

平成15年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

### 第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

# 目 次

## 第3分野

### 課題番号

|                      |  |             |
|----------------------|--|-------------|
| 20030917A<br>KH31028 | 非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価                   | 吉岡澄江 …… 1   |
| 918A<br>KH31029      | ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発                                    | 能美健彦 …… 10  |
| 919A<br>KH31030      | バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発                                | 川崎ナナ …… 18  |
| 920A<br>KH31031      | 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究          | 棚元憲一 …… 27  |
| 921A<br>KH31032      | 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究         | 大野泰雄 …… 33  |
| 922A<br>KH31033      | 医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発                          | 藤本純一郎 …… 43 |
| 923A<br>KH31034      | 創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立    | 井上 達 …… 48  |
| 924A<br>KH31035      | 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究                                 | 合田幸広 …… 58  |
| 925A<br>KH31036      | 医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究 | 頭金正博 …… 67  |
| 926A<br>KH31037      | 多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発                          | 山崎利雄 …… 74  |
| 927A<br>KH31038      | 食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立                | 山本茂貴 …… 83  |
| 928A<br>KH32081      | DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究                       | 阿曾幸男 …… 90  |

## 第4分野

|                 |                                      |             |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| 929A<br>KH41039 | ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立      | 小熊恵二 …… 97  |
| 930A<br>KH41040 | 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究        | 奥山虎之 …… 101 |
| 931A<br>KH42074 | 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究                 | 名和行文 …… 105 |
| 932A<br>KH42075 | 新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究 | 山崎俊夫 …… 115 |

## 第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

## 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究

所属 国立成育医療センター 遺伝診療科  
研究者 奥山 虎之

研究要旨：性分化異常症とリソゾーム蓄積症について、その診断治療法の開発研究を行なった。リソゾーム蓄積症モデルマウスに神経幹細胞を脳室内移植し、治療効果を認めた。また、小児マイクロペニスにおいてAR、SRD5A2 遺伝子変異が存在することを明らかにした。

### 分担研究者

- (1) 東京電力病院小児科副医長 佐々木悟郎
- (2) 日本ケミカルリサーチ株式会社  
研究センター研究員 鈴木徹

### A. 研究目的

小児先天異常症のなかの代表的 2 疾患であるリソゾーム蓄積症と性分化異常症の原因および治療法の解明に関する研究を行なった。(1) リソゾーム蓄積症のモデルマウスであるムコ多糖症 VII 型マウスを用いて、神経幹細胞移植の中枢神経病変に対する治療効果を検討した。リソゾーム病は、特定のリソゾーム酵素の欠損により細胞内に欠損酵素に特異的な基質が過剰蓄積し、全身性・進行性に各臓器において病変を呈する。ライソゾーム病に対する細胞治療は、欠損酵素を十分量分泌することが可能な細胞を移植・生着させ、目的臓器に酵素を補充する治療法であり、その目的に適したドナー細胞の研究が進められている。本研究では、神経幹細胞のドナー細胞としての有用性を検討するため、ムコ多糖症 VII 型 (MPSVII) ( $\beta$  グルクロニダーゼ (GUSB) 欠損症) のモデルマウスに対する脳内移植療法の効果を検証することを目的とした。(2) ミクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。多くは、種々の遺伝および環境因子に影響される多因子疾患として発症する。まれに、単一遺伝病として出現し、アンドロゲン効果に関連するアンドロゲン受容体 (AR) や  $5\alpha$  還元酵素 2 型 (SRD5A2) 遺伝子の変異および多型の関与が推測される。また、これらの多型はミクロペニスに対するテストステロン治療の効果にも関与すると考えられるが、そのような検討はなされていない。上記に背景に基づき、ミクロペニス患者における AR 遺伝子および SRD5A2 遺伝子の変異の有無、AR 遺伝子の

CAG リピート多型および SRD5A2 遺伝子の V89L 多型がミクロペニス発症感受性遺伝子あるいはテストステロン治療の反応性に関与するか否か、エストロゲン受容体遺伝子の特定ハプロタイプがミクロペニス発症の感受性を決定しうるか否かを検討した。

### B. 研究方法

(1) 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・培養した。神経幹細胞のドナー細胞としての有用性を評価するため、以下の実験を行った。① FACS により神経幹細胞の細胞表面抗原を検出した。② 神経幹細胞における、GUSB などの各種内因性リソゾーム酵素の活性値の測定を行った。③  $1 \times 10^5$  個の神経幹細胞を、新生仔 MPSVII マウスの脳室内に移植し 24 時間後および 3 週間後における脳内分布と生着を検討し、また脳内における GUSB 活性値の測定を行った。(2) 解析に関して両親いずれかの承諾が得られたミクロペニス日本人患者 81 人 (年齢 0-14 才、中央値 7 才) を対象とし、以下の 3 項目について検討した。① AR 遺伝子と SRD5A2 遺伝子の変異および多型解析： AR、SRD5A2 遺伝子の全翻訳領域の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。その後、両遺伝子の多型頻度を患者集団と正常集団において統計学的に比較した。② テストステロン治療効果： エナルモン 25mg あたりの陰莖長増加量 (cm/dose) を各患者において算出し、陰莖長増加量と AR 遺伝子の CAG リピート数多型および SRD5A2 遺伝子の V89L 多型との相関を統計学的

に解析した。③ER 遺伝子のハプロタイプ解析：ER 遺伝子の全長に渡って 15 個の SNP2 を解析し、連鎖不平衡領域の有無とハプロタイプ解析をおこなった。

### C. 研究結果

#### (1) リソゾーム蓄積症に関する治療法の開発研究

① 神経幹細胞の細胞表面には、MHC class II、CD80、CD86、ICAM I 等の発現は認められず、抗原提示能は極めて低いことが確認された。② 神経幹細胞の内因性 GUSB 活性値は  $647 \pm 240$  U/mg protein であり、その他の内因性リソゾーム酵素活性値も高値を示した。③ 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、嗅球レベルでは列状に分布していた。移植 3 週間後に、MPSVII マウスの脳内の GUSB 活性値とその生着・分布を評価したところ、正常マウスの 1-2% 程度の GUSB 活性値の増加を認めた。また GUSB 活性値の脳内での明らかな分布の偏りは認めなかった。(2) 性分化異常症の原因解明と治療法の開発：① AR 遺伝子変異解析：1 症例において、イントロン 1 の 3' スプライスコンセンサス配列の -3 位に、シトシンからチミンへの塩基置換 (以下 C→T 置換と略す) を同定した。AR 遺伝子 CAG リピート多型解析では、CAG リピート数の平均±標準誤差、中央値、分布は、患者  $23.5 \pm 0.38$ , 24, 14-34, 対照  $23.7 \pm 0.46$ , 23, 16-32 で、両群の間において有意差は認められなかった。

SRD5A2 遺伝子変異解析では、3 症例において変異が同定された。その内容は、Y26X/R227Q, G34R/R227Q, R227Q/R227Q で、全例に R227Q が共有されていた。SRD5A2 遺伝子 V89L 多型解析では、V89L の genotype は患者では、VV 35.9%、VL 47.4%、LL 16.7%、対照では、VV 28.0%、VL 51.0%、LL 26.0% で、両群の間において有意差は認められなかった。同様に、allele frequency は、患者で V 59.6%、L 40.4%、対照で V 53.5%、L 46.5% であり、両群の間において有意差は認められなかった。② テストステロン治療効果：AR 遺伝子あるいは SRD5A2 遺伝子変異を有する患者における治療効果は乏しかった。

SRD5A2 遺伝子変異を有する 3 例では、患者・家族の同意のもとにジヒドロテストステロン軟膏塗布を治験として行い、全例陰茎長は正常範囲内に到達した。遺伝子変異が認められなかった 78 例は、全例治療により陰茎長は正常範囲内となった。陰茎長反応は 0.08-1.0 cm/25mg (中央値 0.48 cm/25mg) で、治療時年齢や体表面積との相関関係は認められなかった。③ ER 遺伝子のハプロタイプ解析：ER 遺伝子の 250-300 kb の領域の 5 個の SNP 全てにおいて患者-対照群で頻度の有意差が検出された。さらにこの領域は連鎖不平衡領域を構成し、その領域の頻度が患者-対照群で優位に異なった ( $P < 0.03$ )。

### D. 考察

(1) 神経幹細胞は抗原提示能が低いため、同種異系移植 (アロ移植) のドナー細胞に適していると考えられる。神経幹細胞の GUSB およびその他の内因性リソゾーム酵素活性値は高値を示した。さらに脳室内に投与した神経幹細胞は、脳内に広く分布・生着し、レシピエントの神経細胞で GUSB 値の上昇が見られたことから、神経幹細胞の脳内移植による細胞治療は、MPSVII だけでなく、広範な中枢神経病変を有する多くのリソゾーム蓄積症の治療に応用可能であると考えられた。(2) 小児マイクロペニスにおいて単一遺伝性疾患としての AR 遺伝子あるいは SRD5A2 遺伝子変異が存在することを明らかにした。さらに、SRD5A2 遺伝子変異患者では、ジヒドロテストステロン軟膏という有効な代替治療薬が存在することから、その診断は患者の治療に大きく貢献する。ER 遺伝子のハプロタイプ解析は、特定ハプロタイプを有する個体が内分泌攪乱物質に対して高い感受性を有することを世界で初めて明らかとした。この連鎖不平衡領域は、リガンド依存性転写活性化領域に存在する。したがって、この特定ハプロタイプは、内分泌攪乱物質に対する転写活性化を招き、マイクロペニスにたいする疾患感受性を亢進させると推測される。

### E. 結論

以下の 3 点が明らかになった。(1) 神経幹細胞は抗原提示能が低いため、同種異系移植 (アロ移植) のドナー細胞に適していると考えられる。(2) 神経幹細胞の脳内移植による細胞治療は、多くのリソゾーム蓄積症の治療に応用可能である。(3) 小児マイクロペニスにおいて単一遺伝性疾患としての AR 遺伝子あるいは SRD5A2 遺伝子変異が存在する。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Sanae Haga, Keita Terui, Hui Qi Zhang, Shin Enosawa, Wataru Ogawa, Hiroshi Inoue, Torayuki Okuyama, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Tetsuya Ogino, Kaikobad Irani and Michitaka Ozak Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112:989-998 (2003).

2) Kanaji A, Kosuga M, Li XK, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamatwa Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama Y, and Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer. *Molecular Therapy Mol Ther.* 2003;8:718-725.

3) M. Fujino, M. Kawasaki, N. Funeshima, Y. Kitazawa, M. Kosuga, K. Okabe, M. Hashimoto, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, T. Okuyama, S. Suzuki, X-K. Li. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. *Gene Ther.* 2003 Sep;10:1781-1790.

4) M. Fujino, K. Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) *nef*. *Liver Transplant. Liver Transpl.* 2003 ;9:805-813.

5) Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2003 Jun;38:784-92.

6) Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T.: Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 2003 ; 10: 406-414

7) M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgeil, T. Okuyama, N. Roy-Chowdhury, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, & C. Guha. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Ther* 2003; 10: 304-313

8) M. Takahashi, H. Saito, K. Atsukawa, H. Ebinuma, T. Okuyama, & H. Ishii. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepatol Res* 2003; 25,:192-201

## 2. 学会発表

Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Torayuki Okuyama, Seiichi Suzuki. Constitutive activation of Stat3 by adenoviral gene transfer confers resistance to liver injury against Fas-mediated liver injury. 6<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Washington DC, June 4-8, 2003.

Yasuyuki Fukuhara, Yuko Hara, Torayuki Okuyama, Xiao Kang Li. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) Envelop vector successfully mediated beta-galacturonidase gene into mucopolysaccharidosis VII mice. 6<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene

Therapy,  
Washington DC, June 4-8, 2003.

Motomichi Kosuga, Arihiko Kanaji, Toyonori Sakamaki, Yoshiaki Toyama, Torayuki Okuyama. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer. 6<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Washington DC, June 4-8, 2003.

小須賀 基通、金治有彦、福原康之、鎌田裕子、東 範行、奥山虎之。アデノウイルスベクターを用いた新生児ムコ多糖症 VII 型マウスの骨病変に対する遺伝子治療第 9 回日本ライソゾーム病研究会。東京。2003.12.5 (第 1 回鈴木邦彦研究奨励賞受賞対象演題)

鈴木康之、磯貝光治、下澤信行、折居忠夫、戸松俊治、加藤 俊、奥山虎之、松尾宣武。抗 KS モノクロナール抗体を用いたムコ多糖症のマススクリーニング法の検討 第 9 回日本ライソゾーム病研究会。東京。2003.12.4

福原康之、李 小康、小須賀 基通、島崎琢也、岡野栄之、山田 正夫、奥山 虎之：神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの細胞治療。第 9 回日本ライソゾーム病研究会。東京。2003.12.4

磯貝光治、下澤信行、折居忠夫、戸松俊治、加藤俊、奥山虎之、松尾宣武。ムコ多糖症の新生児マススクリーニングに関する研究—特殊抗体を用いた血漿および尿中ムコ多糖の測定。第 46 回日本先天異常学会雑誌。松江。2003.11.20

福原康之、李 小康、小須賀 基通、島崎琢也、岡野栄之、山田 正夫、奥山 虎之：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幹細胞治療。第 46 回日本先天異常学会雑誌。松江。2003.11.20

奥山虎之、柳澤正義、松尾宣武：電子カルテと遺伝子関連個人情報保護について 第 48 回日本人類遺伝学会、長崎、2003. 10. 23

深見真紀、奥山虎之、小須賀基通、西村 玄、室谷浩二、佐藤直子、緒方 勤：SHOX ホモの異常とヘテロの異常を伴う Langer 中肢骨短縮症の 2 例。第 48 回日本人類遺伝学会、長崎、2003. 10. 21

田村智英子、三原喜美恵、小須賀基通、奥山虎之：国立成育医療センターにおける遺伝カウンセリング実践に関する考察。第 48 回日本人類遺伝学会、

長崎、2003.10.23

福原康之、李 小康、小須賀 基通、島崎琢也、岡野栄之、山田 正夫、奥山 虎之：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幹細胞治療法の開発。第 48 回日本人類遺伝学会、長崎、2003.10.21

福原康之、李 小康、小須賀 基通、島崎琢也、岡野栄之、山田 正夫、鈴木盛一、奥山 虎之：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法。第 2 回日本再生医療学会、神戸、2003.3.18

福原康之、李 小康、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、鈴木盛一、奥山虎之：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法の開発。第 45 回日本先天代謝異常学会、神戸、2002.11.8

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

---

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社