

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

龐貝氏症:新生兒篩檢發現個案之突變分析及治療成果

Pompe disease: novel mutations and treatment outcome
through newborn screening

簡穎秀

Yin-Hsiu Chien

指導教授：胡務亮 博士

Advisor: Wuh-Liang Hwu, M.D., Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

致 謝

感謝胡務亮副教授，蔣書娟小姐一路以來的堅持與指導，使得這個全球首創的新生兒篩檢得以在台灣發展，生根，並徹底改變了患者的治療成果。感謝黃愛珠諮詢師及陳曉玲小姐，有了他們盡力與家長溝通，追蹤個案的狀況，我們的篩檢結果才得以有一個完整的全貌。感謝新生兒篩檢室的陳麗珠醫檢師，徐儷文醫檢師，陳秀珍醫檢師，魏明麗醫檢師，劉蓁珍醫檢師，陳麗新醫檢師，胡閔慧小姐，邱麗燕小姐，林靖潔小姐，曾士娟小姐，吳淑姿小姐，及其他同仁，沒有他們的投入，篩檢工作難以完成。感謝所有參與新生兒篩檢的醫師，護理人員，及公衛人員，有了大家的全力配合，我們才能創造這個”世界第一”的成績。

感謝這些年來協助我的實驗室同仁及助理：李妮鍾醫師，葉慧英醫檢師，李安孺小姐，黃筱芸小姐，施竣賀先生，許惠雯小姐，張凱玲小姐，謝易達先生。感謝你們給我這麼融洽的研究環境，並且一起完成這份工作。

感謝余家利主任與繆希椿副教授一直以來的關心與指導，感謝論文指導委員會的楊偉勛副教授，陳垣崇教授，鄔哲源教授，及蔡世峰教授，在百忙之中與會，給予我許多研究上的意見與指導。

最重要的是要感謝一路上父母，外子與兒女們的支持與陪伴，讓我可以全心投入在工作上，尤其是外子，在臨床工作與研究工作兩忙中，還能支持我的工作。感謝寶貝宗鈞和媛婷，要忍受媽媽去上班，不能親自接你們下課，陪你們做功課。不過，媽媽的這個功課終於做完了！

誌於 2009.7.5

目 錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	5
英文摘要.....	6
論文本文	
第壹章、 緒論	8
壹.1. 龐貝氏症 Pompe disease	8
壹.2. 酵素替代療法(Enzyme Replacement Therapy, ERT).....	9
壹.3. 診斷方法	10
壹.4. GAA 基因與蛋白.....	11
壹.5. 新生兒篩檢	12
壹.6. 本研究的目的	13
第貳章、 方法	14
貳.1. 大眾篩檢：新生兒篩檢方法學之建立.....	14
貳.2. 台灣地區龐貝氏症患者的現狀.....	16
貳.3. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之免疫反應.....	18
貳.4. 由大眾篩檢所得之的龐貝氏症分子病理機轉.....	19
第參章、 結果	22
參.1. 新生兒篩檢方法學之建立.....	22
參.2. 台灣地區龐貝氏症患者的現狀.....	24
參.3. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之免疫反應.....	25
參.4. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之腦部發展.....	26
參.5. 經由新生兒篩檢檢出的嬰兒型龐貝氏症患者治療的現狀.....	27
參.6. 由大眾篩檢所得之的龐貝氏症分子病理機轉.....	28
第肆章、 討論	34
肆.1. 酵素補充療法	34
肆.2. 大眾篩檢	35

肆.3.	突變型式	36
肆.4.	Pseudodeficiency	37
肆.5.	Splicing defect	38
肆.6.	Wrong diagnosis?	39
第五章、	結論與展望	41
第陸章、	論文英文簡述	42
第柒章、	參考文獻	46
第捌章、	圖表	54
第玖章、	相關論文	97



圖目錄

圖 1.	篩檢流程	54
圖 2.	本研究使用的 RT-PCR 引子與 GAA 基因關係示意圖	55
圖 3.	新生兒的 GAA 活性數值分布呈現常態分布	56
圖 4.	篩檢成果	57
圖 5.	新生兒時期患者的胸部 X 光及肌肉切片	58
圖 6.	新生兒篩檢陽性個案與陰性個案的數值分布圖	59
圖 7.	台灣地區嬰兒型龐貝氏症患者治療後之體內抗體濃度	60
圖 8.	西方墨點法顯示所有患者體內尚有殘存蛋白	61
圖 9.	嬰兒型龐貝氏症患者治療後之腦部發展	62
圖 10.	新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者治療後的心臟變化	62
圖 11.	比較不同治療對患者存活及運動功能的影響	64
圖 12.	GAA 活性部分缺乏及患者之酵素活性分析	66
圖 13.	GAA 活性部分缺乏及患者之蛋白質含量及 mRNA 含量	67
圖 14.	嬰兒型龐貝氏症患者家族之單倍體分析	68
圖 15.	c.1194+2t>c 影響	69
圖 16.	晚發型龐貝氏症患者 c.546+5g>t 之分析	70
圖 17.	晚發型龐貝氏症患者 c.955+167 c>t 之分析	73
圖 18.	帶有 IVS5+167 t 變化的患者皆有 delta E6 之不正常 RNA 表現	76
圖 19.	帶有 IVS5+167 t 患者皆有數量不一的不正常的 RNA 表現	77
圖 20.	IVS5+167 c 患者偶可表現少量的不正常 RNA	78
圖 21.	IVS5+167c>t 會影響 RNA 接合	79
圖 22.	預測的影響	80

表目錄

表一.	GAA 基因突變 DNA 分析使用的引子序列.....	81
表二.	GAA 基因突變 DNA 分析使用的 PCR 條件.....	82
表三.	GAA 基因突變 RNA 分析所使用的引子序列.....	83
表四.	血片檢體檢驗 GAA 活性與血液淋巴球檢體之結果比較.....	84
表五.	嬰兒型龐貝氏症患者的臨床症狀與檢驗數值.....	85
表六.	嬰兒型龐貝氏症患者基因突變與酵素檢驗數值.....	86
表七.	以臨床表現而診斷的台灣嬰兒型龐貝氏症患者治療現狀.....	87
表八.	新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者之治療效果.....	88
表九.	新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者之基因變化.....	89
表十.	新生兒篩檢檢出 GAA 部分缺乏或缺乏患者之基因突變分析.....	90
表十一.	新生兒篩檢檢出 GAA 部分缺乏或缺乏患者之基因突變分布頻率..	92
表十二.	GAA 活性部分缺乏患者之酵素活性受其他 GAA 基因多型性影響	93
表十三.	GAA 基因 p.G576S 與酵素活性高低有關.....	93
表十四.	新生兒篩檢檢出 GAA 活性部分缺乏者基因之單倍體分析.....	94
表十五.	預測為晚發型龐貝氏症患者之基因突變分析.....	94
表十六.	此家族基因突變與 deltaE6 RNA 之整理.....	95
表十七.	c.955+167 c>t 的盛行率.....	95
表十八.	台灣地區晚發型龐貝氏症患者的基因突變.....	96

中文摘要

背景: 龐貝氏症是一種因為溶小體缺乏酸性糖苷酶無法分解肝糖所引起之疾病。最近針對龐貝氏症，已有酵素補充療法可以使用。嬰兒型龐貝氏症患者經由酵素補充療法，可有效延長性命，恢復心臟正常大小，但是大部分患者的運動及呼吸功能無法恢復正常；晚發型龐貝氏症治療後，其症狀之可逆性也很有限。本研究的目的在探求新生兒篩檢可以早期診斷龐貝氏症，給予患者早期治療的機會。

方法: 我們首先分析台灣龐貝氏症患者之表現型、基因型、以及個案之分佈，以及是否有導致治療失敗之因子。我們接著開發龐貝氏症新生兒篩檢之方法，並且進行前導篩檢作業。篩檢結果之分析，包括篩檢個案之表現型及基因型分析，以及嬰兒型龐貝氏症早期治療之成果。經由比較臨床個案及篩檢結果，試圖去預測台灣族群龐貝氏症之分佈，以及台灣未來關於龐貝氏症之診斷與治療之策略。

結果: 臨床個案分析顯示嬰兒型龐貝氏症患者接受酵素治療後，其肌肉對治療之反應不一，但是並沒有證據顯示患者之腦部會有不可逆之變化。經由新生兒篩檢檢出之嬰兒型患者，因為治療開始時間較早，其預後明顯比臨床個案要好。這些患者的基因型與臨床發現個案相類似，主要為 p.D645E 突變。新生兒篩檢同時檢出部分患者酵素活性缺乏，懷疑為晚發型龐貝氏症患者。這些患者的基因型與臨床發現的晚發型龐貝氏症患者部分類似，但是其發生率以及突變位置未確定的比例均較臨床個案為高。經由族群篩檢我們發現了高比例之龐貝氏症基因變異型。這些變異型會使得酸性糖苷酶活性偏低，我們目前不能排除這些基因變異型是否參與龐貝氏症臨床表現之決定。

結論與展望: 新生兒篩檢可以達到早期診斷龐貝氏症之目的，並改善嬰兒型龐貝氏症之預後。台灣族群中帶有相當高比例之龐貝氏症基因變異型，可能引起龐貝氏症診斷之困難或混淆。新生兒篩檢疑似晚發型龐貝氏症之發生率尚待進一步證實，但結果也暗示臨床上可能有部分晚發型龐貝氏症患者沒有被診斷出來。

關鍵詞: 龐貝氏症，新生兒篩檢，溶小體

英文摘要

Background: Pompe disease is due to a deficiency of lysosomal acid alpha glucosidase (GAA), and currently an enzyme replacement therapy has been developed. In infantile-onset Pompe disease, enzyme replacement therapy can prolong survival and reverse cardiomegaly, however, some patients cannot regain motor or respiratory function. In late-onset Pompe disease, most of the symptoms cannot be reversed by treatment. In this study, we hypothesis that newborn screening for Pompe disease can offer an opportunity for early treatment of Pompe disease.

Methods: We first analyzed phenotype and genotypes of Pompe disease in Taiwan, and explored factors which may affect the outcome. We then developed a method of newborn screening for Pompe disease, and started a pilot screening program. We analyzed the genotypes, aiming at predicting phenotypes and comparing outcomes between early treatment and late treatment.

Results: Patients diagnosed clinical during infancy have poor responses to the treatment in view of skeletal muscle function. However, there was no irreversible changes in their brains. Patients with infantile-onset pompe disease identified by newborn screen could have an earlier onset of treatment and better outcomes in comparism to those identified by clinical symptoms. GAA gene mutations were similar between the two groups, and p.D645E is the most common one. We also identified babies with GAA deficiency but may have late-onset Pompe disease. They had GAA gene mutations previously seen in patients with late-onset Pompe disease, but the babies tended to have a higher incidence of mutations with unknown significance. Through newborn screening, we also identified prominent GAA gene variations in our population, including the

“pseudodeficiency” allele and alleles which may modify the clinical manifestations of Pompe disease.

Conclusion: Results from this study highlight the benefits of early diagnosis, which can be achieved only by newborn screening. of the intense gene variations in the population can confuse the diagnosis. The high incidence of late-onset Pompe disease from the screening program needs further confirmation, but our results do suggest the possibility of under diagnosis of Pompe disease in current clinical practice.

Key words: Pompe disease, newborn screening, lysosome



論文正文

第壹章、緒論

壹.1. 龐貝氏症 Pompe disease

龐貝氏症(Pompe disease)，又稱為肝醣儲積症第二型(glycogen storage disorder type II)，是由於患者缺乏酸性 α -葡萄糖苷酶(acid α -glucosidase, GAA)所引起之疾病。GAA 是一種溶小體酵素，此酵素在細胞中，負責分解溶小體中多餘的肝醣。由於龐貝氏症患者缺乏 GAA 酵素，使得進入溶小體的肝醣無法被分解而持續堆積，因而影響到細胞的功能，主要的症狀是因為肌肉功能受損，而導致肌肉無力，並進而影響生命。龐貝氏症可依其發病年齡、體內 GAA 活性及臨床表徵粗分為嬰兒型龐貝氏症和晚發型龐貝氏症 (late-onset Pompe disease) 兩種。其中，嬰兒型龐貝氏症又可分成典型和非典型 (non-classic) 兩種，非典型嬰兒型龐貝氏症的患者多在六個月大之前發病，雖一樣有肌肉無力的情形，但不同於典型嬰兒型龐貝氏症，沒有心臟肥大的症狀，且有些患者可以存活超過兩年。晚發型龐貝氏症又可分為孩童型 (childhood-onset)、少年型 (juvenile-onset) 與成人型 (adult-onset)，通常病程的進展較慢，且多以肌肉無力的症狀為主，呼吸衰竭是此型患者最常見的死因(Hirschhorn and Reuser, 2001)。嬰兒型龐貝氏症患者，其體內 GAA 活性約只有正常人的 1%或更少，少年型及成人型患者其體內 GAA 活性較高，約為正常人的 1%到 40% (Hirschhorn and Reuser, 2001; Kallwass, et al., 2007; Kishnani, et al., 2006c)。臨床上，嬰兒型患者最明顯的特徵是肝醣貯積在心臟而使得心室肥大，導致心臟迅速擴大，最終造成主動脈血流受阻。肝醣儲積在骨骼肌肉則導致肌肉低張力及肌肉無力，之後呼吸肌也會受影響，造成換氣不足及急速呼吸代償。少年型與成人型之患者會有肌肉及呼吸系統受損的症狀，但不會有心臟受損的症狀(Hirschhorn and Reuser, 2001; Kishnani, et al., 2006c)。嬰兒型患者通常於 2 個月大時開始表現臨床症狀，在 4.7 個月時確定診斷，而在 8.7 個月大時即因龐貝氏症引起的心臟或呼吸衰竭而死亡，可見此病進行之快速 (Kishnani, et al., 2006a)。但是，文獻報告於人類之羊膜細胞及 18 周大胚胎

的肌肉中即可見到肝醣儲積(de Barsy, et al., 1973)，心臟肥大最早見於一 23 天大的新生兒(Raben, et al., 2002b)，可見肝醣的堆積在患者出生前即已開始。

推估各類型龐貝氏症的平均發生率約為 1/40,000。但是不同類型龐貝氏症的發生率因地區與種族而有所不同。嬰兒型龐貝氏症的發生率於非裔美國人 (1/14,000)、中國大陸南方地區和台灣 (1/40,000 到 1/50,000) 較高；而在高加索人種則較低 (1/100,000 到 1/200,000) (Hirschhorn and Reuser, 2001)。晚發型龐貝氏症的發生率則在歐洲裔或荷蘭較高(Hirschhorn and Reuser, 2001)。在荷蘭，包括嬰兒型及晚發型的發生率據估為 50,000 分之一(Poorthuis, et al., 1999)，在紐約進行的一項基因篩檢計畫，使用 7 個常見基因突變點篩選的結果顯示，發生率約為 40,000 分之一 (Martiniuk, et al., 1998)。臨床上的經驗顯示，在台灣(Lin and Shieh, 1996)及以色列(Bashan, et al., 1988) 的發生率應該更高。

壹.2. 酵素替代療法(Enzyme Replacement Therapy, ERT)

在過去，龐貝氏症被視為無法治療的疾病，因此僅能提供支持性的療法，包括高蛋白飲食、物理治療、和呼吸器支持(ventilatory support)(Bembi, et al., 2003; Hirschhorn and Reuser, 2001; Kishnani and Howell, 2004)。目前除這些支持性療法外，亦可採用酵素替代療法(Enzyme Replacement Therapy, ERT)，將患者所缺乏的 GAA 酵素利用基因重組工程大量產生(Bijvoet, et al., 1999; Yang, et al., 1998)，提煉後定時注射至血液中，使儲積於細胞內的肝醣能正常代謝分解。此治療已被證實可以有效延長患者壽命，改善心臟肥大(Kishnani, et al., 2006a; Van den Hout, et al., 2004)。在臨床試驗中，在開始治療年紀小於 6 個月那組，18 名典型嬰兒型患者存活皆超過 18 個月大，在經過一年酵素補充治療後，約有 1/3 的患者，治療效果良好，其肌肉細胞內的肝醣含量可以從 25–58% 大幅降低(Thurberg, et al., 2006)，且有 15 (83%)名患者在 18 個月大時不須使用侵入式呼吸器(Sun, et al., 2007)，而在開始治療年紀介於 6-36 個月大的那組，雖然患者的存活率有改善，但是使

用呼吸器的狀況並未得到改善(Nicolino, et al., 2009)，顯示愈早開始治療的患者，其治療效果愈好(Amalfitano, et al., 2001; Kishnani, et al., 2007)。然而嬰兒型龐貝氏症由於開始表現的症狀不具特異性，而且疾病進程極快，患者極少能夠得到早期診斷早期治療，因而影響治療效果。

除了治療開始時間會影響患者治療效果外，其他因素亦可能造成患者治療成效不一。部分患者甚至產生大量抗體干擾藥物的療效(Amalfitano, et al., 2001; Kishnani, et al., 2007; Kishnani, et al., 2006b)，可能是因為這些患者體內毫無殘存 GAA 蛋白，屬於 cross-reacting immunologic material(CRIM) 陰性患者，因而造成免疫系統在接觸大量外來重組蛋白質時，產生大量抗體來中和這些外來蛋白質的活性(Sun, et al., 2007)。

目前只有零星文獻報告患者經過長期治療的成果，其存活時間可以延長至約 58 個月(Klinge, et al., 2005a; Klinge, et al., 2005b; van Capelle, et al., 2008)。而且因為龐貝氏症屬全身性的疾病，儲積的肝醣已被證實可以在神經系統堆積，造成腦幹細胞核及脊髓前角灰質細胞功能失常而造成自主神經系統的功能異常，酵素療法並未被提到可以改善這些症狀。

對於晚發型龐貝氏症的治療成效，目前只有零星的報告(Case, et al., 2008; van Capelle, et al., 2008; Winkel, et al., 2004)。大致說來，在治療的前 6 個月，可以見到酵素治療之後，患者的呼吸症狀可有部分改善，肌肉酵素(creatine kinase)及其他生化數值(lactic dehydrogenase, transaminases)也可同步下降(Merk, et al., 2009)。但患者的呼吸及行走功能並無法完全恢復正常(Merk, et al., 2009; van Capelle, et al., 2008)。在肌肉受損前及早給與治療應該能得到最佳的治療效果(van der Beek, et al., 2006)。

壹.3. 診斷方法

龐貝氏症是因為缺乏酸性 α -葡萄糖苷酶(acid α -glucosidase, GAA)所引起之疾病。因此確認診斷的方式為證實患者血液淋巴球，皮膚纖維芽細胞，或是肌肉細胞等組織缺乏 GAA 酵素活性(Hirschhorn and Reuser, 2001)。皮膚纖維芽細胞通常需先經由 2-4 周的培養後才可進行酵素檢驗，

肌肉細胞取得不易，因此患者血液淋巴球酵素定量檢驗成為第一線準確且快速的檢驗。然而血液淋巴球分離如果不徹底，則此酵素檢驗會受到血液中性球中所含有的同功酵素(isoenzyme) maltase glucoamylase (MGA)的干擾，而造成檢驗結果假性偏高(Hirschhorn, 2001; Shin, et al., 1985; Taniguchi, et al., 1978)。加入此同功酵素 MGA 的抑制物如 maltose 或 acarbose 可以有效抑制 MGA 的干擾，以準確測定血中或是乾燥血片中 GAA 之酵素活性(Chamoles, et al., 2004; Kallwass, et al., 2007; Li, et al., 2004; Zhang, et al., 2006)。這樣的檢驗方法已經經由小規模的實驗證實，可以快速檢驗患者是否具有酵素缺乏的狀態，包括嬰兒型龐貝氏症患者 (Chamoles, et al., 2004; Zhang, et al., 2006) 以及成年型龐貝氏症患者(Kallwass, et al., 2007)。但是這種檢驗並無法區分患者罹患的是嬰兒型或是晚發型龐貝氏症(Kemper, et al., 2007)。

壹.4. GAA 基因與蛋白

龐貝氏症是由於 GAA 缺乏所導致，這是一種體染色體隱性遺傳疾病，致病基因 GAA 位於第十七號染色體上(17q23-25)，全長涵蓋約 28kb 的長度，共含有 20 個外顯子(exon)，將會轉錄出一條全長約 3847bp 的 mRNA，再轉譯成含有 952 胺基酸的多肽鏈。其轉譯起始點(ATG)位在第二個外顯子上。在 GAA 基因的啟動子(promoter)上，帶有 2 個可能的 AP-2 位點，及 4 個可能的 Sp-1 結合處，而且為 GC-rich，為典型”house-keeping”基因的特徵(Raben, et al., 2002a)。因此 GAA 酵素在全身細胞皆有表現(Ponce, et al., 1999)，但是在不同組織的表現量不同，甚至在同一組織的表現量也不同，顯示此基因可能在轉錄階段另外受到目前未之因素的調節而影響表現。

目前為止，已知有超過 300 種以上的突變，包括點突變(point mutation)，小片段或大片段的缺失(deletion)等。這些突變遍布全基因，但是在 exon 14 的演化保留區上的 CpG dinucleotides 似乎是點突變的好發位置(Huie, et al., 1998)。在特定族群中可能有好發的突變，如高加索人的 c.-32-13T>G 以及中國人的 c.1935C>A(p.D645E)(Lin and Shieh, 1996)。突變

的方式可以解釋患者殘存的酵素活性，進而預測患者的罹病表現(phenotype)。通常說來，GAA 基因突變可依照突變株在 COS 細胞表現酵素活性情形，將突變分為嚴重型(severe)，較不嚴重型(less severe)，以及輕型(mild)等(Hermans, et al., 2004)。然而，越來越多的研究報告指出，這些基因突變分析無法預測表現型(Kroos, et al., 2004; Kroos, et al., 2007; Raben, et al., 2002b)。甚至，龐貝氏症的表現型也日趨複雜，例如曾有報告指出一罹患典型龐貝氏症的嬰兒可以較其他典型龐貝氏症患者有較佳的預後，存活超過 12 個月(Slonim, et al., 2000)。顯見在龐貝氏症之基因型與表現型不一致之處。

GAA 蛋白質有三個主要的型式，分別為 110kDa、95 kDa 及 76kDa。其中 110kDa 為 GAA 蛋白質的前驅物，95 kDa 為 GAA 蛋白質的中間產物，而 76kDa 為經過修飾的成熟的 GAA 蛋白質。GAA 蛋白質的前驅物在 ER 中經過醣化作用後，配置有 mannose 6-phosphate (M6P)，大部分的 GAA 酵素因此可已經由 M6P receptor 運送到溶小體中，經過修飾後成為有活性的 76 及 70 kDa 的酵素(Wisselaar, et al., 1993)。目前已知 GAA 酵素的作用點位於 Phe512 到 Glu521 之間(Hermans, et al., 1991)。

壹.5. 新生兒篩檢

使用濾紙血片做大規模新生兒篩檢以求早期診斷相關疾病並開始治療的概念於 1960 年代初期最先由 Dr Guthrie 發表(Guthrie, 1992)，他首先成功的以濾紙血片檢驗新生兒是否罹患苯酮尿症(phenylketonuria)，搭配及時開始的飲食治療，成功的改變苯酮尿症患者的預後，證明新生兒篩檢的價值。自此，新生兒篩檢成為一種重要之公共衛生政策，美國麻州自 1963 年開始全面施行新生兒篩檢，我國也自民國 73 年 5 月 15 日全面推展，自 74 年 7 月正式開始全國性的篩檢服務。新生兒篩檢的項目也隨著技術的發展，由最早的苯酮尿症，逐漸增加到包括先天性甲狀腺低能症，及其他項目。自從串聯質譜儀技術引進之後，可以檢測的疾病項目迅速成長，美國 the American College of Medical Genetics (ACMG)於 2006 年建議了 29 種疾

病應該被包括於新生兒篩檢，並且另外建議了 25 種在檢驗時可同時檢測的疾病應該被告知(2006)。但是龐貝氏症並未被列入其中，主要原因是因為尚未有良好可靠的篩檢方法，以及篩檢後早期治療的成效尚未明朗。

壹.6. 本研究的目的是

本研究的假設是，嬰兒型龐貝氏症患者，可以經由新生兒篩檢，達到早期診斷早期治療的目的，因而改善治療效果。但是經由新生兒篩檢，檢驗血中 GAA 酵素活性，在沒有臨床症狀的輔助判斷下，就需要搭配基因突變分析，以協助判斷其表現型，決定開始治療的最佳時機。然而 GAA 基因突變多屬私密突變(private mutation)，而且許多 GAA 基因的多型性亦可能導致判斷上的困難，因此本研究需了解台灣地區龐貝氏症患者經由新生兒篩檢檢出者的基因變化，以協助新生兒篩檢的進行。



第貳章、方法

貳.1. 大眾篩檢：新生兒篩檢方法學之建立

貳.1.1. 新生兒篩檢檢體來源

臺大醫院新生兒篩檢中心為台灣地區 3 家新生兒篩檢中心之一，每年篩檢全台約 45% 的出生新生兒。本計畫經由台大醫院研究倫理委員會同意後進行，本研究的進行符合赫爾辛基宣言的準則。新生兒出生滿 48 小時，即會接受新生兒篩檢檢驗之採血。如果父母同意參與本先驅研究計畫，檢附同意書後，本中心即可利用原本的檢體，額外檢驗龐貝氏症。本先驅篩檢計畫自 2005 年 10 起進行至 2008 年 6 月止。

貳.1.2. 新生兒篩檢檢驗方法

本先驅篩檢之檢驗方法包含 3 種酵素活性之測定，包括(1) nGAA 活性：須在 pH 3.8 的環境下並加入 acarbose 抑制物後測定；(2) total GAA (tGAA) 活性：須在 pH 3.8 的環境下不含 acarbose 抑制物的測定；(3) total neutral glucosidase (NAG) 活性：須在 pH 7.0 的環境下不含 acarbose 抑制物的測定。tGAA 活性包括同功酵素 MGA 以及 GAA 活性，因此可以計算出抑制率： $(tGAA - GAA)/tGAA$ 以作為篩檢結果判定之參考。NAG 活性測定是用作檢定檢體品質，測定 NAG 活性可以得出比例參數(ratio)：NAG/nGAA 作為篩檢結果判定之參考。

所有酵素活性測定皆採用產螢光的受質 (substrate) 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (4-MUG) 進行。本方法是改良自 Chamoles 等人 (Chamoles, et al., 2004; Kallwass, et al., 2007) 的方法進行。收到新生兒篩檢檢體濾紙血片後，檢驗人員剪下一直徑 3.2-mm 之濾紙盤，置放於一 96 孔黑色過濾盤之檢體槽中，加入萃取溶液後，以微量盤搖盪器，以使濾紙盤中的血液可以被萃取出來後，以離心方式將血點檢體萃取液移至新的 96 孔塑膠萃取盤 (96-well PS Plate) 的檢體槽，進行酵素反應。

酵素反應中需加入 nGAA 反應溶液 (nGAA Substrate Solution) 及

NAG 反應溶液(NAG Substrate Solution)，以微量盤震盪器震盪混勻後，密封閉光，在 37 度烘箱靜置 20 小時以待反應完成後，加入 EDTA Stop Buffer 將反應停止並以微量盤螢光光譜儀偵測螢光值。

貳.1.3. 新生兒篩檢參考值建立

在篩檢開始時，我們先測量 5000 個匿名新生兒檢體，建立正常值，當方法做小幅修正時，另檢驗 2000 個匿名新生兒檢體作為方法確認。

在篩檢階段，我們使用 2 階段篩檢(圖 1)，檢體之 GAA 活性若小於正常均值的 55%，則進入第二階段的檢驗，同時測定 GAA 以及 NAG 的活性。若是 GAA 活性確定小於正常均值的 25%，而且 NAG/GAA 比值大於 25，則通知此新生兒的家長，請寄送第二次檢體檢驗。若是 NAG/GAA 比值大於 100，則通知此新生兒的家長，須盡速帶此新生兒接受確認檢查。第二次檢體檢驗結果若符合：檢體之 GAA 活性若小於正常均值的 8%，tGAA 抑制率大於 80%，以及 NAG/GAA 比值大於 60，則通知此新生兒的家長，須盡速帶此新生兒接受確認檢查。

貳.1.4. 新生兒篩檢結果驗證

新生兒如因為篩檢結果異常，須接受確認檢查，確認檢查包括理學檢查及病史詢問，肌肉酵素 creatine kinase 檢驗，血液淋巴球 GAA 活性分析，胸部 X 光及心電圖檢驗，如懷疑有心臟肥大，則加排心臟超音波檢查。若證實此新生兒有 GAA 酵素活性缺乏(定義為小於正常均值的 5%)且已出現心臟肥大現象，則立即給予人類重組酵素補充治療，並進行後續的皮膚纖維芽細胞培養及基因分析，以免因為等待而錯失治療良機。

貳.2. 台灣地區龐貝氏症患者的現狀

貳.2.1. 患者來源

自 1994 年起，本院建立了龐貝氏症酵素檢驗方法，因此成為台灣地區少數可以檢驗龐貝氏症的中心之一。我們回顧了自 1994 年到 2008 年曾送至本院檢驗並確認為龐貝氏症患者的資料，包括發病年紀，酵素檢驗數值，以及基因突變分析結果。

貳.2.2. 酵素檢驗方法

我們利用 Ficoll 分離患者的血液淋巴球細胞，或是使用患者的皮膚纖維芽細胞來檢驗 GAA 酵素活性是否有缺乏。細胞將置放於反應液 (40 mM Na₂HPO₄, 30mM Nacitrate, pH 4.0) 中，被震碎後以離心方式(41C, 13 000 rpm for 15 min)取得上清液，一部分作蛋白質定量(BCA protein assay reagent; Pierce, Rockford, IL, USA)。另取一部分作酵素反應。反應液包括 100 mg 蛋白質與 25 mM 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyroside (4-MUG) (Fluka Chemical Corp, Ronkonkona, NY, USA)，一起在 37C 度烘箱中反應 2 h 後加入 1 ml 0.4 M glycine-NaOH buffer, pH 10.6)停止反應，並以螢光光譜儀偵測螢光值(excitation at 365 nm and emission at 450 nm)。

貳.2.3. 基因突變分析

我們利用 QIAampTM DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) 自患者的周邊血液細胞中萃取 DNA。GAA 基因的第 2-20 外顯子含 exon-intron 交界分別以 PCR 放大後(表一，表二)，以直接定序方法檢測基因序列是否有變化。所使用的參考序列為 NC_000017.9; GI:51511734。命名則以 cDNA 序列(NM_000152.3; GI:119393890) 為準，轉譯起始點 ATG 的 A 定為此序列之+1 位置。

貳.2.4. 酵素治療

自 2002 年開始，本院即開始治療嬰兒型龐貝氏症患者，這些患者接受人類重組酵素 α -glucosidase (Myozyme [Genzyme, Cambridge, MA]) 治療，每兩周劑量為 20mg/kg BW，皆經由靜脈注射給予。我們分析患者的發病年紀，目前年紀，以及基因與酵素檢驗結果。患者的運動功能，心臟功能，進食功能等則定期評估，以了解治療成效。



貳.3. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之免疫反應

貳.3.1. 患者治療

自 2002 年開始，本院即開始治療嬰兒型龐貝氏症患者，這些患者接受人類重組酵素 *α*-glucosidase *α* (Myozyme [Genzyme, Cambridge, MA]) 治療，每兩周劑量為 20mg/kg BW，皆經由靜脈注射給予。這些患者在接受注射前，接受注射後每 4 周抽血檢驗血中抗 GAA IgG 抗體檢驗。

貳.3.2. *CRIM status* 分析

我們使用西方墨點法，檢驗患者體內是否有殘存之 GAA 蛋白，以確認患者是否為 *CRIM negative* 狀態。患者的皮膚纖維芽細胞(或是淋巴球細胞)經由音波震碎後，離心取得上清液以供分析。在上清液中的全細胞蛋白質，經由 10% SDS 平板膠片 (polyacrylamide gels) 進行膠體電泳 (SDS-PAGE) 分離後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜上 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 後進行免疫染色。本實驗使用 monoclonal anti-GAA antibody (由 Genzyme 公司提供 (Genzyme, Boston, MA, USA) 作為一級抗體，以及 HRP-conjugated anti-mouse Ig 作為二級抗體。最後以冷光 chemiluminescence (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 法呈色。另以 tubulin 抗體偵測細胞內 tubulin 量做為細胞內蛋白質含量的參考控制。

貳.3.3. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之腦部發展

自 2002 年 12 月至 2004 年 12 月止，共有 5 名嬰兒型龐貝氏症患者於本院接受酵素補充療法，所有患者皆接受腦部核磁共振檢查，包括核磁共振成像 (Nuclear Magnetic Resonance Imaging, NMRI)，及活體磁共振頻譜 (in vivo MR spectroscopy, MRS)。髓鞘化 (myelination) 的成熟度則參考文獻所敘 (Barkovich and Kjos, 1988; Barkovich, et al., 1988)。

貳.4. 由大眾篩檢所得之的龐貝氏症分子病理機轉

貳.4.1. 患者來源

經由新生兒篩檢檢驗確認有 GAA 活性缺乏或部分缺乏患者，以及曾在台大醫院就醫之龐貝氏症患者及其父母，在取得基因檢查同意書後，進行後續基因突變分析。對照組則包括 43 名正常人，325 個匿名的新生兒篩檢血片檢體，以及 98 個由中央研究院 Taiwan Han Chinese cell and genome bank (http://ncc.sinica.edu.tw/han-chinese_genomebank/) 釋出的正常對照組檢體。

貳.4.2. RNA 萃取及分析

我們利用 Trizole (Invitrogen-Gibco, Grand Island) 自患者的周邊血液細胞或是皮膚纖維芽細胞中萃取 RNA。細胞加入 1ml Trizole 試劑將細胞打碎後，加入 0.2 ml chloroform 混勻後離心，取出上層水相部分，加入 0.6 ml isopropyl alcohol，離心所得之 RNA 以 75% ice-cold ethanol 洗後晾乾，但不過度乾燥。之後溶解於 20ul 的 DEPC H₂O 中，於 60°C 下，靜置十分鐘。繼續後續的 RT-PCR 或是保存於 -70°C 以供日後使用。

貳.4.3. RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

我們將抽取到的 RNA 樣品以 AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) 或 SuperScript kit (Invitrogen Corp.) 進行反轉錄，並以 oligo dT primers 或是特定的 GAA RT primers 進行 RNA 的反轉錄，製備出 cDNA，續以不同的 GAA RT primers 放大 GAA 基因的 RNA，RT-PCR 與 GAA 基因之間的關係如圖示(圖 2)。GAA RT primers 詳情請見表所示(表三)。放大 RNA 後，再送基因定序以了解 RNA 的序列是否正確，是否含有不正常的 RNA，以及是否有特定 RNA 減少的狀況。

在定量方面，我們以跨過 GAA 內顯子的引子(Left: 5'-GTC CCA GAA ATC CTG CAG TT, Right: 5'-CAA GGG GAA GTA GCC AGT CA)作為 PCR 的引子。並同時以 PCR 放大 β -actin mRNA 作為半定量的參考。PCR 產物最後經由電泳攝影，再由影像處理軟體 Kodak 1D software (Eastman Kodak)由濃度深淺來定量。

貳. 4. 4. 單倍體分析

我們藉由分析 5 個 GAA 基因多型性標記 p.R199H (c.596G>A, rs1042393G>A), p.H223R (c.668A>G, rs1042395 A>G), p.G576S (c.1726G>A, rs1800307G>A), p.E689K(c.2056G>A, rs1800309G>A), and p.I780V(c.2338A>G, rs1126690A>G)，由 21 個嬰兒型龐貝氏症患者的家族資料中建立單倍體，使用軟體為 Haploview (Barrett, et al., 2005)。

由於單倍體分析在族群研究中極為重要，尤其是單倍體分析可以回答這些多型性標誌與突變究竟是處於 *cis/trans* 的狀況。因此，我們也分析了這 103 個 GAA 酵素活性低下或缺乏的新生兒的 72 個 SNPs。之前的研究已經訂出主要的單倍體型(Kroos, et al., 2007)。在此我們選用其中具代表性的 10 個 SNP 來表示主要的單倍體型，來決定這些新生兒 GAA 基因的單倍體型。

貳. 4. 5. 體外轉錄表現(*in vitro transcription assay*)

我們先建構 GAA 的 minigene，將病人和正常人的 GAA 基因片段如圖示部分，分別以 PCR 放大，放進 plasmid 中，再對 E. coli 作 transformation，在 LB medium 中培養後，以 QIAprep Miniprep kit 抽取 plasmid。取得之 plasmid 以 CaCl_2 transfection 的方式送入 HEK 293T 或 HeLa cell lines，在 DMEM medium 中培養一天後以 TRIZOL reagent 抽取 RNA，加上 DNase 作用後，作 RT-PCR，產物作膠體電泳觀察。

貳.4.6. 統計分析

對於連續性變項，我們使用描敘性統計表示這些變項分佈的狀況。在不同組別中的 GAA 平均酵素活性的比較使用 Kruskal-Wallis 或 Mann-Whitney tests。使用 chi-square test 比較不同組別中的對偶基因頻率 (Allele frequency)。P 值小於 0.05 視為統計學上有意義的差別。



第參章、 結果

參.1. 新生兒篩檢方法學之建立

我們首先檢驗 5000 名新生兒的 GAA 活性數值，可以發現此數值在族群中呈現常態分布的狀況(圖 2)。大部分的新生兒(84.4%)的 GAA 酵素活性介於平均值的 55%~200% 之間，另外，有 13.3%的新生兒活性小於平均值的 55%，有 2.3%的新生兒活性大於平均值的 200%。值得注意的是，約有 0.2%的新生兒之數值偏低，小於正常均值的 10%，因此這些新生兒需要接受第二次檢驗，以確定這些寶寶體內 GAA 的狀況。

自 2005 年 10 月至 2007 年 3 月 (18 個月)，本中心共檢驗 132,538 名新生兒(圖 4)，其中 1101(0.83%)名新生兒因第一次檢驗結果有異常，而被要求做第二次檢驗或作確認檢查。最後共有 121 (0.9%)名新生兒被要求至本院接受確認檢查。這些孩子第一次血片中的平均 GAA 活性為 1.45 $\mu\text{mol/L Wb per hour}$ (range: 0.18–3.24 $\mu\text{mol/L Wb per hour}$)，此較現行一般新生兒的平均 GAA 活性 16.52 $\mu\text{mol/L Wb per hour}$ (range: 1.78–40.76 $\mu\text{mol/L Wb per hour}$) 較低，而且這些孩子的 GAA 酵素活性與現行已知的龐貝氏症患者的酵素活性 (0.38–2.34 $\mu\text{mol/L Wb per hour}$) 無法有效區別。

在這 121 名新生兒中，8 名新生兒的父母拒絕進一步檢查，9 名新生兒的 GAA 活性確認小於正常均值的 3%，另外 101 名新生兒的 GAA 活性大於正常均值的 3%，暫時歸於偽陽性個案。本研究期間並未發現有偽陰性的嬰兒型龐貝氏症患者，因此龐貝氏症新生兒篩檢的偽陰性率為 0%。而偽陽性率為 97%，檢驗敏感性為 3%。

在 GAA 活性確認小於正常均值的 3%的新生兒中，有 3 名在接受確認檢查時，即已出現心臟肥大現象(NBS2, NBS3, NBS4)(圖 5)，因此立即開始人類重組酵素補充治療，另有一名患者(NBS1)，於 7 個月大時出現肌肉無力症狀，因此也於 14 個月大時開始接受人類重組酵素補充治療。這些患者在開始治療時，皆已有明顯肌肉肝醣儲積的現象(圖 5)。

我們並檢驗臨床上已發病的個案之新生兒篩檢血片檢體，是否可以用來早期診斷這些患者罹患有龐貝氏症。這些患者的血片檢驗結果與血液

淋巴球檢體之結果比較於表四(表四)。結果顯示，不論是新生兒篩檢檢出的個案，或是因為臨床表現而被診斷的個案，這些患者的新生兒篩檢血片檢體，的確有 GAA 活性缺乏的表現。因此用新生兒血片可以正確快速檢驗嬰兒型龐貝氏症患者。

另外，比較這些患者的臨床症狀，與經由新生兒篩檢檢出的患者並無不同，皆有心臟肥大，肌肉酵素大幅升高的現象(表五)。除了 NBS1 外，NBS2,3,4 分別於 19, 22, 及 9 天大時即獲得診斷，其中 NBS4 因為 NAG/GAA 比值 >100 ，因此在得知第一次血片結果後立即被通知到醫院確認。當時這些新生兒皆未出現明顯異常症狀，但肌肉切片顯示已有空泡狀肌病變，範圍由 15%~85% 不等。因此確認此篩檢方法可以檢出嬰兒型龐貝氏症患者，而且顯示嬰兒型龐貝氏症患者在出生後即有心臟肥大和肌肉肝醣儲積的現象，應須立即給予治療。

我們最後檢討現行篩檢所使用界限值(cut-off)的合理性。比對這些確認為患者的檢驗數值(圖 6)，現行使用 2-tier 篩檢，在 GAA 活性小於 10%，NAG/GAA 比值超過 25 即為異常，但因為確認為龐貝氏症患者的比值皆大於 60，因此我們可以合理的將此界限值提高到 60，在不影響篩檢特異性的條件下，減少篩檢偽陽性的發生。在使用活性 $\leq 6.39\%$ 均值與 NAG/GAA 比值 ≥ 60 的條件下，不會有偽陰性的產生，而偽陽性率可以從 97% 減少到 50%，檢驗敏感性(sensitivity) 可以從 3% 大幅提高到 86.7%。

參.2. 台灣地區龐貝氏症患者的現狀

參.2.1. 嬰兒型龐貝氏症基因突變分析

自 1994 年開始，共有 37 名患者於本院接受酵素診斷確認為嬰兒型龐貝氏症。另外有 2 人只寄送 DNA 檢驗但沒有酵素活性的資料。這些患者的血球 GAA 酵素活性為 0-7.36，但是皮膚纖維芽細胞的 GAA 酵素活性為 0-1.23，確認為龐貝氏症患者。其中共 25 人接受基因檢驗(表六)，結果顯示 c.1935C>A (p.D645E)為最常見的基因突變，占了 56%，其他的突變包括 c.872T>C (p.L291P)，c.1411_1414del (p.E471PfsX5)較為常見 (表六)。c.1843G>A (p.G615R)則只出現一次。

參.2.2. 嬰兒型龐貝氏症患者治療成果

本院於 2002 年起即開始治療嬰兒型龐貝氏症患者，至 2008 年為止，共有 9 名患者因為產生了臨床症狀因而至本院接受人類重組酵素 alglucosidase alpha (Myozyme [Genzyme, Cambridge, MA])治療，每兩周劑量為 20mg 每公斤體重，皆經由靜脈注射給予。其症狀表現年紀，開始治療年紀，與治療結果如表(表七)。由於早期藥物上處於臨床試驗階段，病患 1-5 取得治療藥物不易，因此在診斷後皆經歷約 1-3 個月的延遲後才開始治療，治療開始年紀為 5.4-6.1 個月。相對而言，病患 6-9 則因為當時藥物已有健保給付，相對取得容易，因此治療開始的時間較早，治療年紀為 2 -4.4 個月。

在這 9 名患者中，目前有 2 名患者死亡，另外有 3 名患者需要使用長時間呼吸器，有 2 名患者可以跑步，行動正常。現有 3 人可以口進食，另外 4 人則因為吞嚥困難，須依靠鼻胃管或胃造瘻管進食(表七)。

參.3. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之免疫反應

本院於 2002 年起即開始治療嬰兒型龐貝氏症患者，患者在接受酵素補充療法前，及治療後皆會定期抽血檢驗其血中抗體濃度。這些患者的體內抗 GAA IgG 抗體，在接受治療後 2 個月內迅速生成並達到頂點(圖 7)，維持約 6 個月之後會逐漸下降，顯示體內對人類重組酵素已產生耐受性。最高的抗體濃度僅為 1:12 000，與國外患者有很大的差距(Amalfitano, et al., 2001)。抗體濃度在因有臨床症狀而被診斷的個案(臨床個案組)與新生兒篩檢檢出的個案(新生兒篩檢組)兩組之間並無差別，不因臨床個案組較晚開始治療而導致抗體濃度較高的表現。

我們進一步以西方墨點法檢驗患者體內是否有殘存的蛋白質。過去的研究文獻結果顯示，GAA 蛋白質有三個主要的型式，分別為 110kDa、95 kDa 及 76kDa。其中 110kDa 為 GAA 蛋白質的前驅物，95 kDa 為 GAA 蛋白質的中間產物，而 76kDa 為經過修飾的成熟的 GAA 蛋白質(圖 8, lane N)。以此方法檢視發現這些患者體內有少數殘餘蛋白質，主要為 110kDa 的型式，為 CRIM 陽性個案(圖 8)。因此推測其免疫系統已經過教育，較可以容忍外來蛋白質的挑戰，不易產生持續性大量抗體干擾藥物療效。已知台灣地區患者常見的突變 p.D645E 仍能產生完整的蛋白(Hermans, et al., 1993)，因此患者體內仍可見到殘餘蛋白質的存在是合理的推測。

參.4. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之腦部發展

先前文獻中的病理切片顯示患者的肝醣可以堆積在大腦皮質及腦幹的膠狀細胞(glial cells)，以及前角細胞(anterior horn cells)(Araoz, et al., 1974)。而且以腦部核磁共振檢驗這些患者的腦部結構時，曾有兩個個案報告有側腦室擴大(widening of the anterior horns of the lateral ventricles)及中心皮質層失養(central cortical atrophy)等變化(van den Hout, et al., 2003)。另一篇回顧亦顯示有腦室擴大，1 位的白質構造出現改變，及局部或廣泛的腦萎縮情形(Kishnani, et al., 2006a)。這些都是回溯性個案報告，至於經過酵素治療後的情況，並未有報告。

我們使用影像學檢查來定期追蹤嬰兒型龐貝氏症嬰兒的腦部發育情形。共追蹤了 5 名(Case 1-5, 表七)患者。這些患者出生體重皆正常，平均於 3 個月大開始出現症狀，於 6 個月大時開始接受治療，接受治療時皆已出現心臟肥大及肌肉無力等典型嬰兒型龐貝氏症的症狀。接受酵素治療 1 年後，其心臟肥大現象皆已消失，Case 5 可以自行移動及行走，但是 Case 2-4 的治療對肌肉症狀改善不大，這些患者只能有少數動作如平行移動腳，不能坐，且無法控制頭部。Case 1 只能眨眼，沒有手部或腿部的運動功能，但是並未出現僵直(spasticity, rigidity, dystonia, or choreoathetosis)等不正常動作。

我們發現，在我們這 5 個於六個月大開始接受治療的患者，接受治療前，皆顯示有延遲髓鞘化 (myelination)的現象(圖 9)，在追蹤到約一歲大時所有患者的髓鞘化程度皆有進步，但是有 3 位(cases 1-3)出現腦室擴大的情形。但是在 Case 1，髓鞘化程度在一開始的 6 個月有進步，但是之後的進步不大，而且開始出現輕微腦部結構異常如側腦室擴大及白質病變等現象。由於重組酵素無法通過血腦屏障，因而我們推斷這些髓鞘化程度改善應歸功於身體狀況的改善。而且從這些患者的追蹤影像可以推論，龐貝氏症的肝醣儲積於部分神經前角細胞或史旺細胞可能不至於對患者腦部功能造成重大影響。

參.5. 經由新生兒篩檢檢出的嬰兒型龐貝氏症患者治療的現狀

我們自 20 萬個新生兒檢出 5 名典型嬰兒型龐貝氏症患者，並於 12 天-34 天內開始給予治療(表八)。另有一名非典型嬰兒型龐貝氏症患者，則於 14 個月大時開始治療。5 名典型嬰兒型龐貝氏症患者在治療前皆有心臟肥大的現象，LVMI 左心室質量比(left ventricular index) 皆超過正常 (正常值 $47.4 \pm 6.2 \text{ g/m}^2$)。治療後約 4-6 個月 LVMI 即有顯著減少，但仍較正常心臟為大(圖 10)。目前所有患者皆可自由行走，自行以口進食。

我們以存活曲線分析未經治療，晚期治療，以及因為新生兒篩檢確認因而早期治療的三組患者，發現其中經過治療的兩組患者之存活曲線類似(圖 11 A)，顯示酵素治療可以大幅延長患者壽命。在新生兒篩檢組存活率與未治療組相比，有大幅改善 ($p=0.0011$)，與晚期治療組比較則相距不大($p=0.4795$)。

另外我們分析患者不使用呼吸器的存活曲線(ventilator-free survival)，可以看出早期治療的患者治療效果最好(圖 11 B)。在新生兒篩檢組不使用呼吸器的存活率與未治療組相比，有大幅改善 ($p=0.0084$)，與晚期治療組比較亦有改善($p=0.0640$)。然而因為新生兒篩檢組的患者追蹤時間不夠長，與晚期治療的患者並未能顯示明顯差異。

然而，我們嘗試比較不同組別患者可以行走的年紀，可以發現早期治療的患者治療效果最好(圖 11 C)。在新生兒篩檢組可以行走的年紀與未治療組相比，有大幅改善 ($p=0.0090$)，與晚期治療組比較亦有改善($p=0.0063$)。這是因為在未治療組，患者未達到能行走的年紀以前即已死亡，而在晚期治療組，許多患者雖然可以存活，但是運動功能改善不盡理想，患者無法行走甚至無法自行坐立，因此可以明顯看出，早期治療(新生兒篩檢組)不但可以對患者的存活有大幅改善，對患者的運動功能也有長足的改善，使得這些患者可以擁有近乎正常的生活。

參.6. 由大眾篩檢所得之的龐貝氏症分子病理機轉

參.6.1. 新生兒篩檢檢出之嬰兒型龐貝氏症患者之基因突變與已知臨床個案相似

我們自 20 萬個新生兒檢出 6 名罹患(典型及非典型)嬰兒型龐貝氏症患者。預估發生率約為 1 in 33 333。這 6 名患者的基因突變如表所示(表九)，這些患者的基因突變仍以 p.D645E 為主，佔 50% (6/12 alleles)，與臨床個案(表六)相似。除了 NBS1 外，這些患者的另一個 Allele 多為 frameshift mutation (p.E471PfsX5, p. L948SfsX70, p.Y354X)，可以呼應這些患者的表現，為嚴重的典型嬰兒型龐貝氏症。

參.6.2. GAA 酵素活性部分缺乏個案的基因分析

在檢驗 13 萬名新生兒後發現的 121 名 GAA 酵素活性部分缺乏或酵素缺陷的個案(包括 4 名嬰兒型龐貝氏症患者)，我們對其中同意進行基因檢驗的 107 名進行了全基因掃描(表十)。共有 72 人(67.3%)帶有一已知的致病性突變(48/107)或是帶有一未知臨床意義的突變(31/107)。其中有 8 人(7.5%, 8/107)同時帶有一已知的致病性突變及一未知臨床意義的突變。在已知致病性突變方面，我們發現仍以 D645E 突變為主(表十，表十一)，佔 24.3% (26/107)，顯示此突變為華人常見，可能是因為方舟效應所導致。第二常見者為 p.E888X (6.5% or 7/107)。但是之前報告中常見的 c.1411_1414del (p.E471fsX5)出現 2 次，c.1843G>A (p.G615R) (Ko, et al., 1999)出現一次，c.872T>C (p.L291P) 則出現兩次。值得注意的是，有很大比例的個案是找不到基因有致病性突變或是未知臨床意義的突變(31.4%，35/107)(表十)，其中有 33 人(33/107, 30.8%)為 [p.G576S + p.E689K]同型子。我們之前也觀察到，部分罹病的家長雖帶有相同的基因突變，但是酵素活性卻有很大的不同(圖 12, carriers)，甚至部分罹病家長，雖然為帶因者，其酵素活性與罹病者相似(圖 12A, B, carriers and patients)。顯示除了致病性突變外，應該有其他原因會導致 GAA 酵素表現的高低。

參. 6.3. 相同帶因者間具有不同酵素活性原因的分析

為了釐清這些帶有相同突變的帶因者，為何有不同酵素活性表現的原因，我們從歷史資料中，找出帶有相同突變的帶因者。先分析這些帶因者的蛋白質表現量及 RNA 量與酵素活性的關係(圖 13)，發現酵素活性愈低者，蛋白質表現量愈低($R^2=0.6599$)，而且其 mRNA 表現量也較少($R^2=0.4067$)。我們進一步分析其基因上不同多型性標記的狀況(表十二)，發現帶有特定 GAA 基因的多型性會影響酵素活性的表現。以 p.G576S 的影響效果最大，在同為 p.D645E 的帶因者身上，可以發現帶有 p.G576S 的帶因者平均酵素活性為 17.73，約為不具有 p.G576S 的帶因者平均酵素活性 32.92 的一半。

因此我們使用新生兒篩檢檢體，進一步分析具有 p.G576S 的人是否會有較低的酵素活性。結果顯示，在 325 個新生兒中，p.G576/p.G576 同型子的酵素活性平均為 16.96 ± 5.64 mmol/L/h ($n=243$)，p.G576/p.S576 異型子的酵素活性平均為 9.55 ± 3.86 mmol/L/h ($n=70$)，而 p.S576/p.S576 同型子的酵素活性平均為 5.84 ± 3.68 mmol/L/h ($n=12$)，明顯不同(表十三)。在這些檢體中，p.G576S 對偶基因頻率為 14.5%，有 12 個檢體為 p.G576S 同型子 (3.69%)，其 GAA 酵素活性為 1.43 到 11.86 mmol/L/h，為正常均值的 8.81 到 72.85%。

在新生兒篩檢檢出酵素活性偏低的 121 個檢體中，我們對其中接受全基因分析的 107 個檢體進行進一步分析，將檢體分成找到一個致病性突變的個案(48/107)，以及找不到致病性突變或是其他未知臨床意義突變的個案(35/107)。這些找不到突變的個案中有 33 人屬於 p.[G576S; E689K] 同型子突變。在 93 個正常對照組中，只有 2 人屬於 p.[G576S; E689K] 同型子突變(2.15%; $P < 0.000001$; χ^2 test)。比較找到一個致病性突變組與找不到突變組之間的酵素活性，發現這兩組的酵素活性相似(表十)，顯示 p.[G576S; E689K] 可能導致酵素活性表現低下。

為了解 p.G576S 與 p.D645E 乃至於其他的基因多型性標誌是否存

在有連鎖不平衡的情形，我們利用現有完整的 21 個家族，進行 trio 分析，結果顯示，p.199 與 p.223 標誌存在有最強的連鎖性，而 p.576，p.645，p.689 及 p.780 間的連鎖性不強(圖 14)。但是此結果由於個案數太少，解讀時須特別留意。

參. 6. 4. 台灣地區的個案帶有特殊的單倍型(Haplotype)

為了克服連鎖分析個案數太少的缺點，我們使用了 93 個正常對照組，以及 103 個經由新生兒篩檢檢出酵素活性偏低的新生兒，利用 10 個基因多型性標記，進行單倍型重組分析。結果顯示，台灣地區人民 GAA 的單倍體與西方高加索人相比，單倍體 3 號，8，9 及 11 號皆較多(表十四)，但是其中只有 2 人為 GAA*03 之同型子(homozygotes)。而在酵素活性偏低的這 103 個經由新生兒篩檢檢出的新生兒族群中，GAA*03 單倍體出現比例高達 81%，其中單倍體 3 號同型子出現的比例更達到 64%，此單倍體包括了 p.S576/p.K689，所謂 pseudodeficiency 基因型，以及 p.D645E，台灣地區最常見的突變點。至於其他的突變，如 p.S251L/p.S254L 則發生在單倍體 9 號上，p.E888X 在 GAA*09 上，p.W746C 及 c.546+5G>T 都在 GAA*03 上。

參. 6. 5. 新生兒篩檢檢出之晚發型龐貝氏症患者之基因突變分析

至於新生兒篩檢中，檢出酵素活性低下但是臨床上並未出現肌肉酵素升高或是心臟肥大的個案，我們懷疑這些個案是晚發型龐貝氏症患者。經由 GAA 全基因掃描，發現帶有已知的致病性突變包括常見的 p.D645E (2/22, 9%), p.G615R (1/22, 4.5%), p.E888X (2/22, 9%)等，共占 22.7%; 帶有一未知臨床意義的突變包括 p.W746C (2/22, 9%), p.S142LfsX29 (1/22, 4.5%) 及 c.546+5t>g (3/22, 13.6%)等共占 50%。總偵測率只有 82% (18/22)(表十五)。可能原因是以現行 GAA 全基因掃描的方式，不足以偵測如大片段缺

失，轉位，或是 RNA 接合(splicing)問題等，因此我們首先用定量 PCR 的方式，試圖偵測這些患者是否有些外顯子基因不等量的狀況，但是並未有發現。我們因此使用大片段反轉錄 PCR 的方式，試圖偵測患者是否具有不正常 RNA 的表現。

參.6.6. 嬰兒型龐貝氏症患者基因突變 $c.1194+2t>c$ 之分析

我們之前在嬰兒型龐貝氏症患者曾檢出一未曾被確認過的突變 $c.1194+2c>t$ (表七, No 5)。此突變預計位在 RNA 接合 donor site，應該會影響到 RNA 接合。之前此突變曾在義大利的晚發型患者出現過，但是並未有進一步的研究證實此變化會影響接合(Montalvo, et al., 2006)。為了瞭解此突變所造成的影響，我們從患者的皮膚纖維芽細胞的 RNA 中，的確找到不正常的 RNA (圖 15)，經由定序比對後發現，此不正常的 RNA 包括 exon6 尾端 4bp 缺失以及 exon7 缺失(圖 15)。此產物預期會造成 41 個胺基酸的缺失蛋白(p.V358_L398del 41)。另一研究(Wan, et al., 2008)使用此患者父親的血球萃取 RNA，發現此變化會造成 RNA 在 exon7 後無法切割，因此造成一含 intron7 的異常 RNA，預測蛋白質產生 p.L398fsX71 的變化。

參.6.7. 新生兒篩檢檢出之晚發型龐貝氏症患者 $c.546+5g>t$ 突變分析

我們在 NBSL7 患者的 RNA 中，找到不正常的 RNA(圖 16 A)，經由定序比對後發現，此不正常的 RNA 包括 3bp 添加在 exon2 與 exon3 之間，以及 exon2 缺失。比對基因定序結果發現， $c.546+5g>t$ 可能造成此不正常 RNA splicing 的結果，因此我們建立一質體，表現 $c.546+5g>t$ ，在體外轉錄表現(圖 16 B)。結果顯示，在 $c.546+5g$ 的質體(圖 16 C, lane 1 及 2)，可以產生正常的產物；但在 $c.546+5t$ 的質體(圖 16 C, lane 3)，則會產生不正常的 RNA。經由序列比對發現，在 $c.546+5t$ 的質體會產生 3 種 RNA，包括增添 184bp 及 3bp 的產物(圖 16 D)。因此確認 $c.546+5g>t$ 會造成不正常

RNA，產生結果包括 p.T182_I183 insV 以及一刪除 578bp 並且無 ATG 轉譯起始點的 RNA，導致 GAA 酵素活性缺乏，為一致病性突變(圖 16 E)。

參. 6. 8. 新生兒篩檢檢出之晚發型龐貝氏症患者 c.955+167 c>t 突變分析

另外，我們在 NBSL9 患者的血液細胞 RNA 中，找到不正常的 RNA(圖 17A)，經由定序比對後發現，此不正常的 RNA 主要為 exon6 缺失的產物(圖 17B)，另外也可見到 exon6-7 缺失的產物。總計在患者及其家屬的血球細胞中，共可以看到 3 種不正常的 RNA(圖 17C)。但是在患者的皮膚纖維芽細胞中，卻看不到這些不正常 RNA 的表現(圖 17 A)。由於 exon6 缺失會造成 40 個胺基酸缺失(圖 17 C, D)，導致 GAA 活性喪失(圖 17 E, D6)，因而此變化極可能是這些患者的致病性突變。我們將此家族基因突變與血液中 RNA 量的比較整理於下(表十六)。

經由比對基因定序結果發現，c.955+167 c>t 極有可能造成此不正常 RNA splicing 的結果。由於包括 exon6-8 之間的序列附近不易被 splicing factor 辨識，以質體於體外轉錄表現並無法重建此缺失，因此我們分析所有具有此突變的患者的 RNA，以建立此突變與不正常 RNA 產物的關聯性。

結果顯示，在龐貝氏症病人及其父母的族群，此突變的盛行率大約 70%；但在一般人的盛行率為 9~10%，其中有一位兩個同源基因都帶有此突變，但臨床上沒有出現症狀。詳細基因型及盛行率請見表(表十七)。所有具此基因變化的患者(圖 18A)皆有 delta E6 之不正常 RNA 表現(圖 18 B)，但是表現強度不一致(圖 19)。甚至在不具有此基因變化的患者，也可看到此不正常 RNA(0)。總結的結果如圖 22(圖 21)。推論此種 RNA 可能是因為 IVS5+167 c>t 突變會加大對 GAA pre-mRNA splicing 的影響(圖 22)，但是仍有其他 modifying factors 共同造成 splicing 異常的現象。因此在同一家族中，可以見到有不同的變化(圖 17 A)。

參.6.9. 新生兒篩檢檢出之晚發型龐貝氏症患者之基因突變與已知臨床個案相似

在我們回溯性研究中，本研究室共分析診斷了 13 位晚發型龐貝氏症患者，包括一對兄弟。其結果顯示(表十八)，突變總偵測率為 100%。在已知致病性突變中，p.D645E 突變仍為最常見，但只占了 29% (7/24)，其他已知致病性突變包括 c.1843G>A (p.G615R)，c.872T>C (p.L291P)，c.1375G>A (p.D459N)，c.1798 C>T (p.R600C)，及 c.2014C>T (p.R672W)各出現一次，共占 50%。其他未知意義的變異共出現 12 次，占 50%，但是其中 c.2238G>C (p.W746C)則出現 8 次，占 33%。甚至在患者 LOPD12，為 p.W746C 同型子，顯示 p.W746C 可以造成龐貝氏症。

總結而言，在疑似晚發型龐貝氏症患者的基因突變(表十五)，與臨床上台灣地區的晚發型個案(表十八)相似，主要以 p.D645E 及 p.W746C 突變為主，顯示這些新生兒篩檢異常的患者，的確需要定期追蹤以及早偵測病症的表現如肌肉無力，肌肉酵素升高的狀況，以及早治療避免肌肉細胞產生不可逆的傷害。



第肆章、 討論

肆.1. 酵素補充療法

針對嬰兒型龐貝氏症的酵素補充療法，在進行臨床階段時的成果顯著，在小於 6 個月前就開始治療的總人數為 18 名試驗者中，所有患者皆存活超過 1 歲，與未治療組有極大的差別(Kishnani, et al., 2007)。到試驗結束時，存活的 15 名患者中，有 3 人須使用呼吸器，5 人須使用管灌飲食，5 人運動功能沒有改善。此成果相較於另一個較晚治療的試驗有明顯差距，顯示愈早開始治療，治療效果愈好。本研究更大幅將治療時間由小於 6 個月提升至小於 1 個月，經篩檢檢出的嬰兒型龐貝氏症患者，即使只有 1 周大，即已顯示有心臟肥大，肌肉酵素(CK)升高的現象，若延遲治療至 2-4 個月大時，也可能無法挽救已受損的組織。本研究證實，若能於小於 1 個月就開始治療，治療成效可以更加改進，因此新生兒篩檢可以協助患者得到最佳的預後。

治療的成果，可能還受到其他因素影響，如 CRIM 狀態，或是是否已受感染刺激細胞 autophage 過程等。目前已知 CRIM 狀態因為對產生抗體有影響，所以若為 CRIM 陰性患者，則需要控制免疫反應，以免產生抑制性抗體而抵銷藥物治療效果(Sun, et al., 2007)。但是在台灣地區，由於患者多含有 p.D645E 突變，因此皆屬 CRIM 陽性患者，較不需擔心免疫反應的問題。

相較於之前的研究認為龐貝氏症患者的心智功能應屬正常發展，Kishnani 等人在 2007 年的報告發現若使用「貝萊氏嬰兒發展量表第二版」對 17 名龐貝氏症個案進行測試，其中有 4 人的智力發展指數顯示有嚴重遲緩。造成此一歧異結果的原因可能和「貝萊氏嬰兒發展量表」的特性有關，因為此量表在評估智力分量表時需要手部操作的動作，嬰兒型龐貝氏症個案可能因為上肢無力，而無法通過這部份的題目，另一個可能的原因則有可能來自於長久的肌肉無力、較差的呼吸功能以及聽覺受損，使得這些嬰幼兒較少有和外界互動、獲得刺激的機會，因而有遲緩的情形。本研究針對腦部影像學的研究發現患有嬰兒型龐貝氏症的嬰兒在腦部神經元的髓鞘

化程度比正常發展的嬰兒要慢(Chien, Lee et al., 2006)，因此可能有部份兒童在心智功能的發展上的確有較為遲緩的現象，但過去由於此類患者大多無法活過一年，因此無法長期追蹤其認知功能的發展。因此在未來的研究中，仍需對心智功能長期的發展進行追蹤。

肆.2. 大眾篩檢

本篩檢著眼於偵測嬰兒型龐貝氏症患者，以期及早給予治療，避免患者，家長及社會成本的負擔。由此研究發現，台灣地區的嬰兒型龐貝氏症患者發生率約為 1: 1 in 33 333 (95%信賴區間為 1:12 048 to 1:100 000)。一般而言，龐貝氏症的發生率依種族與地區不同而有不同，發生率約為 1 in 40 000 到 1 in 300 000(Hirschhorn and Reuser, 2001)。在荷蘭及紐約的發生率約為 1 in 40 000(Poorthuis, et al., 1999) (Martiniuk, et al., 1998)，而之前的臨床經驗顯示，在中國大陸南方和台灣地區發生率約為 1 in 50 000 (Lin, et al., 1987; Lin and Shieh, 1996)。因此，本研究所得到的嬰兒型龐貝氏症患者的發生率與文獻報告類似，可能是因為嬰兒型龐貝氏症的症狀如心臟肥大，肌肉無力等極具有特異性，因此臨床醫師容易辨識此病，本篩檢的意義在於提早診斷時間，以及早給予治療，不至於等到嬰兒型龐貝氏症的症狀如心臟肥大，肌肉無力等症狀出現後才被診斷，影響治療效果。

至於篩檢偽陽性的問題，由於可能造成家屬承受不必要的壓力，及引起親子關係的緊張，我們已著手研究此部分對台灣地區家長所造成的影響。龐貝氏症的再檢檢率在本研究中為 0.8%，此與其他篩檢相似(Kwon and Farrell, 2000)，如 cystic fibrosis 為 0.6%(Sontag, et al., 2005)，congenital adrenal hyperplasia 為 0.74%(Olgemoller, et al., 2003)。然而，我們在經過先趨篩檢後，已經了解確認患者數值分佈。目前我們可以合理的提高界限值，在不影響篩檢特異性的條件下，減少篩檢偽陽性的發生。在使用活性 $\leq 6.39\%$ 均值與 NAG/GAA 比值 ≥ 60 的條件下，不會有偽陰性的產生，而偽陽性率可以從 97%減少到 50%，檢驗敏感性可以從 3%大幅提高到 86.7%。這樣的篩檢效能，與一般新生兒篩檢項目相比，與 G6PD 缺乏症相似，而

較先天性甲狀腺低能症的檢驗為優。未來我們希望可以再改進檢驗方法，以避免不必需的檢驗。

本研究期間並未發現有偽陰性的嬰兒型龐貝氏症患者，因此龐貝氏症新生兒篩檢的偽陰性率為 0%。

但是由於本新生兒篩檢的方法檢驗的是酵素活性，因此有可能檢驗到晚發型龐貝氏症患者。根據之前流行病學的推估，在西方人，嬰兒型龐貝氏症比晚發型患者的比例約是 1:2(Kemper, et al., 2007)。但是在台灣地區，晚發型患者的發生率遠低於嬰兒型患者，此可能是因為台灣地區患者突變型式與西方人不同，或是因為晚發型患者尚未被廣泛診斷所致。雖然迄今，我們仍無法決定晚發型患者何時會發病，或是應該於何時開始給予他們治療，但是由之前的研究顯示，經由臨床診斷的晚發型患者，治療效果不佳。因此需要更早給予治療。目前，對於這些經由篩檢檢出的疑似晚發性患者，我們不但已經由突變分析確認他的罹病狀態，並且定期追蹤他們的運動功能及肌肉酵素等狀態，期能在最早時間偵測出肌肉受損的警訊，以及早給予治療。

肆.3. 突變型式

一般說來，用基因型可以大致預測表現型(Kroos, et al., 2004; Kroos, et al., 2007; Raben, et al., 2002b)。尤其在高加索人常見的 c.-45T>G 突變(Kroos, et al., 1995)，由於會造成 RNA 接合上的缺陷，形成無功能的 RNA，但正常與不正常的比例可能具有組織特異性(Raben, et al., 2002b)，因此大致說來，帶有此突變的患者表現較輕微，多屬於晚發型患者，但是若另一對偶基因為嚴重突變型，則發病年紀就有可能提前 (Kroos, et al., 2007; Kroos, et al., 1995)。在台灣地區，雖然 p.D645E 為常見的突變，但由本研究結果顯示，不論嬰兒型或晚發型患者，皆以 p.D645E 突變最常見，先前文獻也報告過，具有 p.D645E 突變可以有不同嚴重度的表現(Ko, et al., 1999; Lin and Shieh, 1996; Tsujino, et al., 2000)，甚至在非裔美人同樣具有 p.D645E 突變的患者，也可以見到以晚發型表現的症狀(Hermans, et al.,

1993)，因此具有 p.D645E 突變，不必然就可以預測其表現型。但在台灣地區，由於 p.D645E 突變位於 GAA*03 單倍體上，可以預測多數 p.D645E 皆與[p.S576, p.K689] pseudodeficiency 一起出現，因此在台灣族群的 p.D645E 為嚴重的突變。

另外在我們的研究中，有一部分的晚發型患者帶有 p.W746C 突變。此突變原認為是一已知的基因多型性標誌(Huie, et al., 1994)，但是後續研究指出，p.W746C 突變只能殘存約 12%的酵素活性(Huie, et al., 1998)，而且此突變並不常見(Wan, et al., 2008)，在我們的研究結果顯示，帶有 p.W746C 的 6 名晚發型患者，4 名帶有[p.G576S,p.E689K]Ho，1 名帶有 p.G576S He，因此 p.W746C 可能在 p.G576S 的影響下，造成患者較輕微的症狀，為一晚發型的突變(Wan, et al., 2008)。

我們的結果顯示，嬰兒型龐貝氏症患者，不論經由臨床症狀診斷，或是經由新生兒篩檢，皆以 p.D645E 突變占最大比例，而且突變偵測率可達 98%-100%。而在晚發型龐貝氏症患者，臨床診斷的個案仍以 p.D645E 突變最常見，但是比例較嬰兒型為低。而在新生兒篩檢檢出疑似晚發型龐貝氏症患者，p.D645 突變只占 9%，而且突變偵測率只達 82%，其中有 13.6% 屬於 splicing 缺陷，顯示新生兒篩檢檢出疑似晚發型龐貝氏症患者基因突變型式與臨床上晚發型患者不盡相同，可能是因為新生兒篩檢檢出疑陽性的個案，或是臨床上對於晚發型患者的辨識度不足，因此無法顯示晚發型患者基因突變的全貌。

肆.4. Pseudodeficiency

一般認為，嬰兒型龐貝氏症才會有心臟肥大的表現，而晚發型龐貝氏症則不會有心臟的問題。但曾有零星的個案報告，龐貝氏症的臨床表現可能與我們所熟知的不一樣。如有一個案於 14 歲死於心臟衰竭(Suzuki, et al., 1988)，其表現有 GAA 酵素活性缺乏，GAA 基因突變為 p.G576S (c.1726G>A)和 .E689K (c.2065G>A)同型子突變。然而 p.E689K 為一已知的基因多型性標誌 (Huie, et al., 1996; Shieh and Lin, 1998)，並不會造成 GAA

酵素活性表現的變化。這個男孩的肌肉細胞並未見到有肝醣儲積。由於此病患的皮膚纖維芽細胞仍有 11-15% 之殘存酵素活性，因此 p.G576S 突變被稱為“pseudodeficiency”突變 (Tajima, et al., 2007)。這種患者似乎在正常東方人即可見到，在歐洲的發生率約為 1%，但在亞洲人的發生率高達 20% (Kroos, et al., 2008)。已知具有 p.G576S 短暫轉殖的 COS-7 細胞可以表現約 20%-50% 的 GA 酵素活性，這可能是因為 glycine 變成 serine 後，影響蛋白質的穩定度 (Yue, et al., 2005; Yue and Moulton, 2006)，因而影響酵素活性。在我們的篩檢檢出低酵素活性的個案中，有 66 人為這種 p.[G576S; E689K] 同型子突變，其中 33 人找不到其他致病性的突變，顯示 p.G576S 會導致酵素活性低下，以至於這些即便沒有其他致病性突變但是為 p.[G576S; E689K] 同型子突變的個案，會造成新生兒篩檢偽陽性的發生。

雖然 p.G576S 與 p.E689K 不一定要同時出現，在 Kroos 2008 的報告中，發現有 16 名個案為 p.G576S He, p.E689K Ho，但是並未發現有 p.G576S Ho, p.E689K He 的個案 (Kroos, et al., 2008)，顯示 p.G576S 應該發生在已有 p.E689K 變化的單倍體上。既然 p.G576S 的發生率在亞洲可高達 20%，配合臨床經驗來看，p.G576S 本身為 pseudodeficiency 而非真正的致病性突變。但是 p.G576S 的存在，可能導致晚發型龐貝氏症患者酵素表現低下，而造成較嚴重的臨床表現。

肆.5. Splicing defect

在我們的研究顯示，新生兒篩檢疑似晚發型患者有 13.6% 為 splicing 缺陷的突變。從資料庫搜尋可知，目前已知 splicing 缺陷的突變約占總突變種類的 8%，著名的例子包括在高加索人常見的 c.-45T>G 突變 (Kroos, et al., 1995)。本研究新增 3 個關於 splicing 缺陷的突變，包括 c.546+5t>g，c.1194+2t>c 以及 c.955+167c>t。c.546+5t>g 目前只見於新生兒篩檢個案，此變化會造成 exon2 後方加上 3bp 才被裁切，或是 exon2 缺失的 RNA (圖 16)，此種 RNA 因為不含轉譯起始的 ATG，預期不會有蛋白質的產生。另一種產物預測會轉譯出 p.T182_I183insV 蛋白，可能仍有殘存酵素活性，因

此患者檢體仍可測到部分活性。至於 c.1194+2t>c，我們自患者皮膚纖維芽細胞分離出的 RNA 顯示此變化會造成 exon7 的缺失，因而產生 p.V358_L398del 41 蛋白質，先前的報告(Wan, et al., 2008)使用組織得出不同的產物，因而推論組織間應有不同的調控機制。

組織有不同 splicing 調控的機制亦顯示在 c.955+167 c>t。我們的結果顯示，血球細胞與皮膚纖維芽細胞產生的 splicing 產物不同。皮膚纖維芽細胞只表現正常產物。即使在無此點突變的患者，血球細胞亦可以見到稍許不正常產物。此現象同樣出現在其他 GAA splicing 突變。如 c.-45T>G 突變，在正常細胞亦可以見到少許不正常產物(Boerkoel, et al., 1995)，顯示此 c.-45T>G 突變產生的不正常產物可能是 alternative splicing 的產物之一。我們的研究已證實，因為 c.955+167 c>t 突變產生的不正常 RNA(delta E6) 只能製造出無功能的 GAA 蛋白質，但是關於皮膚細胞如何抑制無功能的蛋白質產生，以及血球細胞產生許多無功能蛋白質但仍能殘存有極高的酵素活性等疑問，則仍待進一步探討。

肆.6. Wrong diagnosis?

在我們的篩檢中，有數名新生兒之酵素活性缺乏，但基因檢查無法確認帶有已知致病突變。可能的原因包括這些患者肌肉組織中的 GAA 濃度可能與血球及纖維芽細胞不同，使用酵素檢驗的方法不夠準確，以及 GAA 有其他的同功酵素(isozyme)。

傳統酵素檢驗的方式是使用人工受質 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside(MU- α Glc)，此方法利用受質經酵素分解後可以放出螢光，因此可以測定酵素含量，但是 GAA 活性是否會因此偏差一直是探討的課題之一。理論上使用自然受質 glycogen 來測定 GAA 活性應較能符合生理狀態。之前的文獻曾探討這兩種受質的優劣(Okumiya, et al., 2006)。但在以前的方法使用 glycogen 自然受質時，需先分解 glycogen 後，再使用呈色方式定量被分解的肝糖，因此實驗結果較易受到呈色階段的干擾，而導致結果不一致。而且一西方人已知的基因變異 p.D91N，為

一 pseudodeficiency allele，帶有此變異的同型子不會有臨床症狀，而且使用 glycogen 作為受質時，此基因變異因為對 glycogen 的 K_M 較高(Martiniuk, et al., 1990; Swallow, et al., 1989)，因此會顯出 GAA 酵素缺乏的假象，使用螢光受質 MU- α Glc 則不會有這個問題(Okumiya, et al., 2006)。本實驗皆使用螢光受質，是否台灣族群的某些特有的基因變異對螢光受質與自然受質有不同的反應，導致我們在測定 GAA 酵素活性時呈現假性偏低的現象，值得進一步使用不同方式驗證。

GAA 的功能是在酸性環境(溶小體)下，用來切斷 α -1,4- 以及 α -1,6-glycosidic linkage。龐貝氏症患者因為缺乏此酵素，造成溶小體內的肝糖 glycogen 無法分解。其實以能量的觀點而言，溶小體內的肝糖儲積數量不多，因此 glycogen 儲積並不會造成缺乏 glucose (Hesselink, et al., 2003)，但是肌肉組織尤其是心臟及骨骼肌由於細胞質內的肝糖儲量偏高而特別易受此酵素缺乏影響，這是因為這些細胞質中的肝糖，容易被溶小體吞噬，因而缺乏 GAA 酵素時，就會造成大量肝糖儲積。然而在肝細胞中，雖然也同樣有大量肝糖儲積，但肝功能受損卻不嚴重。是否因為某些肌肉細胞特別需要這個酵素，因此缺乏 GAA 時造成局部(特定種類)的肌肉細胞受損，但對整體的功能並沒有太大的影響，目前並不清楚，仍須進一步研究。

在人體細胞中，至少還有 4 種同功的 human α -glucosidases (Hirschhorn and Reuser, 2001)。這些同功酵素是由不同基因所製造，適用於不同的酸鹼性以及不同的受質，其中 glucosidase II 及 neutral α -glucosidase C 是所有細胞皆表現，在中性環境下作用效能最好。Sucrase-isomaltase 則在小腸，maltase-glucoamylase 在小腸，腎臟及多核性白血球(PMN)中表現，但是沒有一種可以取代 GAA 在體內容小體的作用 (Hirschhorn and Reuser, 2001)。因此這些缺乏 GAA 的新生兒，應須定期檢視是否有肌肉症狀，病檢驗是否有不正常生化數值如 CK，LDH，AST，ALT 等(Winchester, et al., 2008)。

第五章、結論與展望

我們的研究證實，台灣地區嬰兒型龐貝氏症患者在接受酵素補充療法後，不易產生嚴重免疫反應影響治療效果，且治療後存活的患者腦部功能未明顯受損，因此在龐貝氏症新生兒篩檢施行後，由於可以早期治療，應可以大幅改善患者的預後。我們並證實新生兒篩檢檢出的嬰兒型龐貝氏症患者，其心臟肥大與肌肉內有肝醣儲積的現象，於出生後即已表現，這些個案的基因型與臨床個案類似，因此治療成果的改善，主要是因為篩檢帶來的益處所致。

我們研究證實，新生兒篩檢檢出的嬰兒型龐貝氏症患者個案，經由早期發現，早期治療，其存活率與未治療的個案相比有大幅進步，其不使用呼吸器的存活率較臨床個案治療成果相比，有大幅改善，這些患者的生長發育，在粗動作發展方面，與正常孩童類似。至於新生兒篩檢檢出的晚發型龐貝氏症患者，在發生率較臨床個案高，而且在基因型方面，兩者有些微不同之處，可能是因為新生兒篩檢過於敏感，或是臨床個案的發生率被低估所致。這些患者的罹病狀況尚待未來的研究進一步釐清。

本研究亦發現，台灣地區因為有 [p.G576S, p.E689K] pseudodeficiency 基因，導致部分個案酵素活性偏低但應不致於發病。因此未來對於新生兒篩檢，應針對此現象，制定較嚴格的標準，或是增加分析項目，以確保篩檢的正確性以及敏感性。但是，若患者同一條染色體上尚有其他會影響酵素活性的突變如 p.W746C，則患者仍可能因為同時帶有如 p.D645E 等已知突變及 p.W746C/p.G576S 而罹患晚發型龐貝氏症。此推論仍待進一步觀察與研究。

本研究另外指出，splicing 缺陷在龐貝氏症基因突變的角色極為重要。但是關於不同組織間基因調控的機制，以及血球細胞產生許多無功能蛋白質但仍能殘存極高的酵素活性等疑問，仍有賴進一步研究了解。

第陸章、論文英文簡述

Pompe disease is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by deficient acid α -glucosidase (GAA) activity, which results in progressive, debilitating, and often life-threatening symptoms, involving musculoskeletal, respiratory, and cardiac systems. In infantile-onset Pompe disease, enzyme replacement therapy can prolong survival and reverse cardiomegaly; however, some of patients cannot recover their motor and respiratory function. In late-onset Pompe disease, most of the symptoms cannot be reversed by treatment. In this study, we hypothesize that newborn screening for Pompe disease can offer an opportunity for early treatment of Pompe disease.

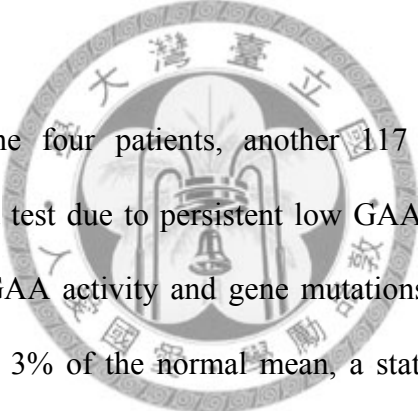
The primary manifestations of Pompe disease are muscle weakness and cardiomyopathy. Although accumulation of glycogen has also been seen in the nervous system in patients, the significance of brain involvement in infantile-onset Pompe disease is not clear. In the first part, we evaluated the brain development in five cases of infantile-onset Pompe disease, whose survivals have been prolonged by enzyme replacement therapy (ERT). Brain magnetic resonance imaging (MRI) and MR spectroscopy (MRS) studies revealed all patients having delay in myelination milestones at a median age of 6 months before the initiation of treatment. After ERT, four of the five cases showed good progression in myelination, left with only mild dilatation of the ventricles. In one case who had no response to ERT in the muscles, his brain myelination was slow and MRI and MRS studies both suggested neuron and myelination loss. Therefore, although myelination defects occur early in

infantile-onset Pompe disease, it does not prevent an effective treatment.

In the second part of the study, we tested the feasibility of screening newborns for Pompe disease using a fluorometric assay measuring GAA activity in dried blood spots (DBS). We conducted a large-scale newborn screening pilot program involving approximately 45% of newborns in Taiwan. The unscreened population was served as a control. Between October 2005 and March 2007, 132,538 newborns were screened; 1093 (0.82%) repeat DBS samples were requested; 121 babies (0.091%) were called for a confirmatory testing. Pompe disease was finally diagnosed in 4 babies. The prevalence of infantile-onset Pompe disease from the screening program was similar to data from the control group (three patients diagnosed). However, newborn screening resulted in an earlier diagnosis: less than 1 month of age in comparison to 3–6 months in the control group. At diagnosis, three of the four babies already had cardiomegaly and vacuolomyopathy, though clinically they were asymptomatic. This is the first large-scale study to prove the feasibility of newborn screening for Pompe disease.

Since diagnosis prior to the development of severe symptoms can be made by newborn screening, we then report the improvement in outcomes for the six patients screened from 206,088 newborns. ERT was immediately started for five of the six patients who had the rapidly progressive form of Pompe disease characterizing by both cardiac and motor involvements; treatment for the other one patient started at 14 months of age because of slow progressive muscle weakness. Results of the the treatment were then compared to those patients diagnosed clinically or the untreated historical controls. At the time of

this report, patients have been treated for 14 to 32 months. The five infants who had early cardiac involvement demonstrated normalization of cardiac size and muscle pathology with normal physical growth and age-appropriate gains in motor development. The infant without cardiac involvement also achieved normal motor development with treatment. Survival in the screened patients was significantly improved as compared to the untreated reference cohort ($P=0.001$). Survival in the treated clinical comparators was reduced but was not statistically different from the newborn screening group ($P=0.48$). Results from this study indicate that early treatment can benefit infants with Pompe disease and highlight the advantages of early diagnosis, which can be achieved by newborn screening.



Besides the four patients, another 117 babies were asked for a confirmatory blood test due to persistent low GAA activity. We analyzed 107 of them for both GAA activity and gene mutations. Nine of them have GAA activity lower than 3% of the normal mean, a status of GAA deficiency, but only 7 bearing 2 mutated alleles. Four of them had infantile-onset Pompe disease, and have been treated for cardiomegaly (in 3) or hypotonia (in 1). Another three of them were suspected to have late-onset pompe disease because they remained asymptomatic. Sixty-eight of the 103 newborns (66.0%) had a known deleterious mutation (44/103) or a sequence variant of unknown significance (31/103) and seven had both. One reported mutation, p.D645E, was the most common mutation Thirty-three (33/103 or 31.4%) of the 35 newborns without detectable mutation were homozygous for the [p.G576S + p.E689K] pseudodeficient allele. We also identified 16 novel variants and 6 distinct haplotypes, one of which has never been described in this population.

These results increase our knowledge of Pompe disease and demonstrate the benefits of newborn screening programs.

We further expand the mutation detection in all clinical IOPD and LOPD patients, and babies suspecting an LOPD phenotype. The common mutation, p.D645E, is the most common mutation in all groups, although the prevalence is higher in clinical IOPD patients, but its prevalence is lower in clinical LOPD patients, and is lowest in babies suspecting an LOPD phenotype. Babies suspecting an LOPD phenotype have a higher incidence of mutation alleles with unknown significance. Through the screening, we found many gene variations in our population, some of them cause “pseudodeficiency” of acid alpha glucosidase activity, and we cannot exclude that those variations can modify the clinical manifestations of the disease.

Results from this study highlight the benefits of early diagnosis, which can only be achieved by newborn screening. The intense gene variation in the population may confuse the diagnosis. The incidence of late-onset Pompe disease needs to be proved, but clinical underdiagnosis of Pompe disease is certainly possible.

第七章、参考文献

2006. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. *Genet Med* 8 Suppl 1:1S-252S.
- Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, Mackey J, Kishnani P, Smith W, McVie-Wylie A and others. 2001. Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 3(2):132-8.
- Araoz C, Sun CN, Shenefelt R, White HJ. 1974. Glycogenosis type II (Pompe's disease): ultrastructure of peripheral nerves. *Neurology* 24(8):739-42.
- Barkovich AJ, Kjos BO. 1988. Normal postnatal development of the corpus callosum as demonstrated by MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 9(3):487-91.
- Barkovich AJ, Kjos BO, Jackson DE, Jr., Norman D. 1988. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology* 166(1 Pt 1):173-80.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263-5.
- Bashan N, Potashnik R, Barash V, Gutman A, Moses SW. 1988. Glycogen storage disease type II in Israel. *Isr J Med Sci* 24(4-5):224-7.
- Bembi B, Ciana G, Martini C, Benettoni A, Gombacci A, Deganuto M, Pittis MG. 2003. Efficacy of multidisciplinary approach in the treatment of two cases of nonclassical infantile glycogenosis type II. *J Inherit Metab Dis* 26(7):675-81.
- Bijvoet AG, Van Hirtum H, Kroos MA, Van de Kamp EH, Schoneveld O, Visser P, Brakenhoff JP, Weggeman M, van Corven EJ, Van der Ploeg AT and others. 1999. Human acid alpha-glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II. *Hum Mol Genet* 8(12):2145-53.
- Boerkoel CF, Exelbert R, Nicastrì C, Nichols RC, Miller FW, Plotz PH, Raben N. 1995. Leaky splicing mutation in the acid maltase gene is associated with delayed onset of glycogenosis type II. *Am J Hum Genet* 56(4):887-97.
- Case LE, Koeberl DD, Young SP, Bali D, DeArmev SM, Mackey J, Kishnani PS. 2008. Improvement with ongoing Enzyme Replacement Therapy in advanced late-onset Pompe disease: a case study. *Mol Genet Metab* 95(4):233-5.

- Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. 2004. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 347(1-2):97-102.
- de Barys T, Jacquemin P, Van Hoof F, Hers HG. 1973. Enzyme replacement in Pompe disease: an attempt with purified human acid alpha-glucosidase. *Birth Defects Orig Artic Ser* 9(2):184-90.
- Guthrie R. 1992. The origin of newborn screening. *Screening* 1:5-15.
- Hermans MM, de Graaff E, Kroos MA, Wisselaar HA, Willemsen R, Oostra BA, Reuser AJ. 1993. The conservative substitution Asp-645-->Glu in lysosomal alpha-glucosidase affects transport and phosphorylation of the enzyme in an adult patient with glycogen-storage disease type II. *Biochem J* 289 (Pt 3):687-93.
- Hermans MM, Kroos MA, van Beeumen J, Oostra BA, Reuser AJ. 1991. Human lysosomal alpha-glucosidase. Characterization of the catalytic site. *J Biol Chem* 266(21):13507-12.
- Hermans MM, van Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Van Der Ploeg AT, Sakuraba H, Wevers R, Kleijer W, Michelakakis H, Kirk EP and others. 2004. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum Mutat* 23(1):47-56.
- Hesselink RP, Wagenmakers AJ, Drost MR, Van der Vusse GJ. 2003. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. *Biochim Biophys Acta* 1637(2):164-70.
- Hirschhorn R. 2001. Glycogen storage disease type II:acid-glucosidase (acid maltase) deficiency. New York McGraw-Hill.
- Hirschhorn RRA, Reuser AJ. 2001. Glycogen storage disease type II:acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. New York McGraw-Hill. p 3389-3420.
- Huie ML, Chen AS, Brooks SS, Grix A, Hirschhorn R. 1994. A de novo 13 nt deletion, a newly identified C647W missense mutation and a deletion of exon 18 in infantile onset glycogen storage disease type II (GSDII). *Hum Mol Genet*

3(7):1081-7.

- Huie ML, Menaker M, McAlpine PJ, Hirschhorn R. 1996. Identification of an E689K substitution as the molecular basis of the human acid alpha-glucosidase type 4 allozyme (GAA*4). *Ann Hum Genet* 60(Pt 5):365-8.
- Huie ML, Tsujino S, Sklower Brooks S, Engel A, Elias E, Bonthron DT, Bessley C, Shanske S, DiMauro S, Goto YI and others. 1998. Glycogen storage disease type II: identification of four novel missense mutations (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid alpha-glucosidase locus of patients of differing phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 244(3):921-7.
- Kallwass H, Carr C, Gerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, Dai J, Kishnani P, Skrinar A, Corzo D and others. 2007. Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of alpha-glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Metab* 90(4):449-52.
- Kemper AR, Hwu WL, Lloyd-Puryear M, Kishnani PS. 2007. Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations. *Pediatrics* 120(5):e1327-34.
- Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, Leslie N, Levine J, Spencer C, McDonald M and others. 2007. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 68(2):99-109.
- Kishnani PS, Howell RR. 2004. Pompe disease in infants and children. *J Pediatr* 144(5 Suppl):S35-43.
- Kishnani PS, Hwu WL, Mandel H, Nicolino M, Yong F, Corzo D. 2006a. A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr* 148(5):671-676.
- Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, Rogers RC, Tsai AC, Waterson J, Herman GE, Amalfitano A, Thurberg BL, Richards S and others. 2006b. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr* 149(1):89-97.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, Crowley JF, Downs S, Howell RR, Kravitz RM and others. 2006c. Pompe disease diagnosis and

management guideline. *Genet Med* 8(5):267-88.

Klinge L, Straub V, Neudorf U, Schaper J, Bosbach T, Gorlinger K, Wallot M, Richards S, Voit T. 2005a. Safety and efficacy of recombinant acid alpha-glucosidase (rhGAA) in patients with classical infantile Pompe disease: results of a phase II clinical trial. *Neuromuscul Disord* 15(1):24-31.

Klinge L, Straub V, Neudorf U, Voit T. 2005b. Enzyme replacement therapy in classical infantile pompe disease: results of a ten-month follow-up study. *Neuropediatrics* 36(1):6-11.

Ko TM, Hwu WL, Lin YW, Tseng LH, Hwa HL, Wang TR, Chuang SM. 1999. Molecular genetic study of Pompe disease in Chinese patients in Taiwan. *Hum Mutat* 13(5):380-4.

Kroos MA, Kirschner J, Gellerich FN, Hermans MM, Van Der Ploeg AT, Reuser AJ, Korinthenberg R. 2004. A case of childhood Pompe disease demonstrating phenotypic variability of p.Asp645Asn. *Neuromuscul Disord* 14(6):371-4.

Kroos MA, Mullaart RA, Van Vliet L, Pomponio RJ, Amartino H, Kolodny EH, Pastores GM, Wevers RA, Van der Ploeg AT, Halley DJ and others. 2008. p.[G576S; E689K]: pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease? *Eur J Hum Genet*.

Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JL, Phipps M, DeRiso M, Palmer RE, Ausems MG, Van der Beek NA, Van Diggelen OP and others. 2007. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology* 68(2):110-5.

Kroos MA, Van der Kraan M, Van Diggelen OP, Kleijer WJ, Reuser AJ, Van den Boogaard MJ, Ausems MG, Ploos van Amstel HK, Poenaru L, Nicolino M and others. 1995. Glycogen storage disease type II: frequency of three common mutant alleles and their associated clinical phenotypes studied in 121 patients. *J Med Genet* 32(10):836-7.

Kwon C, Farrell PM. 2000. The magnitude and challenge of false-positive newborn screening test results. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154(7):714-8.

Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. 2004. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 50(10):1785-96.

- Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. 1987. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of alpha-glucosidase activity. *J Inherit Metab Dis* 10(1):11-7.
- Lin CY, Shieh JJ. 1996. Molecular study on the infantile form of Pompe disease in Chinese in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* 37(2):115-21.
- Martiniuk F, Bodkin M, Tzall S, Hirschhorn R. 1990. Identification of the base-pair substitution responsible for a human acid alpha glucosidase allele with lower "affinity" for glycogen (GAA 2) and transient gene expression in deficient cells. *Am J Hum Genet* 47(3):440-5.
- Martiniuk F, Chen A, Mack A, Arvanitopoulos E, Chen Y, Rom WN, Codd WJ, Hanna B, Alcabes P, Raben N and others. 1998. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am J Med Genet* 79(1):69-72.
- Merk T, Wibmer T, Schumann C, Kruger S. 2009. Glycogen storage disease type II (Pompe disease)--influence of enzyme replacement therapy in adults. *Eur J Neurol* 16(2):274-7.
- Montalvo AL, Bembi B, Donnarumma M, Filocamo M, Parenti G, Rossi M, Merlini L, Buratti E, De Filippi P, Dardis A and others. 2006. Mutation profile of the GAA gene in 40 Italian patients with late onset glycogen storage disease type II. *Hum Mutat* 27(10):999-1006.
- Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, Leslie N, Mandel H, Freyer DR, Arnold GL, Pivnick EK, Ottinger CJ, Robinson PH and others. 2009. Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. *Genet Med* 11(3):210-9.
- Okumiya T, Keulemans JL, Kroos MA, Van der Beek NM, Boer MA, Takeuchi H, Van Diggelen OP, Reuser AJ. 2006. A new diagnostic assay for glycogen storage disease type II in mixed leukocytes. *Mol Genet Metab* 88(1):22-8.
- Olgemoller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. 2003. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 88(12):5790-4.

- Ponce E, Witte DP, Hirschhorn R, Huie ML, Grabowski GA. 1999. Murine acid alpha-glucosidase: cell-specific mRNA differential expression during development and maturation. *Am J Pathol* 154(4):1089-96.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. 1999. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105(1-2):151-6.
- Raben N, Jatkar T, Lee A, Lu N, Dwivedi S, Nagaraju K, Plotz PH. 2002a. Glycogen stored in skeletal but not in cardiac muscle in acid alpha-glucosidase mutant (Pompe) mice is highly resistant to transgene-encoded human enzyme. *Mol Ther* 6(5):601-8.
- Raben N, Plotz P, Byrne BJ. 2002b. Acid alpha-glucosidase deficiency (glycogenosis type II, Pompe disease). *Curr Mol Med* 2(2):145-66.
- Shieh JJ, Lin CY. 1998. Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 11(4):306-12.
- Shin YS, Endres W, Unterreithmeier J, Rieth M, Schaub J. 1985. Diagnosis of Pompe's disease using leukocyte preparations. Kinetic and immunological studies of 1,4-alpha-glucosidase in human fetal and adult tissues and cultured cells. *Clin Chim Acta* 148(1):9-19.
- Slonim AE, Bulone L, Ritz S, Goldberg T, Chen A, Martiniuk F. 2000. Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *J Pediatr* 137(2):283-5.
- Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso FJ. 2005. Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 147(3 Suppl):S83-8.
- Sun B, Bird A, Young SP, Kishnani PS, Chen YT, Koeberl DD. 2007. Enhanced response to enzyme replacement therapy in Pompe disease after the induction of immune tolerance. *Am J Hum Genet* 81(5):1042-9.
- Suzuki Y, Tsuji A, Omura K, Nakamura G, Awa S, Kroos M, Reuser AJ. 1988. Km mutant of acid alpha-glucosidase in a case of cardiomyopathy without signs of skeletal muscle involvement. *Clin Genet* 33(5):376-85.
- Swallow DM, Kroos M, Van der Ploeg AT, Griffiths B, Islam I, Marenah CB, Reuser AJ. 1989. An investigation of the properties and possible clinical significance of

the lysosomal alpha-glucosidase GAA*2 allele. *Ann Hum Genet* 53(Pt 2):177-84.

Tajima Y, Matsuzawa F, Aikawa S, Okumiya T, Yoshimizu M, Tsukimura T, Ikekita M, Tsujino S, Tsuji A, Edmunds T and others. 2007. Structural and biochemical studies on Pompe disease and a "pseudodeficiency of acid alpha-glucosidase". *J Hum Genet* 52(11):898-906.

Taniguchi N, Kato E, Yoshida H, Iwaki S, Ohki T, Koizumi S. 1978. alpha-glucosidase activity in human leucocytes: choice of lymphocytes for the diagnosis of Pompe's disease and the carrier state. *Clin Chim Acta* 89(2):293-9.

Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, Kishnani PS, O'Callaghan M. 2006. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. *Lab Invest* 86(12):1208-20.

Tsujino S, Huie M, Kanazawa N, Sugie H, Goto Y, Kawai M, Nonaka I, Hirschhorn R, Sakuragawa N. 2000. Frequent mutations in Japanese patients with acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord* 10(8):599-603.

van Capelle CI, Winkel LP, Hagemans ML, Shapira SK, Arts WF, van Doorn PA, Hop WC, Reuser AJ, van der Ploeg AT. 2008. Eight years experience with enzyme replacement therapy in two children and one adult with Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 18(6):447-52.

van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JA, Smit GP, Poll-The BT, Bakker HD, Loonen MC, de Klerk JB, Reuser AJ and others. 2003. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics* 112(2):332-40.

Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Loonen MC, Vulto AG, Cromme-Dijkhuis A, Weisglas-Kuperus N, Hop W and others. 2004. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* 113(5):e448-57.

van der Beek NA, Hagemans ML, van der Ploeg AT, Reuser AJ, van Doorn PA. 2006. Pompe disease (glycogen storage disease type II): clinical features and enzyme replacement therapy. *Acta Neurol Belg* 106(2):82-6.

Wan L, Lee CC, Hsu CM, Hwu WL, Yang CC, Tsai CH, Tsai FJ. 2008. Identification

of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II. *J Neurol* 255(6):831-8.

Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, Cupler E, Deschauer M, Fumic K, Jackson M and others. 2008. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab* 93(3):275-81.

Winkel LP, Van den Hout JM, Kamphoven JH, Disseldorp JA, Remmerswaal M, Arts WF, Loonen MC, Vulto AG, Van Doorn PA, De Jong G and others. 2004. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann Neurol* 55(4):495-502.

Wisselaar HA, Kroos MA, Hermans MM, van Beeumen J, Reuser AJ. 1993. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J Biol Chem* 268(3):2223-31.

Yang HW, Kikuchi T, Hagiwara Y, Mizutani M, Chen YT, Van Hove JL. 1998. Recombinant human acid alpha-glucosidase corrects acid alpha-glucosidase-deficient human fibroblasts, quail fibroblasts, and quail myoblasts. *Pediatr Res* 43(3):374-80.

Yue P, Li Z, Moulton J. 2005. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol* 353(2):459-73.

Yue P, Moulton J. 2006. Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J Mol Biol* 356(5):1263-74.

Zhang H, Kallwass H, Young SP, Carr C, Dai J, Kishnani PS, Millington DS, Keutzer J, Chen YT, Bali D. 2006. Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet Med* 8(5):302-6.

第捌章、圖表

圖1. 篩檢流程

本方法使用二階段篩檢法。當第一張乾燥血片中的 GAA 數值低於正常，則啟動“retest”，同時檢驗 GAA 及 NAG，以判定是否需要複檢 (recall)，或是需要確認(confirm)。如果複檢(使用第二張血片)之 GAA 及 NAG 低於標準值，則進入確認(confirm)，檢驗包括淋巴球細胞的 GAA 活性，生化檢驗，胸部 X 光及心電圖等。

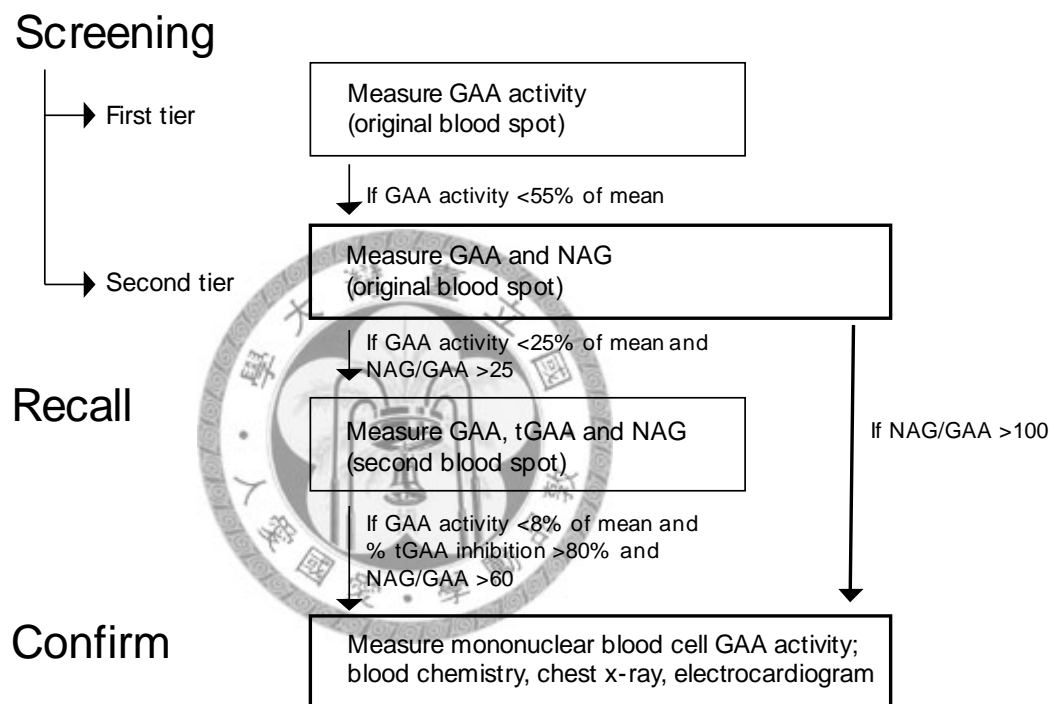


圖2. 本研究使用的 RT-PCR 引子與 GAA 基因關係示意圖

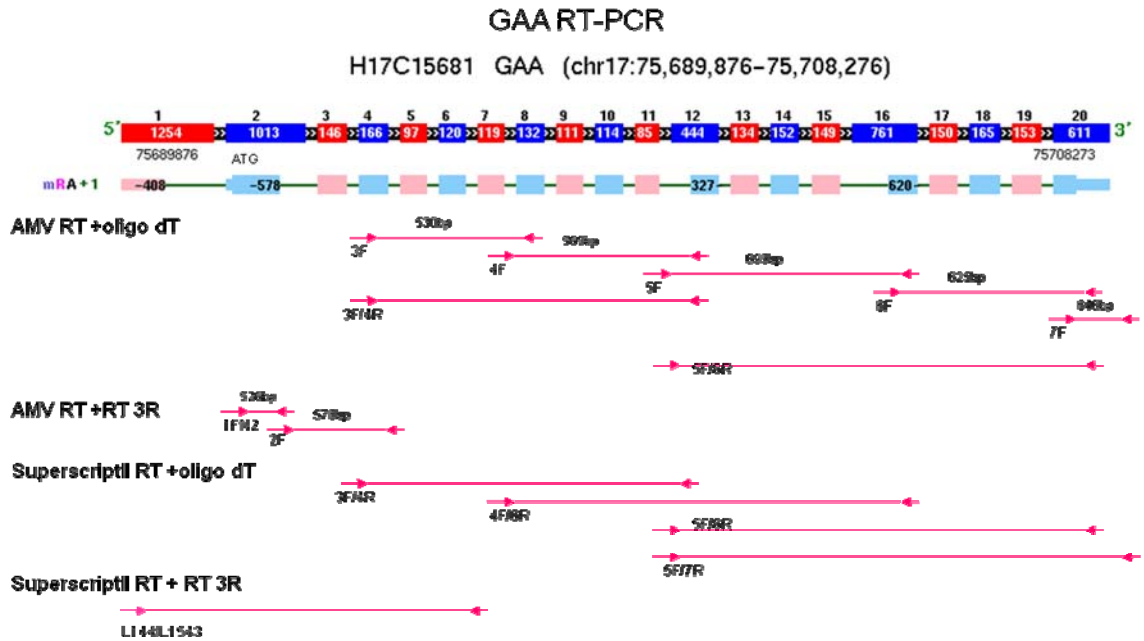
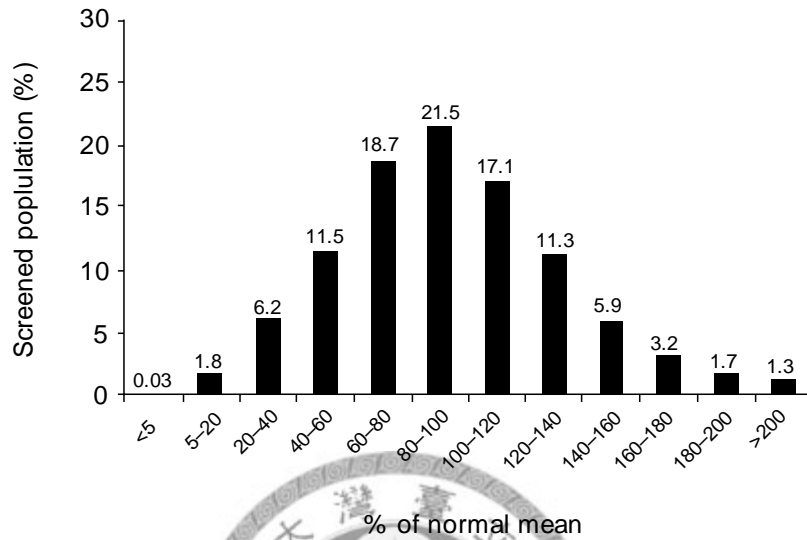


圖3. 新生兒的 GAA 活性數值分布呈現常態分布

(A) 我們首先檢驗 5000 名新生兒乾燥血片的 GAA 活性數值，以了解此數值在族群中分布的狀況



(B) 一般新生兒篩檢的檢體(screened population)其 GAA 數值仍呈常態分布，多數(84.4%)新生兒酵素活性分布於正常平均值活性的 55%~200%。

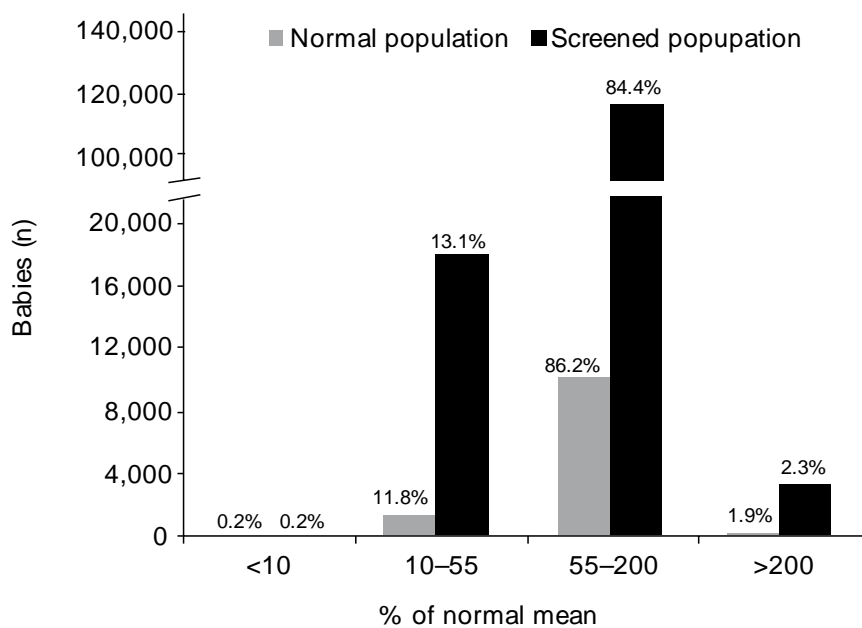


圖4. 篩檢成果

自 2005 年 10 月至 2007 年 3 月 (18 個月)，本中心共檢驗 132,538 名新生兒，其中 1101(0.83%)名新生兒因第一次檢驗結果有異常，而被要求做第二次檢驗或作確認檢查。現在因為經驗增加，因此只有約 0.2~0.3%的新生兒，會因為第一次檢驗結果有異常，而被要求做第二次檢驗或作確認檢查。

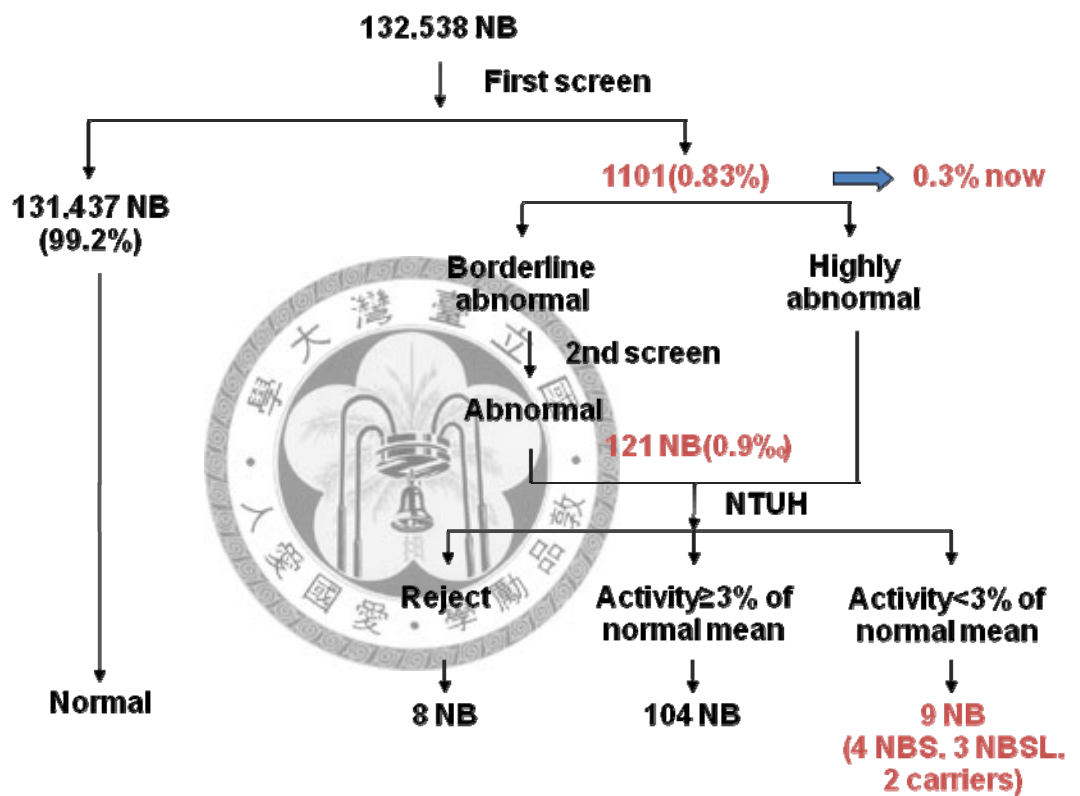


圖5. 新生兒時期患者的胸部 X 光及肌肉切片

(A)患者胸部 X 郭顯示已有心臟肥大的現象



(B)患者之大腿肌肉切片，在 H&E 染色下可見已有大量肝醣儲積造成空泡狀肌肉病變(vacuolar myopathy)

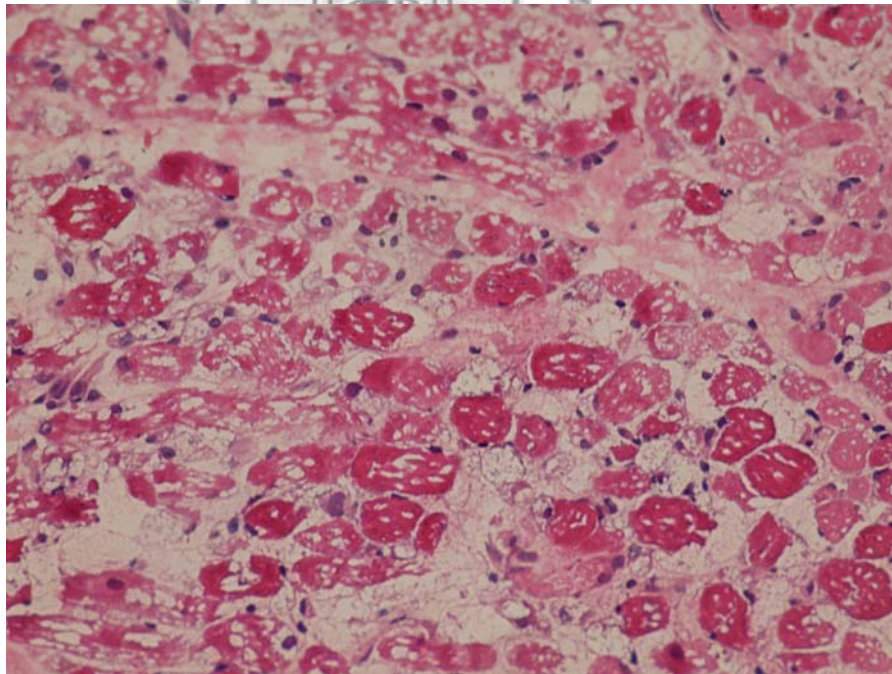
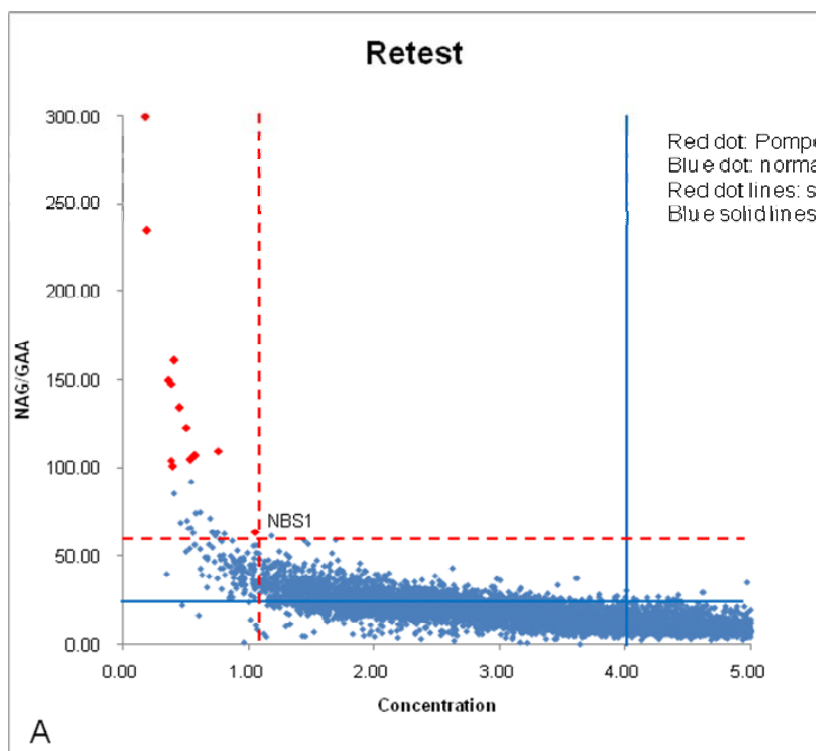
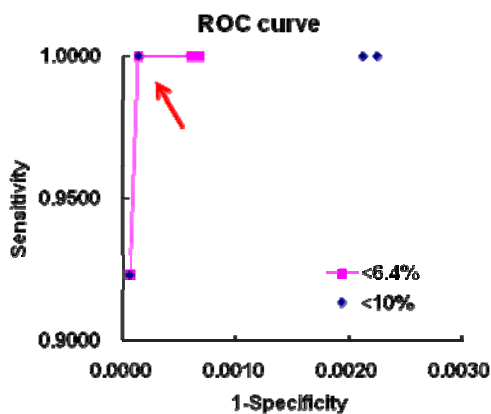


圖6. 新生兒篩檢陽性個案與陰性個案的數值分布圖

(A) 使用 2-tier 篩檢(橫軸: GAA 濃度與縱軸: NAG/GAA 比值), 可以增加篩檢的鑑別度。現行初檢界限值是以橫軸 GAA 濃度小於 4 以及縱軸 NAG/GAA 比值超過 25 即為異常, 但因為確認為龐貝氏症患者的比值皆大於 60, 因此我們可以合理的將此界限值提高到 60, GAA 濃度小於 1.02 (正常均值的 6.39%) 以減少偽陽性的發生。(B) ROC 曲線分析 (C) 不同的篩檢界限值對敏感度及特異性的影響



A



B

Criteria	% of Screened Positive	False-Positive	FP rate (%)
$\le 10\%$	0.22	577	97.47
$\le 6.39\%$	0.05	115	88.46
$\le 6.39\% + \text{Ratio} \ge 30$	0.06	136	90.07
$\le 6.39\% + \text{Ratio} \ge 60$	0.01	15	50.00
$\le 6.39\% + \text{Ratio} \ge 100$	0.01	0	0.00 * Miss 1
Total screen number		206426	

C

圖7. 台灣地區嬰兒型龐貝氏症患者治療後之體內抗體濃度

患者在接受酵素補充療法前，及治療後皆會定期抽血檢驗其血中抗體濃度。橫軸代表接受治療的時間，縱軸為抗體效價(以對數座標表現)，紅色線條及虛線代表因有臨床症狀而被診斷的個案，藍色線條代表新生兒篩檢的個案。其抗體濃度在兩組之間並無差別，不因臨床症狀而被診斷的個案較晚開始治療而導致抗體濃度較高的表現。

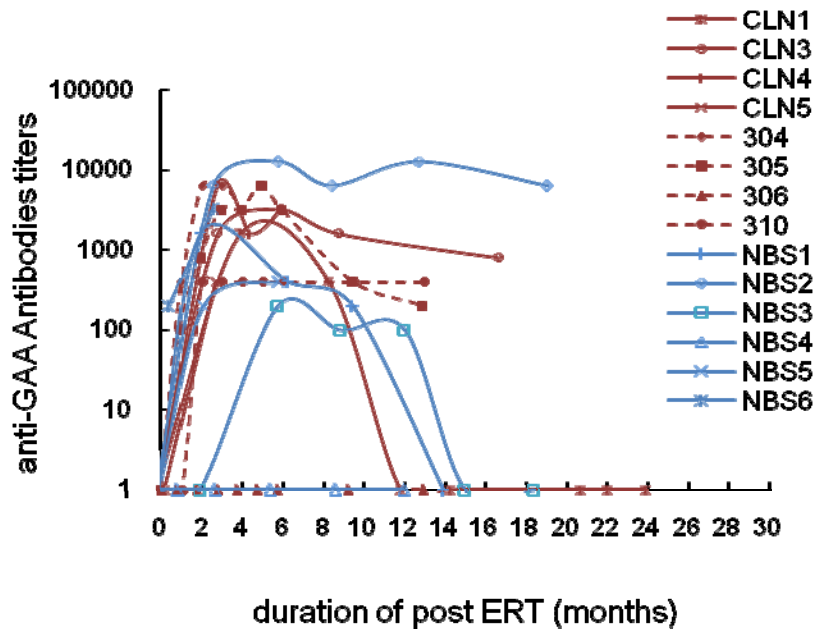
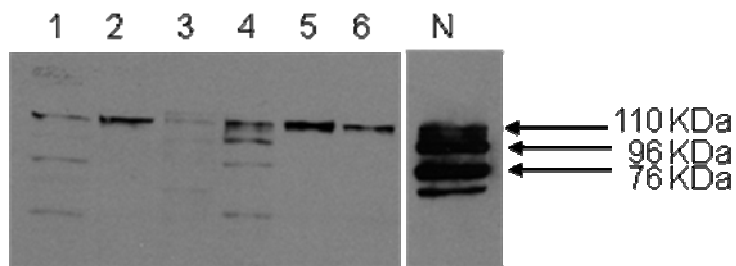


圖8. 西方墨點法顯示所有患者體內尚有殘存蛋白

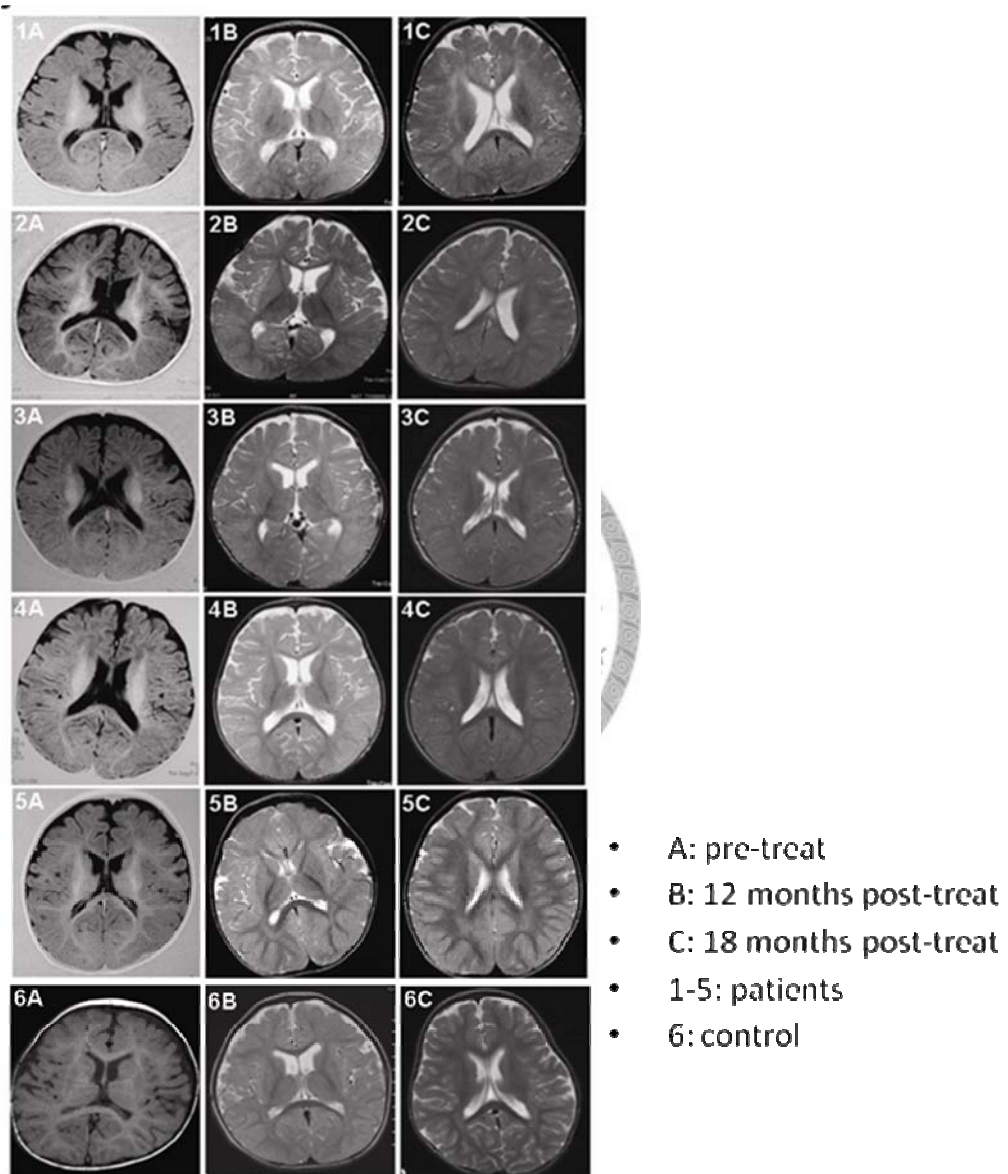
正常 GAA 蛋白質有三個主要的型式，分別為 110kDa、95 kDa 及 76kDa。其中 110kDa 為 GAA 蛋白質的前驅物，95 kDa 為 GAA 蛋白質的中間產物，而 76kDa 為經過修飾的成熟的 GAA 蛋白質。患者 1-6 分別為新生兒篩檢檢出患者 1-6 號，可見其體內皆有少數殘餘蛋白質，主要為 110kDa 的型式，為 CRIM 陽性個案。



1. NBS1, fibroblast
2. NBS2, fibroblast
3. NBS3, mononuclear cell
4. NBS4, fibroblast
5. NBS5, fibroblast
6. NBS6, fibroblast
7. Normal control, fibroblast

圖9. 嬰兒型龐貝氏症患者治療後之腦部發展

腦部核磁共振顯示患者在接受治療前，皆有延遲髓鞘化 (myelination) 的現象(panel A)，在治療效果不佳的患者髓鞘化改善情況有限 (1B, 1C)，而且也出現輕微腦部結構異常如側腦室擴大及白質病變等現象。但是多數患者在治療後髓鞘化程度皆有改善(panel B and panel C)。



新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者治療後的心臟變化

5 名罹患典型嬰兒型龐貝氏症患者在治療前皆有心臟肥大的現象，LVMI 左心室質量比(left ventricular index) 皆超過正常 (正常值(灰色棒) $47.4 \pm 6.2 \text{ g/m}^2$)。治療後約 4-6 個月即有顯著減少，但仍較正常心臟為大。

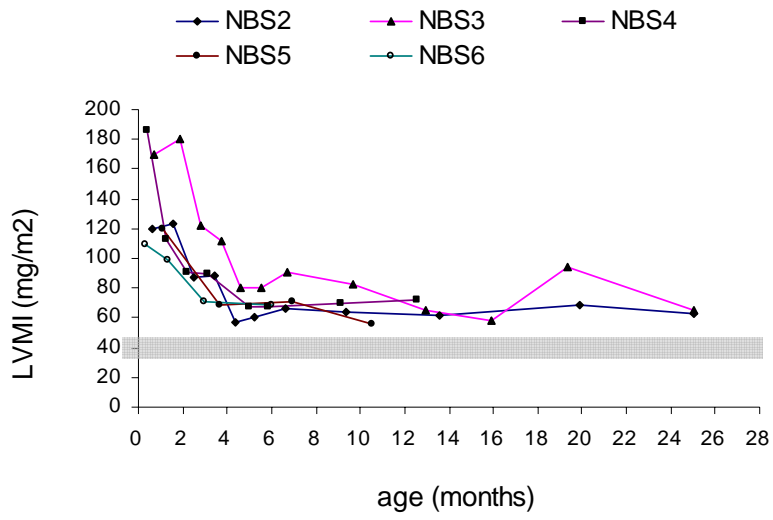
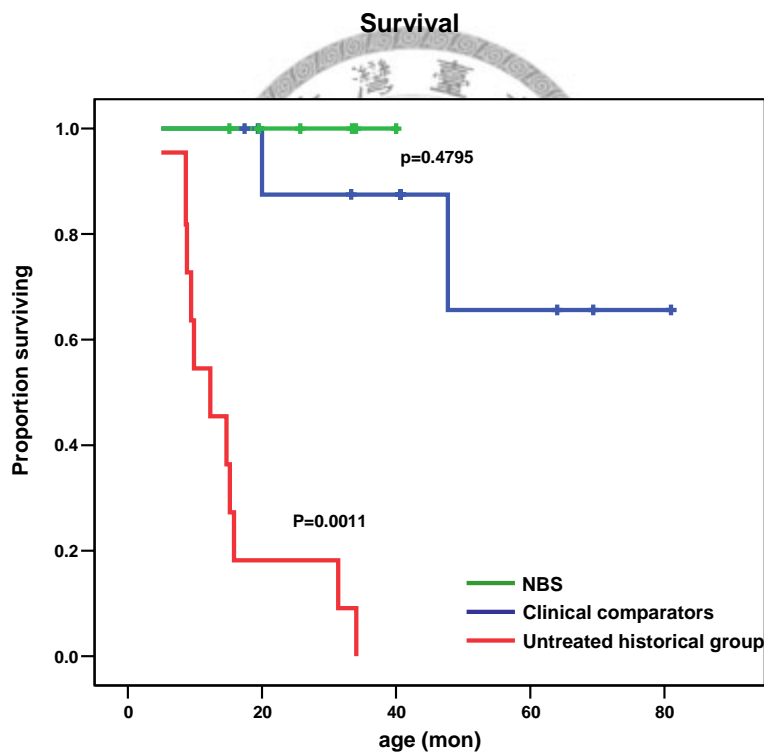


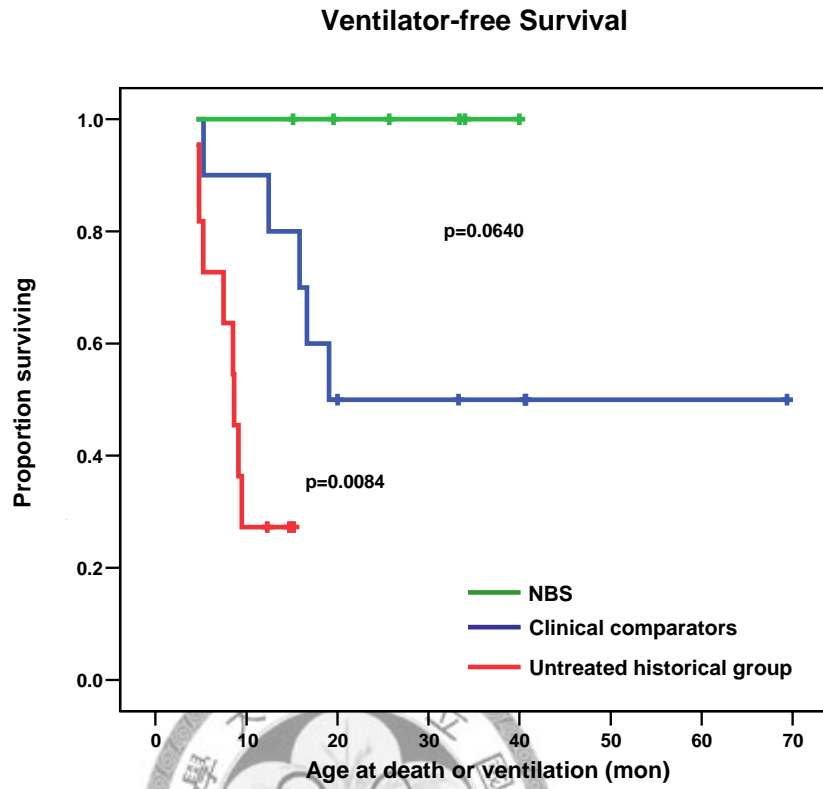
圖11. 比較不同治療對患者存活及運動功能的影響

綠線代表的是因篩檢而早期治療的個案(NBS)，藍線代表因臨床症狀表現而被診斷的個案(clinical cases)，紅線代表未經治療的個案(untreated cases)。(A)以 Kaplan-Meier 存活曲線分析死亡年紀在不同組間的差別。NBS 組與未治療組相比有明顯進步($P=0.007$)。(B) 以 Kaplan-Meier 存活曲線分析不使用呼吸器的存活年紀，顯示 NBS 組與未治療組相比有明顯進步($P=0.0104$)。(C) 以 Kaplan-Meier one-minus-存活曲線分析事件發生時間(走路的时间)，顯示 NBS 組與臨床個案組及未治療組相比皆有明顯進步($P=0.006$ and $P=0.009$)。

(A)



(B)



(C)

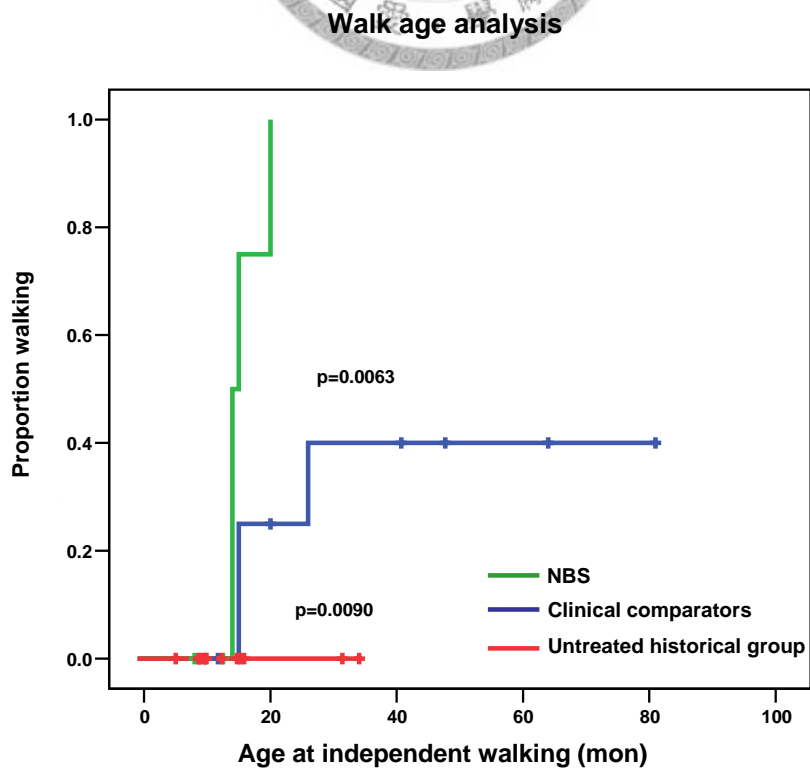


圖12. GAA 活性部分缺乏及患者之酵素活性分析

在(A)血液單核球細胞，(B)皮膚纖維芽細胞中的 GAA 酵素活性分析，顯示患者的活性偏低，但是帶因者(carriers)的活性則有很大的差異性，可以從正常的酵素活性到接近患者的活性缺乏。至於晚發型(juvenile)與嬰兒型(infantile)患者，則可由皮膚纖維芽(B)細胞中的 GAA 酵素活性作區分。

GAA activity

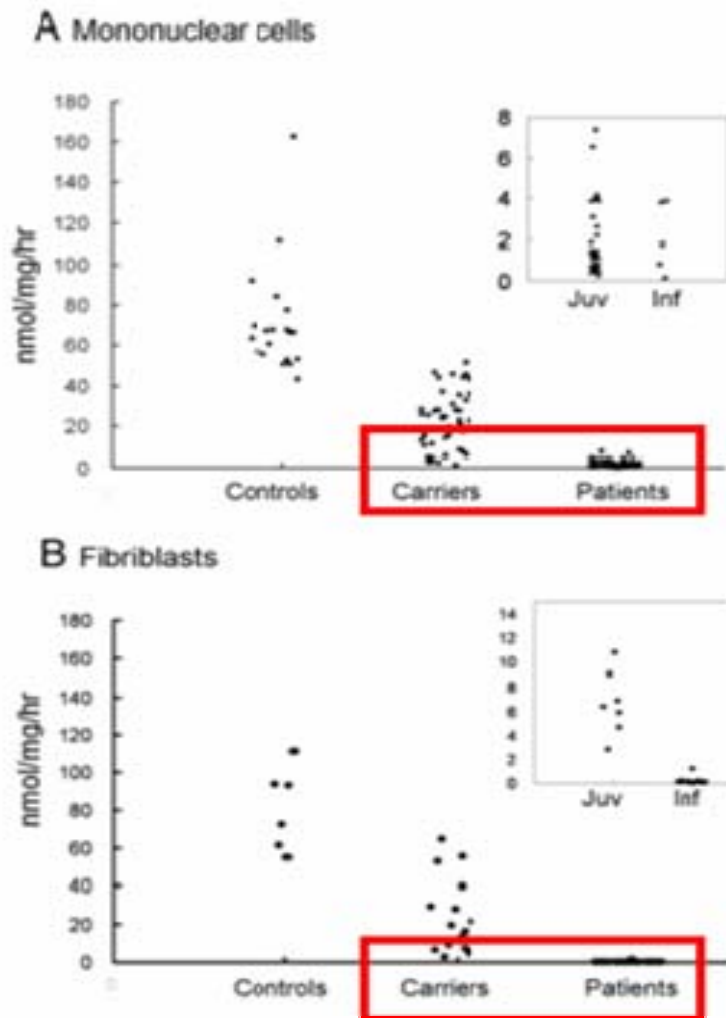


圖13. GAA 活性部分缺乏及患者之蛋白質含量及 mRNA 含量

以 western blot 及 RT-PCR 分別分析患者及帶因者體內 GAA 蛋白質及 RNA 量。Western blot (A) 為選用不同個體(1-9)的皮膚纖維芽細胞的蛋白質量的呈色圖，並與酵素活性作比對(B)。RT-PCR(A) 為不同個體(1-9)的皮膚纖維芽細胞的 RNA 作 RT-PCR 後半定量，並與酵素活性作比對(B)。

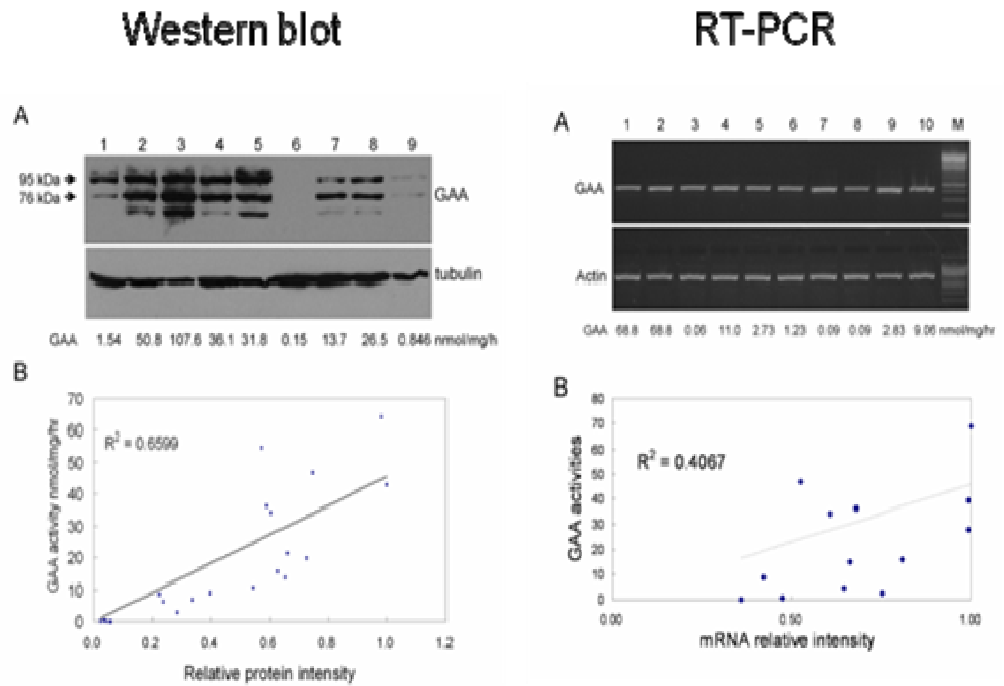


圖14. 嬰兒型龐貝氏症患者家族之單倍體分析

使用 Haploview 作家族連鎖分析，分析 p.199/p.223/p.576/p.645/p.689/p.780 是否可以建構成固定的 haplotype。結果顯示，p.199/p.223 可以形成一個區塊，p.R199/p.H223 占 58.7%，p.H199/p.R223 占 41.3%。

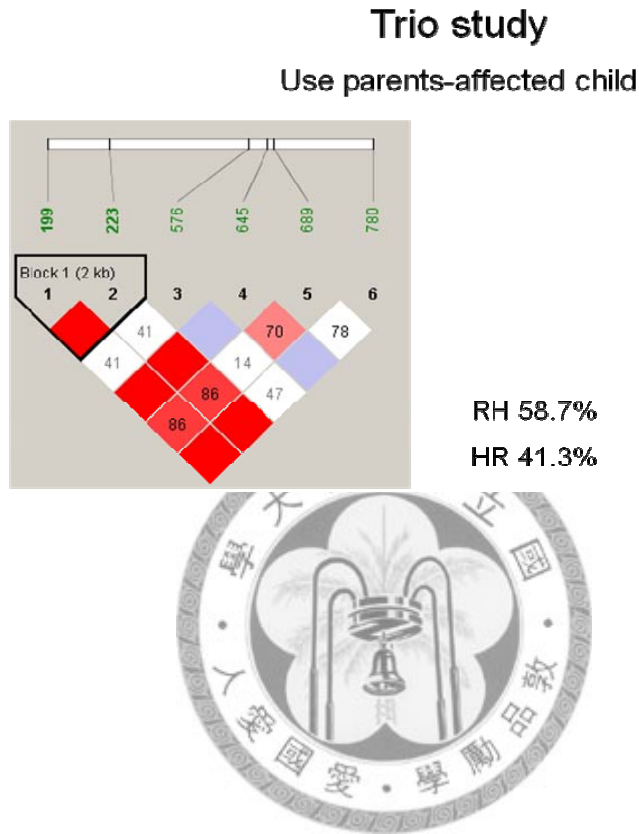
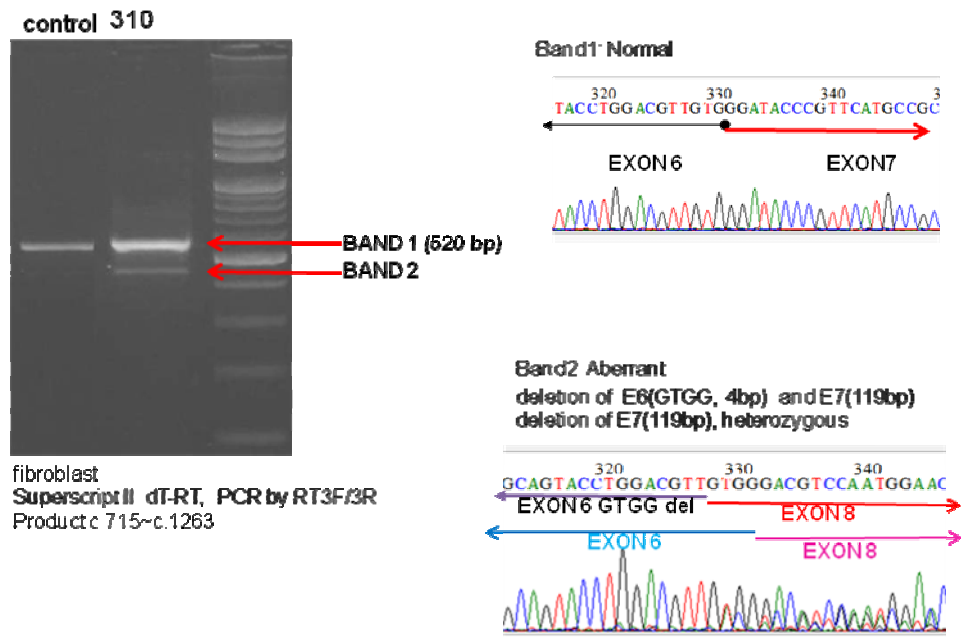


圖15. c.1194+2t>c 影響

(A) 患者的皮膚纖維芽細胞的 RNA 經 RT-PCR 後顯示有正常的 RNA (band 1)及不正常的 RNA (band 2)，在 band 2 中包含有 exon6 尾端 4bp 缺失以及 exon7 缺失兩種產物。(B) 預測圖示 c.1194+2c>t 如何影響 RNA 接合過程

(A)



(B)

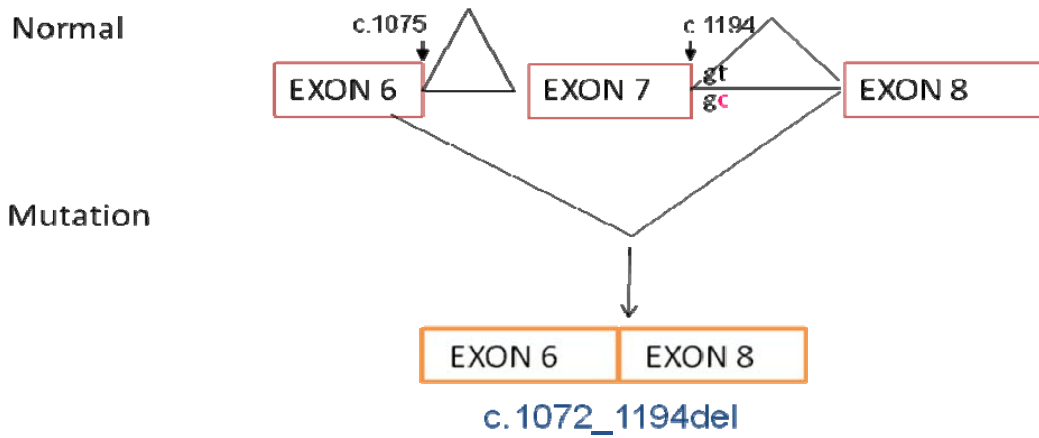
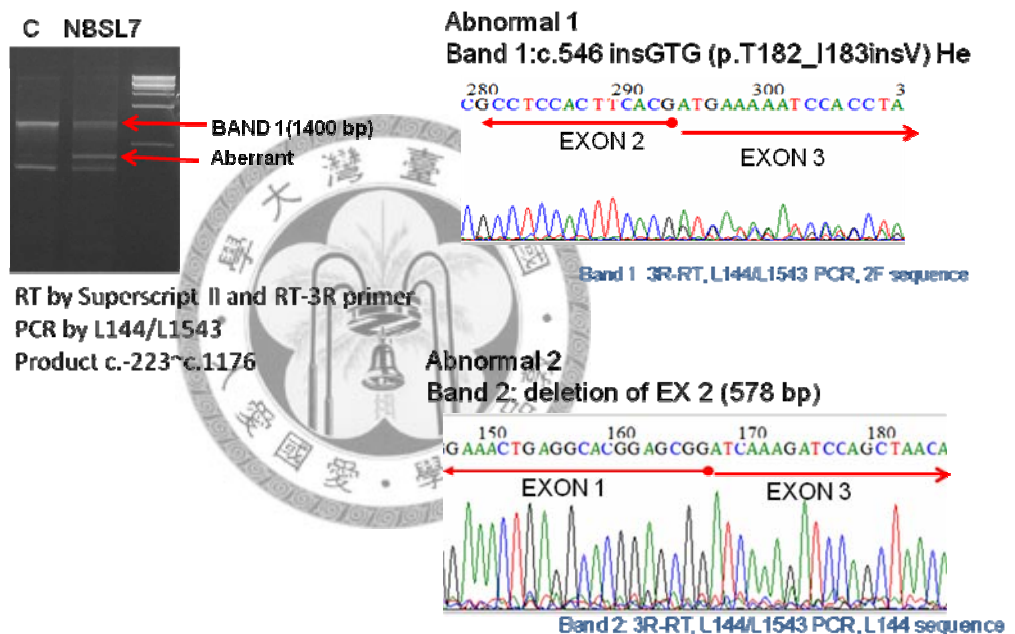


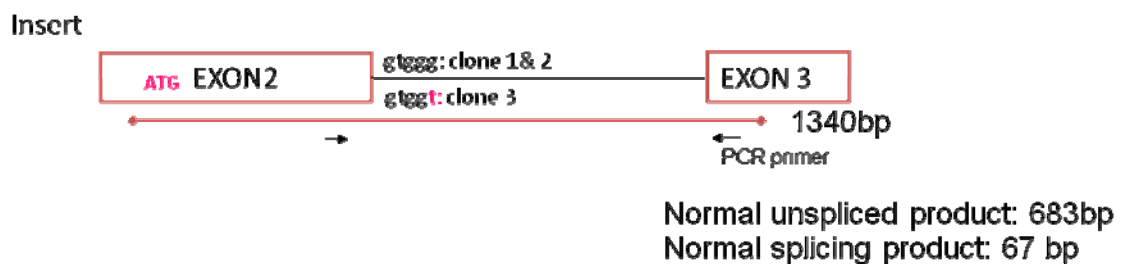
圖16. 晚發型龐貝氏症患者 c.546+5g>t 之分析

(A) 患者的皮膚纖維芽細胞的 RNA 經 RT-PCR 後顯示有不正常的 RNA(aberrant)，包含有 3bp 添加在 exon2 與 exon3 之間(右圖上，abnormal 1)，以及 exon2 缺失(右圖下，abnormal 2)兩種產物。(B) 體外轉錄表現的質體設計。(C) 體外轉錄表現的結果: M 為標誌(marker)，1, 2 代表兩株帶有 c.546+5g 的質體，3 為帶有 c.546+5t 的質體。(D) 體外轉錄表現定序結果，顯示有兩種不正常產物包括增添 184bp 及 3bp 的產物。(E) 預測圖示 c.546+5g>t 如何影響 RNA 接合過程。

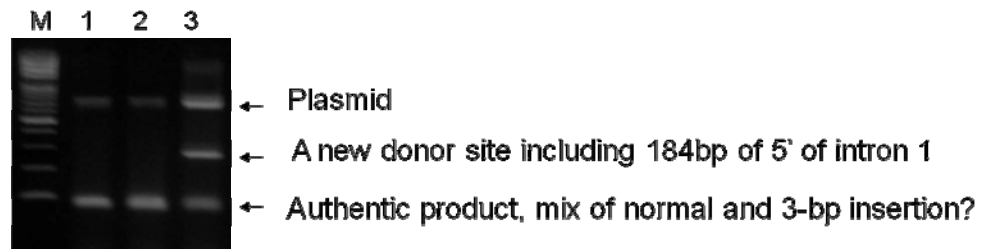
A. Patient data



B. In vitro splicing assay: insert design



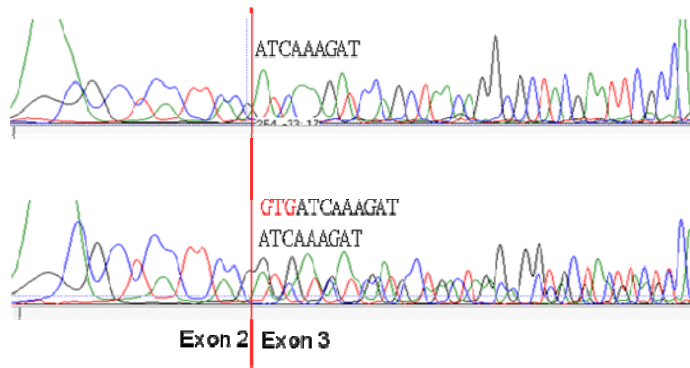
C. In vitro splicing result:



D. Sequence result

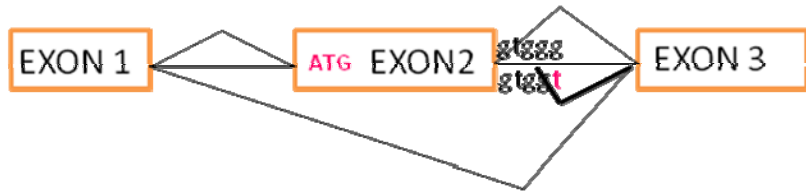
Product 1: 184bp in addition

Product 2: 3bp in addition, mosaic band



E. Scheme of mutation effect

Normal



Abnormal 1



c.546 insGTG (p.T182_I183insV)

Abnormal 2



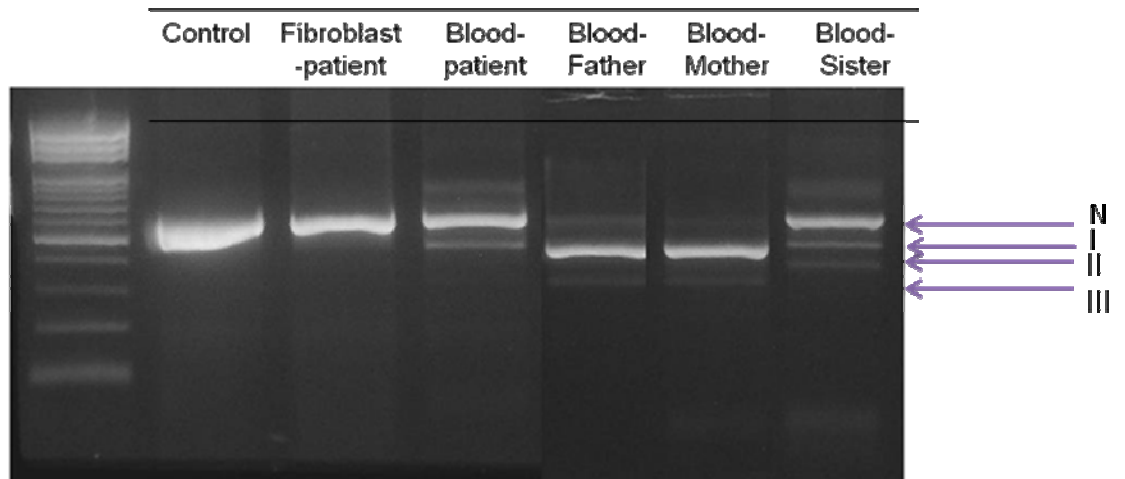
c. -32~546 del (del 578bp including ATG)



圖17. 晚發型龐貝氏症患者 c.955+167 c>t 之分析

(A) 患者的血液細胞的 RNA(blood-patient)經 RT-PCR 後顯示有不正常的 RNA(band I)，但是在皮膚纖維芽細胞的 RNA 卻未出現。患者父母及姐姐的血液細胞的 RNA(blood-father, blood-mother, blood-sister) 皆有不正常的 RNA(band I-III)表現。(B) 定序結果顯示有 3 種不正常產物。(C) 預測圖示 c.955+167 c>t 如何影響 RNA 接合過程。(D)結構預測 exon6 缺失(藍帶)的蛋白質不影響 active center(紅點)。(E)體外表現 exon6 缺失的蛋白活性。

A. Patient data



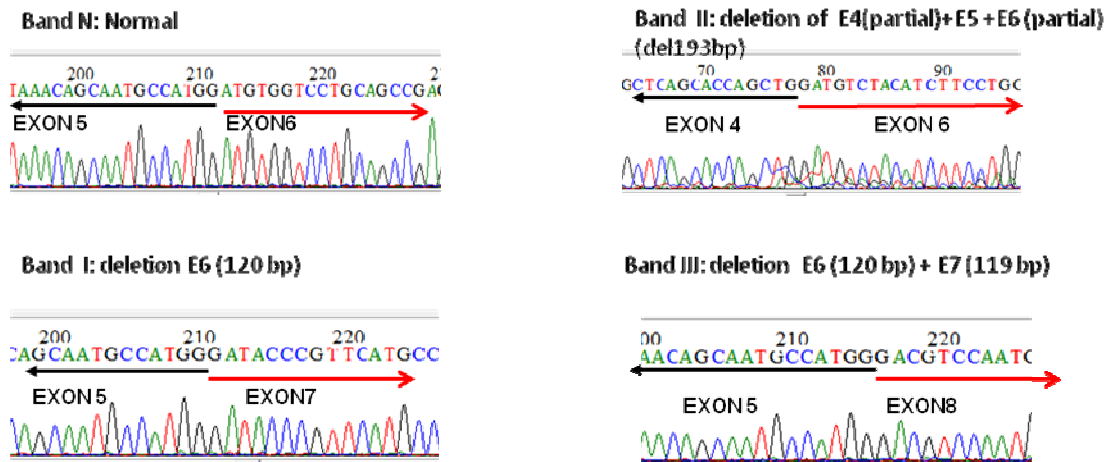
Band N: Normal (520bp)

Band I: delta E6

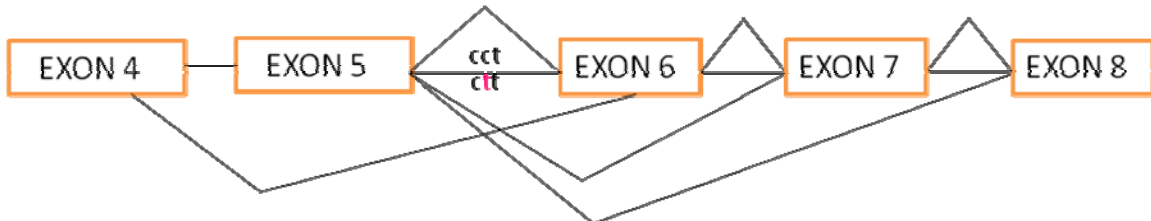
Band II: partial delta E4, deltaE5 and partial delta E6

Band III: delta (E6+E7)

B. Sequence data

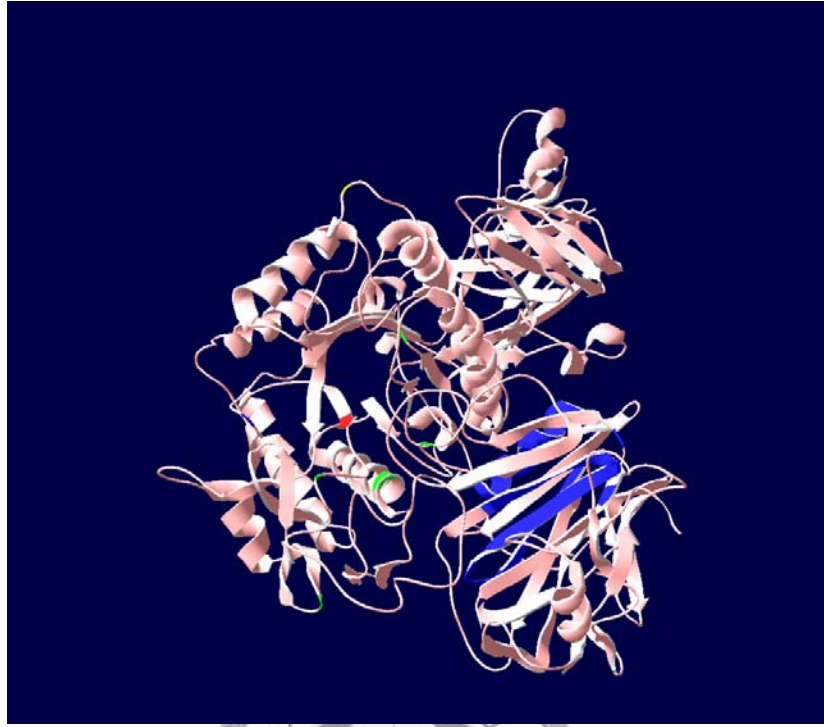


C. Scheme of mutation effect



Normal	EXON 5	EXON 6	EXON 7
Abnormal: major	EXON 5	EXON 7	EXON 8
	c.956_1075del (p.D319_V358del40)		
Abnormal: minor	EXON 5	EXON 8	EXON 9
	c.956_1194del (p.D319GfsX107)		
Abnormal: minor	EXON 4	EXON 6	EXON 7
	c.818_1011del (p.?)		

D. 晚發型龐貝氏症患者 E6 缺失之分析



E. Mutagenesis study for delE6 clone

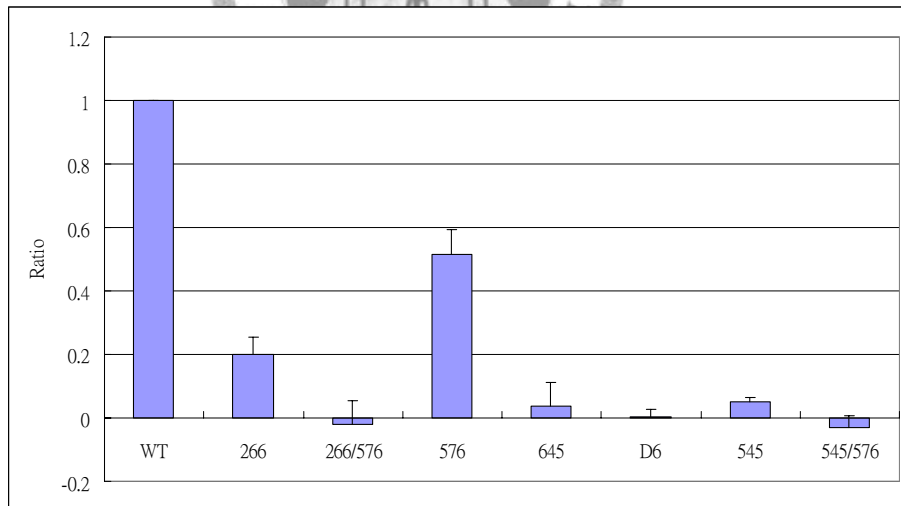
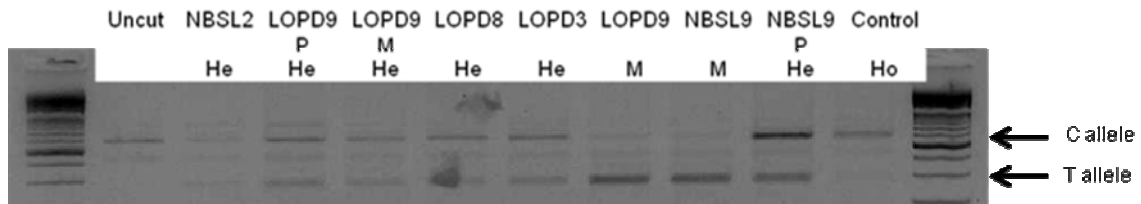


圖18. 帶有 IVS5+167 t 變化的患者皆有 delta E6 之不正常 RNA 表現

A). Detection of c.955+167c>t by RFLP



B). Detection of aberrant mRNA by RT-PCR

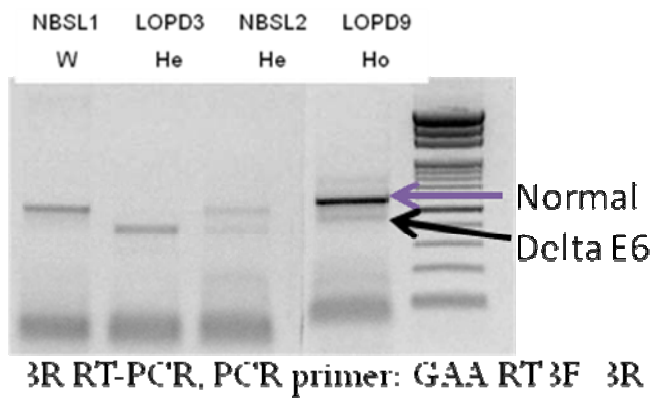
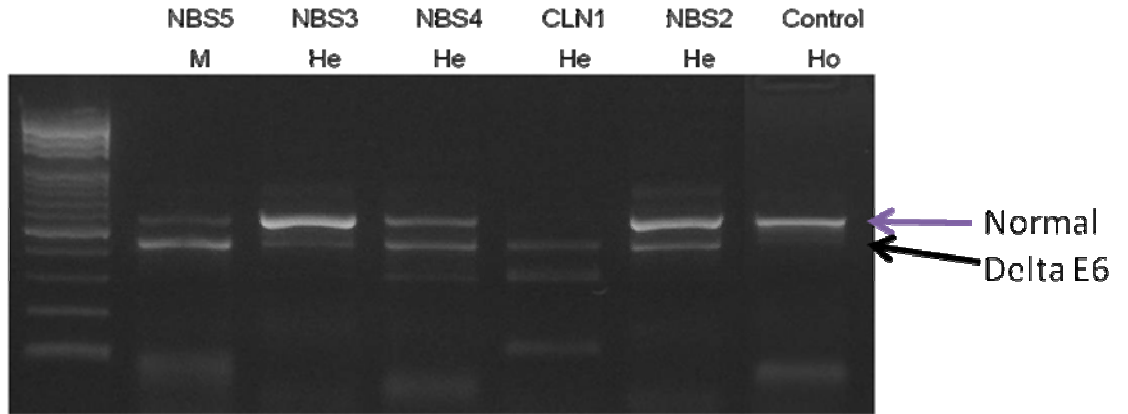


圖19. 帶有 IVS5+167 t 患者皆有數量不一的不正常的 RNA 表現



M: mutation homozygote; He: heterozygotes; Ho: wild type homozygotes



圖20. IVS5+167 c 患者偶可表現少量的不正常 RNA

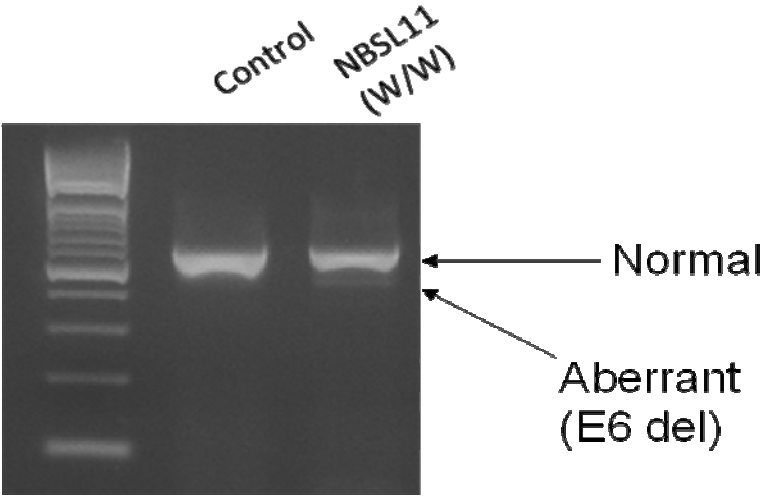


圖21. IVS5+167c>t 會影響 RNA 接合

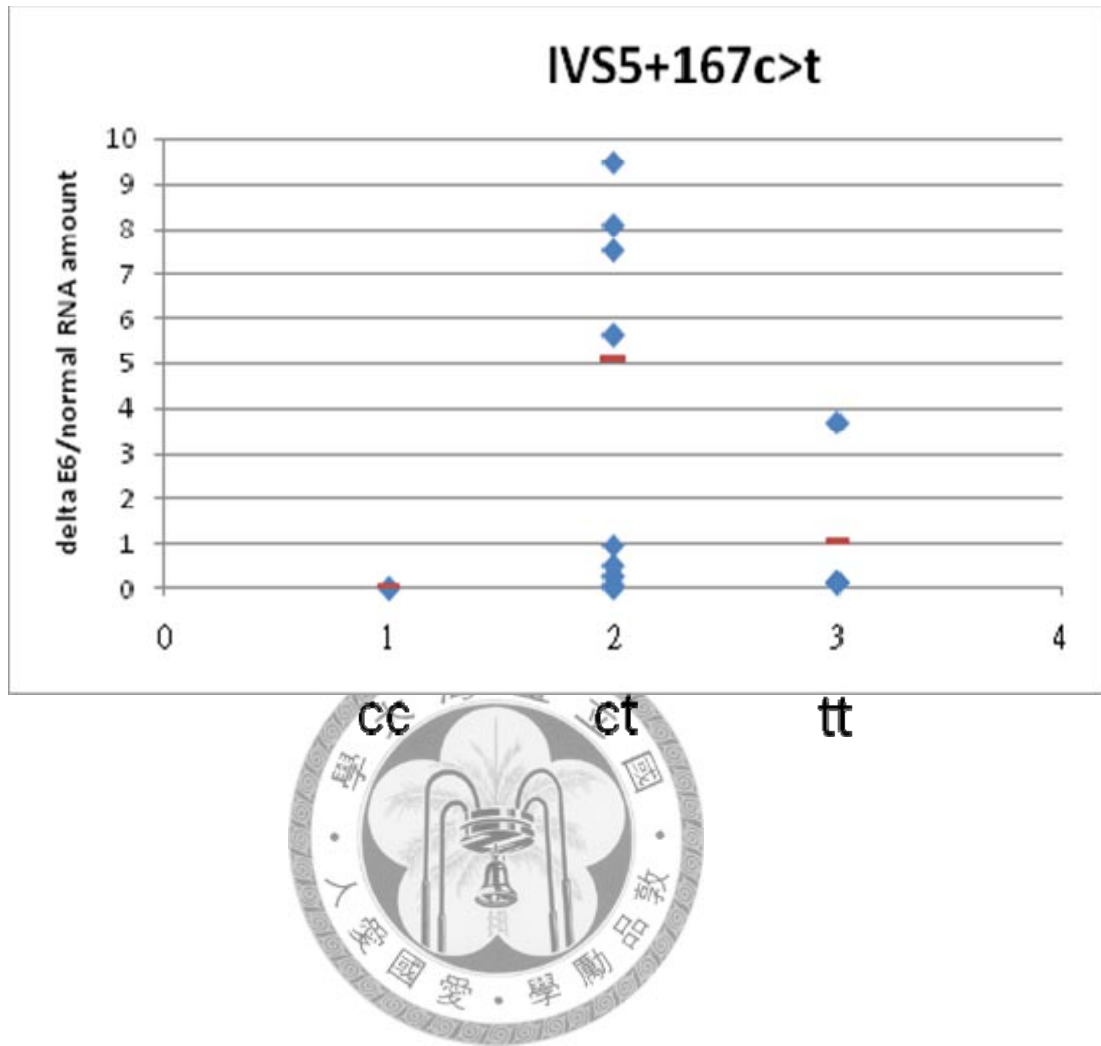


圖22. 預測的影響

Effect of mutation in intron suspect as splicing enhancer



*BDGP score calculated by Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) software



表一. GAA 基因突變 DNA 分析使用的引子序列

primer ID	chr:start
GAA-pro1F	75688309
GAA-pro1R	75688918
GAA-pro2F	75688665
GAA-pro2R	75689237
GAA-pro3F	75689058
GAA-pro3R	75689610
GAA-pro4F	75689414
GAA-pro4R	75690112
GAA-e1F	75690093
GAA-e1R	75690521
GAA-e2UF	75692761
GAA-e2UR	75693392
GAA-e2LF	75693205
GAA-e2LR	75693671
GAA-e3F	75693999
GAA-e3R	75694386
GAA-e4F	75696001
GAA-e5R	75696580
GAA-e6R	75696752
GAA-e8R	75697424
GAA-e9F	75698248
GAA-e9R	75698575
GAA-e10F	75699068
GAA-e11R	75699603
GAA-e12F	10309
GAA-e12R	10673
GAA-e13F	10992
GAA-e14R	11610
GAA-e15F	11591
GAA-15R	12023
GAA-e16F	75705174
GAA-e16R	75705624
GAA-e17F	15982
GAA-e17R	16317
GAA-e18F	75706405
GAA-e18R	75706860
GAA-e19F	75706960
GAA-e19R	75707421
GAA-e20F	75707453
GAA-e20R	75708108



表二. GAA 基因突變 DNA 分析使用的 PCR 條件

Exon	Primer	PCR product	PCR condition	Seq primer
E2 part 1	GAA-e2UF	632	60T30sec	GAA-e2UF
	GAA-e2UR			GAA-e2UR
E2 part 2	GAA-e2LF	467	60T30sec	GAA-e2LF
	GAA-e2LR			GAA-e2LR
E3	GAA 3F (e3F)	388	61T20sec	GAA 3F (e3F)
	GAA 3R(e3R)			
E4,5	GAA-e4F	580	60T30sec	GAA-e4F
	GAA-e5R			GAA-e5R
E6,7,8	GAA-e6R (e6F)	673	60T30sec	GAA-e6R (e6F)
	GAA-e8R			GAA-e8R
E9	GAA-e9F	328	60T30sec	GAA-e9F
	GAA-e9R			GAA-e9R
E10,11	GAA-e10F	535	60T30sec	GAA-e10F
	GAA-e11R			GAA-e11R
E12	GAA 12F	365	61T20sec	GAA 12F
	GAA12R			
E13,14	GAA-e13F	619	60T30sec	GAA-e13F
	GAA-e14R			GAA-e14R
E15	GAA 15F	433	60C20sec	GAA15F
	GAA 15R			
E16	GAA-e16F	451	60T30sec	GAA-e16F
	GAA-e16R			GAA-e16R
E17	GAA 17F	336	61T20sec	GAA 17F
	GAA 17R			
E18	GAA-e18F	456	60T30sec	GAA-e18F
	GAA-e18R			GAA-e18R
E19	GAA-e19F	462	60T30sec	GAA-e19F
	GAA-e19R			GAA-e19R
E20	GAA-e20F	656		GAA-e20F
	GAA-e20R			GAA-e20R

表三. GAA 基因突變 RNA 分析所使用的引子序列

Name	sequence	product size (bp)	range
GAA-1F	cctctcagttgggaaagctg		1-720
GAA-1R	cctgctttgcaggatgtag	570	
GAA-2F	agagcagtgccacacagt		541-1200
GAA-2R	atcaggggactgaggtget	578	
GAA-3F	ctgttctttgcggaccagt		1021-1680
GAA-3R	gaagccatccttgtgaacg	530	
GAA-4F	gtggtggagaacatgaccag		1501-2280
GAA-4R	ccgtagaggtgtgcaggt	569	
GAA-5F	agctggagaaccaccctac		1921-2760
GAA-5R	caaggggaagtagccagtc	699	
GAA-6F	tctagcacctggactgtgga		2521-3300
GAA-6R	cgagaaactgcttcccac	625	
GAA-7F	tcctgtctccaactcacc		3061-3780
GAA-7R	gattccaaatgcccttta	646	



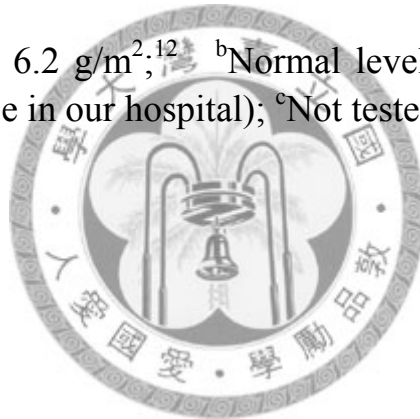
表四. 血片檢體檢驗 GAA 活性與血液淋巴球檢體之結果比較

		DBS			Lymphocytes	Fibroblasts
		GAA, μmol/L Wb/hour (% of normal mean)	NAG/GAA	% tGAA inhibition (tGAA – GAA)/tGAA, %	GAA, nmol/mg protein/hour	GAA, nmol/mg protein/hour
NBS1	a	1.0 (6.4)	64	92		
	b	0.3 (2.7)	102	93	1.8	0.64
NBS2	a	0.4 (2.3)	148	94	0.34	0.06
NBS3	a	0.4 (2.4)	101	94	1.6	
NBS4	a	0.6 (3.5)	133	90	0.45	0.11
CLIN1	c	0.6 (3.4)	89	93		
	d	0.3 (2.2)	155	93	0.9	0.07
CLIN2	c	1.7 (10.5)	59	93		
	d	0.5 (3.7)	108	94	0.9	
CLIN3	c	2.3 (14.1)	40	88		
	d	0.2 (1.5)	205	91	0.33	0.13

表五. 嬰兒型龐貝氏症患者的臨床症狀與檢驗數值

	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4	CLIN1	CLIN2	CLIN3
Sex	Female	Female	Male	Male	Female	Female	Male
Age at diagnosis	40 days	19 days	22 days	9 days	3.6 months	5.5 months	2.2 months
Body weight at diagnosis (kg)	4.43	3.29	3.24	3.53	6.16	7.1	5.79
Age at first infusion	14 months	26 days	29 days	17 days	4.2 months	5.8 months	2.9 months
Chest X Ray	Normal	Cardiomegaly	Cardiomegaly	Cardiomegaly	Cardiomegaly	Cardiomegaly	Cardiomegaly
Electrocardiogram	Normal	Ventricular hypertrophy	Ventricular hypertrophy	Ventricular hypertrophy	Ventricular hypertrophy	Ventricular hypertrophy	Ventricular hypertrophy
Left ventricular mass index (g/m²)^a	42.7	120	170	186	307.5	— ^c	221.7
Muscle biopsy	— ^c	Vacuoles in 80–85% of myocytes	Vacuoles in 15–30% of myocytes	Vacuoles in 30–40% of myocytes	Vacuoles in 90–95% of myocytes;	— ^c	Vacuoles in 80–90% of myocytes;
Creatine kinase (U/L)^b	101	922	1126	597	689	576	985

^aNormal levels, $47.4 \pm 6.2 \text{ g/m}^2$; ^bNormal levels, 38–160 U/L (normal range for creatine kinase in our hospital); ^cNot tested



表六. 嬰兒型龐貝氏症患者基因突變與酵素檢驗數值

DNA No	Sex	Mutation-Allele 1	Mutation-Allele 2	GAA activity	
				Skin	Blood
1473	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2380delC (p.Arg794fsX12)	0.1	0.35
2010	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1508_1510delTTGG (p.Val503fsX519)*	0.22	1.22
2258	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1411_1414del (p.Glu471fsX5)	0.02	3.04
2259	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2815_2816del (p.Val939fsX78)	0.03	1.82
2370	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.09	1.43
2540	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.243C>T (p.Gln81Ter)*	-0.43	0.31
2645	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2662G>T (p.Glu888X)	0.12	0.49
2662	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.21	6.52
3079	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.42	6.83
3349	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.07	
3386	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	?	0.1	1.07
3683	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2815_2816del(p.Val939fsX78)	0.09	0.71
3902	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2023_2025del (p.Asn675del)	0.03	0.80
4017	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2564G>A (p.Gly855Glu)*	0.11	3.86
4628	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1411_1414del (p.Glu471fsX5)	0.06	0.58
4735	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	exon3-15del	0.09	1.11
4773	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1194+2 t>c (p.V358_L398del 41)*	0.1	2.47
4943	F	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.2040+1G>T*	0.09	2.90
5996		c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1843G>A (p.Gly615Arg)	0.07	0.94
6464		c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1411_1414del (p.Glu471fsX5)	0.13	1.70
7805	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.1	0.88
7904	M	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	c.1935C>A (p.Asp645Glu)	0.13	0.38
4594	M	c.872T>C (p.Leu291Pro)	c.872T>C (p.Leu291Pro)	1.23	1.37
16	F	c.872T>C (p.Leu291Pro)	c.872T>C (p.Leu291Pro)		
4		c.2023_2025del (p.Asn675del)	c.2431dup (p.Leu811fsX73)		

*: novel mutation

表七. 以臨床表現而診斷的台灣嬰兒型龐貝氏症患者治療現狀

No	Sex	Mutation-1	Mutation-2	GAA activity (skin)	Age symptom onset (m)	Age start treatment (m)	Current age (m)	Outcome
1	M	c.1935C>A (p.D645E)	c.2023_2025del (p.D675del)	0.03	3	6.1	83.37	No anti-gravity arm movement; Tracheostomy BiPAP; Jejunostomy
2	F	c.1935C>A (p.D645E)	exon3-15del	0.09	3	5.4	47.70	No anti-gravity arm movement, Expired at 47-months-old; Tracheostomy BiPAP; Jejunostomy
3	F	c.1935C>A (p.D645E)	c.1411_1414del (p.E471PfsX5)	0.06	4	5.9	20.00	Anti-gravity arm movement, Expired at 20-months-old Tracheostomy BiPAP; NG feeding
4	M	c.872T>C (p.L291P)	c.872T>C (p.L291P)	1.23	2	5.9	64.00	No anti-gravity arm movement Endotracheal tube; Jejunostomy
5	M	c.1935C>A (p.D645E)	c.1194+2t>c (p.V358_L398del 41)*	0.1	5	5.9	71.77	Run Oral feeding
6	F	c.1935C>A (p.D645E)	c.1843G>A (p.G615R)	0.07	3	4.4	40.70	Walk with assistance*
7	M	c.1935C>A (p.D645E)	c.1411_1414del (p.E471PfsX5)	0.13	2	2.9	33.30	Run
8	M	c.1935C>A (p.D645E)	c.1935C>A (p.D645E)	0.1	3	3.5	19.37	Sit well Mask BiPAP at night NG feeding
9	M	c.1935C>A (p.D645E)	c.1935C>A (p.D645E)	0.13	2	2	17.40	Can't sit yet Mask BiPAP 22h/day NG feeding

*Case 6 expired at the age of 42 months

表八. 新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者之治療效果

	Sex	Age at diagnosis	Age at first infusion	Current age	Gross Motor Status
NBS1	Female	40 days	14 months	40 months	Walk at 15 months
NBS2	Female	19 days	26 days	34 months	Walk at 14 months
NBS3	Male	22 days	29 days	33 months	Walk at 20 months
NBS4	Male	9 days	17 days	26 months	Walk at 14 months
NBS5	Female	33 days	34 days	20 months	Walk at 15 months
NBS6	Male	7 days	12 days	15 months	Walk at 13 months

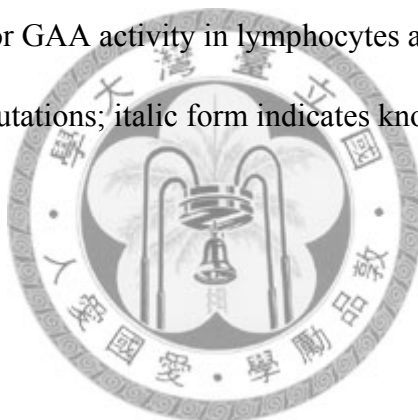


表九. 新生兒篩檢檢出嬰兒型龐貝氏症患者之基因變化

No.	GAA activity (nmol/mg/hr)		Mutation-Pat	Mutation-Mat
	Lymphocyte	Fibroblast		
NBS1	1.65	0.65	c.811A>G (p.T271A)	c.424_440del (p.S142LfsX29)
NBS2	0.68	0.06	<i>c.1411_1414delGAGA (p.E471PfsX5)</i>	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>
NBS3	1.58	-	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2842insT (p.L948SfsX70)
NBS4	0.45	0.11	<i>c.784G>A (p.E262K)</i>	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>
NBS5	3.82	0.14	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>
NBS6	0.83	0.06	c.1062C>G (p.Y354X) / c.1286A>G (p.Q429R)	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>

Normal range for GAA activity in lymphocytes and fibroblasts is >60 nmol/mg/hr

Bold form indicates novel mutations; italic form indicates known mutations.



表十. 新生兒篩檢檢出 GAA 部分缺乏或缺乏患者之基因突變分析

Case	Sex	Acarbose (+)	Acarbose (-)	Genotype
1	F	10.71	5.97	None detected
2	M	10.75	5.98	None detected
3	F	5.07	3.27	None detected
4	M	9.89	6.55	None detected
5	M	3.55	1.45	None detected
6	F	9.83	5.55	None detected
7	F	31.30	18.25	None detected
8	M	18.79	9.18	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
9	F	13.88	7.80	None detected
10	F	8.83	5.92	None detected
12	M	13.03	9.38	None detected
13	M	5.16	3.27	c.796C>T (p.Pro266Ser) He
14	M	11.01	6.70	None detected
16	M	23.58	14.46	None detected
17	M	7.95	4.31	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
18	M	7.03	3.84	c.2373_2376DelInsTGCTCA (p.Ala791AlafsX15) He
19	M	16.06	10.51	None detected
20	M	13.44	8.62	None detected
21	M	7.22	4.01	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
23	F	7.11	4.69	<i>c.2662G>T (p.Glu888X)He</i>
25	M	5.13	3.14	None detected
26	M	11.70	6.67	None detected
27	M	8.16	4.42	None detected
28	M	6.67	4.68	None detected
29	M	7.52	3.59	<i>c.2238G>C(p.Tyr746Cys) He</i>
30*	F	1.65	0.78	c.424_440Del (p.Ser141LeufsX29) He + c.811A>G (p.Thr271Ala) He
32	M	9.74	5.80	None detected
33	F	6.07	3.51	None detected
34	F	8.47	5.00	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
35	F	12.85	7.44	None detected
38	F	7.17	3.83	<i>c.2815DelGT (p.Val939fsX) He</i>
39	F	5.90	3.88	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
40	F	4.94	3.24	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
41	F	6.66	3.99	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Ler, p.Ser254Ler) He
43	F	6.93	4.05	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
44	F	6.48	4.12	<i>c.1222 A>G (p.Met408Val) He</i>
45	M	5.19	3.51	None detected
46	M	7.06	4.43	None detected
48	M	21.93	5.99	<i>c.872 T>C (p.Leu291Pro) He</i>
49	M	5.52	3.26	None detected
50	F	3.08	2.11	<i>c.2815_2816del (p.Val939fsX78) He</i>
51	M	5.59	3.07	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X)He</i>
52	M	6.27	2.98	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
54	F	5.13	2.72	<i>c.1432 G>A (p.Gly478Arg) He</i>
55*	M	1.58	0.24	<i>c.1935 C>A (p.Asp645Glu) He + c.2842insT (p.Leu948SerfsX70) He</i>
56	M	12.26	6.99	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
57	F	8.16	4.85	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
58	F	9.51	4.89	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
59	M	9.02	5.44	None detected
60	M	7.66	4.82	c.671G>C (p.Arg224Pro) He
61	F	4.58	2.51	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
62	F	6.46	3.62	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
63	M	3.58	2.43	None detected
64	F	9.14	5.48	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>

65	F	0.36	0.19	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He + <i>c.1411_1414del (p.Glu471fsX5) He</i>
66	F	7.49	4.79	<i>c.1920T>C (p.Pro640Pro)He</i>
68	M	5.04	3.47	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
70	M	5.96	3.67	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X)He</i>
71	F	15.75	2.34	None detected
72	M	7.11	2.04	c.546+5G>T (Ivs2) He
73	F	8.48	5.72	c.546+5G>T (Ivs2) He
74	M	4.52	2.78	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X) He</i>
75	F	3.26	2.30	c.1669A>T (p.Ile557Phe) He + c.2132C>G (p.Thr711Arg) He
77	F	7.78	7.22	None detected
78	F	3.84	2.86	<i>c.872C>T (p.Leu291Pro) He</i>
81	M	5.44	4.20	c.546+5G>T (IVS2) He + c.2482-216_-201del (IVS17) He
82	M	3.49	2.59	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
83	M	6.55	3.21	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
84	M	13.53	7.97	None detected
85	M	3.52	2.36	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
86	M	18.47	13.53	None detected
87	M	20.48	4.78	c.-32-46G>C (IVS1) He + <i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
88	M	10.53	6.98	None detected
89	F	3.65	2.37	c.1636+10C>T (IVS11) He + <i>c.2023_2025del (p.Asn675del) He</i>
90	F	4.94	3.01	c.955+22G>A (IVS5) He + <i>c.1634C>T (p.Pro545Leu) He</i>
91	F	1.58	0.97	None detected
92	F	8.13	4.58	<i>c.1843 G>A (p.Gly615Arg) He</i>
93	M	12.46	6.71	c.2236T>G (p.Tyr746Gly) He
94	M	28.64	16.40	None detected
95	M	9.46	5.16	c.546+5G>T (IVS2) He
96	F	26.43	5.23	c.2040+17G>A (Ivs14) He
97	M	4.41	2.69	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
98	M	5.91	3.51	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
99	F	5.25	3.41	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
101	M	18.10	11.42	<i>c.2023_2025del (p. Asn 675del) He</i>
102	F	15.23	2.91	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X) He</i>
103	M	5.68	3.56	<i>c.2238G>C(p.Tyr746Cys) He</i>
104	F	10.95	3.85	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) He
105	M	16.83	3.92	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
106	F	24.20	11.75	None detected
107	M	7.37	4.24	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
108	M	12.36	8.18	c.2482-216_-201del (IVS17) He
109	M	5.38	3.24	c.546+5G>T (IVS2) He
110	M	7.64	5.87	c.546+5G>T (IVS2) He
111*	M	0.45	0.16	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i> + <i>c.784G>A (p.Glu262Lys) He</i>
112*	M	0.75	0.23	c.752C>T,c.761C>T (p.Ser251Leu, p.Ser254Leu) Ho
113	M	19.62	3.05	None detected
114	M	5.93	3.65	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
116	F	11.21	2.72	<i>c.1935C>A (p.Asp645Glu) He</i>
117	M	11.07	5.91	c.671 G>C (p.Arg224Pro) He
118*	M	0.8	0.29	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X) He</i> + <i>c.2238G>C(p.Tyr746Cys) He</i>
119*	F	1.27	0.74	<i>c.2662 G>T (p.Glu888X) He</i> + c.1574T>A (p.Phe525Tyr) He
121	F	5.20	2.47	c.1636+10C>T (IVS11) He + <i>c.2023_2025del (p. Asn 675del) He</i>

Normal range for GAA activity in lymphocytes and fibroblasts is >60 nmol/mg/hr

表十一. 新生兒篩檢檢出 GAA 部分缺乏或缺乏患者之基因突變分布頻率

Variant	Location	Type of variant	Severity	Frequency	Lower 95% CI	Upper 95% CI
Ivs1 c.-32-46G>C	Ivs1	Non-coding	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.424_440del	e2	Deletion [p.S141LfsX29]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.525delT	e2	Deletion [p.G176fsX45]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
Ivs2 c.546+5G>T	Ivs2	Non-coding	Unknown	(6/206) 2.91%	1.39%	6.29%
c.671G>C	e3	Missense [p.R224P]	Unknown	(2/206) 0.97%	0.30%	3.50%
c.784G>A	e4	Missense [p.E262K]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.796C>T	e4	Missense [p.P266S]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.811A>G	e4	Missense [p.T271A]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.872 T>C	e5	Missense [p.L291P]	Severe ²	(2/206) 0.97%	0.30%	3.50%
Ivs5 c.955+22G>A	Ivs5	Non-coding	Unknown	(1/144) 0.98%	0.17%	3.81%
c.1222A>G	e8	Missense [p.M408V]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1432 G>A	e9	Missense [p.G478R]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1411_1414del	e9	Deletion [p.E471fsX5]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1574T>A	e11	Missense [p.F525Y]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1634T>C	e11	Missense [p.P545L]	Intermediate ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
Ivs11 c.1636+10C>T	Ivs11	Non-coding	Unknown	(2/144) 0.49%	0.30%	3.50%
c.1669 A>T	e12	Missense [p.I557F]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1843 G>A	e13	Missense [p.G615R]	Severe ¹	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.1935C>A	e14	Missense [p.D645E]	Severe ¹	(22/206) 10.68%	7.28%	15.87%
c.2023-2025del	e14	Deletion [p.N675del]	Severe ¹	(3/206) 1.45%	0.54%	4.24%
Ivs14 c.2040+17G>A	Ivs14	Non-coding	Unknown	(1/144) 0.98%	0.17%	3.81%
c.2132C>G	e15	Missense [p.T711R]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.2236T>G	e16	Missense [p.W746G]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
c.2238G>C	e16	Missense [p.W746C]	Severe ²	(3/206) 0.97%	0.42%	4.89%
c.2373_2376delinsTGCTCA	e17	Deletion [p.A791AfsX15]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%
Ivs17 c.2482[-216]-[-201]del	Ivs17	Non-coding Deletion	Unknown	(2/144) 1.38%	0.43%	4.93%
c.2662 G>T	e19	Missense [p.E888X]	Severe ¹	(7/206) 3.43%	1.71%	6.94%
c.2815_2816del	e20	Deletion [p.V939fsX78]	Severe ¹	(2/206) 0.97%	0.30%	3.50%
c.2842insT	e20	Insertion [p.L948SfsX70]	Unknown	(1/206) 0.49%	0.12%	2.70%

表十二. GAA 活性部分缺乏患者之酵素活性受其他 GAA 基因多型性影響

	WT/WT	WT/PM	PM/PM	P
All carriers (n=39)				
199	23.87±21.36*	27.40±17.91	40.36±22.58	0.276
223	23.87±21.36	27.40±17.91	40.36±22.58	0.276
576	34.34±19.39	14.32±12.77	-	0.003**
689	33.72±19.22	29.26±20.21	-	0.526
780	22.73±19.28	30.31±18.53	56.13±0.21	0.043**
D645E carriers (n=24)				
199	19.74±18.82	32.86±17.38	-	0.172
223	19.74±18.82	32.86±17.38	-	0.172
576	32.92±18.57	17.73±15.04	-	0.030**
689	33.51±17.36	31.26±18.9	-	1
780	19.63±16.93	36.87±17.00	-	0.013**
Non-D645E carriers (n=15)				
199	36.60±39.56	18.78±17.17	47.32±16.58	0.132
223	36.60±39.56	18.78±17.17	47.32±16.58	0.132
576	37.34±20.54	3.97±1.08	-	0.009**
689	36.96±19.62	23.74±28.07	-	0.405
780	27.45±26.47	23.57±17.72	56.13±0.21	0.206

表十三. GAA 基因 p.G576S 與酵素活性高低有關

G576S genotype	G/G	G/S	S/S
mean activity (mmol/L/h) (SD)*	16.96 (5.64)	9.55 (3.86)	5.84 (3.68)
N	243 (74.8%)	70 (21.5%)	12 (3.69%)
N: GAA activities >Median*	154	8	0
N: GAA activities ≤Median*	89	62	12

*: p<0.05

#: activities range: 1.43-11.86 mmol/L/h, 8.81%-72.85% of normal mean

表十四. 新生兒篩檢檢出 GAA 活性部分缺乏者基因之單倍體分析

Major Core Haplotypes	Haplotype Alleles in 93 Normal Taiwanese Individuals										Haplotype Alleles in 102 Low GAA Activity Taiwan NBS Infants		Haplotype Alleles in 175 Normal US Individuals			
	c.271	c.596	c.668	c.1726	c.1835	c.2065	c.2338	c.2446	c.2770	c.2780	n	Frequency	n	Frequency	n	Frequency
(GAA*01)	D	R	H	G	H	E	I	V	S	T	44	24%	4	2%	232	66%
*02	D	R	H	S	L	K	I	V	S	T	0	0%	0	0%	0	0%
*03	D	R	H	S	H	K	I	V	S	T	26	14%	164	81%	1	0%
*04	D	R	H	G	L	E	I	V	S	I	0	0%	0	0%	2	1%
*05	D	R	H	G	H	E	V	V	S	T	0	0%	0	0%	1	0%
*06	N	R	H	G	H	E	I	V	S	T	0	0%	0	0%	8	2%
*07	D	H	R	G	H	E	I	V	S	T	1	1%	0	0%	2	1%
*08	D	H	R	G	H	E	V	V	S	T	77	41%	10	5%	77	22%
*09	D	H	R	G	H	E	I	I	S	T	18	10%	20	10%	6	2%
*10	D	H	R	G	H	E	I	I	S	I	0	0%	0	0%	5	1%
*11	D	R	H	G	H	K	I	V	S	T	20	11%	4	2%	16	5%
*12	D	R	H	S	H	K	V	V	S	T	0	0%	2	1%	0	0%
	Total n										186		204		350	

表十五. 預測為晚發型龐貝氏症患者之基因突變分析

Italic font represents published mutations. Variants in bold font represent novel variants with unknown clinical significance; .

No.	Lym	Fibroblast	Mutation-pat	Mutation-mat
NBSL 1	0.75	0.24	<i>c.752C>T,c.761C>T</i> (<i>p.S251L, p.S254L</i>)	<i>c.752C>T,c.761C>T</i> (<i>p.S251L, p.S254L</i>)
NBSL 2	0.8	0.14	c.2238G>C (p.W746C)	<i>c.2662 G>T</i> (<i>p.E888X</i>)
NBSL 3	1.27	0.53	<i>c.2662 G>T</i> (<i>p.E888X</i>)	c.1574 T>A (p.F525Y)
NBSL 4	1.45	0.27	c.424_440del17 (p.S142LfsX29)	c.533 G>A (p.R178H)
NBSL6	1.49	0.3	<i>c.1935C>A</i> (<i>p.D645E</i>)	<i>c.752C>T,c.761C>T</i> (<i>p.S251L, p.S254L</i>)
NBSL7	1.93	0.51	c.546+5 t>g	c.1080C>G (p.Y360X)
NBSL8	6.36	1.08	c.546+5 t>g	c.546+5 t>g
NBSL9	0.46	0.11	c.2238G>C (p.W746C)	<i>c.1935C>A</i> (<i>p.D645E</i>)
NBSL10	0.49	0.6	c.1324G>A (p.V442M)	<i>c.1843G>A</i> (<i>p.G615R</i>)
NBSL11	0.58	0.49	<i>c.752C>T,c.761C>T</i> (<i>p.S251L, p.S254L</i>)	c.1958C>A (p.T653N) E4-E11 deletion ?

表十六. 此家族基因突變與 deltaE6 RNA 之整理

	Allele 1		Allele 2		D6/total mRNA	GAA activity
	p.D645E	c.955	p.D645E	c.955	Lymphocytes	Lymphocytes (nmol/mg/hr)
Patient	+	+	-	+	11%	0.46
Mother	+	+	-	-	88%	18.25
Father	-	-	-	+	95%	51.47
Sister	+	+	-	+	12%*	0.68

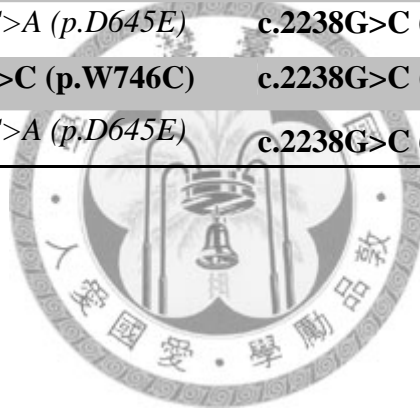
表十七. c.955+167 c>t 的盛行率

Group	Total	Wild-type (C/C)	Heterozygous (C/T)	Homozygous (T/T)	P (to control)	P (to carrier)
Normal control	290	264 (91.1%)	25 (8.6%)	1 (0.3%)		
Pompe carriers	69	31 (44.9%)	34 (49.3%)	4 (5.8%)	<0.0001	
Pompe patients	40	8 (25%)	22 (55%)	10 (20%)	<0.0001	0.003

表十八. 台灣地區晚發型龐貝氏症患者的基因突變

Italic font represents published mutations. Variants in bold font represent novel variants with unknown clinical significance.

No.	Mutation-1	Mutation-2
LOPD1	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.546+1G>T
LOPD2	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2T>C (p.M1?)
LOPD3	<i>c.1843G>A (p.G615R)</i>	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD5	<i>c.872T>C (p.L291P)</i>	<i>c.1798 C>T (p.R600C)</i>
LOPD6	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD7	c.1124 G>A (p.R375H)	<i>c.1375G>A (p.D459N)</i>
LOPD8	c.1822delC (p.R608DfsX88)	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD9	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD10	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	<i>c.2014C>T (p.R672W)</i>
LOPD11	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD12	c.2238G>C (p.W746C)	c.2238G>C (p.W746C)
LOPD13	<i>c.1935C>A (p.D645E)</i>	c.2238G>C (p.W746C)



第玖章、 相關論文

Chien YH, Lee NC, Peng SF, Hwu WL. Brain development in infantile-onset pompe disease treated by enzyme replacement therapy. *Pediatr Res*. 2006 Sep;60(3):349-52. (SCI 2.619; 15/86)

Chien YH, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, Lee NC, Huang AC, Chen CA, Wu MH, Huang PH, Tsai FJ, Chen YT, Hwu WL. Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. *Pediatrics*. 2008 Jul;122(1):e39-45.(SCI 4.789; 2/86)

Yin-Hsiu Chien, Ni-Chung Lee, Beth L. Thurberg, Shu-Chuan Chiang, Xiaokui Kate Zhang, Joan Keutzer, Ai-Chu Huang, Mei-Hwan Wu, Pei-Hsin Huang, Fuu-Jen Tsai, Yuan-Tsong Chen, Wuh-Liang Hwu. Pompe disease in infants: Improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics*, in press (SCI 4.789; 2/86).

Paul Labrousse,* Yin-Hsiu Chien,* Robert J. Pomponio, Joan Keutzer, Ni-Chung Lee, Viatcheslav R Akmaev, Thomas Scholl, Wuh-Liang Hwu. Role of Genetic Analysis in the Pompe Disease Newborn Screening Pilot Program in Taiwan. Submitted. (equal contribution) Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, Page L, Kishnani PS, Schoser BG, Chien YH, Ralston E, Nagaraju K, Plotz PH. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand...Autophagy. 2007 Nov-Dec;3(6):546-52.

Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, Leslie N, Levine J, Spencer C, McDonald M, Li J, Dumontier J, Halberthal M, Chien YH, Hopkin R, Vijayaraghavan S, Gruskin D, Bartholomew D, van der Ploeg A, Clancy JP, Parini R, Morin G, Beck M, De la Gastine GS, Jokic M, Thurberg B, Richards S, Bali D, Davison M, Worden MA, Chen YT, Wraith JE. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*. 2007 Jan 9;68(2):99-109.

Ralston E, Swaim B, Czapiga M, Hwu WL, Chien YH, Pittis MG, Bembi B, Schwartz O, Plotz P, Raben N. Detection and imaging of non-contractile inclusions and sarcomeric anomalies in skeletal muscle by second harmonic generation combined with two-photon excited fluorescence. *J Struct Biol*. 2008 Jun;162(3):500-8.

全文完