

concentration of KS (Figure 3). We also pretreated the plasma and urine specimens with keratanase II and repeated the ELISA. No KS was detected in any enzyme-treated sample, suggesting that elevation of KS measured by the current ELISA assay is derived from KS but not from other GAGs.

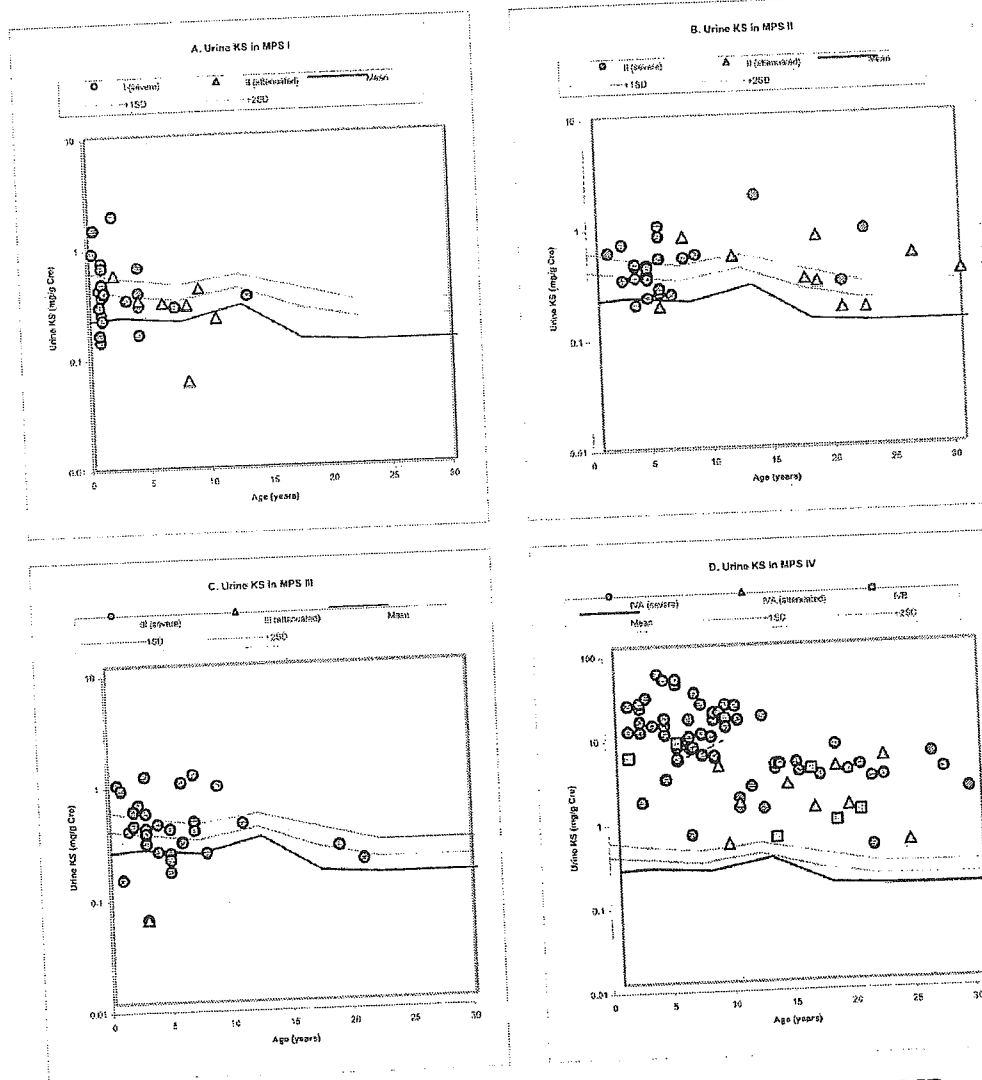


Figure 2 Concentrations of KS in urine of patients with MPS, ML and other LSDs, and normal individuals. Results of all specimens from patients and normal individuals were plotted on a semilogarithmic scale with respect to age. The scale of the KS concentration is different in MPS IVA. The age was shown up to 30 years in each disease group

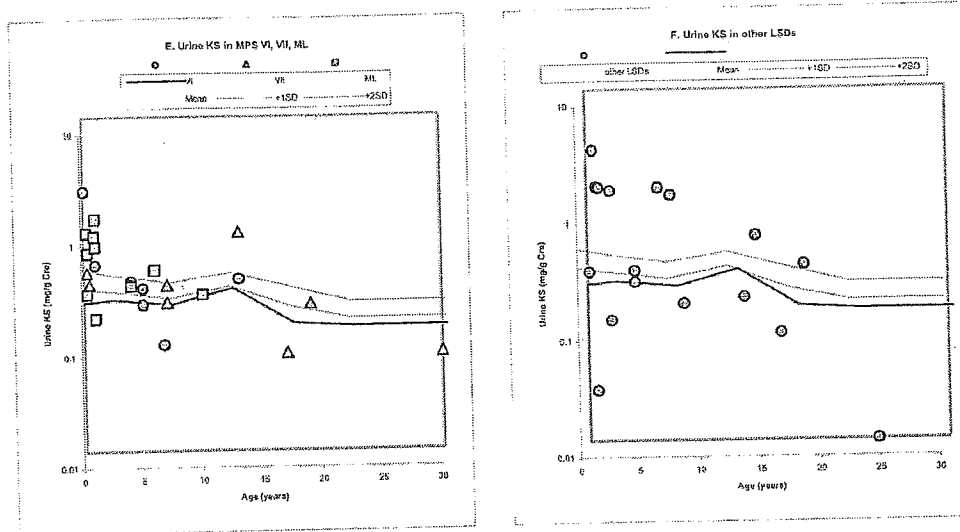


Figure 2 Continued

*HPLC analyses:* Eleven blood and 16 urine specimens of LSD patients were analysed by HPLC. Each specimen was analysed by the sandwich ELISA assay to confirm an elevated KS concentration. The unsaturated disaccharide isomers formed by sample digestion with keratanase II were detected by HPLC when the

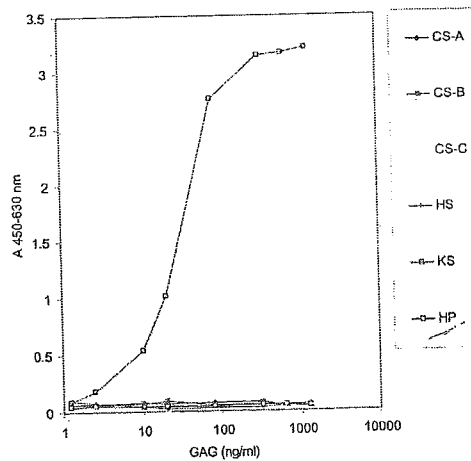


Figure 3 Cross-reactivity of KS-ELISA to KS-related GAGs. The absorbances were plotted against the concentration of each GAG sample. Abbreviations: CS-A, chondroitin sulphate A (Seikagaku # 400658); CS-B, chondroitin sulphate B (Seikagaku # 400660); CS-C, chondroitin sulphate C, (Seikagaku # 400670); HS, heparan sulphate (Seikagaku # 400700); KS, keratan sulphate (Seikagaku # 400610); HP, heparin (Seikagaku # 400610)

mono- and di-sulphated disaccharide isomers were eluted with increasing salt. Total KS was calculated as shown in Table 2 for plasma and urine samples. Tables 2A and 2B show the results of KS concentration obtained by ELISA and by HPLC. The HPLC results of plasma samples showed elevated KS in all types of MPS and ML specimens compared with normal controls. HPLC analysis for urine KS showed 10–40 times higher concentrations in MPS IVA and IVB patients and 2–7 times higher concentrations in other MPS and ML patients as compared to controls. The ratio of ELISA to HPLC in plasma revealed the higher value in normal controls as compared with the patients, while that in urine was lower in the control as compared with the MPS IVA patients. The regression plot between the ELISA and HPLC assays showed a correlation coefficient of 0.855 ( $p < 0.0001$ ) in plasma and 0.925 ( $p < 0.0001$ ) in urine. Thus, the HPLC analyses confirmed the elevation of KS in MPS and ML specimens.

## DISCUSSION

There are well-known relationships between types of MPS and GAGs that accumulate (Neufeld and Muenzer 2001). Elevation of KS level in blood or urine was considered the hallmark of MPS IVA. To our knowledge, this is the first report demonstrating that MPS disorders other than MPS IV can be associated with elevated blood and urine KS levels in addition to the GAGs originating from the respective enzyme defect. The presence of excessive amounts of KS is also observed in ML patients.

The majority of KS is produced in the cartilage tissue and secreted in blood. MPS IVA is caused by deficiency of the enzyme directly involved in KS catabolism, leading to accumulation of undegraded KS in cartilage tissues. The resulting accumulation of undegraded KS damages the cartilage proteoglycans and increases KS levels in the body fluids. The extent of elevated KS in blood and urine in MPS IVA correlates positively with clinical severity (Tomatsu et al 2004).

The mechanism by which the KS is elevated in all other types of MPS and ML is unclear since the current theory on the pathway of KS metabolism cannot explain this phenomenon. Several hypotheses can be offered to explain elevation of blood KS in other MPS and ML patients: (a) the synthesis of KS may be stimulated by storage of other GAG(s); (b) the elevation of KS may be a secondary consequence of the bone dysplasia and damage to the cartilage tissue produced by accumulation of the other GAGs; (c) KS may be co-deposited with the other accumulated GAGs, which inhibits the interaction between KS and enzymes catabolizing KS; and/or; (d) alterations in the extent and distribution of fucosylation, sialylation and sulphation on KS secondary to GAG accumulation may make KS resistant to degradation. KS derived from articular cartilage contains sialic acid and fucose. Sialic acid residues, present as chain caps, and fucose residues inhibit degradation of KS molecules (Tai et al 1994). All of these factors may contribute.

Comparisons of KS in urine showed a less striking elevation in all MPS disorders compared with blood, except in MPS IV in which the KS substrate is a direct result of the enzyme deficiency. The lower elevation of KS in urine specimens of other

Table 2A HPLC analyses of plasma from MPS and ML patients

No.	Type	Age (y)	KS (ng/ml) (by ELISA)	KS ( $\mu$ g/ml) (by HPLC)	Ratio ELISA/HPLC
1	I	2.0	679	6	0.11
2	II	5.0	1100	5.1	0.21
3	II	5.0	1050	3.59	0.29
4	IIIA	2.0	419	2.88	0.15
5	IIIC	13.0	227	2.11	0.11
6	IVA	16.2	1370	4.46	0.3
7	IVA	6.5	1530	7.75	0.2
8	VI	3.0	625	2.12	0.29
9	VII	0.5	427	3.42	0.12
10	MLII	0.9	263	1.87	0.14
11	MLIII	12.0	1030	3.88	0.27
12	Normal	3.0	166	0.3	0.55
13	Normal	5.0	209	0.4	0.52
14	Normal	41.0	127	0.13	0.98
15	Normal	40.0	113	0.12	0.94

MPS and ML patients compared to the elevation in blood could possibly be explained by amounts of KS aggregated with other GAGs or unknown factors in the bloodstream too large to be cleared in the urine. In this scenario, undegraded KS that is not filtered out by the kidney is retained in the blood, leading to a less

Table 2B HPLC analyses of urine from MPS and ML patients

No.	Type	Age (y)	KS (mg/gCre) (by ELISA)	KS (mg/g Cre) (by HPLC)	Ratio ELISA/HPLC
1	I	2	2.6	22.5	0.12
2	I	2	1.9	26.2	0.07
3	II	4	0.63	13.1	0.05
4	II	2	0.7	12.6	0.06
5	II	13	1.86	14	0.13
6	IIIA	4	1.61	13.7	0.12
7	IIIA	3	1.03	16.4	0.06
8	IIIB	8	0.65	8.57	0.08
9	IIIB	10	0.64	7.81	0.08
10	IVA	10	46.2	125	0.36
11	IVA	4	39.7	119	0.33
12	IVA	2	18.2	107	0.17
13	IVB	5	7.02	41.6	0.17
14	MLIII	10	1.25	13.7	0.09
15	GMI	5	3.41	58.1	0.06
16	Fucosidosis	2	1.37	26.6	0.05
17	Normal	4	0.35	5.82	0.06
18	Normal	6	0.25	5.9	0.04
19	Normal	8	0.45	3.36	0.13
20	Normal	13	0.31	3.17	0.1

remarkable increase in urine. This hypothesis (compatible with (c) and (d) above) may explain why previous studies by thin-layer chromatography could not detect any increase of urine KS in other mucopolysaccharidoses.

Most MPS and ML patients have severe bone dysplasia as in MPS IV. Therefore, elevated KS in the blood of other MPS and ML patients could relate to underlying bone disease, especially cartilage tissues, agreeing with hypothesis (b). Since the bone disease is difficult to treat, the successful reduction of the KS could provide more specificity for the bone pathology of MPS disease than the originally directly stored substrates HS or DS. It would be useful to further investigate the KS levels in the blood as a biomarker of other mucopolysaccharidoses.

The elevation of blood KS was observed in all types of MPS and ML patients compared with the age-matched controls. Whether KS concentrations are also elevated in affected newborn babies is an important question from the viewpoint of early detection of the diseases. Although MPS and ML are progressive disorders that often take years to present clinically, there is considerable evidence from both humans (Crow et al 1983; Wiesmann et al 1980) and animal models (Crawley et al 1997) that biochemical storage commences early in gestation and is well advanced by the time of birth. Other evidence from previous studies using lysosomal membrane proteins also indicates that the storage process begins early in gestation and can be well advanced by birth. The preliminary data from cat and dog MPS models also showed findings similar to those in human MPS patients, such as elevation of KS and age-dependency of KS (data not shown). The presence of increased blood KS in all four newborns of the patient group in the present study suggests that, at least in these individuals, the KS is stored during fetal life. Although these preliminary results support the usefulness of KS as a screening marker at an early stage of MPS and ML, further studies on the newborn population will be required to confirm the usefulness of KS. Interestingly, other patients with fucosidosis, GM<sub>1</sub>-gangliosidosis, sialidosis, or galactosialidosis also showed an increase in urinary KS. It is well known that those disorders store predominantly oligosaccharide derivatives. This observation suggests that sulphated oligosaccharides derived from KS also accumulate in these disorders. Future studies will examine the correlation between blood and urinary KS levels for these disorders.

The specificity of the assay for KS was demonstrated using keratanase II treatment. The HPLC assay method for KS was compared with ELISA and showed that the ELISA-based method produced lower levels. This discrepancy in KS concentrations between ELISA and HPLC may have several explanations. The anti-KS monoclonal antibody used here recognizes more than six oligosaccharides, while HPLC can detect disaccharides produced by keratanase II digestion. The anti-KS monoclonal antibody recognizes polysulphated KS, binding more tightly to sulphated sugar but binding less to low-sulphated KS. These findings accounted for higher KS values in HPLC as compared to ELISA. The ratio of KS by ELISA to KS by HPLC in plasma of MPS and ML was constant between 0.1 and 0.3, while the KS ratio in plasma of controls showed a higher value. This may reflect the differences in age, sulphation and molecular size of KS between patients and controls. Further studies are needed to clarify the mechanism in a larger number of samples.

On the basis of these results, we propose that blood and/or urine KS levels may be useful markers for early diagnosis and for monitoring clinical responses to treatment in most MPS and ML individuals. We are currently evaluating whether other GAGs such as heparin sulphate, chondroitin sulphate and dermatan sulphate can be used as adjunctive markers that may increase the sensitivity for this purpose.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all participants, physicians, nurses, and MPS societies (Austrian, Brazilian, Canadian, German, Japanese and Italian) in the participating countries for their important contributions to this study. We thank Dr Robert W. Wilmott for linguistic revision of the text. This research has received financial support from the International Morquio Organization, AZ, USA; the Austrian MPS Society; the German MPS Society; and Seikagaku Corporation, Japan. The content of the paper has not been influenced by the sponsors.

S.T. and K.O. contributed equally to this work.

#### REFERENCES

- Caterson B, Christner JE, Baker JR (1983) Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. Monoclonal antibodies to cartilage proteoglycan. *J Biol Chem* **258**: 8848–8854.
- Chai W, Luo J, Lim CK, et al (1998) Characterization of heparin oligosaccharide mixtures as ammonium salts using electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* **70**: 2060–2066.
- Chang MH, Bindloss CA, Grabowski GA, et al (2000) Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin Chem* **46**: 167–174.
- Crawley AC, Niedzielski KH, Isaac EL, et al (1997) Enzyme replacement therapy from birth in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *J Clin Invest* **99**: 651–662.
- Crow J, Gibbs DA, Cozens W, et al (1983) Biochemical and histopathological studies on patients with mucopolysaccharidoses, two of whom had been treated by fibroblast transplantation. *J Clin Pathol* **36**: 415–430.
- de Jong JG, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R (1992) Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem* **38**: 803–807.
- Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, et al (1998) Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* **44**: 2094–2102.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, et al (2001) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* **344**: 182–188.
- Karlsson M, Edfors-Lilja I, Bjornsson S (2000) Binding and detection of glycosaminoglycans immobilized on membranes treated with cationic detergents. *Anal Biochem* **286**: 51–58.
- Kinoshita A, Sugahara K (1999) Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem* **269**: 367–378.
- Kornfeld S, Sly WS (2001) I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, vol. 4. New York: McGraw-Hill, 3469–3482.

- Leroy JG, DeMars RI (1967) The remarkable cells cultured from a human with Hurler syndrome: an approach to visual selection for in vitro genetic studies. *In Vitro* 2: 107–109.
- Meikle PJ, Brooks DA, Ravenscroft EM, et al (1997) Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 43: 1325–1335.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, et al (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281: 249–254.
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, vol. 4. New York: McGraw-Hill, 3421–3452.
- Oguma T, Toyoda H, Toida T, et al (2001a) Analytical method for keratan sulfates by high-performance liquid chromatography/turbo-ionspray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 290: 68–73.
- Oguma T, Toyoda H, Toida T, et al (2001b) Analytical method of chondroitin/dermatan sulfates using high performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization mass spectrometry: application to analyses of the tumor tissue sections on glass slides. *Biomed Chromatogr* 15: 356–362.
- Shinmei M, Miyauchi S, Machida A, et al (1992) Quantitation of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in pathologic joint fluid. *Arthritis Rheum* 35: 1304–1308.
- Tai GH, Huckerby TN, Nieduszynski IA (1994) 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR study of a fucose-containing heptasaccharide derived from a keratanase digestion of bovine articular cartilage keratan sulphate. *Carbohydr Res* 255: 303–309.
- Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, et al (2004) Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res* 55: 592–597.
- Tondeur M, Vamos-Hurwitz E, Mockel-Pohl S, et al (1971) Clinical, biochemical, and ultrastructural studies in a case of chondrodystrophy presenting the I-cell phenotype in tissue culture. *J Pediatr* 79: 366–378.
- Toyoda H, Demachi Y, Komoriya S et al (1998) Characterization and determination of human urinary keratan sulfate. *Chem Pharm Bull* 46: 97–101.
- Whitley CB, Spielmann RC, Herro G, et al (2002) Urinary glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. *Mol Genet Metab* 75: 56–64.
- Wiesmann UN, Spycher MA, Meier C, et al (1980) Prenatal mucopolysaccharidosis II (Hunter): a pathogenetic study. *Pediatr Res* 14: 749–756.
- Wraith JE, Clarke LA, Beck M, et al (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr* 144: 581–588.
- Yamada H, Miyauchi S, Morita M, et al (2000) Content and sulfation pattern of keratan sulfate in hip osteoarthritis using high performance liquid chromatography. *J Rheumatol* 27: 1721–1724.
- Yoshida K, Miyauchi S, Kikuchi H, et al (1989) Analysis of unsaturated disaccharides from glycosaminoglycuronan by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 177: 327–332.

---

小児科 第46巻 第12号 (平成17年11月1日発行) 別冊

---

Pediatrics  
of Japan

小児科

ムコ多糖症の先端的治療法の  
開発とその臨床応用

奥山虎之

---

金原出版株式会社

---



# ムコ多糖症の先端的治療法の開発とその臨床応用

奥山 虎之\*

## 要 旨

ムコ多糖症は、体の主要な構成成分であるムコ多糖の断片が細胞内のリソゾームに蓄積することにより、全身の臓器・組織が障害される遺伝性疾患である。欠損酵素および臨床症状の相違により、7種の病型に分類される。治療法としては、種々の症状に対する対症療法が中心であるが、根治的な治療法として、酵素補充療法、造血幹細胞移植、遺伝子治療が研究・開発され、すでに一部は臨床応用されている。これらの治療法の利点や限界と、今後の展望について述べる。

## I. ムコ多糖症とは

ムコ多糖症(mucopolysaccharidosis : MPS)は、体の主要な構成成分であるムコ多糖を分解するリソゾーム酵素が先天性に欠損することによって発症する全身性疾患である。欠損している酵素の違いにより7つの病型に分類される(表)。病型の違いにより症状に差があるが、共通する症状としては、難聴、中耳炎、骨の変形、関節拘縮、肝臓・脾臓の腫大、無呼吸、閉塞性呼吸障害、ガーゴイル様顔貌、心臓弁膜症などである。加齢とともに重症化する進行性疾患である。

わが国のムコ多糖症全体の罹患者数は推定約400~500人で、このうちII型(ハンター症候群)が全体の50%以上を占めている。これに対して、欧米ではI型患者数が多い。診断は、上記の症状でMPSが疑われた場合は、尿中

のグルコースアミノグリカン(GAG)を測定する。MPSの場合は、GAGの過剰排出が認められるので、その場合は病型を決定するために白血球中の酵素活性を定量する。これらの検査は、コマーシャルラボラトリーであるSRLに依頼することが可能である。

治療は、個々の症状を緩和するために行われる対症療法と、原因の除去を目的とした根治療法に分けられる。対症療法は、中耳炎に対するTチューブの挿入、無呼吸に対するアデノイド除去、角膜混濁に対する角膜移植、心疾患に対する弁置換などである。これに対して、根治療法は、欠損している酵素を種々の方法で体内に供給することを基本としている。

## II. ムコ多糖症の治療法の原理

多くのリソゾームの酵素は、マンノース6リ

\* Torayuki OKUYAMA 国立成育医療センター遺伝診療科

[連絡先] ☎ 157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療センター遺伝診療科

表 ムコ多糖症の病型分類

病 型	欠 損 酵 素	尿中ムコ多糖	遺伝形式
I H Hurler 症候群	$\alpha$ -L-イズロニダーゼ	DS, HS	AR
I S Scheie 症候群	$\alpha$ -L-イズロニダーゼ	DS, HS	AR
I HS Hurler-Scheie 症候群	$\alpha$ -L-イズロニダーゼ	DS, HS	AR
II A Hunter 症候群 (重症)	イズロン酸サルファターゼ	DS, HS	XR
II B Hunter 症候群 (軽症)	イズロン酸サルファターゼ	DS, HS	XR
III A Sanfilipo 症候群 A 型	スルファミダーゼ	HS	AR
III B Sanfilipo 症候群 B 型	$\alpha$ -L-アセチルグルコサミン	HS	AR
III C Sanfilipo 症候群 C 型	アセチル CoA トランスフェラーゼ	HS	AR
III D Sanfilipo 症候群 D 型	グルコサミン-6-スルファターゼ	HS	AR
IV A Morquio 症候群 A 型	ガラクトース-6-スルファターゼ	KS, CS	AR
IV A Morquio 症候群 B 型	$\beta$ -ガラクトシダーゼ	KS, CS	AR
VI Maroteaux-Lamy 症候群	アリルスルファターゼ B	DS, CS	AR
VII Sly 症候群	$\beta$ -グルクロニダーゼ	DS, HS, CS	AR
IX ヒアルロニダーゼ欠損症	ヒアルロニダーゼ	—	AR

ン酸 (M 6 P) 残基をもつ糖蛋白である。細胞内のゴルジ体と細胞表面の膜構造のなかには、M 6 P を認識・結合する受容体である M 6 P 受容体が存在し、結合した物質をリゾゾームに運ぶ輸送系がある。ゴルジ体にある M 6 P 受容体は、細胞内で新生されたムコ多糖体分解酵素をリゾゾームに輸送する。細胞膜表面にある M 6 P 受容体は、細胞外に存在するムコ多糖分解酵素を細胞内に取り込み、さらにリゾゾーム内に輸送するのに役立つ(図 1, 2)。この後者の輸送系の存在により、種々の根治療法(酵素補充療法, 細胞治療, および遺伝子治療)が可能となっている。

### III. 酵素補充療法

酵素補充療法は、欠損している酵素を薬剤として体外から投与することにより、細胞内に欠損酵素を補充しムコ多糖の分解を促進する方法である。上述の M 6 P 受容体を解した輸送系を利用した治療法である(図 1)。すでに I 型(ハラー症候群, シャイエ症候群)の治療用酵素であるラロニダーゼ(商品名:アルドラザイム)

は、米国および欧州で 2003 年に承認された。しかし、わが国においては、罹患している患者数が極端に少ないことなどの理由により新薬臨床試験が行われず、これまで、承認・販売の目途がまったく立っていなかった。しかし、厚生労働省、製薬会社、患者家族会、岐阜大学および国立成育医療センター関係者の努力により、わが国での承認・販売の展望が開けてきた(詳細は厚生労働省ホームページ:未承認薬使用問題検討会議議事録に記載されている)。

酵素補充療法の利点は、他の根治療法(造血幹細胞移植や遺伝子治療)に比べて安全性が高いことである。実際、欧米で行われた新薬臨床試験の結果からも重篤な副作用はほとんど報告されていない。尿中 GAG の低下, 呼吸状態の改善や肝臓脾臓容積の減少, 運動機能の改善などの効果が報告されている<sup>1)2)</sup>。しかし血流のない角膜や血液・脳関門のある脳への酵素の移行は少なく、角膜混濁や精神発達遅滞に対する効果は期待できないこと、および週 1 回の約 3 時間の点滴による投与を生涯必要とすることなどの問題がある。

他の病型の酵素補充療法については、II 型(ハンター症候群)の新薬臨床試験が欧米で行われ

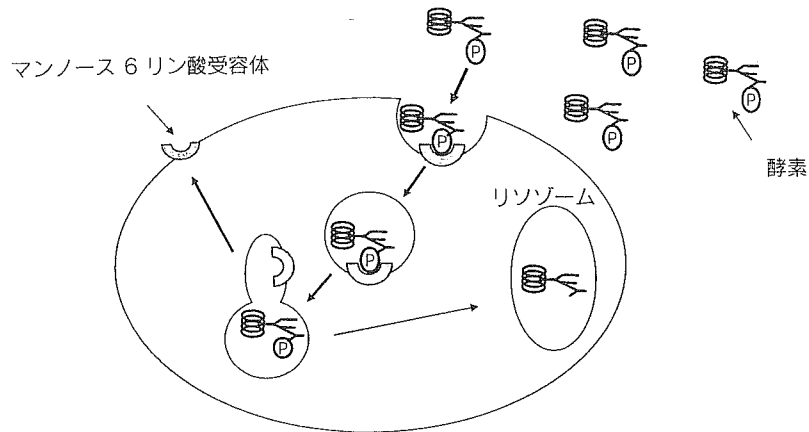


図1 ムコ多糖症の酵素補充療法の原理

ムコ多糖症で欠損している酵素は、リソゾーム酵素で、マンノース 6 リン酸 (M6P) 残基をもつ糖蛋白である。細胞外の酵素は、細胞膜上の M6P 受容体と結合し、細胞内に取り込まれ、リソゾームに運ばれる。

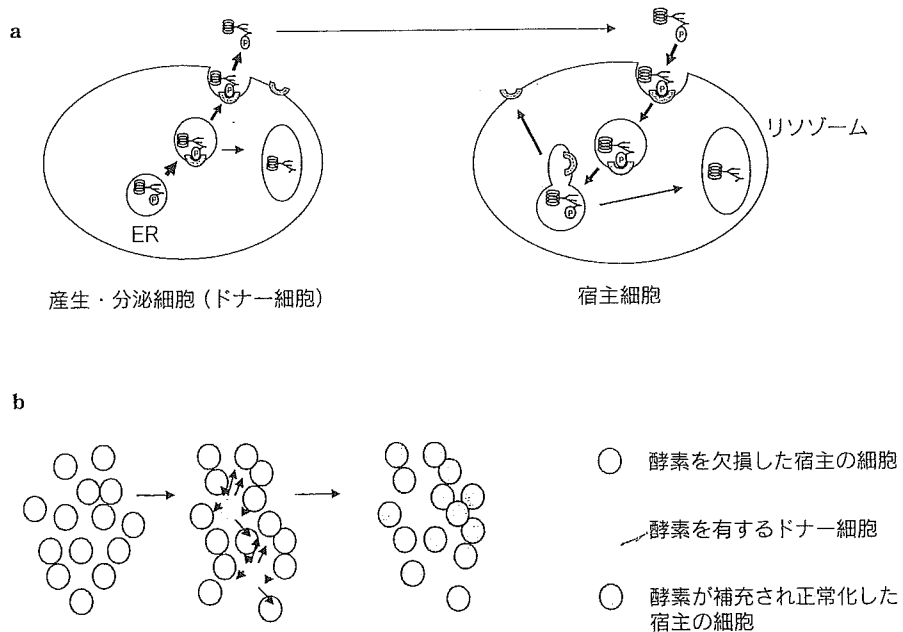


図2 ムコ多糖症の細胞療法の原理

リソゾーム酵素は、細胞内の粗面小胞体およびゴルジ体で産生され、リソゾームに輸送される。しかし、一部の酵素は細胞外に分泌されている。この分泌された酵素は、周辺の細胞に M6P 受容体を介して取り込まれる (a)。したがって、正常細胞が供給する酵素により、宿主の細胞に欠損している酵素が分配されることになる (b)。

最近終了した。結果集計後、本年末には欧米での申請が行われる予定である。米国で行われた新薬臨床試験には、日本から4家族が参加した。日本での新薬臨床試験については、現在検討中である。その他、VI型酵素製剤も最近米国で販売が開始された。

#### IV. 造血幹細胞移植

正常な細胞をムコ多糖症患者の体内に移植して、その正常細胞が分泌する酵素を宿主の細胞表面のM6P受容体を介して、リソゾーム内に輸送することによりムコ多糖の分解を促進する方法が、細胞療法である(図2)。実際に行われている移植法は、造血幹細胞移植である。骨髄移植と臍帯血移植が利用されている。移植結果が良好であれば、永続する治療効果が期待でき、酵素補充療法のような定期的かつ頻回の治療を回避できるという利点がある。しかし、生着不全や宿主移植片反応(GVHD)などのアログラフトに伴う重篤な副作用により死に至る場合もあり、その適応は限定される。

ハーラー症候群においては、Petersらは骨髄移植の場合2歳以下でかつ発達指数が70以上の場合には治療効果が期待できるとしている<sup>3)</sup>。また、昨年、I型ハーラー症候群20例に対する臍帯血移植の結果が報告された。移植成功例では知的発達を含めた症状の改善が報告されているが、3例は移植に伴う副作用で死亡している<sup>4)</sup>。わが国においては、II型患者に対する造血幹細胞移植が比較的多数行われているが、中枢神経系の効果に関しては不明な部分も多く、詳細な調査が必要である。

#### V. 遺伝子治療

欠損酵素の発現を目的として遺伝子を細胞内

に導入する方法が、遺伝子治療である。リソゾーム病とくにムコ多糖症は遺伝子治療が適している疾患とされ、ムコ多糖症VII型モデル動物を使った遺伝子治療の実験は多数報告されている。

自験例を示す<sup>5)6)</sup>。ムコ多糖症VII型欠損酵素( $\beta$ グルクロニダーゼ)の発現ユニットを搭載したアデノウイルスベクターを作製し、これを生直後のマウスに全身投与し、その経過を生後6カ月まで観察したところ、わずか1回の投与で、脳を含む多数の臓器で病理学的改善が示された(図3、4)。また、角膜に同じベクターを局所投与した場合、投与7日後には、組織学的にほぼ完全に正常化することが示された(図5)。これらの事実は、ムコ多糖症が、遺伝子治療に効果的な疾患であることを示している。米国ワシントン大学では、このムコ多糖症VII型のヒトへの遺伝子治療の計画が進行している。

遺伝子治療は、本質的には自己の細胞を修飾する方法なので、造血幹細胞移植のようなアログラフトに伴う重篤な副作用や免疫抑制剤のリスクを回避することが可能であり、安全性の高い治療法といえる。また、適切な方法を選択することにより、永続的な導入遺伝子の発現も可能となることから、酵素補充療法のような定期的かつ頻回の治療を回避できるという利点がある。しかし、フランスでのX連鎖性重症複合型免疫不全症候群の遺伝子治療において、10例中3例で白血球様の症状がみられたことなど、完全に安全な方法として確立されているわけではないので、その適応は慎重に検討する必要がある。

#### VI. ムコ多糖症の包括的医療

上述のように、ムコ多糖症の治療法開発研究は急速に進展しているが、当面は対症療法を中心とした包括的な医療が継続されるであろう。

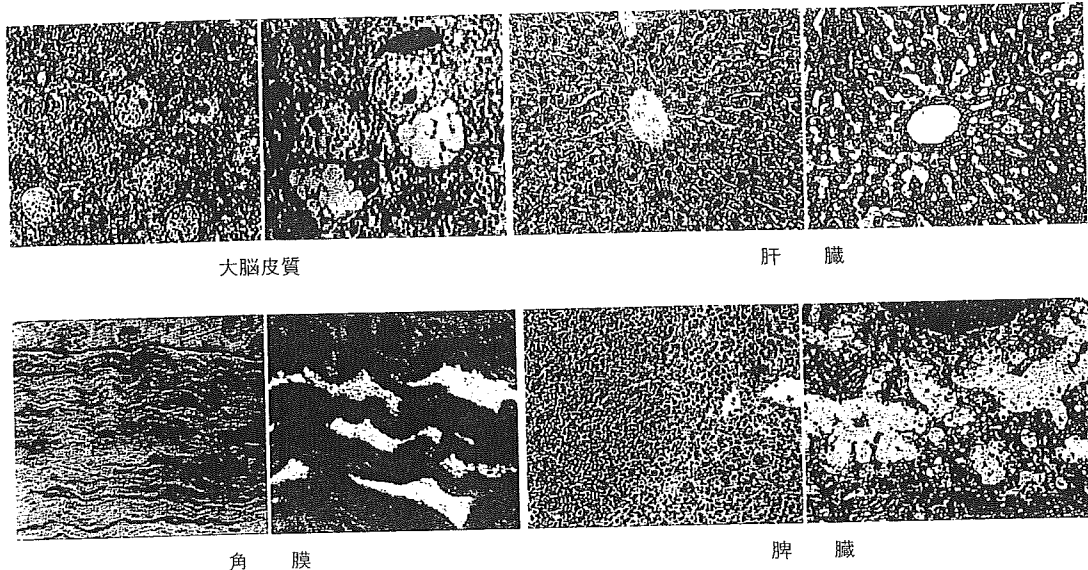


図3 ムコ多糖症モデル動物を使った遺伝子治療法の開発 (1)

出生 24 時間以内のムコ多糖症 VII 型モデルマウス B 6/MPS VII に、ヒト  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUSB) を発現するアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) を経静脈的に全身投与し、その治療効果を病理学的に評価した。ムコ多糖症では、特徴的な細胞内の空胞変性が観察されるが、生後早期に遺伝子治療を行ったマウスでは、空胞変性を有する細胞がほとんど消失している。それぞれ左側が治療したマウス、右側が未治療で同年齢のムコ多糖症マウスである。

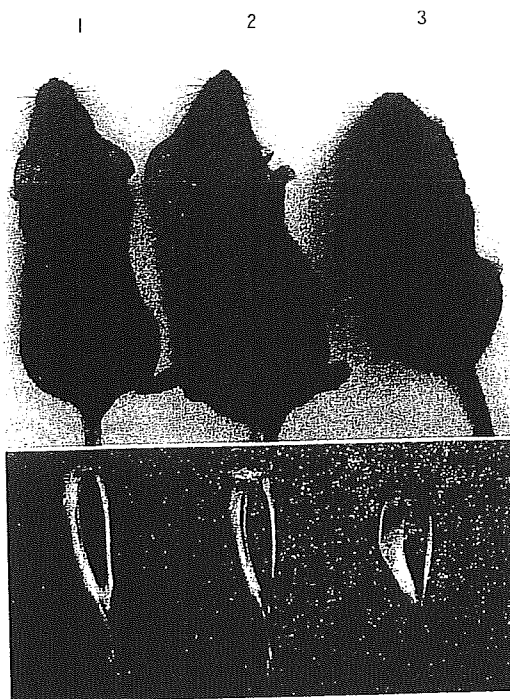


図4 ムコ多糖症モデル動物を使った遺伝子治療法の開発 (2)

出生 24 時間以内のムコ多糖症 VII 型モデルマウス B 6/MPS VII に、ヒト  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUSB) を発現するアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) を経静脈的に全身投与した。おとなになった MPS VII マウスは扁平な鼻、短い足、成長障害などの骨の変形に伴う異常がみられるが、生後早期に遺伝子治療を行ったマウスは、外見上正常マウスと区別がつかなくなる。

上段：全身像、下段：後ろ足の下腿部

1：正常マウス、2：治療した MPS VII マウス、3：無治療の MPS VII マウス

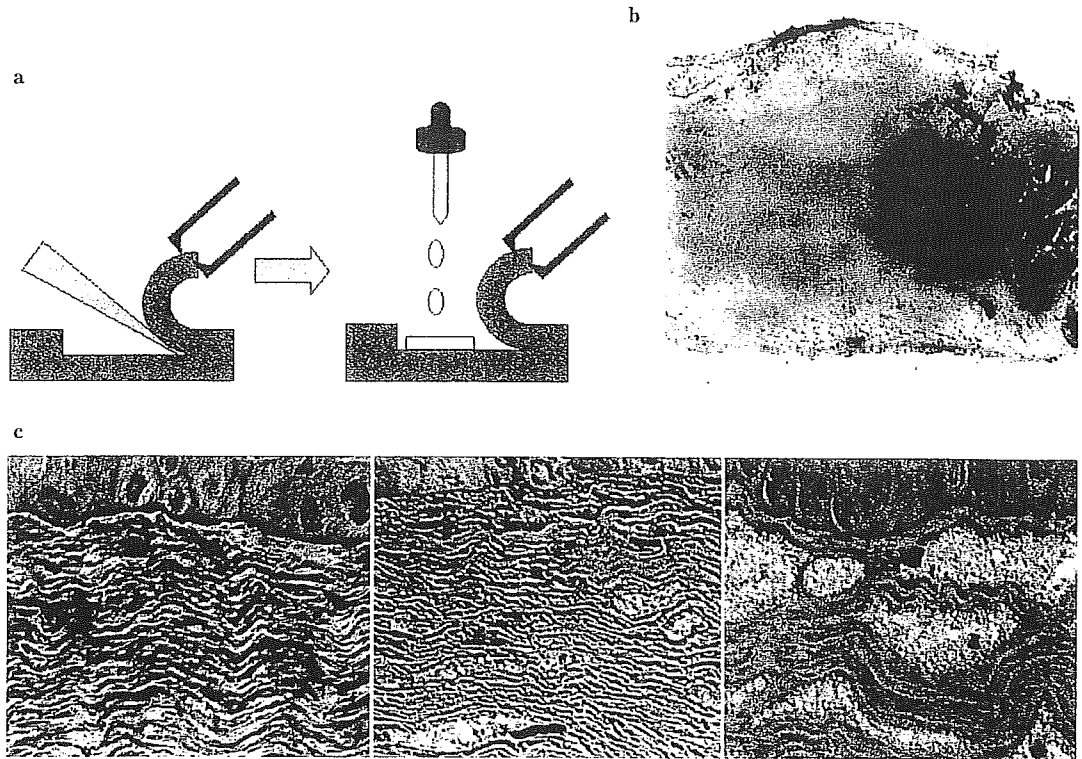


図5 ムコ多糖症モデル動物を使った遺伝子治療法の開発 (3)

MPS VIIマウスの角膜実質にアデノウイルスを投与し、その効果を観察した。

- a : 角膜に切開を加え、実質内に直接アデノウイルスベクターを投与した。
- b :  $\beta$ -グルクロニダーゼの活性染色により赤色に染色される細胞が、角膜実質の広い範囲で観察された。病理学的に、特徴的な細胞内の空胞変性の消失を認めた。
- c : 左；正常マウスの角膜，中；治療されたマウスの角膜，右；未治療のMPSマウスの角膜

とくに、早期発見のためのマススクリーニング法の開発や、適切な遺伝カウンセリングのもとで行われる遺伝子診断・保因者診断および出生前診断への応用に関する体制作りも、治療法開発とともに整備すべき重要課題である。国立成育医療センター遺伝診療科では、遺伝カウンセリングと羊水細胞を含む種々の細胞でのムコ多糖症の酵素活性の測定および遺伝子診断サービスを実施している。詳細については、筆者までご連絡いただきたい（アドレス：[okuyama-t@ncchd.go.jp](mailto:okuyama-t@ncchd.go.jp)）

#### おわりに

以上、ムコ多糖症の先端的治療法の開発と臨床応用の現状について詳述した。酵素補充療法、造血幹細胞移植、遺伝子治療は、それぞれ長所と欠点があり、将来的には、これらの方法を組み合わせた副作用のない適切な治療プロトコルを確立する必要がある。

#### 文献

- 1) Kakkis ED et al: Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. N Engl J Med 344 : 182-188, 2001



日本臨牀 第63巻・第3号（平成17年3月号）別刷

特集：最新の遺伝子診断と治療

## 我が国における遺伝子医療の現状

奥山虎之 小崎里華 福原康之



最新の遺伝子研究

## 我が国における遺伝子医療の現状

奥山 虎之 小崎 里華 福原 康之

### Genetic medicine in Japan

Torayuki Okuyama, Rika Kosaki, Yasuyuki Fukuhara

Department of Clinical Genetics and Molecular Medicine, National Center for Child Health and Development

### Abstract

Present status of genetic medicine in Japan is reviewed. More than five hundred medical doctors have now been qualified as Japanese board of clinical genetics. Training courses for genetic counselors have started in several colleges. Thirty-six hospitals organized by University or National Centers have independent units of clinical genetics. Two major Japanese homepages concerning about clinical genetics are available. Ethical guidelines for gene testing and prenatal diagnosis are published by Japanese Society for Human Genetics and other Japanese medical societies. Infrastructure for clinical genetics are now rapidly organized in Japan, however lots of problems are still waiting to be solved.

**Key words:** molecular genetics, clinical genetics, genetic counseling, ELSI

### はじめに

基礎医学分野における分子遺伝学や細胞生物学の長足の進歩により、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子や、疾患の発症のメカニズムが解明されてきた。これらの成果は、臨床医学や医療の現場に、遺伝子検査という直接的な形で生かされている。しかし、遺伝子検査は、検査結果が検査を受ける本人にとどまらず家族全体に波及する可能性があること、また病気の発症前や出生前に診断ができることなどから、通常の臨床検査とは異なる性格をもっており、その対応には特別な配慮が必要である。我が国においては、日本人類遺伝学会など遺伝医療に関連する諸学会が中心となって、臨床遺伝専門医などの人材

の確保や、遺伝学的検査のガイドラインを示すなど遺伝子医療の健全な発展を促すための基盤整備を進めている。

本稿では、我が国における遺伝子医療の基盤整備の現状と問題点および今後の課題について、①人材および施設、②技術、③情報、④倫理の4項目に分けて概説する。

### 1. 臨床遺伝専門医の育成と研修施設の認定

日本人類遺伝学会、日本遺伝カウンセリング学会および家族性腫瘍研究会の役員から構成される臨床遺伝専門医制度委員会の検討を経て平成14年4月から臨床遺伝専門医制度が発足した。臨床遺伝専門医は、遺伝子医療の中核をな

す人材であり、総数は約 500 人(平成 16 年 3 月現在)である。名簿(氏名と勤務先)は上記学会のホームページに掲載されている。臨床遺伝専門医を目指す研修希望者は例年増加傾向にある。研修専門施設は、全国で 15 施設が認定されている。

遺伝子医療の中で、特に遺伝カウンセリングの分野で医師をサポートする立場の人材として非医師による遺伝カウンセラーの養成と資格化も考慮されている。非医師の遺伝カウンセラー養成コース(修士課程)は、信州大学および北里大学に設置されているが、更に設置を検討している大学も複数ある。

## 2. 遺伝子医療に関係する診断技術の向上

遺伝子診断技術の進歩は著しいが、その臨床検査としての定着は必ずしも容易ではない。その理由の一つは、ほとんどの疾患の遺伝子検査は、本来その疾患の原因遺伝子や病態の解明という研究目的で開発されたもので、検査に要するコストや時間を考慮した‘臨床検査としての最適化’がなされていないことである。遺伝性疾患の多くが患者数の少ない稀少疾患であり、コマーシャルラボラトリーでの対応が困難なことも一因である。

この問題の解決には、網羅的かつ効率的な遺伝子変異スクリーニング技術の開発・改良が必要である。現在、迅速変異解析法や CGH マイクロアレーのような染色体微細構造異常スクリーニング法の臨床検査としての実用化が検討されている。

## 3. 遺伝子医療に関連する情報

日々進歩する遺伝子医療に関する情報は、インターネットで全世界に配信される。米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) が維持配信している OMIM は、臨床で必要とされる個々の遺伝病の最新情報を容易に入手することができる。また、GeneTests は NIH および U. S. Department of Energy のサポートを受け、University of Washington のスタッフによって運営されている遺伝性疾患情報サイトで

ある。200 以上の代表的な遺伝病について、病気の概要、遺伝子検査実施施設への連絡法や遺伝カウンセリングのマニュアルを提示している。

我が国では、京都大学と信州大学がそれぞれ‘いでんネット’と‘Genetopia’というホームページを公開している。いでんネットでは、遺伝相談施設のリストと受診方法などに関する情報や疾患別の遺伝子検査実施施設リストを公開している。また、Genetopia からは、代表的な遺伝性疾患の説明と支援団体情報を入手することができる。これらのホームページは、厚生労働省こども家庭総合研究事業の支援を受けて維持・配信されている。

## 4. 遺伝子医療の社会的・倫理的諸問題について

遺伝子検査は、その結果が本人(発端者)の疾病の診断にとどまらず、家族全体に波及する問題を内包していること、また、遅発性の神経変性疾患などでは発症前に確実な診断が可能であること、出生前診断に応用できることなど、一般の臨床検査とは異なった性格を有しており、実施に当たっては慎重な対応が必要になる。平成 15 年遺伝医学に関連する 10 学会は共同で、‘遺伝学的検査に関するガイドライン’を発表した。このガイドラインは、遺伝子検査を行う際のインフォームド・コンセントの必要性、小児に行う場合の妥当性、検査前からの遺伝カウンセリングの必要性などについて詳細に述べている。

国立成育医療センターでは、昨年、病院内で行われるすべての遺伝子検査をこの‘遺伝学的検査に関するガイドライン’に準拠して実施すべく‘国立成育医療センター病院遺伝子検査取扱規程’(表 1)および‘国立成育医療センター病院遺伝子検査実施要領’(表 2)を定めた。これらの規則の下で遺伝子検査を行う際の流れ図を図 1 に示す。遺伝子検査を考慮する医師は、必ず遺伝診療科に依頼し、全例検査前に遺伝カウンセリングを行い、その後に同意書への署名を求める。検体はすべて匿名化し、患者名と匿名化符号の対応表は遺伝診療科で厳重に保管する。

表1 国立成育医療センター病院遺伝子検査取扱規程

国立成育医療センター病院(以下、「本院」という.)は、遺伝子検査(染色体検査を含む)の有する倫理的諸問題に配慮し、遺伝子検査に関する取扱規程を定め、その統一性・透明性を確保するものとする。

## [目的]

第1条 本規程は、本院における遺伝子検査の実施にあたってその取扱を規定するものである。

## [遺伝子検査運営委員会の設置]

第2条 本規程の策定、改定に関する業務を行うため、本院は、遺伝子検査運営委員会(以下「運営委員会」という.)を設置する。運営委員会は、総長の諮問機関とする。

## [遺伝子検査実施委員会の設置]

第3条 本規程のもとで、遺伝子検査が適確に実施されるために、本院は、遺伝子検査実施委員会(以下、「実施委員会」という.)を設置する。実施委員会は、病院長の諮問機関とする。

## [本規程が適応される遺伝子検査の範囲]

第4条 本規程は、遺伝病の診断を目的とする遺伝子検査および染色体検査(生殖細胞系列の試料を用いた検査)に適用される。体細胞遺伝子変異や病原微生物を検出するための遺伝子検査は対象外とする。また、当センターの倫理委員会で承認された遺伝子解析研究も、本規程の対象外とする。

## [遺伝子検査実施要領について]

第5条 「遺伝子検査等実施要領」は別に定める。

[付則]本規程は平成15年6月1日より施行する。

遺伝医療関連10学会より発表された遺伝学的検査に関するガイドライン(日本人類遺伝学会ホームページから入手可: <http://www6.plala.or.jp/jshg/>)に基づき、国立成育医療センターで遺伝子検査を行う際の規則を策定した。

検査の結果は、遺伝診療科から直接患者に開示し、必要に応じて検査後の遺伝カウンセリングを行う。この規程および実施要綱は、2003年6月から病院全体で実施しているが、これまでのところ大きな問題は生じていない。ガイドラインの主旨を具体的に生かすためには、個々の医療機関がその実情に合った取扱規程や実施要綱を定めることが肝要であり、成育医療センターでの試みがプロトタイプとして全国の医療施設に波及することが期待される。

## 5. 遺伝子医療の現状と今後

遺伝子医療を専門的に扱う診療部門を設置する傾向は全国的に広まっている。2003年11月現在で、全国の大学病院およびナショナルセンターの36施設で既に遺伝子医療部門が設置されていること、更に26施設が設立計画をもっていることが明らかとなっている。この情勢を背景に2003年11月に全国遺伝子医療部門連絡会議が、厚生労働省こども家庭総合研究事業の

支援の下、東京で開催された。当日は、52施設から69人の関係者が集い、その関心の高さが示されたが、同時に多くの問題も指摘された。遺伝子診療部門が設置されている施設は全国で36施設あるが、その中で専属スタッフがいるのはわずかに8施設(22%)で、多くは他の診療科との併任の形で行われているのが現状である。以下、全国遺伝子医療部門連絡会議で指摘された問題を列挙する。

(1) 経済的な問題: 遺伝カウンセリングの「医療」としての認知(保険点数)がないと今後の存続が不安である。診療費設定は、担当スタッフの存在意義の確保、遺伝カウンセリングの質の維持に必須である。ボランティア的活動でのみ支えられていることは、臨床遺伝専門医の養成に支障を来す。

(2) 人的な問題点: スタッフが兼務で十分な業務ができない。専任の看護師・心理士の確保が難しい。

(3) 遺伝子医療という特殊性からくる問題:

表 2 国立成育医療センター病院遺伝子検査実施要領

遺伝病の遺伝子検査および染色体検査は、以下の要領で実施する。

#### 遺伝子検査

- 1) (事前カウンセリングの実施) 遺伝子検査を依頼する医師は、遺伝診療科に連絡する。遺伝診療科医師は、被検者あるいはその代諾者に対して「遺伝学的検査に関するガイドライン」に従って、事前カウンセリングを行う。
- 2) (同意書への署名) 遺伝診療科医師は、患者または代諾者に同意書への署名を求める。
- 3) (検体の匿名化と検査の実施) 遺伝診療科医師は、試料を採取し検査を行なう。検査を病院外の施設で行なう場合は、遺伝診療科医師が、試料を連結可能匿名化しその匿名化対応表を遺伝子診療支援室の所定の場所に鍵をかけて保管する。
- 4) (結果の報告) 遺伝診療科医師は、検査結果の内容を依頼した医師に伝え、「遺伝子検査レポート」を電子カルテに記載する。記載する項目は、検査項目、実施日、検査実施施設、検査概要、その他である。また、依頼した医師は、遺伝子検査レポートに記載されている情報以外の遺伝子情報を電子カルテに記載しない。
- 5) (結果の開示) 遺伝診療科医師は、検査結果を本人またはその代諾者に開示する。ただし、被検者あるいはその代諾者が開示を希望しないことが確認されている場合は、それに従う。
- 6) (関連文書の保存) 遺伝診療科医師は、遺伝子検査結果が記載された文書を遺伝子診療支援室の所定の場所に鍵をかけて保管する。

#### 染色体検査

- 1) (検査の依頼) 染色体検査を依頼する医師は、検査の意義および必要性を被検者または代諾者に説明する。
- 2) (同意の確認) 染色体検査を依頼する医師は、被検者または代諾者の同意を確認し、その旨をカルテに記載する。
- 3) (結果の報告) 院内ラボ(SRL)は、検査結果を記載した文書を遺伝診療科に送付する。遺伝診療科医師は、検査結果の内容を依頼した医師に伝え、「染色体検査レポート」を電子カルテに記載する。記載する項目は、検査項目、実施日、検査概要、その他である。
- 4) (結果の開示) 染色体検査を依頼した医師は、検査結果を本人またはその代諾者に開示する。ただし、被検者あるいはその代諾者が開示を希望しないことが確認されている場合は、それに従う。
- 5) (関連文書の保存) 遺伝診療科医師は、染色体検査結果が記載された文書を遺伝子診療支援室の所定の場所に鍵をかけて保管する。

国立成育医療センター病院遺伝子検査取扱規程に付帯する実施要領。従来から各診療科で個別に対応している染色体検査と、新規に導入された遺伝子検査で異なった運用をしている。

保険診療と自費診療の混合診療が行えないため、保険適用の検査をする場合、別の日の来院が必要になる。各診療科で既に行われている遺伝子診療を施設全体に統一することが困難である。'遺伝子医療'が患者だけでなく、医療機関からの認知度も低い。

#### おわりに

遺伝子医療の基盤整備の現況を、人材、施設、

情報網整備、倫理的問題への配慮の観点から概説した。全国の大学病院やナショナルセンターにおける遺伝子診療部門の開設は急速に進んでいるが、一方で、診療費の問題、医療としての認知の問題、人員の確保など解決すべき課題も多数存在している。行政と医療が協力してこれらの問題を解決し、健全な遺伝子医療を日本に定着させる必要がある。

#### 参考文献

- 1) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>