

に分類され、痙攣、眼球運動失行を高率に呈していたのに対し、骨症状や脾腫などの臓器症状を呈する例は少なかった。

4) F213I ホモ接合体における酵素補充療法の効果  
4例とも酵素補充療法は診断後直ちに施行され(酵素療法開始年齢:1才2ヶ月、2才5ヶ月、2才5ヶ月、5才3ヶ月)、60単位/kg、2週間毎に投与されていた。ヘモグロビン値、血小板値、ACE値、ACP値は投与後12ヶ月でほぼ正常化し、投与後3年では全例正常化していた。これに対し、運動機能は徐々に退行した。すなわち、酵素療法開始時、2例は独歩、2例はハイハイであったが、独歩可能だった2例中1例は治療開始3年後にハイハイとなり、現在7才3月(治療開始後5年9ヶ月)であるが、寝たきりとなっている。独歩可能だったもう1例は、治療開始3年6ヶ月後にハイハイとなり、現在10才2ヶ月(治療開始後9年9ヶ月)であるが座位となっている。ハイハイ可能だった2例中1例は独歩可能となったが、治療開始2年後には再びハイハイとなり、9才(治療開始後7年10ヶ月)で死亡した。ハイハイ可能だったもう1例は治療開始6ヶ月で座位となり、現在9才5ヶ月(治療開始後7年)で座位である。痙攣については全例、酵素療法開始時には認めていなかったが、6ヶ月〜3年後には全例、ほぼ毎日痙攣を認めるようになり、痙攣の出現とともに運動機能が退行していった。

#### D. 考察

日本人ゴーシェ病においては海外症例とは臨床表現型が異なり、神経型が多く、また非神経型→神経型への移行例が存在することが臨床症状の特徴であった。

L444P/L444Pの遺伝子型のゴーシェ病患者では重篤な臓器症状及び神経型への移行を高率に認めたが痙攣は認めなかった。

L444P/F213Iの遺伝子型のゴーシェ病患者では重篤な臓器症状及び神経型への移行を高率に認めるとともに一部の患者でパーキンソン病様症状を呈することが特徴であった。

D409H/×の遺伝子型のゴーシェ病患者では臓器症状は顕著でなかったが、全例診断時より神経症状を呈していた。水頭症の合併が高率に認めるとともに、心弁膜症を一部の症例で合併することが特徴であった。

F213I/F213Iの遺伝子型のゴーシェ病患者では著明な脾腫を呈することが多かったが骨症状は全く認めなかった。全例、神経症状を幼少期から呈していた。全例、診断後直ちに酵素補充療法を施行されていた。臓器症状及び血液学的所見の改善に酵素補充療法は有効であったが、神経症状には効果を認めなかった。すなわち酵素補充療法にもかかわらず運動機能は退行し、痙攣の抑制効果も認めなかった。

#### E. 結論

OhnoらによるとF213I遺伝子変異をもつ患者培養皮膚繊維芽細胞にN-オクチル-β-バリエナミン(NOV)を添加するとβ-グルコシダーゼの活性が約6倍に上昇することが報告されている。従って、F213Iのホモ接合体のゴーシェ病患者の治療は、今後NOVを用いたシャペロン療法あるいはNOVに加え、酵素補充療法を併用法の有用性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, Fujikawa M, Mizuno A, Inui K, Sakai N, Kitagawa T, Suzuki Y, Mochizuki S, Kawakami M, Hosoya T, Owada M, Sakuraba H, Saito H. : Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients : the results of a phase 2 bridging study. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28: 575-83.
2. Meng XL, Shen JS, Watabe K, Ohashi T, Eto Y. : GALC transduction leads to morphological improvement of the twitcher oligodendrocytes in vitro. *Mol Genet Metab.* 2005 Apr;84(4):332-43.
3. Shen JS, Meng XL, Yokoo T, Sakurai K, Watabe K, Ohashi T, Eto Y. : Widespread and highly persistent gene transfer to the CNS by retrovirus vector in utero : implication for gene therapy to Krabbe disease. *J Gene Med.* 2005; 7: 540-51.

##### 学会発表

1. 田嶋朝子、伊東建、飯塚佐代子、沈けい松、井田博幸、衛藤義勝 : In vitroにおけるゴーシェ病モデル細胞の作成およびその評価. 第108回

日本小児科学会, 東京, 2005.4

2. 田嶋朝子、金城栄子、伊東建、井田博幸、衛藤義勝：日本人における3型ゴーシェ病の遺伝子型／臨床型および治療効果について, 第48回日本先天代謝異常学会, 熊本, 2005.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

**研究要旨**

リソソーム病のうち遺伝性脱髄疾患の1つであるクラッペ病は根本的な治療法のない難病である。本疾患に対し最近開発された低分子量物質による分子シャペロン法の応用について検討し、新たな治療法の開発を目指す。

**A. 研究目的**

- 1) シャペロン物質のガラクトセレブロシダーズに対する阻害活性；クラッペ病の欠損酵素ガラクトセレブロシダーゼに対するシャペロン候補物質の阻害活性をまずスクリーニングし、シャペロン活性の可能性を検索する。
- 2) シャペロン物質の患者皮膚線維芽細胞における酵素活性に対する効果を調べ、有効な細胞株を検索する。
- 3) シャペロン物質の効果発現に影響を与える物質の検索；本酵素は activator と言われる SAP-A 蛋白の存在が酵素活性に影響を与えることが知られており、この蛋白の共存による影響を調べる。
- 4) 変異蛋白の細胞内輸送；シャペロンは変異蛋白を安定化して細胞内輸送を効率的に行うが、変異蛋白の種類により細胞内での発現、輸送がどのように影響を受けるかを解析する。

**B. 研究方法**

- 1) シャペロン物質のガラクトセレブロシダーゼに対する阻害活性；in vitro での酵素活性測定系において、各種シャペロン候補物質の存在下での活性変化を解析する。
- 2) 患者皮膚線維芽細胞の培養上清にシャペロン候補物質を添加し、2日間培養後、細胞を回収し細胞内酵素活性を測定する。
- 3) シャペロン物質の効果発現に影響を与える物質の検索；上記実験系において、シャペロン候補物質に加えて SAP-A を添加して、その効果を種々の濃度

において検討する。

- 4) 変異蛋白の細胞内輸送；GFP を付加して変異蛋白の発現ベクターを作製し、その強発現系においてその蛋白質の局在を蛍光顕微鏡で観察する。

**C. 研究結果**

- 1) シャペロン物質のガラクトセレブロシダーズに対する阻害活性；ガラクトセレブロシダーゼ活性をまず G<sub>M1</sub> ガラクトシダーゼのシャペロン物質である NOEV で処理して解析すると、図1のように著明な阻害効果を認めた。これは本来の G<sub>M1</sub> ガラクトシダーゼに対する阻害効果より大きいものであった。

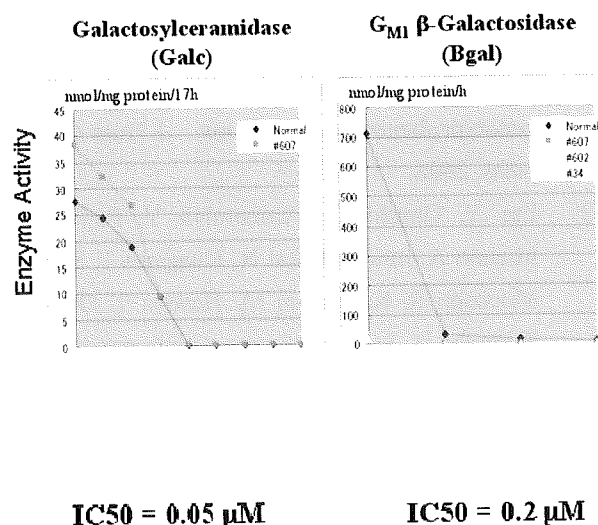


図 1

2) 患者皮膚線維芽細胞の培養上清に上記 NOEV を添加して、その酵素活性の変化を観察した。さまざまな変異のある 10 数種の変異細胞株における活性上昇は明らかでなかった。

3) シャペロン物質の効果発現に影響を与える物質の検索；ガラクトセレブロシダーゼの activator である SAP-A を上記反応液に 2-2000nM 添加して測定するも、明らかな活性上昇は観察されなかった。

4) 変異蛋白の細胞内輸送；シャペロン療法の効果を見る上で、変異蛋白の細胞内輸送の異常を解析するために GFP 蛋白の発現ベクターを構築中である。今後、強発現系での変異蛋白の輸送を解析予定である。

#### D. 考察

NOEV のガラクトセレブロシダーゼに対する阻害効果は大変強いものであるが、明らかな変異蛋白の活性上昇につながらないことは、G<sub>M1</sub> ガラクトシダーゼの場合と大きな違いである。これは NOEV がガラクトセレブロシダーゼとの親和性は高いが、阻害活性が強すぎるためか、また異なる条件下での解析が必要なのか、今後の問題点である。

#### E. 結論

NOEV はガラクトセレブロシダーゼの良いシャペロンになりうる可能性が示されたが、今後更にその測定条件などについて検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui , Ozono K., Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotypephenotype correlation. J Hum Genet, in press, 2006.
2. Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, Fujiwara M, Mizuno A, Inui K, Sakai N, Kitagawa T, Suzuki Y, Mocizuki S, Kawakami M, Hosoya T, Owada M, Sakuraba H, Saito H., Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study., J Inherit Metab Dis. 2005; 28: 575-83.

##### 学会発表

1. 大友孝信、酒井規夫、青天目 信、沖永剛志、滝沢祥子、楠木重範、橋井佳子、太田秀明、谷

池雅子、大藪恵一：若年型クラッペ病に対する造血幹細胞移植の効果. 第48回日本先天代謝異常学会：05.11.16-11.18, 熊本

2. 許 成哲、酒井 規夫、谷池 雅子、赤木 幹弘、乾 幸治、大藪 恵一：Krabbe 病の遺伝子解析；表現型遺伝子型相関. 第48回日本先天代謝異常学会：05.11.16-18, 熊本
3. 酒井規夫、大場志保子、青天目信、神尾範子、沖永剛史、今井克美、鈴木保宏、津留陽、田中あけみ、谷池雅子、大藪恵一：白質ジストロフィー7例に対する造血幹細胞移植の効果とリスク. 第47回日本小児神経学会:05.5.19-21、熊本

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ファブリー病患者由来変異酵素の特徴とシャペロン治療に関する研究  
分担研究者 石井 達 帯広畜産大学教授

残存活性を有するファブリー病患者由来変異酵素 19 種を COS-7 細胞で一過性に発現させ、これらに対する活性部位特異的シャペロンである 1-デオキシガラクトノジリマイシン添加の影響を検討したところ、すべての変異において顕著な酵素活性の上昇が認められた。また、これらのうち 16 種の変異酵素を精製し検討したところ、多くは機能的には正常であるが、熱安定性が低いフォールディング異常酵素であることが確認された。

A. 研究目的

先に我々はファブリー病患者由来変異酵素 (R301Q と Q279E) についてその活性低下機構を明らかにし、また活性部位特異的シャペロンである 1-デオキシガラクトノジリマイシン (DGJ) の添加により活性上昇することを報告した。そこで、さらにその普遍性を確認するため、残存活性を有するファブリー病患者由来変異酵素についてその性質を明らかにし、DGJ の効果を広く検証した。

B. 研究方法

新たに 17 種類のアミノ酸置換型変異 (A20P, E59K, E66Q, M72V, I91T, A97V, R112H, F113L, P146S, A156V, L166V, N215S, M296I, M296V, R356W, G373D, G373S) を作成し、COS-7 細胞で一過性に発現させ、20  $\mu$ M DGJ 添加の影響を検討した。また、DGJ 添加により顕著に活性上昇した 16 種の酵素を精製し、その酵素学的性質を合成基質に対する親和性により検討し、さらに酸性から中性 pH 条件下での熱安定性を正常酵素と比較した。

C. 研究結果

19 種すべての変異酵素において DGJ による顕著な活性上昇 (1.5~10 倍) が認められた。また精製酵素の  $K_m$ ,  $V_{max}$  は、E59K で  $K_m$  の増大が認められた以外、変化は無く、機能的には正常であった。一方、熱安定性は顕著に低く、正常酵素が pH3~7.5 に安定領域が認められたのに対し、変異酵素では pH3.5~6.5 と狭く、特に中性 pH での熱安定性の低下が顕著に認められた。

D. 考察

残存活性を有する変異酵素は一般に機能的には正常であるが、熱安定性の低さに見られるフォールディング異常により細胞内で分解されていると考えられる。

E. 結論

DGJ を用いたシャペロン療法は残存活性を有する遺伝子変異に対して広く適用可能である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木義之	薬物療法（遺伝病に対する新しい治療法）	柳澤正義、衛藤義勝、五十嵐隆	小児科の新しい流れ：先端医療シリーズ 34	先端医療技術研究所	東京	2005	pp104-108

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鈴木義之	ライソゾーム病の酵素補充療法.	Brain Medical	17	253-258	2005
Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, Fujiwara M, Mizuno A, Inui K, Sakai N, Kitagawa T, Suzuki Y, Mochizuki S, Kawakami M, Hosoya T, Owada M, Sakuraba H, Saito H.	Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study.	J Inherit Metab Dis	28	575-583	2005
Mochida K, Wakayama T, Takano, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Matsuda J, Ogura A.	Birth of Offspring after Transfer of Mongolian Gerbil ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) Embryos Cryopreserved by Vitrification.	Mol Reprod Dev	70	464-70	2005
Meng XL, Shen JS, Watabe K, Ohashi T, Eto Y.	GALC transduction leads to morphological improvement of the twitcher oligodendrocytes in vitro.	Mol Genet Metab	84(4)	332-43	2005 Apr
Shen JS, Meng XL, Yokoo T, Sakurai K, Watabe K, Ohashi T, Eto Y.	Widespread and highly persistent gene transfer to the CNS by retrovirus vector in utero : implication for gene therapy to Krabbe disease.	J Gene Med	7	540-51	2005
Suzuki O, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J.	Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line.	Exp Anim	55	65-69	2006
Suzuki Y	$\beta$ -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy.	J Inherit Metab Dis		in press	2006

Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y	Fibroblast screening for chaperone therapy in $\beta$ -galactosidosis.	Brain Dev		in press	2006
Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Agui I T	Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome.	Mammalian Genome		in press	2006
Okada T, Ishii Y, Masujin K, Yasoshima A, Matsuda J, Ogura A, Nakayama H, Kunieda T, Doi K.	The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology.	American Journal of Pathology		in press	2006
Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O.	Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone beta-subunit precursor protein.	Gen. Comp. Endocrinol		in press	2006
Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW.	Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I).	Nature Medicine		in press	2006
Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui , Ozono K.	Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotypephenotype correlation.	J Hum Genet		in press	2006

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

なし

健康危険情報

なし



研究成果の刊行物・別刷

## 第4章 遺伝病に対する新しい治療法

### 1. 薬物療法

#### 1.1 はじめに

遺伝病を治すということは、本質的にはその原因となる遺伝子を修復するということである。遺伝病の臨床的表現型は多様であるが、その遺伝子異常は全身性である。特定の臓器組織のみに遺伝子の構造異常があるわけでない。多細胞生物としてのヒトの組織の遺伝子情報を改変することは容易でない。

単一遺伝子病治療のターゲットは、すべての体細胞に存在する一つの遺伝子である。その多くは脳組織の原発性病変を発現する。現在のところ、脳障害の直接のアプローチは原理的に極めて困難である。

我々はこれまでとは違った発想で、遺伝性ライソゾーム病をモデルとして、脳の遺伝病に対する経口薬の開発を試みている。その原理は酵素基質に類似の低分子化合物をシャペロンとして投与することである。与えられたタイトルは「薬物療法」であるが、ここではシャペロン療法の解説を行うことにする。その原理が、他のカテゴリーの多くの脳の遺伝病に対する新しい治療法となり得るからである。

#### 1.2 シャペロンとは

日本では、シャペロンという言葉は一般的でない。『広辞苑』や『世界大百科事典』など、国内の一般的な辞書、事典類にはこの項目はない。英語圏で最も権威のある『Oxford English Dictionary 第2版』(1989年)には以下の歴史的変遷が記載されている。「貴族(14世紀)、後には貴婦人(16世紀)のかぶる頭巾、帽子。ガーター勲位の装束の一部(16世紀)、棺を引く馬の前頭部につける飾り(17世紀)などの意味を経て、若い未婚女性が社交界に出るときの付き添いで、主に行儀作法を指導し監督する年配の既婚女性(18世紀)などの意味に使われた」とのことである。

現在の臨床医学では、医師とは異なった性の患者を診察するときに医師に付き添う人という意味で、主に北米大陸で使われる(Stedman's Medical Dictionary, 27th ed, 2000)。筆者も米空軍病院でのインターン時

代、女性患者を診察する際、忙しい看護師にシャペロンを頼んでもなかなか来てくれず、長く待たされたことを記憶している。

最近では生物学で分子シャペロンという言葉が使われる。生物学辞典、理化学辞典、医学辞典には「他の蛋白質や蛋白質複合体の適正な折りたたみや構築を行う別の蛋白質」という定義が記載されている。単にシャペロンともいう。細胞内で熱変性を予防し、蛋白質が正しく働くよう機能する熱ショック蛋白質が最も有名である。

この語は元来 chaperon という綴りであったが、原義が女性の持ち物あるいは女性自身を指すことが多かったことから、次第に chaperone という女性形単語として使われるようになった(『Oxford English Dictionary』)。そして現代医学辞書はほとんどすべて chaperone という見出し語になっている。筆者も chaperone と書くことにしている。

#### 1.3 ライソゾーム病の分子病態

ライソゾームは我々の細胞内に存在し、酸性条件下で数十の加水分解酵素が多くの高分子代謝産物を順序よく消化する小胞である。それぞれの酵素は特異的な遺伝子情報により細胞内で合成される。ある一つの遺伝子に構造異常(変異)が起こると、その間違った情報により産生された酵素蛋白質の構造も変化し、活性を失い細胞の機能障害を起こす。個体としては生後ある一定の時期に全身病として発現する。このグループの病気をまとめて(遺伝性)ライソゾーム病という。多くは小児期の進行性中枢神経疾患としての病像を示す<sup>1,2)</sup>。

ライソゾーム酵素は成熟赤血球以外、すべての体細胞に活性が存在する。したがって、脳の病気であっても、その病態解析には他の組織・臓器の細胞を使うことができる。診療の場では、モデル細胞として末梢白血球や皮膚由来の線維芽細胞を用いる。我々は特にβ-ガラクトシダーゼという、脳に特異的な脂質であ

るガングリオシドの分解酵素の病態を詳細に調べてきた<sup>3)</sup>。

1988年にこれらの病気の責任遺伝子構造を解明した後、多様な変異遺伝子の存在を確認し<sup>3)</sup>、それらが発現する酵素蛋白質の細胞内での動きを調べた。その結果、いわゆる「酵素欠損」の分子病態が一様でないことを知った。大きく分けると次の三つに集約できる<sup>4)</sup>。

- ①蛋白質分子が合成されない。
- ②合成された蛋白質分子に酵素としての活性がない。
- ③合成された蛋白質分子に酵素活性はあるが、不安定ですぐ不活化される。

これらの中で①②の病態では、正常な酵素蛋白質あるいは遺伝子を補給しない限り細胞の機能を正常化することは不可能である。ところが③の場合、せっかく活性のある酵素蛋白質が存在するにも関わらず、細胞がそれをうまく利用できていない。何らかの方法でこの蛋白質に適切な細胞内環境を提供すれば、働くべき場所で活性を発揮し、細胞の機能を修復することができるはずである。

我々はこの方向へのアプローチが可能であるかどうか、主に二つの疾患グループについて検討してきた。全身血管病であるファブリー病 ( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A 欠損症)、そして古典的な神経遺伝病である G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスと骨系統疾患モルキオ B 病 (ともに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症) である。

#### 1.4 ケミカルシャペロン療法の原理

遺伝病の変異蛋白質の中には、本来の機能を保持しているにも関わらず、立体的な折りたたみ (フォールディング) が不十分なために、細胞内での生合成の後、すみやかに分解、不活化されてしまう分子がある。基質類似化合物を細胞に投与することにより、この分子が安定化されることがある。この種の化合物は上記の分子シャペロンと本質的に同じ働きをもつので、ケミカルシャペロン (chemical chaperone) と呼ぶことにする。具体的な細胞内での分子反応のプロセスを図 4.1.1 の模式図に示す。

糖鎖末端を加水分解するライソゾーム酵素、例えばガラクトシダーゼはガラクトース、グルコシダーゼはグルコースを認識する。それぞれの類似化合物が基質とともに試験管内に存在すれば、競合的阻害剤として働く可能性がある。ところが細胞内では、これらの化合物が図 4.1.1 のような機構により変異分子を安定化し、ライソゾームに輸送する。酸性の条件下ではシャペロン分子と解離し、安定な状態で酵素としての活性

を示す。ただし、この細胞処理で変異酵素活性を正常のレベルまで上昇させることができるとは限らない。しかし酵素の基質処理能力がある程度以上になれば、理論上は病気の発症を著しく遅らせることができる。実際、酵素活性がかなり低くても保因者は発症しない。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症については、発症年齢と残存酵素活性の関係が放物線状の曲線となる<sup>4)</sup>。合成基質を用いた線維芽細胞内の酵素活性を試験管内で測定するという人工的な実験条件では、細胞内酵素活性が正常細胞の活性平均の 8 ~ 10 % 存在すれば、発症年齢が無量大になると予測できる。つまり、発症年齢が個体の寿命との競争になる。活性発現が不十分な細胞に対して、いくらかでも活性を上げることができれば、この目的が達成される可能性がある。

#### 1.5 新しいシャペロン化合物の検索とその成果：NOEV と NOV

上述の、変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の詳細な分析データをもとに各種の変異細胞にガラクトースを投与してみたら、実際に活性が著しく増加した<sup>5)</sup>。しかしこの実験には、ガラクトースを人体における血液の浸透圧よりも高い濃度にする必要があった。次いで他の類似体のスクリーニングの結果、市販化合物 1-デオキシガラクトノジリマイシンがより低濃度でこの酵素の変異体に働くことがわかった<sup>6)</sup>。

次に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症、つまり古典的な遺伝性代謝性脳変性疾患である G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスを対象とした研究を始めた。この酵素の欠損症は、単一遺伝子の異なった変異により、重症脳障害を起こ

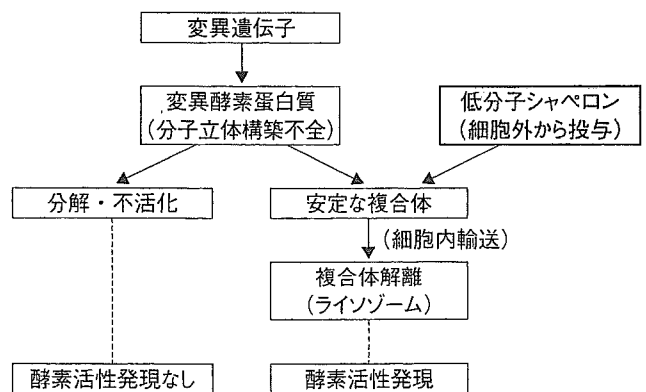


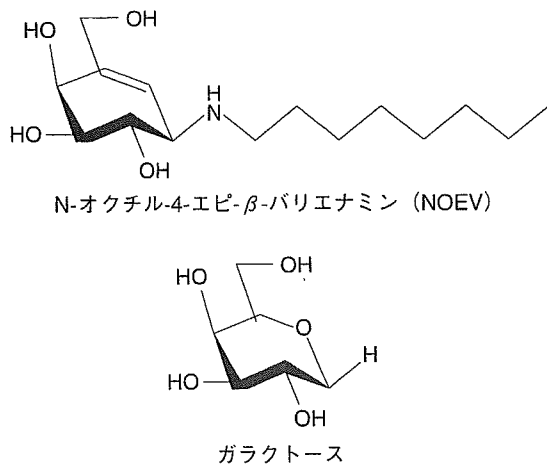
図 4.1.1 ケミカルシャペロン療法の原理 (遺伝性ライソゾーム病)

細胞外から投与された低分子競合的阻害剤は細胞内に入り、標的となる変異蛋白質と結合し、安定な立体構造を確立し、複合体がライソゾームに運ばれ、酸性条件下で解離した変異蛋白質が酵素としての活性を発現する。

す全身疾患 ( $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス) または骨系統疾患 (モルキオ B 病) として発現する<sup>3)</sup>。脳をはじめとして全身臓器にガングリオシド  $G_{M1}$ 、そのアシアロ体  $G_{A1}$  の他にオリゴ糖やムコ多糖 (ケラタン硫酸) などが蓄積する。我々はまず市販のガラクトース誘導体・類似体について、この酵素の阻害活性を調べた。しかしファブリー病と違い、1-デオキシガラクトノジリマイシンの効果は  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対しては  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の数十分の一であった<sup>7)</sup>。

次に生化学工業(株)中央研究所の協力により、新規合成化合物のスクリーニングを始めた。その中に N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン (N-octyl-4-epi- $\beta$ -valianamine ; NOEV) という化合物がヒト細胞内で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の強力な阻害剤として働くことがわかった<sup>8)</sup>。この物性解析の結果を図 4.1.2 に示す。この化合物はガラクトースの構造に似ているが、ガラクトースの C1 と C5 の間は O (酸素) 結合でなく C (炭素) 結合であり、かつ C1 には O (酸素) でなく N (窒素) が結合しているという違いがある。現在のところ、側鎖の炭素数 8 の化合物 (NOEV) が我々の目的に最も有効であることを確認した。

この化合物には炭化水素側鎖がついているため、水に対する親和性は高くない。しかしこのフリー体のままでも 3 ~ 5 mM までの濃度であれば容易に水に溶解



- |                            |
|----------------------------|
| 1. 分子量 287.40              |
| 2. 室温で安定                   |
| 3. 水 (3 mM)、メタノール、DMSO に溶解 |
| 4. 試験管内：酵素活性を阻害 (競合的)      |
| 5. $IC_{50} = 0.2 \mu M$   |
| 6. 細胞内：酵素を活性化 (低濃度)        |

図 4.1.2 NOEV の構造と物性

コア構造はガラクトースに似ているが、ガラクトースの C1 側鎖基と C1-5 結合部はガラクトースと異なる。

する。室温で安定である。試験管内での 50 % 酵素阻害濃度は  $0.2 \mu M$  である。この化合物をヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来の線維芽細胞培養液に添加すると、特定の変異遺伝子に対して活性化を示した。

NOEV は類似化合物 NOV (N-octyl- $\beta$ -valianamine) のエピマーとして開発された化合物である。NOV も  $\beta$ -グルコシダーゼ阻害剤であることがわかっており、調べてみると、ゴーシェ病患者細胞の中に活性発現が誘導される変異のあることがわかった<sup>9)</sup>。

## 1.6 シャペロン化合物 NOEV の変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する効果

### 1.6.1 ヒト線維芽細胞

これらの予備的な結果をもとに、まず患者由来のヒト線維芽細胞への投薬実験を行った。細胞培養液に  $0.2 \sim 2 \text{ mM}$  の NOEV の存在下で 4 日間培養すると、酵素活性が著しく上昇する細胞株があった。特に R201C、R457Q 変異でその反応が大きかった。表現型として若年型症例に最も有効であり、乳児型症例にも 3 倍以上の活性上昇を示す症例があった。すべての症例を合わせて 35 % の細胞が陽性反応を示した。この実験条件下では、成人型・モルキオ B 病症例の反応は大きくなかった。

### 1.6.2 マウス線維芽細胞

そこで、既に確立した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス<sup>10,11)</sup> の線維芽細胞に、ヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損患者の病型特異的な変異 cDNA を導入し、この変異を発現する細胞株を確立した<sup>8)</sup>。ヒト細胞とは多少の違いがあるが、NOEV はファブリー病に有効な 1-デオキシガラクトノジリマイシンの 1000 ~ 2000 倍の活性誘導効果を示した。R201C 変異にもとも有効であった<sup>8)</sup>。ガングリオシド負荷後、正常遺伝子の発現細胞には基質の蓄積がみられなかったが、R201C 発現細胞ではガングリオシド  $G_{M1}$  とそのアシアロ体  $G_{A1}$  の著しい蓄積を示した。そして NOEV 添加により基質蓄積が著しく減少した<sup>8)</sup>。

### 1.6.3 モデルマウスの作成と個体への NOEV 投与

動物個体実験のために、上記のノックアウトマウスにヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の病型特異的な変異遺伝子をトランスジーンとして導入したモデルマウスを作成した<sup>8)</sup>。正常な  $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する遺伝子 GP8 を導入したマウスは病気を発現せず、正常の個体として生存した。この遺伝子の過剰発現により遺伝子治療ができたということになる。この結果を

そのままヒト個体に適用することはできないが、理論的には操作が可能である。ただしヒトのように生存期間が長い個体では、トランスジーンによる長期の酵素活性過剰発現の影響を考慮しなければならない。

次に R201C 発現マウスに NOEV の 1 ~ 3 mM 水溶液を 1 週間経口投与した。脳を含むすべての組織の酵素活性が著しく上昇し、脳組織のグングリオシド蓄積が消失した。3 mM 投与後の脳内酵素活性は、正常マウスの 30 % レベルにまで上昇していた (未発表データ)。また別の実験で、3 mM NOEV 投与 2 ヶ月後の脳内 NOEV 濃度は肝臓内濃度の 30 ~ 45 % にまで上昇していた (未発表データ)。この結果から、経口投与した NOEV が腸管から吸収され、血液脳関門を通過し中枢神経系に取り込まれ、酵素分子を安定化し活性を発現させたとの結論を得た。

これらは発症前マウス実験で得られた結果であるが、現在、発症前からの長期投与実験を進行中である。R201C 発現マウスに 3 mM の NOEV 水溶液を生後 6 ヶ月から経口投与した少数例実験の予備的観察によると、シャペロン投与 4 ヶ月後 (生後 10 ヶ月) に非投与マウスが後肢の不全麻痺を発現したのに対し、投与群では後肢の麻痺は認められない (未発表データ)。今後さらに個体数を増やし、さらに長期の観察を続け、この結果を確認する予定である。

### 1.7 NOEV についてわかったこと、検討すべきこと

以上の細胞、動物個体の実験から以下のことがわかった。表 4.1.1 に主な項目をまとめた。

NOEV は長期間、室温で安定である。これは薬剤としての必須の条件である。水への溶解性については分子修飾による検討を進めている。そして経口投与後、腸管内で吸収されて血液に入り、血液脳関門を通過して脳組織に入る。投与後のマウスの血液、脳組織の濃度測定により確認した。脳組織に入った NOEV は神経細胞の中で変異蛋白質を安定化、活性化し、異常に蓄積した基質 (脂質) を分解する。今後の課題は最適の投与量や投与方法である。

予備的なデータではあるが、NOEV 投与によりモデルマウスの中枢神経系の発症予防が可能であるとの結論が得られた。病初期の後肢麻痺発現が出現しない。そして経口投与 5 週間までは、体重、飲水量、血液生化学分析データに異常を認めない。マウスの嗜好性・忌避はない。さらに、長期投与における個体への影響を観察中である。

NOEV が  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症のシャペロン療法に最もすぐれた薬剤であるという保証はない。現在、他の新規化合物をテスト中である。なかには同程度の活性を持ち、かつ薬剤としての物性が優れた化合物もある (未発表データ)。また、変異体により効果の違いがある。シャペロン分子と変異蛋白質との分子反応を構造機能相関の観点から分析する予定である。

この新しい治療的アプローチが可能であるためには、変異遺伝子が触媒活性をもつ変異蛋白質を発現するという条件が必須である。同じ名前の病気すべての患者に様に適用できる手法ではない。しかし、現在まったく治療法のない病気の一部でもこの方法で症状の軽減、予防が可能になれば、極めて大きな学問的、社会的な意味を持つ。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ変異については 30 ~ 35 % 程度の患者に効果が期待される。他の類似疾患でもほぼ同じ範囲の患者に治療が可能であると予測している (未発表データ)。

### 1.8 他のライソゾーム病・他の遺伝病への応用

既に述べたように、この研究はファブリー病から始まった。現在の主要な研究対象は脳病変を発現する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症候群、すなわち GM1-グングリオシドーシスである。モルキオ B 病については効果が確認できていない。しかし原理的にこのアプローチはすべてのライソゾーム病に適用できるはずである。実際、 $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症候群 (ゴーシェ病) でもグルコース類似の化合物が少なくとも培養細胞で有効であることが確認できた<sup>9)</sup>。また  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに有効な NOEV 類縁体も検索中である。

このように、現在のところガラクトースとグルコースの  $\alpha$  および  $\beta$  結合を認識する酵素についての分析が進行中である。今後、他のライソゾーム酵素欠損症についても順次対象を広げる予定である。

表 4.1.1 NOEV についてわかったこと

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 試験管内で <math>\beta</math>-ガラクトシダーゼの阻害剤である (高濃度)</li> <li>2. 細胞内で変異 <math>\beta</math>-ガラクトシダーゼの活性発現を誘導する (低濃度)</li> <li>3. この阻害・活性化は遺伝子変異特異的である</li> <li>4. 個体への経口投与により、血液脳関門を通過して脳組織に到達する</li> <li>5. 脳組織で変異 <math>\beta</math>-ガラクトシダーゼの活性発現を誘導する</li> <li>6. 脳組織で蓄積基質の分解を誘導する</li> <li>7. 中枢神経症状の発現を予防・軽減する</li> <li>8. 短期投与ではマウス個体に対する副作用・毒性はない</li> </ol> |
|---|

これまで我々はライソゾーム病という細胞内分子病態がかなり明らかにされた疾患群を対象としてきたが、他のカテゴリーの遺伝病でも、もしその分子病態、つまり変異遺伝子の発現、変異蛋白質の分子修飾、活性発現部位への細胞内移動、活性発現機構などが明らかにされれば、同じ原理の治療的アプローチが可能になるはずである。その意味でこの分子治療法、ケミカルシャペロン療法が今後多くの病気について検討され、実用化されることを期待している。

### 謝辞

本稿の $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の研究は、国際医療福祉大学をはじめ以下の多くの施設の研究者との共同研究により進行中である。黒澤美枝子（国際医療福祉大学基礎医学研究センター）、岩崎博之、渡辺浩史（国際医療福祉大学臨床医学研究センター）、松田潤一郎（国立感染症研究所獣医学部）、難波栄二（鳥取大学生命機能研究支援センター）、大野耕策（鳥取大学医学部）、伊藤雅之（国立精神・神経センター神経研究所）、飯田真己（生化学工業中央研究所）、小川誠一郎（慶應義塾大学理工学部）、実方和宏（株式会社エスアールエル）。以上の代表者ととも各施設の多くの研究協力者のご援助をいただいた。また $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症の研究には石井 達（東京都臨床医学総合研究所、現・帯広畜産大学）と樊 建強（東京都臨床医学総合研究所、現・マウントサイナイ医科大学）両氏の貢献が大きい。ここに記して感謝の意を表す。この研究は文部科学省科学研究費（13680918、14207106）ならびに厚生労働省科学研究費（10030501、14221201）の補助金を受けた。

### 文献

- 1) 鈴木義之：リソゾーム病総論、最新内科学大系 11。井村裕夫ほか編：ミトコンドリア病・リソゾーム病、中山書店、東京、p173-186, 1996
- 2) 鈴木義之：遺伝性ライソゾーム病。内科 87: 737-742, 2001
- 3) Suzuki Y, et al:  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): GM1-Gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, et al (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, 3775-3809, 2001; Online Version: <http://genetics.accessmedicine.com/>, McGraw-Hill, New York, 2004
- 4) 鈴木義之：ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法。小児科 45: 2313-2320, 2004
- 5) Okumiya T, et al: Galactose stabilizes various missense mutants of  $\alpha$ -galactosidase in Fabry disease. Biochem Biophys Res Commun 214: 1219-1224, 1995
- 6) Fan JQ, et al: Accelerating transport and maturation of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. Nature Med 5: 112-115, 1999
- 7) Tominaga L, et al: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human  $\beta$ -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. Brain Dev 23: 284-287, 2001
- 8) Matsuda J, et al: Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 15912-15917, 2003
- 9) Lin H, et al: N-Octyl- $\beta$ -valienamine up-regulates activity of F213I mutant  $\beta$ -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. Biochim Biophys Acta 1689: 219-228, 2004
- 10) Matsuda J, et al: Neurological manifestations of knockout mice with  $\beta$ -galactosidase deficiency. Brain Dev 19: 19-20, 1997
- 11) Matsuda J, et al:  $\beta$ -Galactosidase-deficient mouse as an animal model for GM1-gangliosidosis. Glycoconjugate J 14: 729-736, 1997

(鈴木義之)

# ライソゾーム病の酵素補充療法

鈴木義之

SUZUKI Yoshiyuki/国際医療福祉大学臨床医学研究センター

酵素補充療法は、正常な酵素が発現しない遺伝病の中で、ライソゾーム病を直接のターゲットとして開発された。異物として投与された正常の酵素分子が細胞に取り込まれ、ライソゾームに運ばれるからである。これまでにゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症(3病型)、ポンペ病に対する試みがなされ、わが国では最初の2つの病気についてすでに臨床の場での治療が行われている。しかし、小児の重度脳障害の原因としてのこのグループの病気に対して、中枢神経系へのアプローチは達成されていない。今後の問題として残される。

## はじめに

現在、遺伝代謝病と定義されている疾患群は、単一遺伝子の構造変化によって生じた全身病である。そして、この変異遺伝子の異常な情報をもとに、細胞内で合成された変異蛋白質が正常に働かないことが複雑な病態のすべての始まりである。つまり、本来働くべき蛋白質が存在しないということである。そこで代わりに、正常な働きを持つ蛋白質を生体外から補給しようという発想が生まれ、いくつかの病気に試みられてきた。ただし、そのためには一定の条件がある。本来体内に存在すべき蛋白質は、細胞が自分で作り上げ、目的に応じて必要なコンパートメントに運び、機能を発現させている。ところが、正常の蛋白質といっても、細胞外から投与する場合、いわば異物として取り込まれ、必ずしも機能の発現を期待することはできない。

## 酵素補充療法が成立するための 必要条件

酵素補充療法が成立するためには、以下の条件を満たす必要がある。すべての酵素欠損症に漫然と蛋白質を投与しても効果は期待できない。

- ①正常蛋白質の大量合成：ヒト個体の治療に用いるためには、大量の蛋白質精製・供給が必要である。しかも、特に生物製剤としてウイルスや毒性化合物など不純物が微量でも存在することは許されない。わが国でも一部の製剤に混在したウイルスや微量金属と特定の疾患発生との関係が大きく取り上げられたこともあり、供給者はこの点に特に厳重な管理体制を整えている。
- ②蛋白質の投与：蛋白質を経口投与すれば、腸管で分解され本来の機能を失うので、原則として静脈内注入が必要である。投与された蛋白質はそ

### Key words

- 酵素補充療法
- ゴーシェ病
- ファブリー病
- ライソゾーム病

のまま血液中に長時間とどまっているわけではない。速やかに処理される。

③標的臓器へのターゲティング：投与した蛋白質は、できるだけ多く特定の標的臓器に到達するような工夫がなされねばならない。疾患によりその標的が異なるため、製剤も目的に合わせた分子修飾が必要である。つまり、細胞の取り込み効率を可能な限り上げることである。

④細胞内での安定な活性発現：異物として取り込まれた蛋白質は、細胞内で安定に存在し、しかも本来活性を発現するコンパートメントに運ばれ、活性を発現しなければならない。酵素の場合、基質との出会いの場が必要である。

このような条件を満たすのがライソゾーム病である。ライソゾーム酵素を細胞外から投与すると、異物として認識され、そのままライソゾーム、つまりこの酵素が本来働く場所に運ばれ、酸性の条件で安定に活性を発現することが期待されるからである<sup>1)</sup>。したがって、酵素補充療法はライソゾーム病を対象とする治療法として理解される。ただし、血友病など血漿蛋白質の欠損症に対する蛋白質補充療法は、臨床医学で広範に実用化されていることは周知のとおりであるが、酵素補充療法とは別のコンセプトのアプローチであることを付け加えておく。

## ライソゾーム病に対する 酵素補充療法

1970年代から、血漿や白血球の注入、臓器移植などの方法により、正常酵素を患者体内に供給しようとする試みが行われたが、広く実用化されるには至らなかった。その後 Brady らは、酵素をヒト胎盤から精製して患者に供給する試みを始めた。まずゴーシェ (Gaucher) 病 ( $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症) が対象となり、すでに世界各国で広く治療に使われるようになった。わが国では現在、オーファンドラッグとして実用化されている。

以後いくつかの病気について順次開発が進められ、臨床治験に進んでいる製剤が多い。わが国では、ファブリー (Fabry) 病 ( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A 欠損症) の治験も終了し、治療薬として採用された。このほかに、国外ではいくつかのムコ多糖症 (ハーラー (Hurler) 病:  $\alpha$ -イズロニダーゼ欠損症, ハンター (Hunter) 病: イズロン酸スルファターゼ欠損症, マロトー・ラミー (Maroteaux-Lamy) 病: アリルスルファターゼ B 欠損症), ポンペ (Pompe) 病 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損症) などの治験が行われているが、わが国ではこの段階に至っていない。

## ゴーシェ病の酵素補充療法

### 1. 酵素製剤の開発

1974年 Brady らは、ヒト胎盤から精製したグルコセレブロシダーゼ ( $\beta$ -グルコシダーゼ) を成人型ゴーシェ病症例に投与し、肝臓のグルコセレブロシド蓄積の減少、血液中の脂質の消失が長時間続くことを報告した<sup>2)</sup>。以後多数の患者に対する治療実験を行い、ある程度の効果を認めたと、実際に大量に蓄積しているマクロファージには到達しないことがわかった<sup>3)</sup>。そこで、マクロファージへのターゲティングのためにこの酵素の糖鎖を改変し、末端がマクロファージに親和性のあるマンノースを露出した分子として成人型ゴーシェ病患者に投与したところ、著しい臨床効果のあることが確認された<sup>4)</sup>。当初はヒト胎盤から精製した酵素製剤 (セレデース®; Genzyme) が用いられたが、その後遺伝子組み換え製品が開発され、広く用いられている (セレザイム®; Genzyme)。第1の酵素製剤は病原微生物の混入の可能性を完全に否定できないため、現在は市販されておらず、実際には遺伝子組み換え製剤が治療薬として用いられている。

### 2. 臨床効果

胎盤製剤と遺伝子組み換え製剤に効果の差はない<sup>6)7)</sup>。臨床効果は貧血、血小板減少などの血液学的所見、臓器腫大 (肝脾腫)、骨症状などの改善であ



る。

ゴーシェ病は中枢神経障害を伴わない非神経型と、中枢神経障害を伴う急性神経型、亜急性神経型の3病型に大きく分類される。酵素蛋白質は血液脳関門を通過せず、酵素補充療法により中枢神経系の症状を改善することは期待できないので、当初は非神経型症例に適応が限られていたが、2つの神経型症例でも全身状態が改善されるので、現在使用されているセレザイムについては、すべての病型のゴーシェ病に適応が拡大された。

### 3. 治療方法・成績

①初期治療：体重 kg あたり 60 単位セレザイムを隔週 1 回、6~12 ヶ月間静脈内投与。肝脾腫・血液所見の改善、血清アンジオテンシン変換酵素(ACE)・酸ホスファターゼ(ACP)活性の低下を指標とする。

②維持療法：体重 kg あたり 15~30 単位セレザイムを各週 1 回、維持投与。最小有効量は 15 単位。

上記の臨床所見を指標として、投与量を増減する。

この治療基準をもとに、わが国では 6 例の非神経型症例の治療を行った<sup>9)</sup>。すべて肝脾腫があったが、2 例は酵素治療前に脾摘手術を受けていた。すべての症例について上記の初期治療により著しい効果がみられた。身長体重増加が正常化し、骨密度の改善もあり、生活の質の著しい改善のみられた症例があった一方、著しい肝脾腫の存在のため食欲不振、骨病変が進行し、成長が改善されない症例もあった。早期治

療が重要であるとの結論が得られた。

### 4. 副作用

皮膚掻痒感、蕁麻疹、嘔吐・下痢、脱力・発熱・疲労感などの全身症状などもあったが、重篤な身体症状はなかった。特に抗体出現には十分な注意が必要である。

## ファブリー病の酵素補充療法

### 1. 酵素製剤の開発

ゴーシェ病の場合と同様、ヒト胎盤その他の組織体液から精製した  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の投与が試みられた。胎盤由来の酵素治療により、血中セラミドトリヘキソシドの現象が確認された<sup>9)</sup>。しかし、血漿と脾臓由来の酵素製剤のクリアランスが異なることがわかった<sup>10)</sup>。そして、その理由が酵素製剤の糖鎖構造の違いにあることが明らかになった。以後、組み換え遺伝子による酵素大量発現系を用いた大量生産法が確立され、2つの企業が並行して製剤開発を進め(Brady RO: TKT, Desnick RJ: Genzyme)、それぞれ独自に効果を報告した。

### 2. 臨床効果

Schiffmann ら<sup>11)</sup>は、糖鎖末端にマンノースリン酸を持つ酵素製剤リプラガル® (agalsidase alpha; TKT) をファブリー病患者 10 例に 1 回投与し、肝臓と尿沈渣の蓄積脂質がそれぞれ平均 31%、38%減少したことを報告し

た。さらに、26 例の患者に二重盲検試験を行った<sup>12)</sup>。酵素製剤 0.2 mg/kg を隔週 12 回投与したところ、投与群では対照群と比較して腎メサンギウム増生が減少し、正常な糸球体数が増加した。臨床的にはクレアチニクリアランスの低下が起こらず、血液・尿・腎組織の脂質蓄積が減少した。治療経過中、疼痛スコアが減少し、臨床的改善がみられた。対照群にはこれらの変化がみられなかった。過半数の症例に注射後悪寒が発生したが、抗ヒスタミン薬とステロイド薬の投与により軽快した。少数例に酵素に対する IgG 抗体が出現したが、臨床効果や副反応との相関はなかった。このグループはヒト上皮細胞に酵素蛋白質を発現させ、精製した製剤を使った。

他方 Eng ら<sup>13)</sup>は、CHO 細胞に発現させた酵素製剤ファブラザイム® (agalsidase beta; Genzyme) を 29 例のファブリー病患者に投与し、非投与群と比較した。1 mg/kg の酵素製剤隔週投与 20 週後、20 例(69%)で腎毛細血管内皮細胞への脂質蓄積が消失していた。皮膚や心臓への脂質蓄積も減少していた。非投与群には脂質消失例はなかった。血漿中酵素レベルと脂質蓄積とは明確な相関があった。この対照実験終了後、対象群には同量を隔週投与し、6 ヶ月間、臨床効果を観察した。同様に、腎・皮膚の毛細血管脂質蓄積が消失した。この投与量でファブリー病の腎不全や心不全が予防できるという結論が得られた。疼痛については投与群と非投与群との間に差がみられなかったが、これは治療実験中も鎮

表1 わが国における臨床治験成績

検査評価法	組織・体液	変化率
組織病変スコア	腎	1.0 → 0
	皮膚	2.0 → 0
	腎	51.9%
蓄積脂質免疫測定(ELISA)	尿	55.4%
	血漿	100%
クレアチニンクリアランス		有意差なし
QOL	疼痛スコア	有意差なし
	全体的健康感	有意差なし
	精神的健康度	有意差なし

ファブリー病男性患者 13 例、平均年齢 26.6 歳。ファブラザイム 1 mg/kg を隔週静注、20 週間(合計 11 回投与)。投与前と投与後の検査データを比較した。

(文献 14 より改変して引用)

痛剤の使用を継続したためと考えられた。副反応として悪寒、発熱、頭痛のみられた症例があった。また、酵素製剤に対する IgG 抗体が検出された症例があったが、臨床効果に影響はなかった。

わが国における臨床治験成績<sup>14)</sup>を表 1 にまとめた。この治験の対象は腎不全、心不全などのある重症例は除いてあり、全般的に検査所見に大きな異常のない症例であるため、著しい変化はみられなかったが、蓄積脂質および病理組織学的変化の改善は確認された。

### 3. 投与方法・副反応

上述のように、2つの製剤の投与量は異なる。リプラガルは1回 0.2 mg/kg、ファブラザイムは1回 1 mg/kg の投与であり、隔週、継続投与する。わが国ではファブラザイムが薬価収載され、診療に用いられている。悪寒、発熱、頭痛などの副反応があるが、静

注速度の調整や抗ヒスタミン薬などの投薬により、これまでのところ重大な問題は起こっていない。

## ムコ多糖症の酵素補充療法

### 1. ムコ多糖症 1 型(ハーラー病)

デルマタン硫酸とヘパラン硫酸の蓄積による全身組織の変形・異常増殖のために、骨関節系、皮膚粘膜、心臓などの形態機能異常、中枢神経障害の起こる病気である。欧米では CHO 細胞に発現させた  $\alpha$ -L-イズロニダーゼ酵素製剤(ラロニダーゼ; Laronidase) が認可されているが、わが国ではまだ使用許可が得られていない。治療により関節可動域、心不全の改善がみられた<sup>15)</sup>。発熱、頭痛、血管運動反応(顔面紅潮、欠陥性浮腫)などがみられたが、投薬を中止するほどの重篤な例は

なかった。

### 2. ムコ多糖症 2 型(ハンター病)

やはりデルマタン硫酸とヘパラン硫酸の蓄積症であるが、ハーラー病に比べて臨床徴候は軽症である。X 染色体に責任遺伝子があり、原則として男児に発症する。ヒト線維芽細胞に発現させたイズロン酸スルファターゼ<sup>16)</sup>を用いた治験が欧米で開始されている。効果や副反応についての結果は公表されていない。

### 3. ムコ多糖症 6 型(マロトー・ラミー病)

デルマタン硫酸の蓄積症である。骨関節系の症状が中心で、中枢神経障害は起こらない。CHO 細胞に発現させた N-アセチルガラクトサミン 4-スルファターゼ(アリスルファターゼ B) の酵素製剤が試みられている<sup>17)</sup>。尿中ムコ多糖排泄が減少し、関節拘縮が改善されたとのことであるが、詳細は公表されていない。

## ポンペ病に対する酵素補充療法

ポンペ病は、グリコーゲン蓄積症の中で唯一、ライソゾームの加水分解酵素である  $\alpha$ -グルコシダーゼの欠損により、骨格筋、心筋にグリコーゲンが蓄積する疾患である。大部分は乳児期に発症する重症例であるが、学童期以後に進行性筋疾患として発症することがある。中枢神経障害はない。製剤は酵素を発現する CHO 細胞<sup>18)</sup>またはト

ランスジェニックウサギ乳汁<sup>19)20)</sup>から精製された。治験の詳細は公表されていないが、有効例では骨格筋グリコーゲンの減少、心肥大の改善、運動機能の改善などが認められた。わが国では治験は行われていない。

## 今後の課題

### 1. 投与方法・投与量

これまでに数種の疾患についての基礎的臨床的な治療実験が行われているが、製剤により投与量が異なること、そして病型・症例により効果に差があることを考慮せねばならない。一般にライソゾーム病は乳児期の重症型の症例数が多いが、同じ遺伝子変異の異なった表現型に対して、個別的な治療計画の設定が必要になるであろう。これまでのところ論理的な治療基準はなく、経験的な結果をもとに一応の投与量、投与方法が示されているのみである。

酵素製剤により、標的組織・臓器への親和性に違いがあることは当然であり、最初の2つの疾患、ゴーシェ病とファブリー病のように、酵素蛋白質の糖側鎖の修飾によって細胞への取り込み効率が著しく増大することがわかったが、他の因子の可能性も考慮しながら酵素製剤の改善を図ることが必要である。

それぞれの酵素製剤を供給するには莫大な費用がかかり、したがって治療費がきわめて大きいのが現状である。この点も近い将来、何か技術的な改革

を迫られるであろう。

### 2. 副反応

蛋白質製剤の静注という限られた投与方法に頼るこの治療法は、当然、即時の副反応が発生する可能性を常に考慮し、対応しなければならない。幸い、これまでのところ、きわめて重篤な反応は避けられてきたようであるが、生物製剤である以上、夾雑物を完全に除去することはきわめて困難である。この点は酵素補充療法のひとつの限界であるが、それでも多くの患者症例への治療経験をもとに、さらに十分な対応法を確立する努力をすべきである。

### 3. 標的組織への酵素取り込み

標的組織の異なるいくつかの酵素製剤は分子修飾がなされ、特定の臓器に対しては治療効果がみられるようになったが、中枢神経系のほか、骨組織、肺組織への導入効率が高くない。ライソゾーム病の大部分は乳児期の脳の病気である。高分子の蛋白質製剤を、血液脳関門を通過して神経細胞に運ぶためには、今後特別の輸送システムの開発が必要になるであろう。現在、比較的低分子の物質については、リポゾームを使ったターゲティングが実験的に試みられているが、実際に臨床レベルで使われるには多くの問題があるし、まして高分子化合物をこのシステムでうまく神経細胞まで運ぶことができるかどうか、予測は困難である。

この大きな課題を克服した段階で、酵素補充療法は大きく飛躍し、真にライソゾーム病の臨床治療薬として一般

化されるようになるであろう。

## おわりに

本特集のメインテーマは「神経疾患の先端的治療」である。酵素補充療法が真にこの目的のために有効に使われているかどうかは、現在の段階では疑問である。かろうじてライソゾーム病における筋疾患に対する治療の可能性は示されているが、本来のターゲットである中枢神経系についてはこれからの課題として残されることを強調しておきたい。われわれは最近、この方向とは全く違った、中枢神経系を直接の標識臓器とした新しい治療の可能性を探っている(ケミカルシャペロン療法)<sup>21)22)</sup>。このような異なる立場からの治療法の開発が望まれる。

### ●文献

- 1) Tager JM, Hoooghwinkel GJM, Daems WT (ed): Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases. North-Holland, Amsterdam, 1974
- 2) Brady RO, Pentchev PG, Gal A et al: N Engl J Med 291: 989-993, 1974
- 3) Furbish FS, Blair HE, Shiloach J et al: Proc Natl Acad Sci USA 74: 3560-3563, 1977
- 4) Burton NW, Furbish FS, Murray GJ et al: Proc Natl Acad Sci USA 87: 1913-1916, 1990
- 5) Eng CM, Guffon N, Wilcox WR et al: N Engl J Med 345: 9-16, 2001
- 6) 北川照男, 大和田 操, 多田啓也ほか: 小児科臨床 47: 157-180, 1994
- 7) 北川照男, 大和田 操, 衛藤義勝ほか: 小児科臨床 50: 1927-1946, 1997
- 8) 北川照男, 大和田 操, 成沢邦明ほか: 小児科臨床 51: 1859-1887, 1998

- 9) Brady RO, Tallman JF, Johnson WG et al : N Engl J Med 289 : 9-14, 1973
- 10) Desnick RO, Dean KJ, Grabowski G et al : Proc Natl Acad Sci USA 76 : 326-330, 1979
- 11) Schiffmann R, Treco D, Daniel P et al : Proc Natl Acad Sci USA 97 : 365-370, 2000
- 12) Schiffmann R, Köpp JB, Austin HA III et al : JAMA 263 : 2743-2749, 2001
- 13) Eng CM, Guffon N, Wilcox WR et al : Am J Hum Genet 68 : 711-722, 2001
- 14) 衛藤義勝, 大橋十也, 宇都宮保典ほか : 小児科診療 66 : 1435-1444, 2003
- 15) Wrath JE, Clarke LA, Beck M et al : J Pediatr 144 : 581-588, 2004
- 16) Muenzer J, Lamsa JC, Garcia A et al : Acta Paediatr, Suppl 439 : 98-99, 2002
- 17) Harmatz P, Whitley CB, Waber L et al : J Pediatr 144 : 574-580, 2004
- 18) Baben N, Danon M, Gilbert AL et al : Molec Genet Metabolism 80 : 159-169, 2003
- 19) Van den Hout JMP, Kamphoven JHJ, Winkel LPF et al : Pediatrics 113 : e 448-e 456, 2004
- 20) Klinge L, Straub V, Neuforf U et al : Neuromuscul Disord 15 : 24-31, 2005
- 21) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A et al : Proc Natl Acad Sci USA 100 : 15912-15917, 2003
- 22) 鈴木義之 : 小児科 45 : 2313-2320, 2004