

D. 考察

NOV によって活性が上昇する変異は F213I だけでなく、N188S があることを明らかにした。

ゴーシェ病の治療法として、酵素補充療法が行われている。II 型や III 型ゴーシェ病の中枢神経障害に対しては有効ではない。F213I 変異は III 型の臨床症状の原因遺伝子変異であり中枢神経症状を示す。また、N188S 変異を持つ患者は若年性進行性ミオクローヌスを示す特異な神経症状を示す (表 2)。NOV を含めたグルコース類似体は低分子で、血液脳関門を通過できると考えており、F213I および N188S を持つ患者に有効な治療法とできる可能性がある。今後、さらに有効な患者変異を確認するとともに動物モデルを用いた NOV の治療効果の判定を行う必要がある。

E. 結論

N-octyl-valienamine (NOV) は III 型ゴーシ

ェ病の原因変異の 1 つである F213I 変異だけでなく、若年性神経性ミオクローヌスを示す N188S を持つ β グルコシダーゼを安定化・活性化することを見いだし、ゴーシェ病の中枢神経障害に対する新しい治療薬となることを動物モデルを用いて証明していく。

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

雷 珂、侯 琳、井上岳彦、大野耕策 ゴーシェ病の分子シャペロン療法 第 47 回日本小児神経学会総会、2005 年 5 月 19 - 21 日、熊本

H. 知的所有権の取得状況 なし

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

クラッペ病に対するシャペロン療法の検討

分担研究者 鈴木義之 国際医療福祉大学教授
研究協力者 岩崎博之 国際医療福祉大学講師
田部美穂 (株)エスアールエル

研究要旨

クラッペ病患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体NOEVの活性還元効果スクリーニングを行った。試験管内実験ではNOEVのガラクトシルセラミダーゼに対する阻害効果は、 β -ガラクトシダーゼに対する阻害効果の3-4倍だが、NOEVを培養液中に加えることによる線維芽細胞内の酵素活性上昇効果は認められなかった。

A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病に対する内服薬による新しい分子治療法を確立することを目的に、本研究で β -ガラクトシダーゼ欠損症(β -ガラクトシドーシス)患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体の活性還元効果スクリーニングを行い、約3割の例で活性上昇を認めた。今年度はガラクトシルセラミダーゼ欠損症であるクラッペ病への効果について検討した。

B. 研究方法

まず正常細胞の酵素抽出液を用い、新しく有機合成により得られた化合物N-octyl-4epi- β -valienamine(以下NOEV)のガラクトシルセラミダーゼに対する阻害活性を試験管内で測定した。つぎに正常細胞および国内外から提供いただいた10例のクラッペ病患者由来の線維芽細胞の培養液に4日間、0.2-6 μ MのNOEVを添加し、また、ガラクトシルセラミダーゼの活性

化タンパクであるサポシンAを培養液に追加して酵素活性を測定、NOEVの酵素活性還元効果とサポシンAの影響を評価した。酵素活性測定には基質として6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside(HMU-Gal)を用いた。

C. 研究結果

試験管内実験では、NOEVの β -ガラクトシダーゼに対するIC50は0.125Mであるのに対して、ガラクトシルセラミダーゼに対するIC50は0.05Mであった。10例のクラッペ病患者由来線維芽細胞に対して、培養液中に4日間、0.2-6 μ MのNOEVを添加したが、酵素活性の上昇を示した症例はなかった。さらに2-2000nMのサポシンAを培養液に追加したが、活性還元効果は認められなかった。

D. 考察

NOEVのガラクトシルセラミダーゼに対するの

阻害効果は、 β -ガラクトシダーゼに対する阻害効果の3-4倍だが、NOEVを培養液中に加えることによる線維芽細胞内での酵素活性上昇効果は認められなかった。クラッペ病は測定基質によって活性が変わる変異があることが知られており、今後サイコシンを用いた酵素活性測定を行い、同時に細胞実験に用いた細胞株の変異解析を行っていく予定である。

E. 結論

クラッペ病患者由来の線維芽細胞に対してNOEVの酵素活性還元効果は認めなかった。今後クラッペ病に対するシャペロン治療について、さらに新しい試みが必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 鈴木義之：薬物療法（遺伝病に対する新しい治療法）。小児科の新しい流れ：先端医療シリーズ34, pp104-108, 2005.
2. 鈴木義之：ライソゾーム病の酵素補充療法。Brain Medical 17: 253-258, 2005
3. 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.
4. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. J Inherit Metab Dis, in press, 2006.
5. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy

in β -galactosidosis. Brain Dev, in press, 2006.

学会発表

1. Suzuki Y: Child Neurology: Many patients and many diseases. What next? 3rd International Conference on Child Neurology of Central Asian Countries. Almaty, Kazakhstan, 2005.6.2-3.
2. Suzuki Y: β -Galactosidase Deficiency: An Approach to Chaperone Therapy. 42nd Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Paris, September 6-9, 2005
3. Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M: A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. European Paediatric Neurology Society Congress 2005, Goteborg, Sweden, September 14-17, 2005.
4. 鈴木義之：ケミカルシャペロン療法：遺伝性ライソゾーム病に対する新しい分子治療。第50回人類遺伝学会大会，倉敷市，2005.9.19-22.
5. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling in G_{M1} -gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会，神戸，2005.10.19-22.
6. Suzuki Y: New Therapies for Neurogenetic Disorders. XVIII World Congress of Neurology, Sydney, Australia, November 5-11, 2005.
7. 一ノ宮悟史，渡辺浩史，松田潤一郎，丸山貴美子，戸田寛子，岩崎裕之，黒澤美枝子，飯田真己，小川誠一郎，鈴木義之：遺伝子組換え G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評

価. 第 48 回日本先天代謝異常学会、熊本市, 2005. 11. 16-18.

8. 大橋英美子、檜垣克己、山本浩一、高村歩美、飯田真己、小川誠一郎、岩崎博之、鈴木義之、難波栄二: ヒト G_{MI} -ガングリオシドーシス遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法. 第 48 回日本先天代謝異常学会、熊本市, 2005. 11. 16-18.
9. 鈴木義之, 渡辺浩, 岩崎博之, 一ノ宮悟史、丸山貴美子, 戸田寛子, 黒澤美枝子, 松田潤一郎, 飯田真己: G_{MI} -ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発. 第 22 回日本疾患モデル学会, 伊香保町, 2005. 11. 24-25.
10. 高村歩美、檜垣克己、山本浩一、飯田真己、岩崎博之、鈴木義之、難波栄二: マウスモデル細胞を用いた G_{MI} -ガングリオシドーシスの解析. 第 11 回ライソゾーム病研究会, 東京, 2005. 12. 2.
11. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered G_{MI} gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol, 2006. 1. 18-20.

H. 知的財産権の出願・登録
なし

平成 17 年度 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」

分担研究報告書

ニーマンピック病に関する臨床的・分子遺伝学的解析

分担研究者 高田五郎 秋田大学医学部小児科

研究要旨

急速に臨床症状の進行したニーマンピック病 C 型（NPC）2 名の病因解析を行ない 3 つの新規 NPC1 遺伝子異常を同定した（①c.3615delA、②c.2000C<T、③c.2240delT）。2 つの遺伝子異常（①c.3615delA、②c.2000C<T）は安定蛋白発現の低下、1 つの遺伝子異常（③c.2240delT）は mRNA 発現レベルの低下を引起していた。NPC 細胞はコレステロール細胞内蓄積を特徴とする。3 つのコレステロール細胞内蓄積細胞（・症例 1（c.3615delA / c.3615delA）、・症例 2（c.2240delT / c.2000C<T）、・プロゲステロンと LDL コレステロールを添加した正常細胞）では酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）の低下（60~70%）が観察され、コレステロール依存性 ASM 活性調節機構の存在を示唆する。この細胞の ASM の免疫化学染色を行ったが LysoTracker 陽性のライソゾームと局在が一致しており、コレステロール蓄積により ASM 蛋白の局在変化は観察されなかった。コレステロール蓄積による酵素分子レベルの調節機構の存在を示唆した。

A. 研究目的

ニーマンピック病 A・B 型はライソゾーム酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）の異常により、ニーマンピック病 C 型（NPC）は後期エンドゾームのコレステロール輸送調節蛋白 NPC1 の異常により引起される。両者は似た臨床表現型を示し著明な肝脾腫を主症状とし種々の神経症状を伴う。組織学的には各臓器にみられるニーマンピック細胞（泡沫細胞）の浸潤が特徴である。細胞レベルではスフィンゴミエリンと遊離コレステロール両者の蓄積が特徴である。NPC では ASM 遺伝子に異常がないにもかかわらず ASM 活性が低下することが知られている。NPC 細胞の表現形の 1 つである細胞内遊離コレステロール蓄積は、正常細胞にプロゲステロンを用いることで 2 次的に引起することが

可能である。この場合も ASM 活性の低下が起こる。このことはコレステロール依存性 ASM 活性調節機構の存在を示唆する。

2 名の日本人 NPC 患者の病因に関し分子レベルで解明した。その培養皮膚線維芽細胞を用いて NPC 細胞に見られる ASM 活性低下の機序に関して分子レベルで解析・検討した。

B. 研究方法

症例 1 は 34 週、1860g で出生。乳児期に肝脾腫と肝機能異常を指摘され、1 才 2 ヶ月上肢の振戦、1 才 7 ヶ月失調歩行出現。2 才時の精査で骨髄中ニーマンピック細胞、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性 70~80% より NPC と診断された。神経症状進行し 4 才 6 ヶ月で死亡。

症例 2 は 33 週、1470g で出生。乳児期に肝

脾腫を指摘され、1才で運動発達の遅れで発症。2才で骨髄中ニーマンピック細胞と酸性スフィンゴミエリナーゼ活性70~80%のためNPCの診断となった。神経症状の進行のため3才で死亡。

以上2名の患者のご家族より同意を得て培養皮膚線維芽細胞を樹立し以下の検討を行った。

C. 研究結果

遺伝子解析

患者および家族の同意の得、末梢血白血球よりDNAを抽出した。また患者培養皮膚線維芽細胞よりRNAを抽出した。DNAにおいては全てのエクソンおよびイントロン・エクソン境界、RNAでは全長cDNAをPCR法にて増幅して塩基配列を決定した。

[症例1] c.3615delA/c.3615delA をゲノムとRNA両方で認め両親はそれぞれヘテロであった。

[症例2] c.2240delT/c.2000C<T をゲノムに認めた。両親はそれぞれをヘテロで有していた。しかしRNAではc.2240delTを認めず、またc.2000C<Tに対する正常アレルは認められなかった。このことはc.2240delTを有するmRNAがRT-PCRでは検出できないことを示している。c.2240delTは748Xとなるが、この遺伝子異常はmRNAの不安定性、すなわちnonsense-mediated decay pathwayを引起すと考えられる。

発現実験による機能解析

症例1：①c.3615delA

症例2：②c.2000C<T、③c.2240delT

③はnonsense-mediated decay pathwayによりmRNA発現レベルでの異常を起こす遺伝子

異常と考えられた。①と②に関してミュータントNPC1cDNAを作成しCOS-1細胞に一過性発現させウエスタン・ブロットを用いて解析した。正常NPC1cDNAが170~190kDaのバンドを示したのに対して①c.3615delA、②c.2000C<Tではバンドを認めなかった。このことは2つのミュータントを有する蛋白の不安定性を示していた。

コレステロール蓄積細胞のASM活性

・症例1 (c.3615delA / c.3615delA) と・症例2 (c.2240delT / c.2000C<T) の培養皮膚線維芽細胞、・プロゲステロンとLDLコレステロールを添加した正常細胞、以上3種類の細胞に対して遊離コレステロールを検出するフィリピン染色を行った。その結果、3種類の細胞ともにコレステロールの蓄積が著明だった。細胞・、・に関してASM活性を測定し正常細胞と比較した。正常細胞 13.79 ± 0.30 nmol/mg/hr に対して・ 9.42 ± 0.25 nmol/mg/hr (68.3% vs. normal cells, $p=0.0001$)、・ 8.46 ± 0.45 nmol/mg/hr (61.3% vs. normal cells, $p<0.0001$) と有意のASM活性の低下が示された。

コレステロール蓄積細胞のASM免疫染色

コレステロール細胞内蓄積とASMの細胞内局在に関して検討するため正常細胞と・、・、・細胞に関してASMの免疫染色とLysoTrackerを用いたライソゾーム染色を行った。その結果、3種の細胞ともにASMの免疫反応性とLysoTracker陽性のライソゾームの局在は一致した。コレステロール細胞内蓄積によりASM酵素の細胞内局在の変化は認められなかった。

D. 考察

2名の NPC の患者より3つの新規 NPC1 遺伝子異常を同定した。①c.3615delA、②c.2000C<T はウェスタン・プロットの結果より蛋白レベルでの不安定性を引起していた。

③c.2240delT は mRNA 発現レベルでの異常を起こしていた。以上の結果は2名の NPC 患者の重症臨床型と一致した。

NPC 細胞では細胞内コレステロール蓄積がみられる。正常細胞のプロゲステロンと LDL コレステロールを添加するとやはり二次的に細胞内コレステロール蓄積が見られる。これらの細胞では ASM 活性が 50~80%低下することが知られている。このことはコレステロール依存性の ASM 活性調節機構の存在を示唆する。過去の研究よりこの調節に ASM mRNA レベルおよび ASM 蛋白レベルでの変化は観察されていない (Vanier MT, et al. *BBA*, 1991 ; Reagan, et al. *J Biol Chem*, 2000)。我々は細胞内コレステロール蓄積を示す3種の細胞 (・、・、・) において ASM 活性低下が見られることを示した。この細胞を用いて ASM 蛋白の細胞内局在に関して調べた。その結果、3種の細胞で ASM 蛋白の局在はライソゾームにあり、積極的な局在変化は観察されなかった。

最近、ASM 酵素はセラミドを介した細胞内情報伝達に関与していることが明らかとなっている。細胞外ストレス刺激で ASM が活性化されスフィンゴミエリン→セラミド代謝が進行し細胞内応答が起こる。このとき ASM 蛋白は細胞内でライソゾームから局在を変化させ細胞膜中スフィンゴミエリン基質に反応することが示されている。しかしコレステロール依存性の ASM 活性調節にこのような細胞内局在を変化させる機序の存在は観察されな

かった。このことはこの ASM 活性変化が蛋白分子レベル、たとえば蓄積脂質の蛋白分子に対するネガティブ・アロステリック制御などのために起こっている可能性を示唆している。

E. 結論

NPC を引起す3つの新規遺伝子異常に関して分子病態の解析を行なった。コレステロール依存性 ASM 活性調節機構に ASM 蛋白の細胞内局在変化は関与しないと思われた。

F. 研究発表

Tamura H, Takahashi T, Ban N, Torisu H, Ninomiya H, Takada G, Inagaki N. Niemann-Pick Type C: Novel *NPC1* mutations and characterization of the concomitant acid sphingomyelinase deficiency. *Mol Genet Metab*, 87, 113-121,2006.

Takahashi I, Takahashi T, Mikami T, Komatsu M, Ohura T, Schuchman EH, Takada G. Acid sphingomyelinase: Relation of ⁹³Lys residue on the ratio of intracellular to secreted enzyme activity. *Tohoku J Exp Med*, 206, 333-340, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

ファブリー病患者の酵素補充療法前・経過中の 血液中サイトカインと一酸化窒素の推移

分担研究者 芳野 信 (久留米大学医学部小児科学講座・教授)

研究協力者 渡辺順子 (久留米大学医学部小児科学講座)、井田博幸、田嶋朝子、小林正久、
大橋十也、衛藤義勝 (東京慈恵会医科大学小児科学講座)

研究要旨

ファブリー病における血管病変の機序にサイトカインを介した一酸化窒素の産生調節機構の異常の関与を検討する目的で患者血液中の各種サイトカイン、一酸化窒素代謝産物、その基質アルギニン濃度を測定した。またそれらが酵素補充療法の経過とともにどのように推移するかを検討した。その結果、VEGF、TGF- β 、PDGF-AB の上昇を認め、一酸化窒素代謝産物の濃度は約半数で対照値を超えていたが、アルギニン濃度、VEGF、TGF- β 、PDGF-AB 濃度のいずれとも有意の相関を示さなかった。このことからファブリー病患者では一酸化窒素産生調節機構が破綻しているか、またはこれらのサイトカインは一酸化窒素産生調節因子としては主要な機能を果たしていないと考えられた。また酵素補充療法の経過とともに、VEGF、TGF- β 、PDGF-AB は上昇傾向をみとめたが、一酸化窒素代謝産物の濃度は一定の傾向を示さなかった。

A. 研究目的

[背景] ゴーシェ病などではマクロファージの活性化によるサイトカインの増加が病態に関係していることが知られているがファブリー病でのサイトカインの動態は過去には報告がない。ファブリー病では血管病変が病態の主体である。一部のサイトカインは一酸化窒素産生調節を介して血管中膜平滑筋のトーン調節に関与するといわれている。

[目的] ファブリー病 (FD) 患者で血液中サイトカインの変化があるか、血液中一酸化窒素代謝産物 (NOx) 濃度と相関があるか、また NOx 濃度とその基質アルギニン(Arg) 濃度相関があるか、これらの変動があるとするれば、酵素 (アガルシダーゼベータ) 補充療法 (ERT) の経過中にどのように推移するかを明らかにすること。

B. 研究方法

対象は 11 名の FD 男性患者 (年齢 16 歳～

61 歳、血清クレアチニン濃度 1.5 mg/dl 未満 6 名、以上 5 名)、うち 4 名は ERT 開始前から経時的に経過を追えたが、他の 8 名は既に ERT を受けている。サイトカインは ELISA 法、一酸化窒素代謝産物 (NOx) は HPLC、Arg 濃度はアミノ酸分析機で定量した。

倫理面への配慮 本研究のプロトコールは久留米大学医療倫理委員会の承認を得た。採血は事前に個別の患者またはその代諾者からインフォームドコンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

1. 測定したサイトカイン中、M-CSF が 3 例、sCD14 が 7 例、VEGF が 2 例、TGF- β が 10 例で、PDGF-AB が 4 例で上昇を認めた。
2. 上記のうち VEGF、TGF- β 、PDGF-AB は相互に有意の正の相関を認めた。
3. NOx の濃度は 5 例で対照値を超えていたが、その前駆物質 Arg の濃度とは相関は

認めなかった。

4. さらに、NO_xの濃度は VEGF、TGF-β、PDGF-AB のいずれの濃度とも有意の相関を示さなかった。
5. ERT の経過に沿って経時的に観察できた 4 例（観察期間：3 例は 6 ヶ月、1 例は 12 ヶ月）では VEGF、TGF-β、PDGF-AB 濃度は経過とともに上昇傾向を認めたが、NO_x 濃度は一定の傾向を示さなかった。

D. 考察

以上から、FD では a. 軽度ながらマクロファージが活性化されること、b. 血管関連のサイトカイン（VEGF、TGF-β、PDGF-AB）の上昇が見られることが分かった。さらにこれら 3 種のサイトカインは協調的調節を受けていると推測された。また Arg による NO_x 産生調節が破綻していることが推測された。さらに NO_x 濃度は VEGF、TGF-β、PDGF-AB 濃度とは相関を示さず、また ERT の経過中も独立的に推移したことから、その産生に上記サイトカイン以外の要因の関与が伺われた。今後、それらの要因の解析が必要と考えられた。

E. 結論

FD 患者では血液中の VEGF、TGF-β、PDGF-AB の上昇を認め、一酸化窒素代謝産物の濃度は約半数で対照値を超えていたが、アルギニン濃度、VEGF、TGF-β、PDGF-AB 濃度のいずれとも有意の相関を示さなかった。このことから FD 患者では一酸化窒素産生調節機構が破綻しているか、またはこれらのサイトカインは一酸化窒素産生調節因子としては主要な機能を果たしていないと考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

芳野 信：ライソゾーム病患者における血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、厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）平成 16 年度総括研究報告書 52-56.

2. 学会発表

芳野 信：Plasma Cytokines and nitric oxide in patients with Fabry's disease off and on enzyme replacement therapy 平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2005.12.1（東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

分担研究者

松田純子

東海大学・未来科学技術共同研究センター

助教授

研究要旨

スフィンゴリピドーシスの新たな疾患モデルマウス（サポシンAノックアウトマウス、サポシンDノックアウトマウス）を作成し、その脳病態を解析した。

スフィンゴ脂質活性化たんぱく質（サポシンA、B、C、D）は共通の前駆体であるプロサポシンから誘導される相同性の糖たんぱく質で、多くの疎水性スフィンゴ脂質のライソゾームにおける分解に必要である。ヒトではサポシンBおよびCの特異的欠損症が知られており、それぞれ、異染性ロイコジストロフィー様、ゴーシェ病様の病像を呈する。我々は、ヒトの疾患が知られておらず、生体内での機能が明らかでなかったサポシンAとサポシンDに着目し、それぞれの特異的ノックアウトマウスを作成した。その結果、サポシンAノックアウトマウス（Sap-A KO）は遅発型クラッペ病の表現型を呈し、サポシンAは生体内においてガラクトシルセラミダーゼの必須の活性化たんぱく質であることが明らかになった。2005年には、乳児型クラッペ病の病像を呈するヒトのサポシンA欠損症が報告された。また、Sap-A KOに対する骨髄移植の治療効果の検討では、中枢神経系の脱髄病変がほぼ完全に抑制されることが明らかになった。

一方、サポシンDノックアウトマウス（Sap-D KO）は多尿と運動失調を主症状とし、生化学的には、腎臓と小脳に脂肪酸に水酸基のついたセラミド（HFA-セラミド）が蓄積し、病理学的には、腎尿細管変性と小脳プルキンエ細胞の選択的細胞死を呈した。これらの結果より、サポシンDは生体内において酸性セラミダーゼの必須の活性化たんぱく質であり、セラミド代謝系は腎臓および神経系において重要であることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は、各種疾患モデルマウスを用いて、スフィンゴ糖脂質の、ライソゾームにおける遺伝性代謝障害である、スフィンゴリピドーシス（脂質蓄積症）の脳病態の解明と治療法の開発に取り組んでいる。本研究では、独自に作成した2つの疾患モデルマウス—サポシンAノックアウトマウス、サポシンDノックアウトマウス—の脳病態を解析し、スフィンゴ糖脂質の神経系での機能を解析するとともに、新たな中枢神経病変の治療戦略を開発することを目的とした。平成17年度は下記の2つの研究課題に取り組んだ。

1) 遅発型クラッペ病のマウスモデルであるサポシンAノックアウトマウスに対する

骨髄移植の神経病変改善効果の検討。

2) サポシンDノックアウトマウスの小脳における特徴的小脳プルキンエ細胞死のメカニズムの解析。

B. 研究方法

1) 遅発型クラッペ病のマウスモデルであるサポシンAノックアウトマウスに対する骨髄移植の神経病変改善効果の検討。

サポシンAノックアウトマウス（Sap-A KO）はライソゾーム酵素の一つであるガラクトシルセラミダーゼ（GALC）の生体内での必須の活性化たんぱく質—サポシンA—を遺伝的に破壊した遺伝子改変動物で、遺伝性脱髄疾患である遅発型クラッペ病の表現

型を呈する。このSap-A KO に対して、生後7-8日に、GFPトランスジェニックマウスから骨髄移植(BMT)を施行し、Sap-A KOの神経症状、神経病理所見に対する治療効果を検討した。

2) サポシン D ノックアウトマウスの小脳における特徴的小脳プルキンエ細胞死のメカニズムの解析。

サポシンD ノックアウトマウス (Sap-D KO)はスフィンゴ脂質活性化たんぱく質のひとつであるサポシンDを遺伝的に破壊した遺伝子改変動物で、多尿と運動失調をきたし、腎臓と小脳に脂肪酸に水酸基のついたセラミド(HFA-セラミド)の蓄積が認められる。このSap-D KOの小脳病変に注目し、その神経病理変化を免疫組織化学的手法を用いて解析した。

C. 研究結果

1) Sap-A KO に対する骨髄移植では、BMT 未施行の Sap-A KO が、90 日頃から下肢麻痺を呈し、200 日を越えて生存するマウスはゼロで、その平均寿命は 174.5 ± 20 日 (放射線照射(+))、 189.3 ± 1.6 日 (放射線照射(-)) であったのに対し、BMT 施行の Sap-A KO は麻痺等の神経症状をほとんど呈することなく、約 80% のマウスが 1 年を超えて生存した。神経病理所見では 310 日の時点でも中枢神経系の脱髄病変はほぼ完全に抑制されていた。一方、末梢神経系の脱髄病変は 190 日の時点では BMT 未施行群、施行群間に明らかな差異は見出されなかった。

2) Sap-D KO の小脳における病理変化を検討したところ、Sap-D KO ではプルキンエ細胞が、生後3-4ヶ月頃より選択的に脱落することが明らかになった。そのプルキンエ細胞の脱落は進行性で、病末期(1年前後)には大部分のプルキンエ細胞が消失していた。またプルキンエ細胞の脱落は特徴的なパターンで起こり、小脳の冠状断において左右対称性のストライプ状に脱落が認められた。このパターンは小脳の機能的な構造であるparasagittal compartmentに一致し、セラミド代謝関連酵素であるスフィンゴシンキナーゼの小脳における発現と逆相関していた。これらの結果から、セラミド代謝は、正常の小脳プルキンエ神経細胞回路において、重要な生理的・病理的役割を果たしていると考えられた。

D. 考察

我々が作成したサポシンAノックアウトマウス (Sap-A KO) は遅発型クラッペ病の表現型を呈し、サポシンAは生体内においてガラクトシルセラミダーゼ (GALC) の必須の活性化たんぱく質であることを証明したが、2005年には、Spiegelらにより乳児型クラッペ病の病像を呈するヒトのサポシンA欠損症が報告され、マウスモデルで得られた知見がヒトでも裏づけられた。本研究では Sap-A KO を用いて遅発型クラッペ病に対する骨髄移植 (BMT) の治療効果を検討した。その結果、神経症状は臨床的には劇的に改善し、病理学的にも中枢神経系の脱髄所見は劇的に改善していた。これらの結果は遅発型クラッペ病に対する早期のBMTの神経病変への治療効果を示唆するもので、ヒトへの応用が期待される。しかしながら、予想に反してBMTによる末梢神経系の脱髄所見の改善は中枢神経系に比して乏しく、今後の検討が必要であることがわかった。

一方、サポシンDノックアウトマウス (Sap-D KO) は多尿と運動失調を主症状とし、腎臓と小脳に脂肪酸にセラミドが蓄積することから、サポシンDは生体内において酸性セラミダーゼの必須の活性化たんぱく質であることが明らかになっていった。本研究ではSap-D KOの小脳病変に注目し、その病態を解析した。その結果、Sap-D KOの小脳病変は小脳プルキンエ細胞の選択的細胞死に特徴付けられ、その細胞死のパターンは小脳の機能的な構造であるparasagittal compartment (stripes) に一致し、さらにはセラミド代謝関連酵素であるスフィンゴシンキナーゼの小脳における発現と逆相関していることが明らかになった。このプルキンエ細胞死のパターンはNiemann-Pick 病などの他のライソゾーム病にも共通する所見で、セラミド代謝は、正常の小脳プルキンエ神経細胞回路において、重要な生理的・病理的役割を果たしていると考えられ、興味深い。

今後はこれらモデルマウスから得た知見をさらに発展させ、スフィンゴリピドースにおける神経病変の分子メカニズムの解明を進めるとともに、そこから得られた知見を新たな治療法の開発に生かしていきたい。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1, 論文発表

1) Yagi T, Matsuda J, Tominaga K, Suzuki K, Suzuki K. (2005) Hematopoietic cell transplantation ameliorates clinical phenotype and progression of the CNS pathology in the mouse model of late onset クラッベ disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **65**, 565-575.

2) Wu YP, Mizukami H, Matsuda J, Saito Y, Proia LR, Suzuki K. (2005) Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF- α death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease. *Mol. Genet. Metab.* **84**, 9-17.

2, 学会発表

1) 第28回日本神経科学会・2005年7月26-28日・横浜市（神奈川県）

演題：新たなスフィンゴリピドーシスモデルマウス（サポシンDノックアウトマウス）における小脳プルキンエ細胞の選択的細胞死のメカニズムの解明

発表者：松田純子、木戸真希子、山崎明子、樋田一徳、石村和敬、只野一有富佳子、石塚稲夫、黒田泰弘、鈴木邦彦

2) 20th Biennial meeting international society

for neurochemistry jointly with the European society for neurochemistry. ・2005年8月21-26日・Innsbruck (Austria)

Title: Patterned cerebellar Purkinje cell death with accumulation of HFA-ceramide in the new mouse model of sphingolipidosis.

Author: Matsuda J, Yamazaki A, Kido M, Toida K, Tadano-Aritomi K, Ishizuka I, Suzuki K

3) 第48回日本先天代謝異常学会・2005年11月16-18日・熊本市（熊本県）

演題：スフィンゴリピドーシスの新たな疾患モデルマウスの作成；神経系におけるスフィンゴ糖脂質の生理機能の理解と神経病変治療法の開発をめざして

発表者：松田純子

4) 東海大学ハイテク整備事業成果報告会・平成17年9月21日・東海大学校友会館、東京都霞ヶ関

演題：ライソゾーム病の新たな疾患モデルマウスから解明される神経系におけるスフィンゴ糖脂質の生理的機能

発表者：松田純子

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担）研究報告書

Fabry 病酵素補充療法の副作用に対するステロイド剤前投与の効果の検討

分担研究者：衛藤義勝（東京慈恵会医科大学小児科教授）

研究協力者：小林正久（東京慈恵会医科大学小児科助手）

研究要旨

今回、Fabry 病酵素補充療法の副作用に対するステロイド剤前投与の予防効果について検討を加えた。Fabry 病の酵素補充療法の副作用（アレルギー反応）の予防を目的として、ステロイド剤の前投与を行い、その予防効果について検討した。ステロイド剤前投与は安全かつ簡便であり、その有効性を明らかにした。

A. 目的

Fabry 病に対する酵素補充療法は、2004 年にわが国でも承認され、その効果が期待されている。しかし、約 60% の症例に発熱、悪寒、蕁麻疹等の副作用を認め、より安全に Fabry 病酵素補充療法を行うためには、その予防用、対処法を確立する必要がある。そこで、Fabry 病酵素補充療法の予防策としてのステロイド剤前投与の効果を検討した。

B. 方法

対象は、東京慈恵会医科大学小児科で酵素補充療法を施行されている Fabry 病男性患者 20 名。酵素補充療法施行中に発熱、悪寒、蕁麻疹等の副作用を繰り返し認めた患者に対し、次の酵素補充療法開始前 2 時間前にステロイド剤（プレドニゾン 0.5mg/kg）の前投与（内服）を行い、副作用の予防効果について検討した。

C. 結果

対象となった 20 例のうち 9 例に副作用を認めた。副作用は、発熱、悪寒が 8 例と最も多く、副作用を認めた 9 例のうち 6 例は酵素補充療法開始 6 ヶ月以内に副作用を認めた。副作用を認めた 9 例のうち、6 例については副作用が反復して認められ、ステロイド剤の前投与を行った。ステロイド剤の前投与を行った 6 例中 5 例については、ステロイド剤前投与開始後副作用は認められなくなり、ステロイド剤前投与を漸減中止することができた。ステロイド剤前投与によると思われる副作用は認められなかった。ステロイド剤の前投与を行った残りの 1 例については、副作用を予防することができずなかった。

D. 考察

Fabry 病の酵素補充療法では、副作

用が軽微とはいえ発症頻度が高く、コンプライアンスの低下に結びつく場合も多いと考えられる。今回、我々が検討したステロイド剤の前投与は簡便で安全であり、83% (6例中5例)と有効率は高かった。今後、検討を重ね Fabry 病酵素補充療法副作用予防策のガイドライン作成を検討していく。

E. 健康棄権情報
なし

F. 研究発表
学会発表

- 1 小林 正久： Fabry 病酵素補充療法における Adverse Effect についての検討，第 108 回日本小児科学会，2005 年 4 月

- 2 Masahisa Kobayashi : Safety of enzyme replacement therapy among 20 Japanese patients with classical type of Fabry disease, 42nd Symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 2005, Sep.

- 3 小林 正久： Fabry 病酵素補充療法の Infusion Reaction に対するステロイド前投与の有効性についての検討，第 48 回日本先天代謝異常学会，2005 年 11 月

講演

- 1 小林 正久： Infusion Reaction of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease, Fabry 病フォーラム，2005 年 7 月

研究成果の刊行に関する一覧表

衛藤義勝
論文発表

1. Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Miyamura N, Nishida K, Araki E, Itoh K, Matsushita K, Hara M, Kuwahara K, Nakano T, Yasumoto N, Nonoguchi H, Tomita K. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2005 Oct;64(4):281-7.
2. Ichinose M, Nakayama M, Ohashi T, Utsunomiya Y, Kobayashi M, Eto Y. Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 2005 Sep;9(3):228-32.
3. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* 2005 Jul;85(3):196-202.
4. 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.* 2005;28(4):575-83.
5. Meng XL, Shen JS, Watabe K, Ohashi T, Eto Y. GALC transduction leads to morphological improvement of the twitcher oligodendrocytes in vivo. *Mol Genet Metab.* 2005 Apr;84(4):332-43.
6. 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 May;7(5):540-51.

学会発表

- 1 Hiroshi Kobayashi, Asako Morita, Jin-Song Shen, Xing-Li Meng, Toya Ohashi, Donald B Kohn, Yoshikatsu Eto. Retrovirus and Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. 第11回日本遺伝子治療学会. 8月、東京、2005年
- 2 小林博司、森田麻子、沈 勁松、孟 興麗、大橋十也、衛藤義勝. レトロウイルス・レンチウイルスを用いた Krabbe 病に対する遺伝子治療 熊本 第48回日本先天代謝異常学会. 2005. 11

鈴木義之
論文発表

1. 鈴木義之: 薬物療法 (遺伝病に対する新しい治療法). 小児科の新しい流れ: 先端医療シリーズ34, pp104-108, 2005.

2. 鈴木義之:ライソゾーム病の酵素補充療法. Brain Medical 17: 253-258, 2005
3. 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.
4. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. J Inherit Metab Dis, in press, 2006.
5. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. Brain Dev, in press, 2006.

学会発表

1. Suzuki Y: Child Neurology: Many patients and many diseases. What next? 3rd International Conference on Child Neurology of Central Asian Countries. Almaty, Kazakhstan, 2005. 6. 2-3.
2. Suzuki Y: β -Galactosidase Deficiency: An Approach to Chaperone Therapy. 42nd Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Paris, September 6-9, 2005
3. Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M: A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. European Paediatric Neurology Society Congress 2005, Goteborg, Sweden, September 14-17, 2005.
4. 鈴木義之: ケミカルシャペロン療法: 遺伝性ライソゾーム病に対する新しい分子治療. 第50回人類遺伝学会大会, 倉敷市, 2005. 9. 19-22.
5. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling in G_{M1} -gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005. 10. 19-22.
6. Suzuki Y: New Therapies for Neurogenetic Disorders. XVIII World Congress of Neurology, Sydney, Australia, November 5-11, 2005.
7. 一ノ宮悟史, 渡辺浩史, 松田潤一郎, 丸山貴美子, 戸田寛子, 岩崎裕之, 黒澤美枝子, 飯田真己, 小川誠一郎, 鈴木義之: 遺伝子組換え G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48回日本先天代謝異常学

- 会、熊本市, 2005. 11. 16-18.
8. 大橋英美子、檜垣克己、山本浩一、高村歩美、飯田真己、小川誠一郎、岩崎博之、鈴木義之、難波栄二：ヒト G_{M1} -ガングリオシドーシス遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法. 第 48 回日本先天代謝異常学会、熊本市, 2005. 11. 16-18.
 9. 鈴木義之、渡辺浩、岩崎博之、一ノ宮悟史、丸山貴美子、戸田寛子、黒澤美枝子、松田潤一郎、飯田真己： G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発. 第 22 回日本疾患モデル学会, 伊香保町, 2005. 11. 24-25.
 10. 高村歩美、檜垣克己、山本浩一、飯田真己、岩崎博之、鈴木義之、難波栄二：マウスモデル細胞を用いた G_{M1} -ガングリオシドーシスの解析. 第 11 回ライソゾーム病研究会, 東京, 2005. 12. 2.
 11. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered G_{M1} gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol, 2006. 1. 18-20.

田中あけみ
論文発表

1. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* 2005 Jul;85(3):196-202. Epub 2005 Apr 26.
2. Tomatsu S, Okamura K, Maeda H, et al. Keratan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 28: 187-202, 2005.
3. 高浦奈津子、田中あけみ、吉田敏子、他. Sanfilippo 症候群 B 型と Wilson 病を合併した 1 男児例 *脳と発達* 38: 49-53, 2006.

学会発表

- 1 田中あけみ、澤田 智、山野恒一 「ムコ多糖症親の会患者家族に対する出生前診断の意識調査」 第 50 回日本人類遺伝学会 (2005 年 9 月、岡山)
- 2 田中あけみ、澤田 智、山野恒一 「ムコ多糖症親の会患者家族に対する

出生前診断の意識調査」 第48回日本先天代謝異常学会 (2005年11月、熊本)

島田隆
論文発表

1. Inagaki, S., Migita, M., Hayakawa, M., Yoshida, J., Ishizaki, M., Kotani, M., Sakuraba, H., Shimada, T., Murakami, M., Fukunaga, Y. (2005) An asymptomatic heterozygous female with Fabry disease: implications for enzyme replacement therapy. *J. Nippon Med. Sch.* 72: 387-390
2. Kato, K., Miyake, K., Igarashi, T., Yoshino, S., Shimada, T. (2005) HIV vector mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* 25: 522-529
3. Takakusaki, Y., Hisayasu, S., Hirai, Y., Shimada, T. (2005) Co-expression of FGE is essential for synthesis and secretion of functional arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Gene Ther.* 16: 1-8
4. Hayakawa, M., Ishizaki, M., Hayakawa, J., Migita, M., Murakami, M., Shimada, T., Fukunaga, Y. (2005) Role of bone marrow cells in the healing process of mouse experimental glomerulonephritis. *Ped. Research* 58:323-328
5. Miyake, K., Inokuchi, K., Miyake, N., Dan, K., Shimada, T., (2005) Antiangiogenic gene therapy of myeloproliferative disease developed in transgenic mice expressing P230 ber/abl. *Gene Ther.* 12: 541-545
6. Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nasu, Y., Nagai, A., Shimada, T., Daida, H., Kumon, H. (2005) Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12: 1126-1132
7. Takahashi, H., Kato, K., Miyake, K., Yoshino, S., Shimada, T. (2005) Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23:7-12

酒井規夫

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 genotype-phenotype correlation., J Hum Genet (in press)
2. Kawai M, Sakai N, Miyake S, Tsukamoto H, Akagi M, Inui K, Mushiake S, Taniike M, Ozono K., Novel mutation of gene coding for glial fibrillary acidic protein in a Japanese patient with Alexander disease., Brain Dev. 2006 Jan;28(1):60-2.
3. Sangkhathat S, Kusafuka T, Yoneda A, Kuroda S, Tanaka M, Sakai N, Fukuzawa M. Related Articles, Links, Renal cell carcinoma in a pediatric patient with an inherited mitochondrial mutation., Pediatr Surg Int. 2005 Sep;21(9):745-8.
4. 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. 2005;28(4):575-83.
5. Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, Jabs EW, Inui K, Joenje H., Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion., Nat Genet. 2005 May;37(5):468-70.

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. 若年型クラッベ病に対する造血幹細胞移植の効果. 熊本 第48回日本先天代謝異常学会. 2005. 11
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. 熊本 第48回日本先天代謝異常学会. 2005. 11
3. 林田雅子、酒井規夫、小柳津裕子、最上友紀子、中長摩利子、虫明聰太郎、西垣敏紀、沖永剛志、谷池 雅子、大藪恵一. OTC 欠損症の保因者女兒の臨床経過について. 第48回日本先天代謝異常学会. 2005. 11