

小児希少遺伝性難病に対する遺伝学的検査の開発と全国展開

研究分担者 奥山虎之¹

1) 国立成育医療研究センター臨床検査部

小児希少難病、特に先天代謝異常症の中には発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できない疾患が多く存在し、積極的な依頼を促せるような簡便で安価な診断法の確立が必要である。我々は、ライソゾーム病の中でも特に早期発見・早期治療が必須であるポンペ病を対象として、乾燥ろ紙血検体を用いた酸性グルコシダーゼ活性測定による遺伝学的検査の全国展開を開始した。2013年1月から2013年12月までに何らかのポンペ病症状を有する疑い患者288症例を対象に、酸性グルコシダーゼ活性の測定を行った結果、3例（1.04%）のポンペ病患者を診断した。また pseudodeficiency（偽欠損）を19例（6.6%）で認めた。乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量による診断法は、ポンペ病や他のライソゾーム病の早期診断として有用な遺伝学的検査と考えられる。

A. 研究目的

早期診断、早期治療が、予後を劇的に改善する先天代謝異常症としてライソゾーム病が注目されている。酵素補充療法により全身症状の改善が達成できるが、さらに中枢神経症状に有効性が期待できる遺伝子治療、髄腔内酵素補充療法、ケミカルシャペロン療法などの開発が進み、その有効性が報告されている。しかし、どんなに優れた治療法が開発されても、発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できない。上記の事情を考慮し、本研究ではライソゾーム病の早期あるいは発症前診断を可能にする乾燥ろ紙血サンプルを用いた遺伝学的検査を開発、臨床応用しその有用性を検証する。

B. 研究方法

ポンペ病は、ライソゾーム酵素のひとつである酸性グルコシダーゼの先天性欠損を原因とする常染色体劣性遺伝病であり、乳児型の心筋肥大や小児・成人期の近位筋の筋力低下、呼吸筋の障害

で発症する。本病は、発症前もしくは早期に酵素補充療法を開始することにより、生命予後やQOLの改善が期待できる。本年度は、ライソゾーム病の中でも、特に早期発見が重要なポンペ病について、乾燥ろ紙血を用いた遺伝学的検査法を開発、全国展開によるポンペ病の早期診断を試みた。

1. 遺伝学的検査法の確立

採取や輸送が簡便で侵襲の少ない乾燥ろ紙血検体を用いて酸性グルコシダーゼ活性を測定する方法を確立した。蛍光人工基質としては、4メチルウンベリフェリルグルコシドを用いた。その際、非特異的なグルコシダーゼの活性を除去するために、アカルボースを反応液に添加することにより、ポンペ病の欠損酵素である酸性グルコシダーゼ活性を特異的に検出できる方法が確立した。

2. ポンペ病診断の実践

上記の診断技術を関連学会等を通じて全国的に周知して、原因不明の心筋肥大や筋力低下を呈す

る症例でポンペ病の可能性が指摘された症例の検査を受託した。なお、活性低値を呈した症例については、pseudodeficiency (偽欠損) の可能性を考慮して、G576S 多型の検出するための遺伝子検査も同時に施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

288 症例の解析から、3 例の新しいポンペ病患者を同定しえた。また、G576S 多型を有する pseudodeficiency は 19 名で全体の 6.6% であった。

D. 考察

ポンペ病は、従来、筋生検による病理学的診断や皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性測定により診断されてきた。しかし、いずれの方法も侵襲を伴う検査であり、検査の適応に限られてきたため、非侵襲的な検査による診断が望まれてきた。

今回、我々は、乾燥ろ紙血検体を用いた遺伝学的検査でポンペ病を生化学的に診断し、血中の白血球を用いた遺伝子検査で確定診断する方法を確立した。これにより、筋生検や皮膚生検という侵襲的な検査をすることなく、ポンペ病が診断できるようになった。また、検査に要する時間が短縮され、費用も削減できることにより、医師が検査を積極的にオーダーするようになり、ポンペ病と診断される患者が増加した。同様の方法は、他の多くのライソゾーム病の診断に応用可能であり、今後ライソゾーム病の診断目的での遺伝学的検査として開発し全国展開する予定である。

E. 結論

乾燥ろ紙血を用いた遺伝学的検査は、ライソゾーム病の早期発見に有用である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. Okuyama T, Yotsumoto J, Funato Y. Survey of second-trimester maternal serum screening in Japan. J Obstet Gynaecol Res. 39:942-947,2013.
2. Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 108: 172-177, 2013.
3. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. Br J Dermatol. doi:10.1111/bjd.12790. 2013 Dec 16.
4. 後藤由紀、柿島裕樹、藤直子、渡辺靖、小関満、松林守、木田和宏、小須賀基通、奥山虎之。ポンペ病を対象とした新生児マススクリーニングの運用、日本マススクリーニング学会誌、23:51-55,2013。

2. 学会発表

1. 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.
2. M.Kosuga, K.Kida, H.Nakajima, J.Fujimoto, T.Okuyama: Development of a new method for diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4. 2013.
 3. 奥山虎之: 患者登録と新規治療の開発法(シンポジウム: 先天性希少疾患の治療の進歩と患者会の役割). 第 116 回 日本小児科学会学術集会学会、広島、2013.4.19.
 4. 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.
 5. 田中あけみ、鈴木健、奥山虎之、濱崎孝史、藤川研人、坂口知子、小田絵里、藤直子、齋藤三佳、澤田智 北川照男: 三施設共同によるライソゾーム病スクリーニング・パイロットスタディ 2年6か月のまとめ. 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.
 6. 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.
 7. M.Kosuga, H.Nakajima, K.Kida, J.Fujimoto, T.Okuyama. Diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. American Society of Human Genetics 63rd Annual meeting. Boston, USA. 2013, October 24.
 8. 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. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013.Nov.27.
 9. A.Wakiyama, Y.Oda, Y.Yamada, H.Fujisawa, M.Yotsuya, H.Tsuda, M.Furujo, T.Kubo, T.Okuyama. Application of clinical path in enzyme therapy for uniformization of nurse operations. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013.Nov.28.
 10. 田中あけみ、濱崎孝史、桜庭均、齋藤静司、鈴木健、奥山虎之、門野千穂、坂口知子、工藤聡志、藤川研人、小田絵里、藤直子、澤田智、齋藤三佳、北川照男
Iduronate-2-sulfatase の pseudodeficiency allele は意外に多く存在する? 日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台市、2013.11.23.

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

特になし。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okuyama T, Yotsumoto J, Funato Y	Survey of second-trimester maternal serum screening in Japan.	J Obstet Gynaecol Res.	39	942-947	2013
Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M.	Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings.	Mol Genet Metab.	108	172-177	2013
Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J.	The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype.	Br J Dermatol.		Dec16.doi:10.1111/bjd.12790.	2013
後藤由紀、柿島裕樹、藤直子、渡辺靖、小関満、松林守、木田和宏、小須賀基通、奥山虎之	ポンペ病を対象とした新生児マススクリーニングの運用	日本マススクリーニング学会誌	23	251-55	2013