

Leipzig / Germany, April 2001

5) Yamaguchi Y, Shimizu N, Yamazaki T, Kato N, Tamai H, Arima M, Aoki T: The domestic circle of Wilson disease. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig / Germany, April 2001

6) Aoki T: Wilson's disease in Japan. The 2nd Annual Meeting of Korean Society of Inherited Metabolic Disease (guest speaker of symposium), Seoul / Korea, May 2001

7) Shimizu N: Gene analysis of Wilson disease and genotype-phenotype correlation. The 2nd Annual Meeting of Korean Society of Inherited Metabolic Disease (guest speaker of symposium), Seoul / Korea, May 2001

8) 下田牧子, 山口之利, 竹下由紀子, 清水教一, 宇野拓, 江川裕人, 木内哲也, 上本伸二, 田中紘一, 岡田郷, 井上成彰, 金子堅一郎, 青木継稔: 治療抵抗性に肝不全が進行した若年発症Wilson病の1例. 第5回ウイルソン病研究会, 東京, 2001.5

9) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 異なった臨床病型を呈したWilson病同胞例. 第5回ウイルソン病研究会, 東京, 2001.5

10) 山口之利: "8th International Conference on Wilson disease and Menkes disease" 報告. 第5回ウイルソン病研究会, 東京, 2001.5y

11) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 異なった病型を呈したWilson病同胞例の臨床症状および遺伝子変

異に関する検討. 第104回日本小児科学会学術集会, 仙台, 2001.5

12) 清水教一, 山口之利, 青木継稔: Wilson病マス・スクリーニングの意義と施行時期に関する検討. 第104回日本小児科学会学術集会, 仙台, 2001.5

13) 下田牧子, 宇野拓, 山口之利, 清水教一, 江川裕人, 上本伸二, 田中紘一, 岡田郷, 金子堅一郎, 青木継稔: 若年発症し治療抵抗性であった肝型Wilson病の1例. 第104回日本小児科学会学術集会, 仙台, 2001.5

14) 山口之利, 藤井秀樹, 清水教一, 青木継稔, 加藤尚之, 山崎大治, 玉井浩, 有馬正高: 「ウイルソン病友の会」活動の概要および患者アンケートによる食事療法の検討. 第104回日本小児科学会学術集会, 仙台, 2001.5

15) 清水教一, 山口之利, 青木継稔: 神経症状を呈したWilson病症例の予後に関する検討. 第43回日本小児神経学会総会, 岡山, 2001.6

16) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 神経症状を呈したWilson病症例の遺伝子変異に関する検討. 第43回日本小児神経学会総会, 岡山, 2001.6

17) 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, 第12回日本微量元素学会, 東京, 3001.7

18) Takeshita Y, Shimizu N, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T: Molecular analysis for sibling cases of Wilson disease with different phenotype. The 23rd International Congress of Pediatrics, Beijing / China, Sept. 2001

19) Watanabe A, Uno K, Shimizu N, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T: The study of copper induced ATPase acitivity for inborn error of copper metabolism. The 23rd International Congress of Pediatrics, Beijing / China, Sept. 2001

20) Shimizu N, Takeshita Y, Nakazono H, Watanabe A, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T: Molecular diagnosis for Wilson disease in Japan. The 23rd International Congress of Pediatrics, Beijing / China, Sept. 2001

21) 清水教一, 山口之利, 青木継稔: Wilson病マススクリーニング・システム構築に関する検討. 第29回日本マス・スクリーニング学会 / 第24回技術部会(シンポジウム), 横浜, 2001.10

22) 大村育子, 舘野昭彦, 清水教一, 竹下由紀子, 青木継稔, 逸見仁道, 嶋武博之: 全血および濾紙血を用いたWilson病の遺伝子診断に関する研究. 第44回日本先天代謝異常学会, 久留米, 2001.11

23) 清水教一, 竹下由紀子, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: DHPLC(変性高速液体クロマトグラフィー)を用いたWilson病の変異スクリーニングに関する検討. 第44回日本先天代謝異常学会, 久留米, 2001.11

24) 同胞間で異なった臨床病型を呈したWilson病家族例. 第44回日本先天代謝異常学会, 久留米, 2001.11

25) 山口之利, 清水教一, 藤井秀樹, 山崎大治, 玉井浩, 青木継稔: Wilson病における食事療法の検討, 第2報. 第44回日本先天代謝異常学会(シンポジウム), 久留米, 2001.11

26) 山口之利, 清水教一, 玉井浩, 青木継

稔: 「ウイルソン病友の会」活動の概要. 第48回日本小児保健学会, 東京, 2001.11

27) 竹下由紀子, 清水教一, 山口之利, 青木継稔: Wilson病マススクリーニングにおける一次スクリーニングから診断確定までの方略に関する検討. 第48回日本小児保健学会, 東京, 2001.11

28) 清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 青木継稔: Wilson病マススクリーニングの施行意義に関する検討. 第48回日本小児保健学会, 東京, 2001.11

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌

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

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

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

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

清水教一: ウイルソン病. 小児内科 33: 1278-1282, 2001

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

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

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

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

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. 書籍

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，先天異常症候群辞典，上．日本臨床社，大阪，2001，pp802-804

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 34，先天異常症候群辞典，下．日本臨床社，大阪，2001，pp170-172

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 34，先天異常症候群辞典，下．日本臨床社，大阪，2001，pp815-816

厚生科学研究費補助金 分担研究報告書

成人型 Krabbe 病の病態および発症機序に関する研究

分担研究者 古谷博和 九州大学医学部神経内科
研究協力者 山田 猛 飯塚病院神経内科

研究要旨 4例の成人型 Krabbe 病 (AO-GLD) について臨床症状の検討を行うとともに、臨床型の違いが生じる原因を解明するため、乳幼児型 Krabbe 病 (JI-GLD)、AO-GLD に認められる遺伝子変異を導入して GALC 酵素活性を比較した。AO-GLD では全例臨床症状は JI-GLD より軽微であり、ごく軽微な末梢神経障害が認められた。これは中枢神経系と同様の機序で末梢神経系にも脱髄が生じているためと考えられた。また、真核細胞発現系を用いた研究では、JI-GLD と AO-GLD をきたす変異で GALC 活性に全く差は認められなかった。これは酵素活性測定法の感度をあげても同様であり、これらの臨床症状の差を単なるごく軽度の酵素活性の有無などでは説明できない事を示している。

A. 研究目的

Krabbe 病 (globoid cell leukodystrophy; GLD) はリソソーム酵素の galactosylceramidase (GALC) の欠損により中枢神経系でのミエリン形成の障害が起こるが、その殆どは乳幼児型 (juvenile or infantile-onset type, JI-GLD) で、生後3~6ヶ月で発症して精神運動発達遅延、易刺激性 (痙攣発作)、視力障害、錐体路徴候などを呈し、数年以内に死の転帰をとる。しかし、ごく稀に思春期頃に発症し比較的長期の経過をとる症例があり (adult-onset type, AO-GLD)、このような例では痙攣対麻痺が主訴で、軽微な末梢神経障害を呈すなど、臨床型は JI-GLD と大きく異なっている^{1,2)}。

今回5例の AO-GLD について症例の検討を行うとともに、このような臨床型の違いが生じる原因を解明するため、JI-GLD、AO-GLD に認められる遺伝子変異を導入して GALC 酵素活性を比較した。

B. 研究方法

4例の成人発症 Krabbe 病についてその臨床症状、神経放射線、神経生理学的所見を比較した。また、真核細胞発現ベクター(pCAGGS^{neo})に成人型で認められた GALC の変異を導入し、乳幼児型の変異と活性を比較した。さらに AO-GLD の変異の場合、JI-GLD と比べると、ごくわずかの活性が残っている可能性を考え、通常より長時間のインキュベーションで活性の差を比較するようにした。

C. 研究結果

症例・検査結果

4症例の検査時の年齢は30歳から57歳で(平均39歳)、発症年齢は全例思春期早期(平均11.5歳)

で、歩行障害で発症。20年から42年の経過をとり1名のみ知能低下を認めている。

いずれの症例にも末梢神経障害の自覚症状は認めなかったが、神経学的所見で2名に振動覚の低下があり、全例に錐体路徴候と病的反射、頭部 MRI T2 強調画像で白質および錐体路での異常信号高値を認めている。

全例に神経伝導速度検査と末梢神経生検が施行されており、運動・感覚神経伝導速度の低下を認めた。神経生検では3名で hypomyelination および封入体の存在、1名で節性脱髄を認めた。

GALC 活性値は全例異常低値で、GALC 遺伝子の解析では、I66M/V256X、L618S/535-573del、G270D/G270D、I66M/I66M の遺伝子変異が確認された⁴⁾。

次にこれらの AO-GLD 型の遺伝子変異のうち、/535-573del、I66M 変異と JI-GLD 型の I583S 変異を導入した GALC cDNA を真核細胞発現ベクター pCAGGSneo にサブクローニングし⁶⁾、JI-と AO-の GALC 活性の差異を比較したが、活性に全く有意差は認めなかった⁷⁾。さらにごく軽微な遺残活性を検出するために、GALC 活性測定時間を24時間にまで延長して(通常は1~3時間)活性を比較してみたが、これでも全く JI-と AO-との間に差異は認められなかった。

D. 考察

AO-GLD では中枢神経系に認められる脱髄と同様の機序で軽微な末梢神経障害を合併する頻度が極めて高いことが確認された。この場合、殆ど臨床症状は伴っておらず、電気生理学的検査や神経病理学的検査でのみに確認される程度であった。

J1-GLD で末梢神経障害があまり報告されていないのは、発症が早期で電気生理学的検査の対象になりやすく、進行が急速で、病初期から症状が重篤であるためではないかと考えられた。

J1-GLD および AO-GLD を起こす GALC 遺伝子上の変異でオーバーラップするものはなく、これまでに報告された遺伝子変異の部位を GALC 遺伝子上にプロットしてみると、J1-GLD では変異が遺伝子の中央付近に集まるものが多いのに対して、AO-GLD では変異が 5'もしくは 3'末端に集まるものが多かった。

今回の *in vitro* での実験から、GALC 遺伝子上の変異の位置の違いが GALC の酵素活性に何らかの変化を起こし、ひいては J1-および AO-GLD に認められる臨床症状の差が生じると考えられるが、それは単なる GALC の酵素遺残活性などでは説明できず、プロセスされたあとのサブユニットのアセンブルや、ライソゾームへの移行などの障害などにより異常が起こるものと考えられた⁸

E. 結論

成人型 Krabbe 病では白質の脱髄が乳幼児型に比べて軽微である事、中枢神経系と同様の機序で末梢神経系にも脱髄が生じている可能性のある事が確認された。このような成人型 Krabbe 病での特徴は単なる GALC 活性の遺残活性などでは説明できない事がはっきりした。

F. 参考文献

1. Chen YQ et al. Hum Molec Genet 2: 1841-1845, 1996
2. Furuya H et al. Human Genetics 100(3-4):450-456, 1997
3. Gasperi R et al. Am J Hum Genet 59: 1233-1242, 1996
4. Kukita Y et al. Genetic Testing 1(13): 217-223, 1998
5. Niwa H et al. Gene 108: 193-200, 1991
6. Satoh JI et al. Neurology 49: 1392-1399, 1997
7. Suzuki K The metabolic basis of inherited disease, 6th edn. McGraw Hill, New York, pp 1699-1720, 1989
8. Nagano S et al. Clinica Chimica Acta. 276(1): 53-61, 1998

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 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-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab 1 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 (XPcl2) 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/Dab 1 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 Bio.* 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 impars morphogenic movements during *Xenopus* gastrulation. *Devel Biol* 241: 94, 2002
- 30) Onuma Y et al. Multipul 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 SAPI8 and recruits teh 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 Kirean 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点。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

書籍

- 1) 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
- 2) 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

3) 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

4) 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 高脂症。313, 2001

5) 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

6) 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