

は注射2週間後に強く、5週間後、9週間後には漸減したが、正常コントロール程度の酵素活性の発現を維持していた。

D. 考察

AAV2-AM はヒトの細胞では効率良く AM 遺伝子を導入したが、少なくとも我々の用いている AM-KOM のストレインでは非常に効率が低く、将来ヒトの治療に応用するための前段階の実験系として成り立ち難かった。しかし今回 AAV5-AM は AM-KOM に対する遺伝子導入発現効率が十分高いことが判明し、AM-KOM での治療実験が可能となった。現在までに9週まではあるが経過を追って解析した結果、注射した筋肉内では十分な効果を維持していると考えられた。

E. 結論

我々の用いている AM-KOM のストレインでは Fb でも筋組織でも AAV5-AM の遺伝子導入効率ががが高く遺伝子治療研究に有用と思われた。また少なくとも現在までに解析し

た9週まではその効果を維持していた。

G. 研究発表

1. 論文発表

大矢寧、森田浩之、小川雅文、埜中征哉、辻野精一、川井充
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー類似の筋罹患分布を示した成人型酸性マルターゼ欠損症の1例
臨床神経学 第41巻、390-396, 2001

2. 学会発表

辻野精一、宮本健、水上浩明、小澤敬也、Nina Raben: AAV ベクターを用いた acid maltase 遺伝子導入の検討。第42回日本神経学会総会 平成13年5月11日 東京

金澤直美、井原健二、斉藤豊和、辻野精一: Acid maltase 遺伝子新規ナンセンス変異とアミノグリコシド系抗生物質の読み飛ばし効果の検討。第44回日本先天代謝異常学会 平成13年11月8日 久留米

ライソゾーム病の新しい治療法に関する研究
分担研究者 鈴木 義之 国際医療福祉大学教授

研究要旨

重篤な脳障害を伴う遺伝病の新しい治療法開発の試みを行った。β-ガラクトシドーシスとゴーシェ病患者由来の培養細胞にケミカルシャペロンとなる新しい物質 GalX、GlcX (仮に命名) の酵素活性還元効果を調べた。その反応には病型特異性があり、特に幼児型G_{M1}-ガングリオシドーシス症例で著しい効果を示した。また将来の個体実験のために、β-ガラクトシダーゼの病型特異的変異を持つモデルマウスを作成した。

A. 研究目的

遺伝子変異による脳障害の新しい分子治療法を開発することを目的とする。2種のライソゾーム病、β-ガラクトシダーゼ欠損症とβ-グルコシダーゼ欠損症をモデル疾患として治療実験を行う。我々が提唱している新しい治療法は、低分子化合物を変異酵素タンパク質の細胞内安定剤として用いるもので、有機合成により作成した化合物の効果を患者由来培養細胞について検討し、モデル動物、最終的にはヒト患者への投与をめざす。

B. 研究方法

β-ガラクトシダーゼ欠損症とβ-グルコシダーゼ欠損症患者由来の線維芽細胞、リンパ芽球を培養し、その培養液に新しく開発した化合物GalXまたはGlcXを添加し、酵素活性の変化を調べた。またすでに確立したβ-ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスに病型特異的変異遺伝子を導入し、病型特異的なモデルマウスの作成を試みた。

C. 研究結果

β-ガラクトシダーゼ変異タンパク質を発見する細胞の培養液に低濃度のGalXを添加することにより、特定の変異を持つ細胞内酵素活性が3-6倍に上昇した。中でも若年型G_{M1}-ガングリオシドーシス症例の変異は特に著しい活性上昇を示した。同様にグルコース誘導体GlcXはゴーシェ病患者由来線維芽細胞で4-6倍の活性化を示した。

ノックアウトマウスにヒトトランスジーンを導入してβ-ガラクトシダーゼ欠損症の病型特異的なモデル動物をつくった。これまでのところ、野生型(正常)、若年型G_{M1}-ガングリオシドーシス、成人型G_{M1}-ガングリオシドーシス、モルキオB病のモデルマウスが作成された。

D. 考察

これらの成績から、今回検討した2つの化合物は、変異遺伝子を持つヒト細胞内で変異酵素分子を安定化し、ライソゾームで活性を発現させることができることがわかった。これまでにβ-ガラクトシダーゼの数種の変異がこ

の反応を示すことが、変異遺伝子を導入したノックアウトマウス細胞で確かめられているが、ヒト細胞での反応がマウス細胞での反応と同じかどうかはわかっていない。現在多くの細胞を集め、変異同定とは別に培養液中に添加した化合物に対する反応性を検討中である。この成績をもとに、上記のノックアウトトランスジェニックマウスをモデル動物として、個体実験を開始する予定である。

E. 結論

ファブリー病に続いてβ-ガラクトシドーシス、ゴーシェ病でも新しい分子治療法が適用できることが確認された。この成果はこれらの病気の脳障害に対する新しい治療法につながることを示すものである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Itoh M, Matsuda J, Suzuki O, Ogura A, Oshima A, Tai T, Suzuki Y, Takashima S: Development of lysosomal storage in mice with targeted disruption of the β-galactosidase gene: a model of human G_{M1}-gangliosidosis. Brain Dev 2001 23: 379-384.

2) Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human β-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. Brain Dev 2001 23: 284-287.

3) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E: β-Galactosidase deficiency (β-galactosidosis): G_{M1}-Gangliosidosis and Morquio B disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 2001 3775-3809.

2. 学会発表

1) 野口章、長瀬裕美、山本美江、鈴木治、持田慶司、中平美穂、高野薫、野口洋子、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシス幼児型、成人型モデルマウスを用いた新たな治療法開発の試み。実験動物学会(横浜)2001.5.

2) 小川由美、難波栄二、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシスに対する新しい治療法の開発: ヒト遺伝子異常導入マウス細胞株の樹立と低分子物質の効果。日本小児神経学会(岡山)2001.6.7-9.

3) Nagase H, Noguchi A, Yamamoto Y, Suzuki, Mochida K, Nakahira M, Takano K, Noguchi Y, Oshima A, Ogura A, Matsuda J, Suzuki Y: Correction of mouse G_{M1} -gangliosidosis by the human β -galactosidase transgene and generation of knockout/transgenic mice expressing mutant human β -galactosidases. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, 2001.8.19-24.

4) Suzuki Y: Neurogenetic diseases: pathogenesis and treatment (Symposium). 23rd International Congress of Pediatrics, Beijing, China, 2001.9.9-14.

5) Suzuki Y: New approaches for the treatment of lysosomal storage diseases. Cartagena, Colombia, 2001.10.21-24) Suzuki Y: A new therapeutic approach to lysosomal storage diseases. Annual Asia LSD Symposium, Seoul, 2001.11.14-15.

7) 小川由美、難波栄二、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、鈴木義之: β -ガラクトシドーシスの新しい治療法の開発: ヒト異常遺伝子を発現する疾患モデル細胞に対するガラクトース類似低分子化合物の変異酵素活性化作用。

8) 大島章弘、長瀬裕美、野口章、山本美枝、鈴木治、鈴木義之、松田潤一郎: G_{M1} -ガングリオシドーシス成人型および幼児型変異遺伝子導入マウスの解析。第44回先天代謝異常学会総会、久留米、2001.11.8-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. GalX

a) 構造特許: β -ガラクトシダーゼ阻害活性を有する擬似糖(出願中)

b) 用途特許: 糖脂質代謝異常症治療剤、特に β -ガラクトシダーゼ遺伝子の変異に起因する糖脂質代謝異常症の治療剤(出願中)

2. GlcX

a) 構造特許: 擬似糖脂質であってグリコシダーゼ阻害活性を有する化合物(取得)

b) 用途特許: 糖脂質代謝異常症治療剤、特に β -グルコセレブロシダーゼ遺伝子の変異に起因する糖脂質代謝異常症の治療剤(出願中)

ライソゾーム病の病因、病態の解析、治療

分担研究者 難波榮二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

G_{M1}-ガングリオシドーシスの中枢神経障害に対する新しい治療法（ケミカルシャペロン法）の研究を行った。最初に、ノックアウトマウスの培養皮膚繊維芽細胞にヒト正常および14種類の異常遺伝子を導入してモデル細胞を構築した。これら細胞に、低分子物質である1-デオキシガラクトノジリマイシン、N-(n-ブチル)-デオキシガラクトノジリマイシン、GalX（新しい化合物）を投与したところ、特にR201C、I51T、R201H、R457QなどのG_{M1}-ガングリオシドーシスを引き起こす遺伝子異常をもつ細胞で、残存酵素活性の有意な上昇が確認できた。特に、GalXは低濃度で有効で、G_{M1}-ガングリオシドーシスの有望な治療薬になる可能性が示された。

【はじめに】G_{M1}-ガングリオシドーシスはリソゾーム酵素であるβ-ガラクトシダーゼが欠損する神経遺伝病である。現在その脳障害に対する治療法はない。最近、欠損酵素の阻害剤である低分子化合物が低濃度では逆に酵素を活性化するという原理を用いた新しい治療法（ケミカルシャペロン法）を提案した（Fan et al, Nature Med 1999）。次にこの原理をG_{M1}-ガングリオシドーシスにおける中枢神経障害の治療法を開発する試みを開始した。そこでβ-ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス細胞にヒト変異遺伝子を導入することにより疾患モデル細胞を作成し、治療薬の候補になる低分子物質のスクリーニングと効果検討を行った。

【方法】β-ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスの培養皮膚繊維芽細胞にSV40遺伝子を導入して不死化し、pSV2neoと発現ベクターに組み込まれた酵素遺伝子を同時に導入し、モデル細胞を樹立した。用いた遺伝子は、ヒト正常（GP8）および変異β-ガラクトシダーゼ遺伝子Y316C、G123R（幼児型G_{M1}-ガングリオシドーシス）、R201C（若年型G_{M1}-ガングリオシドーシス）、I51T、T82M、R201H、P263S、R457Q（成人型G_{M1}-ガングリオシドーシス）、W273L、Y83H、R482H、R482C、N318H、W509C（モルキオB病）である。0.5mM 1-デオキシガラクトノジリマイシン（DGJ）、0.5mM N-(n-ブチル)-デオキシガラクトノジリマイシン（NB-DGJ）、0.2μM GalX（新しい化合物、仮にこの名称を用いた）を含

む細胞培養液でモデル細胞を4日間培養した後、細胞内残存酵素活性の変化を検討した。

【結果】樹立した12の変異細胞株のうち、変異酵素蛋白質が合成されている4つのG_{M1}-ガングリオシドーシス変異導入細胞株（R201C、I51T、R201H、R457Q）と2つのモルキオB病変異導入細胞株（W273L、Y83H）を用いた。酵素活性の変化はDGJ、NB-DGJ、GalXいずれも同じ傾向を示した。DGJ、NB-DGJ、GalXそれぞれ0.5mM、0.5mM、0.2μMの添加濃度の条件で、G_{M1}-ガングリオシドーシス変異遺伝子R201Cは2.4から5.4倍、I51Tは2.2から6.1倍、R201Hは2.1から4.5倍、R457Qは2.4から6.2倍の発現酵素活性の上昇を示した。モルキオB病変異遺伝子W27は1.5から1.8倍、Y83Hは1.1から2.3倍であった。

【考察】リソゾーム酵素異常症の治療法として骨髄移植、酵素補充療法が行われているが、中枢神経障害に対する効果は明らかでない。最近、蓄積基質の合成酵素を阻害し中枢神経障害を治療する方法が試みられているが、すべてのスフィンゴ脂質の合成を阻害することには疑問があり、また投与量が多く、臨床知見ではかなりの副作用の報告がある。これに対し、われわれが用いた新しい化合物の細胞に対する影響は今後の解析に待たねばならないが、投与量、分子構造などからみて、より妥当なアプローチである。今回検討した低分子化合物はモルキオB病よりG_{M1}-ガングリオシドーシスの変異蛋白質により

有効であった。また血液脳関門を通過することは、いくつかの化合物について確認されている。これらの中で、特に GalX は DGJ や NB-DGJ の濃度の 1/2,500 で同じ程度の効果を示し、新しい治療薬として有望であると考えた。今後さらに細胞レベルでの詳細な検討に加え、マウス個体での研究を行い、臨床応用をめざす予定である。

川由美、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、
鈴木義之

第 7 回リビドーシス研究会 平成 13 年 12 月 1
日 東京

G. 研究発表

1. 論文発表

Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E. Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev* 23: 284-287, 2001.

2. 学会発表

β -ガラクトシアリドーシスの新しい治療法の開発：ヒト異常遺伝子導入マウス細胞株の樹立と低分子化合物の効果 小川由美、難波栄二、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、鈴木義之 第 43 回日本小児神経学会 平成 13 年 6 月 7 日-9 日 岡山

β -ガラクトシアリドーシスの新しい治療法の開発：ガラクトース類似低分子化合物による変異酵素活性化 ミニシンポジウム「先天代謝異常症の新しい治療法の開発」 小川由美、難波栄二、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、鈴木義之 第 44 回日本先天代謝異常学会 平成 13 年 11 月 8 日-10 日 久留米

G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウス新生仔を用いた中枢神経系への経静脈的遺伝子導入の試み 高浦奈津子、八木隆、前田光代、小川由美、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之、山野恒一、田中あけみ 第 44 回日本先天代謝異常学会 平成 13 年 11 月 8 日-10 日 久留米

β -ガラクトシアリドーシスの新しい治療法の開発：ヒト異常遺伝子を発現する疾患モデル細胞に対するガラクトース類似低分子化合物の変異酵素活性化作用 難波栄二、小

ライソゾーム病の神経障害に対する治療法の開発に関する研究

分担研究者 大野耕策 鳥取大学・医学部・脳幹性疾患研究施設・脳神経小児科部門・教授

【研究要旨】 遺伝性ライソゾーム病の治療には骨髄移植、酵素補充療法が用いられるが、中枢神経障害には必ずしも有効ではない。ライソゾーム病の神経障害の治療法の確立が望まれている。本研究ではライソゾーム病の酵素の低分子基質類似体を用いて、変異酵素の活性化を目指す。初年度、ゴーシェ病の変異酵素の活性化に有効な低分子化合物を見いだす。この化合物は低分子で血液脳関門を通過する可能性があり、脳内の残存酵素活性の上昇と蓄積の減少が期待でき、神経障害にたいする有望な治療法となる可能性がある。

1. 研究目的

ライソゾーム病の多くはライソゾーム内の糖脂質加水分解酵素の欠損によっておこる。Suzuki らは、Fabry 病の変異酵素 α ガラクトシダーゼが、ガラクトースおよびその類似体によって活性化されることを見いだした。これはある種の変異を持つ酵素蛋白質は中性の条件では不安定であるが、ガラクトース類似体を添加すると酵素蛋白質が 中性の条件でも安定化する。このことはある種の変異を持つ酵素蛋白質は、酵素蛋白質が合成される中性の環境である小胞体やゴルジ装置で極めて不安定で、酸性の環境であるライソゾームに運ばれるまでに分解されてしまう可能性を示し、ガラクトース類似体を用いると、中性の環境で分解される酵素蛋白質を安定化し、酸性のオルガネラであるライソゾームに運ばれる可能性を示している。Suzuki らはこの理論を分子シヤベロン療法と命名している。

この理論にたてば、適切な阻害剤が見いだせれば、糖脂質の糖鎖分解酵素の欠損による多くのライソゾーム病へ応用可能な治療薬が見いだせる可能性がある。我々は、この治療法理論のバイオニアである鈴木義之博士との共同で、変異型 α 及び β グルコシダーゼを活性化できる阻害剤のスクリーニングを行い、ゴーシェ病の欠損酵素 α グルコシダーゼの一つの変異酵素を活性化する阻害剤を見いだした。

2. 研究方法

正常人由来の皮膚線維芽細胞のホモジネートを酵素蛋白液として、各種の α および β グルコシダーゼの活性を試験管内で阻害する薬剤のスクリーニングを行った。

正常の酵素活性の阻害作用の強い薬剤について、

正常およびゴーシェ病とポンベ病の患者細胞を用い、培養中の細胞へ阻害剤（グルコース類似体）を添加した時の酵素活性の変動を検討した。

培養中の細胞へ阻害剤（グルコース類似体）を添加によって、酵素活性が上昇した変異酵素蛋白質のレベルをウエスタンブロットにより検討した。

この変異酵素蛋白質の各種 pH での安定性を検討し、阻害剤（基質類似体）存在下での安定性を検討した。

酵素蛋白質の抗体を用いて、細胞内の酵素蛋白質の分布を検討した。

さらに、分解されるべき基質が増加する条件下で、この阻害剤（基質類似体）存在下で、基質の蓄積が減少するかどうか検討した。

3. 研究結果

- 1) 約 10 種類のグルコース類似体の中から正常の β グルコシダーゼ活性に対する IC50 が $3\mu\text{M}$ と極めて低濃度で阻害する薬剤 GluX を見いだした。
- 2) この阻害剤を培養線維芽細胞に添加すると β グルコシダーゼ活性を 5 - 6 倍に増加させ、正常の 80% 近くまで上昇させることを見いだした。5 つの異なる変異を持つ変異 β グルコシダーゼの中で、F213I 変異をホモまたはヘテロに持つ物だけに活性の上昇を認めた。L444P 変異をホモに持つ細胞では、ウエスタンブロット上、酵素蛋白質は全く検出されなかった。F213I 変異をホモに持つ患者細胞ではわずかに酵素蛋白質が検出され、GluX の添加で、酵素蛋白質が正常レベル近くまで上昇した。N370S/88GG 変異を持つ細胞では、酵素蛋白質は検出されたが、GluX 添加で酵素蛋白質の量

は増加しなかった。このことから、F213I 変異を持つ細胞の GluX による酵素活性の上昇は酵素蛋白質の増加によることが明らかになった。

- 3) F213I 変異を持つ細胞を GluX 存在下で培養し、ホモジネートを 37°C, pH7, 6, 5 におき、酵素活性の変動をみた。この結果 F213I 変異は pH7 では急速に失活し、pH5, pH6 では比較的安定であった。一方ホモジネートとともに、GluX を添加すると、pH7 でも pH5 と同程度の安定化が見られ、GluX は変異酵素と結合して安定化させることが明らかになった。
- 4) β グルコシダーゼの抗体を用いて、正常および F213I 変異を持つ細胞の β グルコシダーゼの局在を検討した。正常ではライソトラッカーと一致するライソソームに点状に染色像を認めた。ところが、F213I 変異を持つ細胞では、細胞質全体に淡い染色を認めたのみであった。一方、GluX を添加して培養すると F213I 細胞でも、ライソソーム内に強い染色性を認めた。GluX によって、酵素蛋白質が安定化し、ライソソーム内の酵素蛋白質量が増加することが明らかになった。
- 5) 発現が増加し、ライソソームに集まった酵素が、基質を分解する活性を持つかどうかを検討した。14C セリンを標識し、正常細胞と比較し、F213I 細胞でグルコシルセラミッドの量が増加している条件を作成し、この条件下で GluX を添加した所、F213I 細胞のグルコシルセラミッドの蓄積が正常レベルとなった。GluX によって増加し、ライソソームに集まった β グルコシダーゼが実際に蓄積基質を減少させることが明らかになった。

D. 考察

ゴーシェ病の原因酵素である β グルコシダーゼの 1 つの変異 F213I を安定化し、正常のレベルにまで活性を上昇させ、蓄積するグルコシルセラミッドを減少させるグルコース類似体を見いだした。ゴーシェ病の治療法として、酵素補充療法が行われている。II 型や III 型ゴーシェ病の中樞神経障害に対しては有効ではない。F213I 変異は III 型の臨床症状の原因遺伝子変異である。GluX は低分子で、血液脳関門を通過できると考えており、F213I を持つ患者の有効な治療法とできる可能性がある。今後、GluX の毒性試験とともに動物モデルを用いた治療効果の判定を行う必要がある。

E. 結論

III 型ゴーシェ病の原因変異の 1 つである F213I 変異を持つ β グルコシダーゼを安定化・活性化するグルコース類似体を見いだした。ゴーシェ病の中樞神経障害に対する新しい治療薬となる可能性が高い。

F. 健康危険情報 なし

G. 論文発表

1. 学会発表

二宮治明、杉本優子、大崎雄樹、檜垣克美、大野耕策。Niemann-Pick 病 C 型での細胞内小胞脂質蓄積の機序。日本生化学会シンポジウム「脂質の細胞内輸送システム研究の新しい展開」第 74 回日本生化学会大会、国立京都国際会館・京都・平成 13 年 10 月 25 日

2. 論文発表

- 1) Millat G, Marcais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, Ohno K, Vanier MT. Niemann-Pick C1 disease: correlation between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. American Journal of Human Genetics 68: 1373-1385, 2001
- 2) Higaki K, Ninomiya H, Sugimoto Y, Suzuki T, Niwa T, Pentchev PG, Vanier MT, Ohno K. Isolation of NPC1 deficient Chinese hamster ovary cell mutants by gene trap mutagenesis. Journal of Biochemistry (Tokyo) 129: 875-880, 2001
- 3) Sugimoto Y, Ninomiya H, Ohsaki Y, Higaki K, Davies JP, Ioannou YA, Ohno K. Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1 deficient cells. Proceedings of National Academy of Science USA 98: 12391-12396, 2001.
- 4) Yamada A, Saji M, Ukita Y, Taniguchi M, Ninomiya H, Ohno K. Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of the thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. Brain and Development 23: 288-297, 2001.
- 5) Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier MT, Ohno K. Sites and temporal changes of ganglioside GM1 /GM2 storage

in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. Brain and Development 23: 414-421, 2001

- 6) Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) in the brains of Niemann-Pick type C model mice. Journal of Biological Chemistry 276: 10314-10319, 2001.

H. 知的所有権の取得状況 なし

ファーバー病 (酸性セラミダーゼ欠損症) の病態解明

分担研究者 乾 幸治 大阪大学大学院医学系研究科 小児発達講座

研究要旨 ファーバー病は、リソゾーム酵素である酸性セラミダーゼの欠損により全身臓器へセラミドの蓄積をきたし痩せと皮下結節を主症状とする稀な先天性脂質代謝異常症である。本研究では、日本人ファーバー病患者2症例におけるヒト酸性セラミダーゼ遺伝子の変異、V97E、G235をII型に、96delV のホモの変異をV型に同定し、酵素活性の低下とそれによるセラミド蓄積を確認した。またV369Iの新しい多型を見いだした。

A. 研究目的

ファーバー病 (MIM 228000) はリソゾーム酵素である酸性セラミダーゼ (EC 3.5.1.23) の欠損により全身の臓器にセラミドが蓄積する常染色体劣性遺伝形式の先天性脂質代謝異常症である。臨床的には7病型 (古典型、中間型、軽症型、新生児内臓型、神経症状進行型、サンドホフ病結合型、SAP欠損症) に分類されており、関節の有痛性の腫脹、皮下結節、嘔声、関節の運動障害、などの症状とともに精神運動発達の退行、痩せが徐々に進行し乳児期に死亡する古典的タイプが多い。Farberによって初めて報告されているこれまでに世界で50例あまり、日本で6例報告されている稀な疾患である。1995年にヒト酸性セラミダーゼ酵素が精製され、1996年にcDNAのクローニング、1999年にはゲノム遺伝子構造の解析が行われた。これまで8種類の遺伝子変異が報告されているが、日本人の遺伝子変異は報告されていない。

本研究では、日本人ファーバー病2症例における遺伝子変異を明かにし、臨床病型との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

症例 8歳女児

周産期異常なし。10ヵ月時に両手の握りの不良から腱鞘切開術施行。1歳6ヵ月時に両膝、足関節に米粒大の皮下結節出現。その後結節の増加、嘔声、関節の屈曲拘縮、体重の増加不良を認めた。3歳時には階段昇降、可能であったが5歳頃より歩行不良となる。現在ミオクローヌスと片側の眼振を認める。家族歴なし。以後FD1と記す。

症例2 6歳男児

周産期異常なし。8ヵ月より両手指の伸展時疼痛、可動制限出現し1歳時腱鞘切開術施行。その頃までは正常発達であった。1歳頃より食欲不振、体重増加不良となり2歳5ヵ月頃より回転性眼振、ミオクローヌス、強直性痙攣出現。3歳8ヵ月時より仙骨部に皮下結節を生じ、寝たきりの状態となり6歳4ヵ月時死亡した。父方祖母と母方祖父がいとこ。以後FD2と記す。

細胞培養

同意のもと患者・コントロールの培養皮膚線維芽細胞を津通常の方法で培養した。

酸性セラミダーゼ酵素活性測定

L-[1-¹⁴C] Lauric acid (Amersham Pharmacia Biotech)、Lauric acid (Sigma)と Sphingosine (BIOMOL)から SCDase (Sphingolipid ceramide N-deacylase; TaKaRa) の逆反応を用いてセラミド基質を合成し精製した。酵素反応は、反応容量 60 μl、合成セラミド基質 150mM

(12000dpm/nmol)、0.5% TritonX 100、0.2% Tween20、0.2% NP40、0.8% Sodium cholate、250mM Acetate buffer pH4.2、酵素蛋白量約 100 μgで行った。蛋白量はBCA法を用いて測定した。ソニケーションした細胞の11000×g遠心上清を用いて37℃で1時間反応させた後、脂質をクロマトグラフィー=2:1400 μlで抽出濃縮した。その脂質をHPTLC plate (10×10cm; Merck)上でクロマトグラフィー/酢酸=104/1/5にて展開し、セラミダーゼにより水解された¹⁴Cラベル脂肪酸の放射能をBAS 1000で検出し、標準放射能物質と比較し解析した。

RT-PCRとDNAシーケンシング

Total RNAは培養皮膚線維芽細胞からISOGEN(CT)

ボゾ))を用いて抽出した。得られた Total RNA(5 μ g)より常法に従い M-MLV Reverse Transcriptase (STRATAGENE)、random hexamer (Boeringer) を用いて cDNA を合成した。次に PCR 法にて翻訳領域をカバーする 3 本の重複したプライマーセットを作成しフラグメントを増幅した。

PCR 産物はプライマー除去後 Dye Terminator 法にてダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定した。変異の見つかった領域に関してはゲノム DNA を用いて、それぞれの exon-intron 境界を含むプライマーセットにて PCR 増幅し同様に塩基配列を確認した。

遺伝的多型の解析

1105G→A 変異が遺伝的多型であるかを調べるために制限酵素切断実験を行った。正常コントロール 77 名のゲノム DNA を対象にプライマーセット (CER14F、CER14R) を用いて exon14 を含む 480 塩基を増幅した。得られた PCR 産物を制限酵素 *Bst* Z17I で処理し (1105 G→A の時には、235 塩基と 245 塩基に切断されない) 変異を確認した。

酸性セラミダーゼ発現実験

ヒト酸性セラミダーゼ全長 cDNA の PCR 産物を発現ベクター pSVL(Amersham Pharmacia Biotech) の *Xba*I と *Bam*HI 部位に挿入した。変異酸性セラミダーゼの発現ベクターは正常酸性セラミダーゼの発現ベクターを基に QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて作成し塩基配列を確認した。全ての発現ベクターは、COS-1 cells に LIPOFECTAMINE PLUS Reagent (GIBCO BRL) を用い使用法に従い導入した。48 時間後に細胞を回収し酵素活性測定まで -80℃ で保存した。

ノーザンブロッティング

ヒト酸性セラミダーゼを 32 P でラベルしプローブを作成した。正常と患者の培養皮膚線維芽細胞 total RNA (10 μ g) を用い通常の方法で行った。

結果

ノーザンブロッティング

培養皮膚線維芽細胞 total RNA を用いたノーザンブロッティングでは、患者 2 例 (FD 1、FD 2)、

正常 2 例 (C 1、C 2) において約 2.3kb のヒト酸性セラミダーゼ RNA の発現を認め、発現量は正常と同レベルであった。mRNA レベルにおいては変異による明らかな発現低下は起こっていないと考えられた。

遺伝子検索

患者 RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスにより、FD 1 では 3 種の点変異 (290 T→A (V97E)、703 G→C (G235R)、1105 G→A (V369I)) をヘテロ接合で認めた、FD 2 では Δ V96 (exon 4 内の塩基配列における GGTGGTGG→GGTGG 3 塩基欠失 (GGT、GTG あるいは TGG)) をホモ接合で認めた。患者 FD 1、FD 2 と FD 1 の両親のゲノム DNA においても上記の変異はを確認し、FD 1 の母のゲノム DNA より点変異 V97E、V369I、FD 1 の父のゲノム DNA より G235R を確認した。V369I に関しては、正常コントロール 77 名中 4 名に同一変異を認めたため遺伝的多型と判断した。

酸性セラミダーゼ遺伝子発現実験

患者より得られた 2 つの遺伝子変異における発現実験を行った。変異酸性セラミダーゼ pSVL (V97E、G235R、 Δ V96) の活性はいずれも低く、それぞれ wild type の 32%、2%、33% であり、検出した変異が病因であることが判明した

考察

本研究は、日本人ファーバー病症例における初めての遺伝子変異の報告である。変異遺伝子の mRNA 発現量については正常と同レベルであったので、おそらく蛋白レベルでの機能低下 (蛋白の不安定性、立体構造の変化) をきたしているものと推測された。今回確認した 3 種の遺伝子変異はいずれも新規の遺伝子変異であり、それぞれ変異遺伝子の酸性セラミダーゼ酵素活性低下を確認した。今後細胞内局在も検討する必要があると考えられた。臨床病型からは、FD1 は比較的軽症の経過と、中枢神経症状がないことより中間型の 2 型で FD 2 は神経症状進行型の 5 型と考えられるが、これまでの報告どおり酵素活性低下と対象脂質の蓄積率を含め臨床病型との関連性を推察する結果は得られなかった。これまでの遺伝子変異の報告ではその臨床病型について触れられておらず、今後も研究症例を増やし、その関係を追跡する予定である。

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

GM2 ガングリオシドーシス 0 異型の構造生物学的研究

分担研究者 桜庭 均 東京都臨床医学総合研究所・臨床遺伝学研究部門部長

研究要旨

GM2 ガングリオシドーシス 0 異型の病態を蛋白質分子レベルで明らかにするため、ヒト由来ヘキソサミニダーゼの β -サブユニットの 3 次元構造をホモロジーモデリングで構築した。そのモデルは 2 つのドメインからなり、3 箇所にジスルフィド結合が存在した。ドメイン I は逆並行 β -シート構造をとり、活性部位を含むドメイン III は $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を形成した。乳児型 GM2 ガングリオシドーシス 0 異型の原因になる C534Y 変異では、C534 と C551 の間のジスルフィド結合の形成が障害された。C534 はドメイン II の extra helix 上に位置し、ドメイン I に近接する。C534Y 変異により、2 つのドメインを安定化する extra helix の構造に大きな変化が起こると予想された。その結果、患者細胞においては成熟型 β -サブユニットの量が著明に減少した。これにより、ヘキソサミニダーゼ A および B の活性がほぼ欠損し、患者細胞内には大量の GM2 ガングリオシドが蓄積した。一方、成人型 GM2 ガングリオシドーシス 0 異型の原因となる R505Q 変異は、活性部位に影響を及ぼさないが、 β -サブユニット分子の表面構造に変化を来たした。その結果、成熟型 β -サブユニットの量は減少したが、少量が残存した。これにより、両酵素活性は低下したが、軽度の残存活性が認められた。患者細胞内の GM2 ガングリオシド蓄積は中等度であった。酵素の 3 次元構造からの情報は、生化学および臨床的表現型をよく反映し、本症の病態解明に有用と考えられた。

A. 研究目的

GM2 ガングリオシドーシス 0 異型 (Sandhoff 病およびその亜型) は、ヘキソサミニダーゼ (hexosaminidase, Hex) の β -サブユニットをコードする *HEXB* 遺伝子の異常により、ヘキソサミニダーゼ A (hexosaminidase A, Hex A : α -サブユニットと β -サブユニットのヘテロ2量体) とヘ

キソサミニダーゼ B (hexosaminidase B, Hex B: β -サブユニットのホモ2量体) とが同時に活性低下を来たす常染色体劣性遺伝病である。本症の病因となる遺伝子変異に関しては、少数ながら報告が見られるようになったが、病態を解明するために重要な蛋白質分子の情報は極めて乏しいのが現状である。また、本症では、生後 6 ヶ月頃から脳障害を来たして急

速に死に至る「乳児型」から成人期に発症して緩やかな経過をとる「成人型」まで予後に著しい差を生じる臨床型が存在する。その違いがどんな機序により起こるのか不明である。

本研究では、ホモロジーモデリングにより、当該蛋白質の3次元構造の予測を行い、生化学的情報と合わせて、構造—機能相関を分析する。これを基に、本症の各臨床型の病因遺伝子変異により、蛋白質分子にどのような変化が生じ得るかを解析して、分子病態を明らかにしようとするものである。その成果は、疾患の発生機序の解明や、遺伝相談および治療法の開発に応用されるものと期待される。

B. 研究方法

a) 対象

異なる臨床表現型（乳児型および成人型）を有する2例の日本人 GM2 ガングリオシドーシス0異型の患者を対象とした。

症例1は、乳児型 GM2 ガングリオシドーシス0異型の1歳の女児である。生後6ヵ月頃から進行性の筋力低下と筋緊張低下、運動障害や発達の遅れがみられ、1歳時にミオクローム様の変性発作が出現した。Hex A と Hex B の活性は、いずれも正常対照の3%以下で、遺伝型は C534Y/C534Y のホモ接合体であることが示された。

症例2は、成人型 GM2 ガングリオシドーシス0異型の31歳の男性である。25歳頃から、書字や言語の障害が出現し、MRI で小脳萎縮がみられた。Hex A と Hex B の活性は、それぞれ正常対照の15%および6%に低下していた。遺伝子検査で、

R505Q+I207V/R505Q+I207V のホモ接合体であることが示された。このうち、I207V は、先に病因遺伝子変異と報告されていたが、我々の解析結果などからポリモルフィズムであることが示され、R505Q が病因となる変異と考えられている。

b) ヒト由来 Hex のβ-サブユニットのモデリングと病因変異による構造変化の予測

モデリングのテンプレート蛋白質として、X線結晶解析により構造決定され、既に Protein Data Bank (PDB) に登録されている *Streptomyces plicatus* 由来の Hex (PDB コード:1HP4) と *Serratia marcescens* 由来のキトビアーゼ (PDB コード:1QBA) を使用した。これらの蛋白質はヒトの Hex のβ-サブユニットと相同性を持っており、第20群糖加水分解酵素のファミリーに所属する。モデリングでは、まず二つのテンプレート蛋白質の立体構造を重ね合わせるにより構造的に保存された領域である structurally conserved regions (SCRs) を決定した。次にターゲット蛋白質であるヒト由来 Hex のβ-サブユニットとテンプレート蛋白質のアミノ酸配列を ClustalW によりアライメントし、さらに抽出した SCR の構造の配列と二次構造情報を考慮して修正を加えた。SCRs の構造中の主鎖を含めた骨格構造は、*Streptomyces plicatus* 由来 Hex の立体構造を利用し、側鎖の構造は rule-based procedure 法によって決定した。また、structurally variable regions は SYBYL の substructure database からの検索と loop generation 法によって構築した。更

に、エネルギー最小化計算により各残基のコンフォメーションおよび回転角の最適化を行った。変異型蛋白質におけるアミノ酸置換による構造的な影響は、野生型蛋白質の構造と重ね合わせた後、対応する原子間の距離の差を測定することにより評価した。

c) Hex の α -および β -サブユニットの Western blot 解析

症例 1 と 2 および対照 (正常者および GM2 ガングリオシドーシス B 異型と AB 異型患者) 由来の培養繊維芽細胞を試料として、Western blotting により、細胞内の Hex の α -および β -サブユニットについて解析した。Western blotting には、ヒト Hex A に対するウサギのポリクローナル抗体を用いた。

d) GM2 ガングリオシドの免疫蛍光染色

培養繊維芽細胞を試料として、GM2 ガングリオシドとリソソームマーカーである lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) の 2 重染色を行った。その際、1 次抗体として、抗 GM2 ガングリオシドモノクローナル抗体 (IgM isotype) とヤギ抗 LAMP-2 ポリクローナル抗体 (IgG isotype) を用いた。2 次抗体には、それぞれ fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig M F(ab')₂ と rhodamine-conjugated donkey anti-goat Ig G F(ab')₂ を用いた。染色された細胞を、レーザー走査型共焦点顕微鏡で解析した。

(倫理面への配慮)

培養繊維芽細胞の使用に関しては、患者家族の了解を得た。また、本研究の実施に関

して、東京都臨床医学総合研究所の倫理委員会の承認を得た。

C 研究結果

Streptomyces plicatus 由来の Hex と *Serratia marcescens* 由来のキトビアーゼの構造情報を基に、同じ糖水解酵素第 20 群に属するヒト由来 Hex の β -サブユニットの構造をホモロジーモデリングで構築した。ヒト由来 Hex の β -サブユニットは、逆並行 β -シートを有するドメイン I と (β/α)₈ バレル構造を形成するドメイン II から構成される (図 1)。活性中心は、ドメイン II の内部にあり、E355、H294 と D240 が catalytic triad を形成すると考えられる。また、C91-C137、C309-C360 と C534-C551 の 3 箇所ジスルフィド結合が存在すると予測された。この予測は、最近の Schuette らのマスマスペクトロメトリーを用いた解析の結果と一致した。

C534 は、ドメイン II の C 末端の extra helix 上にあり、ドメイン I に近接する (図 1)。C534Y 変異により、C534-C551 間のジスルフィド結合が失われ、2 つのドメインの安定性が大きく低下すると考えられた (図 2)。

R505 は、ドメイン II の α -ヘリックス 8 上に位置する (図 1)。R505Q 変異により、分子表面の構造に変化が起こると予想された (図 3A)。

I207V では、立体構造への影響はほとんどみられなかった (図 3B)。

R505Q+I207V による変化は、R505Q のそれとほとんど変わらなかった (図 3C)。

症例 1 と 2 および対照由来の培養繊維芽

細胞を試料として、Hex A に対するポリクローナル抗体を用いて Western blotting を行った。症例 1 では、 β -サブユニットの成熟体がほぼ欠損していた。また、成熟型 α -サブユニットの量も減少していた。これは、 β -サブユニットと結合できない α -サブユニットは不安定であるため、二次的に分解されることに起因すると考えられた。症例 2 では、 β -サブユニット成熟体の量が減少していたが、軽度の残存が認められた (図 4)。

培養繊維芽細胞を試料として、抗 GM2 ガングリオシド抗体と抗 LAMP-2 抗体を用いた免疫蛍光法で、細胞内 GM2 ガングリオシドの蓄積を解析した。症例 1 では、LAMP-2 の染色パターンと一致して、細胞内に顆粒状に染色性がみられ、リソソーム内に GM2 ガングリオシドが大量に蓄積していることが示された。一方、症例 2 では、症例 1 と同様に GM2 ガングリオシドが蓄積していたが、その程度は中等度であった (Sakuraba, et al., J. Hum. Genet., in press)。

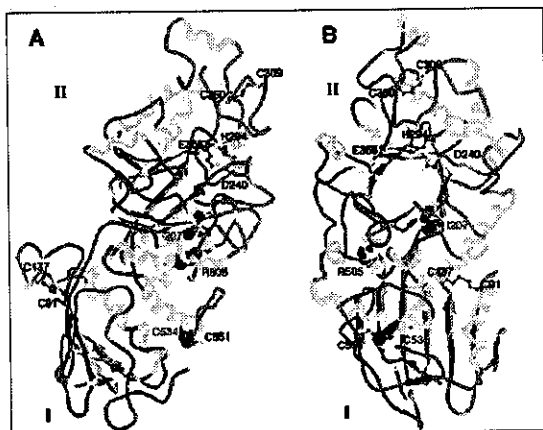


図 1. ヒト由来ヘキササミンダーゼの β -サブユニットの3次元構造モデル

図のAとBは、それぞれヘキササミンダーゼの β -サブ

ユニットの側面および正面像を示す。2次構造をチューブおよびリボンモデルとして表した。ローマ数字はドメインを示す。ジスルフィド結合 (C91-C137, C309-360 および C534-C551) を形成するシステイン残基と catalytic triad を形成するアミノ酸残基 (D240, H294 および E355) をアラビア数字で示した。GM2 ガングリオシド-シスO異型で置換が認められたアミノ酸残基 (C534, R505 および I207) を space-filling モデルで表わした。

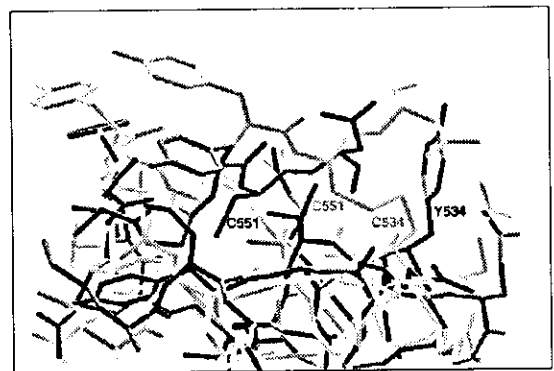


図 2. C534Y に伴う構造変化

野生型 (C534) とミュータント (Y534) における構造の違いを示した。

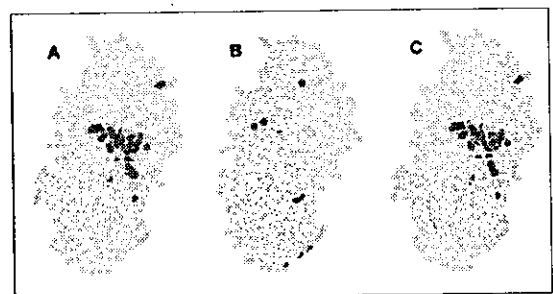


図 3. R505Q, I207V および R505Q+I207V に伴うヘキササミンダーゼの β -サブユニットの構造変化

R505Q, I207V および R505Q+I207V に伴う構造への影響を、それぞれ図の A, B および C に space-filling モデルで示した。それぞれの原子に関しては、ミュータントと野生型とで変化する距離に応じて濃淡をつけた。

R505Q では、分子表面に変化を来たした。一方、I207V では、ほとんど野生型と同じで変化がなかった。R505Q+I207V に伴う変化は、R505Q による変化とほぼ同じであった。

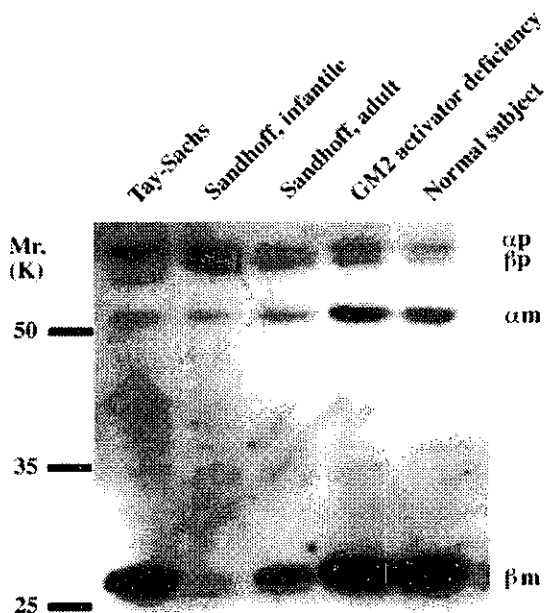


図4 ヘキササミニダーゼの α -および β -サブユニットのWestern blot解析

図のTay-Sachsは、GM2 ガングリオシドーシス B 異型患者、Sandhoff, infantile は症例 1, Sandhoff, adult は症例 2, GM2 activator deficiency は GM2 ガングリオシドーシス AB 異型患者、Normal subject は正常者をそれぞれ示す。 α -サブユニットおよび β -サブユニットの前駆体は、それぞれ αp および βp で、また、 α -および β -サブユニットの成熟体は、それぞれ αm と βm で示した。

D. 考察

Streptomyces plicatus 由来の Hex と *Serratia marcescens* 由来のキトビアーゼとの間のアミノ酸配列の相同性は、それ程高くない。しかし、X 線結晶構造情報から、両者の基本骨格はよく保たれており、ヒト由来

Hex の β -サブユニットでも同様のフォールディングが保たれていると推測される。実際に、ホモロジーモデリングで決定したジスルフィド結合の位置は、生化学的解析結果と一致した。乳児型の症例 1 では、本来のジスルフィド結合が形成されないため安定性が著減し、酵素欠損が起こり、大量の GM2 ガングリオシドが細胞内に蓄積して、重症になると考えられる。成人型の症例 2 では、分子表面の構造変化により、酵素の安定性は低下するが、一部分は残存し、この残存酵素の活性に基づいて、症状は比較的軽くなると思われる。

E. 結論

ホモロジーモデリングにより、ヒト由来 Hex の β -サブユニットの全体構造モデルを初めて提出した。その結果は、生化学的解析結果と矛盾しないものであった。この構造情報を利用して行った GM2 ガングリオシドーシス 0 異型における 3 次元構造変化予測は、生化学的および臨床的表現型をよく説明し得た。構造生物学からの病態研究は、遺伝相談のための情報提供や創薬による治療法開発に役立つと考えられる。

F. 謝辞

本研究は、セレスター・レキシコ・サイエンシズの松澤史子先生、相川聖一先生、土居洋文先生、鳥取大学脳神経小児科の大野耕策先生、大阪市立大学小児科の田中あけみ先生、熊本大学神経内科の宇山英一郎先生および東京都臨床医学総合研究所の小谷政晴研究員の協力で行われた。感謝いたします。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Kotani, M., Lin, H., Ohno, K., Tanaka, A., Yamada, H., Uyama, E.: Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis O variant. J. Hum. Genet., in press

2) 桜庭 均: 成人のガングリオシドーシス. Clinical Neuroscience, 19, 1374-1376, 2001

2. 学会発表

1) 桜庭 均, 松澤史子, 相川聖一, 土居洋文, 小谷政晴, Lin Hou, 大野耕策, 田中あけみ, 山田秀雄: GM2 ガングリオシドーシス O 異型の分子構造学的解析. 第 44 回日本先天代謝異常学会総会, 2001. 11. 8-10, 久留米

2) 桜庭 均, 松澤史子, 相川聖一, 土居洋文, 小谷政晴, Lin Hou, 大野耕策, 田中あけみ, 山田秀雄, 宇山英一郎: ヒト β -ヘキソサミニダーゼのモデリング: GM2ガングリオシドーシスの病態解明への応用. 第7回日本リビドーシス研究会, 2001. 12. 1, 東京

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の解明及び治療法の開発に関する研究

ライソゾーム病の病因、治療、遺伝子治療

分担研究者 高田五郎 秋田大学医学部小児科

研究要旨

ニーマンピック病 A・B 型はライソゾーム酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)の異常でライソゾームにスフィンゴミエリンの蓄積する遺伝性疾患である。最近、スフィンゴミエリン・コレステロールが細胞膜マイクロドメインの形成に関与し細胞機能と関与することが示されている。本疾患の細胞機能異常解析を目的に細胞外ストレス誘導アポトーシスと ASM の関係を研究した。UV-C、H₂O₂ 誘導アポトーシスに ASM が関与することを患者由来培養リンパ球を用いて示した。放射線誘導アポトーシスに ASM が関与することはすでに報告されており、研究者らの実験でも A 型（神経型）リンパ球では放射線誘導アポトーシスの反応が欠失していた。しかし B 型（非神経型）リンパ球では放射線誘導アポトーシスの反応が正常細胞と有意差がなく、放射線誘導アポトーシスのシグナル伝達が保たれている可能性があり臨床型との関係が示唆された。

A. 研究目的

ニーマンピック病(NPD)A・B 型はライソゾーム酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)の異常によりライソゾーム・後期エンドゾームにスフィンゴミエリン(SM)が蓄積するライソゾーム病で、神経退行を示す重症神経型(A 型)、肝脾腫・肺機能低下を主症状とする非神経型(B 型)に分類される。最近、スフィンゴミエリン・コレステロールによる細胞膜マイクロドメイン(rafts)の存在が、細胞機能と密接な関係を有していることが明らかにされ、スフィンゴミエリンの代謝異常がもたらす細胞機能異常に対する考え方に新しい概念の導入が可能となった。細胞外ストレス(放射線刺激など)による細胞アポトーシス誘導には ASM の活性化によるセラミド(CM)の産生が細胞

内シグナル伝達に関与することがすでに証明されている。また Fas(CD95)刺激によるリンパ球アポトーシスの誘導の解析で、ASM の活性化が細胞形質膜 rafts の SM を分解し CM の産生を引き起こし、細胞内シグナルとなっていることが実験的に示されている。研究者は、NPD の病態を明らかにする目的で、3 つの細胞外ストレス（放射線、UV-C、H₂O₂）について ASM 欠損細胞を用いて ASM と細胞外ストレスに関する関係に関して研究を行った。

B. 研究方法

細胞外ストレスの中で、UV-C(紫外線-C)、H₂O₂(過酸化水素)と ASM の関係は明らかになっておらず、ASM 欠損培養リンパ球を用いてその関係を明らかにすることを目的とした。

正常リンパ球と患者由来 ASM⁺リンパ球に、UV-C 刺激(10,000 μ J/cm²)と H₂O₂ 刺激(0.2 μ M)を加えそのアポトーシス誘導に関して検討した。細胞アポトーシスの検出は bis-benzimide(Hoechst33342;sigma)にて染色後、細胞核形態を観察し行った。また確認のため DNA fragmentation Assay を行った。コントロールとして同じ細胞系を用いて他の刺激、飢餓刺激(無血清培養)を行った。この刺激による誘導アポトーシスは p53 系を介すると説明されている。次に細胞外ストレス誘導アポトーシスに対する異なる臨床型由来の培養リンパ球の反応に関して検討した。刺激は放射線刺激(20Gy)を用いて、A 型リンパ球と B 型リンパ球に関してアポトーシスの検出を行った。また以上の実験系に ASM の抑制作用のある chlorpromazine を加えて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮) 本実験に用いた培養細胞は同意の得られた患者由来の細胞である。

C. 研究結果

UV-C 刺激では、正常リンパ球で 12 時間後 20.13 \pm 1.07%、24 時間後 10.85 \pm 2.04%、ASM⁺リンパ球では 12 時間後 8.85 \pm 0.5%(p<0.0001)、24 時間後 5.85 \pm 0.43%(p=0.05)とそれぞれの時間で有意にアポトーシス誘導の低下がみられていた。H₂O₂ 刺激では、正常リンパ球で 12 時間後 8.44 \pm 0.45%、24 時間後 4.24 \pm 0.16%、ASM⁺リンパ球では 12 時間後 2.84 \pm 0.60%(p<0.0001)、24 時間後 1.30 \pm 0.35%(p=0.05)とそれぞれの時間で有意にアポトーシス誘導の低下がみられていた。同じ細胞を用いて行った飢餓刺激誘導アポトーシスの実験では、両方で 20%前後のアポトーシス誘導が見られており有意の差はなかった。

臨床型の異なる患者(A・B型)由来の培養リンパ球を用いて放射線誘導アポトーシス(20Gy)を観察した。正常リンパ球では 12 時間後 26.06 \pm 1.6%、24 時間後 27.73 \pm 3.1%の誘導が見られたのに対して、A 型リンパ球では 12 時間後 7.56 \pm 1.9%(p<0.0005)、24 時間後 8.08 \pm 5.8%(p<0.0001)と著明な低下を示していた。一方、B 型リンパ球では 12 時間後 20.96 \pm 1.9%(p=0.624)、24 時間後 26.6 \pm 5.8%(p=0.764)と正常リンパ球と比べ有意差がなかった。以上より軽症型リンパ球では放射線誘導アポトーシスが正常に保たれていた。この B 型リンパ球に ASM の抑制作用のある chlorpromazine を加えて同様の実験を行ったところアポトーシス誘導の低下が見られた。

D. 考察

細胞外ストレスである放射線による誘導アポトーシスは ASM の活性化による CM 産生誘導によることが ASM ノックアウトマウスを用いた研究から報告されている。また種々のサイトカイン、Fas、TNF α などシグナル伝達にも ASM が関与することが ASM 欠損細胞を用いて示された。細胞外ストレスの中で UV-C、H₂O₂ 誘導アポトーシスに関しては直接証明がなされていなかった。研究者は患者由来の ASM⁺細胞を用いて UV-C あるいは H₂O₂ 誘導アポトーシスに ASM が強く関与することを示した。

ASM 欠損により発症する NPD の臨床型には神経型と非神経型が存在する。しかし ASM の残存酵素活性と臨床型との明確な関係も確立はされていない。研究者らの結果は、両臨床型由来のリンパ球で放射線誘導アポトーシスの程度に差があり、B 型リンパ球では放射線誘導アポトーシスが正常細胞と同様に誘導

された。最近、SM・コレステロールの関与する細胞膜マイクロドメイン(rafts)と細胞機能の関係のデータが多く報告されている。特に神経細胞における rafts と細胞機能の関係も多く報告されており注目されている。リンパ球において Fas(CD95)による細胞内シグナル伝達に ASM が関与し、刺激により ASM がライソゾームより形質膜マイクロドメインまで移動しマイクロドメインの SM を分解することが示されている。放射線誘導アポトーシスでも同様のことが起きているのであれば、B 型リンパ球での形質膜マイクロドメインが正常に反応するというを示しているのであり、神経系が正常に保たれていることとの関係が興味深いと思われた。

E. 結論

細胞外ストレス誘導アポトーシスと ASM の関係に関して研究を行った。UV-C、H₂O₂ 誘導アポトーシスに ASM が関与することを示した。放射線誘導アポトーシスに ASM が強く関与することはすでに報告されているが、研究者らの実験でも A 型（神経型）リンパ球では放射線誘導アポトーシスの反応が欠失しており ASM が同アポトーシスに強く関与していることを確認した。しかし B 型（非神経型）リンパ球では放射線誘導アポトーシスの反応が保たれていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Komatsu M, Takahashi T, Abe T, Takahashi I, Ida H, Takada G. Evidence for the association of ultraviolet-C and H₂O₂-induced apoptosis with acid sphingomyelinase activation. 2001, BBA, 1533, 47-54.

研究成果の刊行一覧

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名）	刊行 年付日	刊行書店名	執筆者名
Eur J Pediatr. 160: 21-25. Effects of enzyme replacement therapy in 13 Japanese pediatric patients with Gaucher disease.	2001		Ida H, Rennert OM, Kobayashi M and Eto Y.
J Pediatr. 138:137-9. A new variant neuronopathic type of Gaucher's disease characterized by hydrocephalus, corneal opacities, deformed toes, and fibrous thickening of spleen and liver capsules.	2001		Inui K, Yanagihara K, Otani K, Suzuki Y, Akagi M, Nakayama M, Ida H and Okada S.
Hum Cell. 14:7-15. Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons.	2001		Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Takeshima T, Inoue K, Eto Y, Kim SU.
Blood. 98:57-64. Genetically modified bone marrow continuously supplies anti-inflammatory cells and suppresses renal injury in mouse Goodpasture syndrome.	2001		Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Shen JS, Hisada Y, Eto Y, Kawamura T, Hosoya T.
J Am Soc Nephrol. 12:2330-7. Inflamed glomeruli-specific gene activation that uses recombinant adenovirus with the Cre/loxP system.	2001		Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Shiba H, Shen JS, Hisada Y, Eto Y, Kawamura T, Hosoya T.
Gene Ther. 8:1081-7. Intraventricular administration of recombinant adenovirus to neonatal twitcher mouse leads to clinicopathological improvements.	2001		Shen JS, Watabe K, Ohashi T, Eto Y.
Brain Dev. 23:379-84. Development of lysosomal storage in mice with targeted disruption of the beta-galactosidase gene: a model of human G(M1)-gangliosidosis.	2001		Itoh M, Matsuda J, Suzuki O, Ogura A, Oshima A, Tai T, Suzuki Y, Takashima S.
Brain Dev. 23:284-7. Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse.	2001		Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E.
The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 2001 3775-3809. b-Galactosidase deficiency (b-galactosidosis): GM1-Gangliosidosis and Morquio B disease.	2001		Suzuki Y, Oshima A, Nanba E.
Hum. Gene Ther. 12:227-233. Selective killing of HIV infected cells by targeted gene transfer and inducible gene expression using a recombinant HIV vector.	2001		Miyake, K., Iijima, O., Suzuki, N., Matsukura, M., and Shimada, T.
Transplantation 71:1735-1740. Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain.	2001		Nakano, K., Migita, M., Mochizuki, H., and Shimada, T.
J. Hematol. 73:476-482. Selective transduction of HIV-1 infected cells by the combination of HIV and MLV vectors. Inter.	2001		Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., and Shimada, T.