のある遺伝子群として, *ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* を臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え, *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* の全エクソン, 5' UTR, 3' UTR の配列を PCR にて増幅. *ABCD2* に関しては DNA マイクロアレイを用いて, *ABCD3*, *4* に関しては直接塩基配列決定法で遺伝子の塩基配列を決定し, variants の検出を行った.

Step2 として, 発現産物である adrenoleukodystrophy protein (ALDP) は, ペル

オキシソームで機能することから、他のペルオキシソームで機能する遺伝子群を、臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え、対象者のエキソーム解析を行い、候補遺伝子内の variants を選択。新規 variants については直接塩基配列法で確認を行った。

これらの候補遺伝子内の variants について、表現型毎の出現頻度に有意な差のある場合、修飾因子としての可能性が指示されると考え、表現型との関連を検討した。

Step1の対象者は、ALD症例75例(小児大脳型16例、思春期大脳型8例、成人大脳型11例、大脳型への移行例13例、小脳脳幹型3例、AMN21例、Addison病1例、未発症2例)、検出された variants については、日本人コントロール96例でも解析を行った。

Step2の対象者は、ALD症例67例(小児大脳型13例、思春期大脳型6例、成人大脳型10例、大脳型への移行例12例、小脳脳幹型3例、AMN19例、Addison病1例、未発症2例)、日本人コントロール369例とした。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施をした。検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

Step1. *ABCD2* に関しては有意差を持って表現型と相関を示す Variants は認められなかった。

ABCD3 に関しては成人大脳型 ALD 症例 1 例についてのみ、1 つのアミノ酸置換を伴う新規 Single nucleotide variant (SNV) を同定した。

ABCD4 においては完全連鎖不平衡にある 5 つの既知の SNP において、コントロールと比較して

AMN で有意に頻度が低かったが ($p=0.011$)、フランスにおける ALD の独立した被験者集団では有意差を認めなかった

日本人 ALD 症例の表現型との関連が示唆される variants が同定されたものの、十分な結果とはいえないことから Step2 の解析を行うこととした。

Step2. コントロール 369 例の解析が完了。

ペルオキシソームで機能する遺伝子群で検出された variants の中で、既知の病因変異、Nonsense, frameshift, splice sites mutations, 新規 non-synonymous SNV を有する症例は、コントロール 369 例中、194 例(52.5%)であった。

新規 non-synonymous SNV の中で、Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP の 5 つの SNV 機能予想アルゴリズムの合計点が 4 点以上(5 点が最も機能変化が大きい)の SNV (deleterious SNV) に絞った場合は、コントロール 369 例中、133 例(36.0%)が有していた。

D. 考察

ABCD1 と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4*, 及びペルオキシソームで機能する遺伝子群において、アミノ酸置換を伴う新規の non-synonymous variants は、多数同定され、coding region の non-synonymous variants は未知のものが依然として存在すると考えられ、網羅的な塩基配列解析は重要と考える。

E. 結論

今後 ALD 症例における Exome 解析も進め、検出された variants における ALD の各表現型及び Control における頻度の比較(関連解析)を行う予定である。併せて、ALD 症例 DNA 検体のさらなる集積を行う。