

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担）研究報告書

ライソソーム病の病態解明、治療法の開発

（分担）研究者 酒井規夫

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

リソソーム病のなかで代表的な遺伝性脱髄疾患の1つであるクラッペ病の病態解明をめざすために、遺伝子解析を行った。日本人19例についてリンパ球ないし培養皮膚線維芽細胞から抽出したゲノムDNAを用いて全エクソンを増幅し、変異をDHPLC法にてスクリーニングする方法を確立した。新規変異4つを含む19変異を確認した。

C. 研究結果

A. 研究目的

クラッペ病の病態解明；クラッペ病は遺伝性脱髄疾患の重要な鑑別疾患であり、近年は早期の骨髄移植が有効な治療法であることが解明されている。日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。

B. 研究方法

クラッペ病の病態解明；当科で生化学的に診断した患者19名（乳児型16例、乳幼児型2例、成人型1例）を対象に、文書を用いて同意を得た後に、リンパ球ないし培養皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出した。全エクソンをPCR法にて増幅しDenaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC法)にて変異をスクリーニングし、変異の疑われるエクソンに関してDirect Sequence法にて変異同定を行った。

クラッペ病の病態解明；当科で診断した日本人19例における遺伝子解析の結果を下記のリストに示す。DHPLC法にてまだ半数の変異が判明していないため、今後更に解析を進める予定である。

No.	phenotype	genotype	polymorphism
1	I	P302A/W115X	I289V
2	J	W647X/I66M	
3	I	I2Del-3ins/R204X	I289V
4	I		
5	I	R204X/I234T	I289V
6	I	I2Del-3ins/?	
7	I	L364R/T652P	I289V
8	I	L618S/?	
9	I	1base del/I546T	
10	A		
11	I		O312Q/
12	I		
13	unknown		

14	I		0312Q/
15	A		I289V/I289V
16	I		I289V/0312Q
17	I	12Del3ins/T652P	0312Q/
18	I	R515H/?	
19	J	12Del-3ins/?	

D. 考察

クラッペ病の病態解明；日本人クラッペ病に 12Del-3Ins が多いことが確認され、これに関しては制限酵素の RFLP を用いて簡便に検出できる。また新規の変異が 4 種類同定されたので、この酵素活性にあたる影響などを発現実験で確認する予定である。今後若年型、成人型は骨髄移植の良い適応にもなると考えられるので、どのような変異が軽い病型に対応するのか解析してゆきたい。

E. 結論

リソソーム病は全体としては 5000 人に 1 人出生するといわれ、今後、酵素補充療法、骨髄移植、遺伝子治療など先進医療の標的疾患として注目を集めてゆくと考えられる。40 種類以上あるとされるリソソーム病であるが、その一つ一つの疾患の病態を更に深く解明することが、今後の治療の成功に結びつくことになり、これからもこのような研究努力をすることは重要と考えられる。

G. 研究発表

論文発表

1) 小児内科 vol 35, 494-497; 2003 ムコリピドーシス II, III 型、酒井規夫

1) Chikara Kokubu, Bettina Wilm, Tomoko Kokubu, Matthias Wahl, Isabel Rodrigo, Norio Sakai, Fabio Santagati, Yoshihide Hayashizaki, Misao Suzuki, Ken-ichi Yamamura, Kuniya Abe and Kenji Imai, Undulated short-tail Deletion Mutation in the Mouse Ablates Pax1 and Leads to Ectopic Activation of Neighboring Nkx2-2 in Domains that Normally Express Pax1, *Genetics* 165: 299-307, 2003

学会発表

第 9 回リソソーム病研究会：03.12.04, 東京

若年型糖原病 II 型 3 例における睡眠時呼吸障害とその治療について

酒井規夫、青天目信、神尾範子、谷池雅子、立花直子、大菌恵一

第 46 回 日本先天代謝異常学会：03.11.20-22, 松江

日本人 Hallervorden-Spatz 症候群患者の遺伝子解析

赤木幹弘、酒井規夫、許成哲、塚本浩子、滝澤昇、乾幸治、谷池雅子、大菌恵一

若年型糖尿病 II 型 2 姉妹例における睡眠時無呼吸の PSG 解析と NIPPV による治療効果

小泉真琴、高尾綾子、青天目信、神尾範子、酒井規夫、谷池雅子、乾 幸治、立花直子、大菌恵一

第 45 回 日本小児神経学会総会：03.05.22-24, 福岡

マラソン後に急速な四肢の筋力低下をきたした CPEO1 症例の臨床的、神経病理学的検討

酒井規夫、山田 穰、青天目信、神尾範子、沖

永剛志、今井克美、乾 幸治、大藪恵一
鼻咽腔閉鎖不全をきたした糖原病 II 型の姉妹例
三好洋子※：清水一男※，山田 穰，酒井規夫，
乾 幸治
長期生存した乳児型 Alexander 病 1 例の神経病理
と遺伝子解析
酒井規夫：山田 穰，乾 幸治，大藪恵一
小児 ALD に対する臍帯血移植の経験、diffusion MRI
と遺伝子解析について
岩合晃子：酒井規夫，榊原理恵，沖永剛志，下
野九理子，今井克美，津留 陽※，大藪恵一，
乾 幸治
第 21 回臨床細胞分子遺伝研究会；03. 6. 14
白血球増多を来した idic(Y) をキメラで持つ 1

症例
酒井規夫、谷池雅子、藤崎弘之、指原淳志、大
藪恵一
第 3 回関西出生前診療研究会；03. 02. 22，大阪
双胎妊娠における Myotonic Dystrophy の出生前
診断
酒井規夫、和田和子、金川武司、下屋浩一郎、
村田雄二、館延忠、乾 幸治、大藪恵一
第 20 回臨床細胞分子遺伝研究会；03. 1. 15
Isodicentric chromosome 15 の 1 症例と文献的
考察
酒井規夫、谷池雅子、藤崎弘之、指原淳志、大
藪恵一

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

レクチンを利用したシアル酸含有糖複合体の検出：シアリドーシス
およびガラクトシアリドーシスにおける蓄積物質の同定

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

ライソゾーム病の発症機構を解明し、新規に開発された治療法を評価するためには、当該疾患の患者細胞内に蓄積する物質を同定する手段が必要である。我々は、一次的および二次的なライソゾーム性シアリダーゼの活性低下により発生するシアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスにおいて蓄積する糖複合体の検出法を開発するため、レクチンを利用した染色およびプロットングを試みた。その結果、レクチンの中で、イヌエンジュ由来の *Macckia amurensis* を用いた染色やプロットングにより、これらの疾患の患者由来の培養線維芽細胞中に蓄積するシアル酸含有糖複合体が検出できることを見出した。この方法は高感度で容易であるため、病態解析や診断、さらには、治療法の評価にも役立つと期待される。

A. 研究目的

ライソゾーム性シアリダーゼは、シアル酸含有糖複合体の非還元末端に存在するシアル酸残基を加水分解する機能を有する。このライソゾーム性シアリダーゼの活性低下により、シアリドーシスとガラクトシアリドーシスが発生する。前者は、一次的なライソゾーム性シアリダーゼの活性低下により、また、後者は同酵素の活性化に働くライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A の異常に基づく二次的酵素活性低下により、シアル酸含有糖複合体の分解が障害されて細胞内に蓄積すると考えられる。

最近、これらの疾患に対する治療法開発のための実験的研究が開始され、その評価のための効果的方法が求められている。治療法評価においては、患者の細胞内に蓄積しているシアル酸含有糖複合体を分解処理できるかが重要となる。しかし、これまでに報告された方法は、糖複合体を精製した後にマススペクトロスコーピーや高速液体クロマトグラフィーなどで検出する手順を含むため、手間がかかり、多くの試料を必要とする。そこで特定の糖を認識するレクチンを利用して、当該疾患で蓄積するシアル酸含有糖複合体の検出法を開発を試みた。

B. 研究方法

a) レクチンと抗体

biotin を結合させた *Macckia amurensis* (MAM, Sia α 2-3Gal を認識)、*Datura stramenium* (DSA, Gal β 1-4GlcNAc を認識)、*Phaseolus vulgaris* (PHA, GalNAc を認識)、*Arachis hypogaea* (PNA, Gal β 1-3GlcNAc>Gal を認識) および Wheat germ agglutinin (WGA, GlcNAc を認識) は、生化学工業 (東京) から購入した。リソソームのマーカである lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) に対する抗体は Southern Biotechnology (Birmingham, AL, 米国) から購入した。また、Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ と streptavidin-fluorescein isothiocyanate (SAv-FITC) は、それぞれ Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, 米国) と BD Bioscience (San Jose, CA, 米国) から購入した。Peroxidase-conjugated mouse anti-biotin は Zymed (San Francisco, CA, 米国) から購入した。

b) 培養線維芽細胞

すでに診断が確定しているシアリドーシスの 2 名の患者、ガラクトシアリドーシスの 2 名の患者と正常対照の 2 名由来の培養線維芽細胞を試料として用いた。

c) レクチンと抗体による 2 重染色

線維芽細胞を Lab-Tek chamber slide (Nunk, Naperville, IL, 米国) で培養し、4% の paraformaldehyde で固定した。その

後、細胞を phosphate-buffered saline で洗滌し、1% の bovine serum albin で処理した。次に、biotin-conjugated MAM, DSA, PHA または WGA と抗 LAMP-1 抗体を用いて反応させた後に、Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ と SAv-FITC で処理し、共焦点レーザー走査型イメージングシステム (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, ドイツ) を装備した蛍光顕微鏡 (Axiovert 100M, Carl Zeiss) で観察した。

d) ウエスタンブロッティング

培養線維芽細胞の破砕液を試料として、非還元条件下で sodium dodecyle sulfate polyacrylamide ゲル電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon, 日本ミリポア、東京) に転写した。転写膜を biotin 化した MAM で処理し、peroxidase-conjugated mouse anti-biotin で反応させた。MAM で反応したバンドは chemiluminescent detection system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, 英国) で可視可した。

(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) レクチン染色

MAM を用いたレクチン染色により、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス患者細胞で顆粒状の強い染色性が認められ

た。その局在は LAMP-1 のそれに一致した。一方、正常対照者の細胞では、MAM に対する染色性は認められなかった。また、DSA、PHA、PNA および WGA に対する染色性に関しては、当該患者細胞と正常対照者細胞との間に差がみられなかった。

b) ウェスタンブロッティング

培養線維芽細胞の破碎液を試料としたウェスタンブロッティングを行った所、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスでは、高分子量領域に MAM に反応するバンドが認められた。正常対照では、MAM に反応するバンドはみられなかった。

D. 考察

細胞化学的および生化学的方法で、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスの患者由来の培養線維芽細胞中に MAM に反応する物質が存在し、それはリソソームに局在することが確認された。MAM は Sia α 2-3Gal に反応することから、本法は、当該疾患で蓄積するシアル酸含有糖複合体を検出していると考えられる。本法は、従来の方法に比べて、簡便であり、少数の細胞で分析可能であることから、診断や治療法の評価に有用と考えられる。

E. 結論

レクチン MAM を利用した細胞化学染色やウェスタンブロッティング法で、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスの細胞中に蓄積するシアル酸含有糖複合体を検

出することが可能であった。

F. 謝辞

本研究は、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によって行われた。

G. 文献

Kotani, M., Yamada, H., Sakuraba, H. :
Cytochemical and biochemical
detection
of intracellularly accumulated sialyl
glycoconjugates in sialidosis and
galactosialidosis fibroblasts with
Maccia amurrensis. Clin. Chim. Acta, in
press

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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(NPD)A・B型は酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)異常により後期エンドソーム・ライソゾームにスフィンゴミエリンとコレステロールの蓄積する疾患である。ASMはライソゾーム蛋白であるがサイトカインなどの刺激により細胞外に分泌される。ライソゾームへのターゲティング(targeting)および細胞外分泌に関するASMの構造的特徴を明らかとする目的で、ASMのlysine残基に関しCOS-1細胞を用いた発現系で検討した。⁹³lysineをalanineに変換したASMはライソゾームへの輸送が減少すると同時に細胞外分泌が増加しており、⁹³lysineがASMの構造上targetingに関与していることが明らかとなった。ASM-GFP(Green Fluorescence Protein)融合蛋白を用い⁹³lysine→alanineの影響を共焦点レーザー顕微鏡で観察しえた。

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)の異常により後期エンドソーム・ライソゾームにスフィンゴミエリン(SM)とコレステロールが蓄積する疾患である。ASMはライソゾームにて加水分解酵素(I-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Zn²⁺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中に存在するZn²⁺の結合が得られる。一方細胞外分泌ASM(s-ASM: secretory ASM)はZn²⁺結合がなされずその酵素活性測定バッファにZn²⁺の添加が必要とされる。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、I-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。細胞外刺激に対するASMの細胞内動態に関して理解することは本疾患の病態を考える上で重要と考えた。本研究ではNPDA・B型の病態解明を目的としてASMのライソゾームへの輸送(trafficking)に関与するASM蛋白の構造上の特徴を明らかとする検討を行った。

B. 研究方法

1) ASMのlysine残基構造に関する検討

Cathepsin Dなどの解析によりライソゾーム蛋白がGlcNAc-phosphotransferaseに認識されリン酸化を受けるのには、そのリジン残基の3次構造が決定因子であることが海外のグループにより実験的に明らかにされた。その実験では特定のリジン残基をアラニンに変換するとライソゾームへの輸送が減少し細胞外分泌が増加する。ASMにおけるリジン残基のライソゾーム輸送への関係をみるために、

ASM に存在する 13 個のリジン残基をそれぞれアラニン残基に改変した蛋白を哺乳細胞に発現させた。全長 ASM cDNA に存在する 13 個のリジンに対応するコドンそれぞれアラニンコドンに PCR-overlapping 法を用いて改変し 13 個の変異 ASM cDNA を作成した。それぞれの変異 ASM cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター p91023(B) にサブクローンし、COS-1 細胞にトランスフェクションし細胞内および培地中の ASM 酵素活性を測定した。酵素活性の測定は酵素液あるいは培養培地 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 1 時間あるいは 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。

2) ASM-GFP 融合蛋白を用いた検討

1) の結果から 93 lysine の変異(K93)がライソゾームへの輸送と細胞外分泌に関与していることが明らかとなったが、このことを ASM-GFP の融合蛋白を用いて調べた。wild-type ASM-GFP と K93 ASM-GFP を COS-1 細胞に一過性発現させ細胞内および培地中の酵素活性を測定した。COS-1 細胞に発現された wild-type ASM-GFP と K93 ASM-GFP を共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss 510 META)にて観察した。

C. 研究結果

1) ASM の lysine 残基構造に関する検討

13 個の変異 ASM cDNA(K93, K104, K105,

K118, K124, K183, K187, K249, K305, K347, K419, K433, K576)を COS-1 細胞に発現させ細胞内 ASM 活性を EDTA バッファーで培地中 ASM 活性を Zn^{2+} バッファーで測定し、正常 ASM cDNA の発現活性値と比較した。その結果 ASM 活性の変化について以下 5 グループに分類された。①両者の活性に変化がない(K104)、②両者が低下する(K249, K305, K419, K433, K576)、③細胞内活性は低下しないが培地中活性は低下(K105, K118, K124, K183)、④細胞内活性が低下(K187, K347)、⑤細胞内活性が低下するが培地中活性は上昇(K93)。

K93 は細胞内では正常 ASM cDNA 発現活性(303.0 \pm 22.1 nmol/mg/hr)に対して約 60% の低値(182.7 \pm 31.2 nmol/mg/hr)を示していたが、培地中では正常 ASM cDNA (407.3 \pm 72.8 nmol/mg/hr) に対して K93 は約 120% (478.1 \pm 112.6 nmol/mg/hr)の上昇を示していた。

2) ASM-GFP 融合蛋白を用いた検討

wild-type ASM-GFP と K93 ASM-GFP の酵素活性の測定結果は、ASM-GFP 融合蛋白においても 93 lysine の変異(K93)がライソゾームへの輸送を減少させ同時に細胞外分泌を増加させる同様の効果を示していた。2つの蛋白に関して COS-1 細胞内の分布に関して共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ wild-type ASM-GFP が核周囲に強く発現しており細胞膜にかけて発現が弱くなっていた(図 1)。一方、K93 ASM-GFP は核周囲から細胞膜にかけて均一に強く発現していた(図 2)。この結果は酵素活性の結果と一致していた。

D. 考察および結論

発現実験において 93 リジン残基をアラニンに変換させると細胞内 ASM すなわちライソゾーム ASM に対する分泌 ASM の割合が上昇することを確認した。このことは 93 リジン残基が ASM の構造上重要なアミノ酸であることを示していた。

図 1

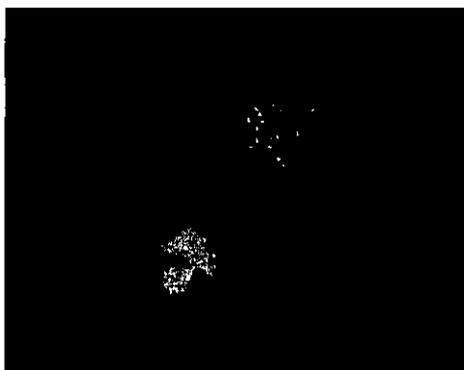
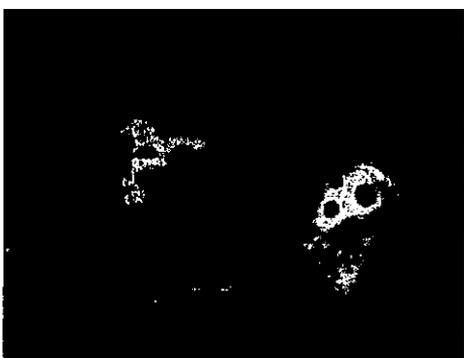


図 2



研究成果の刊行に関する一覧表

<書籍>

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
衛藤義勝	ニーマンピック病、	大関武彦 古川 漸 横田俊一郎	今日の小児治療指針 第13版	医学書院	東京	2003	161-2
高田五郎	糖原病 I・III・VI 型	大関武彦 古川 漸 横田俊一郎	今日の小児治療指針 第13版	医学書院	東京	2003	151
大野耕策	Gaucher 病	大関武彦 古川 漸 横田俊一郎	今日の小児治療指針 第13版	医学書院	東京	2003	161
大野耕策	神経回路網障害を中心とした脳発達障害研究の進歩－ニーマン・ピック病C型の神経変性機構の分子機構	杉田・高橋(編).	脳科学研究の現状と課題.	じほう	東京	2003	188-200
大和田 操	3.6 わが国における小児糖尿病の現況－予後を中心に－	腎不全予防医学調査研究委員会編	腎不全治療マニュアル JAN. 2003	日本透析医会		2003	74-8
大和田 操	Wilson 病	大関武彦 古川 漸 横田俊一郎	今日の小児治療指針 第13版	医学書院	東京	2003	165
鈴木康之	サンドホフ病、ツェルバーガー症候群、プロピオン酸血症、 β -ケトチオラーゼ欠損症、リソソーム蓄積症.		医学大辞典	医学書院	東京	2003	
鈴木康之	ムコ多糖症、ムコリピドーシス	大関武彦	今日の小児治療指針 13版	医学書院	東京	2003	
桜庭 均, 奥宮敏可	ファブリー病の病態生理学.	衛藤義勝/編	Fabry 病：基礎から臨床までの最近の知見	ジャパンメデイアートパブリッシング	東京		印刷中
桜庭 均	ファブリー病の酵素補充療法	伊藤克己, 遠藤 均, 御手洗 哲也, 東原英二, 秋澤忠男/編	Annual Review 腎臓 2004	中外医学社	東京	2004	231-6

<雑誌>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura T, Ohashi T, Kikuchi T, Kiyota H, Eto Y, Ohishi Y.	Antitumor immunity against bladder cancer induced by ex vivo expression of CD40 ligand gene using retrovirus vector	Cancer Gene Ther	10	833-9	2003
Meng XL, Shen JS, Ohashi T, Maeda H, Kim SU, Eto Y.	Braintransplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse	J Neurosci Res	74	266-77	2003
Kobayashi H, Fujisawa K, Saito Y, Kamijo M, Oshima S, Kubo M, Eto Y, Monma C, Kitamura M.	A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of Clostridium botulinum type Ab	Jpn J Infect Dis	56	73-4	2003
Arita J, Tomikawa M, Matsushima H, Eto Y, Morikawa T	[Rhythmic fast activity on EEG in a patient with Mollaret's meningitis]	No To Hattatsu. Japanese	35	239-42	2003
Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K.	Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils	Gene Ther.	10	426-33	2003
Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen JS, Takeda Y, Arakawa Y, Ogawa J, Oyanagi K, Ohashi T, Watanabe K, Inoue K, Eto Y, Watabe K.	Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF beta 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion	J. Neurosci. Res	72	54-64	2003
Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Okamoto A, Suzuki T, Shen JS, Tanaka T, Kawamura T, Hosoya T.	Gene delivery using human cord blood-derived CD34+cells into inflamed glomeruli in NOD/SCID mice	Kidney Int	10	833-9	2003
Yokoo T, Sakurai K, Ohashi T, Kawamura T.	Stem cell gene therapy for chronic renal failure	Curr Gene Ther	3	387-94	2003
Anzai C, Morokawa N, Okada H, Kamidono S, Eto Y, Yoshimura K.	CFTR gene mutation in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens	J Cystic Fibrosis	2	14-8	2003
衛藤義勝	Fabry 病	小児内科	35	1380-3	2003
衛藤義勝	先天代謝異常症-33 Fabry 病	小児内科	35	461-7	2003
衛藤義勝	酵素補充療法の最近の進歩	小児科	44	1342-52	2003
衛藤義勝	Fabry 病	小児内科	35	1380-3	2003
衛藤義勝 大橋十也 他	ファブリー病患者に対する α -ガラクトシダーゼ A 補充療法の多施設臨床試験成績	小児科臨床	56	133-43	2003
衛藤義勝 大橋十也 他	日本人ファブリー病患者における酵素補充療法: 第 II 相オープン試験の結果	小児科診療	8	1435-4	2003
衛藤義勝	てんかんと遺伝相談	小児科診療	10	1691-7	2003
大橋十也	ロイコジストロフィー	小児内科	35	451-4	2003
井田博幸	酵素補充療法	小児科	44	677	2003
井田博幸	標的遺伝子治療	小児科	44	703-4	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井田博幸	酵素補充療法の現状と未来	小児科	44	1920-8	2003
Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y.	Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} -gangliosidosis	Proc Natl Acad Sci USA	100	15912-7	2003
Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A.	Attenuation of ganglioside G_{M1} accumulation in the brain of G_{M1} gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer	Gene Ther	10	1487-93	2003
Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y.	Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} -gangliosidosis	Proc Natl Acad Sci USA	100	15912-7	2003
渡辺順子 芳野 信	Fabry 病患者血中のサイトカインなどの動態	日本先天代謝異常学会雑誌	19	119	2003
渡辺順子 芳野 信	Gaucher 病 I 型患者におけるサイトカインなどの動態	日本先天代謝異常学会雑誌	19	109	2003
田中あけみ、他	ムコ多糖症の臨床と病理	病理と臨床	22	45-9	2004
Maeda M. et al.	Vesicular acetylcholine transporter can be a morphological marker for the reinnervation to muscle of regenerating motor axons.	Neuroscience Res	48	305-14	2004
田中あけみ、他	ガングリオシドーシス (GM1 ガングリオシドーシスおよび GM2 ガングリオシドーシス)	小児内科	35	455-60	2003
田中あけみ	胎児期に発生した疾患の遺伝カウンセリングと予後—先天性代謝異常症	周産期医学	33	1157-9	2003
Matsuzawa F. et al.	Structural basis of the GM2 gangliosidosis B variant	J Hum Genet	48	582-9	2003
Tanaka A. et al.	Different attenuated phenotypes of GM2 gangliosidosis variant B in Japanese patients with HEXA mutations at codon 499, and five novel mutations responsible for infantile acute form	J Hum Genet	48	574-4	2003
Takaura N. et al.	Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal gene transfer	Gene Therapy	10	1487-93	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Migita M, Hamada, H, Fujimura, J, Watanabe, A, Shimada T, Fukunaga. Y.	Glucocerebrosidase level in the cerebrospinal fluid during enzyme replacement therapy - unsuccessful treatment to the neurological abnormality of type 2 Gaucher disease	Eur. J. Paed	162	524-5	2003
Igarashi T, Miyake K, Kato K, Watanabe A, Ishizaki M, Ohara K, Shimada T.	Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model	Gene Ther	10	219-26	2003
Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki, H, Yamada, M, Furuya, T, Migita M, Shimada, T, Mizuno, Y, Urabe T.	Migration of EGFP expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia	Neuroscience	117	531-9	2003
Inokuchi, K, Dan K, Takatori M, Takahuji H, Uchida, N, Inami M, Honda, H, Hirai H, Shimada T.	Myeloproliferative disease in transgenic mice expressing P230 Bcr/Abl: longer disease latency, thrombocytosis and mild leukocytosis	Blood	102	320-2.	2003
Migita M, Uchikoba Y, Oriomo H, Shimada, Matsumoto T, Hayakawa J, Fujino O, Saitoh M, Fukunaga Y.	Genetic diagnosis of Werdnig-Hoffmann disease-A problem for application to prenatal diagnosis	J. Nippon Med. Sch	70	45-8.	2003
Migita, M, Shimada T, Hayakawa J, Morita T, Fukunaga, Y.	Home treatment with enzyme replacement therapy for Gaucher disease	Pediatr. Int	45	363-5	2003
Sugiyama O, Orimo H, Suzuki S, Yamashita K, Ito H, Shimada T.	Bone formation following transplantation of genetically modified primary bone marrow stromal cells	J. Orthop. Res	21	630-7	2003
Furuya T, Tanaka R, Urabe T, Hayakawa J, Migita M, Shimada T, Mizuno, Y, Mochizuki H.	Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders	NeuroReport	14	629-31	2003
Furuya T, Tanaka R, Urabe T, Hayakawa, J, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H.	Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders	NeuroReport	14	629-31	2003
Choi J.B, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, Migita M, Shimada T, Kawamori R, Watada H.	Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta-cells	Diabetologia	46	1366-74	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Orimo H, Goseki-Sone M, Inoue M, Tsubakio Y, Sakiyama T, Shimada T.	Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia	J. Bone Miner. Metab	20	28-33	2003
Kokubu C, Wilm B, Kokubu T, Wahl M, Rodrigo I, sakai N, Santagati F, Hayashizaki Y, Suzuki M, Yamamura K, Abe K, Imai K.	Undulated short-tail Deletion Mutation in the Mouse Ablates Pax1 and Leads to Ectopic Activation of Neighboring Nkx2-2 in Domains that Normally Express Pax1	Genetics	165	299-307	2003
酒井規夫	ムコリピドーシス II・III 型	小児内科	35sup	494-7	2003
Tanaka Y, Takayanagi M, Shiratori Y, Imai Y, Obi S, Tateishi R, Kanda M, Fujishima T, Akamatsu M, Koike Y, Hamamura K, Teratani T, Ishikawa T, Shiina S, Kojiro M, Omata M.	Congenital absence of portal vein with multiple hyperplastic nodular lesions in the liver	J Gastroenterol	38	288-94	2003
Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M.	Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination	J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci	792	63-72	2003
Matsuda J, Suzuki O, Oshima M, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y.	Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis	Proc Natl Acad Sci USA	100	15912-7	2003
Ono H, Sakura N, Yamashita K, Yuasa I, Ohno K.	Novel nonsense mutation (R194X) in the PMM2 gene in a Japanese patient with congenital disorder of glycosylation type Ia	Brain Dev	25	525-8	2003
Matsuzawa F, Aikawa SI, Sakuraba H, Lan HT, Tanaka A, Ohno K, Sugimoto Y, Ninomiya H, Doi H.	Structural basis of the GM2 gangliosidosis B variant	J Hum Genet	48	582-9	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pipo JR, Feng JH, 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 GSDII (Pompe disease)	Pediatr Neurol	29	284-7	2003
大野耕策、二宮治明	ニーマン・ピック病C型の分子病態	遺伝子医学	7	86-92	2003
衛藤 義勝, 大橋 十也, 今井 裕一, 厚東 篤生, 松本 義也, 宮武 邦夫, 藤脇 建久, 西 美和, 岡山 昭彦, 納 光弘, 大和田 操, 松尾 清一, 両角 國男, 重松 秀一, 北川 照男	ファブリー病患者に対する α -ガラクトシダーゼA補充療法の多施設臨床試験成績	小児科臨床	56	133-43	2003
大和田 操	日本人ファブリー病患者における酵素補充療法: 第II相オープン試験の結果	小児科診療	66	151-60	2003
中川万樹生、浦上達彦、大和田 操	新生児マス・スクリーニングで発見された先天性甲状腺機能低下症36例の長期追跡	日本マス・スクリーニング学会誌	13	47-53	2003
大和田 操	高フェニルアラニン血症とともに歩んだ道	日本先天代謝異常学会雑誌	19	14-19	2003
大和田 操	「先天性代謝異常症, 等の新生児マス・スクリーニング」における異常への対応	周産期医学	33	29-32	2003
大和田 操	肝型糖原病に伴う成長障害とその予防	小児内科	35	443-6	2003
大和田 操	先天代謝異常症等の新生児マス・スクリーニングへのかかわり	東京都予防医学協会年報平成15年度版	32		2003
大和田 操	フェニルケトン尿症 (フェニルアラニン水酸化酵素異常症)	小児内科	35	306-10	2003
大和田 操	先天代謝異常症	南山堂 治療	85	67-71	2003
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 GSDII (pompe disease)	Pediatr Neurol	29	284-7	2003
Hara K, Fukushima T, Suzuki T, Shimohata T, Oyake M, Ishiguro H, Hirota K, Miyashita A, Kuwano R, Kurisaki H, Yomono H, Goto J, Kanazawa I, Tsuji S.	Japanese SCA families with a distinct phenotype linked to a locus overlapping with SCA15 locus	Neurology	62	648-51	2004
辻野精一	糖原病II型 (酸性マルターゼ欠損症)	小児内科	35(sup)	398-400	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady R O, Suzuki Y.	Chemical Chaperone Therapy for Brain Pathology in G _{M1} -Gangliosidosis	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>			in press
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 patient with GSDII (Pompe disease)	<i>Pediatr Neurol</i>			in press
Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A.	Attenuation of Ganglioside GM1 Accumulation in the Brain of GM1 gangliosidosis Mice by Neonatal Intravenous Gene	<i>Gene Therapy</i>	10	1487-93	2003
Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii K, Suzuki Y, et al.	Development and Testing of New Screening Method for Keratan Sulfate in Mucopolysaccharidosis IVA	<i>Pediatric Research</i>			In press
Y Jia, C Qi, Z Zhang, T Hashimoto, M Rao, S Huyghe, Y Suzuki, Van Veldhoven, M Baes, J Reddy.	Overexpression of PPAR α regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D- forms of enoyl-CoA hydratase / dehydrogenase enzymes of peroxisomal β -oxidation system	<i>J Biol Chem</i>			In press
Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJA, Kondo N.	Gas Chromatography / Mass Spectrometry Analysis of Very Long Chain Fatty Acids, Docosahexaenoic acid, Phytanic Acid and Plasmalogen for the Screening of Peroxisomal Disorders	<i>Brain & Development</i>	25	481-7	2003
Itoh K, Satoh Y, Kadota Y, Oheda Y, Kuwahara J, Shimamoto M, Sakuraba, H.	Expression of lysosomal protective protein/cathepsin A in a stably transformed human neuroblastoma cell during bi-directional differentiation into neuronal and Schwannian cells	<i>Neurochem. Int</i>			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kotani M, Yamada H, Sakuraba H.	Cytochemical and biochemical detection of intracellularly accumulated sialyl glycoconjugates in sialidosis and galacto-sialidosis fibroblasts with <i>Macckia amurensis</i>	Clin. Chim. Acta			in press
Sakuraba H, Matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Kotani M, Fukushige T, Kanzaki T.	Structural and immunocytochemical studies on α -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease)	J. Hum. Genet	49	1-8	2004
桜庭 均	ファブリー病の診断と最近の酵素補充療法の進歩	SRL 宝函	27	127-32	2003
桜庭 均	Fabry病へテロ接合体の臨床像とその診断	小児科	44	1803-9	2003
桜庭 均	リソソーム病	別冊・日本臨床領域別症候群シリーズ 特集：精神医学症候群 II	39	470-5	2003
桜庭 均	シアリドーシスとガラクトシアリドーシス	小児内科増刊号 小児疾患診療のための病態生理	2	488-93	2003
桜庭 均	リソソーム病—最近の酵素補充療法の開発状況	医学のあゆみ	204	460-1	2003
衛藤義勝, 大橋十也, 宇都宮保典, 藤原優子, 水野愛子, 乾幸治, 酒井規夫, 北川照男, 鈴木義之, 望月正武, 河上牧夫, 細谷龍男, 大和田 操, 桜庭均, 齊藤博久	日本人ファブリー病患者における酵素補充療法：第 II 相オープン試験の結果	小児科診療	66	1435-44	2003
Matsuzawa F, Aikawa S, Sakuraba H, Lan H. T. N., Tanaka A, Ohno K, Sugimoto Y, Ninomiya H, Doi H.	Structural basis of the GM2 gangliosidosis B variant	J. Hum. Genet	48	582-9	2003
Kotani M, Tajima Y, Osanai T, Irie A, Iwatsuki K, Kanai-Azuma M, Imada M, Kato H, Shikata H, Kubo H, Sakuraba H.	Complementary DNA cloning and characterization of RANDAM-2, a type-1 membrane molecule specifically expressed on glutamatergic neuronal cells in the mouse cerebrum	J. Neurosci. Res	73	603-13	2003
Okumiya T, Sakuraba H, Kase R, Sugiura T.	Imbalanced substrate specificity of mutant β -galactosidase in patients with Morquio B disease	Mol. Genet. Meta	78	51-8	2003
北川照男	Fanconi 型腎性くる病を伴う肝腎型チロジン症	小児科臨床	56	929-35	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitagawa T, Owada M, Ishige N, Suzuki K, Ohashi T, Eto Y, Mills K, Winchester B, Keutzer J	Pilot study of mass-screening for Fabry's disease (FD) by measuring globotriaosylceramide (GL3) in whole urine samples using Tandem-mass spectrometry (TMS)	J Inherit Metab Dis	26(sup)	157	2003
北川照男、青木菊麿、松田一郎、多田啓也、大浦敏明、大和田操、山口清次、高柳正樹、重松陽介、大浦敏博	有機酸代謝異常症および脂肪酸酸化酵素異常症の治療ガイドラインの検討専門委員会報告 2003	特殊ミルク情報 2003	39		印刷中
大浦敏明、北川照男、多田啓也、松田一郎、他	わかりやすい肝型糖原病食事療法。編集；特殊ミルク共同安全開発委員会、	社会福祉法人 恩賜財団母子愛育会			2003
鈴木健、石毛信之、穴沢昭、大和田操、北川照男	我が国におけるタンデム質量分析の基礎と導入稼働への技術的対応	日本マス・スクリーニング学会誌	13	23	2003
鈴木健、石毛信之、大和田操、大橋十也、衛藤義勝、北川照男	LC-MS/MS を用いた Fabry 病スクリーニング法の研究	日本先天代謝異常学会雑誌	19	117	2003