

けたくさん挙げてもらおう。田中ビネー知能検査、標準失語症検査にも下位検査として含まれている。語彙力は年齢制限があるが絵画語彙発達検査を利用する。聴覚的ならびに視覚的言語理解の程度をおおまかに知るためにトークンテストを行う。言語能力全般の評価には失語症検査を応用する。

### 3) 視覚認知・視空間認知能力

Wechsler 式知能検査の絵画完成課題を用いる。レーヴン色彩マトリックス検査か K-ABC の視覚類推課題の評価点も参考にする。立方体透視図描画、顔の認知、斜線の認知の可否も問う。半側空間認知障害の有無をみるため線分二等分検査や線分末梢検査、時計や花等の描画を行う。視力の確認もしておく。

### 4) 視覚-運動／構成能力

Rey の複雑図形(模写)、WPPSI の幾何図形課題による模写課題で視覚運動協調を、Wechsler 式知能検査の積み木課題および組合せ課題で構成能力をみる。Frostig 視知覚発達検査も使用可能である。Rey の複雑図形課題には特別な道具も不要であり後述の視覚記銘力・注意実行機能の評価の意味もかねてぜひ実施する。全般的知能評価の補完と身体図式の理解度をみるため人物描画検査を行う。

### (2) 記憶・記銘力

視覚記憶力には田中ビネー知能検査の記憶によるひも通し課題、Benton の視覚記銘検査、Rey の複雑図形課題の得点を参考にする。言語記憶・記銘力には Rey の Auditory Verbal Learning Test (AVLT)、Wechsler 式検査の数唱課題、WPPSI 文章課題(復唱)を実施する。

### (3) 聴覚認知・聴空間認知

聴力の確認をしておく。語音聴力検査、両耳聴力、環境音認知検査(視覚マッチングのある状態とない状態で行う。聴空間認知能力には方向感検査を実施する。

### (4) 注意・実行機能

迷路課題、抹消検査、仮名拾いテスト、Rey の複雑図形(構成得点)などで評価する。前頭葉機能検査として Wisconsin card sorting test (WCST) を利用する。

### 8) QOL(生活の質)の評価

本研究のために簡便なものを作成することを考慮する。

### 2. 神経生理学的検査

上記の神経心理学的検査を補完し、対象児の協力が得られなくても児の状態像を評価できるようにするため、神経生理学的検査を実施する。

- 1) 視覚誘発電位、網膜電図。
- 2) 聴覚誘発電位:聴性脳幹反応、中間潜時反応、頭頂部緩反応。
- 3) 耳音響放射、インピーダンスオージオメトリー、鑑骨筋反射など。
- 4) 覚・聴覚事象関連電位 (ミスマッチネガティブイ、P300, N400) 等

### (2) 検査バッテリーの臨床例への応用

対象は東海大学小児科で骨髄移植療法を受けた2症例である。児の意欲、疲労度を十分観察しながら注意集中が必須の検査、眠っていてもできる検査を組み合わせ1日ないし1日半の日程でできるだけ検査を行う方針とした。結果的にすべての項目を実施することは不可能であったが、多くの専門スタッフ(各時間帯に心理士1名、臨床検査技師兼言語聴覚士1名、小児神経科医師5~7名)が工夫を重ね、優先順位を考えながら多項目の検査を進めることができた。

以下にこの2症例の検査結果概要を示す。

症例1. 8歳男児(骨髄移植後約1年半)

一般理学的には粘膜下口蓋裂による構音障害以外には著変を認めず。日常生活はほぼ自立している。

WISC-III 知能検査では言語性 IQ 47、動作性 IQ 40 未満、全検査 IQ 40 未満で重度の遅滞域であったが、相対的には言語理解が良好だった。複雑図形の模写や、積木模様の構成ができず、視覚認知低下があり、全般的知能にもかなり影響を与えているものと思われる。トークンテストで問題文が長文になると正答率が下がること、数唱課題の成績から、言語性の記銘力障害が疑われた。また、抽象概念の獲得が充分でなく、背景には前頭葉機能の低下も疑われた。環境音認知検査の結果等から中枢性聴覚障害の存在も疑われたが、相対的に聴覚的言語理解は良好で、視覚認知障害を補うために聴覚からのルートを活用する意味はあるものと考えられた。

神経生理学的検査では聴性脳幹反応の中樞潜時の軽度遅延、I波延長が見られた。しかし聴覚中潜時反応、頭頂部緩反応、自動的な聴覚的語音弁別にかかわる皮質反応は保持されていた。視覚誘発電位では潜時の延長が認められた。

症例1の検査結果はMRI上、病変が後方から伸展している点からも説明可能と思われた。今後前頭葉機能検査、Raven色彩マトリセス検査、視覚性事象関連電位等の検査の追加が必要と考えている。

症例2. 15歳男児(骨髄移植後約5年)

兄が同疾患で現在は寝たきりの状態である。理学的に著変なく、日常生活は自立。

WISC-III検査では言語性IQ56、動作性IQは82、総IQは65で、全体的知的水準は軽度遅滞域であった。動作性検査課題に比べて言語性検査課題の成績が低く、特に算数課題、数唱課題での評価点が低いことから、言語性の記銘力障害が疑われた。動作性検査では記号探しなど視覚認知の上にさらに操作や判断を要する課題が相対的に低下していた。処理速度指数を構成する2課題では評価点に乖離が見られ、仮名拾いテストの結果もあわせ注意・集中の困難があった可能性がある。立方体の透視図模写課題やFrostig視覚認知検査の結果は、視覚認知および視空間認知の障害と巧緻性の低下を示唆した。レーヴン色彩マトリセス検査では視覚類推機能は正常で、WISC-IIIで測定されるIQ値よりも本来の知的能力は高いことが窺えた。ReyのAVLTやReyの複雑図形、Benton視覚記銘力検査等を総合すると記憶力は聴覚的にも視覚的にも低下していた。聴覚認知障害は目だたなかったが、音像定位検査で音圧差、時間差の域値が上昇しており、特に時間差認知の低下がみられ中枢性聴覚障害の存在も念頭に置く必要がある。

行動抑制の不十分さもあり、注意や実行機能障害があり前頭葉機能の障害が推定された。半側無視と測定障害はなかった。

神経生理学的には聴性脳幹反応、中間潜時反応、頭頂部緩反応、視覚誘発電位とも正常の反応を示した。純音、言語音の自動弁別

にかかわる皮質反応であるMismatch negativityは正常だったが、能動的意思を介して刺激音を選択する課題のP300は潜時も遅く、振幅が低かった。

症例2の結果はMRI上、前方から病変が進んできたことを支持するものと考えられた。今後、今回のフォローアップのほか、言語機能全般の評価、WCST等、別のタイプの前頭葉機能検査、視覚性事象関連電位等を追加する予定である。

#### D. 考察

ALDの発症や治療効果の判定に必要なかつ実施可能な神経心理学的評価バッテリーを立案し、骨髄移植療法を受けた2症例に応用し、実施可能性と有用性・妥当性を検討した。神経心理学的側面の多面的かつ正確な評価のためには時間の制約の中でもできる限り多項目の検査を行わざるを得ないと思われた。我々の提案した神経心理学的検査によって今回の2症例は中枢性視・聴覚障害、記憶障害、前頭葉機能障害など高次脳機能における特徴的な症候が明らかになった。これらの徴候をより客観的に裏付けるためには神経生理学的指標と画像診断学的指標との照合も重要であると考えられ、今後の研究課題としたい。

小児が対象であること、疾患の性質上、長期的・継続的な観察が必須であることから、各症例に対して適切に実施するための神経心理・生理検査システムを全国レベルで早急に確立していく必要がある。

#### E. 結論

1. 文献的に必要とされている検査項目を抽出し、本邦で実施可能な項目を加えて検査バッテリーを立案した。
2. 小児が対象であることと疾患の性質上、神経生理学的手法など他覚的な評価法の導入が必須であり、画像診断学的指標等の照合も必要である。
3. 長期的・継続的な観察が必須であり適切に検査を実施するための神経心理・生理検査システムを早急に確立する必要がある

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症に対する造血幹細胞移植施行時の前処置に関する検討

分担研究者 加藤剛二 名古屋第一赤十字病院

研究要旨：副腎白質ジストロフィー症では造血幹細胞移植が現時点での唯一有効な治療法とされているがその施行時には前処置中の神経症状の急速な悪化や生着不全等の重大な問題点を包含している。これらの問題点を解決し安全で有効な造血幹細胞移植を施行するためにはその前処置薬剤としてBusulfanを避けかつL-PAMやFludarabine等の薬剤を使用する事が望ましいと考えられる。

はじめに

副腎白質ジストロフィー症（以下ALD）は進行性の中枢神経系症状を呈する疾患であり、とりわけ小児期に発症する小児脳型ALD（childhood onset cerebral adrenoleukodystrophy, COCALD）は進行速度も早くまた有効な薬物治療法が確立されておらずその神経学的予後は極めて不良である。この疾患に対しては現時点では造血幹細胞移植が唯一の有効な治療法と考えられており世界的に骨髄移植を中心とした治療がなされているがその治療にも種々の問題点が存在する。以下にこれらの問題点を列挙し今後の方向性につき述べる。

1, 先天性代謝異常症における造血幹細胞移植の特徴

先天性代謝異常症のが造血幹細胞移植を受ける際の患者側の一般的な状況としては移植までに化学療法や免疫抑制療法を受けていないため移植前の臓器障害が少なく全身状態が比較的よい事が多い。また造血幹細胞移植に関しては前処置としては化学療法が主体で放

射線療法の併用頻度が低く、ATG（抗リンパ球グロブリン）の併用頻度は高い。また移植後の経過としては生着不全の頻度が高く、また逆に完全キメラでなくても症状の改善が得られるという特徴がある。

2, ALDにおける造血幹細胞移植施行時の問題点

さらにこの中でALDに対して移植を行う際の特有の問題点としては以下のよう点が挙げられる。

- 1) 移植適応：移植を行う病期として特に家系内発症例を有する症例での無症状期の移植適応には議論がある。すなわちALD症例の家系内にはALDのみならずその症状が緩徐でかつ末梢型の神経症状を呈するAMN症例を発症する事があり、致命的合併症をも併発し得る造血幹細胞移植の実施には慎重であるべきである。
- 2) 発症早期の移植が困難な場合：本症は神経症状の進行が急なため発症早期に造血幹細胞移植を行う事が肝要であるが往々にしてそれが困難とな

る。すなわち特に家系内初発例では本疾患の初発症状が不定愁訴である事が多いため診断に数ヶ月以上要する事も希ではない。また、診断が早期に得られたとしても血縁者にHLA適合ドナーが得られない場合は骨髓バンクに登録しても移植までに約6ヶ月を要し移植の至適時期を逸する事も多い。

- 3) 前処置直後の神経症状の悪化：昨年度の本研究班による移植症例調査においてALDの移植前処置施行後に急速に神経症状の悪化がみられる症例が約半数にみられる事が判明した。この理由の一つに移植前処置に使用するBusulfanによる中枢神経障害が考えられるため本薬剤の使用を控える事が特に進行期症例では考慮されるべきと考えられる。

### 3, ALDにおける造血幹細胞移植施行時の前処置

ALDに対する移植施行時の前処置は以下のような方法で主に実施されている。標準的方法としては従来のBU+CYに加え、非血縁者間移植では拒絶及びGVHD予防目的でATGやTLI等の放射線照射が行われており、研究的方法としてはBusulfanを避けた方法が模索されている。

#### I. Standard

1. BU+CY
2. BU+CY+ATG
3. BU+CY+TLI /TAI+ATG

#### II. Investigative

1. CY+TBI(Brain sparing)
2. BU+CY+ATG+L-PAM
3. CY+TBI+ATG+Fludarabine

### 4, ALDに対する造血幹細胞移植の前処置別成績

Minnesota大学のPetersらの調査によれば世界で126例のALDに対する造血幹細胞移植の成績が得られ内90例で詳細な結果が得られた。この報告では移植前処置別では化学療法、化学療法と放射線照射、化学療法と放射線照射 (Brain sparing) の3者間での生存率には有意差が得られなかったとしている。また、国内での成績では殆どの症例でBusulfanが投与されているためにその有無による移植成績の比較はできないが移植前発症例での症状改善例は移植が速やかにできた同胞例の一部のみであった。また非血縁者間移植での経過良好例は移植前無症状の1例のみであり緊急的移植に対応可能な臍帯血移植での成功例はみられていない。

### 5, ALDに対する造血幹細胞移植施行時の前処置に関する研究的試み

以上の前処置に関してはALDやその他従来生着不全が多いとされる先天性代謝異常症に対しては種々の試みがなされている。

#### 1) Brain sparing TBI

ミネソタ大学ではALDの移植に際しBusulfanの使用を避けかつ脳を遮蔽した全身放射線照射を行っている。この方法にて非血縁者間移植では骨髓移植19例中8例、臍帯血移植8例3例の生存が得られたとしている。

#### 2) Fanconi 貧血に対する

Fludarabineの使用 (MacMilan, 2000)

諸疾患の中で最も生着不全の頻度が高いとされる本疾患について従

来のCY+TBI+/-ATGでは63%の生着率であったのに対し、これにFludarabineを加えた場合は91%の生着が得られたとしている。

- 3) ヘモグロビン異常症に対する血縁者間臍帯血移植 (Locatelli, 2000)

Locatelliらはヘモグロビン異常症に対する移植に際し、BU+CY+/-ATGの前処置での生着率が67%であったのに対し、これにTEPA又はFludarabineを加えた場合は93%に生着率が向上する事を示した。

- 4) サラセミア症に対する造血幹細胞移植 (Lankester, 2000)

Lankesterらはサラセミア症に対する移植に際しBU+CY+ATGの前処置では12例中5例が無病生存であったのに対し、それにL-PAMを加えた場合は6例全員が無病生存であったと報告した。

## 6, 今後の方向性

以上の結果より今後ALDに対する造血幹細胞移植施行時の前処置は以下のような方法が推奨されると考えられる。

- 1) 無症状期

血縁者間移植:

BU+CY+ATG

非血縁者間移植:

BU+CY+ATG+TLI/TAI

- 2) 発症後

血縁者間移植:

CY+L-PAM/Fludarabine/TEPA+ATG+TLI/TAI

非血縁者間移植:

L-PAM/Fludarabine/TEPA+AT

G+TBI (Brain sparing)

## 7, 結論

今後は以上のような前処置を施行した造血幹細胞移植を実施し、本疾患移植時の特有の問題点である神経症状の悪化、生着不全の予防ができれば本疾患の治療成績向上が期待できると考える。

## 8, 研究発表

### 1) 論文発表

Ohi T, Takeuti S, Itokazu N, Shiomi K, Sugimoto S, Antoku Y, Kato K, Sugimoto T,

Two novel mutations in the adrenoleukodystrophy gene in two unrelated Japanese families and the long-term effect of bone marrow transplantation.

J Neurol Sci. 15:131-8, 2000

## abbreviations

ALD:adrenoleukodystrophy

AMN:adrenomyeloneuropathy

ATG:anti-thymocyte globulin

BU:busulfan

CY:cyclophosphamide

L-PAM:melphalan

TLI:total lymphoid irradiation

TAI:thoraco-abdominal irradiation

TBI:total body irradiation

TEPA:thiotepa

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班

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 尾中 啓枝 東海大学病院精神科心理室 心理検査師

研究要旨 副腎白質ジストロフィーに対して骨髄移植を実施し長期間にわたり経過観察を行っている2例において、精神神経症状について検討した。精神発達の評価には鈴木・Binet式知能検査を用い、サブカテゴリー別に独自の評価方法を導入することによってWechsler法に匹敵する評価を短時間で実施することが可能であった。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィーに対する骨髄移植などの造血幹細胞移植の効果を評価するための精神発達検査として鈴木・Binet式知能検査を実施し、Wechsler法と比較してそれぞれの利点と特徴についてまとめることを研究目的とした。

B. 研究方法と対象

1. 症例

東海大学で骨髄移植を実施し長期間経過観察を行っている2例の副腎白質ジストロフィー（ALD）の男児を対象とし、いずれの症例においても移植の実施と移植前後の諸検査について詳細な説明を行い文書による同意をえたので、倫理面での問題はないと判断した。  
〔症例1〕兄がALDと診断された際に本児もALDであることが判明し、11歳6カ月にHLA1抗原不一致の妹から骨髄移植を行った。移植後ドナー由来の造血生

着が得られ、GVHDの合併はなく移植後5年間経過観察を行っている。

〔症例2〕家族歴はなく、6歳10カ月にHLA一致の妹より骨髄移植を行った。移植後ドナー由来の生着が得られ、GVHDの合併なく移植後1年8カ月間経過観察を行っている。

2. 精神発達検査

東海大学病院精神科心理室では小児の精神発達検査として鈴木・Binet式知能検査を行い、知能因子毎にサブカテゴリー化することによってWechsler法に準じた評価を試みた。サブカテゴリーは12項目に分け、それぞれの年齢別通過率を出して評価した。

C. 研究結果

〔症例1〕

移植前から移植後5年間の期間に7回のBinet検査を施行した。

移植後一旦得点とIQの低下があり、移植前あるいはそれ以上に回復したのは移植後2年（4回目）

であり、以後は以下の表のように同レベルを維持している。

回数	1	2	3	4	5	6	7
	前	移植後					
CA	10:03	11:02	12:02	12:09	13:02	14:07	15:02
得点	39	36	37	44	43	43	44
I Q	88	74	70	82	78	73	73

この結果をサブカテゴリー別に通過率を出しグラフ化したものが図1で、黒いバーが本症例、グレーのバーが年齢標準通過率である。

成功失敗の変化がある項目と変化のない項目があり、c「記銘力(文字・図形)」、d「比較判断」、j「視覚的想像」は移植後一旦下がったが、徐々に回復している。一方、g「記銘力(数)」、h「言葉の定義」などは不安定であり、a「一般的知識」、e「数の操作・数概念」などは少しずつ獲得され進歩している。

#### [症例2]

移植前から移植後1年間に3回の検査を行った。本症例では移植前処置中に神経症状が急激に悪化し、視力が一旦ほぼ完全に失われ、移植後徐々に回復しつつある。

回数	1	2	3
	前	移植	後
CA	6:10	7:02	7:07
得点	8	8	9
I Q	49	47	46

この結果をサブカテゴリー別にグラフ化したものが図2である。d「比較判断」、e「数の操作・数概念」などは不安定であり、a「比較判断」に含

まれる「身体の部分指示」「見なれた物の名」「自分の名前」とc「記銘力」の中の「短文反唱」は安定してできている。a「一般的知識」、c「記銘力(文字・図形)」は変化が少ないものの少しずつ上向きになっている。

#### D. 考察

ALDに対する骨髄移植の効果を総合的に評価する一環として、鈴木・Binet法により精神発達検査を実施した。骨髄移植前後の患児は身体的条件が不良であったり、遠方からの受診者のために長時間の検査が困難であることが多く、短時間で簡便に評価できるBinet法を採用して経時的な変化を観察した。

より詳細な知能の評価が可能であるとされているWechsler法と比較するとBinet法には知能因子がないため、我々はBinet法を改良してサブカテゴリー別に分析することによりWechsler法に準じた評価を試みた。

その結果、ほぼ満足すべき評価が可能であったが、今後国際的な比較検討などを行うにあたっては標準的なWechsler法を採用すべきものと考えられるため、今後は両者を併用しながら順次Wechsler法に移行することを計画中である。

#### E. 結論

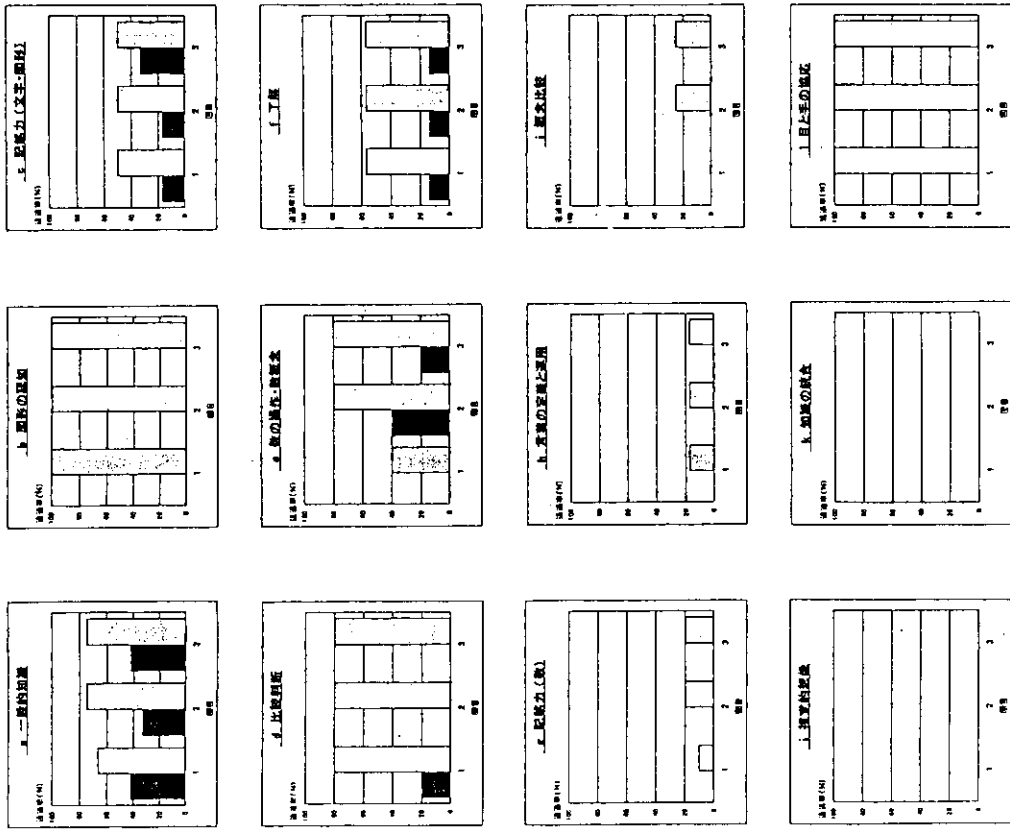
副腎白質ジストロフィで骨髄移植を施行し長期間経過観察を行っている2症例において、鈴木・Binet法により精神発達検査を行い、Binet法を改良することによりWechsler法に準じる評価が可能であった。また、MRI所見とも一致して経過していた。

図 1 . 症例 1 における鈴木・Binet 式知能検査サブカテゴリー別通過率



ケース1  
本検査通過率

図 2 . 症例 2 における鈴木・Binet 式知能検査サブカテゴリー別通過率



ケース1  
本検査通過率



## 厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）分担報告書

### 3 テスラ超高磁場磁気共鳴画像によるラムダチャート解析を用いた神経索機能解析 ～副腎白質ジストロフィーへの適用～

分担研究者 辻 省次 新潟大学脳研究所神経内科教授

共同研究者 寺島 健史<sup>1,2</sup>, 松澤 等<sup>1</sup>, 小野寺 理<sup>2</sup>, 中田 力<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新潟大学脳研究所脳機能解析学

<sup>2</sup>新潟大学脳研究所神経内科

#### 研究要旨

拡散強調画像による拡散不等方性の定量的解析法であるラムダチャート解析を用いて、副腎白質ジストロフィー(ALD)での神経索機能解析を試みた。正常群およびALD群4名(Adrenomyeloneuropathy2名, 成人大脳型1名, 小児1名), および筋萎縮性側索硬化症などそのほかの患者群にエコープラナー法による拡散強調画像を撮像し, 内包後脚部・脳梁膨大部を関心領域として拡散テンソルの固有値・固有ベクトルを算出し, 拡散テンソルの楕円体表記およびラムダチャート解析を行った。成人大脳型ALD患者の内包後脚部および小児ALD患者の脳梁膨大部において, 正常群で認められる不等方性拡散が失われ, ラムダチャート上では isotrace line に沿って isotropic line に近づく方向への変移が認められた。AMNでは2名とも変移は認められず不等方性拡散は保たれていた。ラムダチャート解析により, ALDでの神経索機能異常を視覚的かつ定量的に把握できることが確認できた。本法は非侵襲的かつ短時間で神経索機能を評価するための有用な方法として今後の臨床応用が期待される。

#### A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)の診断, 治療, 予後判定においては対象となる特定神経組織の機能, 特に軸索機能の検索法の確立が不可欠となる。臨床応用にあたっては無侵襲で経時的にくりかえして施行することができ, 短時間で行えることも重要である。本研究は, 磁気共鳴画像を用いた非侵襲的神経索機能解析法であるラムダチャート解析をALDに適用し, その臨床応用への可能性を探ることを目的としている。

#### B. 研究方法

[原理] 生体において拡散強調画像で強調される因子には, 粒子のブラウン運動による本来の拡散現象に加えて, 組織灌流や微小循環・軸索流なども含まれている。そのため拡散強調画像で扱われる拡散係数は一般に“みかけの拡散係数”とよばれている。さらに, 本来の拡散現象が規則性のない運動で方向性をもたない“等方性拡散”となっているのに対して, 生体で観察される“みかけの拡散”は, 拡散の方向によって拡散係数が異なる“不等方性拡散”となっている。不等方性拡散を扱うにはスカラー量である拡散係数を拡散テンソルに拡張することが必要となる。不等方性拡散

は, 細胞膜による自由な拡散運動の制限や, 種々の微視的並進運動が加味されていることに由来するものであると考えられるが, 特に軸索による線維性の組織構築が特徴である神経組織においては, この不等方性拡散は軸索の走行や機能と密接に関連していると思われ, 拡散テンソルの観察が重要な意義をもつと考えられる。ラムダチャート解析は拡散強調画像を用いて, 拡散テンソルの固有値・固有ベクトルを決定する拡散テンソル解析がその基礎となっている。拡散テンソルにおける3つの固有値は, それぞれ対応する固有ベクトルの示す主軸方向への拡散係数を表している。この関係は図1のようにテンソル楕円体の表記によって視覚的に理解することができる。さらに, 神経軸索がシリンダー状の細長いかたちであることを考慮すると, 拡散の不等方性は一方向にのみ強くあらわれ, のこり2方向はほぼ同程度であると考えてよい(図2)ことより,  $\lambda_1 \geq \lambda_2 = \lambda_3$  という関係

が成り立ち,  $\lambda_\alpha = \lambda_1$  および  $\lambda_\beta = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2}$  を散布図

プロットすることにより拡散特性の定量的な把握が可能となる。この散布図プロットをラムダ

チャートと呼んでいる。

[方法] 対象として、正常ボランティア12名(男9名, 女3名), ALD4名(Adrenomyeloneuropathy(AMN)2名, 成人大脳型ALD1名, 小児ALD1名), 筋萎縮性側索硬化症(ALS)2名, Perizaeus-Merzbacher病1名, Alexander病1名, 成人発症Krabbe病1名を選んだ。これらの対象者に対して6種類の異なる条件の拡散強調傾斜磁場パルスを用いたエコブレンダー法による拡散強調画像を撮像した。得られた画像データをもとに内包後脚部, 脳梁膨大部を関心領域として拡散テンソルの固有値, 固有ベクトルを算出し, 拡散テンソルの楕円体表記およびラムダチャート解析を行った。

すべての対象者に対して、研究の目的・内容による文書および面談での十分な説明を行った上で、研究協力への文書による同意書を取得した。

### C. 研究結果と考察

1. 内包後脚部：正常者では図3のようにこの部位での神経線維走行にそった長軸をもつ不等方性拡散が認められる。ALD群においてAMN2例では正常者とはほぼ同様の不等方性拡散を示す(図4)が、成人大脳型ALD例では、内包後脚部は高速スピネコーT2強調画像において高信号を呈しており、拡散テンソル楕円体は不等方性拡散を失って丸みをおびている(図5)。AMNと成人大脳型ALDでは明らかに錐体路変性の状態が異なっていることが示唆される。一方、Krabbe病患者ではT2強調画像で同部位が同様に高信号を呈しているものの、不等方性拡散は失われておらず、不等方性拡散の減弱の程度は必ずしもT2強調画像における信号変化と対応しているわけではない。ラムダチャートは図6に示すように成人大脳型ALD患者でのみ isotrace line に沿って isotropic line に近づく方向への変移が認められた。他のALD患者やALSをはじめとする他の疾患群では変移は認められなかった。

2. 脳梁膨大部：正常群では図7のようにこの部位での線維走行にそった左右方向に長軸をもつ不等方性拡散が認められた。AMN患者や成人大脳型ALD患者でもほぼ正常者と同様であるが、小児ALD患者やPerizaeus-Merzbacher病患者では著しく失われており(図8)、ラムダチャート上での変移の方向は、内包後脚部と同様であった(図9)。

ラムダチャート上での変移の方向と病理組織変化との対応や、不等方性拡散の減弱の程度が単に病期の違いによるものなのか、ALDのサブタイプによって異なるパターンを示すのかなどについては今後症

例の経時的追跡や他症例の検討を重ねる必要があるが、内包後脚部や脳梁などにおける神経変性を十分とらえる感度をもつ手法であることが確認できた。

### D. 結論

ラムダチャート解析により、ALDでの神経索機能異常を視覚的かつ定量的に把握できることが確認できた。本法は非侵襲的かつ短時間で神経索機能を評価するための有用な方法として今後の臨床応用が期待される。

### E. 参考文献

- 1) 中田 力 Diffusion, perfusion imagingの基礎. 日磁医誌, 18: 340-348, 1998.
- 2) Nakada, T., Nakayama, N., Fujii, Y., et al.: Clinical application of magnetic resonance axonography. J. Neurosurg., 90: 791-795, 1999.
- 3) Matsuzawa, H. & Nakada T.: Lambda chart analysis and eigenvalue imaging. In *Integrated Human Brain Science* (edited by Nakada, T.), Elsevier, London, 2000: 219-225.

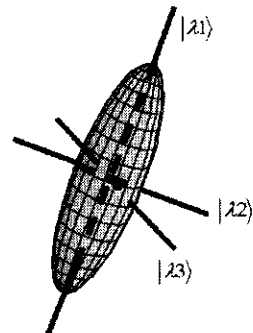


図1 拡散テンソルの楕円体表記

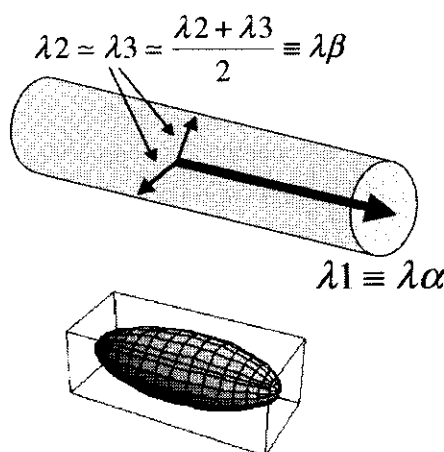


図2

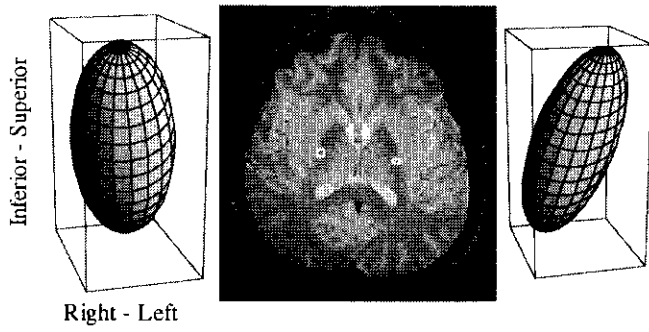


図3 内包後脚 正常者35歳男

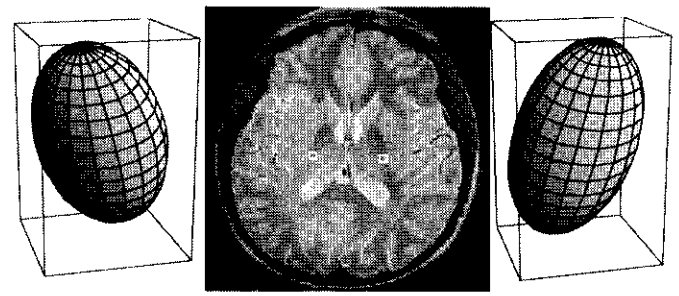


図4 内包後脚 AMN 52歳男

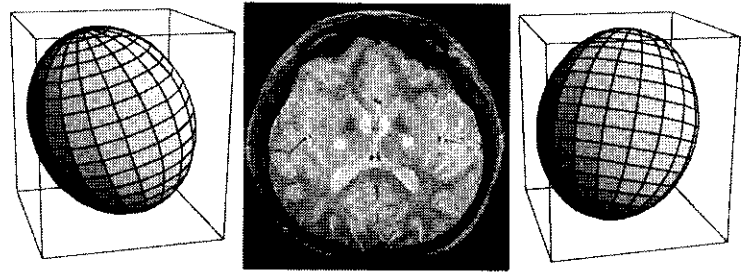


図5 内包後脚 成人大脳型ALD 38歳男

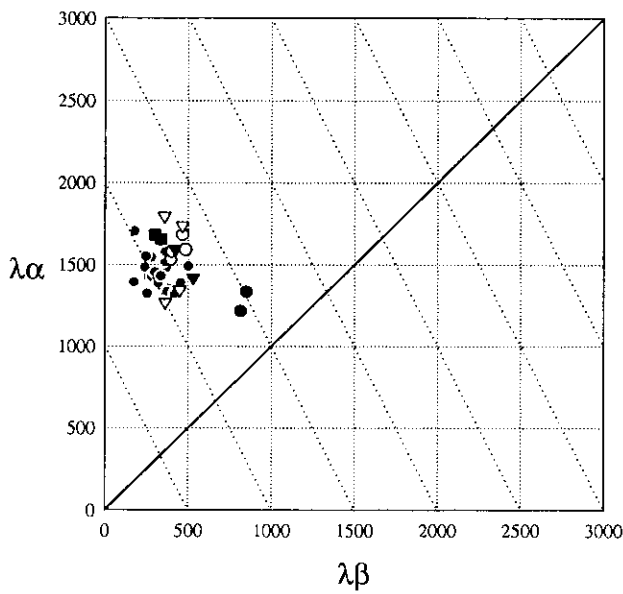


図6 内包後脚 ラムダチャート

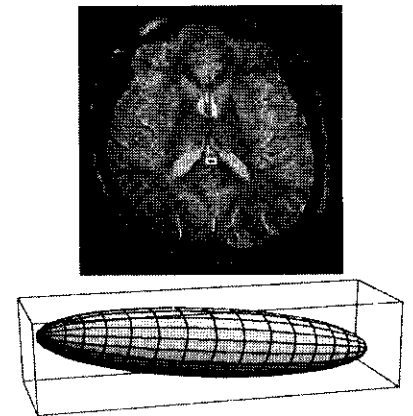
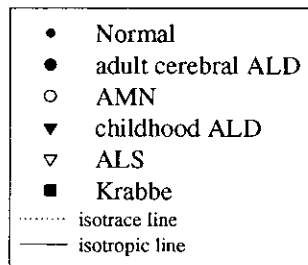


図7 脳梁膨大部 正常者25歳男

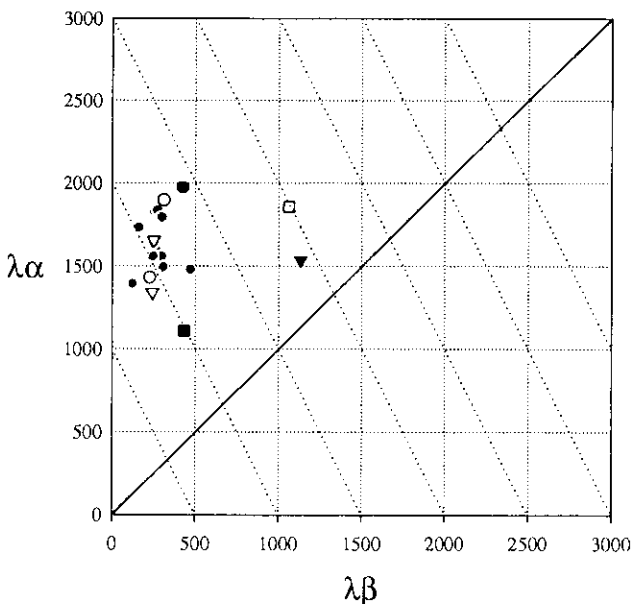


図9 脳梁膨大部 ラムダチャート

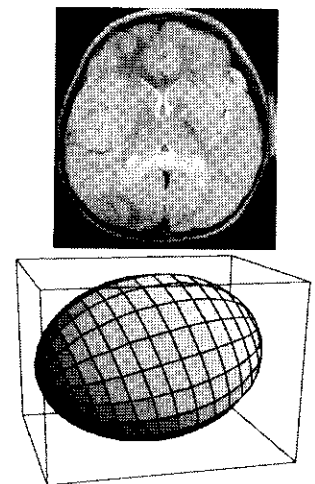
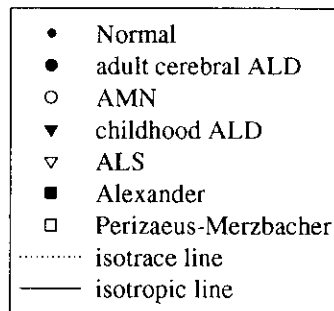


図8 脳梁膨大部 小児ALD 5歳男

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  
（培養細胞系を用いたALD代謝障害の治療）  
分担研究者 山田 猛 九州大学神経内科

研究要旨 副腎白質ジストロフィー(ALD)の治療法として有用性が示されている骨髄移植の治療効果の発現機構を明らかにするために、正常細胞がALD細胞の代謝障害を是正するかどうかを調べた。Lovastatinの極長鎖脂肪酸(VLCFA)の蓄積改善効果の追試験を行った。ALD細胞とミクログリア様細胞N9との混合培養により、ALD細胞のVLCFAが減少した。この効果発現には細胞同士の直接接触が必要であった。混合培養後のALD細胞中にはALD蛋白は検出されず、VLCFAの $\beta$ 酸化活性の上昇もみられなかったことから、VLCFAの減少効果は正常細胞によるVLCFAの除去あるいはALD細胞におけるVLCFAの合成抑制が考えられた。ALD患者線維芽細胞に5 $\mu$ M lovastatinを添加して培養しても、VLCFA蓄積の改善効果は確認できなかった。Lovastatinの臨床応用についてはさらに検証を進める必要がある。

### A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)の治療法としては、早期の骨髄移植の有用性が示されている。本研究では骨髄移植の治療効果の発現機構を明らかにするために、正常細胞がALD細胞の代謝障害を是正するかどうかを調べた。また、lovastatinがALD患者由来の培養線維芽細胞や血中の極長鎖脂肪酸(VLCFA)の蓄積を改善することが報告されている。患者への適用の妥当性を検討するために追試験を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞培養

ALD患者由来の線維芽細胞163Tに neomycin耐性遺伝子を導入してG418耐性とし、標的細胞に用いた。マウスミクログリア様細胞N9を正常治療細胞として用いた。培地はRPMI1640/5% FBSを使用した。両細胞を混合(163T:N9=1:1あるいは10:1)、あるいは0.45 $\mu$ mのフィルターで分離して7~14日間培養後、400 $\mu$ g/ml G418を添加して2日間培養しN9細胞を除去した。

ALD患者及び対照由来の皮膚線維芽細胞を使用してlovastatinの効果調べた。LovastatinはDMSOに溶解し、DMEM/10% FBS培地に終濃度5 $\mu$ M (0.1% DMSO)添加し14日間培養した。

#### 2. ウェスタンブロット解析

総蛋白をSDS-PAGEにて分離し、マクロファージ・ミクログリアのマーカー蛋白である抗integrin  $\alpha$ M抗体(Santa Cruz)を用いたウェスタンブロット法によりN9細胞の混入を評価した。抗ALD蛋白抗体によりALD蛋白を検出した。

#### 3. 脂肪酸分析

総脂質をFolch法により抽出し、0.5N塩酸/90%アセトニトリルにより加水分解、9-anthryldiazomethaneにより蛍光標識し、HPLCによりVLCFAを分離定量した。

#### 4. リグノセリン酸 $\beta$ 酸化活性

培地に[<sup>14</sup>C]リグノセリン酸を添加し1時間培養後、細胞を回収して細胞を破碎し、可溶性分画の放射能を測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 混合培養

Integrin  $\alpha$ MのバンドはN9細胞に認められたが、163T細胞にもわずかに検出された。G418処理後のサンプルのintegrin  $\alpha$ Mのバンドの濃度は163T細胞サンプルと同量であり、N9細胞の混入は無視できる程度と考えられた。

#### 2. VLCFA蓄積改善効果

混合培養(比率1:1と10:1)1週間で、VLCFAの組成はC24:0/C22:0が2.41と2.46、C25:0/C22:0が0.07と0.10、C26:0/C22:0が0.51と0.54であり、163Tの3.14、0.14、0.88に比べて有意に減少していた。またC26:0 (ng/ $\mu$ g蛋白)は0.50と0.48で、163Tの0.62に比べて減少していたが、SDが大きいために有意差は得られなかった。

混合培養(比率1:1)14日間の培養では、C24:0/C22:0が1.89、C25:0/C22:0が0.10、C26:0/C22:0が0.38、C26:0が0.30とさらに減少した。N9除去1週間後にはそれぞれ2.82、0.10、0.55、0.78となり163Tと差はなくなり混合培養の効果は消失した。

フィルターで分離して培養した場合には、C24:0/C22:0が2.94、C25:0/C22:0が0.13、C26:0/C22:0が0.84、C26:0が0.93でありVLCFAの減少効果はみられなかった。

### 3. ALD蛋白の分析

ウエスタンブロット法で、N9細胞にはALD蛋白が検出されたが、163T細胞及び混合培養後の163T細胞にはALD蛋白は検出されなかった。

### 4. リグノセリン酸 $\beta$ 酸化活性

リグノセリン酸 $\beta$ 酸化活性(pmol/h/mg 蛋白)は、N9が165.1、163Tが110.7、混合培養1週間後の163Tが62.0であり、混合培養による活性の上昇はみられなかった。

### 5. 培養線維芽細胞のVLCFAに対するlovastatinの効果

2種類のALD細胞については5 $\mu$ M lovastatinの添加により、C24:0/C22:0が<sup>2</sup>2.26 (対照1.85)と2.43 (2.33)、C25:0/C22:0が<sup>2</sup>0.08 (0.06)と0.10 (0.08)、C26:0/C22:0が<sup>2</sup>0.28 (0.20)と0.25 (0.24)でありむしろ増加していた。C26:0は0.69 (0.92)と0.69 (0.85)であり減少傾向にあったが、有意差はなかった。正常対照細胞でも同様な結果であった。

### D. 考察

正常細胞はALD細胞のVLCFAの蓄積を一過性に改善することが示された。フィルターで分離して培養しても改善効果がみられなかったことから、効果発現には細胞同士の接触が必要と考えられた。混合培養後のALD細胞にALD蛋白は検出されなかったことから、正常細胞からALD蛋白が供給されることはないと考えられた。また、VLCFAの $\beta$ 酸化活性にも上昇はみられなかった。これらの結果からVLCFA蓄積の改善は、正常細胞がALD細胞からVLCFAを除去する、あるいはALD細胞におけるVLCFAの合成を抑制する機序が推定された。

SinghらはALD患者にlovastatinを投与することにより、血漿中のVLCFAが正常化することを報告した。他のHMG-CoA還元酵素阻害薬であるsimvastatinでは効果がみられなかったことから、lovastatinの治療効果はHMG-CoA還元酵素阻害作用とは異なる機序が考えられている。

ただしlovastatinの脳、副腎を含めた組織中のVLCFA蓄積に対する効果は証明されていない。我々の研究ではALDモデルマウスの組織中のVLCFA蓄積に対するlovastatinの効果は認められなかった。今回、培養ALD細胞のVLCFA蓄積に対しても既報のような減少効果がみられず、lovastatinの臨床応用についてはさらに検証を進める必要があると考えられた。

### E. 結論

正常細胞はALD細胞のVLCFA蓄積を改善し、その効果は液性因子によるのではなく細胞接触によって発揮される。

LovastatinのVLCFA蓄積改善効果については追試験により確定できなかった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yamada T, Shinnoh N, Taniwaki T, et al. J Inher Metab Dis 23: 607-614, 2000

2) Yamada T, Shinnoh N, Kondo A, et al. Cell Biochem Biophys 32: 239-246, 2000

#### 2. 学会発表

なし

### G. 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

ALDP の機能解析ならびに大量発現の試み

分担研究者 今中 常雄 富山医科薬科大学・薬学部・教授  
協力研究者 守田 雅志 富山医科薬科大学・薬学部・助手

野生型、変異型 ALD 遺伝子を CHO に導入し、ALDP 安定過剰発現細胞を作製し、極長鎖脂肪酸代謝を検討した。その結果、ALDP は極長鎖脂肪酸代謝に密接に関与すること、機能ドメインとして EAA like motif が重要であることが明らかになった。一方、昆虫細胞に、C末端に His-tag を付加した ALD 遺伝子を導入したウイルスを感染させることにより、ALDP を大量に発現させることが可能になった。さらに可溶化後、ALDP を単一タンパク質として精製することができた。精製タンパク質は ATPase 活性を有し、ALDP の詳細な機能解析に有用であることが示唆された。

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。本研究では、野生型ならびに変異型 ALD 遺伝子を動物細胞に発現し、その機能解析ならびに機能ドメインの検索を行った。さらに分子レベルでの ALDP 機能解析に向けて、昆虫細胞での大量発現を試みた。

B. 研究方法

野生型ならびに EAA-like motif に変異を入れた ALDP cDNA を pCDNA3.1+ に組込み、CHO 細胞に導入し、安定過剰発現細胞を作製した。得られた安定過剰発現細胞について、ALDP のペルオキシソーム局在性を、細胞分画法により検討した。また [1-<sup>14</sup>C] lignoceric acid を基質としてβ酸化活性を測定した。昆虫細胞 Sf 21 に C 末端に His-tag を付加した ALD 遺伝子を導入したウイルスを感染させ、ALDP の発現を immunoblotting で解析した。さらに膜分画を界面活性剤で可溶化し、TALON metal affinity resin を用い ALDP の精製を行った。ALDP の機能と

して ATPase 活性の有無を検討した。

（倫理面での配慮）

細胞への遺伝子導入等の実験は、実験者への安全性を考慮し、「大学等における組替え DNA 実験指針」に準じて行った。

C. 研究結果

野生型ならびに変異型 ALDP 過剰発現細胞より light mitochondria 分画を調製し、ショ糖密度勾配遠心により、ALDP の分布を各種オルガネラの標識酵素の分布と比較した。その結果、ALDP の分布はペルオキシソームに局在する catalase と一致した。極長鎖脂肪酸β酸化についてみると、野生型 ALDP を過剰発現した CHO 細胞では対照と比較し、lignoceric acid のβ酸化が約 1.5 倍亢進した。一方、変異型 ALDP 過剰発現細胞では、lignoceric acid のβ酸化が約 30% 抑制された。

ウイルス感染 Sf 21 細胞において、ALDP の大量発現が確認された。発現した ALDP はすべて膜分画に回収された。ALDP は 0.1% n-dodecyl-β-maltoside で可溶化され、TALON metal affinity resin により精製された。精製 ALDP は SDS-PAGE

で約 80 kDa の単一バンドを示した。さらに精製 ALDP は ATPase 活性をもつことがはじめて明らかになった。

#### D. 考察

過剰発現された野生型ならびに変異型 ALDP はペルオキシソームに局在していることが確認された、脂肪酸代謝の実験に用いることができた。野生型ならびに変異型 ALDP 過剰発現細胞における極長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化活性の変化により、ALDP は極長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化過程に関与することが示唆された。また昆虫細胞で発現させた ALDP が ATPase 活性をもつことより、ALDP は ATP の加水分解を駆動力とし、ペルオキシソーム膜を介した極長鎖脂肪酸の輸送に関与する可能性が考えられる。本変異 ALDP 発現により極長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化活性が低下すること、ALDP が ATPase 活性をもつことは、ALDP の機能に EAA-like motif ならびに Walker A と B motif が重要な役割をもつことを意味している。

#### E. 結論

ALDP は極長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化を制御し、その機能には膜結合ドメインに位置する EAA-like motif とともに、ATP 結合とその加水分解に関与する Walker A と B motif が重要である。一方、ALDP を昆虫細胞で大量発現させ、精製することが可能になった。今後、プロテオリポソーム系を構築し、ALDP の詳細な機能解析が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Imanaka T., Aihara K., Suzuki Y., Yokota S., and Osumi T. : The 70-kDa peroxisomal membrane protein (PMP70), an ATP-binding cassette transporter. *Cell Biochem. Biophys.* 2000, 32, 131-138.

- 2) Fujiwara C., Imamura A., Hashiguchi N., Shimozawa N., Suzuki Y., Kondo N., Imanaka T., Tsukamoto T., and Osumi T. : Catalase-less peroxisomes. Implication in the milder forms of peroxisome biogenesis disorder. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(47), 37271-37277.
- 3) Morita M., Kurochkin I. V., Motojima K., Goto S., Takano T., Okamura S., Sato R., Yokota S. and Imanaka T. : Insulin-degrading enzyme exists inside of rat liver peroxisomes and degrades oxidized proteins. *Cell Struct. Funct.*, 2000, 25((5), 299-305.

##### 2. 学会発表

- 1) 石黒和彦, 中川智行, 加藤暢夫, 阪井康能, 守田雅志, 今中常雄 : 酵母ペルオキシソーム膜 PMP47 の機能の解析. 日本薬学会第 120 年会, 2000, 3, 岐阜.
- 2) 菊池美紀, 相原一敏, 守田雅志, 今中常雄 : ペルオキシソーム ABC トランスポーター PMP70 の機能解析. 日本生化学会北陸支部第 18 回大会, 2000, 5, 福井.
- 3) 今中常雄, 菊池美紀, 守田雅志 : ペルオキシソーム ABC タンパク質と脂質代謝. 日本生化学会第 73 回年会シンポジウム, 2000, 10, 横浜.
- 4) 柏山恭範, 守田雅志, 上条桂樹, 岡村昭治, 今中常雄 : ペルオキシソーム ABC タンパク質 (PMP70) のヌクレオチド結合ドメインの解析. 日本生化学会第 73 回年会, 2000, 10, 横浜.
- 5) 荒井國三, 大熊勝治, 松川 通, 加藤聖, 今中常雄 : ペルオキシソームのオートファジーによる分解. 日本生化学会第 73 回年会, 2000, 10, 横浜.
- 6) 植田和光, 田中亜路, 青木 綾, 村崎

善之, 今中常雄, 木岡紀幸, 天知輝夫: 脂質輸送に関与する ABC タンパク質の構造と機能. 日本生化学会第 73 回年会シンポジウム, 2000, 10, 横浜.

7) 富田隆志, 宇根瑞穂, 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ついて. 第 22 回胆汁酸研究会, 2000, 11, 京都.

8) 黄 縁, 伊東利津, 今中常雄, 白田信光, 伊藤正樹: 3-ketoacyl-CoA thiolase (チオラーゼ) のペルオキシソーム移行型中間体の蓄積とそのトポロジーI. PEX2 変

異株における解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 2000, 12, 神戸.

9) Imanaka T. : ABC transporters and regulation of cell function. Mini-symposium on Advances in Basic and Applied Aspects of Therapeutics, 2000, 11, Los Angeles.

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の治療法開発のための臨床的および基礎的研究  
(ALDの発症における新規遺伝子リポドーシンの機能解析)

分担研究者 橋本 有弘 三菱化学生命科学研究所 主任研究員

研究要旨 ヒト副腎白質ジストロフィー(X-ALD)の原因遺伝子 ALDP は広範な組織で発現しており、X-ALD における組織特異的障害の発症には未知の介在因子の関与が想定されている。私達は長鎖脂肪酸アシル Co シンターゼ活性を有する新規遺伝子リポドーシン(lipidosin, Lpd) を単離・同定した。Lpd はヒトおよびマウスにおいて ALD 標的器官特異的な発現パターンを示した。ショウジョウバエにおける Lpd ホモログの欠損は、神経変性および超長鎖脂肪酸の蓄積というヒト ALD に類似した表現型を示すことが報告されており、Lpd は ALD における組織特異的障害発症機序に関わる介在因子の有効な候補分子であると考えられる。

A. 研究目的

ヒト副腎白質ジストロフィー(ALD)は、副腎白質ジストロフィー・タンパク質 (ALDP)遺伝子の変異を原因とする遺伝性疾患であることが明らかにされている。

ALDにおいては、主に脳白質、脊髄、副腎、精巣に障害が現われるが、原因遺伝子 ALDPの発現はこれらの組織に限定されるわけではなく、様々な組織で広範に認められる。したがって、ALDPの機能欠損とALDにおける組織特異的障害との間をつなぐ組織特異的な介在因子の存在が予想され、探索されてきた。しかし、有効な候補因子は見いだされておらず、ALDにおける障害発症機序は明らかではない。

私達はマウスおよびヒトより新規遺伝子リポドーシン(lipidosin, Lpd)をクローニングした。Lpdのショウジョウバエ・ホモログは、神経変性および超長鎖脂肪酸の蓄積という、ALDに類似の表現型を示すことが報告され、LpdがヒトALD発症機序に関わっている可能性が考えられる。本研究は、マウスおよびヒトの新規遺伝子Lpdの生理機能を解明し、ALD発症機構におけるLpdの役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. マウスおよびヒトLpd 遺伝子の単離・同定  
マウス培養筋芽細胞よりサブトラクション法によって得られたcDNA断片の配列をもとにプライマーを設計し、マウス脳のcDNAライ

ブラリー(マラソンcDNA、クロンテック社)を鋳型として、5'RACE法によって上流域をクローニングした。5'RACE法によってもcDNAの5'末端を含む断片が得られなかったため、マウス脳キャップcDNA ライブラリー(ノッポンジーン)を鋳型としてオリゴキャップ法によって、5'末端を含む断片をクローニングした。

マウスLpd遺伝子との相同性から遺伝子バンクに登録されていたヒトLpd遺伝子3'断片を見いだした。ヒト脳のRNA(クロンテック社)にキャップ・オリゴヌクレオチドを結合させ、ヒトLpd遺伝子3'断片の配列をもとに設計したプライマーを用いてcDNAを合成した。次にヒトLpd遺伝子特異的プライマーを合成し、オリゴキャップ法によってcDNAの5'末端を含む断片をクローニングした。

2. マウスLpd 遺伝子に対する特異的モノクローナル抗体の作成

マウスLpd cDNAの3'側のアミノ酸をコードする配列を住血吸虫のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子と結合させ、大腸菌に融合タンパク質として発現させた。精製したGST-Lpdタンパク質をアジュバントとともにBalb/cマウスの腹腔内に投与した。脾臓よりB細胞を分離し、ミエローマP3-X63.Ag8.653と融合させ、ハイブリドーマを作成した。

3. イムノブロット解析

成体マウスの各組織を摘出し、wet weightの10倍量の[1% SDS, 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl] 中でホモゲナイズ

した。ホモジェネートを沸騰水中で10分間加熱し、総タンパク質を抽出した。得られたタンパク質 20  $\mu$ g を12.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて分離した後、セミドライブロットティング装置を用いてタンパク質を電氣的にPVDF膜に転写した。抗Lpdモノクローナル抗体と膜を反応させた後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体によってLpd抗体を検出した。さらに、BCIP/NBTを基質として発色法により、Lpdタンパク質を検出した。

#### 4. Lpd 遺伝子産物のアシルCoAシンターゼ活性の測定

Lpd cDNAをpcDNA3.1/hygroベクターに挿入し、発現プラスミドを構築した。これを遺伝子導入試薬 (FuGene6、ロッシュ社)を用いてCOS7細胞に導入し、一過的に発現させた。遺伝子導入したCOS7細胞を回収し、0.1% Triton-X100を含むバッファーで溶解させた。この溶解液を試料とし、パルミチン酸およびリグノセリン酸と反応させた。反応終了後、逆相カラムを装着した高压液体クロマトグラフィー装置を用いてアシルCoAを分離・定量した。

#### 5. ノザン解析

マウスおよびヒトの各種臓器より抽出したmRNAをブロットしたナイロン膜 (クロンテック)を<sup>32</sup>P 標識したマウスおよびヒトLpd cDNAとハイブリダイズさせた。膜を洗浄後、フジ・イメージアナライザーを用いてシグナルを検出した。

動物実験については三菱化学生命科学研究所動物飼育センターの定める規定にもとづき、動物愛護に配慮のうえ実施した。また、ヒト由来のRNAについてはクロンテック社より市販されている対象者不定のサンプルを用いており、倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

#### 1. マウスおよびヒトLpd遺伝子cDNAの構造解析

マウスLpd遺伝子は722アミノ酸、ヒトLpd遺伝子は724アミノ酸をコードしており、相互の相同性は約87%であった。マウス、ヒトLpd遺伝子ともショウジョウバエ・ホモログ(Bubblegum と呼ばれている)とは約50%の相同性を示した。また、既知の遺伝子、タンパク質との

相同性は低く、新規遺伝子であることが判明した。タンパク質モチーフとしては、チオエステル形成酵素群に保存されている「AMP結合配列」を含むことが明らかになった。この配列はアシルCoAシンターゼにおいてもよく保存されていることが知られている。

#### 2. Lpd タンパク質の酵素活性

Lpd が「AMP結合配列」を有すること、また、ALD発症にはアシルCoAシンターゼの機能抑制が関与すると考えられていることから、LpdがアシルCoAシンターゼ活性をもつか否かを検討した。その結果、Lpdはパルミチン酸(PA)を基質としてPA-CoAを合成する、長鎖脂肪酸アシルCoAシンターゼ活性を持つことが明らかになった。一方、リグノセリン酸をCoA化することはできず、超長鎖脂肪酸に対しては有意な活性を示さなかった。Lpdは長鎖脂肪酸特異的なアシルCoAシンターゼ活性を有するものと考えられる。

#### 3. Lpd の組織特異的発現

マウスLpd 遺伝子転写産物 (mRNA)は、脳、脊髄、副腎、精巣において特異的な約3 kbのバンドとして認められたが、心臓、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓での発現は認められなかった。また、スプライスアイソフォームは認められなかった。

ヒトにおいては、脳、脊髄、副腎に発現が確認された。脊髄および脳では7、4.4、3 kbのバンドが検出され、スプライスアイソフォームの存在する可能性が示唆された。

ヒトおよびマウスにおけるLpd遺伝子の発現はALDにおいて障害を受ける組織とよく一致した。

#### 4. Lpd タンパク質の同定

抗 Lpdモノクローナル抗体により、副腎皮質由来のY1細胞およびマウス組織(脳、精巣、卵巣、副腎)に存在するLpd タンパク質を検出することに成功した。Lpdタンパク質はcDNAから予想されたとおり、SDS-PAGE上で約80kDaのバンドとして検出された。

### D. 考察

ヒトおよびマウス脳ncDNAライブラリーからクローニングされた新規遺伝子Lpdは長鎖脂肪酸を特異的な基質としてアシルCoAを合成するアシルCoAシンターゼ活性を有するタンパク質をコードしていた。その一次構

造は、既知の長鎖脂肪酸アシルCoAシンターゼとは相同性が低く、新たな分子群(タンパク質ファミリー)を構成している可能性がある。また、その発現はALDにおいて障害をうける組織に特異的であった。ショウジョウバエLpdホモログの機能欠損が、神経変性および超長鎖脂肪酸の蓄積というヒトALDに類似した表現型をもたらすとの報告がある。私達の結果とショウジョウバエ変異体の表現型から、ヒトALDにおける組織特異的障害発症の機序にLpdが関与している可能性が考えられる。

一方、ALD発症には超長鎖脂肪酸アシルCoAシンターゼの機能低下が関与するのではないかと考えられてきた。Lpdには超長鎖脂肪酸をCoA化する活性は認められず、ショウジョウバエLpd変異体において超長鎖脂肪酸が蓄積する原因は不明である。今後、長鎖脂肪酸の代謝障害が間接的に超長鎖脂肪酸の代謝系に影響を与える可能性について検討する必要がある。また、生体内においては、未知の因子の作用によってLpdの基質特異性が変化する可能性も考えられる。これらの課題に答えるためには、培養細胞レベルでの解析に加えて、遺伝子改変マウスなどを用いた個体レベルでの解析が必須である。

## E. 結論

ALDの原因遺伝子ALDPは広範な組織で発現しており、X-ALDにおける組織特異的障害の発症には未知の介在因子の関与が想定される。ヒト、マウスにおける発現特異性およびハエ・ホモログ変異体における神経変性症状から、アシルCoAシンターゼ活性を有する新規遺伝子産物 lipidosin はALDにおける標的細胞特異的障害の発症を規定する介在因子の有力な候補であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Moriya-Sato, A., Hida, A., Inagawa-Ogashiwa, M., Wada, M. R., Sugiyama, K., Shimizu, J., Yabuki, T., Seyama, Y. and Hashimoto, N. (2000)  
Novel Acyl-CoA Synthetase in

Adrenoleukodystrophy Target Tissues.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 279,  
62-68.

### 2. 学会発表

守屋-佐藤綾子、稲川-小柏匡代、梶山薫、橋本有弘

「分化不能筋芽細胞株INC2特異的に発現する新規遺伝子の解析」

日本分子生物学会第23回大会 (12月13～16日、神戸)。

G. 知的所有権の取得状況  
なし。

# 研究報告書

## オリゴデンドロサイト特異的に発現する ABC 蛋白 ABC2 の単離

稲垣 暢也 秋田大学医学部生理学第一講座  
塩田 清二 昭和大学医学部解剖学第一講座

### 目 的

ATP-binding cassette (ABC) 蛋白のなかでも ABC1 (ABCA) サブファミリーは脂質輸送に関与している可能性が強い。そこで、ABC1 サブファミリーに属する ABC2/ABCA2 の全長 cDNA を単離し、これまで不明であった全一次構造を決定し、さらにその組織発現を明らかにする。

### 方 法

既知の ABC2 の部分配列をプローブにして、ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、全長の塩基配列を決定した。RNA probe を用いて、In situ hybridization を行い、さらに ABC2 に対する抗体を作成して免疫組織染色を行った。

### 結果及び考察

ABC2 は 2434 アミノ酸からなる糖蛋白で、ABC1、ABC3、ABCR と 40 ~ 45 % のアミノ酸一致を認めた。ABC2 mRNA は脳の特に出質において発現が著しく多く、免疫組織染色ではオリゴデンドロサイトのライソゾームに陽性反応が認められた。従って、ABC2 はオリゴデンドロサイトに特異的な脂質輸送に関与している可能性が示唆された。

### 結 論

ABC2 の全長の一次構造を初めて決定した。ABC2 は特にオリゴデンドロサイトにおけるミエリン形成に関与している可能性が示唆された。