

学位論文抄録

Fabry disease screening in high-risk populations in Japan: a nationwide study
(日本全土におけるファブリー病ハイリスクスクリーニング)

吉田 真一郎

指導教員

中村 公俊 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Fabry disease (FD) is a X-linked inherited disorder caused by mutations in the GLA gene, which results in the deficiency of α -galactosidase A (α -Gal A). This leads to the progressive accumulation of metabolites, which can cause multisystemic dysfunction. A recent screening study among neonates reported an increase in the incidence of FD, and numerous FD patients remain undiagnosed or even misdiagnosed. Therefore, this study aimed to identify patients with FD by performing high-risk screening in 18,135 individuals, enrolled from October 2006 to March 2019, with renal, cardiac, or neurological manifestations from all prefectures in Japan. A total of 601 hospitals participated in this study.

Methods: α -Gal a assay Method : a single 3.2mm diameter disk punched from DBSs, was incubated in a well of a 96-well microwell plate with 100 μ L of citrate/potassium phosphate buffer for 1 h at room temperature. A 20- μ L aliquot of the extract was then added to 40 μ L of the reaction mixture (3.0mM 4MU- α Gal; 100mMN-acetyl-D-galactosamine in potassium phosphate buffer) in a black 96-well microwell plate. The reaction mixture was incubated at 38 ° C for 3 h, and the reaction was terminated with 200 μ L of 300mM glycine/NaOH buffer to measure fluorescence intensity.

Next-generation sequencing (NGS): The 13.3-kb region, including GLA, was amplified using long-range PCR. Library preparation and sequencing were performed using a Nextera XT Kit and MiSeq sequencer (Illumina). Variants detected in the GLA gene by NGS were resequenced using the Sanger method. Public databases, including Fabry-database and ClinVar were used to classify each variant. The software PolyPhen-2 was used for missense mutations to predict the potential impact of an amino acid alteration on α -Gal A function.

Results: Low α -Gal A activity was detected in 846 individuals, with 224 of them diagnosed with FD by GLA sequencing. Cases with a family history of FD (n = 64) were also subjected to sequencing, without α -Gal A assay, as per individual request, and 12 of them were diagnosed with a variant of FD. A total of 236 patients with FD (97males and 139 females) were identified from among 18,199 participants. A total of 101 GLA variants, including 26 novel variants, were detected in the 236 patients with FD from 143 families, with 39 amenable variants (39%) and 79 of the 236 patients (33%) suitable for migalastat treatment.

Conclusions: The simple screening protocol using dried blood spots that was performed in this study could be useful for early diagnosis and selection of appropriate treatments for FD in high-risk and underdiagnosed patients with various renal, cardiac, or neurological manifestations.

学位論文抄録

[目的] ファブリー病は α -galactosidase A (α -Gal A) 活性欠損をきたす GLA 遺伝子変異で発症する X 連鎖性の先天性疾患である。酵素活性欠損により進行性の代謝物蓄積を起し多器官での機能障害をきたす。最近の新生児に対し行われたスクリーニングにおいて患者発生率の増加が報告されており、多くの患者が未診断あるいは誤診断のままとなっている。そのためこの研究では 2006 年 10 月から 2019 年 3 月までに国内各県の 601 の研究参加病院より腎臓、心臓および神経性の兆候のある 18,135 名についてハイリスクスクリーニングを行うことで患者を同定することを目的とした。

[方法] 参加者より入手した乾燥血液ろ紙より直径 3.2mm のディスクを切り出し合成基質法により α -Gal A 活性を測定した。GLA 遺伝子配列解析はサンガー法と次世代シーケンサー法を用い、バリエーション分類には Clinvar や Fabry-database の公開データベース、アミノ酸変化による α -Gal A 活性への影響度予測を行う PolyPhen2 を用いた。

[結果] GLA 遺伝子配列解析によりファブリー病と診断された 224 名を含む 846 名において α -Gal A 活性低下が確認された。家族歴を持つ 64 名についても要望により GLA 遺伝子配列解析を行いファブリー病関連バリエーションが確認され 12 名が診断された。全体として 18,199 名の参加者において 97 名の男性、139 名の女性を含む 147 家族、236 名がファブリー病と診断された。この中で 26 の新規バリエーションを含む 101 の GLA バリエーションが同定され、そのうち 39% (39 個) のバリエーション、33% (236 名中 79 名) の患者がミグlustat 治療適応であった。

[結論] 乾燥血液ろ紙を用いたこのシンプルなスクリーニングプロトコールは様々な腎臓、心臓あるいは神経性の兆候を示しているハイリスク者や未診断者に対する早期診断と適切な治療法選択のため有用かもしれない。