

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

ペルオキシソーム膜ABCタンパク質の構造と機能

分担研究者 今中 常雄 富山医科薬科大学・薬学部・教授
研究協力者 守田 雅志 富山医科薬科大学薬学部分子細胞機能学

ALDP との相互作用が予想されるペルオキシソーム膜主要構成タンパク質 PMP70 の構造と機能について詳細な解析を行った。その結果、PMP70 は長鎖脂肪酸 CoA に特異性をもつ輸送担体であること、機能ドメインとして EAA like motif、Walker A、B motif が重要であること、ATPase 活性をもつことを明らかにした。また細胞内における PMP70 の過剰発現は、ALDP の関与が推定される極長鎖脂肪酸 β 酸化を抑制すること、PMP70 と ALDP のヘテロダイマー形成は、ALDP の ATP に対する親和性を変化させることを見いだした。

A. 研究目的

ALD の原因となるペルオキシソーム ABC タンパク質 ALDP は極長鎖脂肪酸代謝に関与しているが、その機能の詳細は不明である。一方、ペルオキシソーム膜には主要構成タンパク質として ALDP とホモロジーの高い PMP70 が存在している。そこで今回、PMP70 の構造と機能、細胞内における役割、ALDP との相互作用の可能性を解析した。

B. 研究方法

野生型、変異型 PMP70 cDNA を CHO 細胞に導入し、安定過剰発現細胞を作製した。各 PMP70 の発現量、細胞内局在性を検討するとともに、 $[1-^{14}\text{C}]$ palmitic acid、 $[1-^{14}\text{C}]$ lignoceric acid を用い β 酸化活性を測定した。PMP70 のヌクレオチド結合ドメインを含む C 末側半分をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大量精製し、ATPase 活性を測定した。ラット肝ペルオキシソームを用い、8-azido- $[^{32}\text{P}]$ ATP による photoaffinity label を行い、抗 PMP70 ならびに ALDP 抗体による co-immunoprecipitation 等により PMP70、ALDP に対する ATP 親和性を検

討した。

(倫理面での配慮)

実験動物としてはラットを用いたが、エーテル麻酔下苦痛を与えずに脱血死させ、肝臓を摘出し実験に供した。

C. 研究結果

野生型 PMP70 過剰発現 CHO 細胞は対照と比較し、palmitic acid の β 酸化は 2-3 倍亢進したが、lignoceric acid の β 酸化は 30-40% 抑制された。一方、変異型 PMP70 過剰発現細胞では、palmitic acid ならびに lignoceric acid の β 酸化が顕著に抑制された。また大腸菌で PMP70 を発現させることにより、PMP70 が ATPase 活性をもつことをはじめて示した。photoaffinity label の実験により、PMP70 ならびに ALDP が ATP に対して親和性をもつこと、ALDP の ATP に対する親和性は PMP70 とのヘテロダイマー形成により増加することが明らかになった。

D. 考察

PMP70 は ATP の加水分解を介し、ペルオキシソーム内に長鎖脂肪酸 CoA を輸送するトラ

ンスポーターであると考えられる。またその過剰発現は極長鎖脂肪酸代謝を抑制することより、PMP70のペルオキシソーム膜での増加は、ALDPのペルオキシソームへの局在化もしくはALDPの機能を抑制していると推定される。さらにATP photoaffinityの結果は、ALDPのATP加水分解のサイクルがPMP70により抑制されるためと推定される。

E. 結論

PMP70は長鎖脂肪酸代謝CoAに特異性をもつ輸送担体であることが明らかになった。またPMP70の一部はALDPとヘテロダイマーを形成し、ALDPの機能に影響を与えることが示唆された。今後、ALDPの構造と機能の詳細、ALDPと他のABCタンパク質との相互作用、オリゴデンドログリア細胞でのALDPの存在状態、ALDP欠損と脂質代謝の変動を解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imanaka T., Aihara K., Takano T., Yamashita A., Sato R., Suzuki Y., Yokota S., and Osumi T. : Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 274 (17), 11968-11976, 1999.
- 2) Yamasaki M., Hashiguchi N., Fujiwara C., Imanaka T., Tsukamoto T., and Osumi T. : Formation of peroxisomes from peroxisomal ghosts in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant upon complementation by protein microinjection. *J. Biol. Chem.* 274 (50), 35293-35296, 1999.
- 3) Nakagawa, T., Imanaka, T., Morita, M., Ishiguro, K., Yurimoto, H., Yamashita, A., Kato, N., and Sakai, Y. : Peroxisomal

membrane protein pmp 47 is essential in the metabolism of middle-chain fatty acid in yeast peroxisomes and is associated with peroxisomal proliferation. *J. Biol. Chem.* 275 (5), 3455-3461, 2000.

- 4) 今中常雄：ABC トランスポーター：医薬開発のターゲット(2), 脂質代謝との関連性. *バイオサイエンスとインダストリー* 58 (2), 101-104, 2000.

2. 学会発表

- 1) 中川智行, 今中常雄, 守田雅志, 加藤暢夫, 阪井康能：酵母ペルオキシソーム膜トランスポーター pmp47 は中鎖脂肪酸の活性化に必要である. 第72回日本生化学会, 1999, 10, 横浜.
- 2) 加藤佳樹, 柏山恭範, 岡村昭治, 守田雅志, 今中常雄：昆虫細胞 Sf9 とペルオキシソーム. 第72回日本生化学会, 1999, 10, 横浜.
- 3) 宇根端穂, 坂本明子, 倉本載寿, 今中常雄：胆汁酸生合成中間体のペルオキシソーム膜輸送に関する研究. 第72回日本生化学会, 1999, 10, 横浜.
- 4) 山崎正稔, 橋口典代, 藤原千春, 今中常雄, 塚本利朗, 大隅 隆：Pex タンパク質のマイクロインジェクションによるペルオキシソーム回復過程の解析. 第72回日本生化学会, 1999, 10, 横浜.
- 5) 塚本利朗, 橋本典代, 藤原千春, 今中常雄, 原口徳子, 平岡 泰, Baumgart E., 横田貞記, 大隅 隆：PEX6 欠損 CHO 細胞におけるペルオキシソーム膜形成の異常. 第72回日本生化学会, 1999, 10, 横浜.
- 6) 今中常雄：ABC トランスポーターの多様性と生命維持機構. 第27回薬物活性シンポジウム・プレコングレス, 1999, 10,

福井.

- 7) 今中常雄, 守田雅志: ペルオキシソーム ABC トランスポータの構造と機能. 第 22 回日本分子生物学会, 1999, 12, 福岡.
- 8) 橋本典代, 塚本利朗, 藤原千春, 今中常雄, 原口徳子, 平岡 泰, Baumgart E., 横田貞記, 大隅 隆: PEX6 欠損細胞におけるペルオキシソーム膜形成の異常. 第 22 回日本分子生物学会, 1999, 12, 福岡.

- 9) 田中亜路, 宮木崇典, 今中常雄, 木岡紀幸, 天知輝夫, 植田知光: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質のヌクレオチドとの反応性の解析. 第 22 回日本分子生物学会, 1999, 12. 福岡.

F. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

副腎白質ジストロフィーに対する骨髄移植の現況

分担研究者 加藤 俊一 東海大学医学部小児科学教室 助教授
研究協力者 矢部普正¹⁾、服部欽哉¹⁾、保田由喜治¹⁾、松本正栄¹⁾、矢部みはる¹⁾、C. Peters²⁾
1) 東海大学医学部小児科学教室
2) ミネソタ大学小児科

研究要旨 副腎白質ジストロフィーに対して骨髄移植や臍帯血移植などの造血幹細胞移植を実施した6例の臨床経過と効果について検討した。移植結果と効果は移植時のIQと強く相関し病初期で移植を実施できた症例ほど移植後の精神神経症状に改善が認められ、MRIでの白質病変の進行が停止している。

A. 研究目的

東海大学でこれまでに実施した移植症例について、移植時期、移植方法、ドナーとの組織適合性などと移植結果と臨床効果についての検討を討することを研究目的とした。

B. 研究方法と対象

1996年2月から1999年10月までの期間に東海大学で骨髄移植または臍帯血移植を実施した6例の副腎白質ジストロフィー(ALD)の男児を対象とした。

6例の移植時年齢は5歳4カ月から10歳6カ月(中央値7歳7カ月)で、移植時の臨床状態は発症前1例、初期1例、中期1例、中期～晩期2例、晩期1例であった。これらの症例における副腎白質ジストロフィーの診断時期は1歳11カ月から9歳7カ月(中央値7歳2カ月)であった(表1)。

ドナーは3例がHLA一致同胞、1例がHLA1抗原不一致同胞、2例が非血縁者であった。1例において最初の移植が拒絶されたため、同一ドナーからの再移植が行われた。移植細胞は3例4回の移植が骨髄、3例3回の移植が臍帯血であった。

移植前処置は2回の移植で放射線照射を含めたレジメン、5回の移植で非照射レジメンを用いた。GVHD予防は6回の移植でシクロスポリン単独もしくはメソトレキセートかプレドニンとの併用、1回の移植でFK506を用いた。またHLA1抗原不一致同胞からの移植例でT細胞除去を行った。

すべての症例において患者とドナーの両親に対して十分な説明を行い、書面にてインフォームド・コンセントを取得した。

C. 研究結果

a) 生着

ドナー由来の造血幹細胞の生着は5回の移植で得られたが、T細胞除去の1例と非血縁者間臍帯血移植の1例で拒絶による自己造血能の回復が認められた。

b) G V H D

急性G V H Dは0度4例、I度2例であった。慢性G V H Dは長期生存4例のいずれにも認められていない。

c) 転帰

2000年1月の段階で6例中5例が生存中である。臍帯血移植を受けて拒絶された症例は、他院において別の臍帯血移植後に死亡した。

d) 臨床効果

6例において移植後3～44カ月の期間における神経症状やMRIの変化を検討した(表2)。

① 神経症状

Petersらの提唱するdementia rating score(DRS)を用いて運動、会話について評価すると、移植時0であった3症例では移植後も0の状態が維持されており、2から3に進行した症例、3から2に改善した症例、4のままで改善が認められなかった症例がそれぞれ1例ずつであった。視力、聴力、IQの詳細は表2と図1に示した。

② MRI 所見

6例における移植前後のMRIでの脱髄パターンとスコアは表2と図2に示すとおりで、神経症状のDRSとほぼ相関した。

③ 極長鎖脂肪酸

各症例の極長鎖脂肪酸は移植後徐々に低下した(図3)。

D. 結論と考察

ALDにおいてはその遺伝的特徴から家系内発症が多く、患者あるいは保因者の推測ができる場合が少なくない。これらの症例では定期的な診察と検査により小児期発症の脳性ALDをできるだけ早期に診断し、移植が必要と判断された症例には早期に移植が実施されることが重要である。

最も理想的なドナーはHLA一致の同胞であるが、HLA一致の同胞が得られる確率は4分の1にすぎず、またALD患児においては同胞も患者であることがあり、他の疾患にくらべ同胞ドナーが存在する確率は低い。そのため、HLA一致同胞以外の血縁ドナー、HLA一致の非血縁骨髄ドナー、HLA部分一致の非血縁臍帯血ドナーなどを探し出す努力が必要となる。

ALDなどの代謝異常疾患においては患者の免疫能が正常であるため、移植した骨髄や臍帯血が拒絶されることが多く、とくに臍帯血移植においては生着不全が大きな問題となる。移植前処置の強化や細胞数の多い臍帯血の選択などにより生着率を高めることが考えられている。

以上より、小児期発症の脳性ALDにおいてはできるだけ早期の造血幹細胞移植が望まれる。

表 1 . 症例の概要

症例	UPN	移植時 年齢	神経学的 進行度	診断時 年齢	移植後の 観察期間	生着	臨床的 改善
1	215-1	10歳3ヶ月	初期	9歳7ヶ月		拒絶	
	215-2	10歳6ヶ月	初期	9歳7ヶ月	44ヶ月	完全	進行停止
2	241	5歳4ヶ月	発症前	1歳11ヶ月	37ヶ月	完全	発症なし
3	316	9歳0ヶ月	中期	8歳6ヶ月	16ヶ月	拒絶	死亡
4	317	7歳3ヶ月	中～晩期	7歳2ヶ月	16ヶ月	完全	進行
5	336	6歳10ヶ月	中～晩期	6歳6ヶ月	10ヶ月	完全	進行停止
6	345	7歳7ヶ月	晩期	7歳2ヶ月	3ヶ月	完全	進行停止

表 2 . 移植前後の神経症状の変化

症例	観察 期間	運動 (DRS)	会話	視力 右/左	聴力 (dB)	IQ
1	44ヶ月	0→0	0→0	0.9/1.0→0.9/1.0	正常→正常	88→78
2	37ヶ月	0→0	0→0	正常→正常	正常→正常	98→93
3	16ヶ月	0→0	0→0	0.3/0.7→0.15/0.2	27.5/33.8→NT	81→NT
4	16ヶ月	2→3	2→3	0.06/0.05→NT	46.3/40.8→NT	52→NT
5	10ヶ月	3→2	3→2	0.2/0.2→0.4/0.4	難聴→23.8/61.3	49→47
6	3ヶ月	4→4	4→4	NT→NT	NT→NT	NT→NT

移植前→移植後

表 3 . MRI の脱髄所見とスコア

症例	脱髄パターン	移植前	移植後	
			時期	SCORE
1	前頭葉	5	38ヶ月	5.5
2	なし	0	39ヶ月	0
3	後頭葉	9	4ヶ月	9
4	頭頂-後頭葉	12	10ヶ月	13
5	頭頂-後頭葉	11	9ヶ月	12
6	びまん性	23.5	3ヶ月	26

図 1 . 移植後のMRIスコア推移

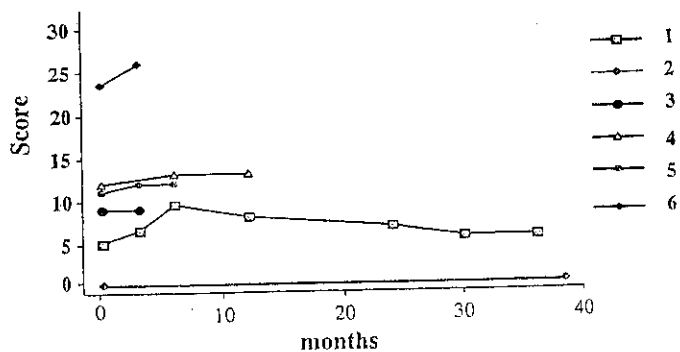


図 2 . 移植後のIQの推移

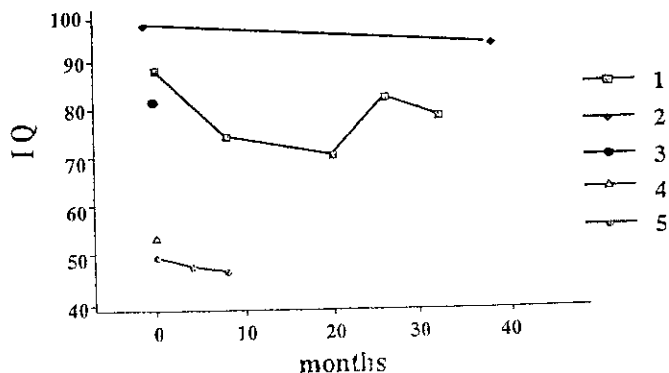
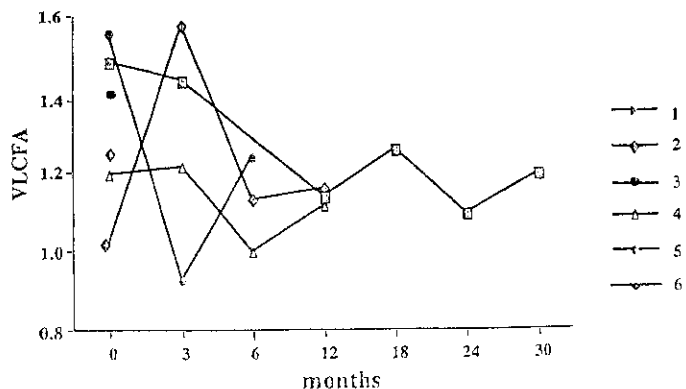


図 3 . 極長鎖脂肪酸の推移



厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

副腎白質ジストロフィーの治療法開発のための臨床的及び基礎的研究

分担研究者 辻 省次 新潟大学脳研究所神経内科・教授

研究要旨

Adrenoleukodystrophy に対する有効な治療法を開発することを目的とした。この目的のためには多数例の解析が不可欠である。このため国際的に症例を集積、解析しようという試みがなされている。Johns Hopkins 大学の Dr. Moser らを中心に行われている Multicenter Therapeutic Trials of X-linked Adrenoleukodystrophy にわが国が参加するにあたっての諸問題について検討を行った。この治験計画のプロトコールは妥当なものであり、わが国においても、参加、実施が可能であると考えられる。国際共同治験を実施する上での問題点として、1. 神経心理学的検査の標準化の問題 (cross-cultural difference をどう克服するか)、2. 神経心理学的検査を実施するにあたりわが国のインフラの整備、3. DICOM 非対応の MRI 装置で撮影された MRI 画像をどのような形で DICOM フォーマット化し centralized masked reading を実施するかという点が検討課題であることが明らかとなった。

研究目的

ALD の治療については、これまでに、極長鎖脂肪酸を低下させることを目的として、極長鎖脂肪酸の摂取制限(食餌療法)、ロレンゾ油(主成分はオレイン酸、エルカ酸で、これらの単価不飽和脂肪酸が極長鎖脂肪酸合成系を抑制することにより極長鎖脂肪酸を低下させると考えられている)が試みられてきているが、これらによって血漿極長鎖脂肪酸は低下するものの、臨床的改善が得られるかどうかについては、ロレンゾ油投与が始まって 10 年ほど経過したにもかかわらずいまだに確立されていない。その原因としては、evidence-based medicine の立場から、placebo-controlled clinical trial のプロトコールの上に実施されなかったことによる。このような背景から、ALD の治療薬の検討を行っていくためには、placebo-controlled clinical trial の実施が必須であると考えられる。一方、ALD は白質ジストロフィーの中では最も頻度の高い疾患であるとはいえ、1980-1990 年

の 10 年間に關して行われた厚生省酵素障害研究班の調査結果からは、おおよそ 200 名の ALD 症例の存在が推定された。また、わが国の出生男児数万人あたり 1 名程度と発生頻度が推定されており、わが国単独で、placebo-controlled clinical trial の実現は不可能であり、国際的な共同治験の体制が必須となる。米国においても、頻度は 5 万人に 1 名と推定されており、やはり単独での共同治験の実施は非常に困難な状況にある。

1998 年になり、Singh らによって、lovastatin が培養皮膚線維芽細胞で、極長鎖脂肪酸を速やかに低下させることが発見された。引き続いて 4 例の ALD 発症者、1 例の発症前 ALD 男児、あるいは 2 例の女性キャリアーに投与され、投与後 1 ヶ月以内に極長鎖脂肪酸が正常化することが報告された。極長鎖脂肪酸低下に対する効果はロレンゾ油に比較して顕著であるものの、ALD の臨床型、臨床経過が多彩であることを考慮すると、placebo-controlled

trial が必須であると考えられる。

このような背景から、lovastatin を用いた国際共同治験の実施に向けての準備が、Johns Hopkins 大学の Dr. Moser を中心として具体化し、わが国もこれに参加して、国際共同治験の実施をする方向で検討に入った。国際共同治験を成果のあるものにするためには、プロトコールの立案、臨床症状、所見の評価、画像所見の評価などさまざまな検討課題があり、本年度は、その実施に向けての問題点について重点的に検討を行った。

研究方法

国際共同治験のプロトコールに関する検討

Multicenter Therapeutic Trials of X-linked Adrenoleukodystrophy について、主としてわが国で実施する際の問題点についての検討を行った。

- ①神経学的所見の評価、神経心理学的評価に関する検討
- ②centralized masked reading of MRI images についての検討

研究結果

プロトコールの内容に関する検討

ALD に対する lovastatin の臨床効果についての国際共同治験計画の骨子は次の通りである。①X-ALD の治療効果を客観的に評価できるインフラの整備と施設間ネットワークを確立する、②各年度少なくとも 100 例の ALD 症例、20 例の発症キャリアーの方々に治験に参加してもらうようにする、③ lovastatin, placebo について、1:1 の無作為割り当てを行う、④臨床効果についての評価を行う、⑤新しい治療法についても検討する。

①については、国際的に協力体制の構築が既に完了しており、わが国は本研究班が参加することで、十分な対応ができると考えられる。

②に関しては、わが国では、これまでの易学的なデータを参考にすると ALD 発症者については年間 20 名程度の参加が可能であると予測されている。

③～⑤については、このような国際共同治験の場合、特に各国での神経心理学的な評価、神経学的所見などをいかに標準化するかという点が問題となる。この点に関しては、できる限り cross-cultural difference が出にくい形の検査方法の統一作業を国際的な協力の下に進める必要がある。一方、画像所見はこのような cross-cultural difference の問題を避け客観的な評価が行えるという点で利点があり、中央化して目隠し読影(masked reading)を行うことが重要であると考えられる。

神経心理学的検査に関する問題点

本年 2 月 21 日に Johns Hopkins 大学 Kennedy Krieger Institute において、Dr. Moser が NIH に提出した Multicenter Therapeutic Trials of X-linked Adrenoleukodystrophy の申請に対する NIH による site visit が行われた。その場に辻が出席したが、site visit team からも、cross cultural difference に対していかに対処するかという点が質問として出された。この点に関しては、各国毎に randomize するなどを行うことの必要性が確認された。このプロトコールでは、3-5 才の症例に対しては WPPSI を、6-16 才の症例に対しては WISC III を、17 歳以上の症例に対しては WAIS-R を行うことになっている。これらの検査についてはわが国においても既に標準化作業が完了しているものであるのでその実施に際しては、問題がないと考える。ただ、これらに加えて、Benton Test of Judgment of Line Orientation, Rey-Osterreith Figure, Stanford Binet Bead Memory subset, Rye Auditory Verbal Learning Test, Verbal Fluency, Tests of Variables of Attention Measures of Physical

and Psychological Adjustment, The Symptom Checklist-90 などが計画されており、これらについてはわが国でどのように導入するかという点に関してはさらに検討が必要であり、次年度の検討課題とした。また、わが国においては、ほとんどの医療機関で、神経心理学の検査を担当できるスタッフが充実していないという問題点もあり、この点もわが国のインフラをどのように整備充実させていくかという点が課題であり次年度の検討課題とした。

神経心理学的検査は、このような国際共同治験の際に、cross-cultural difference をどのように克服するかが最大の問題点となる。わが国において標準化作業の終了している、WAIS, WISC については実施は原理的に可能であるが、標準化の終了していない検査方法については、米国の神経心理学者と引き続き検討を要する。また、わが国においては、神経心理学検査を実施できる施設が非常に限られているという問題点があり、インフラストラクチャーをどのように整備するかが過大となる。この点に関しては、次年度において、小児の神経心理学の専門家を研究班員に迎えさらに検討を加える予定である。

画像所見の centralized masked reading についての問題点

ALD の臨床表現型が多彩であること、国際共同治験の場合に、特に神経心理学的検査で cross-cultural difference の問題がある。これに対して、画像診断は、このような問題とは無関係に客観的に評価できるという点で大きな利点があると考えられる。Multicenter Therapeutic Trials of X-linked Adrenoleukodystrophy では、MRI 画像を一カ所に集積し目隠し読影 (centralized masked reading) が計画されている。これを実現するためには、DICOM フォーマット化された MRI 画像ファイルをインターネットにより転送することが

必要となる。本年度において、新潟大学と米国 George Washington 大学の間で、DICOM フォーマット化された MRI 画像ファイルの転送実験が行われ、画像ファイルの転送が問題なく実施できることを確認した。国内においては、DICOM 対応が整備されている施設は限られており、DICOM 対応の整備がなされていない MRI 装置を用いて撮影された画像ファイルをどのように DICOM フォーマットに変換するかという点も次年度の検討課題である。

考察

神経学的所見の評価については、大きな問題なく実施できると考えられる。神経心理学的検査については、国際的な標準化作業の完了しているものは実施可能であるが、標準化がされていない検査方法については、米国の神経心理学者とさらに標準化に関連する問題を検討する必要がある。実施面においては、拠点病院のような施設を設け十分な神経心理学検査が実施できる体制の整備が必要であり、この点に関しては次年度、小児科領域の神経心理学者の参加を得てさらに検討を加える。

MRI 画像を、DICOM フォーマット化してインターネットにより転送する技術については問題点なく実施可能であることを確認した。問題点としては、わが国の病院の多くは未だに DICOM フォーマットに対する対応が完了しておらず、そのような施設で撮影された MRI 画像をいかに DICOM フォーマット化して転送するかという点が検討課題である。この点についても、次年度において、具体的な対応策としてどのような方法が最も有用であるかを検討する。

結論

本年度、Multicenter Therapeutic Trials of X-linked Adrenoleukodystrophy をわが国で実施する場合の諸問題について検討を行った。

この治験計画のプロトコールは妥当なものであり、わが国においても、参加、実施が可能であると考えられる。国際共同治験を実施する上で
の問題点として、1. 神経心理学的検査の標準化の問題 (cross-cultural difference をどう克服するか)、2. 神経心理学的検査を実施するためのわが国のインフラの整備、3. DICOM 非対応の MRI 装置で撮影された MRI 画像をどのような形で DICOM フォーマット化し、centralized masked reading を実施するかという
点が検討課題であることが明らかとなり、次年度においてこれらの点を重点的に検討することにする。

研究発表

1. 論文発表

Takano H, Koike R, Onodera O, Sasaki R and Tsuji S, Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of 29 unrelated Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD). Arch Neurol 1999 56:295-300.

Aoyagi Y, Kobayashi H, Tanaka K, Ozawa T, Nitta H and Tsuji S, A de novo splice donor site mutation causes in-frame deletion of 14 amino acids in the proteolipid protein in Pelizaeus-Merzbacher disease. Ann Neurol 1999 46:112-115.

2. 学会発表

なし

知的所有権の取得

なし

IV. ワークショップ

「副腎白質ジストロフィー症の骨髄移植の臨床的効果」総括

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

ワークショップ「副腎白質ジストロフィー症の骨髄移植の臨床的効果」

Session 1 「リソソーム病の骨髄移植」

総括 加藤 俊一 東海大学医学部小児科学教室

研究要旨 副腎白質ジストロフィー以外の先天性代謝異常疾患に対する造血幹細胞移植に関するワークショップを行い、国内における移植例の把握を行った。最も多くの移植例があるのはムコ多糖症で、わが国での特徴はII型のハンター病での移植例が多い点である。重症型のハンター病では関節拘縮、低身長、肝脾腫、聴力障害などの身体症状は移植にて著明に改善するが、中枢神経障害の改善は少なかった。

A. 研究目的

ムコ多糖症、リビドーシスなどの先天性代謝異常疾患に対する根治療法として実施されている骨髄移植などの造血幹細胞移植について、長期間の観察による臨床効果の評価を行い、今後の移植の適応に関するガイドラインを作成するための資料とすることを研究目的とした。

本報告はワークショップのまとめという性質上、以下の記載を各発表者別に記述することとする。

B. 研究方法と対象、C 研究結果

1. 中林啓記(日本大学駿河台)

ハンター病2例、モルキオ病1例、ALD1例の移植結果の報告があり、ハンター病においては皮膚の軟化、肝脾腫の消失、関節可動域の拡大など著明な改善があっ

たが、IQは移植後も低下した。

2. 塚本浩子(大阪大学小児科)

3例のリソソーム病に対する骨髄移植の経過について報告があった。ハンター病症例では肝脾腫、皮膚関節症状、運動能力は改善し、心弁膜症も進行緩徐となったが、精神発達遅滞の改善は認めない。Hurler-Scheieの症例では皮膚関節症状、臍ヘルニア、角膜混濁、心弁膜症に効果が認められた。

3. 田中あけみ(大阪市大小児科)

ムコ多糖症に対する骨髄移植後の効果を客観的に評価するプロトコルの紹介があった。とくにMRIとMRSを用いて脳の画像所見をスコア化して評価する方法が注目された。

4. 祐川和子(岐阜大学小児科)

全国的な調査によりハンター病13例の移植後の臨床効果を評価した。肝脾腫、皮膚硬化については

全例で、関節拘縮、難聴、弁閉鎖不全は症例により改善がみられたが、骨の変形、精神発達遅延への明らかな効果は確認できなかった。

5. 服部欽哉（東海大学小児科）

8例のハンター病の移植後の評価を行い、生着例では全例で酵素活性の正常化、肝脾腫、皮膚軟化、関節拘縮、弁膜症、難聴の改善または進行停止が認められているが、IQは低下している症例があり、神経症状への効果は十分でない可能性が示された。

6. 加藤剛二（名古屋第一日赤）

4例のムコ多糖症に対して造血幹細胞移植が行われ、全例が生着し生存中である。骨格変形の改善は認められないが、VII型の症例で神経症状と運動能力に著明な改善が認められている。

なお、移植の実施に関する同意は各施設のインフォームド・コンセントの規則と様式によって取得された。

D. 結論と考察

ムコ多糖症に対する骨髄移植の効果は病型により内容と程度が異なることが国際的な調査により明らかにされてきた。I型のハーラー病においては2歳以下でIQが70以上の症例であれば、身体症状だけでなく精神神経症状に対する効果も認められることが多くの報告で確認されている。

しかし、II型のハンター病では欧米における移植例数が少なく、正確な評価が未確定となっていた。

ハンター病はわが国で多い病型であり、移植例数も多いことから、日本における解析が望まれていた。今回の調査と各施設からの報告によりその概要が明らかになったといえる。

肝脾腫、皮膚硬化、関節拘縮などの症状はほぼ全例で消失し、患児の日常生活は著明に改善している。難聴は中耳炎の合併頻度の低下により種々の程度で改善している。心弁膜症については一部の症例で改善が認められているものの、緩徐に進行している症例もある。知能や精神神経症状に対する効果はハーラー病ほどのものはないが、症例毎に経過をみると進行の停止と部分的な改善が認められる場合もある。

以上の結果より、ハンター病における造血幹細胞移植の適応は症例の重症度とドナーとのHLA適合性によって決めるべきものと考えられる。

1. 中枢神経症状を伴わない軽症型では、HLA一致同胞からの骨髄移植が適応となる。

2. 中枢神経症状を伴う重症型では出来るだけ早期に造血幹細胞移植を行うことが望ましく、HLA一致同胞、HLA一致非血縁者からの骨髄移植が適応となる。

3. 臍帯血移植については生着不全が多いことから、十分な細胞数が確保される場合に適応と考えられる。

本総括は下記の先生方との共同報告である(敬称略)

Session1

中林啓記¹⁾、大和田 操¹⁾、陳 基明²⁾、麦島秀雄²⁾

¹⁾駿河台日本大学病院小児科

²⁾日本大学板橋病院小児科

塚本浩子、乾 幸治、岡田伸太郎

大阪大学大学院医学研究科小児発達医学

田中あけみ¹⁾、瀬戸俊之²⁾、服部英司¹⁾

¹⁾大阪市立大学医学部小児科

²⁾PL病院小児科

祐川和子¹⁾、加藤俊一²⁾、青島 努³⁾、綾目秀夫⁴⁾、乾 幸治⁵⁾、大浦敏博⁶⁾

大和田操⁷⁾、工藤 亨⁸⁾、小林潤一郎⁹⁾、四宮範明¹⁰⁾、花木啓一¹¹⁾

¹⁾岐阜大学医学部小児科

²⁾東海大学医学部小児科

³⁾名古屋大学医学部小児科

⁴⁾山口大学医学部第3内科

⁵⁾大阪大学医学部小児科

⁶⁾東北大学医学部小児科

⁷⁾日大駿河台病院小児科

⁸⁾札幌医科大学小児科

⁹⁾明治大学文学部心理学科

¹⁰⁾東邦大学大橋病院小児科

¹¹⁾鳥取大学医学部小児科

服部欽哉¹⁾、矢部普正¹⁾、矢部みはる¹⁾、松本正栄¹⁾、保田由喜治¹⁾

加藤俊一¹⁾、祐川和子²⁾、折居忠夫²⁾

¹⁾東海大学医学部小児科

²⁾岐阜大学医学部小児科

加藤剛二¹⁾、青島努²⁾、重松陽介³⁾、岡田純一⁴⁾、祐川和子⁵⁾
折居忠夫⁶⁾、松山孝治¹⁾

¹⁾名古屋第一赤十字病院小児血液腫瘍科

²⁾名古屋大学医学部小児科

³⁾福井医科大学医学部小児科

⁴⁾トヨタ記念病院小児科

⁵⁾岐阜大学医学部小児科

⁶⁾中部学院大学

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

ワークショップ「副腎白質ジストロフィー症の骨髄移植の臨床的効果」

Session 2 「ALDの骨髄移植」

総括 辻 省次 新潟大学脳研究所神経内科

研究目的

「副腎白質ジストロフィーの治療法開発のための臨床的及び基礎的研究」においては、副腎白質ジストロフィーの有効な治療法の確立を目指して、1. ロバスタチンの国際共同治験、2. 骨髄移植による治療効果の評価、の2つを大きな柱として研究を行っている。

副腎白質ジストロフィー(adrenoleukodystrophy, ALD)は進行性の脱髄と副腎皮質機能障害を主徴とするX染色体連鎖劣性遺伝性疾患である。臨床的には、学童期の男児が学習障害・視力聴力障害などで発症し数年の経過で進行し植物状態に至る小児型、成人になってから発症し多彩な神経症状を示す成人型、副腎不全を主徴とするAddison病型、女性保因者、などの多彩な病像を呈する。ALDは白質ジストロフィーの中では最も頻度の高い遺伝性神経疾患であり、小児から成人にいたる幅広い年齢層で発病する予後不良の難病である。

ALDの治療については、極長鎖脂肪酸を低下させることを目的として、極長鎖脂肪酸の摂取制限(食餌療法)、ロレンゾ油(主成分はオレイン酸、エルカ酸で、これらの単価不飽和脂肪酸が極長鎖脂肪酸合成系を抑制することにより極長鎖脂肪酸を低下させると考えられている。J. Neurol. Sci. 103: 188-194, 1991)が試みられてきているが、これらによって血漿極長鎖脂肪酸は低下するものの、臨床的改善が得られるかどうかについては、ロレンゾ油投与が始まって10年ほど経過したにもかかわらずいまだに確立されていない。

一方、1990年にAubourgらにより、骨髄移植が発症早期のALD男児に対して行われ、臨床効果があったという報告がされて以来、骨髄移植が試みられてきているが、十分な数の症例を対象とした客観的な治療成績の報告がなされておらず、骨髄移植の治療効果についても未だに確立されたといえる段階にはない。

このような背景からわが国においても、散発的にALDに対する造血幹細胞移植が行われるようになってきているものの、これまでにまとまった報告はなく、その臨床的効果の位置づけについても評価が定まっていない。

そこで、平成11年度において、これまでにわが国で行われた、ALDに対する造血幹細胞移植例の全例について、担当医に一同に会してもらい、その治療成績について検討を行うことを目的として、副腎白質ジストロフィーに対する骨髄移植をテーマとしてワークショップを開催した。さらに、副腎白質ジストロフィーの骨髄移植について、世界で最も多くの症例の経験を有しているミネソタ大学のDr. Charles Petersにもこのワークショップに参加を求め、これまでの経験例(126例)の報告をいただくとともに、わが国の造血肝細胞移植例についての意見の交流を行った。

結果

ALDに対して、これまでにわが国で実施された造血幹細胞移植例として18例の報告があった。このうち、14例が発症ALD男児に対して行われ、4例が発症前男児に対して行われたものであった。発症ALD男児に対して行われた移植例は、発症時年齢(5.6~10才、平均7.4才)、移植時年齢(6.4~11.8才、平均8.4才)、移植後観察期間(2~72ヶ月、平均22.8ヶ月)であった。

予後としては、明らかに進行が停止した例が1例、移植後症状の進行は認められたもののその後進行が停止したと考えられ、ある程度の臨床効果があるのではないかと考えられた例が2例であった。残りの症例は、移植後も症状が進行したか、あるいは移植後相当に進行した状態にあり、移植による改善が認められなかった例である。移植の効果があったと考えられる例は、発症後10ヶ月で比較的神経症状の軽いときに移植が実施されていた。骨髄移植時の前処置(conditioning)中に神

経症状の悪化が認められた例があり、骨髄移植に際しての前処置の問題点については次年度さらに検討を加える予定である。

発症前男児に対して行われた例については、移植時年齢(1.8~9.5才、平均6.1才)で、移植後観察期間が(21~134ヶ月、平均65.5ヶ月)であるが、この間においては神経症状の出現は認めていない。ALDの発症年齢については多彩であり、発症年齢を予測できないことから、これらの移植例についてはさらなる観察を続けることと、本研究班で次年度の活動として計画しているALDの自然歴についての調査結果と比較を行いながら、その効果についての検討を加えていく必要がある。

考察

本年度18例の造血幹細胞移植例について、その臨床経過の報告をいただいた。検討課題として次のような課題を設定した。

1. ALDの骨髄移植の臨床的効果について

18例の造血幹細胞移植例の中に、臨床的に効果があったとする報告例が3例認められた。臨床的には症状の進行が停止したものの、発症前の状態にまで回復した例はなかった。これらの症例は発症早期に骨髄移植が行われており、従来から言われているように早期移植例が効果的であることを示唆している。しかしながら、一方で、早期に骨髄移植が行われたにもかかわらず症状の進行を認めた例もあり、骨髄移植の臨床効果を左右する因子については、さらに詳細に検討を加える必要がある。

2. 発症前ALDに対して造血幹細胞移植は発症を予防できるか？

ALDの発症年齢は小児期から成人期までと幅が広く、同一家系内においても発症年齢、臨床型は多様である。また遺伝子変異の分析からは、明らかなgenotype-phenotype correlationは認められていない。このような背景から、発症前男児については、発症年齢が予測できないために、発症前男児に対して行われた造血幹細胞移植の臨床効果(発症に対する予防効果、症状の進行に対する抑制効果)の判定は困難である。今回報告された骨髄移植実施例については、今後の経過についての観察を継続する必要がある。さらに、現在本研究班において、全国規模の疫学調査を実施してALDの自然歴についての調査を次年度施行する予定であり、

そこで得られるALDの自然歴と比較して、発症の予防に効果があるかどうかについての検討を行う必要もある。

3. 骨髄移植に関連する問題点

今回のワークショップでの検討で問題となった点は、臍帯血移植を行った4例中2例が死亡しており、臍帯血移植における問題点についてさらに検討を行う必要がある。また、骨髄移植の前処置(conditioning)中に神経症状の悪化が認められた症例が散見された。これが、たまたま原疾患(ALD)の増悪期に一致したものか、あるいは、前処置に用いた薬剤の影響があるのかどうかについても検討を行う必要がある。

ALD発症者の同胞をドナーとしての骨髄移植が多く行われているが、その中に保因者がドナーとして4名含まれていた。(この他にも保因者であるかどうかの確認が行われていない場合もある)。保因者がドナーとなった場合の、臨床効果に違いがあるか、血中極長鎖脂肪酸の推移などについて次年度さらに検討を加える必要がある。

4. 極長鎖脂肪酸の改善が認められるか？

ドナーが非保因者である場合、保因者である場合のそれぞれについて、移植後血中極長鎖脂肪酸がどのように推移するかという点に関しては、今回のワークショップでは十分なデータが得られなかった。この点に関しては、次年度以降可能な範囲で追跡調査を行う必要性がある。

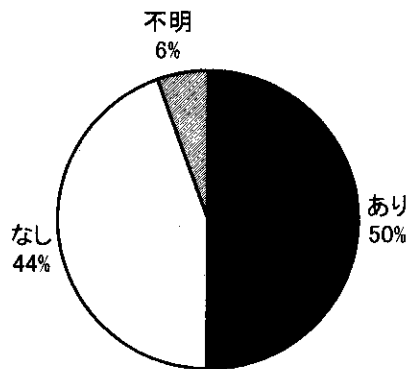
結論

本年度のワークショップにおいて、わが国過去に行われたALDに対する造血幹細胞移植例の全例あるいはその大部分が集積できたものと考えられる。18例の中には造血幹細胞移植がALDに対して有効であると考えられる例が一部に認められるが、臨床的效果に影響を与える要因についてはさらに検討を加える必要性がある。発症前ALD男児の造血幹細胞移植例については、さらに追跡調査を継続する必要がある。

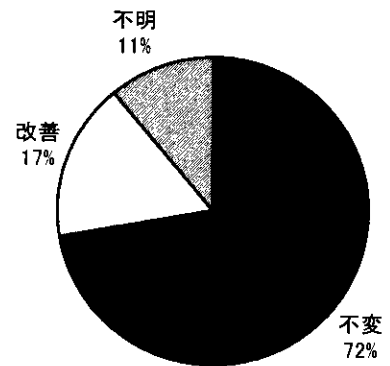
conditioning中に悪化した症例が散見されこの点に関しても次年度検討を加える必要性がある。

図1 ALD患者での骨髄移植の効果

前処置中の症状の悪化



極長鎖脂肪酸の推移



発症者での造血幹細胞移植の効果
(n=14)

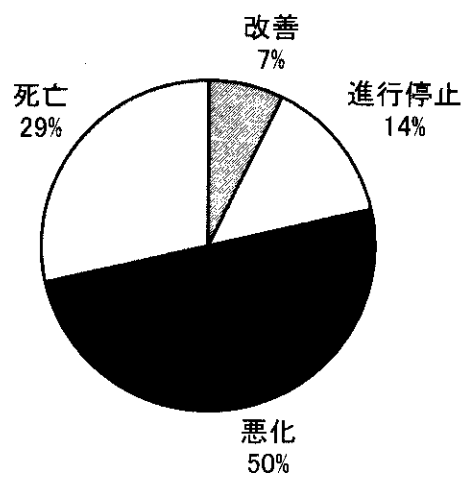


表 1 造血幹細胞移植例 (ALD 発症者)

症例	発症時年齢	初発症状	診断時年齢	移植時年齢	発症から移植までの期間(月)
1	5才7ヶ月	複視	6才1ヶ月	6才5ヶ月	10
2	不明	不明	4才8ヶ月	7才9ヶ月	不明
3	7才	不明	8才4ヶ月	9才4ヶ月	12
4	6才7ヶ月	左外斜視	6才7ヶ月	6才11ヶ月	4
5	6才2ヶ月	表情が硬い、言葉数が少なくなる	6才5ヶ月	6才6ヶ月	4
6	7才6ヶ月	視力障害	8才	8才2ヶ月	8
7	6才11ヶ月	6才7ヶ月で眼位異常	7才1ヶ月	7才3ヶ月	16
8	7才4ヶ月	頭痛、ふらつき	8才	9才3ヶ月	23
9	10才	歩行障害	10才	11才9ヶ月	20
10	7才	集中力の低下	8才6ヶ月	9才	24
11	6才5ヶ月	6才5ヶ月より退行	7才2ヶ月	7才7ヶ月	3
12	9才3ヶ月	構語障害、学力低下、視力低下	9才11ヶ月	10才5ヶ月	10
13	9才	計算力の軽度低下、兄がALD	9才7ヶ月	10才6ヶ月	10
14	不明	言葉の遅れ、斜視	6才5ヶ月失明当議、視力障害	6才10ヶ月	不明

表 2 造血幹細胞移植の効果及び合併症

症例	観察期間 (M)	移植の効果	VLFAの推移	移植時症状が進行	移植後急速な悪化	急性GVHD	慢性GVHD	合併症
1	72	悪化	不変	進行	あり	なし	なし	なし
2	21	悪化	不変	なし	ゆっくり変化	なし	なし	なし
3	2	悪化	不変	進行	あり	なし	なし	Sepsis, RF, Pn
4	7	悪化	不変	進行	あり	発疹	なし	なし
5	41	悪化	改善	進行	あり	なし	なし	なし
6	20	悪化	軽度改善	進行	あり	なし	なし	なし
7	16	悪化	不変	進行	あり	皮膚	なし	出血性膀胱炎
8	17	悪化, 死亡	不変	進行	あり	皮膚、肝臓	なし	EBV-LPD, TMA
9	3	悪化, 死亡	不変	進行	あり	なし	あり	出血性膀胱炎、カンジダ、緑膿菌感染症
10	16	悪化, 死亡	不変	進行	不明	なし	なし	力子挿入部の蜂窩織炎
11	3	悪化, 死亡	不変	最初から重症	不明	なし	なし	肺炎、ARDS
12	49	改善	不変	進行	なし	手掌紅斑	なし	なし
13	41	進行停止	改善	不明	あり	皮膚	なし	なし
14	10	進行停止	不変	進行	なし	なし	なし	出血性膀胱炎
15	22	神経症状なし	不変	なし	なし	なし	なし	CMV, HC
16	69	神経症状なし	不変	なし	なし	なし	なし	なし
17	37	神経症状なし	不変	なし	なし	なし	なし	なし
18	134	神経症状なし	改善	なし	なし	なし	なし	なし

表 3 造血幹細胞移植の詳細

症例	ドナー	ドナーの carrier check	移植細胞	前処置	前処置中の症状の悪化	HLA 一致率	生着/キメラ率
1	発症者	保因者	BM	BU+CY	あり	6/6	生着
2	発症者	不明	BM	BU+CY+TLI+ATG	なし	6/6	生着
3	発症者	不明	CB	BU+CY+TLI+ATG	あり	5/6	生着
4	発症者	保因者	BM	BU+CY+Thiotepa+ATG	あり	6/6	生着
5	発症者	保因者	BM	BU+CY+ALG	あり	6/6	生着
6	発症者	非保因者	BM	BU+CY	あり	6/6	生着
7	発症者	不明	BM	BU+CY+ATG	あり	6/6	生着
8	発症者	不明	CB	BU+CY+ATG	あり	2/6	生着
9	発症者	不明	BM	BU+CY+ATG	あり	6/6	不明
10	発症者	不明	CB	TAI+CY+ATG	なし	部分一致	生着せず
11	発症者	不明	CB	BU+CY+ATG	最初から重症	4/6	生着
12	発症者	非保因者	BM	BU+CY	あり	6/6	生着
13	発症者	不明	BM	BU+CY+ATG	なし	5/6	生着
14	発症者	正常	BM	BU+CY+ATG	なし	6/6	生着
15	非発症者	不明	BM	BU+CY+TLI+ATG	なし	6/6	生着
16	非発症者	保因者	BM	BU+CY+ATG	なし	6/6	生着
17	非発症者	不明	CB	BU+CY+ATG	なし	6/6	生着
18	非発症者	非保因者	BM	BU+CY	なし	6/6	生着

BM=骨髄

CB=臍帯血幹細胞