

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究

平成13年度 研究報告書

主任研究者 桜川宣男

平成14年(2002)4月

目次

I. 総括研究報告	1
ライソゾーム病の病態解明と治療法の開発に関する研究 桜川宣男	
II. 分担研究報告	
1. ライソゾーム病の病態解明と治療法の開発に関する研究	6
桜川宣男	
2. 中枢神経障害の発症機構の神経発生的解明と治療に関する研究	8
御子柴克彦	
3. 試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究	14
浅島 誠	
4. ライソゾーム病の臨床疫学的、分子遺伝学的研究	17
青木継稔	
5. 成人型 Krabbe 病の病態および発症機序に関する研究	23
古谷博和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

（総括研究報告書）

ライソゾーム病の病態解明と治療法の開発に関する研究

（主任研究者：桜川宣男、国立精神・神経センター神経研究所）

研究要旨

ライソゾーム病の特定疾患対策研究として、新規の治療法の開発研究のための基礎研究、動物モデルによる治療実験、疾病発病の病態解明および患者 QOL 改善に資する課題を取り上げた。基礎研究ではヒト羊膜間葉細胞における神経幹細胞の分離、同定に成功した。ツメガエルによる実験で細胞内において腎臓、膵臓、心臓の作成に成功した。また腹側因子の同定を行った。ライソゾーム病モデルマウスに対する欠損遺伝子導入羊膜細胞の脳内移植実験では、移植部位および遠隔部位における酵素活性の上昇と蓄積物質の消失を観察した。病態解明については、38例の Danon 病の臨床病理解析の結果、男性患者では心筋症、ミオパチー、精神遅滞を3主徴とし、女性患者では多くの場合心筋症のみで発症することが判明した。Hunter 病の重症型と軽症型の変異蛋白質の正常の相違を確認し、IDS 3次元構造解析により2つのドメインから形成される基本骨格を確認した。患者 QOL の改善に資するために、診断の永続的、一元化にむけて体制づくりを始めた。そして一部のライソゾーム病についてのマスキング・システムの構築を検討している。

[分担研究者]

御子柴克彦 東大医化学研究所 教授
浅島 誠 東大総合文化研究科 教授
青木 継稔 東邦大学医学部 学長
古谷 博和 九州大学医学部 講師

[協力研究者]

奥山 虎之 国立成育医療センター室長
桜庭 均 東京都臨床医学研究所部長
祐川 和子 岐阜大学医学部 講師
横山 安伸 エス・アール・エル 課長
西野 一三 国立精神神経センター部長

A. 研究目的

ライソゾーム病の診断法の進歩により、若年型や成人型の症例が診断されるようになり、長期生存患者の QOL が問題となってきた。一方中枢神経症状を呈する脳型のライソゾーム病については治療法は確立していない。そこでライソゾーム病の病態発現機序を分子生物学的手法により解明して、中枢神経症状の改善を目指した画期的な治療法の開発を行うことを目的とする。そして長期生存患者の QOL の改善に資することを目的とする。

B. 研究方法

細胞移植、臓器形成の基礎研究：初めにライソゾーム病の新規の治療法として細胞移植による脳機能再生の基礎研究を行った。桜川はドナー細胞として免疫寛容を示す羊膜細胞、特に羊膜間葉細胞の分離、培養法を確立し、幹細胞としての性質を検討した。

御子柴は脊椎動物初期発生における体軸形成の分子機構を解明するために IP3 により上昇した細胞質 Ca^{2+} により制御され腹側化を誘導する因子の同定を試み、Cn/NF-AT 経路が腹側化シグナルであることの同定を試みた。浅島はツメガエルのアニマルキャップからネフロンの形成を試み、腎形成に関与する新規の遺伝子を探した。同様にアニマルキャップから膵臓や心臓の形成すること試みた。

治療法の開発研究：奥山・桜川は責任遺伝子導入羊膜上皮細胞の脳内移植によりムコ多糖症中枢神経病変に対する治療法の開発を行った。桜庭・桜川はファブリ病責任遺伝子導入羊膜不死化細胞を半透膜に封入した所謂カプセル化細胞の移植による治療研究を行った。

病態解明の研究：古屋は成人型 Krabbe 病の病態解明のため、4例の遺伝子解析と酵素活性の比較検討した。西野は遺伝学で

に Danon 病と診断確定した患者の臨床病理学的特徴について検討した。祐川は遺伝性ムコ多糖症の遺伝子変異によるアミノ酸置換が原因酵素蛋白質の立体構造に与える影響について検討した。

患者 QOL の改善に資する課題：ライソゾーム病の治療法の進歩が期待されているが、そのためには早期発見による早期治療が不可欠である。青木は、ムコ多糖症と異染性白質変性症のマススクリーニング・システムの構築を検討した。また中間代謝産物測定や遺伝子診断などが大学や研究施設においてサービシ的に行われている現状について、将来的に継続される保証がない。そこで横山はライソゾーム病の特定疾患認定に必要不可欠のこれら診断法を包括的一元化と半永久的な診断システムの構築の素案を始めた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを施行して、妊婦より胎盤を入手し、羊膜細胞の調整を行った。動物実験はそれぞれの研究機関の動物倫理委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

再生医学の基礎研究：桜川はヒト羊膜間葉細胞に神経幹細胞が存在している可能性を発見した。本細胞は BrdU+/nestin+/vimentin+ の性質を保持し、amniosphere (一次、二次) を形成する自己複製能とオリゴ、アストロへの分化する多分化能を持つ。GFP 遺伝子導入した組み換えレトロウイルス感染細胞が分裂し集族する所見が得られた。羊膜間葉細胞は長期継代が可能である。本細胞の高純度で大量培養法の確立と、動物実験による生体内の動態を検討始めた。御子柴は腹側化因子に関わる IP₃-Ca²⁺ シグナル伝達経路を解析し、転写因子の 1 つである nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) が受精後、4 細胞期に腹側化因子であることを同定した。浅島はツメガエルのアニマルキャップからネフロン (腎形成単位)、膵臓形成および心臓形成を *in vitro* で成功した。そして腎形成に関与する新規の遺伝子をクローニングし、前腎間での発現と機能を解析した。

治療法の開発研究：奥山・桜川は、遺伝

性ムコ多糖症 VII 型モデルマウスに対して、責任遺伝子である β -glucuronidase 遺伝子を導入したラット羊膜細胞を脳内に移植した。移植後 30 日目に脳内に生着しており、移植部位および遠隔部位における酵素活性上昇と形態学的に蓄積の減少を認めた。桜庭・桜川はファブリ病の責任遺伝子である α -galactosidase 遺伝子を CHO 細胞に導入し、半透膜ファイバーのカプセルに包埋した所謂カプセル化細胞の移植治療実験を行った。酵素は半透膜ファイバーを透過して培養液に遊出し、患者由来の細胞内に取込まれて、酵素活性の上昇と蓄積物質の減少を惹起した。現在 *in vivo* 実験を行っている。

病態解明の研究：古屋は、成人型 Krabbe 病の病態解明を目的とし、乳幼児型と比較した。臨床症状は軽微で、末梢神経障害が主体であった。新核細胞発現系を用いた実験では乳幼児型と成人型をきたす変異で酵素活性に全く差は求められなかった。即ち臨床型と遺伝型では相関が存在しないことが判明した。西野は Danon 病 38 名の臨床病理学的特徴について検討した。男性患者では心筋症、ミオパチー、精神遅滞を 3 主徴とし、女性患者では多くの場合心筋症のみで発症することが判明した。祐川は Hunter 病の病態解明を行い、重症型と軽症型の変異蛋白質の性状の相違を見い出した。そして IDS 3 次元構造解析により 2 つのドメインから形成される基本骨格を確認した。

患者 QOL の改善に資する課題：青木はライソゾーム病の 7 疾患をスクリーニング対象疾患に選定し、今回はムコ多糖症と異染性白質変性症を取り上げた。前者は尿中ムコ多糖体をメチルメチレンブルー呈色反応を用い、後者は新生児濾紙血を用いて arylsulfatase A を測定することが可能であり、検討を開始した。横山はライソゾーム病の診断方法の統一と標準化の必要性から酵素測定および遺伝子解析系の一元化システム構築の試作始めた。

D. 考察

桜川が研究しているヒト羊膜間葉細胞は多機能、多分化能を保持する細胞である可能性が高い。本細胞から神経幹細胞の分離、培養が可能となることは、他臓器・組織の

細胞への分化誘導の期待が持てる。浅島がツメガエルのアニマルキャップから腎臓、膵臓、心臓を *in vitro* で形成することに成功したが、この技術をヒト羊膜間葉細胞に応用するならば、ヒト臓器の *in vitro* での作成に大きな期待が持てる。一方御子柴はツメガエル初期胚において腹側化誘導因子の同定に成功した。これは幹細胞から *in vitro* における臓器形成に大きな情報を提供した。

治療法の開発研究で用いた羊膜上皮細胞は、多機能を有するが自己複製能には乏しく、長期継代が難しい。しかしムコ多糖症 VII 型モデルマウスの脳内への責任遺伝子導入細胞の移植実験より、脳代謝病のような広範囲な脳病変にも細胞移植を応用できる可能性を示唆している。このことより、羊膜間葉細胞からの神経幹細胞の脳移植はさらに有望と考える。また臨床応用の実際面より考えるとカプセル化細胞は近い将来において実現性が高い技術である。即ち責任遺伝子を強発現させた不死化細胞を包埋したカプセルよりその酵素が遊離してくることの発見は重要であり、臨床応用面では期待が大きい。

患者 QOL に資する課題として、ライソゾーム病の包括的で永続的な診断システムの樹立を検討している。特定疾患の認定に不可欠である中間代謝産物測定、酵素診断、遺伝子診断などの統一と標準化のためにムコ多糖症の診断法について始めた。これはサービシ的に診断を行ってきた大学などの研究機関からは大きな期待を寄せられている。

E. 結論

ライソゾーム病の中樞神経症状治療のための基礎研究を行い、神経幹細胞を含有する可能性を持つヒト羊膜間葉細胞がドナー細胞として有望であることを証明した。この細胞を用いた再生医学的アプローチとして、腹側因子の解析と *in vitro* での臓器形成の基礎データが蓄積してきている。羊膜細胞を用いたライソゾーム病モデル動物の治療実験でも有効であるとの成績を得た。ムコ多糖症、Danon 病の病態解明により治療法の開発に結び付けたい。また早期診断および診断の包括的、一元化にむけて患者

QOL 改善への貢献をめざしている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi S, et al. A novel approach to *ex vivo* gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier. *Tohoku J Exp Med* 193: 279-292, 2001.

1) Kosuga M, et al. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Therapy* 3 : 139-148, 2001

3) Matsuura K, et al. Synthesis and release of erythropoietin by human amniotic epithelial cells. *J Tokyo Medical University* 59:38,2001

4) Kosuga M, et al. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intra-cerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant*.10: 435,2001

5) Nakajima T, et al. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transpl* 10: 423, 2001.

6) Okawa H, et al. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 21: 4003, 2001

7) Elwan MA, Sakuragawa N: Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 25: 205-208, 2002

8) Koyano S, et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth and Diff*. In press.

9) Naganawa et al. *In vitro* study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant*. In press.

10) Fukami K et al. Requirement of phospholipase C δ 4 for the Zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*

292:920,2001

11) Ohshima T et al. Synergistic contributions of cyclin-dependent kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *PNAS* 98:2764,2001

12) Koyabu Y, et al. Physical and functional interactions between zic and gli proteins. *U B C* 276: 6889,2001

13) Kitaguchi T et al. Xenopus polycomblike 2 (XPc12) controls anterior to posterior patterning of the neural tissue. *Dev Genes Evol* 211: 309, 2001

14) Iwasaki H et al. Molecular characterization of the starfish inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and its role during oocyte maturation and fertilization. *JBC* 277: 2763, 2002

15) Uchiyama T et al. A novel recombinant hyper-affinity inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) absorbent traps IP3, resulting in specific inhibition of IP3-mediated calcium signaling. *JBC* 277: 8106, 2002

16) Aruga J et al. Zic2 controls cerebellar development in cooperation with zic 1. *J Neurosci*. 22: 218, 2002

17) Saneyoshi T et al. The Wnt/Calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. *Nature*, in press.

18) Ohshima T et al. Cdk5/p35 contributes synergistically with Reelin/Dab1 to the positioning of facial branchiomotor and inferior olive neurons in the developing mouse hindbrain. *PNAS*, in press.

19) Ichigi J et al. Dome formation and tubule morphogenesis by Xenopus kidney A6 cell cultures exposed to microgravity simulated with a 3D-clinostat and to hypergravity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Animal* 37:31, 2001

20) Asashima M et al. Spermann's influence on Japanese Developmental Biology. *J Dev Biol* 45: 57, 2001

21) Ariizumi T et al. In vitro induction systems for analyses of amphibian organogenesis and body patterning. *J Dev Biol*. 45: 273,2001

22) Furue M et al. Activin A induces expression of rat Sel-1/mRNA, a negative regulator of Notch signaling in rat salivary

gland-derived epithelial cell. *BBRC* 282:745,2001

23) Yamamoto H et al. Inhibition of the signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *JBC* 276:26875, 2001

24) Nishinakamura R et al. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney Development. *Develop* 128; 3105, 2001

25) Michiue T et al. Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and Casein Kinase I ϵ . *JBC* 276: 33147, 2001

26) Tiedemann H. et al. Pluripotent cell (stem cell) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis. *Dev Growth Diff* 43: 469,2001

27) Hino S-I et al. Inhibition of the Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Mol Cell Biol* 21: 330, 2001

28) Igarashi T et al.: Cloning and characterization of the Xenopus laevis p8 gene. *Dev growth Diff* 43:693,2001

29) Hayata T. Et al. Overexpression of the secreted factor Mig30 expressed in the Spermann organizer impairs morphogenic movements during Xenopus gastrulation. *Devel Biol* 241: 94, 2002

30) Onuma Y et al. Multiple nodal-related genes act coordinately in Xenopus embryogenesis. *Dev Biol* 241,2002

31) Wada N et al. The second largest subunit of mouse DNA polymerase epsilon, DPE2, interacts with SAP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA *J Biochem* 131: 307, 2002

32) Sedohara A et al. Role of BNP⁴ in the inducing ability of the head organizer in Xenopus laevis. *Zoo Sci* 19: 67, 2002

33) Aoki T. et al. Wilson's disease in Japan, nationwide survey of clinical features and molecular analysis in Japanese patients. *J Korean Soc Inh Met Dis* 1: 33, 2001

34) 山口之利他。Wilson 病の食事療法における微量元素の検討。飲料水を中心に（第2報）。*Bio Res Trace Elem* 12: 291; 2001

35) 青木継稔他。Menkes 病と脳形成異常。*脳神経* 53:427.2001

36) 青木継稔他。Wilson 病の長期治療と問

題店。小児内科 33:921,2001

37) 清水教一他。ウイルソン病。小児内科 33:1278,2001

38) 清水教一。Wilson 病のマス・スクリーニング。小児科臨床 61:1580,2001

39) 清水教一。Wilson 病。小児内科 (増刊) 171,2001

40) 清水教一。Wilson 病。日臨 59 (増刊:本邦臨床統計集2) 383:2001

41) 青木継稔、黒田泰弘。新生児マス・スクリーニングの現状と今後の動向。日児誌 105:1178,2001

42) 青木継稔。新生児・乳幼児期における新しいマス・スクリーニング対象疾患について。日児誌 105:1202,2001

43) 青木継稔。ヘモクロマトーシス。黒木良和編。日本臨床領域別症候群シリーズ33。先天代謝異常症候群辞典。上。日本臨床社、大阪。PP802,2001

44) 青木継稔。Menkes 病。黒木良和編。日本臨床領域別症候群シリーズ33。先天代謝異常症候群辞典。上。日本臨床社、大阪。PP170,2001

45) 青木継稔。Wilson 病。黒木良和編。日本臨床領域別症候群シリーズ33。先天代謝異常症候群辞典。上。日本臨床社、大阪。PP815,2001

46) 奥宮敏可他。Fabry 病。別冊、日本臨床 領域別症候群シリーズ No. 59 高脂血症。313,2001

47) 桜庭 均。Fabry 病における脳血管障害。別冊、医学の歩み 脳血管障害—臨床と研究の最前線。54,2001

48) 桜庭 均。Fabry disease. 別冊。日本臨床 領域別症候群シリーズ No. 33 先天異常症候群 (上巻) 661,2001

2. 学会発表

1) 桜川宣男他。ヒト羊膜間葉細胞における nestin 陽性細胞の同定と神経幹細胞の検討。第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会。京都 9.26-28,2001

2) 児矢野 聡他。ヒト羊膜上皮細胞 (HAEC) の actovin と noggin の合成・分泌能について。第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会。京都 9.26-28,2001

3) M. Elwan, 桜川宣男。サル羊膜細胞のドパミン取込み。第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会。京都 9.26-28,2001

4) 掘越嗣博他。ラット羊膜における Cell-CAM 105 の発現。第46回日本人類遺伝学会。大宮、10.3-5,2001

5) 児矢野 聡他。ヒト羊膜の上皮細胞および間葉系細胞の免疫原性について。第46回日本人類遺伝学会。大宮、10.3-5,2001

6) 小須賀基道他。リソゾーム蓄積症の治療を目的とした遺伝子導入サル羊膜細胞の脳内移植法の検討。第46回日本人類遺伝学会。大宮、10.3-5,2001

7) 大杉圭子他。遺伝子導入カプセル化細胞によるライソゾーム病への治療研究。第44回日本先天代謝異常学会 福岡 11.8-10,2001

8) 千葉靖典、加瀬良一、小谷政晴、小笠原 諭、丸山 穰、中島 佑、小林和男、竹内 誠、桜庭 均、地神芳文。出芽酵母によるファブリー病治療役の開発。第22回日本糖質学会年会、静岡 7.16-18,2001

9) 滝山宣明、加瀬良一、小谷政晴、桜庭均：筋芽細胞を標的とした Fabry 病の遺伝子治療法の開発。第44回日本先天代謝異常学会総会。久留米 11.8-10,2001

10) 千葉靖典、加瀬良一、小谷政晴、小笠原諭、丸山 穰、中島 佑、小林和男、竹内 誠、桜庭 均、地神芳文。ファブリー病酵素補充療法を目的とした出芽酵母による α -ガラクトシダーゼの産生。第44回日本先天代謝異常学会総会。久留米 11.8-10,2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得；なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他

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）

ライソゾーム病の病態解明と治療法の開発に関する研究
（主任研究者：桜川宣男、国立精神・神経センター神経研究所）

研究要旨

ライソゾーム病の中樞神経症状に対する治療法として、細胞移植法の開発研究を行った。多機能を有すると考えられるヒト羊膜間葉細胞に注目し、神経幹細胞の存在について検討した。初めに羊膜間葉細胞の分離・培養に成功した。羊膜の凍結標本の免疫染色では、羊膜上皮細胞は CK19（上皮細胞マーカー）に陽性反応を示し、その下層の羊膜間葉細胞は vimentin, nestin, musashi-1 に陽性であった。培養羊膜間葉細胞は BrdU+/nestin+/ vimentin+細胞であり、bFGF, EGF 添加の無血清培地にてスフェロイドが形成された。NGF, NT-3 添加培地による培養にて、GFAP, Gal C 陽性細胞が増加した。以上よりヒト羊膜間葉細胞には神経幹細胞の存在が示唆された。

A. 研究目的

中樞神経系の障害を伴うライソゾーム病の治療法は確立されていない。ヒト羊膜は羊膜上皮細胞層と間葉細胞層から形成され、いずれも免疫寛容を呈する細胞である。従来の研究により、羊膜上皮細胞は種々の神経細胞様の機能を呈することを証明してきた。そしてムコ多糖症Ⅶ型マウスへの欠損遺伝子導入マウス羊膜細胞の脳内移植により、酵素学的小よび組織学的改善を報告した。我々は、より多機能を有する可能性を秘めた羊膜間葉細胞に注目して本研究を行った。ヒト羊膜間葉細胞の分離、培養法を確立し、神経幹細胞についての性質を検討した。最終的には、本細胞の脳内移植によるライソゾーム病の治療法の確立を目的としている。

B. 研究方法

ヒト胎盤はインフォームドコンセント施行して入手した。従来の方法により、胎盤から羊膜上皮細胞をトリプシン処理して分離した。残った組織をパパイン、DNAase などの混合酵素液により処理して、羊膜間葉細胞を分離した。培養は LIF, mercaptoethanol (ME), 10% FBS 含有の DMEM:F12 培地により、コラーゲンコート培地での培養で培養した。培養細胞を種々の抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。また RT-PCR により nestin の同定を行った。さらに bFGF, EGF 含有の無血清培地

によりスフェアの形成を行った。そして、NGF, NT-3 添加による分化誘導実験を行った。Clonality assay は GFP 導入の組み換えレトロウイルスを用いて行った。

（倫理面への配慮）

ヒト胎盤は提供される妊婦に目的を予め説明し、同意を得てから帝王切開分娩時に入手した。

C. 研究結果

羊膜の凍結標本の免疫染色により、羊膜上皮細胞層は CK19 に陽性であり、下層の羊膜間葉細胞層は vimentin に陽性に染色され、さらに nestin, musashi-1 に陽性反応を示した。培養羊膜間葉細胞には BrdU 陽性細胞が約 20% 存在しており、nestin, musashi-1 と共発現していた。つぎに bFGF, EGF 含有の無血清培地を用いた培養により、スフェロイド (amniosphere) が形成された。さらにトリプシン処理後、二次スフェロイドが形成された。次にスフェロイドを付着培地に移し、NGF, NT-3 による分化誘導実験を行った。bFGF, EGF 培地では、nestin+/β-tubulin+であり、NGF 添加培地では β-tubulin+/GFAP+、NT-3 添加培地では GFAP+/Gal C+細胞が増加する傾向を示した。GFP 導入の組み換えレトロウイルスを羊膜間葉細胞に感染させ、付着培地で培養した。GFP 導入された蛍光発色する細胞がクラスター状の集族が観察された。

羊膜上皮細胞層は受精後8日目に Epiblast が二分して形成される。一方羊膜間葉細胞層は胎生初期には羊膜上皮細胞層と絨毛膜との広い間隙をうめる粗な組織として存在する。胎生が進むにつれてこの間隙は縮小し、妊娠末期には羊膜上皮細胞層と絨毛膜との中間をうめる細胞層として存在する。羊膜間葉細胞を分離、培養したが、90%以上の純度であることが判明した。この培養細胞は、神経幹細胞の特徴である BrdU+/nestin+/vimentin+ を呈する細胞であることを証明した。また神経幹細胞の性質として必要な自己複製能 (amniosphere 形成) と多機能 (神経細胞、オリゴ、アストログリア細胞マーカーの発現) を持つことが判明した。このことより羊膜間葉細胞には神経幹細胞が存在していることが示唆された。間葉細胞は骨髄に存在するが、神経系細胞に分化誘導可能であることが証明されている。羊膜間葉細胞は免疫寛容性を持つことより同種移植が可能であることより、骨髄間葉細胞より移植面では有利である。今後動物実験により生体内での移植細胞の動態について検討し、モデル動物の治療細胞として応用する予定である。

E. 結論

ヒト羊膜間葉細胞の分離、培養に成功し、その性質を検討した結果、神経幹細胞の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G.

1. 論文発表

1) Takahashi S, et al. A novel approach to ex vivo gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier. *Tohoku J Exp Med* 193: 279-292, 2001.

2) Kosuga M, et al. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Therapy* 3 : 139-148, 2001

3) Matsuura K, et al. Synthesis and release of

erythropoietin by human amniotic epithelial cells. *J Tokyo Medical University* 59:38,2001

4) Kosuga M, et al. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intra-cerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant.*10: 435,2001

5) Nakajima T, et al. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplanatation to the liver. *Cell Transpl* 10: 423, 2001.

6) Okawa H, et al. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 21: 4003, 2001

7) Elwan MA, Sakuragawa N: Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 25: 205-208, 2002

8) Koyano S, et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth and Diff.* In press.

9) Naganawa et al. In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant.* In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
（統括・分担）研究報告書

中枢神経障害の発症機構の神経発生学的解明と治療に関する研究

分担研究者 御子柴 克彦 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

これまでに多くの背側化因子および腹側化因子が同定されているが、いずれも IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路との関連は明らかでない。そこで本研究は脊椎動物初期発生における体軸形成の分子機構を明らかにするために、 IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路の上流のシグナル、つまり IP_3 産生を誘導する分子、および下流のシグナルである、 IP_3 により上昇した細胞質 Ca^{2+} により制御され腹側化を誘導する分子の同定を試み、転写因子の1つである nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) が受精後、4細胞期に腹側化因子であることを同定した。

A. 研究目的

Ca^{2+} シグナルは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇、持続的上昇、 Ca^{2+} 濃度の上昇と降下を繰り返す Ca^{2+} 振動など多様な濃度変化の様式を持ち、複数の転写調節因子が Ca^{2+} 振動の頻度の違いをそれぞれの活性の使い分けに利用している。このような Ca^{2+} シグナルを解読しうる転写調節因子の一つ、nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) は Ca^{2+} /カルモデュリン (CaM) 依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリン (Cn) の制御を受ける転写因子である。Cn/NF-AT 経路は T 細胞活性化を中心に解析されてきたが、神経系で IP_3 受容体の発現を調節しているほか、心肥大や骨格筋の分化に関与していることも報告された。このように多様な機能を持つ Cn/NF-AT 経路であるが、ツメガエルでの Cn および NF-AT 分子の存在の報告はなく、当然どのような機能を持つかは全く不明である。そこで、Cn および NF-AT のツメガエル相同遺伝子を単離し、時空間的発現、 Ca^{2+} 依存性、体軸形成に与える影響を調べることにより Cn/NF-AT 経路が腹側化シグナルとして機能するかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究結果

細胞外の刺激に対しフォスファチジルイノシトール (PI) の代謝回転が活性化されるとフォスファチジルイノシトール 4, 5 リン酸が水解され、イノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP₃) ジアシルグリセロールが生成される。IP₃ は細胞内小器官の小胞体膜上に存在する IP₃ 受容体に作用して細胞内貯蔵庫からのカルシウム (Ca²⁺) 放出を制御する情報伝達物質である。IP₃ 受容体は、ほぼ全ての組過的上昇が観察される。(2) イノシトール代謝酵素の阻害剤であるリチウムをアフリカツメガエル (以下ツメガエル) やゼブラフィッシュ、ヒドドラへ曝露させると胚が背側化する。なお、この現象はイノシトールの注入で見られなくなる。(3) 32-64 細胞期での IP₃ 含量上昇がリチウムによって消失する。(4) 背側でイノシトール代謝を活性化すると胚が腹側化する。(5) IP₃ 受容体に対する特異的な機能阻害抗体を腹側割球へ注入すると背側化が観察される。これらの結果は、IP₃-Ca²⁺シグナル伝達経路が腹側化シグナルとして機能していることを強く示唆する。

これまでに多くの背側化因子および腹側化因子が同定されているが、いずれも IP₃-Ca²⁺シグナル伝達経路との関連は明らかでない。そこで本研究は脊椎動物初期発生における体軸形成の分子機構を明らかにするために、IP₃-Ca²⁺シグナル伝達経路の上流のシグナル、つまり IP₃ 産生を誘導する分子、および下流のシグナルである、IP₃ により上昇した細胞質 Ca²⁺により制御され腹側化を誘導する分子の同定を試み、それぞれの作用メカニズムについての解析を行った。

Cn A subunit (CnA)のツメガエル相同遺伝子 (XCnA) をツメガエル卵母細胞 cDNA ライブラリーよりマウス EST clone (mouse CnA 断片)をプローブに用いブランクハイブリダイズ法により単離した。XCnA は、マウスやヒト CnA とアミノ酸レベルで全長では 93%以上の相同性を示し、母性因子のタンパク質として未受精卵から各発生段階で一定量発現していた。自己阻害領域を欠損させることにより Ca²⁺非依存的な酵素活性を示す XCnA (XΔCnA) を作成し強制発現させたところ、背側中胚葉誘導因子であるアクチビンによる予定外胚葉外植体の伸長反応が部分的に阻害された。腹側化因子は背側での伸長運動を阻害することが知られており、このことから Cn が腹側化活性を持つことが考えられた。次にツメガエル卵母細胞 cDNA library よりマウス NF-ATc1 Rel domain をプローブにしたブランクハイブリダイズ法によりツメガエル NF-AT 相同遺伝子 XNF-AT を単離した。XNF-AT も XCnA と同じく母性因子としてタンパク質、RNA

ともに存在し、発生段階を通じて一定量発現していた。培養細胞に発現させた XNF-AT はカルシウムイオノフォア A23187 刺激もしくは X Δ CnA の共発現により脱リン酸化され、核内へ移行した。XNF-AT は Cn 活性および API 依存的に NF-AT 結合サイトを含むマウス IL-2 プロモーターを活性化させた。以上、XNF-AT は、1) 母性因子として存在すること、2) Ca²⁺/Cn 依存的な転写因子であることから腹側化シグナルとしての IP₃-Ca²⁺シグナルの下流で働きうる分子であることが示唆された。

続いて恒常的活性化型 XNF-AT と顕性不活性 XNF-AT を用いた機能獲得実験および機能喪失実験により XNF-AT の背腹軸形成への関与を検討した。Cn による脱リン酸化部位および Cn 結合部位を欠損させた XNF-AT Δ SP は培養細胞において刺激の有無に関わらず核内に局在し、Cn 非依存的に IL-2 プロモーターを活性化させた。すなわち、XNF-AT Δ SP は Ca²⁺刺激に対し非感受性であり、恒常的活性化型 XNF-AT として機能することを確かめた。XNF-AT Δ SP RNA を 4 細胞期の割球へ注入すると、前頭部構造の形成阻害が観察された。さらに、XNF-AT Δ SP の発現により予定外胚葉外植体の中胚葉誘導因子アクチビンや FGF による伸長運動が阻害された。これらの結果は、XNF-AT に腹側化活性があることを示唆する。XNF-AT の DNA 結合部位を含む C 末端 Rel 相同領域を全て欠損させた XNF-AT Δ Rel はツメガエルにおいて野生型 XNF-AT による IL-2 プロモーターの活性化を濃度依存的に阻害した。このことから XNF-AT Δ Rel が機能喪失型 XNF-AT として機能することが確かめられた。XNF-AT Δ Rel RNA を 4 細胞期腹側割球への注入すると異所性の体軸（二次軸）が生成された。さらにこの二次軸は野生型 NF-AT との共発現によってレスキューされた。XNF-AT Δ Rel の効果を分子マーカーの発現で確認したところ、XNF-AT Δ Rel により予定腹側帯域外植体でのオーガナイザーマーカーの *gooseoid*, *chordin* の他、*Xnr3*, *siamois* の発現が上昇、逆に腹側マーカーである *Xvent*, *Xhox3* の発現が消失していた。これらの結果は XNF-AT Δ Rel が内在性の NF-AT 活性を特異的に阻害して腹から背への運命変換を起こしたと解釈できる。以上、XNF-AT は機能獲得で腹側化、機能喪失で背側化を引き起こすことから腹側化因子であると結論した。よって、IP₃-Ca²⁺シグナルの下流として Cn/NF-AT による転写調節を経て腹側化が引き起こされているものと考えられる。

XNF-AT Δ Rel により誘導された *Xnr3*, *siamois* は背側化因子の一つである Wnt/ β -catenin 経路特異的な標的遺伝子産物であり、NF-AT 経路の抑制が Wnt/ β -catenin

経路を活性化したことを意味する。実際、XNF-AT Δ Rel によって β -catenin タンパク質の安定化が起きること、Xwnt8 による二次軸の形成を XNF-AT Δ SP が抑制することからも NF-AT 経路と Wnt/ β -catenin 経路のクロストークが推察された。そこで Wnt/ β -catenin 経路との作用点がどこかを XNF-AT Δ Rel と Wnt 経路の負の調節因子 (*frzb*, 顕性不活性型 Xdsh、GSK3 β 、顕性不活性型 Tcf) との共発現により解析した。XNF-AT Δ Rel による *siamois*、*Xnr3* の発現誘導は XGSK3 β および顕性不活性型 XTcf によって消失した。この結果は XNF-AT 経路は Wnt/ β -catenin 経路を少なくとも GSK3 β より上流、Xdsh より下流で負に制御していることを示唆する。

C. 考察

Wnt 経路は現在のところその機能から二つのグループ、背側化活性を持つ Wnt/ β -catenin、G タンパク質を介して Ca^{2+} 動員を起こすとされる Wnt/ Ca^{2+} 経路の二つに分けられる。Wnt/ Ca^{2+} 経路の機能は不明な点が多いが、その発現により 1) Wnt/ β -catenin の活性を抑制する、2) 予定外胚葉外植体のアクチビンによる伸長運動を阻害するなどの表現型を示し、それらは XNF-AT で得られた表現系と極めて一致する。従って、Wnt/ Ca^{2+} 経路は細胞内 Ca^{2+} 動員を起こすことと過剰発現による表現型の相似から NF-AT 経路の上流に位置すると予想される。そこで Wnt/ Ca^{2+} 経路が直接 Cn/NF-AT を活性化させるか否かを検討した。培養細胞において Wnt/ Ca^{2+} 経路が NF-AT に依存的な転写を活性化したこと、予定外胚葉外植体における NF-AT の核内移行を促進したこと、さらにインビボで Xwnt5A による表現系を XNF-AT が強調したことから Wnt/ Ca^{2+} 経路が NF-AT 経路を活性化させる上流経路であることが強く示唆された。

D. 結論

本研究によりツメガエルにおいて背腹軸形成時に IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達系は Wnt/ Ca^{2+} 経路を上流とし Cn/NF-AT を介して、背側化シグナルである Wnt/ β -catenin の活性を阻害することで腹側化シグナルとして機能していることが明らかになった。

E. 健康危険情報

受精後 4 細胞期という発生初期に生体の重要な軸形成の 1 つである背腹軸形成

がなされるが、この時期に何らかの外的障害が起きると奇形が起こることを意味しており、胎児環境保全とその維持は重要である。

F. 論文発表

①Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. & Takenawa, T.: Requirement of phospholipase C δ 4 for the Zona pellucida-induced acrosome reaction. **Science**, 292 920-923 (2001)

②Ohshima, T., Ogawa, M., Veeranna, Hirasawa, M., Longenecker, G., Ishiguro, K., Pant, H. C., Brady, R. O., Kulkarni, A. B. & Mikoshiba, K: Synergistic contributions of cyclin-deendant kinse 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positoning of cortical neurons in the developing mouse brain. **PNAS**, 98 2764-2769 (2001)

③Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi, K., Aruga, J. & Mikoshiba, K: Physical and functional interactions between zic and gli proteins. **J. Biol. Chem.**, 276 6889-6892 (2001)

④Kitaguchi, T., Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J. & Mikoshiba, K: Xenopus polycombllike 2 (XPcl2) controls anterior to posterior patterning of the neural tissue. **Dev Genes Evol**, 211 309-314 (2001)

⑤Iwasaki, H., Chiba, K., Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Suzuki, F., Ikeda, M., Furuichi, T. & Mikoshiba, K.: Molecular Characterization of the Starfish Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and Its Role during Oocyte Maturation and Fertilization. **J. Biol. Chem.**, 277 2763-2772 (2002)

⑥Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Hishida, A., Furuichi, T. & Mikoshiba, K.: Anovel recombinant hyper-affinity Insitol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) absorbent traps IP₃, resulting in specific inhibition of IP₃-mediated calcium signaling. **J. Biol. Chem.**, 277 8106-8113 (2002)

⑦Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J. & Mikoshiba, K.: Zic2 controls cerebellar development in cooperation with zic1. **J. Neurosci.** 22 218-225 (2002)

⑧Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. & Mikoshiba, K.: The Wnt/Calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. **Nature**, (in press) (2002)

⑨Ohshima, T., Ogawa, M., Takeuchi, K., Takahashi, S., Kulkarni, A. & Mikoshiba, K.: Cdk5/p35 contributes synergistically with Reelin/Dab1 to the positioning of facial branchiomotor and inferior olive neurons in the developing mouse hindbrain. **PNAS**, (in press) (2002)

I. 研究目的

初期発生における腎臓や膵臓、心臓、神経系などの器官や組織がどのようにして出来るかを遺伝子の発現のカスケードとしてとらえる。特に各器官形成に特異的なキーとなる遺伝子の探索を行うことによって、器官形成と発現のダイナミクスを明らかにしていく。

II. 研究成果

未分化細胞からのネフロンの形成

まず腎形成においては、ネフロンという腎単位の形成がアニマルキャップから可能となった。つまり今までは未分化細胞（アニマルキャップ）にアクチビンとレチノイン酸を処理することによる前腎管のみの形成であったが、更に腎導管が出来ることを腎管特異の抗体と腎導管特異の抗体を用いて二重抗体染色で証明した。このことは、既に発表されているアクチビンとレチノイン酸によって糸球体も出来ることが報告されているので、ここに腎臓の最小単位にあるネフロン（=腎細管+腎導管+糸球体）が未分化細胞から出来たことになる。これはその後の中腎や後腎形成にもつながるので、その成果は今後の分子生物学的アプローチを可能にするもので意義深い系の確立といえる。

腎形成に関与する新規の遺伝子探索

また腎形成に関与する新規の遺伝子として、XC3H-3 β と XTRAP- γ の2つをクローニングし解析を行った。XTRAP- γ は 153 のアミノ酸から構成され4つの膜貫通領域を持ち未受精卵の中に存在するが、ツメガエルの尾芽部に

は前腎細管領域に局在が見られた。また、XC3H-3 β は zinc フィンガーモチーフを持つ364のアミノ酸から構成される遺伝子である。これら2つの新規の遺伝子の前腎間での発現と機能が解析された。

膵臓形成と遺伝子発現

アクチビンとレチノイン酸を時間差処理することによって膵臓をほぼ完全に作る系を開発したが、これをつかっただけの解析がなされた。その結果、膵臓に特異的なホルモンであるインスリンやグルカゴンの遺伝子発現や蛋白質の存在のみならず、膵臓にあると思われるカルボキシラーゼ、DNaseI、リパーゼなど、ほとんどの膵臓特異的に合成される遺伝子の発現も確認された。そのことによって、私たちがアニマルキャップからつくった膵臓が正常胚の膵臓と形態学的にも遺伝子発現などの分子レベルにおいてもほぼ同じものであることが確認された。

未分化細胞からの心臓形成

ツメガエルのアニマルキャップからの心臓形成についても試みられた。その結果、ほぼ100%の確率でもって拍動する心臓が形成された。これらの心臓は拍動するだけでなく、電顕像では介在板（ID）をもっており、かつ、心臓特異的マーカー遺伝子であるトロポニンIや XNK-2.5 なども発現していることが示された。また、これらの *in vitro* 系でつくられた心臓を生体内（*in vivo*）への移植も試みられた。

新規の遺伝子の更なる解析について

1. 私たちの研究室でクローニングされた

かにした。ただ、Xnr-1 やアクチピンとは別の経路で活性化されると考えられる。

2. Wnt 系の細胞内情報伝達系はいままで多くの人によって研究されているが、広大・菊池教授らとの共同研究によって、Idax, Axam, Casein Kinase 1 ϵ 、Protein Phosphatase 2A (PR61 subunit)、duplin など新しくクローニングしてその機能解析を行った。このことによって、胚発生において大きな役割を担っていると思われる Wnt 系の働きについて一部明らかにした。そして、TGF- β や Notch シグナル系とのクロストークの関連性の実験もなされた。

III. 発表論文

1. Ichigi, J., Asashima, M.
Dome Formation and Tubule Morphogenesis by *Xenopus* Kidney A6 Cell Cultures Exposed to Microgravity Simulated with A 3D -Clinostat and to Hypergravity.
In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal. 37. 31-44, 2001
2. Asashima, M., Okada, S. T.
Spemann's influence on Japanese
Developmental Biology.
J. Dev. Biol. 45, 57-65, 2001
3. Ariizumi, T., Asashima, M.
In vitro induction systems for analyses of amphibian organogenesis and body patternig.
J. Dev. Biol. 45, 273-279, 2001
4. Furue, M., Zhang, Y., Okamoto, T., Hata, R-I, Asashima, M.
Activin A Induces Expression of Rat Sel-1/mRNA, a Negative Regulator of Notch Signaling, in Rat Salivary Gland-Derived Epithelial Cell.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 282, 745-749, 2001
5. Yamamoto, H., Hinoi, T., Michiue, T., Fukui, A., Usui, H. Janssens, V., Hoof, V. C., Goris, J., Asashima, M., Kikuchi, A.
Inhibition of the Signaling Pathway by the PR61 Subunit of Protein Phosphatase 2A.
The Journal of Biological Chemistry. 276. 29, 26875-26882, 2001.
6. Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, G. N., Gilbert, J. D., Jenkins, A. N., Scully, S., Lacey, L. D., Katsuki, M., Asashima, M., Yokota, T.
Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development.
Development 128, 3105-3115, 2001
7. Michiue, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Fukui, A., Asashima, M., Kikuchi, A.
Synergistic Activation of the Wnt Signaling Pathway by Dvl and Casein Kinase I ϵ .
The Journal of Biological Chemistry 276 (35) 33147-33155, 2001
8. Tiedemann, H., Asashima, M., Grunz, H., Knochel, W.
Pluripotent cells (stem cells) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis.
Develop. Growth Differ. 43, 469-502, 2001
9. Hino, S-I., Kishida, S., Michiue, T., Fukui, A., Sakamoto, I., Takada, S., Asashima, M., Kikuchi, A.
Inhibition of the Wnt Signaling Pathway by Idax, a Novel Dvl-Binding Protein.
Mol. and Cell. Biol. 21, 330-342, 2001
10. Igarashi, T., Kuroda, H., Takahashi, S., Asashima, M.
Cloning and characterization of the *Xenopus laevis* p8 gene.
Develop. Growth Differ. 43, 693-698, 2001
11. Hayata, T., Tanegashima, K., Takahashi, S., Sogame, A., Asashima, M.
Overexpression of the secreted factor Mig30 expressed in the Spemann organizer impairs morphogenetic movements during *Xenopus* gastrulation.
Mech. Develop. 112, 37-51. 2002
12. Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C.,

- Asashima, M.
Multiple nodal-Related Genes Act
Coordinately in *Xenopus* Embryogenesis
Devel. Biol. 241. 94-105. 2002
13. Onuma Y, Takahashi S, Asashima M, Kurata
S, Gehring, W. J.
Conservation of Pax 6 function and upstream
activation by Notch signaling in eye
development of frogs and flies.
Proc Natl Acad Sci. 99. 2020-2025. 2002
14. Wada, M., Miyazawa, H., Wang, R. S.,
Mizuno, T., Sato, A., Asashima, M.,
Hanaoka, F.
The Second Largest Subunit of Mouse DNA
Polymerase epsilon, DPE2, Interacts
with SAP18 and Recruits the Sin3 Co-
Repressor Protein to DNA.
J Biochem. 131. 307-311. 2002
15. Sedohara, A., Fukui, A., Michiue, T.,
Asashima, M.
Role of BMP-4 in the Inducing Ability of the
Head Organizer in *Xenopus laevis*.
Zoological Science 19 (1). 67-80. 2002

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

主課題：ライソゾーム病の病態解明及び治療法の開発に関する研究
（主任研究者：櫻川宣男，国立精神・神経センター神経研究所）

分担研究課題：ライソゾーム病の臨床疫学的，分子遺伝学的研究
分担研究者 青木継稔

研究要旨

ライソゾーム病に対するマスキリング・システムの構築について検討を行った。ライソゾーム病29疾患のうち，頻度および治療の可能性を考慮して，7疾患を選定した。それらの中で，ムコ多糖症に対しては尿中のムコ多糖体をジメチルメチレンブルー呈色反応により測定することが可能である。現在，本法を用いた1か月児および6か月児に対するムコ多糖症スクリーニングが検討されている。また，異染性白質変性症は根治的治療法は存在しないものの，症状出現前に骨髄移植を行うことにより病期の進展を抑えられる可能性がある。マスキリングによる早期発見・早期治療開始が期待される疾患である。本症に対しては，新生児濾紙血を用いてのarylsulfatase Aを測定することが可能である。今後は，これら2疾患を中心に，ライソゾーム病のマスキリング・システムを検討していく。

研究協力者

清水教一，山口之利
（東邦大学医学部第2小児科）
逸見仁道，嶋武博之
（東邦大学医学部分子生物学）

A. 研究目的

従来治療が極めて困難であったライソゾーム病に対して，骨髄移植や酵素補充療法をはじめ，有効な治療法が開発されつつある。当然早期発見・早期治療開始により，生命予後あるいはQOLを改善させる事ができる可能性が高い。

今回筆者らは，ライソゾーム病の早期診断を目的として，そのマスキリング・システム構築に関する検討を行った。

B. 研究方法

ライソゾーム病29疾患に対して，その頻度，治療法の有無と開発の可能性，および一次スクリーニングに有効な検査法の有無などより，スクリーニングの対象となりうる候補疾患を選定した。それらの疾患に対して，マスキリング・システム確立に向けての詳細な検討を行う。

C. 研究結果

以下の7疾患をスクリーニング候補疾患と

して選定した。

1. ムコ多糖症 (MPS)
2. Gaucher病
3. GM2-gangliosidosis
4. 異染性白質変性症 (MLD)
5. Fabry病
6. GM1-gangliosidosis
7. Nieman-Pick病

今回は，上記疾患のうちMPSとMLDに関して詳細な検討を行った。

D. 考察

MPSに対する治療として，骨髄移植の有効性が報告され，さらに酵素補充療法の開発も進んでいる。中枢神経症状発現を考慮し，6か月児あるいはそれ以前よりの治療開始が考えられており，マスキリングによる早期診断の重要性が示唆される。本症のスクリーニングは，ジメチルメチレンブルー呈色反応 (DMB)による尿中ムコ多糖体の測定により行うことが可能である。現在，1か月児および6か月児に対するスクリーニングが検討されている。また，費用便益が検討され，スクリーニングの意義はあるとされている。

MLDは，根治的治療法は存在しないものの，骨髄移植を症状の発現前に施行すれば病期の進展を抑えられる可能性がある。マスキリングによる早期診断・早期治療開

始により予後の改善が期待される疾患である。本症は、尿中sulfatide測定、あるいは血液におけるASA活性測定によりスクリーニング可能である。新生児濾紙血におけるASA活性測定が可能であり、それを利用したシステム構築を検討していく。

E. 結論

ライソゾーム病のマススクリーニング・システム構築に関する検討を行った。MPSは乳児の尿に対するDMB法により、MPSは新生児濾紙血に対するASA活性測定により、スクリーニングを行うことが可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoki T and Shimizu N: Wilson's disease in Japan, nationwide survey of clinical features and molecular analysis in Japanese patients. *Journal of The Korean Society of Inherited Metabolic Disease* 1: 33-37, 2001
- 2) 山口之利, 加藤尚之, 藤井秀樹, 清水教一, 青木継稔: Wilson病の食事療法における微量元素の検討, 飲料水を中心に(第2報). *Biomed Res Trace Elements* 12: 291-292, 2001
- 3) 青木継稔, 山口之利, 大村育子, 渡辺温子, 清水教一: Menkes病と脳形成異常. *脳神経* 53: 427-435, 2001
- 4) 青木継稔, 清水教一, 山口之利: Wilson病の長期治療と問題点. *小児内科* 33, 921-928, 2001
- 5) 清水教一: ウィルソン病. *小児内科* 33: 1278-1282, 2001
- 6) 清水教一: Wilson病のマス・スクリーニング. *小児科診療* 64: 1580-1581, 2001

7) 清水教一: Wilson病. *小児内科* 33 (増刊): 172-173, 2001

8) 清水教一: Wilson病. *日臨* 59 (増刊: 本邦臨床統計集 2): 383-389, 2001

9) 青木継稔, 黒田泰弘: 新生児マス・スクリーニングの現状と今後の動向. *日児誌* 105: 1178-1179, 2001

10) 青木継稔: 新生児・乳幼児期における新しいマス・スクリーニング対象疾患について. *日児誌* 105: 1202-1206, 2001

2. 学会発表

- 1) Sakamoto M, Yamaguchi Y, Aoki T, Gitlin JD: Intracellular localization of Menkes and Wilson disease protein. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig / Germany, April 2001
- 2) Takeshita Y, Omura I, Shimizu N, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T: Molecular analysis for Wilson disease patients with severe phenotype. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig / Germany, April 2001
- 3) Watanabe A, Shimizu N, Nakazono H, Yamaguchi Y, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T: An infantile case of Wilson disease. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig / Germany, April 2001
- 4) Shimizu N, Yamaguchi Y, Aoki T: Mass-screening for Wilson disease. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease,