

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：桜川宣男，国立精神・神経センター神経研究所）

分担研究課題：ライソゾーム病のマスクリーニングと臨床的検討
分担研究者 青木継稔（東邦大学学長）

研究要旨

ライソゾーム病の臨床統計の結果をもとに、本症のマスクリーニング・システム構築に関する検討を行った。平成 11 年度の小児慢性疾患事業などへの「先天代謝異常」の登録をもとに、ライソゾーム病各疾患における頻度を検討した。比較的頻度が高い疾患に対して、診断法、治療法、およびスクリーニングの方法を検討した。その結果、現時点においては Tay-Sachs 病、GM1 ガングリオシドーシス、ムコ多糖症および異染性白質ジストロフィーなどがスクリーニング対象疾患の候補疾患になりうると考えられた。今後、これらの疾患に対し尿あるいは濾紙血を用いたスクリーニング法を検討していく必要があると考えられた。

研究協力者

清水教一（東邦大学医学部第二小児科）

「先天代謝異常」の登録数は、全国 84 都道府県市にて集計され、6,373 人であった。この中におけるライソゾーム病各疾患の症例数と頻度は表の通りであった。

A. 研究目的

ライソゾーム病は従来治療が極めて困難な疾患であった。しかし、近年骨髄移植や酵素補充療法をはじめとした有効な治療法の開発が進んでいる。早期に診断し治療を開始することにより、生命予後や QOL を改善させることができる可能性が考えられるようになってきた。そして、早期発見を目的とした本症のスクリーニングの必要性が考えられている。今回筆者らは、ライソゾーム病の臨床統計の結果をもとに、本症のマスクリーニング・システム構築に関する検討を行った。

表. ライソゾーム病各疾患の頻度

疾患名	症例数	頻度(%)
Gaucher 病	30	0.5
Nieman-Pick 病	7	0.1
GM1 ガングリオシドーシス	4	0.1
Tay-Sachs 病	6	0.1
Krabbe 病	3	0.0
異染性白質ジストロフィー	12	0.2
Multiple sulfatase 欠損症	9	0.1
Faber 病	3	0.0
ムコ多糖症	139	2.2
ムコリピドーシス	13	0.2
セロイドリポフチノーシス	6	0.1
Fabry 病	9	0.1

B. 研究方法

1. 平成 11 年度の小児慢性疾患事業などへの「先天代謝異常」の登録をもとに、ライソゾーム病各疾患における頻度を検討した。
2. 比較的頻度の高い疾患の診断法および治療法を検討した。
3. 上記の結果をもとに、マスキリングの対象疾患の選択と、その方法について検討した。

D. 考察

今回の検討において、ムコ多糖症とスフィンゴリピドーシスは現行の新生児マスキリング対象疾患であるホモシスチン尿症よりも高頻度であった。また、上記した各疾患のうち 0.1%以上の頻度を有し、かつ治療が可能となりうる疾患としては、ムコ多糖症、Gaucher 病、異染性白質ジストロフィー、Fabry 病、Tay-Sachs 病、Nieman-Pick 病

C. 研究結果

平成 11 年度の小児慢性疾患事業などへの

および GM1 ガングリオシドーシスなどがあげられる。これらの疾患に対する検査法を考えた場合、ムコ多糖症および異染性白質ジストロフィーは尿検査にて、Tay-Sachs 病および GM1 ガングリオシドーシスは濾紙血を用いた検査にてスクリーニングすることが可能であると考えられた。以上より、これら 4 疾患がスクリーニング対象疾患の候補疾患になりうると考えられた。今後は、これらの疾患に対する一次スクリーニングの方法とその施行時期について検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

ライソゾーム病各疾患の臨床統計をもとに、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。疾患頻度、治療の可能性、およびスクリーニングのための検査法を検討した結果、ムコ多糖症、異染性白質ジストロフィー、Tay-Sachs 病および GM1 ガングリオシドーシスの 4 疾患がスクリーニング対象疾患の候補疾患となりうると考えられた。

F. 研究発表

1. 刊行論文

清水教一，竹下由紀子，渡辺温子，逸見仁道，嶋武博之，岡田光正，青木継稔：重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の遺伝子変異に関する検討。Biomed Res Trace Elements 13: 284-285, 2002

竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，岡田光正，青木継稔：本邦における Wilson 病遺伝子診断に関する研究。Biomed Res Trace Elements 13: 286-287, 2002

Takeshita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, Nakazono H, Saitou M, Fujikawa Y, Aoki T: Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. J Hum

Genet 47: 543-547, 2002

青木継稔，清水教一，竹下由紀子：Wilson 病遺伝子異常の臨床と治療。細胞 34: 583-586, 2002

2. 学会発表

清水教一，山口之利，青木継稔：Wilson 病マススクリーニング・システムの検討，方法と施行時期に関するまとめ。第 105 回日本小児科学会学術集会，名古屋，2002 年 4 月

竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，青木継稔：変性高速液体クロマトグラフィーによる Wilson 病遺伝子変異スクリーニングの検討。第 105 回日本小児科学会学術集会，名古屋，2002 年 4 月

斉藤美雪，中園宏紀，竹下由紀子，清水教一，山口之利，青木継稔：同胞間にて異なった病型および発症年齢を呈した Wilson 病の一家系。第 105 回日本小児科学会学術集会，名古屋，2002 年 4 月

山口之利，藤井秀樹，清水教一，青木継稔，玉井浩，有馬正高：ウイルソン病友の会活動の状況。第 105 回日本小児科学会学術集会，名古屋，2002 年 4 月

山口之利，清水教一，青木継稔：Wilson 病マススクリーニング実施に向けて，方法と施行時期に関するまとめ。第 6 回ウイルソン病研究会学術集会，東京，2002 年 5 月

竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，青木継稔：Wilson 病の遺伝子診断に関する検討，効率の良い方略とその位置づけについて。第 6 回ウイルソン病研究会学術集会，東京，2002 年 5 月

竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，

青木継稔：神経型・肝神経型 Wilson 病に対する遺伝子診断の方略. 第 44 回日本小児神経学会総会, 仙台, 2002 年 6 月

清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 青木継稔：神経型および肝神経型 Wilson 病の早期診断に関する検討. 第 44 回日本小児神経学会総会, 仙台, 2002 年 6 月

清水教一, 竹下由紀子, 渡辺温子, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔：重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の遺伝子変異に関する検討. 第 13 回日本微量元素学会, 木更津, 2002 年 7 月

竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔：本邦における Wilson 病遺伝子診断に関する研究. 第 13 回日本微量元素学会, 木更津, 2002 年 7 月

竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔：重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の ATP7B 遺伝子変異に関する検討 (第二報). 第 19 回日本小児肝臓病研究会, 土浦, 2002 年 7 月

清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔：Wilson 病マススクリーニング・システムにおける一次スクリーニング法の検討, 方法と施行時期に関するまとめ. 第 49 回日本小児保健学会, 神戸, 2002 年 10 月

竹下由紀子, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔：Wilson 病マススクリーニングにおける遺伝子診断の位置づけに関する研究, 第 49 回日本小児保健学会, 神戸, 2002 年 10 月

清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔：Wilson 病の予後に関する検討, 早期 (発症前) 診断の重要性について.

竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 四宮範明, 青木継稔：R778L 変異を有する Wilson 病症例に関する検討. 第 45 回日本先天代謝異常学会, 神戸, 2002 年 11 月

合成基質を用いた galactosylceramidase(GALC)活性の測定に関する研究

分担研究者 古谷 博和 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 講師

研究協力者 新納 信江, 大八木 保政, 吉良 潤一

九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

研究要旨

Krabbe 病の原因酵素である galactosylceramidase(GALC)活性の測定のための基質は、これまで bovine spinal cord から抽出していたが、アイソトープを使用していたために、多くのステップ、技術の習熟、特殊な施設が必要であった。そこで、人工合成基質を用いて同様の結果が出るかどうか、Krabbe 病患者培養細胞を用い、天然基質を用いた場合と、人工合成基質とで、GALC 活性の比較を行った。その結果、天然基質を用いた場合と比較して、測定に多少時間がかかり、培養時間の短縮は多少精度を下げる可能性があることを除いて、Krabbe 病の診断に特に問題はないことが判明した。今後診断のみならず、GALC 機能の解析のためにもこの測定方法は有用であると考えられた。

A. 研究目的

Krabbe 病(globoid cell leukodystrophy, GLD)は、galactosylceramidase(GALC)遺伝子の異常により起こる常染色体劣性の遺伝疾患であるが、GALC のアミノ酸変異や欠損の位置によって完全に臨床型が決定するという特徴がある。

このことから、臨床型、GALC 遺伝子変異と遺伝子発現、酵素活性の違いを in vivo, in vitro で調べてゆくことは、詳細な機能の解明されていない GALC と GLD の病態を知る上で有用であると考えられる。

しかし、これまで GALC 活性測定には、アイソトープラベルした bovine spinal cord からの抽出基質を使用する方法が用いられており、この方法ではアイソトープラベルのために多くのステップ、技術の習熟、測定のための施設が必要であるため、これが GALC の機能解析や、GLD の病態解明を行ってゆく上で大きな問題となっている。

そこで今年度は、蛍光標識した人工合成基質を用いることで、GALC 活性の測定が可能であることを示すとともに、天然基質を用いた場合とで測定値、測定方法に大きな差が出ないかどうかを検討した。

B. 研究方法

測定するサンプルとしては、GLD の患者さんより研究承諾をえて培養した線維芽細胞（乳幼児型 1

例 (K3)、および成人型 2 例 (K1, K2)) と、正常コントロール（4 例）の線維芽細胞を用いた。

蛍光標識された HMU-β-Gal(6-Hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside)は、O.P. van Diggelen 教授(University Medical Centre Rotterdam, Netherlands)より供給していただいた。測定方法は、RI 法と同じく、10μl の homogenate cell lysate (20μg protein)に 20μl の基質溶液を加え、17 時間 37℃ で培養後、stop buffer を加え、測定を行った。Blank substrate としては、heat inactivate した BSA-0.2% 溶液を用いた。

合成基質 HMU-β-Gal を用いた線維芽細胞の GALC 活性を、天然基質(Gal-C)と RI を用いたこれまでの方法とで比較検討した。

また、一般に HMU-β-Gal を基質として用いた場合は、Gal-C を用いた場合（1 時間）に比べて、遙かに長い培養時間（17 時間）が必要である。培養時間が酵素活性値に及ぼす影響を調べるため、培養時間 2, 4, 8, 17 時間でそれぞれ酵素活性を測定、比較した。

（倫理面での配慮）

この実験では、研究承諾をえて培養した患者および正常コントロールの線維芽細胞を用いており、特に問題点はないと考えられる。

C. 研究結果

HMU-B-Gal を用いて測定した正常コントロールの GALC 活性は全例 1.12~4.71 nmol/hr/mg のなかに入っており、Gal-C を用いた場合 (1.93~5.58 nmol/hr/mg) と大きな差は認められなかった。

乳幼児型の GALC 活性の平均値は、HMU-B-Gal を用いた場合 K1 0.5, K2 0.72, K3 0.37 nmol/hr/mg であり、Gal-C を用いた場合 (K1 0.39, K2 0.25, K3 0.14) と、多少測定値のばらつきがあるものの、平均値では大きな差は認めず、いずれも正常者線維芽細胞に比較して著しく低値をとっていた。また、乳幼児型および成人型との間で、GALC 活性に差は認められず、これまでの Gal-C と RI を用いた場合と同様の結果であった。

培養時間と GALC 活性の比較では、培養時間が 4 時間を超えると、吸光度の生データで比較した場合、コントロールと GLD サンプルとの差が大きくなる傾向があった。

D. 考察

以上の結果より、人工合成基質を用い蛍光法で測定した GALC 活性も、RI 法とほぼ同程度の感度を有しており、この方法での GALC 活性測定および GLD 診断に大きな支障はないと考えられた。

培養時間の問題では、HMU-B-Gal を用いた方法では、培養時間の短縮は、精度を落とす可能性が考えられ、十分な培養時間を守ることが望ましいと想われた。

GALC 活性測定が、人工合成基質を用いた蛍光法で可能となったことは、RI 施設を持たない研究施設でも、多くのサンプルの活性測定が可能になったことを意味しており、今後の GALC 機能解析研究のためにも有用であると考えられる。

E. 結論

1. 合成人工合成基質(HMU-B-Gal)を用いても、天然基質を用いた場合と同じようにGALC活性は測定出来る。
2. 天然基質(Gal-C)を用いた場合と比較すると、多少精度に差はあったが、診断は可能であった。
3. 人工合成基質(HMU-B-Gal)を用いた場合、培養時間の短縮は、精度を落とす可能性が考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 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

- 1) Koyano S, Fukui A, Uchida S, Yamada K, Asashima M, Sakuragawa N: Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Development, Growth and Differentiation*. 44: 103—112, 2002
- 2) Elwan MA, Sakuragawa N: Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 25: 205-208, 2002
- 3) Naganawa Y, Ohsugi K, Kase R, Date I, Sakuraba H, Sakuragawa N: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplantation* 11: 325-329, 2002.
- 4) Ogawa A, Terada S, Miki M, Matsuura K, Hoshika A, Sakuragawa N: Human amniotic epithelial (HAE) cell produce erythropoietin. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*. 12: 309-313, 2002.
- 5) Terada S, Ogawa S, Sakai N, Miki M, Fujita T, Yata T, Nagamune T, Sakuragawa N, Suzuki E: Apoptosis inhibiting genes and caspase inhibitors improved mammalian cell survival and enhanced protein production. ACS symposium series 830. *Biological system engineering*. Edt by Maartin MR, Park TH, Nagamune T. America Chemical Society, Washington DC, pp 190- 199, 2002
- 6) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N: Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neuroreport*. In press.
- 7) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. In press.
- 8) Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. & Mikoshiba, K.: The Wnt/Calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos.. *Nature* 417: 295-299 , 2002
- 9) Nagai, T., Ibata, K., Park, ES., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol*, 20 : 87-90 , 2002
- 10) Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K. & Ikura, M: Structure of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor binding core in complex with IP₃ *Nature*, 420: 696-700 , 2002
- 11) Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K. & Takenawa, T.: Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension. *Developmental Cell* , 3 : 645-658, 2002
- 12) Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hataya, T. and Asashima, M. : Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 244, 267-277, 2002
- 13) Onuma, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S. and Walter J. Gehring. : Conservation of Pax 6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. *PNAS*, 99(4), 2020-2025, 2002
- 14) Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M. and Kikuchi, A. : Desumoylation activity of Axin, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of β -catenin *Molecular and Cellular Biology*, 22(11), 3803-3819, 2002

- 15) Emura, T., Asashima, M., Furue, M. and Hasizume, K.: Experimental split cord malformations. *Pediatr. Neurosurg.* 36, 229-235, 2002
- 16) Osafune, K., Nishinakamura, R., Komazaki, S. and Asashima, M.: In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Develop. Growth Differ.* 44, 161-167, 2002
- 17) Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C. and Asashima, M.: Multiple nodal-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Biology*, 241, 94-105, 2002
- 18) Kobayashi, M., Kishida, S., Fukui, A., Michiue, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Yoneda, Y., Asashima M. and Kikuchi, A.: Nuclear localization of Duplin, a β -catenin-binding protein, is essential for its inhibitory activity on the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 277(8),5816-5822, 2002
- 19) Kakeda, M., Kyuno, J., Kato, T., Nishikawa, M. and Asashima, M.: Role of the thrombopoietin (TPO)/Mpl system: c-Mpl-lik molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus laevis*. *Develop. Growth Differ.*, 44, 63-75, 2002
- 20) Sedohara, A., Fukui, A., Michiue, T. and Asashima, M.: Role of BMP-4 in the including ability of the head organizer in *Xenopus laevis*. *Zool. Sci.*, 19,67-80, 2002
- 21) Wada, M., Miyazawa, H., Wang, R., Mizuno, T., Sato, A., Asashima, M. and Hanaoka, F.: The second largest subunit of mouse DNA polymerase ϵ , DPE2, interacts with SASP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA. *J. Biochem.*, 131, 307-311, 2002
- 22) Hayata, T., Tanegashima, K., Takahashi, S., Sogame, A. and Asashima, M.: Overexpression of the secreted factor Mig30 expressed in the Spemann organizer impairs morphogenetic movements during *Xenopus* gastrulation. *Mechanisms of Development*, 112, 37-51, 2002
- 23) Koyano, S., Fukui, A., Uchida, S., Yamada, K., Asashima, M., and Sakuragawa, N.: Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Develop. Growth Differ.*, 44(2), 103-112, 2002
- 24) Satow, R., Chan, T. and Asashima M.: Molecular cloning and characterization of dullard: a novel gene required for neural development. *B. B. R. C.*, 295, 85-91, 2002
- 25) Uehara, M., Haramoto, Y., Sekizaki, H., Takahashi, H. and Asashima, M.: Chromosome mapping of *Xenopus tropicalis* using the G- and Ag-bands: Tandem duplication and polyploidization of larvae heads. *Develop. Growth Differ.*, 44, 427-436, 2002
- 26) Furue, M., Myoishi, Y., Fukui, Y., Ariizumi, T., Okamoto, T. and Asashima, M.: Activin A induces craniofacial cartilage from undifferentiated *Xenopus* ectoderm in vitro. *PNAS*, 99(24), 15474-15479, 2002
- 27) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R.: Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 62-69, 2003
- 28) Takeshita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, Nakazono H, Saitou M, Fujikawa Y, Aoki T: Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *J Hum Genet* 47: 543-547, 2002
- 29) 清水教一, 竹下由紀子, 渡辺温子, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継穂: 重篤な肝障害を呈した Wilson 病症例の遺伝子変異に関する検討. *Biomed Res Trace Elements* 13:

- 284-285, 2002
- 30) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 青木継稔: 本邦における Wilson 病遺伝子診断に関する研究. *Biomed Res Trace Elements* 13: 286-287, 2002
- 31) 青木継稔, 清水教一, 竹下由紀子: Wilson 病遺伝子異常の臨床と治療. *細胞* 34: 583-586,] 2002
- 32) Takahashi, H., Hirai, Y., Migita, M., Seino, Y., Fukuda, Y., Sakuraba, H., Kase, R., Kobayashi, T., Hashimoto, Y., Shimada, T.: Long-term systemic therapy of Fabry disease by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 13777-13782, 2002
- 33) Naganawa, Y., Ohsugi, K., Kase, R., Date, I., Sakuraba, H., Sakuragawa, N.: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transpl.* 11: 325-329, 2002
- 34) 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 0 variant. *J. Hum. Genet.*, 47: 176-183, 2002
- 35) Itoh, K., Naganawa, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sasagasako, N., Yamada, T., Kira, J., Kobayashi, T., Pshezhetsky, A. V., Sakuraba, H.: Novel missense mutations in the human lysosomal sialidase gene causing sialidosis and structural prediction of mutant enzymes. *J. Hum. Genet.*, 47: 29-37, 2002
- 36) Takemoto Y, Suzuki Y, Tamakoshi A, Onodera O, Tsuji S, Hashimoto T, Shimosawa N, Orii T, Kondo N. Epidemiology of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Genet* 2002;47(11):590-3
- 37) Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Grubb JH, Snella EM, Gutierrez MA, Dieter T, Sukegawa K, Orii T, Kondo N, Sly WS. Missense models [Gustm(E536A)Sly, Gustm(E536Q)Sly, and Gustm(L175F)Sly] of murine mucopolysaccharidosis type VII produced by targeted mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12;99(23):14982-7
- 38) Tomatsu S, Orii KO, Islam MR, Shah GN, Grubb JH, Sukegawa K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Sly WS. Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics* 2002 Mar;79(3):363-75
- 39) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59: 1689-1693, 2002.
- 40) Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kellely RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP. Posttranslational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002.
- 41) Takahashi M, Yamamoto A, Takano K, Sudo A, Wada T, Goto Y, Nishino I, Saitoh S. Girmline mosaicism of a novel mutation in LAMP-2 deficiency (Danon disease). *Ann Neurol* 52: 122-125, 2002.
- 42) Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J,

- Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58: 1773-1778, 2002.
- 43) Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I. The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. *J Biochem* 131: 647-651, 2002.
- 44) Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 57: 903-905, 2001.
- 45) Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406: 906-910, 2000.
- 46) Itoh, M., Kuwahara, J., Itoh, K., Fukuda, Y., Kohya, M., Shindo, M., Shishido, K. : Apoptosis-inducing activity of synthetic halichlorine intermediates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2002) 12(16) 2069-2072
- 47) Itoh, K., Naganawa, Y., Matuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sasagasako, N., Yamada, Kira, J., Kobayashi, T., Pshezhetsky, A. V., Sakuraba, H. : Novel missense mutations in the human lysosomal sialidase gene in sialidosis patients and prediction of structural alterations of mutant enzymes. *J. Hum. Genet.* (2002)47, 29-37

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班

平成14年度研究班会議

場所：東邦大学医学部大森病院5号館地下1階
大森臨床講堂
〒143-8541 東京都大森西 6-11-1
Tel: 03-3762-4151

1:00 受付け開始

1:30 開会挨拶

Session 1 司会 浅島 誠

- (1) 1:40~2:00 細胞移植による脳代謝病の治療研究：ヒト羊膜細胞由来 SP 細胞
の分離・培養と phenotype の検討

東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座

桜川宣男

- (2) 2:00~2:20 脳神経系の発生・分化機構の解明

東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野

御子柴克彦

Session 2 司会 御子柴克彦

- (3) 2:20~2:40 未分化細胞からの目と軟骨の形成の基礎と応用

東大・院・総合・生命

浅島 誠

- (4) 2:40~3:00 合成基質を用いた galactosylceramidase(GALC)活性の測定

九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

古谷博和、新納信江、吉良潤一

3:00~3:10 休憩

Session 3 司会 古谷博和

- (5) 3:10~3:30 ライソゾーム病のマススクリーニングと臨床的検討

東邦大学医学部附属大橋病院小児科学第二講座

清水教一、青木継稔

- (6) 3:30~3:50 神経幹細胞の脳内移植によるライソゾーム病の治療

国立成育医療センター

福原康之、小須賀 基通、奥山虎之

- (7) 3:50~4:10 GM2 ガングリオシドーシス B 異型の構造学的研究

東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 臨床遺伝学

桜庭 均

- (8) 4:10~4:30 ムコ多糖症の新生児期マススクリーニングに関する研究ー

特殊抗体を用いた血漿及び尿中ケタラン硫酸、ヘパラン
硫酸、コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸の測定ー

岐阜大学小児科

磯貝光治、近藤直実

生化学工業

加藤 修、宮浦修一、岡村和夫

大阪市立大学小児科

田中あけみ

国立成育医療センター

奥山虎之、松尾宣武

中部学院大学

折居忠夫

Session 4 司会 青木継稔

(9) 4:30～4:50 Danon 病における自己貪食空胞の筋病理学的検討

国立精神・神経センター神経研究所 西野一三, ○杉江和馬, 埜中征哉

(10) 4:50～5:10 Sandhoff 病モデルマウスにおける組織異常シグナルの解明と細胞補充療法への応用

徳大・薬・附属医薬資源研究センター・環境生物工学分野 伊藤孝司

(11) 5:10～5:30 ムコ多糖症-尿スクリーニングと酵素活性測定検査体制の構築

株式会社エス・アール・エル 検査統括部 横山安伸

5:30～5:45 総合討論

5:45 閉会

研究課題名：細胞移植による脳代謝病の治療研究：

ヒト羊膜細胞由来 SP 細胞の分離・培養と phenotype の検討

研究者：東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座	桜川宣男
協力研究者：東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座	畑田成吾
株式会社エスアールエル：	柿沼健一、横山安伸
国立精神神経センター：	蓮見裕子、菊池愛子、加茂 功
ベックマンコールター：	井野礼子

序論：ヒト羊膜上皮細胞は胎生初期に形成され、免疫学的に幼弱であることより同種移植可能な細胞である。我々の従来の研究により、羊膜上皮細胞は多機能、即ち種々の生体活性物質（acetylcholin, catechlamín, neurotrophic factors, activin, noggin, alubumin, erythropoietin）の合成・分泌する機能を保持していることを報告してきた。また羊膜上皮細胞の下層に存在している羊膜間葉細胞は、神経プロゲニターの特徴をもつ細胞が存在していることを証明した。このような従来の研究から、羊膜細胞には多機能の幹細胞が存在する可能性を提唱してきた。そして体細胞由来幹細胞の分離、培養の研究進めてきた。

近年、造血幹細胞や他の器官の未熟細胞の多能性が報告されている。特にマウス骨髄細胞を用い、Hoechst 33342（UV レーザーに2つの波長の蛍光を発する）の波長を暗く発現している細胞集団が高い幹細胞活性を持つことが証明され、その細胞分画を SP 細胞（side population）と呼ばれている。そこで我々は羊膜細胞由来の SP cells の分離・培養に成功し、phenotype を検討しているので報告する。

方法：インフォームドコンセント施行してから、予定帝王切開分娩の胎盤より羊膜を分離した。従来の方法により、羊膜は2段階の酵素処理法により、羊膜上皮細胞と羊膜間葉細胞とに分離し、培養した。培養細胞を細胞分離装置（ベックマン・コールター）を用いて、SP cells の同定を行い、分離した。分離細胞を継代培養し、種々の抗体で染色して phenotype の検討を行っている。

結果：細胞分離装置を用いて SP 細胞分画をゲートで囲み、verapamil 処理細胞と比較検討した。羊膜間葉細胞には 0.6% の SP 細胞の存在が確認された。10,000 個の SP 細胞を分取し、24 well デッシュの 1 well を用いて同じ培養液で培養した。細胞の成長は速やかで、8 日目にコンフルエントに達した。以後、継代を繰替えし現在 17 代目に達して成長をつづけている。一方、羊膜上皮細胞より同様に SP 細胞分画が分取された（1.6%）。この細胞の成長は遅く、異なった細胞集団と考えられる。各種の CD 抗体による免疫染色を行っているところである。

考察と結論：ヒト羊膜細胞には SP 細胞の存在が証明された。CK19（羊膜上皮細胞のマーカー）および vimentin（羊膜間葉細胞マーカー）の共発現する細胞であることが判明した。

羊膜は帝王切開時に提供された胎盤より調整される。従って羊膜細胞の調整は供給面、倫理面からは問題が少ない。また同種移植が可能な細胞であることが証明されていることより、羊膜細胞由来の幹細胞は、再生医療にとって有望な細胞であると同時に将来の羊膜幹細胞バンクシステムの樹立の道を開くものである。

研究課題名：脳神経系の発生・分化機構の解明

研究者・所属：東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野 御子柴克彦

研究要旨：

高次脳機能発現の分子的基盤を明らかにするためには、脳がどのような過程を経て作られるのかについての理解が不可欠である。精子と卵の受精現象に始まり、神経外胚葉の形成、神経板の部位特異化、皮質層構造の形成、神経回路網の形成といったいくつかの決定的な事象の流れのなかで脳神経系は形づくられる。本研究チームではこれらの事象に系統的に取り組み、それぞれの過程で重要な役割を果たす分子群の構造・機能、それらの細胞、組織、個体レベルでの役割を明らかにすることにより、脳神経系に特徴的な多様性と特異性をうみだすメカニズムを明らかにする。

方法：

脳内の神経細胞に位置異常が見られる様々な突然変異マウスを利用し、発生過程で各神経細胞がいかにしてそれぞれ特異的に配置されるのかを分子生物学・細胞生物学・形態学・構造生物学的手法を駆使して明らかにする。

結果：

脳内の神経細胞の位置決定に重要な役割を担う各種分子の解析を、それらの変異マウスを利用して行うとともに、各種分子の構造生物学的なアプローチにより行なっている。変異マウスはリーリン/CR-50 抗原を欠損したリーラーとリーリンシグナルを受ける側の細胞内分子 disabled-1(Dab1)変異マウスで我々の研究室で単離されたヨタリマウスに加え、Cdk5/p35 キナーゼ欠損マウスを主に用いて検討を行なっている。リーリンのリセプターが明らかになってきたが、Dab1 以降のシグナル伝達の機構は不明であり、また Cdk5/p35 の欠損による機能障害の機序もこれまでに明らかにされていない。Cdk5/p35 欠損マウスとリーラー及びヨタリマウスはその皮質構築異常の表現型が類似していることから、Cdk5/p35 がリーリンシグナルの下流にある可能性が指摘されてきた。両者の関係を明らかにするために、p35 とリーリンあるいは Dab1 の両者の欠損したミュータントマウスを作製し解析した。この結果 Cdk5/p35 はリーリンシグナルの下流としては機能しないが、両者は共働的に神経細胞の位置決定に機能していることが明らかとなった。また、我々は構造生物学的アプローチにより、リーリン/CR50 抗原の機能発現の分子機構を検討した。その結果、リーリンはその機能阻害抗体 CR-50 の認識するエpitep部位を介して、その静電的相互作用により homomultimer を形成して、その下流の Dab1 のチロシン残基のリン酸化反応を起こし、以降のリーリンシグナルの伝達過程が進行することを解明し、リーリンの機能が発現されるためにはリーリンの homomultimer 形成が必須であることを明らかにした。我々の作製した CR-50 はこの homomultimer 形成を阻害する事により、リーリンシグナルを遮断し、機能阻害抗体として機能している事が示唆された。

結論及び考察：

今回 Cdk5 の脳の発生・分化での役割を解明してきた。更にリーリンの構造生物学的性質を明らかにした。今後、

a. Cdk5^{-/-}, p35^{-/-}マウス及び *reeler*, *yotari* とこれらの double mutant の神経組織、培養細胞を用いて、Cdk5/p35 キナーゼがどのような蛋白のリン酸化を介して神経細胞の移動・位置決定に重要な役割を果たしているのか、Reelin シグナルとの関連もふまえて明らかにしていく。

b. リーリンの F-spondin 様部位及びリーリンリピート部位について、構造生物学的解析を行ない、リーリンの機能発現の分子機構の詳細をさらに検討する。

研究課題：未分化細胞からの器官形成の制御機構について

研究者： 東京大学大学院総合文化研究科生命環境系 浅島 誠

研究要旨：

1. 序論

脊椎動物の未分化細胞から様々な臓器をつくることは、いろいろな病気治療にも非常に重要なことである。また分化がどのようにしておこるのかについてシグナル伝達機構を明らかにすることは分化メカニズムの上からも大切である。

2. 方法

両生類胚のアニマルキャップ (St. 9) は未分化細胞の塊であり、そこから試験管内で様々な臓器や組織をつくり出すことを私達は独自に開発してきた。その中で、今回はアクチビン処理細胞と未処理細胞を混合することによって新規に軟骨をつくることに成功した。また TGF- β 系のシグナル伝達と Wnt 系のシグナル伝達は細胞分化や器官形成に重要であるので、それらのシグナル分子を two hybrid 法や expression cloning 法などを用いることによって単離することに成功した。

3. 結果

①両生類胚の未分化細胞であるアニマルキャップを切り出して、アクチビン処理細胞と未処理細胞を混合することによって、そこから新しく軟骨をつくり出すことに成功した。この軟骨はアルシアン・ブルーで染まり、またコラーゲン II でもよく染色される。更にグースコイドなどの顎骨に特異的に発現することによっても証明された。また軟骨の塊をアルシアン・ブルーで染めた後、取り出すことも可能となった。

②血球系の分化に対して、アニマルキャップや卵に TPO (トロンボポイエチン) の遺伝子を注入することによって血球が体内に増殖することを示した。

③細胞内情報伝達系では TGF- β 系のシグナル分子としてはアクチビンの type II 受容体に結合する ARIP-1 (activin receptor interacting protein-1) のクローニングとその解析を行った。その結果、このシグナルを特異的に阻害することによって、形態形成の異常が見られた。

④もう1つの細胞内情報伝達系としての Wnt 系では新しく b-カテニンと結合する Duplin 遺伝子のクローニングと解析がなされ、この Duplin 遺伝子は b-カテニンが核に移行し局在するのに必要な遺伝子であることを示した。

4. 考察

今まで未分化細胞であるアニマルキャップについて、アクチビン処理細胞と未処理細胞を混ぜ合わせることによって初めて成功したことは、細胞間の相互作用の重要性を増すものであろう。また血球分化においてもカエルの血球分化はヒトでもマウスでも同じシステムで動いていることを示したものと見えよう。

細胞内情報伝達系についてはいろいろなものが知られているが、特に TGF- β 系のアクチビン受容体と結合して重要な機能をもつ ARIP-1 のクローニングと解析は今後のこの分野に大きな発展をもたらすであろう。また Wnt 系において、b-カテニンの重要性はよく指摘されているが、それがどのようにして細胞質から核に移行するのかについてはよくわからなかったが、そこに介在する Duplin 遺伝子のクローニングと解析がなされた意義は大きいといえる。

5. 結論

①今回未分化細胞のアニマルキャップから初めて軟骨、しかも顎骨をつくることに成功した。

②ヒトやマウスの血球系に関与するトロンボポイエチンがカエルでも血球分化系に関与することを示し、そのメカニズムに迫ることができた。

③TGF- β 系でのアクチビン受容体に関与する ARIP-1 (activin receptor interacting protein-1) をクローニングし、その機能が調べられた。

④Wnt 系において、b-カテニンを細胞質から核に局在させるための Duplin がクローニングされ、その遺伝子発現の重要さと分化との関係が示された。

研究課題名：合成基質を用いた galactosylceramidase (GALC) 活性の測定
研究者・所属：九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
古谷博和（ふるやひろかず）、新納信江、吉良潤一

目的

Krabbe 病 (globoid cell leukodystrophy, GLD) は、galactosylceramidase (GALC) 遺伝子の異常により起こる常染色体劣性の遺伝疾患であるが、GALC のアミノ酸変異や欠損の位置によって完全に臨床型が決定するという特徴がある。

このことから、臨床型、GALC 遺伝子変異と遺伝子発現、酵素活性の違いを調べてゆくことは、詳細な機能の解明されていない GALC と GLD の病態を知る上で有用であると考えられる。

しかし、これまでの GALC 活性測定には、アイソトープラベルした肝臓からの抽出基質を用いる RI 法が用いられており、この方法では基質の供給量と測定可能な施設に制約が生じ、これが GALC の機能解析を行ってゆく上で大きな問題となっていた。

そこで今年度我々は、蛍光標識した人工合成基質を用いることで GALC 活性の測定が可能であること、GLD の診断に問題がないことを示した。

方法

蛍光標識された GALC は O. P. van Diggelen 教授 (University Medical Centre Rotterdam, Netherlands) より供給を受けた。測定方法は、RI 法と同じく、基質に細胞抽出液を加え、一定時間培養後、基質に残った蛍光活性と、遊離した蛍光活性を測定するという方法で行った。

測定するサンプルとしては、乳幼児型および成人型 GLD の患者さんより研究承諾をえて培養した線維芽細胞と、正常コントロールの線維芽細胞を用いた。

これらの線維芽細胞の GALC 活性を、RI を用いたこれまでの方法と、蛍光標識基質を用いた方法とで比較検討した。

結果

蛍光法で測定した、乳幼児型および成人型 GLD の線維芽細胞 GALC 活性は、正常者線維芽細胞に比較して著しく低値をとっていた。また、乳幼児型および成人型との間で、GALC 活性に差は認められず、RI 法と同様の結果であった。

考察

以上の結果より、人工合成基質を用い蛍光法で測定した GALC 活性も、RI 法と同程度の感度を有しており、この方法での GALC 活性測定に支障はないと考えられた。

結論

GALC 活性測定が、人工合成基質を用いた蛍光法で可能となったことは、RI 施設を持たない研究施設でも、多くのサンプルの活性測定が可能になったことを意味しており、今後の GALC 機能解析研究のためにも有用であると考えられる。

ライソゾーム病のマスクリーニングと臨床的検討

清水教一，青木継稔

東邦大学医学部小児科学第二講座

〔目的〕ライソゾーム病は従来治療が極めて困難な疾患であった。しかし近年、骨髄移植や酵素補充療法をはじめとした有効な治療法の開発が進んでいる。早期に診断し治療を開始することにより、生命予後やQOLを改善できる可能性が考えられるようになってきた。そして、早期発見を目的とした本症のスクリーニングの必要性が考えられている。今回筆者らは、ライソゾーム病の臨床統計の結果をもとに、本症のマスクリーニング・システム構築に関する検討を行った。

〔方法〕平成11年度の小児慢性疾患事業などへの「先天性代謝異常」の登録をもとに、ライソゾーム病各疾患における頻度を検討した。そして、比較的頻度の高い疾患に対して診断法および治療法を検討し、マスクリーニング対象疾患となりうるか否かを検討した。

〔結果〕平成11年度の「先天性代謝異常」の全登録者数は、全国84都道府県市にて集計され、6,373人であった。この中におけるライソゾーム病各疾患の症例数と頻度は、Gaucher病30例0.5%、Nieman-Pick病7例0.1%、GM1ガングリオシドーシス4例0.1%、Tay-Sachs病6例0.1%、Krabbe病3例0.0%、異染性白質ジストロフィー12例0.2%、Multiple sulfatase欠損症9例0.1%、Farber病3例0.0%、ムコ多糖症139例2.2%(Hurler症候群9例0.1%、Hurler-Scheie症候群2例0.0%、Scheie症候群1例0.0%、Hunter症候群56例0.9%、Sanfilippo症候群4例0.1%、Morquio症候群3例0.0%、Maroteaux-Lamy症候群2例0.0%、Sly病1例0.0%)、ムコリピドーシス13例0.2%(I-cell病3例0.0%、シアリドーシス1例0.0%)、セロイドリポフチノーシス6例0.1%、Fabry病9例0.1%であった。

〔考察および結論〕上記した各疾患のうち比較的頻度が高く(0.1%以上)、かつ治療が可能となりうる疾患としては、ムコ多糖症、Gaucher病、異染性白質ジストロフィー、Fabry病、Tay-Sachs病、Nieman-Pick病およびGM1ガングリオシドーシスなどがあげられる。これらの疾患に対し、尿あるいは濾紙血を用いたスクリーニング法を検討していく必要があると考えられた。現時点においては、Tay-Sachs病、GM1ガングリオシドーシス、ムコ多糖症および異染性白質ジストロフィーなどがスクリーニング対象疾患の候補疾患になりうると思われた。

研究課題名：神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中中枢神経病変に対する細胞治療法の基礎的研究

研究者・所属：国立成育医療センター遺伝診療科 福原康之、小須賀基通、奥山虎之

序論:

多くのライソゾーム病は中枢神経病変を伴う。最近、神経幹細胞の脳内移植による中枢神経病変に対する細胞治療法の開発が検討されている。この治療法が有効となるためには、正常ドナー細胞から分泌される欠損酵素が周囲のレシピエント神経細胞に効率よくとりこまれ多くのレシピエント細胞が機能的に正常化する必要がある。今回、ライソゾーム酵素のドナー・レシピエントにおける細胞間輸送の可能性を検討した。

方法:

受精後 14 日目の正常 B6 マウス胎児脳の線状体からニューロスフェア法により神経幹細胞を分離し、神経幹細胞および培地における β -glucuronidase (GUSB) の活性値を測定した。ムコ多糖症 VII 型 (MPSVII) マウス由来の線維芽細胞である 3521 細胞を 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用した培地のみを加え、もう一方には培地と 1mM のマンノース 6 リン(M6P)酸を加え、培養した。24 時間後、各群の 3521 細胞の GUSB 活性を比較した。さらに同様の実験を、C3H マウス神経およびグリア細胞に対して行い、培地から神経細胞内に取り込まれた B6 マウス神経幹細胞由来の GUSB 活性のみを測定した。

結果:

神経幹細胞の内因性活性は 647 ± 240 U/mg protein で、培地中に 35 ± 18 U/mg protein の GUSB の分泌が確認された。神経幹細胞由来の GUSB を含む培地を、3521 細胞に添加したところ、24 時間でその 17.6% が取り込まれた。C3H マウス由来の GUSB は加熱により不活化されるが、B6 マウス由来の GUSB はほとんど不活化されない。この特性を利用し、神経幹細胞から分化させた C3H マウス神経・グリア細胞への取り込みを観察した。その結果、添加した GUSB の 21.9% の取り込みが観察された。また、上記の実験を 10mM M6P の存在下で行うと、取り込み率は 3521 細胞で 2.8%、C3H 神経・グリア細胞で 11.8 % まで低下した。

考察:

上記の成績から M6P 受容体を介する GUSB の細胞間輸送が、ドナー神経幹細胞とレシピエントの脳内細胞の間で成立しうることが示唆された。この結果に基づき、MPSVII モデルマウスを用いた中枢神経病変に対する神経幹細胞移植療法の可能性を現在検討中である。

結論:

M6P 受容体を介する GUSB の細胞間輸送が、ドナー神経幹細胞とレシピエントの脳内細胞の間で成立しうることが示唆された。

研究課題：構造学的視点からの Tay-Sachs 病の病態解析

研究者、所属：(財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所
臨床遺伝学研究部門 桜庭 均

研究要旨：

[序論]

Tay-Sachs 病は、ヘキササミニダーゼのアルファサブユニットの異常による遺伝病である。責任蛋白質の構造面から本症の病態解明を試みた。

[方法]

Protein Data Bank に登録されている細菌由来のヘキササミニダーゼおよびキトビアーゼの構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により、ヒト由来ヘキササミニダーゼのアルファサブユニットの3次元構造を構築し、本症の病因となる9種類の遺伝子変異によって生じる構造変化を解析した。

[結果]

野生型 α -サブユニットは、逆平行ベータシート構造をとる第1ドメインと活性ポケットを含む(ベータ/アルファ) β -バレル構造をとる第2ドメインから成る。今回の解析対象とした9種類の変異は5群に分類された。第1群(R178H)は活性部位近傍にあり、活性関連領域の立体構造に変化を来たした。第2群(W420C、C458Y)は活性ポケット内に位置するが、変異の位置は活性部位から遠く、当該部位の周辺に大きな構造変化が生じた。第3群(R504C/H)は第2ドメインの extra helix にあり、分子表面に構造変化を起こした。一方、第4群(R499C/H)も extra helix 上に位置するが、分子内部における構造変化が予想された。第5群(R170W、L484)は、ドメイン2上の、ドメイン1に面する領域にあり、両ドメインの構造に大きな変化を起こすことが予測された。

[考察]

第1群は、活性部位に限局した変化が予想された。実際に、本変異は B1 異型にみられ、本変異を持つ患者細胞中の酵素の Km 値は対照の30倍の値を示した。第2群では、大きな構造変化のため、安定性が失われて酵素の過剰分解が起こると考えられた。

第3群では、ベータサブユニットとの結合能が失われることが知られており、この領域の分子表面はベータサブユニットとの結合に重要と考えられる。第4群では、生合成された変異アルファサブユニットが小胞体に止まることが知られており、この領域は細胞内輸送に関連する可能性がある。第5群ではドメイン1と2の両方に構造変化が生じて、安定性低下が起こると考えられた。

[結論]

構造学的視点からの Tay-Sachs 病の解析情報は、本症の病態解明に有用と考えられた。

研究課題名：Danon 病における自己貪食空胞の筋病理学的検討

研究者・所属：国立精神・神経センター神経研究所

西野一三、○杉江和馬、壘中征哉

研究要旨

序論

Danon 病は、リソソーム膜蛋白 LAMP-2 の原発性欠損症で、主に致死性心筋症とミオパチー、知的遅滞を X 連鎖性優性遺伝疾患である。筋病理学的には、筋線維内に多数認める自己貪食空胞が特徴である。しかし、その空胞の形成機序は全く不明で、この空胞形成の病態解明を目指し解析した。

方法

対象は、LAMP-2 変異を認めた Danon 病 8 家系 10 人の男性患者。全例で筋生検が施行されうち 1 例で 2 回生検されている。全患者で筋病理学的に検討した。

結果

筋線維内に多数の好塩基性小空胞を認め、空胞は大半が細胞内深部に散在し、球あるいは楕円球型の完結した形態であった。空胞壁では AChE や nonspecific esterase 活性を認めるが、 α -bungarotoxin は陰性、さらに dystrophin など筋鞘膜特異蛋白が存在し、perlecan など細胞外マトリックス構成蛋白も認めた。リソソーム膜蛋白 limp-1 と dystrophin の二重染色では、空胞壁で dystrophin を発現する空胞と発現しない空胞の 2 種類を認めた。dystrophin で囲まれた自己貪食空胞は加齢で増加したが、limp-1 を過剰発現した筋線維は加齢による増加は認めなかった。電顕的には細胞質崩壊産物を含む自己貪食空胞であり、この集合体を基底膜構造を持つ二重膜で囲まれる空胞と囲まれていない空胞を認め、免疫電顕で二重膜は dystrophin を発現していた。

考察

Danon 病で認める自己貪食空胞の壁は、筋細胞膜の性質を有していた。しかし空胞壁は AChE を発現するも神経筋接合部の機能はないことから筋細胞膜とは異なる発生と考えられた。また dystrophin で囲まれた空胞は加齢とともに形成されることを明らかにしたが、低年齢でも既に認める limp-1 を過剰発現した筋線維の存在が primary な変化と考えられた。今回の検討から、この特異な空胞は、従来提唱されてきた形質膜の陥入によりも、膜癒合に関連する LAMP-1 と相補的に働く LAMP-2 の欠損のため exocytosis できず limp-1 を過剰発現した自己貪食空胞の周囲に新たに形質膜が生じて形成された可能性が推測された。

結論

Danon 病で認められる空胞の壁は、筋細胞膜の性質を有しており、自己貪食空胞の周囲に何らかの機序で形質膜が形成されたと推測され、空胞は蓄積性の変化と考えられた。