

2. 学会発表
- 1) 武田 篤、松崎理子、長谷川隆文、糸山泰人、菊池昭夫、 γ -synuclein 凝集体形成における細胞内微小管系の関与、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002.
 - 2) 松崎理子、武田 篤、長谷川隆文、糸山泰人、菊池昭夫、培養細胞を用いた γ -synuclein 細胞内凝集モデルの作成、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002.
 - 3) 長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、武田篤、糸山泰人、 γ -synuclein 過剰発現による細胞内凝集体形成と RA・BDNF 分化誘導、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002.
 - 4) Hasegawa T., Matsuzaki M., Kikuchi A., Furukawa K., Takeda A., Itoyama Y. Accelerated formation of γ -synuclein aggregates in "differentiated" SH-SY5Y neuroblastoma cells. 7th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Miami, USA, 2002.
 - 5) 武田篤、長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、糸山泰人、古川勝敏、Tyrosinase による Dopamine 合成細胞モデル、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003.
 - 6) 松崎理子、長谷川隆文、菊池昭夫、古川勝敏、武田篤、糸山泰人、鉄キレート剤による α -synuclein 細胞内凝集体形成抑制と神経細胞死、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003.
 - 7) 長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、古川勝敏、武田篤、糸山泰人、 α -synuclein 過剰発現 SH-SY5Y 細胞を用いた RA・BDNF 分化誘導下における凝集体形成モデルの作成、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003.
 - 8) 小林理子、長谷川隆文、武田篤、菊池昭夫、糸山泰人、 α -synuclein 凝集体形成による細胞保護作用、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004.
 - 9) 武田篤、小林理子、長谷川隆文、菊池昭夫、糸山泰人、チロシン水酸化酵素発現調節モデルを用いたシヌクレイノパチーの病態解析、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004.
 - 10) 長谷川隆文、小林理子、菊池昭夫、武田篤、チロシナーゼ発現調節モデルを用いたカテコラミン酸化物による神経細胞死の病態解析、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004.
 - 11) Hasegawa T, Kobayashi M, Takeda A, Kikuchi A, Furukawa K, Itoyama Y. Oxidized catecholamine metabolites by tyrosinase overexpression induces apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.
 - 12) Kobayashi M, Hasegawa T, Takeda A, Kikuchi A, Itoyama Y. Protective role of γ -synuclein aggregation induced by iron. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.
 - 13) Takeda A, Kobayashi M, Hasegawa T, Kikuchi A, Itoyama Y. Inducible overexpression of tyrosine hydroxylase and dopamine production in cellular model. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.

副腎白質ジストロフィーおよびペルオキシソーム病の 病態と治療法開発に関する研究

分担研究者 鈴木康之 岐阜大学医学部医学教育開発研究センター
研究協力者 下澤伸行 岐阜大学生命科学総合実験センター
竹本靖彦 岐阜大学医学部小児病態学
長瀬朋子 岐阜大学医学部小児病態学

研究要旨

副腎白質ジストロフィーやペルオキシソーム欠損症は中枢神経に主病変があり、前者は脱髄、後者は神経細胞移動障害が特徴的である。しかし、ペルオキシソームの中枢神経の発生、発達過程に果たす役割はほとんど解明されていない。今年度の研究により、中枢神経の発生発達過程におけるペルオキシソーム膜タンパクならびにマトリックスタンパクの神経細胞内における局在を生後マウス小脳組織と胎生15日の小脳分散培養を用いて明らかにした。その結果、グリア細胞においては膜タンパクならびにマトリックスタンパクともペルオキシソームに局在していたのに対し、プルキンエ細胞においては膜タンパクは存在するもののマトリックスタンパクは局在していなかった。今後、神経幹細胞を用いて分化過程におけるタンパクの局在を明らかにするとともに、中枢神経におけるペルオキシソーム代謝機構を明らかにして、ペルオキシソーム病における中枢神経病変の発症機序を解明したい。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)およびペルオキシソーム欠損症はいずれも細胞内小器官であるペルオキシソームの代謝機能に異常をきたす遺伝性疾患である。研究者らはこの3年間において、(1) ALDの前方視的調査を目的としたデータベースの試作、(2) ALD遺伝子異常を示し、従来と異なる臨床所見を呈する疾患単位の発見、(3) 新たなペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子の発見、(4) ペルオキシソーム欠損症の中枢神経病理所見に関する発生学的研究を行ってきた。

B,C,D. 研究方法・結果・考察

(1) ALDの前方視的調査を目的としたデータベースの試作

副腎白質ジストロフィー患者の臨床所見、検査所見、臨床経過、治療歴、QOL、ADLなどを経時的に入力し、種々の解析が可能なデータベースを開発した。これらは自然歴の解明のみならず、病態、早期診断、医療対策、福祉対策にも還元できると考えられた。本データベースは患者登録、身体所見、Review of Systems、治療歴、神経心理学的検査、血液生化学検査、聴力検査、心電図・エコー、肺機能、レントゲン・MRI、歩行検査、画像取り込みなどが可能であ

り、報告書の作成、ファイル出力も可能である。

(2) ALD 遺伝子異常を示し、従来と異なる臨床所見を呈する疾患単位の発見

出生直後から呼吸障害、顔貌異常、黄疸、肝腫大など Zellweger 症候群様の臨床像を呈し、既存の新生児型 ALD やペルオキシソームβ酸化酵素単独欠損症でない、新たな疾患単位と考えられる症例を経験した。症例は37週3日、1780gで出生した低出生体重児で、極長鎖脂肪酸の蓄積を認めたため、当初 Zellweger 症候群を疑ったが、蛍光抗体染色でペルオキシソームの存在が確認され、β酸化酵素の解析でも異常を検出できなかった。しかし Western blot で ALDP の欠損を認め、ALD gene 全体を含む large deletion が存在することが明らかとなった。本症例の解析は ALDP の機能、ALD の発症機序を考える上で極めて重要と考えられた。

(3) 新たなペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子 PEX14 の発見

Zellweger 症候群に典型的な臨床所見を呈して生後12日で死亡、血清極長鎖脂肪酸の蓄積と赤血球プラスマローゲンの欠乏、線維芽細胞での蛍光染色よりペルオキシソーム欠損症と診断した。線維芽細胞を用いた細胞融合による相

補性解析より、既存のペルオキシソーム欠損症 12 群とは異なる新たな相補性群と判明し、K 群と命名した。この患者細胞ではペルオキシソーム局在シグナルである PTS1 タンパクも PTS2 タンパクもペルオキシソームへの局在が障害されていた。酵母のペルオキシソーム形成遺伝子 *PEX14* のヒトホモログ *HsPEX14* はクローニングされていたが、ヒトでの遺伝子異常の報告がないため、この遺伝子を解析したところ、患者で Q185X のナンセンス変異を homozygote で有していることが明らかになった。野生型 *HsPEX14* を発現ベクターに組み込んで患者細胞に導入したところ、PTS1 タンパクも PTS2 タンパクも正常にペルオキシソームに局在化した。一方、Q185X 変異を有する *HsPEX14* を発現させても酵素のペルオキシソームへの局在は回復しなかった。さらに抗ラット *PEX14* 抗体を用いて患者細胞の蛍光染色を行った結果、*PEX14* タンパクの欠損が認められた。

(4) ペルオキシソーム欠損症の中枢神経病理所見に関する発生学的研究

生後小脳組織においても胎仔小脳分散培養細胞レベルにおいても、抗ペルオキシソーム膜タンパク抗体による染色ではグリア細胞、プルキンエ細胞双方にペルオキシソームの顆粒状染色が認められた。一方、複数の抗マトリックスタンパク抗体を用いた染色では、グリア細胞では豊富に顆粒状染色が認められたのに対し、プルキンエ細胞では生後凍結切片でも分散培養でも殆ど顆粒状染色物は認められなかった。以上の結果よりグリア細胞には正常にマトリックスタンパクを有するペルオキシソームが存在しているのに対し、プルキンエ細胞ではペルオキシソームの膜構造自体は存在するもののマトリックスタンパクは局在しておらず、細胞内輸送機能もしくはタンパク自体の産生や分解に異常を来している可能性が考えられた。このことは発達神経系におけるペルオキシソームタンパクの細胞内輸送やペルオキシソーム代謝におけるニューロン・グリア相互作用の関与を解明するための重要な所見であると思われた。

E. 結論

(1) ALD の前方視的調査を目的としたデータベースを試作した。(2) ALD 遺伝子異常を示し、従来と異なる臨床所見を呈する疾患単位を明らかにした。(3) 新たなペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子 *PEX* を発見した。(4) ペルオキシ

ソームが中枢神経病理所見に関与していると示唆される発生学的所見を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Raas-Rothschild A, Wanders RJ, Mooijer PA, Gootjes J, Waterham HR, Gutman A, Suzuki Y, Shimozawa N, Kondo N, Eshel G, Espeel M, Roels F, Korman SH. A PEX6-defective peroxisomal biogenesis disorder with severe phenotype in an infant, versus mild phenotype resembling Usher syndrome in the affected parents. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1062-8.
- 2) Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y, Fujiki Y, Wanders RJ, Kondo N. A novel aberrant splicing mutation of the *PEX16* gene in two patients with Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:109-12.
- 3) Suzuki Y, Iai M, Kamei A, Tanabe Y, Chida S, Yamaguchi S, Zhang Z, Takemoto Y, Shimozawa N, Kondo N. Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency. *J Pediatr.* 2002;140:128-30.
- 4) Takemoto Y, Suzuki Y, Shimozawa N, Tamakoshi A, Onodera O, Tsuji S, Kondo N. Epidemiology of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Genet* 47:590-593, 2002
- 5) 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. *Brain & Development* 27:481-487, 2003
- 6) Yuzhi Jia, Chao Qi, Zhongyi Zhang, Takashi Hashimoto, M. Sambasiva Rao, Steven Huyghe, Yasuyuki Suzuki, Paul P. Van Veldhoven, Myriam Baes, and Janardan K. 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. *J Biol Chem* 278:47232-9, 2003
- 7) Une M, Iguchi Y, Sakamoto T, Tomita T, Suzuki Y, Morita M, Imanaka T. ATP-dependent transport of bile acid intermediates across rat liver peroxisomal membranes. *J Biochem.* 134:225-230, 2003
- 8) Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Ohura T, Suzuki, Kondo N. Genetic heterogeneity of peroxisome biogenesis disorders among Japanese patients: evidence for a founder haplotype for the most common *PEX10* gene mutation. *Am J Med Genet* 120A:40-43, 2003
- 9) Matsumoto N, Tamura S, Furuki S, Miyata N, Moser A, Shimozawa N, Moser HW, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. Mutations in novel peroxin gene *PEX26* that cause

- peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 73:233-246, 2003
- 10) Kikuchi M, Hatanoto N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T, Taniguchi H. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of lon protease. *J Biol Chem.* 279: 421-8, 2004
- 11) J Gootjes, O Elpeleg, F Eyskens, H Mandel, D Mitanchez, N Shimozawa, Y Suzuki, HR. Waterham, RJA Wanders. Novel mutations in the PEX2 gene of four unrelated patients with a peroxisome biogenesis disorder. *Pediatr Res.* 55: 431-6, 2004
- 12) Nagase T, Shimozawa N, Takemoto Y, Suzuki Y, Komori M, Kondo N. Peroxisomal localization in the developing mouse cerebellum: Implications for neuronal abnormalities related to deficiencies in peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1671(1-3): 26-33, 2004
- 13) N Shimozawa, T Tsukamoto, T Nagase, Y Takemoto, N Koyama, Y Suzuki, M Komori, T Osumi, G Jeannette, RJA. Wanders, N Kondo. Identification of a New Complementation Group of the Peroxisome Biogenesis Disorders and PEX14 as the Mutated Gene. *Hum Mutat.* 23 (6): 552-8, 2004
- 14) Morita M, Takahashi I, Kanai M, Okafuji F, Iwashima M, Hayashi T, Watanabe S, Hamazaki T, Shimozawa N, Suzuki Y, Furuya H, Yamada T, Imanaka T. Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, a flavonoid derivative, stimulates fatty acid beta-oxidation in skin fibroblasts of X-linked adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett.* 579(2): 409-14, 2005
- 基準値について. 第 47 回日本人類遺伝学会、2002.11.13-15、名古屋
- 7) Shimozawa N, Suzuki Y, Nagase T, Takemoto Y, Kondo N: Genetic Heterogeneity In Japanese Patients With Peroxisome Biogenesis Disorders And Evidence For A Founder Haplotype For The Most Common Mutation In PEX10 Gene. International Symposium: Peroxisomal Disorders and regulation of Genes, Sep 25-28, 2002, Gent, Belgium
- 8) Suzuki Y, Takemoto Y, Shimozawa N, Kondo N: Epidemiology Of X-Linked Adrenoleukodystrophy In Japan. International Symposium: Peroxisomal Disorders and regulation of Genes, Sep 25-28, 2002, Gent, Belgium
- 9) 船戸道徳、下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之、今村善彦、近藤直実: ペルオキシソームβ酸化酵素単独欠損症日本人症例の検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会、2003.4.25-27, 福岡
- 10) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実: マウス小脳における発達過程でのペルオキシソーム局在についての検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会、2003.4.25-27, 福岡
- 11) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、山形崇倫、桃井真理子、近藤直実: Zellweger 症候群様の臨床像を呈し、ALDP 遺伝子を含む遺伝子欠失を有した 1 例. 第 48 回日本人類遺伝学会、2003.10.21-24, 長崎
- 12) 下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、塚本利朗、鈴木康之、近藤直実: ペルオキシソーム欠損症新規相補性群の同定—PEX14 遺伝子異常. 第 48 回日本人類遺伝学会、2003.10.21-24, 長崎
- 13) 鈴木康之、竹本靖彦、長瀬朋子、下澤伸行、近藤直実: 副腎白質ジストロフィーの臨床経過. 第 4 6 回日本先天代謝異常学会、2003.11.20-22, 松江
- 14) 下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之、松本 正、藤木幸夫、近藤直実: ペルオキシソーム欠損症 A 群における病因遺伝子 PEX26 の解析. 第 4 6 回日本先天代謝異常学会、2003.11.20-22, 松江
- 15) N Shimozawa, T Nagase, Y Suzuki, N Kondo: Molecular and neurological findings in Zellweger syndrome. 7th International symposium on neuronal migration disorders and childhood epilepsies, Tokyo, April, 2004
- 16) Shimozawa N, T Nagase, Y Suzuki, N Kondo, RJA Wanders. Molecular analysis of Peroxisome Biogenesis Disorders. 56th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Oct, 2004
- 17) Hashimoto K, Kato Z, Nagase T, Shimozawa N, Kuwata K, Omoya K, Li A, Matsukuma E, Yamamoto Y, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Suzuki Y, Wanders RJA, Kondo N. Molecular basis of a temperature-sensitive PEX13 mutation of peroxisomal biogenesis disorder (1): Immunohistochemistry and protein analyses. 56th Annual Meeting of American

2. 学会発表

- 1) 長瀬朋子、下澤伸行、堀部亮子、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実: 脳の発達におけるペルオキシソームの役割—マウス小脳における局在の検討. 第 105 回日本小児科学会学術集会、2002.4.19-21、名古屋
- 2) 鈴木康之、竹本靖彦、下澤伸行、近藤直実: 副腎白質ジストロフィーの全国疫学調査 (第 2 報). 第 44 回日本小児神経学会総会、2002.6.27-29、仙台
- 3) 竹本靖彦、鈴木康之、長瀬朋子、下澤伸行、近藤直実: 濾紙血を用いたペルオキシソーム病スクリーニング. 第 44 回日本小児神経学会総会、2002.6.27-29、仙台
- 4) 下澤伸行、鈴木康之、長瀬朋子、竹本靖彦、大浦敏博、近藤直実: 日本人ペルオキシソーム欠損症 common mutation における haplotype の検討. 第 45 回日本先天代謝異常学会、2002.11.7-9、神戸
- 5) 鈴木康之、竹本靖彦、下澤伸行、近藤直実: 本邦における副腎白質ジストロフィーの疫学的特徴. 第 45 回日本先天代謝異常学会、2002.11.7-9、神戸
- 6) 竹本靖彦、鈴木康之、下澤伸行、近藤直実: GC/MS を用いた一斉分析システムによる極長鎖脂肪酸の

Society of Human Genetics, Toronto, Oct, 2004

- 18) 長瀬朋子、下澤伸行、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実 ニューロンにおけるタンパクのペルオキシソームへの import に関する検討. 第 46 回日本小児神経学会総会、東京、2004
- 19) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実. 中枢神経系におけるペルオキシソームタンパクの import に関する検討. 第 47 回日本先天代謝異常学会、宇都宮、2004
- 20) 折居恒治、下澤伸行、鈴木康之、長瀬朋子、William Sly、近藤直実. ペルオキシソーム欠損症モデルマウスの基礎的検討. 第 47 回日本先天代謝異常学会、宇都宮、2004
- 21) 橋本和幸、加藤善一郎、長瀬朋子、下澤伸行、桑田一夫、面家健太郎、松隈英治、白川昌宏、鈴木康之、近藤直実. PEX13 温度感受性変異の分子基盤(1): 免疫組織化学およびタンパク解析. 第 47 回日本先天代謝異常学会、宇都宮、2004

H. 知的所有権の取得状況

なし

小児副腎白質ジストロフィー症の神経心理学的・神経生理学的評価 幹細胞移植の適応と治療効果判定のために

分担研究者 加我 牧子 国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部部长

研究要旨 小児期発症の副腎白質ジストロフィー症の臨床指標として考案した検査バッテリーを用い造血幹細胞移植(HSCT)前後の男児13例にのべ27回評価を行った。その結果、視力障害のあるALD小児の中枢性視覚障害の評価を行うことができ、末梢聴力が正常なALD小児にしばしば中枢性聴覚情報処理の存在が見いだされた。多種類の誘発電位と事象関連電位の同時検査はALD小児の認知機能の階層的評価に有用であった。詳細な検査により、視覚・視空間認知、記憶、前頭葉機能、聴覚認知などの障害が抽出され、MRI所見から推測されるより広範囲な認知障害が確認された。継時的検査でIQが保たれているのは発症年齢が遅い群であり、術前PIQが80以上でも術後、著しい低下を示す場合があった。知能検査下位項目のうち算数の低下は発病初期の指標として敏感であった。動作性課題の下位項目には個人差があったが、符号・記号探しは注意障害の評価に役立った。

HSCT後症例と非移植例の経過を比較することでALD児における視・聴覚認知機能はHSCTにより低下が阻止される、あるいは進行が鈍化することが推定され治療の意義が確認された。各施設で比較的容易に実施できる検査としてWechsler系知能検査以外にレイの複雑図形、レイのAVLT、人物描画検査、立方体透視図模写は特別な器械や器具が不要で、短時間にできるため有用であり、各施設で比較的容易に実施できる。それ以外の検査評価は更に専門的施設で実施を考慮すべきであり、年少児の評価には神経生理学的検査の積極的導入が必要である。

A. 研究目的

今日小児副腎白質ジストロフィー(ALD)症に対して、発病初期の造血幹細胞移植(HSCT)の有用性が確立されている。我々は本研究班において、本邦で実施可能かつ有用な検査バッテリーを提案し、3年間にわたりHSCT前後に神経心理ならびに生理学的検査を行い検討を進めてきた。そこで1. このバッテリーによる検査ならびに経過観察の意義を明らかにすること、2. 移植以外の治療を行った非移植群の経過と比較することにより移植の効果について評価すること、3. 視聴覚認知障害の有無と程度、4. 各移植施設での定期健診に際して実施可能な検査を検討し、提案すること

を目的とした。

B. 研究方法

対象は幹細胞移植前後の評価のため全国からご紹介頂いた13例(発症時平均年齢：6歳9ヵ月)の小児ALD児で、のべ27回にわたり評価を行った。小児例のうち8例は移植前または待機中で5例は移植後であった。また非移植例8例(発症時平均年齢：8歳6ヵ月)で神経生理学的検査結果を参考とした。

(1) 心理学的・神経心理学的検査

Moserの推薦する方法を改変したバッテリーに聴覚機能検査を加え総体として言語、視空間認知、視知覚、視運動、記憶、注意/

実行機能をしらべた。用いた検査は WISC-III, Raven 色彩マトリクス検査, レイの複雑図形, レイの AVLT, Frostig 視知覚発達検査, 失語症検査, トークンテスト, 顔や斜線の認知, Dichotic listening test (DLT), 線分抹消検査, 線分二等分検査, 語音聴力検査, ストループテスト, 環境音弁別検査, 音像定位検査, 人物描画検査, 立方体透視図模写, 時計や花などの描画, Wisconsin Card Sorting Test などである。

(2) 神経生理学的検査

中耳および内耳機能の評価のためインピーダンスオージオメトリー、鐙骨筋反射、耳音響放射を実施した。感覚伝導路機能評価のため視覚誘発電位（視覚誘発電位 VEP）・聴覚誘発電位（聴性脳幹反応 ABR, 中間潜時反応 MLR, 頭頂部緩反応 SVR）・体性感覚誘発電位（長潜時体性感覚誘発電位 SEP, 短潜時知覚誘発電位 SSEP), 視覚性・聴覚性事象関連電位 (mismatch negativity (MMN), P300) である。

(倫理面への配慮)

患児並びに保護者が主治医から国立精神・神経センターにおける検査について説明を受け、これに同意した方のみが当センターを受診された。受診時には検査の内容と意義について保護者と患児に再度説明して同意を得た。

C. 研究結果

13 例中 MRI 上に後頭葉が主病変だったのが 9 例、前頭葉病変のある例が 2 例、病変が確認できてない 2 例があった (表 1)。

表 1

症例	年齢	症例 (27 occasions)			MRI 病巣	
		VIQ	PIQ	FIQ	主病変	その他
1	3y4m			DQ 80	Lt Oc	T F
2	4y0m	77	60	62	none	
3	7y0m	97	94	101	Oc	
4	8y4m	53	<40	<40	Oc	CC
5	10y7m	72	<40	51	Oc	
6	10y8m	79	48	60	Oc	CC BS
7	10y8m	94	54	73	Oc	CC
8	12y11m	92	87	89	P	
9	5y10m	81	71	74	Oc	CC
10	8y6m	47	<40	<40	Oc	
11	9y9m	99	89	93	none	
12	15y2m	56	82	65	F	P
13	18y0m	77	63	68	Oc	F

CC; 病巣, BS; 脳幹

(1) 神経心理学的所見

0. 知能検査

FIQ と PIQ の経過はほぼ同様の傾向を示し、移植後長期に安定している群と下がってきている群が認められた。一方 PIQ80 以上で治療しても IQ が悪くなる群もあり、1 例は 1 年程度は安定していたがその後急速に悪化した。他の 1 例は術後急速に悪化がみられた。なお HSCT 前後における FIQ の経時変化では、移植例 4 例の FIQ は、発症後急激に低下したが、移植後 2 - 3 年経過すると IQ 低下が緩徐となる傾向を示した。非移植例では発症後、数ヵ月から 2 - 3 年で既に IQ の検査はできない状態であった。

知能が安定しているグループでは Wechsler 系の知能検査の下位項目の検討で複数回の検査でもプロフィールの変化はほとんどなかった。経時的観察で発症に際して算数の項目の低下がみられていた症例が 4 例中 3 例認められた。動作性課題では絵画完成、絵画配列、組み合わせなど低下項目は症例による差があり、また符号・記号探しは注意障害の評価に役立った。

1. 前頭葉機能

程度はさまざまであるが前頭葉機能障害を示す者が 9 例あった。

2. 言語機能

言語機能は7例で軽度の障害を認めた。

3. 記憶機能

記憶に関する障害も見られ視覚性記憶、言語性記憶がともに正常であったのは1例のみであった。

4. 聴覚認知機能

① 聴力検査 純音聴力の異常を示したのは検査し得た12例中1例のみであったが語音弁別は5名で低下が見られた。

② 環境音認知が正常であったのは3例のみであった。

③ 音の方向感の異常を示す者が多く、音圧差、時間差ともに正常だったのは1例のみであった。

④ 両耳聴検査 実施し得た8例中4例で重度の左右差など高度の異常を示した。

(1) 視覚認知機能—視力と視覚系神経生理学的検査

小児例のすべてになんらかの視覚認知障害を認めた。

1. 視力 13例中6例に高度の視力低下を示した。

2. 視覚誘発電位 VEP 経過中正常であったのは4例であった。初診時2歳で神経心理学的評価が充分行えなかった症例のVEPが8ヶ月の経過で明瞭な潜時の延長を示した。移植群と非移植群のF-VEPのIV波潜時の比較では、非移植例(5例)で、早い例では潜時延長が発症後7ヵ月よりみられ、変動する傾向を認めた。また、波形は認めても潜時が著明に遅延している例、振幅の低下する例を認めた。

3. 視覚性 P300 当研究室でのルーチンの検査を一部でも実施することが可能であったのは5例であったがすべての検査が正常であったのは2例のみであり、高度の潜

時遅延を示す者が多かった。ただしアニメーションキャラクターや色など本人に適した課題を用いることによってこのうちの1例は生理学的に視覚弁別の評価が可能となり正常所見を示した。そのほか5例の検査が可能となった。

(3) 聴覚認知機能—聴覚系生理検査

① OAE 検査を実施した11例中3例が軽度異常を示した。

② 聴性脳幹反応 ABR 経過中一貫して正常であったのは5例のみであった。初診時2歳で神経心理学的評価が充分行えなかった症例のABRが8ヶ月の経過で明瞭な潜時の延長を示した。移植群と非移植群の発症後におけるI-V波頂点間潜時を比較した。移植群で移植後7年後までほぼ一定にたもたれていたのに対し非移植例では経過を追えた8例中5例で、発症後2、3年以降に潜時延長を認め、V波の消失する例も認めた。また、移植群、非移植群とも明らかな域値上昇は認めなかった。非移植例の波形は発症後3年でV波潜時の遅延、消失あるいは平坦化を認めているが、移植例では移植前から波形はほぼ正常であり、発症後2年5ヵ月まで正常波形が保たれていた。他の3例も、明らかな異常を示した例は認めなかった。

③ 聴性中間潜時反応 MLR 高度の異常を示した症例はなかった。移植前後の経過では、移植群で明らかな異常は認めなかった。

④ 頭頂部緩反応 SVR 12例中2例が軽度の異常を示した。移植前後の経過では、移植群で明らかな異常は認めなかった。

⑤ mismatch negativity MMN トーンバースト、言語音への反応がともに正常だったのは2例のみであった。トーンバーストへ

の反応が言語音より良好であった者が 7 例あり、逆の結果を示したのは 1 例のみであった。言語音刺激による mismatch negativity 潜時は 1 例で不変であり、他の 3 例では改善傾向を示した。純音刺激による mismatch negativity 潜時の移植前後の経時的変化においても同様の結果であった。

⑥ P300 反応が検出されても潜時の延長を示す者が多く、トーンバースト、言語音への反応がともに正常だったのは 2 例のみであった。トーンバーストへの反応が言語音より良好であったのは 6 例あった。

聴覚性 P300 潜時は移植後の経過中、1 例では移植後 1 年目で、P300 を同定できなかったものの、移植後 3 年目には P300 を認め、潜時もその後短縮し、改善を示した。また、他の 3 例では最終観察時には不変であり、増悪傾向を認めなかった。また、言語音刺激では移植後 1、2 年後は弁別できなかったものが、徐々に弁別可能となってきた。

(4) 体性感覚誘発生理検査

移植群、非移植群における SSEP、N20 潜時、N13-N20 中枢神経伝導時間の発症後時間経過の比較では N20 潜時は、移植後ほぼ一定の値を示したが、中枢神経伝導時間は 4 例中 2 例で正常範囲内にあり、2 例で経過とともに軽度延長した。しかしながら、移植後 4 年以降も N20 は明瞭に認められた。また、全例左右差を認めなかった。一方、非移植例では、N20 潜時の著明な延長が 1 例で発症後 7 ヶ月からすでにあきらかで、波形は次第に消失していくパターン、もしくは著明な潜時の遅延を認めるなど異常が早期から出現していた。また、中枢神経伝導時間についても早期から著明な遅延を認

めた。

(5) MRI 病変と神経心理検査の評価の関係

神経心理学的検査によって、視覚認知、視空間認知、記憶、前頭葉機能、聴覚認知などの障害が抽出され、MRI 所見から推測されるよりも広範囲に認知機能が障害されていることがしばしばあることが示された。

D. 考察

IQ の推移を検討すると FIQ と PIQ の経過はほぼ同様の傾向を示した。移植後長期に安定している群と低下する群が認められた。

Shapiro らの報告の通り PIQ80 以下は結果が悪く、特に治療前に PIQ が 50 以下の者は予後が悪かった。従ってこの群での移植は社会的適応に限られると思われた。一方 80 以上で治療しても IQ が悪化する群もあった。悪化は術後急速で有る場合と 1 年程度経過した後の場合があった。発症年齢と予後には関係があり、発症の遅い者は知能が保たれやすいと思われた。発症が遅く知能が比較的よく保たれていた症例では WISC-III の下位検査項目の変動はほとんどないことが判明した。また発症のサインとして算数の項目の低下には注意を払う必要があるのではないかと考えられた。

発症群は Wechsler 系知能検査言語性課題のうち算数の低下を示すものが目立った。

Wechsler 系知能検査のみでは十分評価できない課題として言語性記憶・視覚性記憶・視覚的推理・視空間認知・構成能力・聴覚認知・聴空間認知などがあげられる。この点を意識して検査を実施する必要がある。移植施設における定期健診での評価を

考えると特別な器械や器具が不要で、短時間にできる項目としてレイの複雑図形、レイの AVLT、人物描画テスト、立方体透視図模写があげられる。各施設での検査実施者の数や質、常備されている器具や機器の差を考慮して国立精神・神経センターにおける検査との分担を考える必要があることを示した。

MRI所見から推測されるよりも広範囲に認知機能が障害されていることがしばしばあることが示された。これは潜在的に病態が進行しており、それを神経・生理検査により、MRI所見から推測できない機能異常を検出できるため、治療時期決定・効果判定に有用であると考えられる。

小児副腎白質ジストロフィーにおける HSCT 治療効果判定としての神経生理学的検査を経時的に経過を追った報告はこれまでなかった。

神経心理学的ならびに神経生理学的手法を組み合わせることで ALD 小児の視聴覚認知機能を明らかにすることができ、幹細胞移植前後の機能評価に有用であることが判明した。特に移植時期の判断が難しく、しかも神経心理学的評価が十分行えない年少児については誘発電位検査が経時的評価に有用であり積極的に応用すべきと思われる。

明らかな視力障害のある症例でも適切な課題を作成することによって視覚弁別機能の評価を他覚的かつ経時的に行えることがわかり、臨床的評価に有用であることが判明した。

大部分の ALD 小児の純音聴力は正常であったが、高率に語音弁別の異常をはじめとする聴覚情報処理の異常がみられ、日常

生活面でのケアが必要なことが示唆された。特に MMN と P300 はトーンバーストと言語音の弁別処理の異常を明らかにするのによい手段であり、広く臨床応用を進める必要があると思われる。

SEP, SSEP の結果から移植により大脳皮質一次感覚野の伝導は移植により保たれると推察された。

以上の誘発電位と事象関連電位の検査結果の推移は、移植により疾患の進行が停止あるいは少なくとも鈍化していることを示唆していると思われる。非移植例では認知機能の進行性悪化は通常停止することがない点を考慮すると、移植の直接の効果が現れていること、また児の成長発達が認知機能低下の抑制に働きうるものと考えられた。

E. 結論

1. 私たちのテストバッテリーは小児 ALD 症例の幹細胞移植前後の評価に有用であることが示された。
2. 幹細胞移植により認知機能の低下を阻止または遅延させることができることが確認された。
3. 視力障害のある ALD 小児の中枢性視覚障害を評価することができ、末梢聴力が正常な ALD 児もしばしば中枢性聴覚情報処理の異常を合併していることが明らかになった。
4. 各施設での定期健診において実施可能な検査項目を提案し、国立精神・神経センターにおける検査との役割分担が必要と考えた。
5. 年少児の評価には神経生理学的検査の積極的導入が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inagaki M, Kaga Y, Kaga M et al. Multimodal evoked potentials in patients with pediatric leukodystrophy: Natural courses and Changes after haemopoietic stem cell transplantation. *Clinical Neurophysiology*, (in press.)

2) 白根聖子, 稲垣真澄, 堀口寿広, 中村雅子, 佐々木匡子, 加我牧子: 副腎白質ジストロフィー症における両耳分離聴能検査 (Dichotic Listening Test)異常. *脳と発達* 36: 311-317, 2004

3 Kaga M, Kon K, Uno A, Horiguchi T, Yoneyama H, Inagaki M. : Auditory perception in auditory neuropathy: Clinical similarity with auditory verbal agnosia. *Brain Dev* 4:197-202, 2002

4) 白根聖子, 稲垣真澄, 加我牧子: 小児の中枢性聴覚障害. *JOHNS* 18:1822-1824, 2002

5) 加我牧子: 小児神経疾患と中枢性聴覚障害. *医学のあゆみ* 200:181-185, 2002.

2. 学会発表

1). Inagaki M, Oana S, Kaga M, Katoh S: Multimodal evoked potentials in patients with pediatric leukodystrophy: natural courses and changes after haemopoietic stem cell transplantation. The 8th International Evoked Potentials Symposium, Fukuoka, 2004.10.7.

2). Kaga M, Inagaki M, Shirane S, Horiguchi T, Hatori T, Sasaki K, Nakamura M: Auditory perception in patients with childhood adrenoleukodystrophy (ALD).

IREASG 2003. Tenerife. 2003,6,11

3) 小穴信吾ら: 小児副腎白質ジストロフィー (ALD) における造血幹細胞移植後の神経生理学的所見. 第 46 回日本小児神経学会, 東京, 2004.7.16

4) 羽鳥誉之ら: 副腎白質ジストロフィー症 (ALD) における視覚性 P300 の評価. 第 44 回日本小児神経学会, 仙台, 2002.6.27.

5) 佐々木匡子ら: 副腎白質ジストロフィー症 (ALD) 児への神経心理学的診断アプローチ. 第 44 回日本小児神経学会, 仙台, 2002.6.28.

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

研究協力者

稲垣真澄, 堀口寿広, 中村雅子, 鈴木・白根聖子, 佐々木匡子, 羽鳥誉之, 小穴信吾, 山口奈緒子, 小久保奈緒美, 佐田・加賀・佳美, 軍司敦子, 石黒秋生, 加藤俊一

貴重な症例をご紹介いただいた先生方ならびにご協力いただいた患者さんにご家族に感謝いたします

副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の有効性に関する研究

分担研究者 加藤 俊一 東海大学医学部・教授

研究要旨：副腎白質ジストロフィー（ALD）における造血幹細胞移植ガイドラインを作成した。ガイドラインでは、造血幹細胞移植の適応と適応時期、ドナーならびに移植細胞源の選択、移植前処置、GVHD予防、治療効果の評価方法などについて具体的な記載を行った。

ALDにおいて現時点で唯一の根治療法である造血幹細胞移植についての正しい理解の普及に役立てるため、本ガイドラインが活用されることが望まれる。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー（以下ALD）においては骨髄移植や臍帯血移植などの造血幹細胞移植以外に有効な治療法はない。しかし、造血幹細胞移植についての国内外のコンセンサスはこれまでなかった。そこで、本研究班における3年間のまとめとして、「副腎白質ジストロフィー（ALD）における造血幹細胞移植ガイドライン」を作成することを目的とした。

B. 研究方法

国内外で実施されたALDにおけるSCTの結果を詳細に解析して、造血幹細胞移植の適応と適応時期、ドナーならびに移植細胞源の選択、移植前処置、GVHD予防、治療効果の評価方法などについて班員相互での検討を重ねてガイドラインを作成した。

C. 研究結果

1. 適応

発症後の症例と発症前の症例に分けて、それぞれの適応の考え方と適応時期について記述した。

2. ドナーならびに移植細胞源

HLA適合度、血縁関係、保因者であるかどうかなどを考慮したドナー選択と移植細胞源選択の実際について記述した。

3. 移植前処置とGVHD予防

現時点で至適さるいは最適とされる前処置は確立されていないことから、本研究班が推奨する前処置について紹介した。

GVHD予防法については骨髄移植ではすでに確立された方法を、臍帯血移植においては臨床研究中の予防法について記述した。

4. 生着

生着の判定方法とキメリズム解析に用いられる種々のマーカーについて記述した。

5. MRIによる評価

MRIの実施時期、評価方法について重要な項目を記述した。

6. 知能の評価

一般的に行われているWISC-IIIによる評価と、研究班が独自に行っている詳細な検査とその紹介システムについて記述した。

7. その他

副腎機能や甲状腺機能の検査項目と検査時期について記述し、副腎機能不全の治療についても言及した。

E. 結論

本研究班通算6年間の成果を治療ガイドラインとしてまとめ、今後のわが国におけるALD治療が適切に行われるための指針とした。

F. 健康危害情報

本疫学研究そのものによる健康危害情報はな

かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Isogai K, Teramoto T, Tashita H, Shimozawa N, Nishimura M, Asano T, Oda M, Kamei A, Ishiguro H, Kato S, Ohashi T, Kobayashi H, Eto Y, Kondo N.: Bone marrow transplantation for the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23:453-8.
- 2) Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 2004;104:881-888.
- 3) Sakata N, Kawa K, Kato K, Yabe H, Yabe M, Nagasawa M, Mugishima H, Kigasawa H, Tsuchida M, Akiyama Y, Morisima Y, Kodera Y, Kato S. Unrelated donor marrow transplantation for congenital immunodeficiency and metabolic disease: an update of the experience of the Japan Marrow Donor Program. *International Journal of Hematology* 2004; 80:174-182.
- 4) Yabe H, Inoue H, Matsumoto M, Hamanoue S, Hiroi A, Koike T, Sako M, Fujiwara M, Ueda Y, Maruya E, Saji H, Kato S, Yabe M. Unmanipulated HLA-haploidentical bone marrow transplantation for the treatment of fatal, nonmalignant diseases in

children and adolescents. *International Journal of Hematology* 2004;80:78-82.

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

国内の副腎白質ジストロフィー症に対する造血幹細胞移植成績

分担研究者 加藤剛二 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科

分担研究者 加藤俊一 東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学

研究要旨：国内では 1988 年 9 月から 2003 年 6 月までに 37 例の副腎白質ジストロフィー症に対し 40 回の造血幹細胞移植がなされ、ドナー別では血縁者間 18 例（骨髄移植 17 例、臍帯血移植 1 例）、非血縁者間 19 例（骨髄移植 11 例、臍帯血移植 8 例）であった。前者では 17 例全例が生存中（内 1 例は自己回復）で、後者では 10 例中 9 例生着し、6 例が生着生存、3 例が死亡、1 例不明であった。これらの成績を基に今後は前向き臨床試験の実施が望まれる。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー症（以下 ALD）は小児期に発症し進行性の神経症状を呈する難治性の先天性代謝異常症であり、現時点では同種造血幹細胞移植が唯一有効な治療法として試みられている。これまで国内で実施された本症に対する造血幹細胞移植成績を検討し、今後の方針につき検討する。

B. 研究方法

1. 症例：ALD に対する移植成績は日本小児血液学会造血細胞移植委員会に集積されたデータを基に解析した。1988 年 9 月から 2003 年 6 月までに 37 例に対して 40 回の造血幹細胞移植が施行され、内 3 例は拒絶のため 2 回の移植がなされた。年齢中央値は 8 歳（1-15 歳）、体重中央値は 26kg（12-55kg）であった。移植件数の年次推移では非血縁者間の移植が可能となって 1996 年以来移植件数は増加しているが年間の最多移植件数は 1998 年の 8 件である。

2. 移植施設毎の移植件数：施設毎の

移植件数を示す。（）内施設数。11 例（1）、5 例（1）、3 例（1）、2 例（1）、1 例（12）。

3. ドナー及び移植細胞の種別と移植細胞数：血縁者間 18 例（同胞間骨髄移植 16 例、母子間骨髄移植 1 例、同胞間臍帯血移植 1 例）、非血縁者間 19 例（骨髄移植 11 例、臍帯血移植 8 例）であり、移植細胞数の中央値は骨髄移植で $3.43 \times 10^8/\text{kg}$ 、臍帯血移植で $2.8 \times 10^7/\text{kg}$ であった。

4. 診断から移植までの期間（表 1）

	血縁者間	非血縁者間
骨髄移植	105(56-436)	551(218-1842)
臍帯血移植	1536	137(24-334)

診断から移植までの期間（日）の中央値と範囲を表 1 に示す。非血縁者間骨髄移植においては血縁者間骨髄移植及び非血縁者間臍帯血移植と比較して診断から移植までの期間が長い傾向にあった。

5. 移植前処置：血縁者間骨髄移植では BU + CY（9 例）、BU + CY + ATG（4 例）、L-PAM + TAI + ATG（2 例）、その他 4 例、非血縁者間骨髄移植では BU + CY + ATG（3 例）、

BU+CY+TLI+ATG (3例)、その他5例。
非血縁者間臍帯血移植では BU + CY + ATG (3例)、BU + CY + Fludara (2例)、その他5例であった。

6. なお本研究においては移植データの集積に際し匿名化されており、倫理面での問題はないと考えられる。

C. 研究結果

1. 生着：血縁者間骨髄移植では好中球 500/mm³ 以上の回復日数は中央値 15 日 (7-42)、非血縁者間骨髄移植では同 18 日 (8-19 日)、非血縁者間臍帯血移植では同 22 日 (11-47) であり、それぞれにおいて移植細胞数による回復日数に差は認められなかった。

2. 生存及び死亡 (表 2)：血縁者間骨髄移植では 18 例中 17 例が生着生存、1 例は拒絶生存であり、非血縁者間骨髄移植では 11 例中 10 例が生着、7 例が生着生存、3 例が死亡、1 例不明であった。非血縁者間臍帯血移植では 8 例中 6 例が初回移植で生着、2 例は 2 回目移植で生着しており、生存例は 2001 年以降に施行された 4 例で、内 2 例が拒絶生存、他の 2 例が生着生存 (前処置は共に BU+CY+Fludara) であった。

D. 考察

副腎白質ジストロフィー症に対して造血幹細胞移植による臨床的効果が得られるためには 1) 発症後早期に実施する事、2) 生着を得る事、及び 3) 中枢神経系に対する副作用を少なくする事が重要であるがこのすべてを満たす事は困難である。1) に関しては本症が早期に診断され、かつ早期にドナーが得られる事が条件であるが家系内の孤発例では診断までに時間を要する事も多く、その間に症状が急速に進行して移植の至適時期を逸す

る事もある。これまで ALD の年間発症例数は 50 例前後とされているが移植例数は 10 例未満である点も本来の受益者が少なくなっている可能性を否定できない。また血縁者に HLA 適合者が得られない場合は従来非血縁者間骨髄移植が実施されているが登録から移植まで 6 ヶ月前後を要しており、多くの症例でこの間に症状の進行がみられている。これに対して近年非血縁者間臍帯血移植を目的としたネットワークが充実したが現時点では臍帯血移植による生着不全の頻度が高く成績は不良である。また前処置薬の BU による神経症状の悪化も無視できない頻度で生じているためこの薬剤は本来避けるべきであるが非血縁者間臍帯血移植においてはこれまで BU 非使用例での生着例は報告されていない。そのため今後は BU を省いた前処置によって非血縁者間臍帯血移植を早期に実施する方法を模索する事が重要と考えられる。具体的には Fludarabine, melphalan, TBI (4Gy)による血液腫瘍にてその成果が報告されている前処置が望ましいと考えられ、今後前向き臨床試験の実施が望まれる。

E. 結論

現時点において本症に対する臨床的効果を得るためには造血幹細胞移植が最も有効とされているが移植時期や移植方法等で解決すべき点が多い。今後は国内での多施設での前方視的臨床研究によって最良の方法を見出す事が重要と考えられる。

F. 健康危険情報：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況：なし

H 本文中の略語

BU:busulfan,

CY:cyclophosphamide,

L-PAM:melphalan,

Fludara:fludarabine,
 TAI:total abdominal irradiation,
 TLI:total lymphoid irradiation,
 ATG:anti-T lymphocyte globulin,
 GVHD:graft versus host disease,

MTX:methotrexate,
 CsA:cyclosporin,
 Pred:prednisolone,

表2. ドナー及び前処置別移植成績

HLA 一致同胞間骨髓移植 (15 例中 14 例生着生存)	移植回数	生着	生存	生着生存
BU, CY	9	9	9	9
BU, CY, ATG	3	3	3	3
BU, CY, TAI, ATG	1	0	1	0
BU, CY, TEPA	1	1	1	1
CY, TLI	1	0	1	0
L-PAM, TAI, ATG	1	1	1	1
HLA 不一致血縁者間骨髓移植 (2 例生着生存)				
L-PAM, ATG, TAI	1	1	1	1
Flu, L-PAM, ATG, TBI	1	1	1	1
HLA 一致同胞間臍帯血移植 (1 例生着生存)				
BU, CY, ATG	1	1	1	1
非血縁者間骨髓移植 (11 例中 7 例生着生存)				
BU, CY, ATG	3	3	1	1
BU, CY, TLI, ATG	3	3	3	3
CY, TBI	1	1	1	1
CY, TLI, ATG	1	1	0	0
L-PAM, TAI, ATG	2	2	2	2
不明	1	-	1	-
非血縁者間臍帯血移植 (8 例中 2 例生着生存)				
BU, CY, ATG	3	3	0	0
BU, CY, TLI, ATG	1	1	0	0
BU, CY, Flu	2	2	2	2
BU, CY, TEPA, ATG	1	0	1	0
CY, TBI, ATG	1	0	0	0
CY, TAI, ATG	1	0	0	0
L-PAM, TAI, ATG	1	0	1	0

ALD の発症における新規遺伝子リピドーシンの機能解析

分担研究者 橋本有弘 三菱化学生命科学研究所 主任研究員

協力研究者 宋 時榮 三菱化学生命科学研究所 主任研究員

研究要旨

Lipidosin は副腎白質ジストロフィー (X-ALD) において障害の認められる、脳、副腎、生殖腺に特異的に発現する長鎖アシル CoA シンターゼである。Lipidosin のショウジョウバエ変異体が超長鎖飽和脂肪酸を蓄積し、神経変性を示すこと、また、マウス、ラットおよびヒト Lipidosin ホモログは副腎白質ジストロフィー (X-ALD) で障害を受ける組織特異的な発現を示すことから、Lipidosin が X-ALD における組織特異的障害の発症に関わっている可能性が考えられる。私たちは、Lipidosin が中枢ではアストロサイト特異的に発現することを明らかにした。またマウスの実験的脱髄などを用いた解析の結果、髄鞘再生時に Lipidosin の発現レベルが増大することを明らかにした。さらに遺伝子相同組み替えによって Lipidosin 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し解析したところ、Lipidosin が髄鞘再生の促進に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト副腎白質ジストロフィー(ALD)は、副腎白質ジストロフィー・タンパク質 (ALDP) 遺伝子の変異を原因とする遺伝性疾患であることが明らかにされている。ALD においては、主に脳白質、脊髄、副腎、精巣に障害が現われるが、原因遺伝子 ALDP の発現はこれらの組織に限定されるわけではなく、様々な組織で広範に認められる。したがって、ALDP の機能欠損と ALD における組織特異的障害との間をつなぐ組織特異的な介在因子の存在が予想され、探索されてきた。しかし、有力な候補因子は見いだされておらず、ALD における障害発症機序は明らかではない。

私達はマウスおよびヒトより新規遺伝子リピドーシン(Lipidosin, *Lpd*)をクローニングした。*Lpd* のショウジョウバエ・ホモログは、神経変性および超長鎖脂肪酸の蓄積という、ALD に類似の表現型を示すことが報告され、*Lpd* がヒト

ALD 発症機序に関わっている可能性が考えられる。本研究は、マウスおよびヒトの新規遺伝子 *Lpd* の生理機能を解明し、ALD 発症機構におけるその役割の解明を目的とする。

B. 研究方法

1. イムノブロット解析によるラット *Lpd* の組織分布の検討

成体ラットの各組織を摘出し、wet weight の 10 倍量の[1% SDS, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl] 中でホモゲナイズした。ホモジェネートを沸騰水中で 10 分間加熱し、総タンパク質を抽出した。得られたタンパク質 20 μ g を 12.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて分離した後、セミドライブロットティング装置を用いてタンパク質を電氣的に PVDF 膜に転写した。抗 *Lpd* モノクローナル抗体と膜を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体によって *Lpd* 抗体を検出した。

2. 免疫電子顕微鏡による組織学的解析

8 週齢ラットをネブタール麻酔下に開胸し、Zamboni 液 (0.1M リン酸緩衝液 4% パラホルムアルデヒド、0.2% ピクリン酸;pH 7.4) で灌流後、固定液でさらに 4 時間浸漬固定した。組織ブロックを水溶性包埋剤 (O.C.T. compound 4583) に包埋し、クリオスタット切片を作成した。切片を抗 Lipidosin monoclonal 抗体と 4°C 2-3 日間反応させた。ビオチン化抗マウス IgG を載せて室温 60 分反応させた後、ABC 試薬 (avidin-biotin-HRP 複合体) を載せてさらに室温 45 分反応させた。切片を洗浄し、0.2% タンニン酸、2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1M PB (pH 7.2) で 30 分固定した後、0.1M PB (pH 7.4) で 5 分 x 3 回洗浄した。切片をペルオキシダーゼ基質液 (0.3% ニッケルアンモニウム、0.2mg/ml DAB、0.05M Tris-HCl Buffer, pH 7.6) に 10-30 分、次いで 0.0045% 過酸化水素を含む同基質液に 2-7 分発色させた。切片を 1% OsO₄ を含む 0.1M PB (pH 7.2) で 30 分浸漬した後、0.5% 酢酸ウラニウム液と 4°C 終夜浸漬した。1% チト酸を塗布した後、2.5% グルタルアルデヒド水溶液で室温 30 分固定した。切片をエポキシ樹脂に包埋後、超薄切片を作成し、酢酸ウラニウム、クエン酸鉛で染色した後、電子顕微鏡で観察した。

3. 脳虚血モデル動物における Lipidosin の発現解析

スナネズミは虚血性中枢神経変性のモデルとして、有用であることが知られている。スナネズミの片側の総頸動脈を 10 分間結紮後に再開放し、片側大脳半球に虚血性神経変性を誘導した。虚血性障害負荷後経時的に脳を灌流固定し、虚血側および対側半球における Lipidosin の発現を蛍光抗体法によって比較検討した。

4. Lipidosin ノックアウトマウスの作製

定法により ES 細胞にターゲッティングベクターを導入し、サザン解析によって相同組み換え体を同定・分離した。その組み換え ES 細胞を用いてキメラマウ

スを作製し、それを C57B6J マウスと交配して、一方の *Lipidosin* ゲノム遺伝子が破壊されたヘテロマウスを得た。ヘテロマウスどうしの交配によりノックアウトマウスを作製した。

5. クプリゾン摂食による脱髄モデルマウスの作製

マウスに 0.45% (w/w) クプリゾンを含む餌を 4-10 週間与えて脱髄を誘導した後、クプリゾンの投与を中止し、髄鞘再生を促した。髄鞘染色 (Klüver-Barrera 法)、ミエリン塩基性タンパク質抗体染色、脂肪染色によって髄鞘再生過程を組織学的に検討し、この過程での Lipidosin の発現変化を特異的モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によって検討した。また、薄層クロマトグラフィーによってコレステロール・エステル量の変動を検討した。

動物実験については三菱化学生命科学研究動物飼育センターの定める規定にもとづき、動物愛護に配慮のうえ実施した。

C. 研究結果

1. ラット Lpd タンパク質の組織特異性

成体ラットの各臓器における Lpd タンパク質レベルを抗 Lpd モノクローナル抗体を用いたイムノブロット法によって検討した。その結果、Lpd は精巣、卵巣、脳に比較的高レベルで存在することが明らかになった。Lpd は副腎にも存在するが、その発現レベルは、脳、生殖腺に比べると低かった。Lpd は格筋、肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓には検出されなかった。

2. ラットアストロサイトにおける Lpd の細胞内局在性

ラット大脳皮質における Lpd の発現を酵素抗体法によって検討したところ、毛細血管周囲のアストロサイトが陽性であることが明らかになった。免疫電子顕微鏡法により、細胞内の分布を検討したところ、血管内皮細胞を取り囲む基底膜に接するフットパッドと呼ばれる突起部分にまで Lpd が密に分布していることが明らかになった。

ラット小脳皮質においては Lpd はバグマングリア細胞特異的に発現している。免疫電子顕微鏡法で検討すると、Lpd は興奮性シナプス近傍の微細な突起部分にも密に存在していた。

3. クプリゾン誘起脱髄モデルでの髄鞘再生過程における Lipidosin の発現増大

マウスにクプリゾンを含む餌を与えると、cingulum, dorsal hippocampal commissure, external capsule などに脱髄巣が形成されることが知られている。クプリゾン投与後、正常餌を 2 週間与えた個体では髄鞘の再生が認められた。このとき髄鞘再生部位に Lipidosin 免疫反応強陽性のアストロサイトが認められた。クプリゾン投与動物の白質では対照動物に比べて GFAP 免疫反応も増大しているが、GFAP 陽性アストロサイトが白質全体に広く分布しているのに対し、Lipidosin 強陽性のアストロサイトは抗 MBP 抗体陽性反応で同定した髄鞘再生部位に局在していることが明らかになった。これは Lipidosin 陽性アストロサイトが、脂肪酸の同化作用(anabolism)を介して髄鞘再生になんらかの機能を果たしている可能性を示唆している。

4. スナネズミ虚血性神経変性モデルの髄鞘再生過程における Lipidosin の発現誘導

虚血性神経変性を与えてから 3 日後の海馬では障害を受けた CA1 ニューロンの細胞体周囲や neuropil、線状体を貫通する内包線維束周囲や外包などのアストロサイトに Lipidosin の著しい増大を見いだした。

5. Lipidosin ノックアウトマウスの発生、成長に関する表現型解析

Lipidosin ノックアウトマウスは、ヘテロマウスどうしの交配によりほぼ 1/4 の確率で生まれ、出生後はヘテロおよび野生型の同腹マウスと同様に、順調な成長を示した。神経原性の異状を示唆するような外見及び特徴的行動(企図振戦など)は認められなかった。また、成体 Lipidosin ノックアウトマウスは、雌雄ともに正常な妊孕性を示した。

6. Lipidosin ノックアウトマウスにお

ける髄鞘再生の遅延

成体マウスにクプリゾンを含む餌を与えると、corpus callosum, cingulum, dorsal hippocampal commissure, external capsule などに脱髄巣が形成された。クプリゾン投与後、正常餌を一定期間投与すると野生型個体では髄鞘の再生が認められた。一方、同様に処理した Lipidosin ノックアウトマウスでは野生型に比べ、より広い範囲での脱髄巣の残存など髄鞘再生の遅延傾向が認められた。

7. Lipidosin ノックアウトマウスにおけるコレステロール・エステル量の低下

野生型個体にクプリゾンを投与後、正常餌を 4 週間与えると髄鞘が再生する。このとき、コレステロールエステルは一過性の増大を示した。ところが、Lipidosin ノックアウトマウスに髄鞘再生を誘導すると、コレステロールエステルは蓄積するものの、その量は野生型に比べて低減していた。

D. 考察

Lpd はアシル CoA シンターゼ活性を有しており、アストロサイトにおける脂質代謝に関与しているものと考えられる。Lpd はアストロサイトの細胞質に存在し、毛細血管に接するフットパッドおよびシナプス近傍の微細突起にまで密に分布していた。一方、私たちは強制発現させた lpd はアシル CoA シンターゼ活性を示すものの、 β 酸化を促進しないことを明らかにしてきた。これらと免疫電子顕微鏡による結果を考え合わせると、Lpd が脂肪酸の分解ではない細胞機能に関わっているのではないかと考えられる。

脂肪酸の同化(anabolism)経路の key enzymes である Lipidosin が、髄鞘再生時や虚血障害後の回復過程で、アストロサイトに発現する、という知見から、私たちは「Lipidosin 陽性アストロサイトが脂肪酸の同化を介して、髄鞘形成や虚血障害からの回復に重要な役割を果たしているのではないか」と考えている。

この新しい仮説を検証するため、Lipidosin 遺伝子欠損マウスを作製した。マウスの実験的脱髄モデルにおける髄鞘

再生過程の解析から、アストロサイトにおける Lipidosin を介する脂肪酸の同化が髄鞘再生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Lipidosin 遺伝子欠損マウスを用いた解析の結果は、Lipidosin がコレステロールエステル形成を介して、髄鞘再生の促進に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

E. 結論

ALD の原因遺伝子 ALDP は広範な組織で発現しており、X-ALD における組織特異的障害の発症には未知の介在因子の関与が想定される。Lipidosin は ALD における標的細胞特異的障害の発症を規定する介在因子の有力な候補であると考えられる。

Lipidosin 遺伝子欠損マウスおよびマウスの実験的脱髄モデルにおける・髄鞘再生過程の解析から、アストロサイトにおける Lipidosin を介する脂肪酸の同化が髄鞘再生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、Lipidosin 遺伝子欠損マウスの解析を通じて、

「ALDP の欠損によって生じた超長鎖脂肪酸の蓄積と、アストロサイトにおける Lipidosin を介したコレステロール輸送機構との関連性」を解明することにより、未だ不明な点の多い X-ALD の発症機構の実体が明らかになるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1. Umeda, R., Inagawa-Ogashiwa, M., Kato, C., Song, S. and Hashimoto, N. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Yokohama, June 11-13, 2003.

2. Song S.Y., Kato C., Adachi E., Moriya-

Sato A., Inagawa-Ogashiwa M., and Hashimoto N.
3rd Forum of European Neuroscience (FENS), Paris, July 13-17, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。