

D. 考察

Fabry 病は白人男性で 4000 人に一人の割合で見られる比較的頻度の高い先天性代謝疾患で、心不全、腎不全等を引き起こし、何も治療を施さない場合 40 代から 50 代で死亡すると言われている。治療法としては対症療法しか無く、根本治療が期待されている。米国において α -Gal A を経静脈的に投与する酵素補充療法のトライアルが行われ、 α -Gal A の発現と Gb3 の各臓器での蓄積の抑制が認められたが、長期に渡る α -Gal A 投与が必要であるため患者に大きな金銭的負担が生じる。また治療の評価方法が、患者の痛みの軽減度合い、病理的な改善スコアでの判断など、やや客観性に欠けるものであった。我々の Fabry マウスでの実験結果では、安全性に優れ、非分裂細胞にも導入できる AAV ベクターを筋肉に一回導入することにより長期的な α -Gal A の発現と Gb3 の各臓器での蓄積を確認できた。さらに心臓超音波検査を用いることにより、客観的データによる治療の効果判定ができた。今回の結果はヒトの Fabry 病の根本治療にも十分応用出来るものと確信した。

E. 結論

Fabry 病の治療方法として、AAV ベクターを筋肉組織へ導入する方法は十分に臨床応用が可能なものであることを、マウス動物実験にて確認した。今後治療の効果、安全性について、さらなる長期間にわたる観察をする必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13777-82.

2. 学会発表

1) H.Takahashi, Y.Hirai, Y.Seino, H.Sakuraba, R.Kase, Y.Hashimoto, T.Shimada. :

Adeno-associated Virus Vector Mediated Muscle Directed Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease

ASGT (American Society of Gene Therapy) ,Boston, 2002.6

2) H.Takahashi, Y.Hirai, Y.Seino, Y.Hashimoto, H.Sakuraba, T.Shimada. :

Development of AAV vector mediated enzyme replacement therapy for Fabry disease: echocardiographic evaluation of gene therapy of Fabry mice

日本遺伝子治療学会（東京）2002.7

3) 高橋啓, 平井幸彦, 清野精彦, 橋本康弘, 桜庭均, 島田隆 :

Adeno-associated Virus Vector Mediated Muscle Directed Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease

生化学会（京都）2002.10

4) 高橋啓, 平井幸彦, 清野精彦, 橋本康弘, 桜庭均, 島田隆 :

Fabry 病遺伝子治療の検討 : 心臓超音波検査、組織学的評価による治療効果の判定

先天代謝異常学会（神戸）2002.11

5) H.Takahashi, Y.Hirai, Y.Seino,
Y.Hashimoto, H.Sakuraba, T.Shimada.

AAV Vector-mediated Muscle Directed
Gene Therapy Results in Long-term
Enzymatic and Functional Correction in
Cardio-vascular System of Fabry Mouse.

American Heart Association, Chicago
2002.11

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：

日本人若年型 acid maltase 欠損症の高頻度遺伝子変異及び新規遺伝子変異の同定

分担研究者 辻野 精一

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部室長

協力研究者 金澤 直美

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部

研究要旨

Acid maltase (AM)の欠損症(AMD)はライソゾーム中にグリコーゲンが蓄積するライソゾーム病であり糖原病 II 型とも名付けられている。臨床的に心筋症、肝腫大も伴い重篤な乳児型と、ほぼ骨格筋症状のみを呈する若年型および成人型に分類される。今回6例の日本人若年型 AMD 症例について遺伝子解析を行い、3種の新規遺伝子変異と、新たに高頻度と考えられた遺伝子変異を見いだした。

A. 研究目的

AMD 症例の遺伝子異常の解明は日本人症例においては今だ十分になされているとは言えない。正確かつ簡便な遺伝子診断法を確立するためにも、今回日本人若年型症例に関し遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

生検骨格筋等において AM 酵素活性の著明な低下を示した若年型の6例（内2組の姉妹を含む）よりインフォームドコンセントを得た後、末梢白血球から DNA を抽出し、AM 遺伝子の各エクソンごとに増幅する PCR を行い直接塩基配列を決定した。または培養線維芽細胞より RNA を抽出し RT-PCR で増幅した cDNA の塩基配列を決定した。同定されたそれ

ぞれの変異を確認し、スクリーニングするために PCR-RFLP 法を用いた。研究に当たりヒト遺伝子解析に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究成果

一組の姉妹例および別の家系の1例において AM 遺伝子のエクソン 13 にミスセンス変異 S619R を同定した。この変異が制限酵素 *Ava* II 部位を創出することを利用した PCR-RFLP によっても確認され、この3症例ともにこの変異のホモ接合体であった。また姉妹例の両親および兄はヘテロ接合体であった。過去に蓄積された AMD 症例の DNA サンプルをこの PCR-RFLP によりスクリーニングしたところ、若年型1例と成人型1例の片方の

アレルに認めた。当所で検索した遺伝子頻度は 22 家系例中 4 家系 (アレルで 13.6%)、若年型に限れば 10 家系例中 3 家系 (アレルで 25.0%) であった。別の姉妹例の片側のアレルにおいてエキソン 16 に新規ナンセンス変異 Q776X を認め、もう一方のアレルにはエキソン 8 に新規ミスセンス変異 R437C を認めた。Q776X が制限酵素 *Acc I* 部位を創出することを利用した PCR-RFLP でもこの変異のヘテロ接合体であることを確認した。別の症例の片側のアレルにおいてエキソン 8 に新規ミスセンス変異 M439K を認めた。この変異が mismatch primer-PCR と制限酵素 *BspHI* を用いた RFLP によっても確認された。Q776X と M439K は他の 21 家系の AMD 症例 DNA には検出されなかった。

D. 考察

日本人若年型 AMD 症例に 3 つの新規遺伝子変異を同定した。また以前、日本人症例に 4 種類の高頻度変異 (S529V、R600C、D645E、R672Q) を報告しているが、今回新たに S619R が比較的高頻度に認められることを見いだした。またこの変異のホモ接合体は若年型になるようであった。既報と合わせると 22 家系中 16 家系はこの 5 種の内のいずれかの変異を少なくとも一方のアレルに有していた。これら 5 種類の遺伝子変異をスクリーニングすることにより日本人でも遺伝子診断が可能な患者は少なくないと考えられた。

E. 結論

日本人若年型 AMD 症例に新規遺伝子変異 Q776X、R437C および M439K を同定し、S619R が高頻度遺伝子変異であることを見いだした。

G. 研究発表

1. 学会発表

Tsujino S, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Plotz P, Raben N: Efficiency of different serotypes of adeno-associated virus vector for delivering the acid maltase (AM) gene into AM knockout mice. Xth International Congress on Neuromuscular Disease, Vancouver, Canada, 7. 10, 2002

辻野精一、水上浩明、小澤敬也、村松慎一、Nina Raben

異なる serotype の AAV ベクターによる acid maltase 遺伝子導入の比較検討
第 43 回日本神経学会総会 平成 14 年
5 月 31 日 札幌

金澤直美、宮本健、山田穰、酒井規夫、乾幸治、萩原綱一、川本未知、幸原伸夫、杉江秀夫、坂井文彦、辻野精一

日本人若年型 acid maltase 欠損症の高頻度遺伝子変異 S619R 及び新規遺伝子変異 Q776X, M439K

第 45 回日本先天代謝異常学会
平成 14 年 11 月 8 日 神戸

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ケミカルシャペロン療法実施のためのβ-ガラクトシドーシス
細胞スクリーニング

分担研究者 鈴木義之 国際医療福祉大学教授

研究要旨

β-ガラクトシダーゼ欠損症（β-ガラクトシドーシス）患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体 NOEV の活性還元効果スクリーニングを行った。β-ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞 27 種の細胞株の中で、8 種に有意の活性上昇を認めた。R201C、R457Q 変異にとくに著しい効果があった。

A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病に対する内服薬による新しい分子治療法を確立することを目的に、本研究ではβ-ガラクトシダーゼ欠損症（β-ガラクトシドーシス）患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体の活性還元効果スクリーニングを行った。

B. 研究方法

まず正常細胞の酵素抽出液を用い、新しく有機合成により得られた化合物 N-octyl-4-epi-β-valienamine（以下 NOEV）の阻害活性を試験管内で測定した。つぎに正常および病的対照、β-ガラクトシドーシスなどの国内外から提供いただいた患者由来の線維芽細胞の培養液に NOEV を添加し、活性還元最適濃度を確認した。β-ガラクトシダーゼ活性測定には蛍光人工基質 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside を用いた。

C. 研究結果

試験管内実験では NOEV の IC₅₀ は 0.125 μM であった。次にβ-ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞の実験を行った。培養液中に 0.2-2 μM

の NOEV を添加することにより、GM1-ガングリオシドーシス若年型細胞（変異 R201C）で 3-7 倍の酵素活性を認めた。この現象には変異特異性があり、R201C のほかに R457Q の変異で活性上昇を認めた。これまで検討した 27 種の細胞株の中で、8 種に有意の活性上昇を認めた。うち GM1-ガングリオシドーシス若年型ではすべての例が（5/5）、乳児型で約 3 割の例で活性上昇を認めた。

D. 考察

新しく合成した低分子化合物 NOEV が、特定の変異遺伝子を持つβ-ガラクトシドーシス患者由来の線維芽細胞内で酵素活性を上昇させることを確認した。α-ガラクトシダーゼ変異に有効な 1-デオキシガラクトノジリマイシンのβ-ガラクトシダーゼに対する活性還元効果は NOEV の 1/100-200 程度であり（IC₅₀ : 25 μM）、この新しい化合物が特定の変異細胞・個体に対して治療薬として使える可能性のあることがわかった。細胞実験に用いた細胞株は引き続いて変異解析を行っており、今後この化合物の変異特異的活性を明らかにしていく。

E. 結論

NOEV は特定の変異遺伝子を持つ β -ガラクトシドーシス患者由来の線維芽細胞内で酵素活性の復元に有効であった。現在のところ R201C、R457Q の変異で酵素活性の復元効果を認めている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

学会発表

岩崎博之、一ノ宮悟史、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之： β -ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞に対する新しい酵素阻害剤 GalX による細胞内活性復元効果のスクリーニング、第 45 回日本先天代謝異常学会 2002 年 11 月 8 日 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 構造特許：カルバ糖アミン誘導体

出願日：平成 13 年 (2001)

9 月 7 日

発明者：小川 誠一郎、鈴木 義之

要約： β -ガラクトシダーゼ阻害活性を有する擬似糖

2) 用途特許：糖脂質代謝異常症治療剤

出願日：平成 13 年 (2001)

9 月 7 日

発明者：鈴木 義之、難波 栄二

要約：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

厚生労働科学研究費補助金（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

分担研究者 難波栄二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

私は中枢神経障害を呈するライソゾーム病である G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法（ケミカルシャペロン法）の研究を進めている。本年度は、特に日本人の代表的な変異である R201C 異常をもつ細胞株について、より低濃度で効果のある新しい化合物（GalX）の効果の検討を詳細に行った。その結果、GalX は 0.4 μM の濃度で最も有効であり、投与 4 日から 8 日でもっとも大きな酵素活性の上昇が見られた。投与中止後、4 日で効果が半減し、8 日で効果がみられなくなった。この細胞株にガングリオシドを負荷した条件下で、GalX の効果を検討したところ、ガングリオシドの蓄積が減少する傾向がみられた。GalX は R201C 変異患者に有効な治療薬になると考えられた。

A. 研究目的

現在ライソゾーム病に対しては酵素補充療法が開発され、遺伝子治療の研究が進められているが、中枢神経障害の治療は困難である。我々は、ファブリー病で開発された新しい治療法（ケミカルシャペロン法）（J.Q.Fan, et al. Nature Med 5,112(1999)）の原理を用いて中枢神経障害を呈する G_{M1}-ガングリオシドーシスの治療法の開発を進めている。昨年までに、低分子物質、1-deoxygalactonojirimycin、N-(n-butyl)-deoxy-galactonojirimycin が中枢神経障害を伴う遺伝子変異に有効であることが明らかになっている（L.Tominaga, et al. Brain Dev.23,284 (2001)）。さらに、低濃度で有効である GalX が開発されてきた。今回は、GalX の効果を日本人の代表的な変異の一つである R201C 変異を中心に研究した。

B. 研究方法

材料：低分子化合物
酵素活性を上昇させると期待される、ガラクトース類似体は次の 3 種類、1-deoxy-galactonojirimycin(DGJ)、N-(n-butyl)-deoxy-galactonojirimycin(NB-DGJ)、β-galactosidase inhibitor (NOEV)（通称 GalX）を用いた。

細胞株

ノックアウトマウス由来の細胞をもとに、ヒトの 12 種類の変異β-ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、確立した細胞株を用いた。

方法

1.細胞株β-galactosidase に対する阻害活性の測定

6 種類の細胞培養上清を透析、濃縮して、DGJ、GalX に対する試験管内 50%阻害濃度（IC₅₀）の測定を行った。酵素活性

の測定は 4MU 人工基質を用いた。

2.細胞株に対する低分子化合物の効果

6 種類の細胞を用い、 $0.2\mu\text{M}$ GalX をそれぞれ 4 日間負荷し、細胞内 β -galactosidase を測定した。

3.細胞株に対する GalX 至適濃度の測定

4、8、 $16\mu\text{M}$ GalX を 4 日間細胞に負荷し、細胞内 β -galactosidase を測定した。

4.若年型 R201C 細胞株における GalX 投与期間における効果

$0.2\mu\text{M}$ GalX を若年型 R201C 細胞株に 8 日間投与し、その後、培養液中から GalX を除きさらに 8 日間の間の酵素活性を 4 日ごとに、合計 16 日間検討した。

5.G_{M1}-ガングリオシドの蓄積の検討

細胞株 R201C を用い、2 日間 0.1mg/ml のガングリオシドをローディングし、その後 4 日間 $0.2\mu\text{M}$ GalX を負荷し、FITC ラベルコレラ毒素 B サブユニット (CTB) を用いて染色した。

C. 研究結果

GalX のベータガラクトシダーゼ酵素に対する IC_{50} を検討した結果、正常酵素 $0.21\mu\text{M}$ 、若年型 R201C 変異 $0.24\mu\text{M}$ 、成人型 R457Q 変異 $0.15\mu\text{M}$ 、成人型 I51T 変異 $0.71\mu\text{M}$ 、に対してモルキオ BY83H と

W273L 変異では $4\mu\text{M}$ 以上と高い IC_{50} であった。つまり中枢神経障害を伴わない、モルキオ B 病の変異酵素よりも、若年型、成人型 G_{M1}-ガングリオシドーシスの変異酵素に対してより低濃度で阻害活性を示した。次に、培養細胞株における GalX の至適濃度を検討したところ、R201 変異 $0.4\mu\text{M}$ 、R457Q 変異 $1.6\mu\text{M}$ 、に対して、W273L 変異では $16\mu\text{M}$ 以上となった。細胞株 6 種類に対する 3 種類の低分子化合物を用いた検討では、GalX は $0.2\mu\text{M}$ と最も低濃度で効果を示した (表)。さらに、細胞株 R201C の GalX の投与期間における検討では、投与 4 日目で最大の効果得られ、その後 8 日まで同じ効果が持続した。GalX を除くと 4 日目で効果が半減し、8 日で効果がなくなり、酵素活性が低下した。細胞株 R201C を用いた G_{M1}-ガングリオシド蓄積の検討では GalX の負荷により蓄積が減少する傾向がみられた。

D. 考察

今回検討を行った GalX は、特に R201C 変異において低濃度で効果を示し、新しい治療薬として有望であると考えられた。最大の効果を得るのに、投与後 4 日間が必要であった。ガングリオシドの蓄積が減少する効果が確認でき、GalX で上昇した酵素活性は細胞で有効に働いていると考えられた。今後さらに神経細胞を含め細胞レベルでの研究に加えて、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。

E. 結論

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の検討を行った。0.2 μM GalX を用いて若年型 R201C 変異の酵素活性を細胞レベルで 5 倍上昇させることができた。さらに、蓄積物質 G_{M1}-ガングリオシドの減少がみられ、治療薬として、有効であると考えられた。

F. 健康危険情報
特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S. Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology* 58:811-813, 2002

Saito Y, Suuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E ε4 homozygosity. *Ann Neurol.* 52:351-355. 2002

2. 学会発表

高浦奈津子、田中あけみ、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之、山野恒一. GM1-ガングリオシドーシスモデル新生仔を用いた経静脈的遺伝子導入による中枢神経への治療効果 第 44 回 日本小児神経学会総会（仙台） 2002 年 6 月 27 日-29 日

小倉加恵子、前垣義弘、赤星進二郎、岡明、難波栄二、大野耕策

進行性ミオクローヌステんかんを呈した Gaucher 病の 1 例 第 45 回 日本先天代謝異常学界総会（神戸）2002 年 11 月 7 日-9 日

小川由美、高村歩美、富永里香、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之
GM1-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法の開発—新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法— 第 45 回 日本先天代謝異常学界総会（神戸）2002 年 11 月 7 日-9 日

岩崎博之、一ノ宮悟史、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之
β-ガラクトシドーシス患者由来繊維芽細胞に対する新しいガラクトース誘導体による細胞内活性還元効果のスクリーニング 第 45 回 日本先天代謝異常学界総会（神戸）2002 年 11 月 7 日-9 日

大島章弘、山本美江、野口章、鈴木治、松田潤一郎、富永里香、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之
GM1-ガングリオシドーシス—疾患モデルマウスへの低分子化合物投与による治療効果の検討— 第 45 回 日本先天代謝異常学界総会（神戸）2002 年 11 月 7 日-9 日

高村歩美、小川由美、富永里香、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之
GM1-ガングリオシドーシスに対する治療法の開発：新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法 第 8 回 日本リゾソーム研究会（東京）2002 年 11 月 21 日-22 日

表

Phenotype	Cell line	Addition			
		None	DGJ (Increase)	NB-DGJ (Increase)	NOEV (Increase)
Normal	GP8	67.6	112.9 (1.7)	94.5 (1.4)	78.9 (1.2)
Juvenile G _{M1}	R201C	22.9	131.9 (5.8)	113.5 (5.0)	116.3 (5.1)
Adult G _{M1}	R201H	19.1	34.2 (1.8)	52.7 (2.8)	86.0 (4.5)
	R457Q	19.1	34.2 (1.8)	52.7 (2.8)	86.0 (4.5)
Morquio B	W273L	8.1	11.3 (1.4)	11.0 (1.4)	17.7 (2.2)
	Y83H	10.1	17.1 (1.7)	12.4 (1.2)	20.2 (2.0)

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はライソゾーム内加水分解酵素の欠損によるもの、ライソゾーム内蛋白質をターゲティングする機能の異常とライソゾーム膜蛋白質に関連し、ライソゾーム内外の輸送の欠陥による疾患が存在する。ライソゾーム内酵素欠損症の治療には酵素補充療法が開発・実施されているが、中枢神経系の治療には有効ではない。また、酵素欠損以外の疾患への有効な治療法はない。本分担研究は、治療法のないこれらグループの中枢神経系の治療法の開発を目指す。初年度、ライソゾーム病の酵素の低分子基質類似体を用いて、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した。今年度、この化合物によって変異酵素が活性化される過程には、変異酵素が確かに、ライソゾームに移行することを明らかにし、動物での治療実験の準備をしている。また、ライソゾームからその他の細胞膜器官への小胞輸送に参与する NPC1 蛋白質の欠陥によるニーマン・ピック病 C 型では、アルツハイマー病と同様の神経原繊維性変化がアポ E の遺伝子型が $\epsilon 4$ の homozygous な場合にみられることを明らかにした。

A. 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が、一部は、ライソゾーム内への酵素蛋白質のソーティング異常、ライソゾームからの脂質輸送小胞の欠陥による場合がある。酵素欠損による場合は、酵素補充療法の開発によって、治療の期待が高くなってきたが、中枢神経障害への効果は十分ではない。

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ャペロン療法と命名している。

この理論にたつて、昨年度、鈴木義之博士との共同で、 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。今年度この阻害剤の臨床応用を目指し、さらに基礎的実験を行った。

また、ニーマン・ピック病 C 型はライソゾームからの脂質小胞輸送に参与する分子の欠陥でおこり、プルキンエ細胞、視床神経細胞の脱落、meganeurite の形成、spheroid 形成、アルツハイマー病と類似の神経原繊維性変化を示す。これらの病変形成の背景を明らかにすることで、治療法の開発を目指す。今年度、ニーマン・ピック病 C 型患者の若年者で神経原線維性変化をきたすものは、アポ E の遺伝子型が $\epsilon 4/\epsilon 4$ を示すことを明らかにした。

B. 研究方法

培養中の細胞へ阻害剤（グルコース類似体、GlcX）を添加によって、酵素活性が上昇した変異酵素蛋白質の細胞内分布を、免疫組織化学、細胞内小器官分画後、酵素蛋白質の抗体を用いて検討した。

ニーマン・ピック病C型患者剖検脳で、神経原線維性変化を示す例を解析し、ApoEの遺伝子型を検索した。

C. 研究結果

1) F2134I 変異 β グルコシダーゼのリソゾーム内蛋白質の GlcX による上昇

昨年度、GlcX は F213I 変異を持つ β グルコシダーゼの活性を 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。この F213I 変異を持つ細胞は通常の培養では、酵素蛋白質が検出されるが、GlcX の添加で、酵素蛋白質が正常レベル近くまで上昇した。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。

今年度、F213I 変異を持つ細胞を GlcX 存在下、非存在下で培養し、細胞小器官を分画し、 β グルコシダーゼの抗体を用いて、酵素蛋白質量を検討した結果、GlcX 存在下で培養した細胞は、リソゾーム分画の蛋白質量が増加することを確認した。また、免疫組織化学的に、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、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。

2) ニーマン・ピック病C型若年者で、神経原線維性変化が出現する遺伝的背景

ニーマン・ピック病C型の若年・成人例のほとんどでアルツハイマー病にみられるのと同様に神経原線維性変化がみられる。この背景を明らかにする目的で9例のニーマン・ピック病C型（1歳～55歳）の剖検脳を検索した。この結果、31歳、32歳、37歳の3人に、神経原線維性変化とアミロイド β 蛋白質の蓄積を認めた。対象では42歳以下にこのような変化を認めなかった。これら7人でアポリポ蛋白質の遺伝型を検討したところ、この3人がアポe4アリルをホモに持っていた。

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 は GlcX によって安定化され、活性を上昇させるが、この理由は、リソゾーム内の酵素蛋白質の量を増加させることによることを明らかにした。F213I 変異はIII型の臨床症状の原因遺伝子変異である。ニーマン・ピック病C型でアルツハイマー病と同じ神経原線維性変化が形成される背景には、アルツハイマー病の危険因子である ApoE の遺伝子型が関与している。

E. 結論

GlcX は低分子で、血液脳関門を通過できると考えており、F213I を持つ患者の神経症状に有効な治療法とできる可能性があり、今後、GlcX 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。

F. 健康危険情報 なし

G. 文発表

1) 学会発表

二宮治明、大野耕策。シンポジウム「リソソーム病の分子病態解明と治療法開発- ニーマン・ピック病C型の分子病態」第75回日本生化学会大会、平成14年10月14-17日、京都

2) 論文発表

Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Maruyama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid b deposition associated with APOE e4 hmomozygosity. *Ann Neurol* 52: 351-355,

H. 知的所有権の取得状況 なし

リソソーム病における骨病変と骨代謝マーカーに関する研究

（分担）研究者 乾 幸治 大阪大学大学院医学系研究科 小児発達医学講座

研究要旨

リソソーム病のうちムコ多糖症の dysostosis multiplex（多発性骨形成不全症）をはじめとして多くの病態において骨の形態異常を呈するものがあるが、その発症機序の詳細は不明である。今年度はムコ多糖症、I-cell 病、Gaucher 病、Farber 病患者における骨密度、骨代謝マーカーを検索し、骨密度の低下と骨代謝マーカーの統計をとった。

A. 研究目的

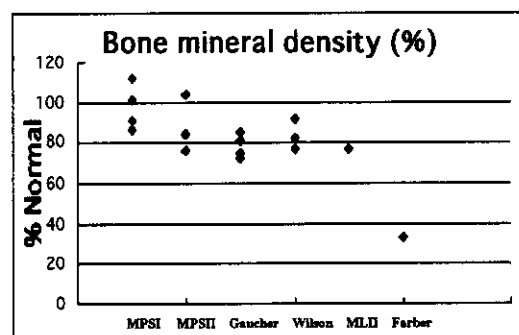
リソソーム病の病態解明の一端として骨病変の程度とその病因を探ることは、中枢神経病変の病因を調べることに並んで重要な課題である。ムコ多糖症における多発性骨形成不全症としての側彎症は患者の QOL にとって重要な症状であり、Gaucher 病 I 型における骨壊死をはじめとする骨病変は酵素補充療法によっても必ずしも効果が十分でない病態であり、この病因を調べることは酵素補充療法、骨髄移植、遺伝子治療などをはじめとする将来的な治療法にとってその効果判定において重要なパラメーターとなりうるものである。そこでリソソーム疾患における骨密度を測定し、骨代謝マーカーとして骨粗鬆症などでよく使われる検査項目について統計をとることを目的とした。

B. 研究方法

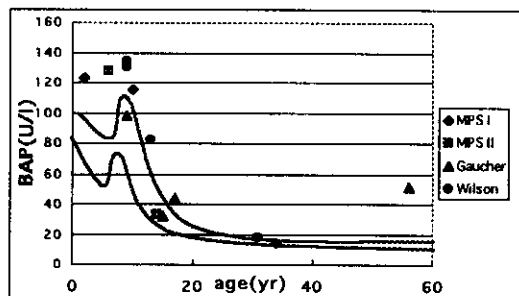
対象とした疾患はムコ多糖症 I 型 3 例、ムコ多糖症 II 型 3 例、I-cell 病 1 例、Gaucher 病 I 型 4 例、Farber 病 1 例であり、また対照として銅代謝疾患である Wilson 病 5 例においても、骨密度を測定した。骨密度は DEXA 法で腰椎、全身骨で評価した。また各患者において血液および尿中骨マーカーを調べた。骨吸収マーカーとして ICTP (I 型コラーゲン C-テロペプチド)、尿中デオキシピリノジン、尿中 NTx (I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド)、骨形成マーカーとして骨型 ALP(BAP)、オステオカルシン(OC)を調べた。

C. 研究結果

図1 骨密度



BAP



OC

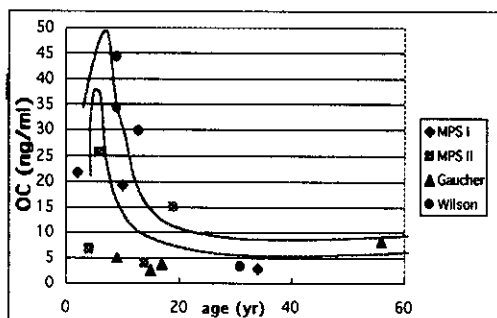


図2 骨形成マーカー

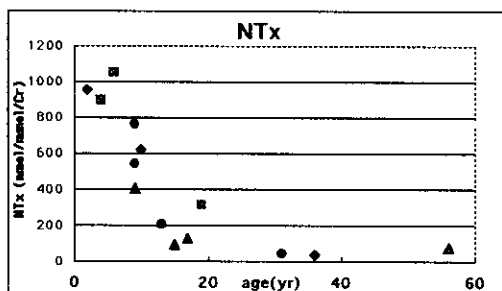
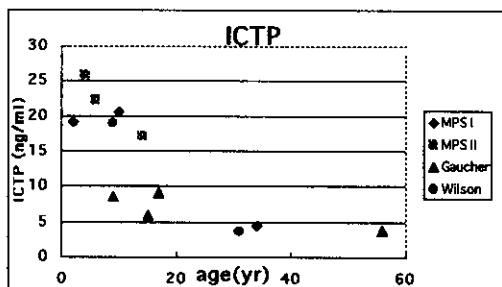


図3 骨吸収マーカー

骨密度に関しては Gaucher 病で軽度の低下、Farber 病で高度の低下を認めた。

骨代謝マーカーに関しては、正常値も幅があり、一定の傾向は明らかには認めなかった。

D. 考察

骨密度に関しては疾患とは別に年齢的なも

のを考慮しなければならず、評価は難しいが、正常の75%以下であったのは Farber 病の1例であった。骨代謝マーカーは正常値の幅もあり、疾患のデータももう少し症例数を増やして検討する必要があるが、Gaucher 病では形成マーカー、吸収マーカーとも比較的低値を取る傾向がうかがわれた。

E. 結論

リソソーム病において骨病変が明らかなものにおいては骨密度が低下しているものも認められ、なんらかの骨代謝異常が疑われるが、今後症例を増やし、経過を追うことにより評価をしていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muramatsu T, Sakai N, Yanagihara I, Inui K, Mutatinal analysis of the acid ceramidase genen in the Japanese patients with Farber lipogranulomatosis, *J Inherit Meta Dis* (in press)
- 2) Akagi M, Inui K, Tsukamoto H, Sakai N, Muramatsu T, Yamada M, Matsuzaki K, Goto Y, Nonaka I, Okada S. A point mutation of mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh syndrome., *Neuromuscul Disord.* 2002 Jan;12(1):53-5.

2. 学会発表

第45回日本先天代謝異常学会; 酒井規夫、ムコ多糖症における骨病変と骨代謝マーカー

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

Schindler/Kanzaki 病の病態解明に関する研究

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

Schindler/Kanzaki 病は、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (α -NAGA) の活性低下を伴う遺伝病である。本症では、遺伝型/生化学的表現型と臨床表現型との間に著しい paradox がみられると共に、当該酵素活性低下から推定される蓄積物質と尿中に排泄される主な物質とが異なっている。本症の病態を明らかにするため、構造学および細胞化学的解析を行った。Kanzaki 病でみられる R329Q/W による α -NAGA の 3 次元構造変化は、Schindler 病でみられる E325K による変化よりも大きく、構造学的解析結果は生化学的解析結果とよく対応した。後者でみられる重度の神経障害は、 α -NAGA 活性低下以外の因子による可能性が考えられた。また、Kanzaki 病患者由来の培養皮膚繊維芽細胞を試料とした化学分析の結果、細胞内に蓄積する主な物質は、 α -NAGA の基質であることが明らかになった。

A. 研究背景と目的

Schindler/Kanzaki 病は、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (α -NAGA) の活性低下と尿中に O 結合型糖鎖のオリゴ糖の排泄増加がみられる常染色体劣性遺伝病である。本症は、リソソーム病の中では、最も新しく概念が確立した疾患であるが、同時に最も「謎」が多い疾患として注目されている。

本症発見の切掛けとなった Schindler 病のドイツ人兄弟例は、生後 8-12 カ月で発症して急激に重い脳障害が進行し、8-9 歳時に植物状態に陥った。これらの症例では、病理学的に infantile neuroaxonal dystrophy の所見を示している。一方、Kanzaki 病として、最初に報告された日本人症例は、成人期に皮膚の小血管腫で発症し、粗な顔貌とごく軽度の知能低下のみの臨床像を示した。その後診断されたスペイン人や他の日本人症例も同様の臨床所見を有していた。

この臨床的多様性を説明する理由として、当初は、同一疾患の重症型が Schindler 病の臨床像を、軽症型が Kanzaki 病の臨床像を示すものと考えられた。しかし、最近になり、Schindler 病の兄弟例の遺伝型 (E325K のホモ接合体) と同じ遺伝型

を持つにも拘わらず、白内障と軽い運動障害のみの臨床症状を示す患者群や 8-9 歳に至っても無症状の者が発見されている。また、Kanzaki 病の患者では、病理学的に細胞内空胞化が見られ、 α -NAGA 活性がほぼ完全欠損するのに対して、最初の Schindler 病の症例では、リソソーム特有の病理変化が見られず、 α -NAGA の残存活性が認められている。

また Schindler/Kanzaki 病患者の尿中に排泄される主な O 結合型糖鎖のオリゴ糖の構造が、 α -NAGA の活性低下から予想される GalNAc α 1-O-Ser/Thr とは異なっており、NeuNAc α 2-3Gal β 1-3[NeuNAc α 2-6]GalNAc α 1-O-Ser/Thr であることから、本症の病態が本当に α -NAGA の活性低下と結びつくのかという大きな疑問が生じている。

我々は、Schindler/Kanzaki 病の病態を明らかにするため、構造学および細胞化学的解析を試みた。

B. 研究方法

a) α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの構造学的解析

Protein Data Bank (PDB) に登録されてい

るニワトリの α -NAGA の結晶構造情報 (PDB コード: 1KTB) を基にして、SYBYL/COMPOSER および BIOPOLIMER (TRIPOS, Inc.) を用いてヒトの野生型と変異型 (E325K, R329Q/W) の α -NAGA の 3 次元構造のモデリングを行った。

テンプレートとなるニワトリの α -NAGA の構造情報を基に、構造保存領域を決定し、ヒト α -NAGA の骨格構造を作製した。さらに、側鎖の rotamer を rule-based procedure 法に従い、決定した。ループ領域については、loop generation 法で構築し、biopolymer dictionary で、各アミノ酸残基に対する水素原子の付加を行った。最後に、エネルギー最小化法を適用した。次に野生型の場合と同様の方法で、変異型 α -NAGA の構造をモデリングした。

変異による影響を評価するため、least-square-mean fitting 法で、変異型を野生型に対してスーパーインポーズした。当該原子の位置が、野生型に比べて total root-mean-square distance value よりも大きく異なる場合を、「影響あり」と判定した。

b) 細胞内蓄積物に関する細胞化学分析

Kanzaki 病患者由来の培養皮膚繊維芽細胞を試料として、細胞内に蓄積している物質について化学的染色を行った。抗 Tn 抗体 (GalNAc α 1-O-Ser/Thr を認識) およびイヌエンジュ由来のレクチン *Macckia amurensis* (MAM, NeuNAc α 2-3Gal を認識) を用いて、それぞれに対して、リソソームマーカーとして使用される Lamp-1 に対する抗体との組み合わせによる二重染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、当研究所の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

a) α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのモデリングと病因遺伝子変異による構造変化

野生型 α -NAGA は、活性ポケットを含む (β/α)₈ バレル構造をとるドメイン1と逆平行 β -シート構造をとるドメイン2 とから構成される。R329 はドメイン2 に存在し、その側鎖はドメイン1 と両ドメイン

間のループに埋もれる様な状態でバックリングしており、ドメイン1 の主鎖と水素結合を形成する。Kanzaki 病の症例でみられた R329Q/W の変異により、R329 と水素結合を形成する筈のドメイン1 の主鎖とアミノ酸残基が置換した Q/W329 が存在する β -ストランドおよびその周辺の構造に大きな影響が出ると考えられた。一方、E325 はドメイン2 に存在し、Schindler 病の兄弟などの症例でみられた E325K の変異により、その周辺の側鎖のコンフォメーションが影響を受けたが、主鎖への影響はみられず、予想される変化は小さかった。

b) Kanzaki 病患者由来培養繊維芽細胞内の蓄積物質

Kanzaki 病患者由来の細胞では、抗 Lamp-1 抗体と抗 Tn 抗体に対して顆粒状に共染した。一方、MAM では染色されなかった。この事から、Kanzaki 病の培養繊維芽細胞内に主に蓄積している物質は、NeuNAc α 2-3Gal β 1-3[NeuNAc α 2-6]GalNAc α 1-O-Ser/Thr ではなく、本来の α -NAGA の基質となる GalNAc α 1-O-Ser/Thr であると考えられた。

D. 考察

今回の解析の結果、酵素蛋白質の構造変化は、Kanzaki 病でみられる遺伝子変異によるものの方が Schindler 病によるものよりも大きく、生化学的および病理学的分析結果と矛盾しないものであった。これまでに、世界中で infantile neuroaxonal dystrophy の患者の調査がなされたが、 α -NAGA 欠損と infantile neuroaxonal dystrophy とを合併する症例は最初の症例の他にはみられなかった。Schindler 病における重い神経症状の発現には、 α -NAGA 遺伝子変異以外の因子が関係する可能性が強いと考えられた。

また、細胞化学的解析から、肝臓などの臓器と血流を介しての連絡がない培養繊維芽細胞においては、リソソームに蓄積する主な物質は GalNAc α 1-O-Ser/Thr であると考えられた。本症患者の尿中に大量に排泄される O 結合型の糖鎖を持つ NeuNAc α 2-3Gal β 1-3[NeuNAc α 2-6]GalNAc

α 1-O-Ser/Thr に関しては、糖鎖形成酵素が豊富に存在する肝臓において、本来的に蓄積する GalNAc α 1-O-Ser/Thr の非還元末端にさらに糖が付加されて作られ、これが血流を介して腎から排泄されるものと考えられた。従って本症では、 α -NAGA の活性低下に基づいて当該基質の蓄積が起こっていると考えられる。

E. 結論

ヒト α -NAGA の 3 次元構造モデルを構築し、Schindler 病患者でみられた E325K と Kanzaki 病でみられた R329Q/W の変異による構造変化を推定した。後者による変化は前者によるものよりも大きく、当該酵素活性の低下度や病理変化の程度とよく相関した。最初に発見された Schindler 病兄弟例における重度の infantile neuroaxonal dystrophy の症状形成には、 α -NAGA の異常の他の因子が関与している可能性が考えられた。

また、Kanzaki 病患者由来の培養繊維芽

細胞の化学的解析の結果、細胞内に蓄積している主な物質は、 α -NAGA の基質であり、矛盾はないと考えられた。

F. 謝辞

本研究は、(株)セレスター・レキシコサイエンシズの松澤史子先生、相川聖一先生および土居洋文先生と鹿児島大学皮膚科学教室の神崎 保教授および福重智子先生、東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学研究部門の小谷政晴研究員の協力で行われた。

G. 研究発表

桜庭 均, 松澤史子, 相川聖一, 土居洋文, 小谷政晴, 福重智子, 神崎 保: ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのモデリングと Schindler/Kanzaki 病の構造学的研究. 第 8 回日本ライソゾーム病研究会, 2002. 11. 21-22, 東京

厚生労働科学研究費補助金（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

ニーマンピック病 A・B 型の病態に関する研究

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。ASM の一部はライソゾームに達せず細胞外に分泌される。この分泌 ASM の活性測定にはライソゾーム ASM と異なり Zn^{2+} の存在が必要となる。この ASM の分泌はサイトカイン刺激で亢進することが培養細胞で観察されていた。われわれは疾患病態として高サイトカイン血症を示す Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) 患者血清の ASM 活性を測定し、分泌 ASM の上昇することを観察した。このことは高サイトカイン血症がもたらす細胞内、細胞外病態に ASM の関与する可能性を示唆した。本観察はニーマンピック病 A・B 型の病態を考える上で重要と思われた。

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。ASM はライソゾームにて酵素 (l-ASM: lysosomal ASM) として働くが、その一部はライソゾームに達せず細胞外に分泌される。本酵素は Zn^{2+} 結合部位を有しその活性に大きな影響を与えるが、ライソゾームに達した酵素のみライソゾームに存在する Zn^{2+} の結合が得られ、細胞外分

泌 ASM (s-ASM: secretory ASM) は Zn^{2+} 結合がみられずその酵素活性測定にバッファー中 Zn^{2+} の存在が必要である。培養細胞を用いた研究で、interferon- 1β (INF- 1β) や interferon- γ (INF- γ) などの cytokine 刺激で、l-ASM が低下し s-ASM が増加する反応が起きることが観察され報告されている。本研究では疾患病態として高サイトカイン血症を示す HLH 患者の s-ASM (血清中 ASM) に関して検討を行った。

B. 研究方法

高サイトカイン血症を示す 3 名の小児に関して血清中 s-ASM の測定を行い正常者および ASM 欠損症であるニーマンピック

病B型患者血清値との比較検討を行った。また高サイトカイン血症の改善に伴う血清s-ASMの変化に関して検討した。Case 1はEBウイルス感染症に伴うHLHで診断基準を満たしていた。血中サイトカインはsoluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) 14,600 U/ml (normal: <1,090 U/ml)、INF- γ 5.2 U/ml (normal: <1.0 U/ml)、interleukin-6 (IL-6) 25.3 pg/ml (normal: <4.0 pg/ml)と全て高値であった。Case 2はFamilial HLHで血中サイトカインはsoluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) 23,900 U/ml (normal: <1,090 U/ml)、INF- γ 19.4 U/ml (normal: <1.0 U/ml)と高値であった。Case 3はvirus-associated HLHで、血中サイトカインはsoluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) が20,300 U/ml (normal: <1,090 U/ml)と高値であった。血清は-20°Cで保存後、100 μ l に対して50 μ l 基質 (20nmol 14 C-sphingomyelin, 0.08 μ Ci/20nmol in 0.2% taurodeoxycholic acid)、50 μ l 酢酸ナトリウムバッファー (1.0mol/L, pH5.0, 4% Triton X-100, EDTA 0.02mmol/L or Zn $^{2+}$ 0.1 mmol/L)を加え37°Cで6時間incubationした。反応は200 μ l ice-cold 30% trichloroacetic acid と400 μ l 2.5% bovine serum albuminを加え停止し、vortexし10 min 室温静置、10 min 遠心した。上清500 μ l を液シンにてカウントした。

(倫理面への配慮) 本実験に用いた血清

は同意の得られた正常者および患者の検体である。

C. 研究結果

正常成人血清 (n=10) では

(EDTA) s-ASM 0.79 \pm 0.23

nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 1.55 \pm 0.75 nmol/0.1ml/6hr であり血清中に Zn $^{2+}$ 刺激で活性上昇を示すASMが存在することが示された。1-5才の小児では(EDTA) ASM 0.41 \pm 0.24 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 1.89 \pm 0.61 nmol/0.1ml/6hr であった。以上の結果は成人と小児で年齢による差がないことを示していた。

Niemann-Pick病B型患者2名(患者I, 患者II)の血清を用いて同様の測定を行った。患者Iでは(EDTA) ASM 0.03 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 0.04 nmol/0.1ml/6hr、患者IIでは(EDTA) ASM 0.09 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 0.08 nmol/0.1ml/6hr でありほとんど活性値を示さなかった。次にHLH患者血清の測定を行った。Case 1では(EDTA) ASM 2.58 \pm 0.16 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 30.28 \pm 0.75 nmol/0.1ml/6hr、Case 2では(EDTA) ASM 1.49 \pm 0.02 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 35.95 \pm 1.13 nmol/0.1ml/6hr、Case 3では(EDTA) ASM 1.35 \pm 0.05 nmol/0.1ml/6hr に対して (Zn $^{2+}$) s-ASM 21.32 \pm 0.41 nmol/0.1ml/6hr であった。患者血清では統計学的に有意に (p<0.0001)、正常者に比べて高いs-ASM