

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

ニーマン・ピック病 C 型の病態生理の研究

分担研究者 大野 耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科教授

研究要旨：ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は小脳失調が前景に立つ中枢神経障害を主徴とする常染色体劣性遺伝病であり、生化学的には LDL 由来コレステロールの細胞内小胞での蓄積を特徴とする。原因遺伝子産物 NPC1 は、いわゆる sterol-sensing domain を有しており、細胞内コレステロール輸送の key molecule であると考えられている。cDNA microarray によるスクリーニングにより、NPC 細胞では interferon stimulated response element (ISRE) によりドライブされる一連の遺伝子の発現が増加していることが判明した。その後の検討により、NPC 細胞では JAK/STAT シグナル伝達系が恒常的に活性化されており、これはこの細胞が炎症性サイトカイン (IL-6/IL-8 および IFN-beta) を産生するためであることが明らかになった。IL-6/NPC1 ダブルノックアウトマウスでは脳抽出物中の STAT のレベルが低下し、アストロサイトの増殖が明らかに抑制され、寿命が約 15% 長くなったことから、サイトカイン産生/STAT 増加は NPC 脳でのグリア細胞の増殖及び神経変性に関与すると考えられる。

A. 研究目的

NPC の病態生理を解明する手がかりを得ることを目的として、NPC 細胞での遺伝子発現パターンを解析し、神経細胞死につながる可能性のある変化をとらえることを計画した。

B. 研究方法および結果

1. NPC 細胞では ISRE-driven gene の発現が亢進している。 NPC 患者と正常人から得た皮膚繊維芽細胞から mRNA を抽出し cDNA とした後、これを probe として cDNA microarray を用いて発現パターンを比較した。その結果、NPC 細胞では MxA、2' -5' oligoadenylate synthetase など、ISRE により誘導される一群の遺伝子の発現が亢進している事が判明した。

2. NPC 細胞/組織では STAT の蛋白質レベルが高い。 1. の生化学的機序を解明するため、転写因子 STAT の蛋白質レベルを調べた。ヒト NPC 細胞において、STAT1-STAT5 のレベルの増加が見られ、同様に NPC1 欠損 CHO 細胞にお

いても、STAT1, STAT3-STAT6 の増加が認められた。NPC1 欠損マウスの肝臓、脳の抽出物においても同様の増加が認められ、小脳 Purkinje 細胞や浸潤するグリア細胞で STAT-3 の抗原性が増加していた。

3. NPC 細胞は炎症性サイトカイン (IL-6/IL-8 および IFN-beta) を恒常的に産生する。 2. の生化学的機序を解明するため、NPC 細胞と正常細胞の共培養実験、各々の培養上精による刺激実験を行ったところ、NPC 細胞の培養上精中に、STAT の発現レベルを亢進させる活性物質が存在することが判明した。ELISA により 40 種類以上の既知のサイトカイン濃度を測定したところ、NPC 細胞の培養上精中には IL-6/IL-8 が正常細胞の 100 倍以上の高濃度で存在しており、正常細胞では検出できない IFN-beta が存在した (図 1)。レポーター遺伝子アッセイおよび中和抗体による阻害実験から、STAT1/STAT3 の増加は各々 IFN-beta/IL-6 によることが判明した。また

NPC1 欠損マウスから得た皮膚繊維芽細胞および腹腔マクロファージの培養上清にも高濃度の IL-6 が検出された。

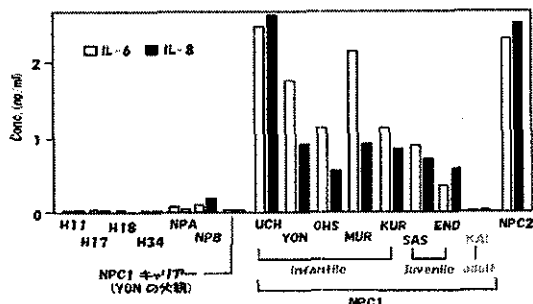


図1 ヒト皮膚線維芽細胞上清中の IL-6/IL-8 の濃度. ELISA により測定.

4. IL-6 欠損により NPC マウスのアストログリオーシスが抑制され、寿命がのびる. NPC1 欠損マウスは生後 12 週以内に死亡し、その脳では脂質蓄積、神経変性に加えて顕著なアストログリオーシスが生じる。NPC の病態における上記サイトカインの役割を明らかにする目的で IL-6/NPC1 ダブルノックアウト (DKO) マウスを作製した。DKO マウスでは脳抽出物中の STAT のレベルが低下し、アストロサイトの増殖が明らかに抑制され、寿命が約 15% 長くなった (表 1)。

Background	IL-6	male	female	sum
Balb/C	+/+	68±4 (25)	72±4 (25)	70±5(50)
Balb/C x C57/BL	+/+	70±3 (7)	71±7(7)	70±5(14)
	+/-	69±1 (13)	75±6 (11)	71±4(23)
	-/-	77±6* (6)	81±7* (6)	79±7*(12)

表 1 IL-6/NPC1 DKO マウスの寿命。かつこ内は例数。

5. NPC 細胞は lipopolysaccharide (LPS) に対して高い感受性を示す. NPC 細胞で過剰に産生される炎症性サイトカインは、正常細胞では LPS などいわゆる先天性免疫機構を活性化する物質の刺激により産生される。そこで、IL-6 産生を指標として LPS に対する反応性を検討したところ、NPC 細胞は明らかに高い

感受性を示すことがわかった。

C. 考察

以上 1-3 の結果から、NPC 細胞は何らかの理由により炎症性サイトカインを恒常的に産生しており、この結果として STAT シグナル伝達系が活性化されることがわかった。4 の結果から、cytokine 産生および STAT の増加は NPC 脳でのグリア細胞の増殖及び神経変性に関与すると考えられる。さらに 5 の結果は、このサイトカインの産生が先天性免疫機構の反応性の変化によることを示唆する。

D. 結論

NPC 細胞は炎症性サイトカインを恒常的に産生しており、これらのサイトカインは NPC 脳でのグリア細胞の増殖及び神経変性に関与する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohara S et al. (2004) Degeneration of cholecystokinin-immunoreactive afferents to the VPL thalamus of the mouse model of Niemann-Pick type C. *Brain Res.* 1022, 244-246.

Hou L et al. (2004) N-Octyl-β-valienamine up-regulates activity of F213I mutant β-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 219-228.

Ohara S et al. (2004) Axonal dystrophy of dorsal root ganglion sensory neurons in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Exp. Neurol.* 187, 289-298.

Ohsaki Y et al. (2004) Reduced sensitivity of Niemann-Pick C1-deficient cells to θ-toxin (perfringolysin O): sequestration of toxin to raft-enriched membrane vesicles. *Histochem. Cell Biol.* 121, 263-272.

Yamamoto T et al. (2004) Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain Dev.* 26, 245-250.

Feng J.H. et al. (2004) Novel TSC2 mutations and decreased expression of tuberlin in cultured tumor cells with an insertion mutation. *Hum. Mutat.* 24, 397

2. 学会発表

杉本優子他「ニーマンピック C1 のコレステロール濃度依存性ユビキチン化」日本生化学会年会、横浜 2004

鈴木倫毅他「ニーマンピック C型細胞によるサイトカインの産生と JAK/STAT シグナルの活性化」日本生化学会年会、横浜 2004

- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

くも膜下出血を合併した、酵素補充療法後 Fabry 病の剖検例

分担研究者：辻 省次 東京大学大学院医学系研究科神経内科学 教授

共同研究者：橋本 明子¹⁾、作石 かおり¹⁾、清水 潤¹⁾、村山 繁雄²⁾、仁木 利郎³⁾、池村 雅子³⁾、宇川 義一¹⁾、後藤 順¹⁾

1) 東京大学医学部附属病院神経内科

2) 東京都老人総合研究所老化臨床神経科学研究グループ

3) 東京大学医学部附属病院病理部

研究要旨：成人発症の Fabry 病に対し酵素補充療法を施行中、嚢状動脈瘤破裂によるくも膜下出血を合併した剖検例を経験した。全身病理所見では心筋、糸球体上皮、髄質細胞内、皮膚汗腺上皮、内皮細胞、末梢神経神経周膜、肝クッパー細胞、大動脈内膜に特徴的な同心円状の沈着物を認めた。また中枢病変では頭蓋内血管の著しい内腔拡張を認め、内弾性板の部分的な断裂、中膜平滑筋の菲薄線維化と同部位における蓄積物を貪食したマクロファージの集簇を認めた。また電顕観察で、中膜平滑筋内に多数の特徴的蓄積物を認めた。脳実質では、血管周囲の陳旧性梗塞巣に石灰化を伴った所見を認めた。Fabry 病では従来血管閉塞病変が注目されていたが、このように著しい血管壁の変化を認めたことより、嚢状動脈瘤形成、くも膜下出血の背景となる血管変化の存在が指摘された。

A. 研究目的

くも膜下出血にて死亡した Fabry 病の剖検例を報告、病因的関連を検討する。

B. 研究方法

1) 対象

症例の概略：死亡時 52 歳男性。43 歳より知能低下、48 歳時 Fabry 病と診断、51 歳 recombinant human α -galactosidase の酵素補充療法開始、約 8 ヶ月後くも膜下出血で死亡。

既往歴で、高血圧、高脂血症、糖尿病など動脈硬化の危険因子無く、家族歴として母親に心不全、腎臓病あり 67 歳で死亡。

48 歳初診時、アクロメガリー様顔貌、短頸、巨舌、皮膚乾燥、両膝 angiokeratoma あり。神経学的所見として、意欲減退、

無頓着、知能低下（MMSE 20/30、HDS-R 22/30、WAIS-R verbal IQ 95、performance IQ 58、total IQ 76）、両側錐体路徴候、前頭葉徴候、驚愕反応、尿便失禁を認めた。検査所見上血清クレアチニン 1.15、クレアチニンクリアランスは 58 と腎機能低下を認め、Holter 心電図で発作性心房細動、心エコーで左前壁中隔肥大指摘。頭部 MRIT2 強調画像で、半卵円中心白質にびまん性に広がる高信号域を認め、T1 強調画像で同病変は低信号を呈し、いずれの撮影条件でも髄液と同じ信号を示していた。また FLAIR 像では高信号内に類円形の低信号を呈す病変を認めた。頭部 MRA では中大脳動脈および脳底動脈の拡張を認め、basilar top の伸展挙上を認めた。

52 歳時くも膜下出血を突然発症し、

右前大脳動脈皮質枝動脈瘤の破裂と診断、クリッピング術施行、動脈瘤部を病理学的に検索するも、出血のアーチファクトと破壊のため評価不能であった。第10病日に死亡した。

2) Fabry病の診断根拠

尿薄層クロマトグラフィーにて trihexosylceramide および digalactosylceramide を確認した。また白血球ライソゾーム酵素活性にて α -galactosidase A 活性は 2.1nMol/mgP/h(49.8-116.4)と低下、GLA 遺伝子解析で開始コドンが ATG から GTG へ置換していることを確認した。

3) 方法

剖検時、脳、脊髄、末梢神経、筋、血管、皮膚、肝臓・腎臓・脾臓検体を採取、一部凍結保存。通常顕微鏡観察には、ホルマリン固定パラフィン包埋、5 μ m厚切片を脱パラし、Hematoxylin eosin, Klüever-Barra, Bodain, Elastica van Gieson, PAS, diastase 消化 PAS, Azan 染色を施行。免疫組織化学的には、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP, Dako), HLA-DR (CD68, Nichirei), Abeta (11-28, IBL), リン酸化タウ (AT8: Innogenetics), ubiquitin (Sigma), リン酸化 α シヌクレイン (psyn#64, 岩坪威博士供与) 抗体を用い、Ventana20x 自動免疫染色装置で染色、観察した。電顕観察にはグルタルアルデヒド固定エポン包埋 1 μ m厚 toluidine blue 染色厚切り標本観察後、関心領域の電顕観察を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については十分な口頭説明の上、文書による本人の同意を得て行った。酵素補充療法については、学内治験審査委員会の承認を得て、十分な説明を行い、文章による本人同意を得て実施した。また病理解剖についてはご遺族より文書による同意を得て施行した。

C. 研究結果

心臓：肉眼的に心肥大を認め、組織学的に心筋に、H.E.で黄金色を呈し、PAS・dPAS 陽性の沈着物を認めた。超微形態的に、同心円状、ゼブラ状構造物の沈着を認めた。

腎臓：肉眼的に、腎皮質の萎縮あり。組織学的に、糸球体上皮、髄質細胞内には、心筋に認められたものと同様の沈着物を認めた。

皮膚：汗腺上皮、内皮細胞に沈着物を認め、電子顕微鏡でその構造が心、腎と同様のものであることを確認した。

末梢神経：小径線維優位の有髄線維脱落と、神経周膜に同様の沈着物を認めた。

肝臓：クッパー細胞に沈着あり。

大動脈：動脈硬化はごく軽度。部分的に内膜の沈着物を認め、中膜平滑筋には空胞形成を認めた。

中枢病理所見：脳重 1460g。外表からの観察で、くも膜下出血を脳底部に認める。頭蓋内血管の動脈硬化はごく軽度。両側椎骨動脈・脳底動脈は著明に拡張。右前大脳動脈皮質枝クリッピング術後。前・中・後大脳動脈は内腔が拡張。脳萎縮は腫大のため不明。大脳冠状断連続断面で、脳梁膝部と前帯状回の破壊を認める。皮質萎縮ははっきりしない。大脳白質は、髄条血管に沿う線状の軟化性病変が多発し、一部融合。基底核・視床には特記所見なし。左小脳矢状断断面、右小脳・脳幹水平断断面に著変なし。脊髄はくも膜下出血を認めるのみ。

組織学的に、頭蓋内動脈では、内弾性板が部分的に断裂しており、同部において中膜平滑筋が菲薄線維化し、蓄積物を貪食したマクロファージの集簇を認める。また電顕観察で、中膜平滑筋内に、多数の特徴的蓄積物を認めた。脳実質では、大脳白質には、血管を中に含む陳旧性脳梗塞病変が多発しており、一部石灰化を

伴い、蓄積物を含むマクロファージを散見した。小脳白質の小血管周囲には、Rosenthal fiber を認めた。

D. 考察

本例では、血管拡張、動脈瘤形成の病理学的変化と、Fabry 病の病態との関連が問題となる。

本例では肉眼的に頭蓋内血管の内腔拡張を認め、組織学的に血管平滑筋細胞に層状構造物の沈着を高度に認め、これは心筋、腎糸球体上皮・髄質細胞、皮膚汗腺上皮、血管内皮に沈着していたものと同様のものと考えられた。更に特に脳底動脈において顕著に、血管の内弾性板の断裂像が認められた。以上より本症例では血管壁の変化が非常に強いと考えられる。

次に動脈瘤の合併を認めた Fabry 病の過去 4 報告例を表に示す。いずれも未破裂動脈瘤で発見され、剖検はされておらず、予後、組織学的所見についての記載は無かった。血管拡張については過去の 4 報告例全てで脳底動脈の拡張を認めており、うち 3 例では内頸動脈の拡張も認めた。以上より、動脈瘤形成と頭蓋内血管の拡張の関連が、文献からも示唆される。

しかし、動脈瘤の部位については脳底動脈であったものが 3 例あり、本症例のように前大脳動脈に動脈瘤を形成した報告は検索した限りでは存在しなかった。動脈瘤の形状については、記載のある 2 例は紡錘状であり、本例のように嚢状動脈瘤が認められた症例は存在しなかった。このことより本症例は動脈瘤の部位、形状いずれにおいても特徴的であると考えられた(1, 2)。

この 3 例と本例の差異として、変異部位が異なる可能性と、酵素補充療法が何らかの影響を与えたふたつの可能性が

ある。本例の場合、酵素補充療法前に頭部 MRA を施行するも右前大脳動脈皮質枝の動脈瘤は画像的評価範囲外であり後者の可能性については、否定も肯定もできないため、今後の症例の蓄積を待ちたい。

Fabry 病では従来血管閉塞病変が注目されてきた。その背景として、腎血管性高血圧による動脈硬化性変化や、glycosphingolipid の血管平滑筋への沈着による中小血管の狭窄などが挙げられている(1)。しかし、今回前述のような著しい血管壁の変化を認めたこと、少数ながら臨床報告例が存在することは、酵素補充療法の関与が否定できないまでも、むしろそれだからこそ、Fabry 病における病変のひとつとして、今後注意が必要である点を指摘したい。

E. 結論

Fabry 病と診断されくも膜下出血で死亡した剖検例を報告した。Fabry 病では従来嚢状脳動脈瘤形成とそれによる出血はあまり注目されていなかった。しかし、本剖検例の結果よりその背景となる血管変化の存在が指摘された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

参考文献

1. D N Maisey, J A Cosh. Basilar artery aneurysm and Anderson-Fabry disease. JNNP Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 1980; 43:85-87
2. Panayiotis Mitsias, Steven R. Leviane. Cerebrovascular Complications of Fabry's Disease. Ann Neurol 1996;40:8-17

図 1 脳動脈瘤を合併した過去の報告例

	1	2	3	4	本症例
年齢 性別	50 F	57 F	50 M	38F	52 M
脳底動脈拡張	+	+	+	+	+
内頸動脈拡張	+	?	?	+	+
動脈瘤部位	脳底	脳底	?	脳底	前大脳
動脈瘤形状	?	紡錐形	?	紡錐形	嚢状

1,2,3: D N Maisey et.al, 1980, JNNP
 4:Mitsias et. al, 1996, Ann Neurol

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者	島田 隆	日本医科大学生化学第二講座 教授
研究協力者	久安 早苗	日本医科大学生化学第二講座
	高草木 幸子	日本医科大学生化学第二講座

研究要旨

リソゾーム酵素アシルスルファターゼ A (ASA) の遺伝子欠損に起因するリソゾーム病、異染性ロイコジストロフィー (MLD) の、遺伝子治療開発の一環として、活性型 ASA の大量発現に対するスルファターゼ活性化酵素 FGE の有効性を *in vitro* および *in vivo* で検討した。COS 細胞における ASA と FGE の共発現は細胞内および細胞外の ASA 活性を 20 倍以上増加させた。細胞外に分泌された ASA が M6P 依存性に MLD 患者由来の fibroblast に取り込まれたことから、発現した ASA は正常な修飾糖鎖を有していると考えられた。また、MLD マウスの肝臓における ASA と FGE の共発現は肝臓組織と血清中の ASA 活性と ASA 蛋白質を有意に上昇させた。これらの結果から、ASA と FGE の共発現は機能的 ASA の発現に必須であり、MLD の遺伝子治療における ASA の systemic delivery において重要な要素であると考えられた。

A. 研究目的

異染性ロイコジストロフィー (MLD) はリソゾーム酵素アシルスルファターゼ A (ASA) の遺伝性欠損によるリソゾーム病である。ミエリン脂質であるスルファチドが脳その他に蓄積することによって神経系のミエリン崩壊が起こり、種々の神経症状を呈する。今日まで有効な治療法はなく、遺伝子治療の標的疾患と考えられている。最近、一連のスルファターゼを共通に活性化する酵素が同定され、FGE (Formylglycine generating enzyme) あるいは SUMF1 (Sulfatase modifying factor 1) と名付けられた。FGE はスルファターゼ活性中心部位の Cys を formylglycine に転換させる

ことからスルファターゼ活性に必須の修飾酵素である。本研究は MLD の遺伝子治療開発の一環として、活性型 ASA の大量発現に対する FGE の有効性を確かめるために行った。

B. 研究方法

1. *In vitro* 実験:

HeLa, COS, 293 の細胞を 6 穴プレートに培養し、それぞれの細胞に CAGS プロモーター下で ASA 及び FGE を発現するプラスミド (pCAG-ASA, pCAG-FGE) を、FuGENE を用いて transfection した。72 時間後に細胞を harvest し、細胞内、外の ASA の酵素活性、酵素蛋白質、mRNA 発現を調べた。酵素活性は p-nitrocatechol 法で測定した。

酵素蛋白質は anti-ASA ペプチド抗体を用いた Western blotting 法で、mRNA はヒト ASA の cDNA をプローブに用いた Northern blotting 法により検出した。FGE の蛋白質と mRNA も同様に調べた。細胞外に分泌された ASA の再取り込み実験は、MLD 患者の fibroblast を 8 穴チャンバースライド上で培養し、その細胞に ASA 発現 COS 細胞の condition medium を M6P の有り、無しで加えて培養し、2 時間後 anti-ASA ペプチド抗体を用いて細胞の免疫染色を行った。

2. In vivo 実験:

体重 20 g の MLD マウスに pCAG-ASA, pCAG-FGE のプラスミドの各 100 μ g を尾静脈より Hydrodynamics 法で共注入した。18 時間後に血清および組織抽出液を調製し、ASA の酵素活性、酵素蛋白質、mRNA を In vitro 実験と同様に調べた。MLD マウスの FGE 発現も Northern blotting 法により解析した。

C. 研究結果

1. In vitro 実験

HeLa, COS, 293 の 3 種類すべての細胞株において ASA と FGE の共発現は細胞内外の ASA 活性を増加させた。特に COS 細胞では細胞内で 20 倍、細胞外に分泌された ASA 活性で 71 倍の上昇が見られた。ASA の発現だけでは細胞外で検出される活性は極めて少なかった。ASA 蛋白質と mRNA 発現は FGE との共発現による影響は見られなかった。これらの結果は ASA の FGE による修飾が翻訳後に起こることを示した。

細胞外に分泌された ASA の細胞内再取り込み実験では、ASA が MLD 患者の fibroblast に M6P 依存的に取り込まれることを活性と免疫染色により証明した。この結果は過剰発現で分泌された ASA が正常にグリコシル化されていることを示すものである。

2. In vivo 実験

MLD マウス肝臓における ASA と FGE

の共発現は肝臓の ASA 活性を 3.7 倍、血清中では 14 倍の上昇を誘導した。ASA だけの発現では血清に分泌される ASA 活性はごく僅かであった。また、In vitro の結果とは異なり、肝臓の ASA は活性のみならず酵素蛋白質も有意に増加するのを認めた。この結果から FGE により修飾された活性型 ASA は不活性型 ASA よりも生体内では安定性が高いことが示唆された。

MLD マウスにおける FGE mRNA 発現の生体内分布はヒトと同様に腎臓でもっとも高く、脳での発現は比較的少なかった。しかし、ヒトの脳における発現に比べると

MLD マウスではある量の発現が認められた。

C. 考察

FGE(formylglycine generating enzyme) とその遺伝子 SUMF1 (sulfatase modifying factor) は最近、2 つのグループの異なるアプローチによって同定された。FGE は ASA を含む多くのスルファターゼの活性化に必須の修飾を担当する小胞体局在酵素である。正常下ではスルファターゼを活性化するのに十分量の FGE が恒常的に発現しているはずである。しかし、組換えスルファターゼを過剰発現させる時、しかるべき量の FGE もまた発現させる必要があると考えられる。そこで我々は MLD の遺伝子治療開発の一環として触媒的に活性な ASA 酵素の過剰発現に対する FGE の有効性を検討した。3 種類の細胞株を用いた in vitro 実験と、MLD マウスの肝臓に過剰発現させた in vivo 実験のいずれにおいても ASA と FGE の共発現は ASA 活性の増加をもたらした。特に細胞培養液あるいは血清中に分泌される ASA 活性は ASA 単独では極めて少ないのに対して FGE との共発現で顕著な上昇が見られた。生体内で循環系に分泌されたリソソーム酵素は周囲の細胞のみならず遠隔の細胞によっても再吸収される。この性質を利

用して組換えリソソーム酵素を肝臓などの臓器で過剰発現させ、血中に分泌させることにより全身的酵素補充療法が期待できる。我々は本研究において明した。

D. 結論

ASA と FGE の共発現は活性型 ASA の発現に必須であり、MLD の遺伝子治療における ASA の systemic delivery において重要な要素である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., Daida, H. (2005) Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J. Virol.* 79: 609 - 614.
- 2) Noro, T., Miyake, K., Suzuki-Miyake, N., Igarashi, T., Uchida, E., Misawa, T., Yamazaki, Y., Shimada, T. (2004) Adeno-Associated Viral Vector-mediated Expression of Endostatin Inhibits Tumor Growth and Metastasis in an Orthotropic Pancreatic Cancer Model in Hamsters. *Cancer Res.* 64:7486 - 7490.
- 3) Rei, Ogawa., Mizuno, H., Watanabe, A., Migita, M., Hyakusoku, H., Shimada, T. (2004) Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice—including relationship of sex differences. *BBRC* 319:511-517.
- 4) Rei, Ogawa., Mizuno, H., Watanabe, A., Migita, M., Shimada, T., Hyakusoku, H. (2004) Osteogenic and chondrogenic differentiation

MLD の遺伝子治療のため特定の臓器で多量の活性型 ASA を発現させ、循環系に分泌させるために FGE が必須であることを証

by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *BBRC* 313:871-877.

2. 学会発表

- 1) Takakusaki, Y., Hisayasu, S., Watanabe, A., Shimada, T.: Modification of the Expression Vector for Systemic Gene Therapy of MLD. The 7th Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy (Minneapolis, USA) 2004. 6.
- 2) Kawabata, K., Migita, M., Mochizuki, H., Fukunaga, Y., Shimada, T.: An Ex Vivo Therapy Approach for Metachromatic Leukodystrophy Using neural Progenitor Cells. The 7th Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy (Minneapolis, USA) 2004. 6.
- 3) Kurai, T., Takakusaki, Y., Kitagawa, R., Yamamoto, M., Hisayasu, S., Hirai, Y., Shimada, T.: AAV vector mediated co-expression of FGE with ASA for gene therapy of metachromatic leukodystrophy. American Society of Human Genetics. Annual Meeting 2004. (Tront, Canada) 2004, 10.

ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究

分担研究者 国立成育医療センター 遺伝診療科 奥山 虎之

研究要旨：ムコ多糖症 2 型（ハンター症候群）の系統的遺伝子診断法を確立し、本症を有する家族の保因者診断に適応し、その臨床的有用性を検証した。7 家系 13 名の解析を行った。5 家系でイズロネートサルファターゼ遺伝子（IDS）の点変異（ミスセンス変異 4 例、ナンセンス変異 1 例）を、1 家系で微小欠失（4 塩基欠失）を認めた。さらに、1 家系では、IDS 遺伝子とその近傍に存在する偽遺伝子（IDS-2）との組み換えによると考えられる成績を得た。以上の結果から、今回確立した診断法は、ハンター症候群の遺伝子診断法として有用であり、遺伝カウンセリングと併用することにより適切な保因者診断や発症前診断（早期診断）に活用できることが示された。

A. 研究目的

ムコ多糖症（MPS）は、ライソゾーム病のなかでは、比較的頻度が高い疾患群である。特に、わが国では MPS2 型（ハンター症候群）の頻度が高いのが特徴である。ハンター症候群の遺伝形式は、X 染色体連鎖遺伝である。ハンター症候群の遺伝子診断は、発端者の確定診断や家族内の保因者診断に有用だけでなく、現在開発中の酵素補充療法を効果的に行うための、早期診断や発症前診断に活用できる可能性がある。しかし、わが国では、恒常的かつ診療目的で本症の遺伝子診断を行うコマーシャルラボラトリーや医療機関・研究機関がない。本研究では、上記の背景を考慮し、国立成育医療センターで診療を目的としたハンター症候群の体系的な遺伝子診断体制を確立することを目的とする。あわせて、適切なハンター症候群の遺伝カウンセリングについても検討する。

B. 研究方法

（1）ハンター症候群の遺伝子診断法の確立
ハンター症候群の疾患責任遺伝子であるイズロネートサルファターゼ遺伝子（IDS）の 9 個のエクソンとその近傍のイントロンを PCR 法で増幅し、得られた DNA 断片の塩基配列を決定した。IDS 遺伝子には隣接して同遺伝子ときわめて相同性の高い偽遺伝子である IDS-2 が存在する。PCR により IDS-2 遺伝子が同時に増幅されないようにプライマーおよび反応条件について検討した。さらに、IDS 遺伝子と IDS-2 遺伝子の相同組み換えにより、IDS 遺伝子構造が異常となりハンター症候群が発症する場合がある。この、組み換えを迅速・簡便に検出できる方法を検討した。

（2）ハンター症候群の遺伝子検査と遺伝カウ

ンセリングへの活用

「ムコ多糖症親の会」において国立成育医療センターで遺伝子診断が可能であることを紹介した。遺伝子診断を希望する家族には、同センターに来院していただき、国立成育医療センター遺伝子検査実施規定に準拠して検査前遺伝カウンセリングを行い、同意が得られた家族に対して、遺伝子検査を行った。結果が判明したところで、再度来院していただき遺伝子検査の結果を告知した。

（倫理面への配慮）国立成育医療センターでは、遺伝子検査実施規定を定めている。内容は、臨床検査前カウンセリングのなかで、検査の目的の明確化、プライバシー保護のための匿名化、および代諾で検査をする場合の妥当性についてカウンセラーに説明することを定めている。説明は臨床遺伝医療の経験豊富な臨床遺伝専門医が担当する。

C. 研究結果

1. 1. ハンター症候群の遺伝子診断
7 家系、13 名の遺伝子解析を行った。発端者の遺伝子診断が 7 例、保因者診断が 6 例であった。点変異が 5 家系で見られた。アミノ酸が置換されるミスセンス変異が 4 例で、詳細は、エクソン 3 の C690G (P120R) が 1 家系、エクソン 9 の G1265A (C422T) が 2 家系、エクソン 7 の A989G (Q310P) が 1 例であった。エクソン 3 とエクソン 9 のミスセンス変異は既に報告のある変異であったが、エクソン 7 の変異は以前に報告のない変異であった。エクソン 7 の変異については、血縁関係のない日本人の 100 人の解析で同様の変異を検出できなかったことから、多型の可能性は低く疾患関連の遺伝子変異と考えた。また、エクソン 9 の変異は、

以前に重症型ハンター症候群の遺伝子変異として報告された変異であるが、今回解析した2例とも知的障害を伴わない軽症型であり、遺伝子型と表現型に解離が認められた。4例中、2例で母親が保因者であることが確認された。エクソン3とエクソン9に変異を認めるおのおの1例であった。

ナンセンス変異が1例で認められた。エクソン3の、C514T (R172X) 変異であり、過去に報告のあるもので、母親は保因者で表現型は重症型であった。

エクソン9の4塩基が欠失しフレームシフトを生じる症例を1例認めた。これは、以前に報告のない変異で、母親は保因者ではなかった。

また、IDS 遺伝子と IDS-2 遺伝子の相同組み換えが原因と考えられる症例を1例認めた。

2. 遺伝カウンセリングの内容

7家系中、6家系の遺伝子解析にあたって、国立成育医療センターで検査前後に遺伝カウンセリングを行った。遺伝子診断を希望したすべての家族で、母親あるいは発端者に姉妹がいて、その保因者診断を希望し来院していた。発端者の姉妹はすべて未成年であり、検査前遺伝カウンセリングを行った結果、全例で、保因者診断を当面行わないという結論になった。

D. 考察

1. ハンター症候群の遺伝子解析：

ハンター症候群の遺伝子変異はホットスポットが存在せず、症例ごとにすべてのエクソンの網羅的解析が必要とされている。今回の7例の解析でも6種類の遺伝子変異が検出された。しかも、2例は未報告の変異であり、本症の遺伝子診断は過去の報告例の解析だけでは不十分であることが示された。

2. 遺伝カウンセリングの必要性：

ハンター症候群の遺伝子解析は、家族内の保因者診断には必須の検査である。しかし、保因者はとくに症状を呈することがないため、小児期に両親の希望により保因者診断を行うことは、通常妥当とは考えられていない。保因者診断は、本人が成人し自らの意思でおこなうことが適切と考えられる。今回、検査前遺伝カウンセリングで発端者の両親にその点を説明したところ、全例で未成年の検査を保留することとなった。検査前遺伝カウンセリングの有用性が示される結果となった。

E. 結論

ハンター症候群の遺伝子診断体制を確立した。遺伝子解析においては、偽遺伝子路の相同組み換えを検出する必要性が示された。遺伝カウンセリングにおいては、未成年の保因者診断には慎重に対応することが必要であることが示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Okuyama T, Iijima M, Tanaka T, Reiko Horikawa R, Yamada K, Ogata T. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004;82:173-9.

2. 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).

3. 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. *Mol Ther.* 2003; 8:718-725.

4. 奥山虎之 他。内分泌疾患の診療とカウンセラーの資格と責任 ホルモンと臨床 52, 79-88, 2004

2. 学会発表

1. Fukuhara Y, Okuyama T, et al. Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10th annual meeting of the gene therapy 2004, 8月5日、東京

H. 知的財産権の出願・登録

本年度は特に予定していない。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾克服研究事業）
分担研究報告書

ライソゾーム病患者の QOL 改善に向けた調査研究：
ムコ多糖症の呼吸障害について

分担研究者 桜川宜男 東京小児療育病院

研究要旨

ライソゾーム病の全国調査を重症心身障害児施設を中心に行った。そして今回は特にムコ多糖症（21例）の呼吸障害について検討した。在宅療育10例のうち、長重心は7例、罹病期間10年以上の症例は9例であった。呼吸障害38%であり、気管切開は4例（20%）であった。我々は挿管困難な症例でフフフェースマスク BiPAP が有効であった症例を経験した。このような症例における QOL の改善に有効であると考えられる。

A. 研究目的

ライソゾーム病は先天的にライソゾーム酵素の欠損を特徴とする先天性代謝異常症である。一部の疾患では、酵素補充療法が臨床応用されはじめて有効例が証明されてきている。しかし中枢神経症状を呈する脳型では、有効な治療法は確立していない。一方近年の全身管理に関する治療法が進歩し、重度の障害をもつ患者のなかでも、長期間の生存例が増加してきている。そして症例の多くは、重症心身障害の施設に入所しているかまたは在宅療養して通院しているのが現状である。このような症例においては、普段の生活におけるその質（QOL）が重要課題となっている。我々は、昨年度において、国立療養所の重症心身障害児病棟および公法人立の重症心身障害児施設に患者の実態調査を行った。そこでライソゾーム病患者の QOL の改善にむけた調査研究を目的とし、今年度はムコ多糖症の呼吸障害について検討したので報告する。

B. 研究方法

昨年度おこなった全国のアンケート調査のなかで、特にムコ多糖症について検討した。項目では、酸素療法、気管切開

や分離手術の有無、人工呼吸器使用状況と重症度（大島分類）などを各症例で調査した。なおアンケート調査においては、大学の倫理委員会の承認を経て、またインフォームドコンセントを施行した。

つぎに、呼吸障害と心不全を呈したムコ多糖症Ⅱ型（ハンター症候群）の1例においてフルフェイスマスク BiPAP が有効であった症例を経験した。ムコ多糖症では気道閉塞による呼吸障害が大きな問題となるが、QOL の改善に貢献しているので紹介する。

C. 研究結果

アンケート配布数は180施設。回答は51%。患者数47例。この内ムコ多糖症21であり、ハーラー症候群2名、ハンター症候群は7例、サンフィリップ症候群11例であった。1例以外は10年以上の罹病期間であり、長期間の療育が伺われる。重症度分類では、大島分離で「1」が11例であり、大半は「3」以上の超重心であった。又入院例は11例であり10例は在宅であった。大島分類で「3」以上の7例が在宅であり、超重心患者の在宅療育が多いことも判明した。また呼吸障害の治療分離では、酸素

療法7例。気管切開4例。人工呼吸器装着2例であった。酸素療法を受けているが気管切開に至っていない症例は3例存在した。在宅症例10例のなかで7例は機能訓練に通っている。このように重症例で療育機関に入院または療育訓練を受けている症例の存在が明らかになった。

つぎに、症例番号「16」の15歳ハンター症候群は、人工呼吸器使用し、酸素療法を受けているが、気管切開未施行の症例である。長期間の呼吸障害に悩まされているが、呼吸器装着により改善をみた。気管切開が困難な症例においてはQOLの改善に有効であるので報告する。

症例報告：フルフェイスマスク BiPAPが有効であったムコ多糖症Ⅱ（ハンター症候群、症例番号16）。16歳男児。2歳6ヶ月、酵素測定により確定診断された。運動機能は7-8歳頃から退行始まり、知的には10歳ころより有意語が消失した。10歳ころから心不全症状が出現し、大動脈便逆流症が深奥し、15歳では ejection fraction が30%まで低下した。幼少時より睡眠時無呼吸を「みとめたが11歳頃より増悪した。13歳頃より在宅酸素療法を開始したが、睡眠時無呼吸は著変なかった。14歳頃から、入眠直後より舌根が沈下し、無呼吸が頻発し SpO₂ が低下し、覚醒とともに再呼吸が起こり、SpO₂ が回復するというパターンが続くようになり、症状が悪化してきた。15歳、肺炎から呼吸不全に陥り、フルフェイスマスク BiPAPを開始した。BiPAP 導入後、呼吸不全は改善し、睡眠中の無呼吸も減少した。全身の浮腫の消失、肺うっ血や CRT (cardiac trachic ratio), EF (ejection flow)が改善した。

本症例は、気管粘膜の著明な腫脹および気道狭窄のために挿管が困難な症例であったため、BiPAP を選択したが結果は呼吸不全、心不全兆候が改善する効果を

示した。

D. 考案

全国調査により、重症心身障害児者施設に入所または通院しているムコ多糖症の21が判明した。大多数は超重心であり、40%の症例で呼吸障害合併していた。ムコ多糖症は気道狭窄を併発しやすく、気管切開が困難な症例がみられる。我々はこのような症例において、フルフェイスマスク BiPAP を使用して、呼吸不全および心不全の軽快をみた症例を報告した。ムコ多糖症の呼吸障害においてQOLの改善に朗報である。

E. 結論

ムコ多糖症は長い臨床経過を呈し、多くの症例が重症心身障害児施設に入院または通院していることが判明した。また呼吸障害を合併しやすく、挿管困難な症例が多いがフルフェイスマスク BiPAP がQOL改善に有効であることが判明した。

G. 研究発表

1. 総説

1) 松田光展、山口恭子、桜川宣男：小児の運動障害の診かた。小児科：46:14-23,2005

2. 学会発表

1) 椎木俊秀、桜川宣男、舟橋満寿子、鈴木康之：BiPAPが有効であったムコ多糖症Ⅱ型睡眠時無呼吸症候群の1例。日本小児神経学会、平成17年5月、熊本

2) 椎木俊秀、桜川宣男：BiPAPが有効であったムコ多糖症Ⅱ型閉塞性呼吸障害の1例。第30回、全国重症心身障害学会。旭川、平成16年9月9日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表。重症心身障害児病棟・施設に通院、入院しているムコ多糖症患者の病状

番号	診断名	年齢	罹病期間	大島	酸素	気切	分術	人呼	経管	胃瘻	機能訓練
入院、入所											
1	MPSⅡ	25	22年	1	○	○	×	×	×	○	×
2	MPSⅡ	17	17年	1	×	×	×	×	○	×	○
3	MPSⅢ	32	25年	5	×	×	×	×	×	×	
4	MPSⅢ	28	20年	2	×	×	×	×	×	×	○
5	MPSⅢ	27	27年	1	×	×	×	×	○	×	○
6	MPSⅢ	25		2	×	×	×	×	×	×	○
7	MPSⅢ	23	17年	3	×	×	×	×	○	×	×
8	MPSⅢ	21	19年	1	○	○	×	×	○	×	○
9	MPSⅢ	20	17年	1	○	×	×	×	○	×	○
10	MPSⅢ	11	10年	1	×	×	×	×	○	×	○
11	不明	31	29年	1	○	○	×	×	○	×	
在宅											
12	MPSⅠ	21	21年	1	○						○
13	MPSⅠ	6	6年	1	○	×	×	×	○	×	○
14	MPSⅡ	26	23年	3	×	×	×	×	×	×	○
15	MPSⅡ	21	17年	10	×	○	×	×	×	×	×
16	MPSⅠ	15	14年	1	○	×	×	×	○	×	○
17	MPSⅡ	12	不明	1			×	×		○	不明
18	MPSⅡ	11	10年	3	×	×	×	×	×	×	○
19	MPSⅢ	32	20年	2	×	×	×	×	×	×	×
20	MPSⅢ	25	23年		×	×	×	×	×	×	○
21	MPSⅢ	16	13年		×	×	×	×	×	×	○

大島：大島分類 酸素：酸素療法 気切：気管切開 人呼：人工呼吸器
 経管：経管栄養

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究班」
分担研究報告書

ライソゾーム病患者における血液中サイトカインなどの動態に関する研究
Gaucher 病患者の骨代謝マーカー、血液像とサイトカインの関連について

分担研究者 芳野 信 久留米大学医学部小児科学教室 教授
研究協力者 渡邊順子 久留米大学医学部小児科学教室 助手

研究要旨

われわれは Gaucher 病における骨病変や血液学的異常の機序における各種のサイトカイン等の関与の有無を検討するため本研究を行った。酵素補充療法中の Gaucher 病 1、3 型患者計 8 名で血液中のサイトカイン等と、骨代謝マーカー、血液学的検査所見との関係を検討した。その結果、本症では過去に報告されていない血液中の IL-18、TGF- β 1 の上昇が明らかになった。さらに IL-18 濃度は骨形成マーカー B-ALP と正の相関を認め、M-CSF などの過剰産生に伴う骨吸収に拮抗していることが伺われた。また、M-CSF や sCD14 および TNF- α の濃度はおおむね赤血球造血の因子とは負の相関を示した。これは造血空間の大きさの反映であると考えられた。

A. 研究目的

ライソゾーム病では欠損酵素の基質が蓄積する事が病態の引き金になると考えられるが、それ以降の機序は疾患毎に多様であると考えられる。Gaucher 病患者ではマクロファージ/単球系細胞が活性化され、その結果、血液中では一部のサイトカインや sCD14 など関連タンパク質（以下、サイトカイン等と総称する）が増加している事が知られている。Gaucher 病 1 型、3 型 では骨病変や貧血、白血球・血小板減少などの血液学的異常が患者の QOL に大きな影響を与える。しかし、これらの病態の機序は必ずしも明らかではない。われわれは、サイトカイン等がこれらの病態と関係しているのではないかとの仮説のもとに本研究を行った。

B. 研究方法

対象患者：酵素補充療法中の Gaucher 病患者 8 名（1 型 4 名、3a 型 1 名、3b 型 3 名）。年齢は 2 歳 4 ヶ月～50 歳（内 4 名が 20 歳以上）、性別は男子 7 例、女子 1 例、酵素補充療法の期間は 11 カ月～141 カ月。

血液中のサイトカイン等は血漿（TGF- β 1 のみ血清）を用いてそれぞれの製造者の指定するマニュアルにしたがって ELISA 法で定量した。一般血液検査、その他の血液学的検査、骨代謝マーカー測定はそれぞれの方法で行った。

本研究は久留米大学医学部倫理委員会の承認を受けた。説明主旨を患者またはその利益代理人に口頭ならびに文書で示し、書面でインフォームドコンセントを得た上で実施した。

説明の主旨は以下のとおりである。1. 定期検査の採血のおり、研究用に 14ml 採血させていただく。2. 採血にともなう苦痛や危険性は診療目的のそれと同等である、3. 本研究は直ちに診療上の患者の利益に結びつくものではない、4. 検体は匿名化され、主治医と研究責任者（芳野）以外の人には知られない、5. 研究に協力する、しないは患者自身（またはその利益代理人）の自由意志によって決めていただく、6. 協力しないことによって何らの不利益を受けない、7. いったん協力の許諾を与えた後もいつでも撤回できる、8. 得られた結果は、個人が特定できないかたちにしたうえで学会等での口頭発表や学術雑誌に論文等のかたちで公表することがある、の8点である。

C. 研究結果

以下の結果の記載では、ある値が対照値範囲を上回る場合は、上昇、下回る場合は低下と表記する。

1. 血液中のサイトカイン等

測定したサイトカイン等 10 項目中、IL-18、IL-6、IL-8、TNF- α は全例で対照範囲内であった。いっぽう、IL-18 は 7 例、sFas は 1 例、sCD14 は 4 例、M-CSF は 1 例、TGF- β 1 は 8 例全例、EPO は 1 例でそれぞれ上昇を認めた。

2. 骨代謝マーカー

対照値が確立している成人患者につき述べる。骨形成マーカーである osteocalcin は全例で対照値範囲内、bone-specific alkaline phosphatase (B-ALP) は 1 例が上昇を示した。また骨吸収マーカーである血清中の N-telopeptide to helix は 3 例、尿中の N-telopeptide to helix は 2 例、deoxypyridinoline は 3 例が上昇を示した。

3. Surrogate marker

病像の全般的マーカーである surrogate marker として total acid phosphatase (T-AcP) と angiotensin converting enzyme (ACE) を測定したところ、1 例が T-AcP の上昇を認めた以外はすべて対照値内であった。

4. 一般血液検査およびその他の血液学的検査

赤血球数、血色素濃度、ヘマトクリット値、血清鉄、フェリチン濃度、白血球数は全例、対照値範囲であった。血小板数は 2 例が低下、不飽和鉄結合能は 1 例が上昇を示した。

5. 血液中のサイトカイン等と骨代謝マーカーおよび surrogatemarker の相関

骨代謝マーカーの対照値が確立している成人患者 4 例について検討したところ、IL-18 濃度と骨形成マーカー-B-ALP との間に正の相関を認めた (表 1)。

また surrogate marker については全 8 例について、IL-18 および TNF- α の各々と T-AcP の間に正の相関が認められた。さらに IL-18 と ACE 間には正の相関が見られた (表 1)。

6. 血液中のサイトカイン等と血液学的検査との相関 (表 1)

IL-1 β 濃度は白血球数、EPO 濃度と正の相関を認めた。TNF- α 濃度は血色素濃度、ヘマトクリット値の各々と負の相関が見られた。sCD14 濃度は、白血球数、不飽和鉄結合能、EPO 濃度と正の相関を、またヘマトクリット値、血清鉄濃度の各々と負の相関を認めた。M-CSF 濃度は、白血球数、不飽和鉄結合能、EPO 濃度と正の相関を、血色素濃度、血清鉄濃度の各々と負の相関をそれぞれ認めた。

D. 考察

本研究の結果、Gaucher 病 1 型、3 型患者では、IL-18、TGF- β 1 の濃度が上昇してい

表1 サイトカイン等と骨代謝マーカー、surrogate marker および血液学的検査所見との相関

サイトカイン等	検査項目*	r	p	n
	骨代謝マーカー			
IL-18	B-ALP	0.984	0.0164	4 [§]
	surrogate marker			
IL-18	T-AcP	0.848	0.0084	8
TNF- α	T-AcP	0.946	0.0004	8
IL-18	ACE	0.745	0.0341	8
	血液学的検査			
IL-1 β	白血球数	0.729	0.0401	8
	EPO	0.876	0.0043	8
TNF- α	血色素濃度 \dagger	0.852	0.0072	8
	ヘマトクリット値 \dagger	0.769	0.0258	8
sCD14	白血球数	0.759	0.029	8
	不飽和鉄結合能	0.775	0.0407	8
	EPO	0.824	0.0119	8
	血色素濃度 \dagger	0.853	0.0099	8
	ヘマトクリット値 \dagger	0.762	0.0281	8
	血清鉄濃度 \dagger	0.85	0.0155	8
M-CSF	白血球数	0.928	0.0009	8
	不飽和鉄結合能	0.978	0.0001	8
	EPO	0.972	<0.0001	8
	血色素濃度 \dagger	0.7735	0.038	8
	血清鉄濃度 \dagger	0.967	0.0001	8

\dagger : 負の相関を示す。 \S : 成人例のみ

ることが明らかになった。これは Gaucher 病では過去に報告がない新しい知見である。さらに IL-18 が骨形成マーカーである B-ALP との正の相関を示したことは興味深い。本症での骨病変は骨粗鬆症、いわゆる“無血管性”壊死、その他の機序が関与しているといわれるが分子レベルでの機序は不明である。酵素補充療法治療前の患者では M-CSF 濃度の上昇がみられることはわれわれその他の報告がある。破骨細胞は CFU-GM、CFU-M から分化するが、M-CSF はその分化を促進する。このことから、Gaucher 病では M-CSF の増加により骨のホメオスタシスは破骨促進へ傾いていると言える。いっぽう、IL-18 濃度は骨形成マーカーである B-ALP 値と正の相関を示した。このことは、IL-18 濃度の上昇は、破骨促進へ傾いている状態に対する代償機転として作用している可能性がある。また TGF- β 1 は破骨細胞のアポトーシスを誘導し、間質細胞での M-CSF 産生を抑制する。したがって、TGF- β 1 の上昇も破骨促進へ傾いている状態に対する代償機転として作用している可能性がある。以上の事をまとめると、Gaucher 病では、M-CSF の過剰産生は骨吸収的に作用し、いっぽう、IL-18 や TGF- β 1 は代償性に骨形成的に作用していると考えられる。

血液学的所見との関係では、M-CSF および sCD14 濃度は、血色素濃度、血清鉄濃度と負の相関を、不飽和鉄結合能、EPO 濃度と正の相関を示した。いまのところ、M-CSF 自体が赤血球の分化・増殖に直接関係しているという証拠は知られていない。したがって上記の現象は、単に骨髓における造血空間の大きさを反映しているのかもしれない。この考えは M-CSF と白血球数が正の相関を示したことと

矛盾しない。いっぽう、TNF- α 濃度が血色素濃度およびヘマトクリット値と負の相関を示したことは、M-CSF 濃度と同様、造血空間の大きさの表現かもしれない。事実、われわれは過去に、酵素補充療法の経過中に、M-CSF、TNF- α 濃度の低下とともに血色素濃度などとともに上昇したことを報告している。

E. 結論

Gaucher 病 1 型、3 型患者血液中で IL-18、TGF- β 1 の上昇を認めた。これは過去に報告がない新しい知見である。

本症では M-CSF 等が過剰産生され、それが骨吸収的に作用していると考えられる。本研究では IL-18 濃度と骨形成マーカーである B-ALP との間に正の相関が認められた。このことから IL-18 の上昇は骨形成的に作用し、M-CSF 等の骨吸収的効果に対して拮抗的に作用していると考えられる。

M-CSF や sCD14 および TNF- α の濃度はおおむね赤血球造血の因子とは負の相関を示した。これは造血空間の大きさの反映であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

渡辺順子、徳永泰幸、原田英明、井田博幸、小林正久、大橋十也、衛藤義勝、芳野 信：1 型、3 型 Gaucher 病患者における血中サイトカインと骨代謝マーカー、血液像との相関。日本先天代謝異常学会雑誌 2004；20：203。

芳野 信、渡辺順子：Fabry 病患者血液中のサイトカインなどの動態。厚生労働省科学研究 難治性疾患克服研究事業「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」報告書 p43-44. 2004 年 3 月.

2. 学会発表

渡辺順子、芳野 信：リソソーム病患者の血中サイトカイン等の動態. 第 107 回日本小児科学会学術集会 (岡山) 2004 年 4 月 9 日- 4 月 11 日.

Watanabe Y, Tokunaga Y, Ida H, Kobayashi M, Ohashi T, Eto Y, Yoshino M: Correlations among cytokines and bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. 41st Annual Symposium, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Amsterdam) 2004. 8. 31. - 9. 3.

渡辺順子、徳永泰幸、原田英明、井田博幸、小林正久、大橋十也、衛藤義勝、芳野 信：1 型、3 型 Gaucher 病患者における血中サイ

トカインと骨代謝マーカー、血液像との相関. 日本先天代謝異常学会 (宇都宮) 2004 年 11 月 11 日- 13 日.

H. 健康危険情報

該当せず

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

J. 謝辞

本研究に多大な協力を頂いた東京慈恵会医科大学小児科学教室・井田博幸助教授、衛藤義勝教授はじめ、教室員各位に深謝する。