

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

凍結筋切片を用いた Pompe 病スクリーニング

研究分担者：西野 一三 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究協力者：福田 冬季子 浜松医科大学 小児科学 准教授

研究要旨

Pompe 病は、臨床病理学的に疾患特異的变化が乏しく、多数例が見逃されている可能性が指摘されている。国立精神・神経医療研究センターでは 1978 年以来、全国の医療機関に向けて筋病理診断サービスを提供している。その解析数は近年増加の一途を辿り、2016 年は 914 検体を数えるに至っており、本邦で施行される筋生検の約 8 割が集まっているものと推測される。この筋病理診断サービスにおいて治療可能な Pompe 病例を見逃さないことが重要であることは言うまでもない。そこで、凍結筋切片を用いた Pompe 病スクリーニングを開始した。当初解析を行った 201 例中活性低下の可能性が指摘されたのは 11 例であった。このうち 4 例は検体不良による酵素活性低値であった。GAA 遺伝子解析および凍結筋での酵素活性測定では、偽欠損アレルを 2 例がヘテロ接合型で、2 例がホモ接合型で有していた。更に、ホモ接合型で偽欠損アレルを有していた例のうち 1 例は、乳児型の原因変異をもヘテロ接合型で有しており、その活性は酸性マルターゼ / 中性マルターゼ活性比が、通常の患者で見られる活性比ほどの低下ではないものの、0.25 と著明な低下を示していた。以上の結果は、今回の 201 例の中に Pompe 病患者は存在しないもこと、すなわち、本邦では Pompe 病が極めて稀であり、少なくとも高頻度に患者が見逃されているわけではないことを示している。また、また予てより指摘されているとおり、一定の頻度で偽欠損アレルを有する患者が存在する事、更には、病的変異の保因者が偽欠損アレルを有する場合には酵素活性がかなり低下する事が示された。

A：研究目的

筋病理診断を受ける例の中で治療可能な Pompe 病を見逃さないために開始された凍結筋切片を用いた Pompe 病スクリーニング実施の成果を明らかにし、本邦 Pompe 病の

実態に迫る事を目的とする。

B：研究方法

Pompe 病は、特に遅発型の例は、臨床病理学的に疾患特異的变化が乏しく、多数例が

見逃されている可能性が指摘されている。国立精神・神経医療研究センターでは1978年以来、全国の医療機関に向けて筋病理診断サービスを提供している。その解析数は近年増加の一途を辿り、2016年は914検体を数えるに至っており、本邦で施行される筋生検の約8割が集まっているものと推測されている。この筋病理診断サービスにおいて治療可能なPompe病例を見逃さないことが重要であることは言うまでもない。そこで、中村公俊班長の協力を得て、凍結筋切片を用いたPompe病スクリーニングを2015年7月より開始している。今回は、当初解析を行った201例での結果を再検討することにより、本邦筋疾患患者の中でのPompe病の頻度を予測することとした。

具体的には、ルーチンで施行されている筋病理診断用標本作製時にスライドグラスを1枚多く作製し、そのスライドを一定期間分まとめて熊本大学に送付して、酵素活性測定を行う。酵素活性のカットオフ値は1 nmol/h/mg proteinとした。カットオフ値以下であった例について筋病理標本を再評価し、標本不良や人口産物による二次的な酵素活性低下でないことを確認した例について、常葉大学・杉江秀夫先生および浜松医科大学・福田冬季子先生の協力を得て凍結筋での酵素活性測定を行う。カットオフ値は、酸性マルターゼ/中性マルターゼ活性比で1とした。カットオフ値以下であった例について、GAA遺伝子解析を行い、病的変異の有無および偽欠損アレルの有無を確認する。

C:研究結果

当初解析を行った201例中、凍結切片での活性がカットオフ値以下であったのは

11例であった。これら11例について、筋病理標本を再評価したところ、そのうち3例は脂肪および線維組織のみの検体であり、筋線維が全く含まれていなかった。また、1例では、強い化学的な人口差物が切片全体に認められた。従って、これら4例は、検体不良による二次的な酵素活性低値と判断した。

残り7例のうち十分な検体量のあった6例で、凍結筋での酵素活性測定を行ったところ、4例がカットオフ値以下であった。この4例に加えて、残余検体量が少なく生化学的解析を行えなかった1例についてGAA遺伝子解析を施行した。

酵素活性がカットオフ値以下であった4例は何れも偽欠損アレルを有していた。4例のうち2例はヘテロ接合型であったが、残り2例はホモ接合型で偽欠損アレルを有していた。ヘテロ接合型2例の酸性マルターゼ/中性マルターゼ活性比は、0.6および0.84であったが、ホモ接合型2例は、0.25および0.52であった。更に興味深いことに、活性比が0.25と一番低かった例は、ホモ接合型の偽欠損アレルに加えて、乳児型の原因変異として知られるc.1798 C>T (p.R600C)変異をヘテロ接合型で有していた。当該例について、臨床および病理学的所見を再検討したところ、臨床的にはLeigh脳症が疑われる例であり、Pompe病と全く異なる表現型であった。また、筋病理標本上も、タイプ2線維萎縮を認めるのみでPompe病を示唆するような空胞性病本はなく、非特異的ながらもLeigh脳症として矛盾しない所見であった。なお、検体量が少なく生化学的解析を行えなかった1例についてもGAA遺伝子解析

を行ったが、病的変異も偽欠損アレルも認めなかった。

D. 考察

Pompe病と考えられる例は1例も存在しなかった。このことは、本邦ではPompe病の頻度が低いこと、また、筋病理診断の過程で少なくとも多数のPompe病例が見逃されている実態はないことが示された。

また、従来から指摘されているとおり、本邦には一定の頻度で偽欠損アレル保有者が存在する事が確認された。まだ十分な症例数とは言えないことに加えて、酵素活性がカットオフ以上の例ではゲノム解析を施行していないことから正確な議論は困難であるが、今回の201例中に2例のホモ接合型偽欠損アレル保有者が居たことは、本邦ホモ接合型偽欠損アレル保有者の頻度は、少なくとも1%以上ある可能性が高いことが示唆される。

一方で、偽欠損アレルのヘテロ接合型保有者、ホモ接合型保有者で接合型に比例して酵素活性が低下する傾向が認められたこと、更には、病的変異のヘテロ接合型保因者では更にその活性が低下していた事からは、今回の酵素活性測定システムが一定の感度を有し、診断スクリーニングとして一定の信頼度があることを示している。

E : 結論

凍結筋切片を用いた Pompe 病スクリーニングが有効に機能していることが確認された。今回の 201 例の解析結果では 1

例も Pompe 病患者が同定されなかったことは、本邦では、Pompe 病の頻度は低いこと、また、筋病理診断サービスの過程で多数の Pompe 病患者が見逃されている訳ではないことを示している。また、従来から指摘されているとおり、一定の頻度で偽欠損アレル保有者が存在する事も確認された。更には、偽欠損アレル保有者で病的変異のヘテロ接合型保因者の場合には、更に酵素活性が低下するものの、少なくとも筋生検時点では Pompe 病を発症していない事が確認された。

F : 健康危険情報

なし

G : 研究発表

1 : 論文発表

Mori-Yoshimura M, Segawa K, Minami N, Oya Y, Komaki H, Nonaka I, Nishino I, Murata M: Cardiopulmonary dysfunction in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2A. Muscle Nerve. [Epub ahead of print]
doi: 10.1002/mus.25369. PMID: 27500519

Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsuhashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N:

Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. Am J Hum Genet. 99(4): 950-961, Oct, 2016
doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.005. PMID: 27666374

Preethish-Kumar V, Pogoryelova O, Polavarapu K, Gayathri N, Seena V, Hudson J, Nishino I, Prasad C, Lochmuller H, Nalini A: Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy. Eur J Neurol. 23(8): e46-8, Aug, 2016
doi: 10.1111/ene.13041. PMID: 27431025

2 : 学会発表

なし

**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