

matrix metalloproteinase 3(stromelysin 1)
発現減少が認められた遺伝子として、
ribosomal protein S4, Y-linked (RPS4Y)
WAP four-disulfide core domain 1 (WFDC1)
latent transforming growth factor β binding protein
などがあつた。これらは、GLD で特異的に変化して
いる遺伝子と考えられた。

D. 考察

GLD では、GALC 変異が臨床型を決定するという
特徴があるが、アミノ酸置換が GALC の構造や機能に
どのような変化を起こすかについてははっきりしてい
ない。今回、JI-GLD と AO-GLD の間や、GLD とコン
トロール細胞との間で DNA マイクロアレー法で有意
に遺伝子発現差が認められた事から、JI-GLD と AO-
GLD との間で、ライソゾーム酵素に関する遺伝子
の発現に差が生じている可能性が考えられた。

今後、二次元蛋白泳動で恒常的に移動度に変化の認

められるスポットを解析し、これと DNA マイクロア
レー法での結果を比較し、関連する遺伝子に関して real
time RT-PCR 法などを用い、確実に発現量の差を認め
る遺伝子を検索してゆく予定である。

E. 結論

cDNA マイクロアレーを用いて、JI-GLD と AO-GLD 患
者培養線維芽細胞で発現する遺伝子の解析を行った。そ
の結果、JI-GLD と AO-GLD との間で発現量に差の認め
られる遺伝子が認められた。二次元蛋白泳動でも移動度
の異なるスポットがいくつか認められた。

今回認められた結果は、GLD の病態や GALC の機能
解析のための手掛かりになると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨

全国の重症心身障害児病棟・施設に入院または通所しているライソゾーム病患者を対象にして、生活の質（QOL）の状況を主眼としたアンケート調査を行った。48例の報告があり、特定疾患対象年齢の20歳以上は28例（59.6%）であった。特定疾患に登録されているのはわずか3例であった。すべて大島の分類1の症例であり酸素療法、経管栄養、気管切開などを受けている症例が20～50%であった。本登録制度の利用や社会資源の活用にもむけた啓蒙が必要であると考えられる。

A. 研究目的

ライソゾーム病が厚生労働省の特定疾患に認定され、昨年度より20歳以上の患者に対する個人調査の申請手続きが始まった。ファブリ病を含め、30種類のライソゾーム病が対象である。ライソゾーム病は一般に予後不良であり、新しい治療法の開発とQOLの改善が望まれているが、一方最近では重度の障害児（者）に対する医療、療育の進歩により、重症心身障害児病棟、施設において、ターミナルステージの医療ケア、療育を受ける症例が増えている。全国の重症心身障害児病棟及び施設において経過観察されている症例につき、医療と療育に関するアンケート調査を行った。

B. 研究方法

全国の重症心身障害児病棟及び施設（計180施設）を対象に調査を行った。「入所・入院か在宅か」、入所・入院期間、罹病期間、治療状況、種々の手帳の取得状況、在宅診療の状況等についてアンケートを作製し、患者への説明書、調査の同意書とともに全国の療養所、施設に郵送、各主治医によるインフォームドコンセントを経て、同意を得られた患者を対象とした。

（倫理面への配慮）

アンケート調査に関しては東邦大学医学部の倫理委員会より承認を得た。

C. 研究結果

国立療養所重症心身障害児病棟75ヶ所の回答率は48%、公法人立重症心身障害児施設105ヶ所の回答率は53%で、全体として51%、患者数は合計47例であった。サンフィリップ症候群（11例）、セロイドリポフスチノーシス（11例）、ハンター症候群（7例）が多く、特定疾患対策事業の対象となる20歳以上の患者は28例（59.6%）であった。55.3%が入所または長期入院をしており、その期間は5年以下が過半数を占めていた。一方21年以上に渡り長期入所・入院している患者の存在も確認された。罹病期間をみると11-20年の症例が最も多く、21年以上の症例も報告された。大島分類では1が29例（61.7%）、2が4例（8.5%）を占めていた。現在の医療状況としては酸素療法、経管栄養を受けている症例がそれぞれ29.8%、48.9%と多かった。これらはいずれも大島分類1の症例であり、さらに23.4%の患者が気管切開を、10.6%の患者が喉頭気管分離を受けていた。療育状況に関しては、在宅で機能訓練を受けている症例も57.1%と多いことが分かった。また訪問看護、在宅機能訓練等の在宅診療、通園事業、支援費制度を利用している患者の割合は低かった。手帳の取得状況をみると療育手帳、身体障害者手帳については大半の患者が取得している一方

で、特定疾患の登録を済ませた症例は3例に過ぎず、年齢対象の10.7%と極めて少なかった。

D. 考察と結論

特定疾患に登録している症例はまだ少ないことが判明した。QOLの改善に当たっては、特定疾患対策事業の啓蒙や、在宅患者への社会資源に関する情報提供及び資源の活用が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①清水教一：金属代謝異常症。別冊日本臨床，領域別症候群シリーズ39（精神医学症候群II），pp462-465，大阪，2003
- ②清水教一：Wilson病。小児消化器病肝臓病マニュアル，pp274-275，診断と治療社，東京，2003
- ③清水教一：Menkes病。今日の小児治療指針，第13版，p165，医学書院，東京，2003
- ④Shimizu N, Takeshita Y, Nakazono H, Fuji H, Ikeda C, Omura I, Hemmi H, Shimatake H, Okada M, Aoki T: Mutations of the human ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease. The Second International Symposium at Genome Research Center for Birth Defects and Genetic Disorders, Seoul/Korea, July 2003
- ⑤Yamaguchi Y, Takeshita Y, Shimizu N, Aoki T: Pilot study on population based mass screening for Wilson disease in Japan. The Second International Symposium at Genome Research Center for Birth Defects and Genetic Disorders, Seoul/Korea, July 2003

2. 学会発表

- ①斎藤美雪，中園宏紀，竹下由紀子，山口之利，清水教一，四宮範明，青木継稔：Wilson病における家族内検索の意義とその方法に関する検討。第106回日本小児科学会学術集会，福岡，2003年4月
- ②竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，岡田光正，四宮範明，青木継稔：

Wilson病の遺伝子診断，日本人症例における変異の特徴に基づく方略の検討。第106回日本小児科学会学術集会，福岡，2003年4月

- ③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にて発見された症例の診断確定までの方略に関する検討。第106回日本小児科学会学術集会，福岡，2003年4月
- ④渡辺温子，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：Menkes病の早期診断法としてのATP7A遺伝子解析の有用性に関する検討。第106回日本小児科学会学術集会，福岡，2003年4月
- ⑤山口之利，藤井秀樹，渡辺温子，竹下由紀子，清水教一，四宮範明，青木継稔，玉井浩，有馬正高：ウイルソン病友の会，活動の現状。第106回日本小児科学会学術集会，福岡，2003年4月
- ⑥藤井秀樹，水口浩一，渡辺温子，山口之利，清水教一，青木継稔：経過中に汎血球減少を呈したWilson病の一例。第7回ウイルソン病研究会，東京，2003年5月
- ⑦竹下由紀子，渡辺温子，山口之利，清水教一，青木継稔：精神症状にて発症したWilson病の一例。第7回ウイルソン病研究会，東京，2003年5月
- ⑧足立玲，二瓶浩一，山口之利，竹下由紀子，清水教一，加藤尚之，青木継稔：血清セルロプラスミン値が正常値を示したため診断確定に苦慮したWilson病の幼児例。第7回ウイルソン病研究会，東京，2003年5月
- ⑨植村泰子，大石悟，竹下由紀子，山口之利，清水教一，青木継稔，中島敏雄：神経症状発症から数年後にKayser-Fleischer角膜輪発見を契機に診断された肝神経型Wilson病の一例。第7回ウイルソン病研究会，東京，2003年5月
- ⑩渡辺温子，竹下由紀子，清水教一，青木継稔，逸見仁道，嶋武博之：Menkes病の遺伝子解析および遺伝子診断に関する研究。第7回ウイルソン病研究会，東京，

2003年5月

⑪清水教一，四宮範明，青木継稔：ビリルビン透析療法および肝移植にてビリルビン脳症が改善した Crigler-Najjar 症候群 type 1 の 1 例。第 45 回日本小児神経学会総会，福岡，2003 年 5 月

⑫竹下由紀子，清水教一，山口之利，四宮範明，青木継稔：精神症状にて発症し日本人に希な ATP7B 遺伝子変異を有する Wilson 病症例。第 45 回日本小児神経学会総会，福岡，2003 年 5 月

⑬足立玲，二瓶浩一，竹下由紀子，山口之利，清水教一，加藤尚之，青木継稔：血清セルプラスミン値が正常を示した Wilson 病の幼児例。第 14 回日本微量元素学会，大阪，2003 年 7 月

⑭竹下由紀子，清水教一，逸見仁道，嶋武博之，青木継稔：遺伝子診断が有用であった Wilson 病の 2 家系。第 14 回日本微量元素学会，大阪，2003 年 7 月

⑮清水教一，青木継稔：神経症状を呈した Wilson 病症例に対する銅キレート薬治療に関する研究。第 30 回日本小児臨床薬理学会，大阪，2003 年 9 月

⑯清水教一，山口之利，中山憲司，市原侃，田村正秀，福土勝，藤田晃三，高橋勉，高田五郎，鈴木健，北川照男，青木継稔：Wilson 病マススクリーニングの意義と有効性に関する検討。第 50 回日本小児保健学会，鹿児島，2003 年 11 月

⑰足立玲，渡辺温子，竹下由紀子，山口之利，清水教一，四宮範明，青木継稔：

幼若児 Wilson 病早期発見のための遺伝子解析等による家族内検索の有用性について。第 50 回日本小児保健学会，鹿児島，2003 年 11 月

⑱竹下由紀子，清水教一，四宮範明，青木継稔：長期投与が必要である慢性疾患の服薬指導に関する検討，Wilson 病症例を中心として。第 50 回日本小児保健学会，鹿児島，2003 年 11 月

⑲山口之利，清水教一，竹下由紀子，四宮範明，玉井浩，有馬正高，青木継稔：ウイルソン病友の会，活動の現況。第 50 回日本小児保健学会，鹿児島，2003 年 11 月

⑳清水教一，藤井秀樹，道海秀則，井澤雅子，下田牧子，宇野拓，竹下由紀子，四宮範明，中村道子，青木継稔：怠薬の結果精神症状が出現した発症前型 Wilson 病の 1 例。第 50 回日本先天代謝異常学会，松江，2003 年 11 月

(21)竹下由紀子，清水教一，渡辺温子，足立玲，四宮範明，青木継稔：ATP7B 遺伝子解析が診断と家族内検索に有用であった Wilson 病の 4 家系。第 50 回日本先天代謝異常学会，松江，2003 年 11 月

研究成果の刊行に関する一覧表

桜川宣男

1. Horikoshi T, Fujii T, Kawashima K, Sakuragawa N: Acetylcholine increase in amniotic fluid of experimental rats for intrauterine growth retardation. *Life Sci* 72: 2145-2149, 2003.
2. Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 342: 61-64, 2003.
3. Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 344(3) 157-160, 2003
4. 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. *Neurosci Lett* 341: 1-4, 2003
5. Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in human placenta amniotic epithelial cell. *Placenta* 24(6): 658-663, 2003
6. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T: Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 980: 48-56, 2003
7. Pipo JR, Feng J-H, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K: New GAA mutations in Japanese patients with GSD II (Pompe disease). *Ped Neurol* 29: 284-287, 2003.
8. Ogawa A, Terada S, Sakuragawa N, Masuda S, Nagao M, Miki M: Progesterone, but not 17 β -estradiol, up-regulates erythropoietin (EPO) production in human amniotic epithelial cells. *J Biosci Bioeng* 96: 448-453, 2003.
9. Sakuragawa N, Kakinuma K, Hatada S, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Yokoyama Y: Human amnion mesenchyme cells express phenotype of neuronal progenitor cells. In press. *J Neurosci Res*.

御子柴克彦

1. Ando, H., Mizutani, A., Matsu-ura, T. & Mikoshiba, K.: IRBIT, a novel inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃) receptor binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* 278 10602-10612 (2003)
2. Yasuda, H., Higashi, H., Kudo, Y., Inoue, T., Hata, Y., Mikoshiba, K. & Tsumoto, T.: Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience* 17 287-297 (2003)
3. Saneyoshi, T., Kume, S., & Mikoshiba, K.: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 499-507 (2003)
4. Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamoto, T. & Akagawa, K.: Expression of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is enhanced by phorbol-ester stimulation in astroglia: participation of the PKC signaling pathway. *FEBS Letters* 536 209-214 (2003)
5. Park, T.-J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K. & Nukina, N.: Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 671-678 (2003)

6. Shiraishi, Y., Mizutani, A., Mikoshiba, K. & Furuichi, T.: Coincidence in dendritic clustering and synaptic targeting of homer proteins and NMDA receptor complex proteins NR2B and PSD95 during development of cultured hippocampal neurons. *Mol.Cell. Neuro.* 22 188-201 (2003)
7. Aruga, J. & Mikoshiba, K.: Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol.Cell.Neuro.* (in press) (2003)
8. Nagase, T., Ito, K.-I., Kato, K., Kaneko, K., Kohda, K., Matsumoto, M., Hoshino, A., Inoue, T., Fujii, S., Kato, H., & Mikoshiba, K.: Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP₃ type 1 receptor. *Neuroscience* 117 821-830 (2003)
9. Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurosawa, M., Rafael A.F., Yoshida, N., Mikoshiba, K. & Takenawa, T.: Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J.Cell Biology* 161 79-88 (2003)
10. Yamamoto, T., Sakakibara, S., Mikoshiba, K. & Terashima, T.: Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of *yotari* and *reeler* mice. *J.Comp.Neurol.* 461 61-75 (2003)
11. Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K.: Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor *J.Biol. Chem.* 278(19) 16551-16560 (2003)
12. Hirota, J., Ando, H., Hamada, K. & Mikoshiba, K.: Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 *Biochem. J.* 372 435-441 (2003)
13. Sandona D., Scolari, A., Mikoshiba, K. & Volpe, P.: Subcellular distribution of Homer 1b/c in relation to endoplasmic reticulum and plasma membrane proteins in Purkinje neurons. *Neurochem Res.* 28(8) 1151-1158 (2003)
14. Fujii, S., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Taufiq, M. A. & Kato, H.: Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Res.* 46 509-521 (2003)
15. Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S. & Mason, C.A.: *Zic2* patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114 545-557 (2003)

浅島 誠

1. 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
2. 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
3. Ariizumi T. and Asashima, M.: From field to gel blot: teaching a holistic view of developmental phenomena to undergraduate biology students at the University of Tokyo. *Int. J. Dev. Biol.*, 47, 93-97, 2003
4. Yabe, S., Tanegashima, K., Haramoto, Y., Takahashi, S., Fujii, T., Kozuma, S., Taketani, Y. and Asashima, M.: FRL-1, a member of the EGF-CFC family, is essential for neural differentiation in *Xenopus* early development. *Development*,

- 130, 2071-2081, 2003
5. Yokota, C., M. Kofron, M. Zuck, D. W. Houston, H. Isaacs, Asashima, M., C. C. Wylie and J. Heasman.: A novel role for a nodal-related protein; Xnr3 regulates convergent extension movements via the FGF receptor. *Development*, 130, 2199-2212, 2003
 6. Fukui, A., Komazaki S., Miyoshi, O. and Asashima, M.: Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes. *Develop. Growth Differ.*, 45, 113-119, 2003.
 7. Sogame, A., Hayata, T. and Asashima, M.: Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes *Develop. Growth Differ.*, 45, 113-119, 2003
 8. Hino, S., Michiue, T., Asashima, M. and Kikuchi, A.: Casein kinase I ϵ enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 278(16), 14066-14073, 2003
 9. Kaneko, T., Chan, T., Satow, R., Fujita, T., and Asashima, M.: The isolation and characterization of XC3H-3b: a CCCH zinc-finger protein required for pronephros development. *B. B. R. C.*, 308, 566-572, 2003
 10. Kyuno, J.-I., Fukui, A., Michiue, T., and Asashima, M.: Identification and characterization of *Xenopus* NDRG1 *B. B. R. C.*, 309, 52-57, 2003
 11. Okabayashi, K. and Asashima, M.: Tissue generation from amphibian animal caps *Current Opinion in Genetics & Development*, 13, 1-6, 2003
 12. Tanaka, M, Asashima, M., and Atomi, Y.: Proliferation and differentiation of *Xenopus* A6 cells under hypergravity as revealed by time-lapse imaging. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 39, 71-79, 2003
 13. Asashima, M., and Okabayashi, K.: Current state of and outlook for organogenesis from undifferentiated cells *CORNEA*, 22(7), 2-12, 2003
 14. Emura, T., Hashizume, K., and Asashima, M.: Experimental study of the embryogenesis of gastrointestinal duplication and enteric cyst *Pediatr. Surg. Int.*, 19(3):147-151, 2003
 15. Ariizumi, T., Kinoshita, M., Yokota, C., Takano, K., Fukuda, K., Moriyama, N., Malacinski, G. M., and Asashima, M.: Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int. J. Dev. Biol.*, 47, 405-410, 2003
 16. Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakamura, Y., Yokota, T., Asashima, M., and Koide, H.: Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313(3), 475-481, 2004
 17. Sedohara, A., Komazaki, S., and Asashima, M.: In vitro induction and transplantation of eye during early *Xenopus* development. *Develop. Growth Differ.*, 45(5/6), 463-471, 2003
 18. Fukui, Y., Furue, M., Myoishi, Y., Sato, J. Denry, Okamoto, T., and Asashima M.: Long-term culture of *Xenopus* presumptive ectoderm in a nutrient-supplemented culture medium *Develop. Growth Differ.*, 45(5/6), 499-506, 2003

青木継稔

1. 清水教一：金属代謝異常症. 別冊日本臨床, 領域別症候群シリーズ 39 (精神医学症候群 II), pp462-465, 大阪, 2003
2. 清水教一：Wilson 病. 小児消化器病肝臓病マニュアル, pp274-275, 診断

と治療社, 東京, 2003

3. 清水教一: Menkes 病. 今日の小児治療指針, 第 13 版, p165, 医学書院, 東京, 2003
4. Shimizu N, Takeshita Y, Nakazono H, Fuji H, Ikeda C, Omura I, Hemmi H, Shimatake H, Okada M, Aoki T: Mutations of the human ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease. The Second International Symposium at Genome Research Center for Birth Defects and Genetic Disorders, Seoul/Korea, July 2003
5. Yamaguchi Y, Takeshita Y, Shimizu N, Aoki T: Pilot study on population based mass screening for Wilson disease in Japan. The Second International Symposium at Genome Research Center for Birth Defects and Genetic Disorders, Seoul/Korea, July 2003

「ライソゾーム病の病態の解明と治療法の開発に関する研究」

平成15年度研究発表会

プログラムと抄録集

日時：平成16年1月24日（土曜日）午後1時～5時45分

場所：東邦大学医学部附属大森病院5号館 大森臨床講堂（地下1階）

東京都大田区大森西5-2-1-16

Tel: 03-3762-4151（代表）

連絡先：

〒229-1131 神奈川県相模原市西橋本5-4-30

さがみはら産業創造センター SIC-2, No 301

東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 桜川宣男

Tel & Fax: 042-563-5377 E-mail: sakuraga@sea.plala.or.jp

12:30 受付け開始

1:30 班会議開始、挨拶

[座長 御子柴 克彦]

- [1] ライソゾーム病の脳病変に対するヒト羊膜細胞由来幹細胞による移植法の開発研究
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 桜川宣男
- [2] ヒト羊膜細胞 (SP 細胞) における神経再生研究
順天堂大学医学部脳神経外科 阿部祐介、屋田 修、新井 一
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 桜川宣男
- [3] 試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究
東京大学大学院総合分化研究科 福井彰雅、浅島 誠

[座長 福井彰雅]

- [4] 小脳におけるニューロン形成と縦縞状の区画化
東京大学医科学研究所、理化学研究所 御子柴 克彦
理化学研究所 橋本光弘
- [5] 酵母で産生した α -ガラクトシダーゼのファブリー病モデルマウスへの投与効果
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
- [6] DNA マイクロアレーを用いた成人型、乳幼児型 Krabbe 病培養線維芽細胞発現遺伝子解析
九州大学大学院医学研究科脳神経病研究施設神経内科 古谷博和、新納信江、吉良潤一

3:20~3:30 休憩

[座長 古谷博和]

- [7] 神経幹細胞を用いたムコ多糖症VII型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療
国立成育医療センター遺伝診療科 奥山虎之
- [8] ヒト組換え β -ヘキササミニダーゼと Sandhoff 病モデル系を用いた新規酵素補充療法の開発研究
徳島大学薬学部附属医薬資源教育研究センター 環境生物工学分野 伊藤孝司
- [9] 縁取り空砲を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子と分子病態
国立精神神経センター 西野一三、野口 悟、埜中征哉

[座長 青木継稔]

[10] ムコ多糖症の新生児マススクリーニングに関する研究

岐阜大学医学部
セントルイス大学
生化学工業
国立成育医療センター

磯貝光治、下沢伸幸、折居忠夫
戸松俊治
加藤 俊、宮浦修一、岡村和夫
奥山虎之、松尾宣武

[11] 重症心身障害児病棟・施設におけるライソゾーム病患者に関するアンケート調査

東邦大学医学部
東京小児療育病院
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座

清水教一、青木継稔
松田光展、桜川宣男
桜川宣男

[12] ライソゾーム病の「包括的遺伝診療サポートシステム」の構築
(株) エスアールエル 学術部、医化学分析センター

横山安伸、田部美穂

[13] 遺伝子導入ヒト羊膜細胞による Sandhoff 病モデルマウスの治療研究
北里大学医学部・微生物学

北里英郎

5:30 全体討論

5:45 班会議終了

[1] ヒト羊膜間葉細胞幹細胞の分離培養と神経細胞への分化誘導

東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 桜川宣男、小林 護、加茂 功
(株) エスアールエル 柿沼健一、横山安伸
国立精神・神経センター微細構造研究部 菊池愛子
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野栄之

序論：我々はヒト羊膜上皮細胞 (AECs) にドパミン産生細胞が存在し、パーキンソン病モデルラットの脳内細胞移植の有効性を報告した。本年度は羊膜間葉細胞 (AMCs) を解析して神経細胞への分化誘導に成功したので報告する。また羊膜間葉細胞由来の幹細胞である side population cells (SP 細胞) を分離、培養して性質を検討した。そしてライソゾーム病患者への脳内細胞移植の有効性について考察した。

方法：分化誘導実験は Woodbury らの方法に従った。実験開始後 24 時間の細胞の形態を観察し、免疫染色及び遺伝子解析した。また nestin enhancer の調整制御をうける EGFP 導入アデノウイルス (AdE/nestin-EGFP) の感染実験を行った。次に細胞分離装置により、幹細胞である SP 細胞の分離・培養に成功した。SP 細胞について免疫染色、RT-PCR を施行し、分化誘導実験を行った。またライソゾーム病の細胞移植治療法をめざして、17 種類の酵素活性を測定した。

結果：AMCs は vimentin 陽性であり CK19+/vimentin+ 細胞が約 10% 存在している。誘導前は BrdU+/vimentin+/nestin+/Musashi1+ の幹細胞の特長を示した。誘導後の細胞形態は複数の長い突起をもち、nestin、Musashi1、NF-M、NeuD に陽性であった。Nestin、Musashi1 の遺伝子発現が認められ、AdE/nestin-EGFP 陽性細胞が存在していた。次に SP 細胞の増殖曲線を検討したが、最近報告された骨髄由来の幹細胞 (MAPCs) と類似であった。遺伝子解析では未分化細胞に発現している Oct 4、Rex 1 などの遺伝子発現が判明した。そして分化誘導実験でも神経細胞への分化が証明された。ライソゾーム酵素活性を測定し、β グルコシダーゼと β ガラクトシダーゼは参考データの 500% 以上の高い活性を示した。

考察：分離・培養した AMCs は神経幹細胞の特徴を示し、そして神経細胞に分化誘導が可能であったことより、AMCs には神経幹細胞の存在が大きく示唆された。そして、細胞分離培養装置を用いて、羊膜間葉細胞由来の幹細胞 (SP 細胞) を分取し、培養に成功した。この細胞は上皮細胞及び間葉細胞マーカーの共発現細胞であり、epithelial mesenchymal transition (AMT) の存在が示唆された。AECs から SP 細胞が分取できたので、羊膜細胞由来の幹細胞における AMT の意義について検討する必要がある。ライソゾーム病患者の治療法として本細胞の脳内移植療法に期待がもてる。モデル動物による有効性の証明を試みる。

結論：倫理的にも供給面でも問題少なく、同種移植可能なヒト羊膜細胞由来の幹細胞は、脳変性疾患の細胞移植に対する候補細胞として有望である。またライソゾーム酵素を多量に含有していることより、ライソゾーム病患者への脳内細胞移植にも有望である。

[2] ヒト羊膜細胞 (SP 細胞) における神経再生研究

順天堂大学脳神経外科

阿部 祐介 屋田 修 新井 一

東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座

桜川 宣男

中枢神経系の治療戦略の一つとして、最近注目されている細胞移植が挙げられる。現在の所、移植に使われる細胞としては、組織幹細胞又は胚性幹細胞などが使用されているが、我々は、これらと同様に多能性幹細胞としての機能を有する可能性のある羊膜細胞に着目し、この細胞を用いて種々の研究を行ってきた。今回、ヒト羊膜細胞から分離した SP 細胞を用いて、神経細胞との共培養及び脳内への移植を行い、その形態学的変化と免疫学的変化を検証した。

【方法】ヒト胎盤より採取した羊膜細胞 (SP 細胞) を DMEM/F12 にて培養し、ラット胎児から採取培養した神経細胞と共培養し、その後の形態学的変化と免疫学的変化を検索した。又、ラット脳内への移植を行い、共培養同様に形態学的変化を検証した。

【結果】(1) 羊膜細胞は神経細胞との共培養により神経様の形態を示し、さらに神経細胞の長期生存も確認された。(2) ラット脳内への移植により、宿主脳内に羊膜細胞は生着し、神経細胞様に分化を認めた。(3) 移植細胞の腫瘍化は認められなかった。以上から羊膜細胞は神経細胞の代用として中枢神経系の再生治療への利用が期待できる。

[3] 試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究
東京大学大学院総合文化研究科 浅島 誠

A. 研究目的

初期発生における腎臓や膵臓、心臓、神経系などの器官や組織がどのようにして出来てくるかを遺伝子の発現のカスケードとしてとらえる。特に各器官形成に特異的なキーとなる遺伝子の探索を行うことによって、器官形成と発現のダイナミクスを明らかにしていく。また、ES細胞を用いて器官形成についても、試験管内の臓器形成が確認された。

B. 研究方法

両生類胚のアニマルキャップ (St9) 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たちが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から単離した新規遺伝子の機能解析に器官形成のメカニズムの解明に成功した。誘導のシグナル伝達の重要な TGF- β 系と Wnt系に関わる新規遺伝子の単離と解析に成功した。また、我々はマウスのES細胞を用いて、試験管内でいくつかの組織を作り出すことに成功した。

C. 研究成果

[腎形成に関与する新規の遺伝子探索]

腎形成に関与する新規の遺伝子として、XC3H-3 β とXTRAP- γ の2つをクローニングし解析を行った。XTRAP- γ は153のアミノ酸から構成され4つの膜貫通領域を持ち未受精卵の中に存在するが遺伝子であり、前腎細管の最終分化に必要であることがわかった。また、XC3H-3 β はzincフィンガーモチーフを持つ364のアミノ酸から構成される遺伝子であり、前腎周辺の間充織組織に局在が見られた。この遺伝子の発現が前腎細管の誘導に必要であることがわかった。また、私たちは重力の変化に応答する遺伝子、NDRG-1を単離し、機能解析を行った。その結果、NDRG-1は前腎形成に重要であることが確認された。

[膵臓形成と遺伝子発現]

アクチビンとレチノイン酸を時間差処理することによって膵臓をほぼ完全に作る系を開発したが、これをつかっの解析がなされた。その結果、膵臓に特異的なホルモンであるインスリンやグルカゴンの遺伝子発現や蛋白質の存在のみならず、膵臓にあると思われるカルボキシラーゼ、DNase1、リパーゼなど、ほとんどの膵臓特異的に合成される遺伝子の発現も確認された。そのことにより、私たちがアニマルキャップからつくった膵臓が正常胚の膵臓と形態学的にも遺伝子発現などの分子レベルにおいてもほぼ同じものであることが確認された。

[未分化細胞からの心臓形成]

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

[ES細胞からの器官形成]

私たちはマウスの未分化細胞(ES細胞)を用いて、試験管内の器官形成についても試みた。マウスのES細胞をレチノイン酸などで処理すると、心筋細胞の高率な形成が確認された。また、内分泌や外分泌細胞などを含めた膵臓細胞の形成がはじめて確認された。

[新規の遺伝子の更なる解析について]

1. 私たちの研究室でゲノム解析のために、2倍体のゲノムをもつ*Xenopus tropicalis*初期発生の分子生物学的解析も行った。初期発生の最も早い時期に発現するNodal-5と6(Xnr-5, Xnr-6)の他に、これらの遺伝子ファミリーに属すると考えられるXnr-3がクローニングされた。そして、Xnr-3の解析を進めるためにmorpholino oligoやcleavage mutantを使って調べた結果、Xnr-3の分泌される時に切り離されるpro-regionの部分が、他のTGF- β 遺伝子の活性を制御していることが確認された。また、私たちは生殖細胞に局在する遺伝子Xtdzlを単離して、その局在や発現を制御するゲノムの上流解析を行った。

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

D. 考察

未分化細胞の器官形成において、分子的メカニズムの解明は、試験管内の器官形成を行う上に重要なことである。私たちの結果によって今後、試験管内で効率的に組織や器官をつくる系の開発に非常に重要である。また、試験管内でマウスのES細胞を用いて内分泌や外分泌などを含む膵臓組織をつくることに成功したことは、試験管内での膵臓の器官形成の開発に初めて成功したといえる。

E. 結論

- 今回は未分化細胞のアニマルキャップから単離した新規遺伝子の機能解析に成功し、これらの遺伝子が腎臓や膵臓、生殖細胞などの器官や組織の形成に重要であることがわかった。
- 私たちはマウスのES細胞を用いて、試験管内の器官形成を行い、高率な心筋細胞の形成に成功した。また、内胚葉性組織や内分泌、外分泌細胞を含む膵臓組織の形成に成功した。
- 誘導現象に重要なTGF- β 系とWnt系に関わる新規遺伝子の単離と解析に成功した。

[4] 小脳におけるニューロン形成と縦縞状の区画化

東京大学医科学研究所、理化学研究所 御子柴克彦
理化学研究所 橋本光弘

(1) アデノウイルスベクターは、神経細胞の誕生日特異的に遺伝子を導入する。

発生段階の脳において、脳を構成する神経細胞は、脳室面に沿って存在する神経幹細胞より発生・分化してくる。神経幹細胞より発生した神経細胞は、いつ神経幹細胞より発生したか（神経細胞の誕生日）によって、その神経細胞がどのような性質を持ち、脳内においてどの構造体を形成するかという三次元的な位置情報が決定される。発生した神経細胞は、神経細胞の誕生日によって決定された情報を元に、脳内を移動し、特殊化した神経細胞へ分化することによって、脳の高次構造を形成していく。例えば、大脳皮質においてより早くに発生した神経細胞は、より内側の層に、より遅く発生した神経細胞はより外側の層へ移動していき、大脳皮質の層構造を形成する（inside-out パターン）。このように、脳の形態形成は、時間軸（神経細胞の誕生日）に沿って厳密に制御されていることが知られている。しかし、神経細胞の誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構は、未だ明らかになっていない。我々は、アデノウイルスベクターを用いることにより、トリチウム・チミンやBrdU同様、神経細胞の誕生日特異的に、神経細胞へ遺伝子を導入することができる（つまり、ウイルスを注入した日と、ウイルスが感染した神経細胞の誕生日が一致する）ことを明らかにした。アデノウイルスベクターで遺伝子が導入された神経細胞は、正常に発生・分化し、その誕生日に従って脳組織を構築する。この技術を用いれば、同一の誕生日を有する神経細胞群へ、個別に遺伝子を導入することができる。また、この技術は、今まで解析不可能であった、誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構を詳細に解析することを可能にした。

(2) 小脳における縦縞状の区画化は、小脳プルキンエ細胞の誕生日によって規定されている。

多くの解剖学的・生理学的・分子生物学的研究によって、小脳は、正中線を軸にして内側から外側方向へ、左右対称の縦縞状の区画化（mediolateral clusters）されていることが示唆された。例えば、下オリーブ核の各副核に属する神経細胞は、ある特定領域のPurkinje細胞群へ登上線維を投射している。それぞれの登上線維は、小脳を縦断する縦縞状の領域を形成する。また、電気生理学的研究により、登上線維が形成する縦縞状の領域には、体の運動を制御する体性感覚地図が存在することが明らかとなった。以上の研究結果から、小脳の縦縞状の区画化は、小脳における機能区分と考えられ、小脳の神経回路網の形成と小脳の機能の発現における基礎的構造単位であると考えられるようになった。さらに、分子生物学的発達により、多くの分子が小脳で縦縞状に発現していることが明らかとなり、小脳の縦縞状区画化は、神経回路網のみならず、分子レベルでも制御されていることが示された。多くの科学者が、小脳の機能発現において、小脳の縦縞状区画化が非常に重要であることを認めているにもかかわらず、いつ、どのようにして小脳の縦縞状の領域化が確立されるかは、いまだ証明されていない。

そこで、我々は、小脳の縦縞状区画化を解明するために、アデノウイルスベクターを用いて第4脳室に面した神経幹細胞への遺伝子導入を試みた。マウス胎生10.5日、11.5日、12.5日胚の中脳脳室へ、核移行シグナルを付加したLacZ遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを注入したところ、LacZ遺伝子でラベルされた第4脳室の神経上皮細胞は、Purkinje細胞に発生・分化することが判明した。さらに興味深いことに、ラベルされたPurkinje細胞は、それぞれの誕生日特異的に、異なるパターンの縦縞状区分を形成する。以上の結果より、Purkinje細胞による、小脳の区画化は、Purkinje細胞の発生する時期（胎生10.5日から胎生12.5日の間のPurkinje細胞の誕生日）に、すでに運命づけられており、さらに、縦縞状区画のパターンはPurkinje細胞の誕生日によって規定されていることが判明した。従って、あるニューロンの移動・配置にとってその細胞の誕生日が重要な意味を持つという点で、小脳の縦縞状区画化の成り立ちと、大脳皮質の層構造形成（inside-outパターン）は、脳組織形成における共通原理であることが判明した。

主要論文リスト

Hashimoto M. and Mikoshiba K.:

“Mediolateral Compartmentalization of the Cerebellum Is Determined on the “Birth Date” of Purkinje Cells”. *J of Neuroscience* 23, 11342-11351 (2003).

Hashimoto M. and Mikoshiba K.: “Neural-birth date specific gene transfer with adenoviral vectors”

J of Neuroscience (in press).

[5] 酵母で産生した α -ガラクトシダーゼのファブリー病モデルマウスへの投与効果

(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

容易で経済性が高いライソゾーム病の治療薬の生産法を開発することを目的として研究を行った。ライソゾーム病の中で発生頻度が高く、临床上重要なファブリー病の治療薬の開発を試みた。産業技術総合研究所との共同研究により、特定の糖鎖合成酵素の遺伝子群を破壊した酵母株にヒトの α -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、ヒト型糖鎖を持つ当該酵素を産生した。この酵素を、ファブリー病モデルマウスに週1回の割合で合計4回に渡り経静脈投与した。その結果、ファブリー病モデルマウスの肝臓、腎臓、心臓および脾臓に過剰に蓄積していた糖脂質セラミドトリヘキソシドの量が、それぞれ非投与マウスの2%、72%、28%および31%に減少した。セラミドトリヘキソシドに対するモノクローナル抗体を用いて、これらの臓器組織の間接免疫染色を行った所、いずれにおいても、酵素投与により染色性の著しい減少が示された。酵素投与前に電子顕微鏡で観察された多数の封入体も大幅に減少したことが確認された。酵素の反復投与により、酵素に対する抗体価の有意な上昇はみられず、理学的な副作用も認められなかった。酵母で産生した α -ガラクトシダーゼは、ファブリー病治療薬として有望と考えられる。

[6] DNA マイクロアレーを用いた成人型、乳幼児型 Krabbe 病培養線維芽細胞発現遺伝子解析

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

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。

これまで私どもは、日本に多い GALC 活性を解析し、乳幼児型、成人型の変異を組み込んだ GALC 遺伝子を一過性に発現することで、その活性の差を検出しようとしてきたが、単純な GALC 活性の測定ではこれらの臨床症状の違いを説明することは出来なかった。

そこで今年度は、DNA マイクロアレーを用いて、成人型と乳幼児型 GLD で発現遺伝子の差異を検討した。

方法

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から total RNA を抽出し、2.5 μ g を約 16,000 種類の発現遺伝子を搭載した IntelliGene Human Select DNA チップ (Takara) を用いて解析し、これら 3 種類のサンプルの間で発現遺伝子を比較検討した。

結果

その結果、乳幼児型および成人型の間で発現量に差の認められた遺伝子が、数種類認められた。

考察

GLD の治療を考えた場合、脱髄の生じた神経細胞を直接治療する事が究極の目標ではあるが、現時点ではかなり困難である。その場合、発症及び症状の進行を遅らせる方向に持ってゆくことも一つの方法であり、そのためには成人型と乳幼児型との間での疾患発症機序の違いを解析する必要がある。今後、今回同定された遺伝子に関して、RT-PCR 法などを用いてさらに解析してゆく予定である。また、二次元蛋白泳動の結果についても報告する。

[7] 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療

国立成育医療センター遺伝診療科 奥山 虎之

ムコ多糖症 VII 型 (MPSVII) はライソゾーム蓄積病の一つで、 β -glucuronidase (GUSB) が欠損しているため、全身のライソゾーム内に GUSB の基質であるグリコサミノグリカンが過剰蓄積し、ガルゴイル顔貌、骨の発達異常、肝脾腫、角膜混濁、難聴、精神発達遅滞をきたす常染色体劣性遺伝病である。現在我々は、自己複製能と多分化能を持つ神経組織由来の細胞であり、移植後周囲の微小環境の影響によりレシピエントの脳組織に組み込まれやすい神経幹細胞に着目し、MPSVII マウスに対する神経幹細胞の脳内移植実験を行っている。本年度は、今回は、1) 神経幹細胞のドナー細胞としての有用性の検討と、2) 神経幹細胞をマウスの脳室内に移植した後の脳内分布と生着の検討を行った。

〔対象および方法〕 神経幹細胞は、受精後 14 日目のマウスの胎児の線状体からニューロスフェア法を用いて選択的に培養した。1) 神経幹細胞のドナー細胞としての有用性の指標として、①神経幹細胞の細胞表面マーカーの発現、②神経幹細胞の内因性リソゾーム活性の定量を行った。2) 神経幹細胞の移植後の脳内分布と生着に関しては、移植後 24 時間後・3 週間後に評価を行った。

〔結果〕 1) 神経幹細胞は、MHC class II、CD80、CD86、ICAM I 等の細胞表面抗原が発現しておらず、抗原提示能が低くドナー細胞として適していることが示された。また、神経幹細胞は GUSB のみならず、その他の内因性リソゾーム酵素活性も高いことが明らかとなった。2) 移植 24 時間後、海馬レベルでは脳室周囲にドナー細胞が塊状に分布し、嗅球レベルでは列状に分布していた。移植後 3 週間時に、MPSVII マウスの脳内の GUSB 活性値とその分布を評価したところ、正常マウスの 1-2% 程度の GUSB 活性の増加を認めた。また、GUSB 活性の脳内での明らかな分布の偏りは認めなかった。

〔考察〕 神経幹細胞は抗原提示能が低くドナー細胞に適していると判断した。GUSB およびその他の内因性リソゾーム酵素活性は高く、MPS VII を含め多くの中樞神経病変を伴うリソゾーム蓄積病に適用出来る可能性が示唆された。マウスの脳室内に投与した神経幹細胞は、脳内に広く分布することから、MPS VII をはじめとする脳の広範な神経変性疾患の治療にも応用可能であると思われる。

[8]ヒト組換え β -ヘキソサミニダーゼと Sandhoff 病モデル系を用いた新規酵素補充療法の開発研究

徳島大学薬学部附属医薬資源教育研究センター・環境生物工学分野

伊藤 孝司

【序論】GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム性 β -ヘキソサミニダーゼ A (β -Hex A) または GM2 アクチベータータンパク質の欠損により GM2 ガングリオシド (GM2) の過剰蓄積および中枢神経症状を伴って発症する遺伝性糖質代謝異常症である。本研究では近年実用化されているリソソーム病の組換え酵素補充療法を GM2 ガングリオシドーシスの治療に応用することを目的とし、哺乳類細胞株におけるヒト β -Hex A の発現系の構築、補充効果評価のための欠損モデルマウス脳由来の細胞株の樹立、X 線結晶構造に基づく酵素分子のデザイン等の検討を行った。

【方法】 β -Hex A は、相同性を示す二種の α および β -サブユニットから構成されるが、このうち β 鎖遺伝子の破壊により作製された Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) の新生児の脳初代培養系に SV40 T 抗原およびヒト TERT 遺伝子を導入し、不死化細胞株を樹立した。また CHO 細胞株にヒト α または β 鎖遺伝子を導入し、各々の単独および同時恒常発現株を得た。さらに本年4月に解明されたヒト Hex B ($\beta\beta$ ホモダイマー) の X 線結晶構造を基に、相同性と構造類似性を示す Hex A ($\alpha\beta$ ヘテロダイマー) の分子モデルを構築した。

【結果】SV40T 抗原および TERT 遺伝子を発現する SD マウス新生児大脳由来の細胞株が得られ、Nestin, A2B5, O4 などの分化マーカー陽性を示した。ヒト α または β 鎖を各々単独および同時発現する CHO 細胞株が得られ、 β 鎖単独発現株からは Hex B が、また同時発現株からは Hex A 活性が分泌され、特に後者が Sandhoff 病患者由来の培養皮膚繊維芽細胞内に取り込まれ、蓄積する GM2 を効率よく分解した。さらに分子モデリングによりヒト Hex B ($\beta\beta$) および Hex A ($\alpha\beta$) の各々のダイマー形成に関わるアミノ酸残基が予測された。

【考察・結論】初めて樹立された SD マウスの大脳由来の不死化細胞株はグリア前駆細胞としての性質を示し、今後培養系での酵素補充効果の評価に利用できると考えられた。またヒト α および β 鎖遺伝子を同時発現する哺乳類細胞株で得られる組換え Hex A が、酵素補充療法に有効である可能性が示された。さらに各 β -Hex アイソザイムの分子モデリングによりサブユニット間の相互作用に関与するアミノ酸残基が推測され、これらのアミノ酸置換により機能改変型酵素の分子デザインが可能になった。

[9] 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子と分子病態

国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第一部

西野一三、野口悟、埜中征哉

【背景】縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (Distal myopathy with rimmed vacuoles; DMRV) は、1981年に埜中らにより世界に先駆けて報告された疾患で、青年期から成人期にかけて発症する常染色体劣性の筋疾患である。前脛骨筋が好んで侵され、大腿四頭筋が侵されにくいことが特徴である。病理学的には、縁取り空胞とよばれる自己食空胞塊が多数出現することが特徴で、オートファジー/ライソゾーム系が活性化されている。1983年に Argov らにより quadriceps sparing myopathy (QSM) として報告され、その後、主に欧米で遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy; HIBM) と呼ばれている疾患と臨床病理学的に極めて良く類似していることが知られていた。最近、HIBM の原因遺伝子がシアル酸合成経路の律速段階酵素 UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE/MNK) をコードする GNE 遺伝子であることが明らかにされた。

【目的】DMRV も GNE 遺伝子変異を原因とするのか、また、そうであるなら GNE 遺伝子変異によりどのようにして DMRV を発症するのかを検討する。

【方法】患者検体において GNE 遺伝子のシーケンスを行う。見出された変異について組換え蛋白を合成し、GNE/MNK 活性を測定する。患者細胞・組織においてシアリル化の程度を検討する。

【結果】これまでに39例の患者においてホモ又は複合ヘテロ接合型の変異を見出した。1つのエクソスキッピングを除いて、すべてミスセンス変異であった。GNE ドメインの変異では GNE 活性が、MNK ドメインの変異では MNK 活性が低下していた。患者細胞では、シアリル化が低下していたが、GNE 代謝産物の投与により回復した。強い糖修飾を受けている α -dystroglycan や LAMP-2 にはウェスタン解析上異常が見られなかった。

【結論】DMRV は GNE 遺伝子の機能喪失型変異により発症している。シアリル化異常は補正可能であり、治療法開発に応用出来る可能性がある。