

I-cell 病細胞における蓄積物質の細胞化学的分析

分担研究者：桜庭 均

（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員

研究要旨： 複雑な病態を示す I-cell 病細胞中に蓄積する物質を同定することを目的として研究を行った。I-cell 病患者由来の培養線維芽細胞を試料として、ライソゾームのマーカであるライソゾーム関連膜蛋白質-1 に対する抗体と候補となる糖複合体を認識する特異抗体またはレクチンを用いた二重染色を行った。その結果、I-cell 病細胞のライソゾームには、GM2 ガングリオシドやシアル酸 α 2-3 ガラクトース、ガラクトース β 1-4N-アセチルグルコサミンおよびマンノース残基を持つ糖複合体が大量に蓄積していることが明らかになった。本研究成果は、I-cell 病の病態解明や診断、治療の評価などに役立つと期待される。

A. 研究目的

I-cell 病は、マトリックス性のライソゾーム酵素の輸送障害により、ライソゾーム内に糖複合体と考えられる大量の物質が蓄積し、複雑な病態を示す遺伝病である。本症で細胞内に蓄積する物質の構造特性は、まだ明らかにされていない。本研究では、I-cell 病患者由来の培養線維芽細胞を試料として、各種の特異抗体やレクチンを利用した細胞化学的方法により、患者細胞内に蓄積する物質の構造特性を明らかにし、I-cell 病の病態解明と診断、治療の評価などへの臨床応用を目指すものである。

B. 研究方法

日本人の I-cell 病患者 2 症例から生検により、皮膚組織を得た。これより、培養線維芽細胞株を樹立し、試料とした。この試料および対照となる健常者由来の培養線維芽細胞を用いて、抗 GM2 ガングリオシド抗体および *Maackia amurensis* (MAM)、*Datura stramonium* (DSA)、concanavalin A

(ConA)、*Arachis hypogaea* (PNA)、*Sambucus sieboldina* (SSA) などのレクチンによる細胞化学染色を行った。染色の際には、ライソゾームのマーカであるライソゾーム関連膜蛋白質-1、lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) に対する抗体を用いて、上記の抗体またはレクチンとの二重染色を行うことにより、細胞内における染色位置を同定した。

(倫理面への配慮)

患者由来の培養線維芽細胞の使用に関しては、患者家族の同意を得ると共に、当研究所倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

I-cell 病の細胞は、抗 GM2 ガングリオシド抗体、MAM、DSA および ConA を用いた染色で、対照に比べて強い顆粒状の染色性が認められた。その染色箇所は抗 LAMP-1 抗体を用いた場合の染色箇所と一致した。一方、PNA と SSA を用いた染色においては、患者細胞と対照との間に差は認められなかつ

た。

D. 考察

これらの解析結果から、I-cell 病患者由来の細胞においては、GM2 ガングリオシドやシアル酸 α 2-3 ガラクトース、ガラクトース β 1-4*N*アセチルグルコサミンおよびマンノース残基を持つ糖複合体が、ライソゾームに大量に蓄積していると考えられた。細胞内の酵素活性測定により、 β -ヘキソサミニダーゼ A、ライソゾーム性シアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよび α -マンノシダーゼなどの酵素活性が著明に低下していることが確認されており、これらの基質の蓄積は、当該加水分解酵素の異常に基づくものと考えられた。

PNA と SSA とが認識する糖鎖は、それぞれガラクトース β 1-3*N*アセチルガラクトサミンとシアル酸 α 2-6 ガラクトース/*N*アセチルガラクトサミンであり、これらは線維芽細胞の主たる代謝産物ではないため、I-cell 病細胞においては蓄積しないものと考えられた。

E. 結論

糖脂質に対する特異抗体や特定の糖鎖構造を認識するレクチンを用いた細胞化学的方法により、I-cell 病患者由来の培養線維芽細胞のライソゾームに蓄積する物質の構造特性を明らかにした。

この研究成果は、I-cell 病の診断や治療法の効果判定および治療薬用量の決定などに応用出来ると期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawashima, I., Ohsawa, M., Fukushige, T., Nagayama, Y., Niida, Y., Kotani, M., Tajima, Y., Kanekura, T., Kanzaki, T., Sakuraba, H. : Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. Clin. Chim. Acta, 378: 142-146, 2007.

2. 学会発表

川島育夫, 大澤真以, 福重智子, 永山善久, 新井田要, 神崎 保, 桜庭 均 : I-cell病患者由来の培養線維芽細胞における蓄積物質の解析. 第 12 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2006.11.24-25.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

平成 18 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

ニーマンピック病 A/B 型の日本における頻度をアンケート調査した。ニーマンピック病は 0.9 % の医師が経験ありとの回答を得たが、病型別では A 型 2 例、B 型 2 例、C 型 13 例、不明 2 名であった。ニーマンピック病 A/B 型の頻度は極めて低い頻度であった。日本人ニーマンピック病 A 型 4 名と B 型 5 名の臨床型と臨床型を調べた結果、S231P が日本人における軽症例を起こす遺伝子型として広く存在する可能性が得られた。最近、細胞内脂質輸送に関するトランスポーター ABC 蛋白が報告されている。細胞内コレステロール・スフィンゴリエリンの蓄積のみられる細胞における 4 種 ABC 蛋白 (ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1) 発現に関して調べたが、ABCA1、ABCA7、ABCG1 の発現低下が観察され病態への関与が示唆された。

1. 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リエリナーゼの欠損が原因の疾患で、近年登場した酵素補充療法の対象疾患として欧米では臨床試験が行われている。国内での臨床適応も近い現状を考え、国内患者の実態把握（頻度、病型、治療法など）を目的に全国の医療機関を対象にアンケート調査を実施した。加え遺伝子解析を通じた国内患者の分子遺伝学的特徴を調べた。次に本疾患の基本病態である細胞内スフィンゴリエリン蓄積と脂質輸送に関係する遺伝子として次々に発見されている ABC (ATP-binding cassette) 蛋白との関係を分子レベルで解析した。

2. 研究方法

1) アンケート調査：全国の大学病院および 250 床以上の診療所の小児科、消化器内科、血液内科 2,785 ヶ所に対して郵送によってア

ンケート調査を行った（秋田大学医学部倫理委員会指針にて）。一次調査として①ニーマンピック病患者の有無、②原因不明の肝脾腫の有無、③原因不明の低 HDL 血症の有無、に関して往復はがきにて調査を行った。二次調査にてニーマンピック病の病型、症状、診断、治療等に関してアンケート調査を行った。

2) 遺伝子解析：症例 28 才、女性、会社員として普通に生活。子 1 人。肝脾腫の存在に対して血液内科で骨髄穿刺を施行し泡沫細胞を多数認めた。腹部で肝 2～3 横指、脾臓 4～5 横指触知する。他に特異的な所見なし。検査では特徴的な所見として低 HDL 血症

(13mg/dl : 40-90mg/dl) を認めている。本症例と最近酵素診断した新規 A 型患者の遺伝子診断を行い、文献報告例の結果と合わせ日本人の遺伝子型と臨床型の関係を考察した。遺伝子診断は文書にて本人の同意を得て行なった。

3) 培養皮膚線維芽細胞 3 種類 (正常、ニーマンピック病 A 型、ニーマンピック病 B 型) に関して脂質輸送に関する 4 種類の ABC 蛋白 (ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1) に関して遺伝子発現量 (mRNA) を GAPDH mRNA を内部コントロールとして LightCycler を用いたハイプロプローブ法にて測定した。

3. 研究結果および考察

1) 2,785 名の対象に対して回答 1,052 名が得られ回収率 37.8%であった。ニーマンピック病の診療経験ありが 25 名 (0.9%)、うち 2 次調査で 14 名から回答有り A 型 2 例、B 型 2 例、C 型 13 例、不明 2 名であった。原因不明の肝脾腫の診療経験ありが 45 名 (1.6%) であったが、2 次調査 (9 名が回答) でニーマンピック病やゴーシェ病を疑ったの 11.1%、骨髓穿刺検査を行なったのは 22.2%、低 HDL 血症合併が 11.1%、胸部レ腺の異常のあったもの 0.0%であった。原因不明の低 HDL 血症の診療経験ありが 27 名 (1.0%) であった。今回の調査ではニーマンピック病 A/B 型の頻度は極めて低い結果であった。しかしほぼ普通の日常生活を送り小児期を問題なく経過し肝脾腫のみが症状である B 型の症例は内科領域で診断されることになる。小児科疾患の認識の強い本疾患の鑑別をより普及させることで診断例は増える可能性がある。

2) 2 名の新規患者を含む日本人ニーマンピック病 A 型 4 名と B 型 5 名の臨床型と臨床型を調べた結果、海外の症例にみられるような高頻度の遺伝子異常は存在しなかった。S231P が非常に軽症の B 型 2 家系にみられた。1 例は非常に軽症で軽度肝脾腫と肝機能異常のみの男子 (S231P/S231P)。血縁関係のない他の 1 例は子をもうけている会社員の女性である (S231P/c.567delT)。S231P は日本人にお

る軽症例を起こす遺伝子型として広く存在する可能性がある。

3) 培養皮膚線維芽細胞を用いてニーマンピック病 A/B 型に細胞における脂質輸送に関する ABC 蛋白の発現量 (mRNA) の変化を PCR を用いた定量法で観察した。ABCA1 は肝やマクロファージにおけるコレステロールの細胞外排出に関与する。その異常では低 HDL 血症や臓器コレステロール蓄積を特徴とする Tangier 病をきたす。ニーマンピック病 A/B 型でも低 HDL 血症は特徴的な検査所見である。測定結果では正常 1.77×10^{-2} (以下 GAPDH 補正值) に対して B 型 6.31×10^{-3} (* $p < 0.0001$)、A 型 5.21×10^{-3} (* $p < 0.0001$) と有意の低下を示していた。ABCA3 は肺胞 II 型細胞のラメラ体限界膜に発現し脂質輸送を通じサーファクタント合成に関与する。その異常は先天性サーファクタント欠損症を来す。測定結果は 3 つの細胞で差はなかった。ABCA7 は ABCA1 蛋白と相同性が高く HDL 形成に関与することが分っている。測定の結果、正常 1.75×10^{-4} に対して B 型 0.73×10^{-4} (* $p < 0.0001$)、A 型 1.18×10^{-4} (** $p = 0.0002$) と有意に低下が見られた。ABCG1 はマクロファージや肺で発現がみられコレステロールやリン脂質の輸送に関与している。その欠損モデルでは肺で泡沫細胞の浸潤などニーマンピック病 A/B 型と似た病像を呈する。測定結果は正常 2.01×10^{-4} に対して B 型 1.87×10^{-6} (** $p = 0.0002$)、A 型 2.77×10^{-6} (** $p = 0.0002$) と著明な低下が観察された。ニーマンピック病 A/B 型が多様な症状を来す病態はほとんど不明である。しかし細胞内主要脂質であるスフィンゴミエリンの蓄積が主病態である点を考えると細胞内脂質輸送に関する ABC 蛋白の機能に二次的な影響が発現す可能性は高く、今回の解析

結果はそれを支持する。本疾患の治療を考えた病態解明に重要な所見と思われる。

4. 結論

ニーマンピック病 A/B 型の国内患者実態と遺伝学的な特徴を明らかとし、その病態を考える上で細胞内脂質輸送に関与する ABC 蛋白発現の二次的な変化に関して解析し ABCA1、ABCA7、ABCG1 の発現変化の可能性を示唆した。

5. 研究発表

論文発表

1. Tatano Y, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Takada G, Murata M, Sakuraba H, Ito K. Significant decrease in tropoelastin gene expression in fibroblasts from a Japanese Costello syndrome patient with impaired elastogenesis and enhanced proliferation. *J Biochem(Tokyo)*, 140: 193-200, 2006.
2. Oyama K, Takahashi T, Shoji Y, Oyamada M, Noguchi A, Takada G, Kanbayashi T. Niemann-Pick Disease Type C: Cataplexy and Hypocretin in Cerebrospinal Fluid. *Tohoku J. Exp. Med.*, 209: 263-267, 2006.
3. Ishii H, Takahashi T, Toyono M, Tamura M, Harada K, Yoshida M, Noshikawa Y, Enomoto K, Takada G. Acid Sphingomyelinase Deficiency: Cardiac Dysfunction and Characteristic Findings of the Coronary Arteries. *J Inherit Metab Dis*, 29, 232-234, 2006.
4. Tatano Y, Takeuchi N, Kuwahara J, Sakuraba H, Takahashi T, Takada G, Itoh K. Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal beta-galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuraminidase-1 deficiencies. *J Med Invest*, 53: 103-112, 2006.
6. 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.

6. 知的所有権の出願・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

ファブリー病患者の血液中サイトカイン、
アルギニン濃度と一酸化窒素代謝産物の推移

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の機能的障害の機序を検討する目的で、患者血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。その結果、一酸化窒素産生調節に関係する VEGF、TGF- β 1、PDGF-AB の上昇傾向を認めた。また一酸化窒素代謝産物濃度は約半数で対照値を超えていたが、いっぽうアルギニン濃度はむしろ低値であった。また一酸化窒素代謝産物値は VEGF、TGF- β 1、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、それらサイトカインによる一酸化窒素産生調節機構の破綻および血中アルギニン低下が血管のトーンズの調節障害に関与していることが推測される。さらに、これらの変化は今回の酵素補充療法の観察期間では有意の変化は認めなかった。

A. 研究目的

[背景] ファブリー病 (FD) の病態におけるサイトカインの関与についての研究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ズ調節に関与するといわれている。

[目的] 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なれば、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

ERT 開始前から経時的に経過を追えた 5 名の FD 男性患者 (年齢 21 歳～51 歳)。うち 3 名は ERT 開始前から血液透析を受けている。患者は昨年度に途中経過を報告した症例であり、本年度はその後の経過を観察したものである。サイトカインは ELISA 法、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. ERT の経過に沿って経時的に観察できた 5 例 (観察期間: 最大 18 か月) では、

VEGF、TGF- β 1、PDGF-ABは一過性に上昇を認め、一部症例ではその後下降傾向を示した。

2. VEGF、TGF- β 、PDGF-ABは相互に有意の正の相関を認めた。
3. NO_xの濃度は全計測値(n=14)中、6ポイントで対照値を超えていたが、Arg濃度は5ポイントでM-2SD(60 μ mol/l)以下であった。さらに、Argの濃度とNO_x濃度の間には相関は認めなかった。
4. NO_xの濃度はVEGF、TGF- β 1、PDGF-ABのいずれの濃度とも有意の相関を示さなかった。

D. 考察

以上から、FD男性患者ではVEGF、TGF- β 1、PDGF-ABの濃度が上昇傾向にあること、さらにこれらは協調的調節を受けていると推測された。FD患者では、血液中のArg濃度が低いことに加え、サイトカインによるNO_x産生の調節も破綻し、血管平滑筋の収縮・弛緩の調節が障害されていることが推測された。これらの機構がFD患者における血管の機能的障害に関与していることが伺われた。また、これらの現象は今回の観察期間内では有意の変化を示さなかった。

E. 結論

FD患者ではArg供給不全およびサイトカインによる一酸化窒素産生調節機構が破綻しており、これは血管の機能的障害の現れと推測される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

芳野 信：ファブリー病患者の酵素補充療法前・経過中の血系中サイトカインと一

酸化窒素の推移 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17年度総括研究報告書 65-66.

M.Yoshino et al.: Role of specific cytokines in bone remodeling and hematopoiesis in Gaucher disease, *Pediatr Int* (2007), in press.

2. 学会発表

芳野 信：ライソゾーム蓄積症の病態におけるサイトカインの役割 平成18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 2006.7.19(東京)

Yoshino M, Watanabe Y, Tokunaga Y, Harada E, Fujii C, Numata S, Harada E, Tajima A, Ida H: The role of cytokines in the mechanism of bone lesions and hematological changes in Gaucher's disease. 9th Annual Asia LSD Symposium (Makuhari) 2006.9.10-9.12.

芳野 信、渡辺順子、井田博幸、小林正久、大橋十也、衛藤義勝：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などの推移 平成18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 2006.11.24(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

β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損症の遺伝子変異解析と神経変性機構に関する研究

分担研究者： 難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター教授

研究要旨：DHPLC法により新たに4人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者について遺伝子変異解析を行い、4種の新規変異を同定した。β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス脳組織を用いたマイクロアレイ発現解析を行い、モデルマウス脳において発現変動している遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法ケミカルシャペロン療法開発のための基礎的研究を行った。DHPLC法を用いたβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析を行った。G_{M1}-ガングリオシドーシス神経変性機構の分子解明を目的とし、β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス脳組織を用いたマイクロアレイ発現解析を行った。

B. 研究方法

1. DHPLC法による遺伝子変異解析

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来皮膚線維芽細胞およびリンパ球から抽出したゲノムDNAを用い、WAVE fragment解析システム（Transgenomic社）によるDHPLC（denaturing high performance liquid chromatography）解析を行った。DHPLC解析により見つかった変異部位について、direct sequencingにより変異遺伝子を同定した。

2. マイクロアレイ発現解析

正常、β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損、およびヒトR201C発現マウス大脳皮質よりRNAを抽出し、マイクロアレイ発現解析はイルミナSentrix mouse-6 expression beadchipを用いた。解析結果はIngenuityパスウェイ解析ソフトウェア（ver. 3.0）を用い、パスウェイ解析を行った。免疫蛍光染色は、マウス脳凍結切片を作製し、抗GM1、抗Bip/Grp78抗体を用いそれぞれ行った。

C. 研究結果

4人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者についてDHPLC法による変異解析を行った結果、4種類の新規遺伝子変異（E131K、W273R、D448V、W582X）および既知変異（R49C、Y270D、H281Y）を同定した。

11ヶ月齢正常マウスと9ヶ月齢β-ガラクトシダーゼ欠損マウス大脳皮質からそれぞれ抽出したRNAを用いマイクロアレイ発現解析を行った結果、蛋白質分解系、小胞体

ストレス応答、アポトーシス、酸化ストレス、炎症に関連する種々の遺伝子群において有為な発現変動が認められた。そのうち小胞体ストレス関連遺伝子についてパスイ解析を行った結果、欠損マウスにおいて Bip/Grp78、PERK、IRE1、CHOP の発現上昇、TRAF2、JNK-1、Bcl-2 の発現低下が見られた。さらに、脳組織における蛋白質の発現を免疫蛍光染色で検討した結果、小胞体シャペロン分子の一つ Bip/Grp78 蛋白質の発現が欠損マウス神経細胞内で異常に亢進し、また R201C 発現マウス脳での Bip/Grp78 の発現はケミカルシャペロン NOEV (N-octyl-4-epi- β -valienamine) 投与により抑制された。

D. 考察

DHPLC 変異解析により 4 種類の新規遺伝子変異を同定した。これら新規変異を含め現在 96 種類の β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異が同定されている。今後、まだ効果判定を行っていない変異型について、マウス細胞発現系を用いケミカルシャペロン効果の検討を行っていく予定である。

G_{M1} -ガングリオシドーシスの神経変性機構を解明する目的で、マイクロアレイ発現解析を行った。発現変動していた遺伝子群のうち、小胞体ストレス応答の亢進が β -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳において認められた。また、小胞体ストレス応答に関連するシャペロン分子の一つ Bip/Grp89 蛋白質の発現が G_{M1} 蓄積神経細胞において顕著に上昇していた。さらに、この発現はNOEV投

与R201Cマウスで抑制されていた。これらの結果は直接または間接的に小胞体ストレス応答シグナルが神経変性機構に関連することを示唆する。今後は過剰な小胞体ストレス応答が引き起こされる分子機構について詳細な解析を行って行く予定である。また、その他の発現変動遺伝子についても検討を行う。

E. 結論

DHPLC 法により新規 β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異を同定した。 β -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳において小胞体ストレス応答の亢進が神経変性機構と関連している可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 28: 482-486, 2006

2. 著書

1) 難波栄二、檜垣克美、Udin Bahrudin: 遺伝子診断の実際、小児科診断 69: 1621-1626, 2006

3. 学会発表

1) 高村歩美、檜垣克美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: G_{M1} -ガングリオシドーシス神経変性における Trk 受容体の機能異常.

第 29 回日本神経科学大会、京都、2006.7

2) Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E. Impairment of Trk signaling in G_{M1} -gangliosidosis mice brains. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, (ICIEEM), Chiba, Japan, 2006.9

3) Higaki K, Takamura A, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Analysis of the effect of chemical chaperone on human mutant β -galactosidase expressing mouse cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, (ICIEEM), Chiba, Japan, 2006.9

4) Sawada T, Tanaka A, Seto T, Maeda M, Jikihara I, Yamaguchi E, Matsuda J, Nanba E, Yamano T. Cell therapy for the brain involvement in lysosomal storage disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, (ICIEEM), Chiba, Japan, 2006.9

5) 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二： β -ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異とケミカルシャペロン療法の検討。第 51 回日本人類遺伝学会大会、米子、2006.10

6) 澤田智、田中あけみ、前田光代、直原育久代、瀬戸俊之、松田潤一郎、國枝孝典、高野薫、難波栄二、檜垣克美、高村歩美、山口悦子、山野恒一：ライソゾーム病の脳病変に対する細胞治療。第 51 回日本人類

遺伝学会大会、米子、2006.10

7) 野中和香子、檜垣克美、高村歩美、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二：GM1-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロン療法の分子解析。第 12 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2006.11

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究

分担研究者 国立成育医療センター 遺伝診療科 奥山 虎之

研究要旨

ムコ多糖症（MPS）の系統的遺伝診断法を確立し、23 症例の責任遺伝子の遺伝子解析を行い、その臨床的有用性を検証した。ムコ多糖症 I 型ではスプライシング変異、5 塩基挿入、ナンセンス変異 3 種の変異を同定し、ムコ多糖症 II 型では遺伝子全長の欠失 1 例、遺伝子組み換え 1 例、ミスセンス変異 10 例、ナンセンス変異 1 例、挿入変異 1 例、欠失変異 2 例、未同定 1 例であった。ムコ多糖症 VI 型ではミスセンス変異のホモ接合体が 1 例、ナンセンス変異 2 種の複合ヘテロ接合体が 1 例であった。以上の結果から、今回確立した診断法はムコ多糖症の遺伝子診断として有用であり、保因者診断や出生前診断への臨床応用が可能となった他に、新たな早期治療への展望が開けた。このように家系内での遺伝子診断を行っていく上で、臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーによる遺伝カウンセリングは非常に重要である。

A. 研究目的

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。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・開発されており、すでに一部は臨床応用されている。これにより、早期治療の重要性が増しており、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整備すべき重要課題である。

今回、我々は当科を受診又は診療依頼のあったムコ多糖症患者のうち、遺伝子検査の同意の得られた 23 症例において、責任遺伝子の遺伝子診断サービスを実施した。

B. 研究方法

これまでに当センターではムコ多糖症 I 型 3 症例、ムコ多糖症 II 型 18 症例、ムコ多糖症 VI 型 2 症例の遺伝子解析を行った。

解析方法は、同意の得られたクライアントの末梢血白血球から genomic DNA を抽出し、それぞれムコ多糖症 I 型では α -イブロンダーゼ、ムコ多糖症 II 型ではイブロンダーゼ-2-サルファターゼ、ムコ多糖症 IIIA 型ではヘパラン N-1 サルファターゼ、ムコ多糖症 VI 型ではアシルサルファターゼ B の遺伝子の各エクソンおよびエクソンイントロン接合部を PCR で増幅し、

ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

当院受診患者にはすべて検査前遺伝カウンセリングを行い、他施設からの依頼については、主治医に対して検査前遺伝カウンセリングを依頼した。

本遺伝子検査にあたって、当センター遺伝学的検査運営委員会で定めた遺伝学的検査取扱規程にのっとり、同意を得て実施した。また、遺伝カウンセリングについては人類遺伝学会の定める臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーにより、検査前カウンセリングを行い、遺伝子検査の結果が判明後に再度結果を説明し、遺伝子検査全般のサポートを実施している。

C. 研究結果

ムコ多糖症 23 症例において、22 種の変異を確認した。

ムコ多糖症 I 型では 3 種の変異を同定し、それぞれスプライシング変異、5 塩基挿入、ナンセンス変異であり、2 アリルが未同定であった。ムコ多糖症 II 型では遺伝子全長の欠失 1 例、遺伝子組み換え 1 例、ミスセンス変異 10 例、ナンセンス変異 1 例、挿入変異 1 例、欠失変異 2 例、未同定 1 例であった。ムコ多糖症 VI 型ではミスセンス変異のホモ接合体が 1 例、ナンセンス変異 2 種の複合ヘテロ接合体が 1 例であった。

ムコ多糖症の病因変異は遺伝的異質性に富むとされており、今回の解析結果でも、I 型の 2

家系、II型の2家系以外はそれぞれ異なった遺伝子変異を同定した。

D. 考察

ムコ多糖症は尿中グリコサミノグリカンの過剰排泄および末梢血白血球中の酵素活性低下により確定診断可能である。ムコ多糖症が疑わしい患者はこれらの検査を早期に行い、確定診断することで、早期に根治療法へと導くことができる。この時に遺伝子診断は、診断をさらに確定、補強するためにあり、必須な検査ではない。しかし、保因者診断や出生前診断においては、酵素活性測定では確実な診断が困難であり、遺伝子検査が重要となってくる。その際に発端者の遺伝子変異が判明している、その変異の有無を検索することで、確実な診断が可能となる。遺伝子診断により保因者と判明し、出生前診断にて変異を有する児が出生する可能性が強い場合に、出生直後からの根治療法の開始が可能であり、このような治療オプションを遺伝カウンセリングにおいて提供できる。

また、遺伝子検査を行う前後には、検査の長所と短所について説明し、自立的意思決定権を尊重するよう、遺伝カウンセリングを行わねばならない。遺伝子診断は発端者本人だけではなく、保因者診断や出生前診断といった様子の結果が家系内に影響を及ぼすことがあるため、本人の意思を確認することが重要であると同時に、家族を含めたサポートもしていかなければならない。

E. 結論

ムコ多糖症患者において遺伝子診断を試行した。23症例において、新規変異を含む22種の変異を同定した。発端者の変異が検出されたことにより、保因者診断や出生前診断が臨床応用可能となり、ムコ多糖症診断に対する家系内の幅広いニーズに応えることが可能となった他に、新たな早期治療への展望が開けた。このように家系内での遺伝子診断を行っていく上で、遺伝カウンセリングは非常に重要であり、

専門外来において臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーによる入念なカウンセリングを提供する機会を設ける体制作りが欠かせない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells. *Mol Ther.* 2006 13:548-55..
2. 田中藤樹、奥山虎之：酵素補充療法ムコ多糖症 I型、VI型：小児科診療 69、2006、1735-1739

2. 学会発表

1. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells "Workshop on the blood brain barrier" 9th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases which Venice 29-July 2, 2006, Italy
2. Assessment Long-term outcomes in MPS I and MPSII The 9th Annual Asia Lysosomal Storage Disorders (LSD) Meeting Sept 10-12,2006 Makuhari Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
平成18年度分担研究報告書

ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する研究

分担研究者 三井純，高橋祐二，伊達英俊，岩田淳，後藤順，辻省次

研究要旨
パーキンソン病患者におけるGBA遺伝子の解析

三井純，高橋祐二，伊達英俊
岩田淳，後藤順，辻省次

東京大学神経内科

A. 研究目的

パーキンソン病患者においてGBA遺伝子を解析して，相関の有無を調べる．有無を調べる．

B. 研究方法

ゴーシェ病の原因遺伝子であるGBA遺伝子のエクソン配列全てを短期間で大量に解析可能なDNA microarray-based resequence systemを構築した．

パーキンソン病患者においてGBA遺伝子の解析を行った．

C. 研究結果

パーキンソン病（PD）47例を対象にGBA遺伝子を解析した．3例にRecNciI変異を認めた．同変異は対照231例に認めなかった．

D. 考察

PDとGBA変異の相関を調べた過去の報告では，様々な種類のGBA変異の総和を正常対象と比べて有意差ありとする報告となしとする報告が分かれている．過去の多くの報告は特定の変異に限って調べており，本研究のようにGBA遺伝子のエクソン配列全てを解析した報告は少ない．

我々が今回見出した変異は，過去の報告を含めて変異の種類毎にメタ解析すると，他の種類の変異と比べて著しく高い相関を示した．

E. 結論

RecNciI変異がPDと相関している可能性が示唆された．

F. 研究発表

1. 論文発表：作成中．
2. 学会発表：なし．

G. 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．

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）研究班

分担研究報告書

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者	島田 隆	日本医科大学生化学第二講座教授
研究協力者	倉井 年幸	日本医科大学生化学第二講座
	北川 亮	日本医科大学生化学第二講座

研究要旨

Arylsulfatase A (ASA) 欠損症である異染性白質ジストロフィー (MLD) をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。リソゾーム酵素は、その一部が細胞外に分泌され、他の細胞に取り込まれる Cross-correction という現象が知られており、この特性を利用した治療法の開発を目指している。これまでの研究で、培養細胞やマウス肝臓での ASA の発現には sulfatase の活性化酵素である FGE (Formyl-glycin generating enzyme) の同時発現が重要であることを明らかにした。又、ASA と FGE を発現する AAV タイプ 1 ベクターを作製し、ウイルスベクターの直接脳内投与による遺伝子治療の有効性を、ASA ノックアウトマウス (MLD マウス) を使った実験で確認した。更に、より侵襲性の低い方法としてウイルスベクターの全身投与による遺伝子治療の可能性を検討し、脳内スルファチドの減少を認めた。MLD 遺伝子治療のヒトへの臨床応用を目指し、霊長類を使った実験も開始している。

A. 研究目的

MLD のモデルマウス (ASA ノックアウトマウス) を対象として、安全で有効な遺伝子治療法を開発する。更に、ヒトへの臨床応用を目指し、サルを使った前臨床試験を開始する。

B. 研究方法

AAV ベクターはベクタープラスミド、AAV1 パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミドのトリプルトランスフェクションにより AAV1-ASA と AAV1-FGE を作製した。

ASA 酵素活性は p-nitrocatechol 法により測定した。新たに ELISA 法により ASA 分子を測定する方法を確立した。スルファチドの定量は TLC 法により行った。脳内でのスルファチドの分布は Alcian blue 染色により解析した。

筑波霊長類センター、都神経研、順天堂

大学と共同でサルへのウイルスベクターの投与実験を行った。

C. 研究結果

AAV1-ASA+AAV1-FGE を、生後 1 ヶ月の若い MLD マウスの尾静脈より注入し、3 ヶ月後の ASA 活性、スルファチド量の測定を行った。AAV1 ベクターは主に肝臓に取り込まれ持続的な遺伝子発現が認められた。その結果、腎臓でのスルファチドの著明な減少が TLC 法及び組織学的解析で示された。更に、驚くべきことに脳内のスルファチドの減少も確認された。これらの結果は少なくとも若いマウスでは脳血液関門を越えた遺伝子治療が可能であることを示している。

カニクイザルの脳組織への遺伝子導入実験を開始した。脳外科医の応援も得てサルへの定位脳固定手術法の実験系を確立し、AAV ベクター及びレンチウイルスベクター

の遺伝子導入効率やベクターの分布を検討している。HIV ベクターではニューロンに選択的に遺伝子導入が起こり、順行性及び逆行性の遺伝子発現が認められた。一方、SIV ベクターではグリア細胞への遺伝子導入が認められたが、逆行性の遺伝子発現は明らかではなかった。

D. 考察

様々なアプローチによる遺伝性神経変性疾患の治療を目指している。脳血液関門 (BBB) を越えて脳組織を治療する方法としてマウスの脳内に直接 AAV ベクターを注入することにより広い範囲の脳組織を、生化学的、組織学的に治療できることを示してきた。しかし、手法が侵襲的であり、しかもヒトの脳はマウスの脳と比べ数百倍も容積があることを考えると、直接注入法には限界があることが想定される。これらの問題を克服するためベクターの改良や、投与方法の工夫を進めている。一方、新たな方法としてベクターの全身投与による脳組織の治療効果を検討した。AAV ベクターの静脈内投与により腎臓組織のみならず脳組織でも蓄積したスルファチドの減少が認められた。現在、このメカニズムを調べているが、ベクターが BBB を越えて脳組織に感染した、発現した ASA が BBB を通過して脳細胞に取り込まれた、ベクターが感染したマクロファージが脳内に侵入した、などの可能性が考えられる。いずれにせよこのような現象は成人マウスでは報告されていないため若いマウスに特有な現象と考えられる。現在、更に生後 1 日以内の新生児マウスを使った実験で有効性を調べている。

新規の遺伝子治療の安全性と有効性を調べるための重要な前臨床研究としてカニクイザルを使った実験を開始した。AAV ベクターのサブタイプの違いによる遺伝子導入効率や分布の比較実験を行っている。レンチウイルスを使った実験では HIV ベクターと SIV ベクターの違いが示された。これらの組織特異性や分布の違いを利用することで対象疾患に応じた新しい遺伝子治療プロトコルの作成が可能になると考えられる。

E. 結論

生後 1 ヶ月の若いマウスに対する AAV

ベクターの静脈注射により内臓のみならず大脳組織でのスルファチドの減少を認めた。カニクイザルに対する遺伝子治療実験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurai, T., Hisayasu, S., Kitagawa, R., et al., AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase A efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of mitachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 15: 38-43, 2007
2. Yasuda, T., Miyachi, S., Kitagawa, R., et al., Neuronal specificity of α -synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience* 144:743-745, 2007
3. Kitagawa, R., Miyachi, S., Hanawa, H., et al., Differential Characteristics of HIV-based vs. SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neuroscience Res.* In press
4. Miyake, K., Miyake, N., Shimada, T., Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. *J. Biotech.* In press
5. Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., et al., Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human α -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.* 51:341-52, 2006
6. Kawabata, K., Migita, M., Mochizuki, H., et al., Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res.* 1094: 13-23, 2006
7. Kinoshita, H., Watanabe, A.,

Hisayasu, S., et al., Targeted gene delivery to selected liver segments via isolated hepatic perfusion. J. Surg. Res. in press

2. 学会発表

- 1) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Suzuki, H., Shimada, T. A single unilateral injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in bilateral expression and widespread distribution of ASA and prevention of sulfatide storage in the whole brain of MLD model mice American Society of Gene Therapy 9th Annual Meeting (Baltimore) 2006. 6
- 2) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Shimada, T. Co-injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in wide spread distribution of ASA and correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (Makuhari) 2006. 9
- 3) Shimada, T. Local and systemic gene therapy for metachromatic leukodystrophy. 3rd annual world symposium of Lysosomal disease network (Orlando) 2006, 12
- 4) Kurai, T., Shimada, T. Correction of metachromatic leukodystrophy in a mouse model by AAV1 mediated co-expression of ASA and FGE. The 12th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2006. 8

平成18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）に関する調査研究班
分担研究報告書

ウイルスベクターを用いたKrabbe病に対する遺伝子治療

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科教授

研究要旨：ライソゾーム病のうちでも進行性に脱髄をきたす致死
的疾患であるKrabbe病に対する遺伝子治療の基礎的研究を行っ
た。一部改変したHIV由来の安全性の高いレンチウイルスベクター
に原因欠損遺伝子であるGALCを挿入した組換えウイルスを作成し
た。これを新生児マウスに静脈注射し、各臓器での発現を確認し
たところ1週間後の肝臓において有意な発現は見られたが、症状発
現の遅延や延命といった表現系の改善には至らなかった。

研究協力者

小林博司（東京慈恵会医科大学講師）

A. 研究目的

Krabbe病は進行性致死性神経難病であり、原因となる欠損酵素GALC発現遺伝子を導入することにより、脱髄の進行を抑制し症候を改善させることによる遺伝子治療をモデルマウスを用いて検討する。

B. 研究方法

- (1) Krabbe病の原因遺伝子GALCをベクタープラスミドに挿入し、co-transfectionにより組み替えレンチウイルスベクターを精製する。ウイルス力価は同時に組み込まれたGFPの発現を293細胞においてFACSにて計測する。
- (2) Krabbe病モデルマウスであるTwitcher mouseを交配し遺伝子診断によりHomozygoteマウスを選別し日令1-2の新生児マウスに対し、顔静脈より1回当たり50-100・1投与する。
- (3) 治療群と未治療群において体重増加、Twitching(尾の震え)などの症状発現、および各臓器におけるGALC酵素活性の発現、病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

- (1) 動物実験は全て慈恵医大動物実験センター委員会の倫理指針に従っている。
- (2) また組み換えウイルスベクター作成に関しても慈恵医大組換えDNA委員会、および倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

- (1) 今回精製された組換えレンチウイルスベクターは力価として 1.5×10^8 TU/mlであった。更に感染導入効率を高めるため感染時にpolybrene 8mg/ml, Chondroitin Sulfate 8mg/mlを同時に加えるなどの検討を行った。
- (2) 細胞株への感染実験では293A細胞、HepG2細胞株などにおいてdose dependentな酵素・GFPの発現結果が得られた。
- (3) 治療群と未治療群において体重増加、Twitching(尾の震え)などの症状発現、および寿命といった表現型は有意な差異が見られなかった。
- (4) 投与1週間後にマウスをsacrificeし、各臓器での酵素発現を検討した結果、肝臓において投与群に活性上昇が見られたが、中枢神経系には差は見られなかった。

E. 結論

組換えレンチウイルスはKrabbe病の遺伝子治療に有用なベクターであるが、モデルマウスでの結果は十分とはいえ、今後プロモータ領域などベクター構造、ウイルス力価、投与方法などにおいて改善の余地があると考えられた。

F. 研究発表

1. 学会発表

【学会発表】

1. 小林博司, 森田麻子, 大橋十也, 衛藤義勝. レンチウイルスを用いたKr

abbe病モデルマウスの遺伝子治療.
第48回日本小児神経学会総会. 舞
浜, 2006. 6

2. Kobayashi H, Morita A, Ohashi T,
Eto Y. Lentivirus mediated gene
therapy for Krabbe disease. The
10th International Congress of I
nborn Errors of Metabolism. Mak
uhari, Sept. 2006
3. Kobayashi H, Morita A, Ohashi
T, Eto Y. Lentivirus mediated
gene therapy for Krabbe disease.
The 12th Annual Meeting of Japa
n Society of Gene Therapy. Tokyo,
August. 2006

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

β -ガラクトシダーゼ欠損症に対する新しい分子治療法の開発

分担研究者 鈴木 義之 国際医療福祉大学大学院教授
研究協力者 一ノ宮悟史 国際医療福祉大学大学院

研究要旨

G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的検査法を確立し、病型、重症度、月齢との相関を解析した。脳障害の進行とともに評価スコア値が上昇した。シャペロン化合物NOEVを G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスに経口投与し、神経学的評価を行った。シャペロン療法がマウスの脳障害発生予防に効果のあることを示した。

A. 研究目的

われわれが提唱するケミカルシャペロン療法の対象としての G_{M1} -ガングリオシドーシスの神経学的検査法を開発し、その成果をもとにシャペロン化合物NOEV (N-octyl-4-epi- β -valienamine) の効果を調べた。

B. 研究方法

すでに確立した完全ノックアウト重症型およびR201C型トランスジェニック軽症型 G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの臨床経過を正常野生型マウスと比較検討した。姿勢・肢位、自発運動、反射運動など11の検査項目を選び、それぞれの異常度を4段階のスコアに分類した。

シャペロン治療実験のために新しい有機合成化合物NOEVを軽症型モデルマウスに経口投与し、その臨床経過をこの新しい神経学的評価法により判定した。

C. 研究結果

正常および疾患モデルマウスは生後2-4ヶ月で総スコア値に差が出現し、加齢とともに著明となった。正常マウスでは生後18ヶ月まで、総スコア値は常に5未満であった。軽症型マウスは生後5ヶ月よりスコア値の異常が明らかになり、生後15ヶ月で15-20まで上昇した。重症型マウスのスコア値は生後2ヶ月以後異常となり、生後半年以後は20-30まで上昇した。NOEV投与実験により、投与開始数カ

月後、総スコア値上昇傾向が抑制された。

D. 考察

新しく開発した神経学的評価法は、 G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの重症度や臨床的進行の評価に有用であった。そして今後進める予定のシャペロン療法動物実験の効果判定にも使うことができるかと期待される。

E. 結論

この新しい神経学的評価法の妥当性を、疾患モデルマウスの時間経過を追うことにより確認した。これは今後多くの他の疾患モデルマウスの簡易評価法として適用が可能であろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. J Inherit Metab Dis 29: 471-476, 2006.
2. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, et al: Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. Brain Dev 28: 482- 486, 2006.
3. 鈴木義之: ケミカルシャペロン. 小児科診療 69: 1710-1715, 2006.

4. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, et al:
 β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis):
 G_{M1} -Gangliosidosis and Morquio B disease.
 Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D,
 Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds): The
 Online Metabolic and Molecular Bases of
 Inherited Disease, McGraw-Hill, New York,
 <<http://genetics.accessmedicine.com/>>.2006.
5. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, et al:
 Neurological assessment of G_{M1} -gangliosidosis
 model mice. Brain Dev 29: 210-216, 2007.
6. Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y: Development and
 medical application of unsaturated carboglyco-
 sylamine glycosidase inhibitors. Mini Rev Med
 Chem, in press, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録
 なし

学会発表

1. 鈴木義之: 遺伝性ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法. 第25回分子病理学研究会東京シンポジウム, 東京, 2006.8.4-5.
2. 鈴木義之: モデルマウスを用いた G_{M1} -ガングリオシドーシスの新しい治療法開発. 第29回日本人類遺伝学会大会, 米子市, 2006. 10. 17-20.
3. Suzuki Y, Ichinomiya S, Maruyama K, Toda H, Watanabe H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J: Mouse neurology: neurological assessment of G_{M1} -gangliosidosis model mice. 35th Annual Meeting of the Child Neurology Society Meeting, Pittsburgh, 2006. 10. 18-21
4. 一ノ宮悟史, 渡辺浩史, 松田潤一郎, 丸山貴美子, 戸田寛子, 岩崎博之, 黒澤美枝子, 飯田真己, 小川誠一郎, 鈴木義之: シャペロン療法モニタリングのためのマウス神経学的評価法の開発. 第12回ライソゾーム病研究会, 東京, 2006. 11. 24-25.
5. Suzuki Y: Molecular approaches to neuro-genetic diseases: G_{M1} -gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt 2007. 1. 25-26.