

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

ライソソーム病の細胞治療用の移植細胞の開発研究

分担研究者：北里大学医療衛生学部再生医学寄附講座 桜川宣男客員教授

研究要旨 ヒト羊膜 SP(side population)細胞の分離、培養法を確立してその性質検討を行った。未分化細胞マーカーである Oct4 の発現は、経時的培養細胞（P12 まで）において確認された。また骨芽、軟骨及び脂肪細胞への分化誘導後に、各々の特異的蛋白質の発現（免疫染色）および遺伝子発現（RT-PCR）を確認した。また本細胞は各種のライソソーム酵素活性を含有していることを証明した。従来の研究により明らかにされているように、羊膜由来の SP 細胞もライソソーム病の細胞遺伝子治療用の細胞ベクターとしての有用性が示唆された。

A. 研究目的

ライソソーム病に対する細胞遺伝子治療法を確立するために、移植可能で遺伝子導入できる細胞の樹立を目的とする。そしてヒト羊膜間葉細胞の SP 細胞の細胞生物学的性質を検討し、中胚葉系譜への多分化能を検討した。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを施行して、予定帝王切開分娩時に胎盤を入手した。2段階酵素処理により、羊膜上皮細胞と羊膜間葉細胞を分離した。分離後直ちに Hoechst 33342 染色をおこない、FACS を用いて SP 細胞を分離した。未分化細胞マーカーである Oct 4 の発現を経時的に解析した。また種々の表面抗原を用いて、本細胞の性質検討を行った。次に骨芽、軟骨、脂肪細胞への分化誘導を行い、各細胞に特異的なマーカー遺伝子（RT-PCR）または蛋白質（免疫染色）を検索して、分化能を評価した。

（倫理面への配慮）

本件研究の実施にあたり、大学の倫理委員会において研究の承認を得た。

C. 研究結果及び考察

FACS により分離した SP 細胞は継代培養を続けても（P12 まで）OCT4 を発現していた。骨芽細胞への分化誘導後、アルカリフォスファターゼ活性およびカルシウムの蓄積、各骨芽細胞特異的蛋白質、遺伝子の発

現を検出した。軟骨細胞誘導後では、軟骨細胞マーカーを検出した。さらに脂肪細胞誘導後、細胞内に油滴の発生が観察され、Oil Red 染色で陽性であった。

つぎに SP 細胞内の各種ライソソーム酵素活性を測定したところ、 β -galactosidase, β -glucosidase, β -hexosaminidase, iduronate-2-sulfatase, arylsulfatase の酵素活性が高いことが判明した。

D. 考察

Kosuge et al は羊膜上皮細胞に β glucuronidase 遺伝子を導入し、同酵素欠損の動物モデル（MPS VII 型モデルマウス）の脳内に移植した結果、脳内の欠損酵素活性の上昇と、ムコ多糖の異常蓄積の消失を証明した。そこで本細胞もライソソーム酵素の遺伝子導入を行うことにより、他家移植用の細胞遺伝子治療に使用可能であることが示唆された。今後は、モデル動物による細胞治療の効果を判定する必要がある。近未来に、欠損酵素導入した細胞ベクターを構築し、ライソソーム病の細胞遺伝子治療が期待される。

E. 結論

ヒト羊膜由来の SP 細胞の分離、培養法を確立し、その性質検討を行った。本細胞は、未分化状態を維持しながら増殖し、骨芽、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなった。また種々のライソソーム酵素を含有し、これらの酵素遺伝子を導入した細胞ベクターの構築が可能で

あることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, et al: Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J. Exp Med.* 209: 23-32, 2006
- 2) Hori J, Wang MC, Kamiya K, et al: Immunological Characteristics of Amniotic Epithelium. *Cornea*: s53-58, 2006
- 3) Kikuchi A, Tomoyasu H, Kobayashi M, et al: Immunological and neurological roles of 80-kDa and 100-kDa haemopoietic factors. In Press in "Proceedings of 8th International Congress of Neuroimmunology", Ed: T. Tabira, Publisher: Medimond International Proceedings
- 4) Kamo I, Tomoyasu H, Kobayashi M, et al: Studies on myoid cells in hyperplastic myasthenia gravis In Press in "Proceedings of 8th International Congress of Neuroimmunology", Ed: T. Tabira, Publisher: Medimond International Proceedings

2. 学会発表

- 1) 小林 護、八鍬拓士、横山安伸、他：新規多分化能細胞としてのヒト羊膜由来 Side Population (SP) 細胞についての検討。第 24 回日本ヒト細胞学会。東京, 2006.7
- 2) 小林護、八鍬拓士、横山安伸、他：ヒト羊膜 Side population (SP) 細胞の HLA 発現解析と間葉系幹細胞様細胞

の分離。第 21 回日本生殖免疫学会。東京, 2006.12

- 3) 小林 護、八鍬拓士、横山安伸、他：ヒト羊膜上皮細胞から分離した Side Population(SP)細胞の細胞生物学的性質について。第 6 回日本再生医療学会。神奈川, 2007.3
- 4) 八鍬拓士、小林護、横山安伸、他：ヒト羊膜由来 Side Population細胞の中胚葉系細胞への分化誘導。第 6 回日本再生医療学会。神奈川, 2007.3
- 5) Kikuchi A, Tomoyasu H, Kobayashi M, et al: Immunological and neurological roles of 80-kDa and 100-kDa haemopoietic factors. The 8th International Congress of Neuroimmunology .Nagoya, Japan, 2006.10
- 6) Kamo I, Tomoyasu H, Kobayashi M, et al: Studies on myoid cells in hyperplastic myasthenia gravis. The 8th International Congress of Neuroimmunology. Nagoya, Japan. 2006.10
- 7) Kikuchi A, Kobayashi M, Sakuragawa N, et al: Effects of myoid cell factors on B-cell development in myasthenic thymus 20th IUBMB. International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. 2006.6

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 特許取得：研究期間内はなし。
- 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推進事業)
分担研究報告書

ゴーシェ病の中樞神経障害に対する治療法の開発

分担研究者 大野 耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科教授

研究要旨：グルコース類似体 N-octyl- β -valienamine (NOV) は、 β -glucosidase (β -Glu) F213I 変異体に対して酵素活性増強効果(enzyme enhancement activity: EEA)を示す (Lin H, et al., Biochim Biophys Acta 2004)。NOV および関連薬物を用いたゴーシェ病に対する酵素増強療法 (enzyme enhancement therapy:EET) の可能性を検討する目的で、まず F213I 以外に NOV が有効である β -Glu 変異体をスクリーニングし、N188S、N370S、G202R の各変異に対しては有効であるが、G193W, L444P, D409H に対しては無効であることを明らかにした。次に、NOV よりも強い EEA を持つ薬物をスクリーニングし、N-dodecyl- β -valienamine が NOV と同等かそれよりも強い EEA を持つことを発見した (Lei K, et al. Biochim Biophys Acta 2007 in press)。F213I, N188S, G202R の各変異は中枢神経症状を伴うゴーシェ病の原因となることが分かっている。従って、NOV および関連薬物による EET は中枢神経症状を伴うゴーシェ病に対して有効な治療法となる可能性がある。

A. 研究目的

ゴーシェ病に対する治療法として酵素補充療法(enzyme replacement therapy:ERT)と基質除去療法(substrate reduction therapy:SRT)の2つが確立されているが、どちらの治療法も中枢神経症状に対しては無効である。私たちは、中枢神経症状に対して有効な第3の治療法としてゴーシェ病に対する酵素増強療法(enzyme enhancement therapy:EET)の可能性を追求している。これまでに、グルコース類似体 N-octyl- β -valienamine (NOV) が、 β -glucosidase (β -Glu) F213I 変異体に対して酵素活性増強効果(enzyme enhancement activity: EEA)を示すことから、この分子が変異 β -Glu に対してシャペロンとして働く可能性を報告した (Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004)。NOV および関連薬物を用いた EET の可能性を検討するために、以下の3つの目標を設定した。① F213I 以外に NOV が有効である β -Glu 変異体

をスクリーニングする、② NOV よりも強い EEA を持つ薬物をスクリーニングする、③ 個体レベルでの NOV の EEA を検証する。本稿では①②の2点についての研究成果を報告する。

B. 研究方法

1. ヒト皮膚繊維芽細胞および COS 細胞発現系での NOV の効果の検討。
正常人由来細胞及びゴーシェ病患者由来細胞 9 種類 (F213I/F213I, N370S/84GG, G202R/L444P, N188S/G193W, N370S/N370S [DMN00.41, DMN87.30], nt1447del20insTG/L444P, nt1447del20insTG/?, D409H/?) を用いて、NOV の EEA を検討した。さらに、COS 細胞に Flag-標識 β -Glu (wild-type および 6 種類の変異体 : N188S, G193W, G202R, F213I, N370S, L444P) を一過性に発現させ、抗 Flag 抗体免疫沈降産物中の酵素活性を測定した。

2. NOV および関連薬物の効果の検討。

種々の長さのアルキル基をもつ N-alkyl- β -valienamine を生合成し、その wild-type β -Glu 阻害効果と F213I β -Glu に対する EEA を比較した。用いた化合物を図 2a に示す。

C. 研究結果

1. ヒト皮膚繊維芽細胞および COS 細胞発現系での NOV の効果

ヒト皮膚繊維芽細胞を NOV 存在下で 4 日間培養し、ライセート中の酵素活性を測定したところ、NOV は F213I/F213I, G202R/L444P, N188S/G193W, N370S/N370S の変異を持つ細胞に対して有効であったのに対し、N370S/84GG, nt1447del20insTG/L444P, nt1447del20insTG/?、D409H/? の変異を持つ細胞に対しては無効だった。Scripps Institute の Dr. Kelly のグループは、N370S, G202R 変異体に対して NN-DNJ (N-nonyl-deoxynojirimycin) がシャペロンとして有効であることを報告しているの、NOV を NN-DNJ の EEA を比較したところ、同じ濃度で NOV は NN-DNJ よりも高い効果を示した。

次に、COS 細胞に Flag-標識 β -Glu を一過性に発現させ、NOV で処理した。N188S、N370S、G202R 変異体では、NOV は抗 Flag 抗体免疫沈降産物中の酵素活性を増加させたが、G193W、L444P、D409H に対しては無効だった。酵素活性の増加は蛋白質量の増加を伴っていた。

以上、ヒト皮膚繊維芽細胞と COS 細胞発現系での NOV の効果の選択性はおおむね一致しており、NOV は N188S、N370S、G202R の各変異に対してはシャペロンとして有効であるが、G193W、L444P、D409H に対しては無効である。N188S、N370S、G202R は触媒活性をもつドメイン III に位置するのに対して、

G193W、L444P、D409H はその他のドメインに位置する (図 1)。この結果は従って、アミノ酸変異がドメイン III に位置することが NOV による変異酵素安定化の必要条件であることを示唆する。

2. NOV および関連薬物の効果

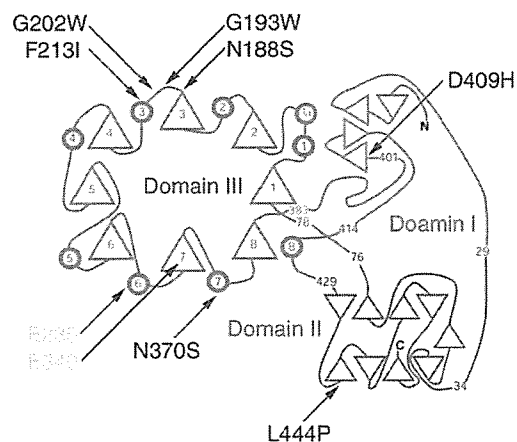


図 1 β -Glu の 3 次構造と各変異の位置 E235、E340 は触媒活性の中心に位置すると考えられているグルタミン酸残基を示す。

種々の長さのアルキル基をもつ N-alkyl- β -valienamine のうち、2 つのアルキル基をもつ化合物 f が最も強い β -Glu 阻害効果を示したが、この化合物は F213I β -Glu に対して EEA を示さなかった (図 2b)。N-dodecyl- β -valienamine は NOV と同等かそれよりも強い EEA を示した (図 2c)。これらの結果は、 β -Glu 阻害効果と EEA は相関しないこと、N-alkyl- β -valienamine の EEA には、適当な長さのアルキル基がひとつ存在することが必要であることを示している。

D. 考察

NOV は N188S、F213I、N370S、G202R の各変異に対してはシャペロンとして有効である。一方、NOV を含む N-alkyl- β -valienamine の EEA には、適当な長さのアルキル基がひとつ存在すること

が必要である。

F213I, N188S, G202R の各変異は中枢神経症状を伴うゴーシェ病の原因となることが分かっている。また、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。従って、NOV および関連薬物による EET は中枢神経症状を伴うゴーシェ病に対して有効な治療法となる可能性がある。

現在、F213I β -Glu を導入したトランスジェニックマウスを作製中で、これができ次第 β -GluK0/F213I β -Glu TG マウスを作製し、NOV の *in vivo* での効果を検証する予定である。

E. 結論

NOV は β -Glu 変異体に対する分子シャペロンとして働くが、その効果には選択性があり、N188S、F213I、N370S、G202R の各変異に対しては有効であるが、G193W、L444P、D409H に対しては無効である。また、N-dodecyl- β -valienamine は NOV と同等かそれよりも強い EEA を持つ。

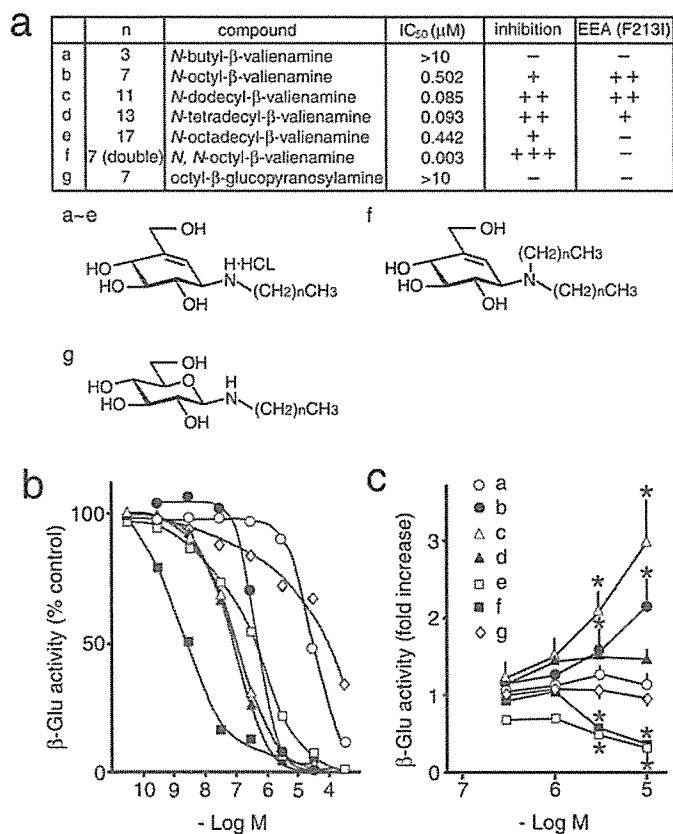


図 2 NOV および関連薬物の効果

a. N-alkyl- β -valienamine の β -Glu 阻害効果と F213I β -Glu に対する EEA の比較。b. ヒト皮膚繊維芽細胞抽出物を用いた各化合物の β -Glu 阻害効果。c. COS 細胞発現系での F213I β -Glu に対する各化合物の EEA。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lei K., Ninomiya H., Suzuki M., Inoue T., Sawa M., Iida M., Ida H., Eto Y., Ogawa S., Ohno K. and Suzuki Y. (2007) Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* in press.

2. 学会発表

Ohno K, Lei K, Luan Z, Inoue T, Ninomiya H, Nanba E, Suzuki Y. Activity of N-octyl-beta-valienamine for b-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. 10th International Child Neurology Congress, Montreal (Canada), June 11-16, 2006.

H. 知的所有権の取得状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

衛藤 義勝

【論文発表】

1. Ohashi T, Eto Y: Cell Therapy for Peripheral Disease and Reconstructive Applications: Transplants for Lysosomal Storage Disease. Cellular Transplantation From Laboratory to Clinic. C.R.Halberstadt, D.F.Emerich. (edit):Elsevier Inc, pp205-213, 2007
2. Kobayashi H, Watabe K, Izuka S, et al: Successful Transduction of Mammalian Astrocytes and Oligodendrocytes by Pseudotyped Baculovirus Vector in Vitro and in Vivo. Jikei Medical Journal53(2):55-62, 2006
3. Shiba H, Okamoto T, Futagawa Y, et al: Adenovirus vector-mediated gene transfer using degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma in rats. J Surg Res133(2):193-196, 2006
4. Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol24(11):1689-1699, 2006

【特別講演、講演会、シンポジウム】

1. Eto Y. Gene Therapy and Cell Therapy in neurogenetic disorders. 第2回ヨーロッパ神経遺伝学会. Rostock, Oct. 2006
2. 衛藤義勝. 成人にみられる代謝異常症—最近の治療の進歩. 熊本医師会. 熊本, 2006. 10
3. Eto Y. Novel treatment for neurogenetic disorders. T The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba, Sep. 2006
4. Eto Y. Gene Therapy and Cell Therapy in Lysosomal Storage Disease. The 12th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, Aug. 2006
5. 衛藤義勝. 脳を治す—遺伝性神経疾患の治療は可能か. 第48回日本小児神経学会. 舞浜, 2006. 6
6. 衛藤義勝. ファブリー病の最近の治療に関して. 日本ファブリー病研究会. 新潟, 2006. 5
7. Eto Y. Female Fabry disease. International Symposium of Lysosomal Disease. Stockholm, April. 2006
8. Eto Y. Cell Therapy and Gene Therapy Lysosomal disease. Taipei, March. 2006

【学会発表】

1. Kobayashi M, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Clinical manifestations of Japanese heterozygotes with Fabry disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sep. 2006
2. Qiu WJ, Izuka S, Ohashi T, Eto Y. Correction of The alpha-Galactosidase A

- deficiency and Reduction of Glycolipid Storage in Fabry Mice Receiving Transduced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sep. 2006
3. 月花環, 林孝彰, 竹内智一, 久保朗子, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝, 北原健二. 新規 OAT 遺伝子変異を認めたビタミン B6 非反応性脳回状脈絡網膜萎縮の同胞例, 第 60 回臨床眼科学会. 京都, 2006. 10
 4. 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 Krabbe 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
 5. Kobayashi H, Morita A, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sept. 2006
 6. Kobayashi H, Morita A, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. The 12th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, August. 2006
 7. 小林博司, 有賀賢典, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝. ムコ多糖 I 型日本人女性の継続的な酵素補充による治療経過について. 第 12 回日本ライソゾーム研究会. 東京, 2006. 11
 8. 小林博司, 井田博幸, 大橋十也, 船塚真, 宍倉啓子, 鈴木よう子, 大澤真木子, 衛藤義勝. 遅発型 Pompe 病日本人男性に対する酵素補充療法. 第 1 回日本ポンペ病の会. 東京, 2006. 11

鈴木 義之

【論文発表】

1. Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y: Development and medical application of unsaturated carbaglyco- sylvamine glycosidase inhibitors. Mini Rev Med Chem, in press, 2007.
2. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, et al: Neurological assessment of GM1-gangliosidosis model mice. Brain Dev 29: 210-216, 2007.
3. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. J Inherit Metab Dis 29: 471-476, 2006.
4. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, et al: Fibroblast screening for chaperone therapy in α -galactosidosis. Brain Dev 28: 482- 486, 2006.
5. 鈴木義之: ケミカルシャペロン. 小児科診療 69: 1710-1715, 2006.
6. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, et al: β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1-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.

【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GM1-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 GM1-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: GM1-gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt 2007. 1. 25-26.

芳野 信

【論文発表】

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

【学会発表】

1. 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, September, 2006.

田中あけみ

【論文発表】

1. 坂口(梶田)知子, 田中あけみ, 山野恒一: ジメチルメチレンブルー呈色反応による尿のムコ多糖症スクリーニング法: 見逃し症例に基づく反省と方法の再検討, 日本マススクリーニング学会誌, 印刷中 2007

2. Maeda M, Namikawa K, Kobayashi I, Ohba N, Takehara Y, Kadono C, Tanaka A, Kiyama H: Targeted gene therapy toward astrocytoma using a Cre/loxP-based adenovirus system. *Brain Res.* 1081; 34-43, 2006
3. 田中あけみ、澤田智、藤岡弘季、山野恒一: Hurler 病の 1 症例における酵素補充療法の効果. *日本小児科学会雑誌*, 110; 945-950, 2006
4. 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
5. 田中あけみ: ムコ多糖症における骨髄移植ほどの程度有効か?, 五十嵐隆、石井正浩、滝田順子、平岩幹男、水口雅、横田俊平、横谷進、渡辺とよ子編, *小児疾患の治療*, 中外医学社, 東京, pp270-274, 2006
6. 田中あけみ: ムコ多糖症, 渡辺博編, 「小児の治療指針」小児科診療増刊号, 診断と治療社, 東京, pp546-550, 2006
7. 田中あけみ: 肝型糖原病, 竹井謙之、川崎誠治編, 「消化器疾患」別冊医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp594-597, 2006
8. 田中あけみ: Wolman 病, 別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ, 日本臨床社, 東京, pp750-752, 2006

【学会発表】

1. Tanaka A, Sawada T, Seto T, Yamano T: Efficacy estimation of bone marrow transplantation on the brain in mucopolysaccharidosis type II: a comparative study with natural histories. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sep. 2006

島田 隆

【論文発表】

1. 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. 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
3. 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
4. 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 mitochromatic leukodystrophy. *Mol.*

Ther. 15: 38-43, 2007

5. 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
6. Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., et al., Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human alpha-galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.* 51:341-52, 2006
7. 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

【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
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

酒井 規夫

【論文発表】

1. Waguri S, Tomiyama Y, Sakai N, et al., The luminal domain participates in the endosomal trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Exp Cell Res.* 312 (20): 4090-107, 2006
2. Xu C, Sakai N, Taniike M, et al., Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation., *J Hum Genet* 51(6):548-554, 2006

3. Gordillo M, Vega H, Sakai N, et al., Characterization of the sensitivity of lymphoblastoid cell lines to various stress agents in Roberts syndrome., *Med J Osaka Univ* 49 (1-4): 29-41, 2006
4. 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.* 28(1):60-2, 2006
5. 酒井規夫、神経症状でみつかるとる先天代謝異常症 *小児科診療* 69; 1579-84, 2006
6. 酒井規夫、ロイコジストロフィー、*小児科診療 増刊号、小児の治療指針* 69, Suppl 553-555, 2006
7. 酒井規夫、ムコ多糖症、*小児内科、小児外科、小児疾患の診断治療基準*、38 Suppl 71, 2006

【学会発表】

1. Sakai N, Xu C, Taniike M, Inui K, Ozono K. Six novel mutations detected in the GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, 06.09.12-16
2. Otomo T, Sakai N, Nabatame S, Okinaga T, Takizawa S, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Taniike M, Ozono K. Neurological improvement of hematopoietic stem cell transplantation on late-onset Krabbe disease; two years' clinical course of siblings. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, 06.09.12-16
3. Akagi M, Miyoshi Y, Sakai N, Taniike M, Ozono K. Novel mutations of ZMPSTE24 in a Japanese family with madibuloacral dysplasia. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, 06.09.12-16
4. 酒井規夫. 小児の白質ジストロフィー. 第 33 回大阪大学阪神地区小児科勉強会 ; 神戸 06.9.7

高田 五郎

【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.
- 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.
 - 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.
 - 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.

高柳 正樹

【学会発表】

- Yorifuji T, Kawai M, Takayanagi M et.al.: Mutation analysis of GNPTA gene in Japanese patients with I-cell disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Japan, 2006

大野 耕策

【論文発表】

- Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Suzuki Y. Enzyme enhancement activity of N-octyl- β -valienamine on β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* in press 2007
- Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of Signal Transducers and Activators of Transcription in Niemann-Pick Disease Type C (NPC) Fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J Neurosci* in press 2007
- Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Cholesterol depletion facilitates

ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4. J Cell Sci. 119:2643-2653, 2006

【学会発表】

1. Ohno K, Lei K, Luan Z, Inoue T, Ninomiya H, Nanba E, Suzuki Y. Activity of N-octyl-beta-valienamine for b-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. 10th International Child Neurology Congress, Montreal (Canada), June 11-16, 2006.

難波 栄二

【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. 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

【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: GM1-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 GM1-gangliosidosis mice brains. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, (ICIEM), 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, (ICIEM), 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, (ICIEM), 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

鈴木 康之

【論文発表】

1. Kato T, Kato Z, Kuratsubo I, Ota T, Orii T, Kondo N, Suzuki Y: Evaluation of ADL in patients with Hunter disease using FIM score. *Brain and Development* (2007, in press)
2. Tomomi Kato, Koji Isogai, Koji Orii, Izumi Kuratsubo, Naomi Kondo, Tadao Orii and Yasuyuki Suzuki: Portal hypertension in a patient with Hunter disease. *J Inherit Metab Dis* 29(5):686, 2006
3. 鈴木康之：骨症状で見つかる先天代謝異常症. 日常診療での先天代謝異常症. *小児科診療* 69 : 1590-1594, 2006

【学会発表】

1. Suzuki Y, Kato T, Kuratsubo I, Orii T, Kondo N: ADL in patients with Hunter disease. 10th International Congress of Inborn Error of Metabolism. 2006. 9. 12-16, Makuhari
2. Kuratsubo I, Suzuki Y, Orii K, Kato T, Orii T, Kondo N: Neuropsychological aspects of mucopolysaccharidosis type II with milder phenotypes. 10th International Congress of Inborn Error of Metabolism. 2006. 9. 12-16, Makuhari
3. Suzuki Y, Kato T, Kato Z, Orii T, Kondo N: Mutational and Structural Analysis of Japanese Patients with Mucopolysaccharidosis type II. 9th International Symposium on mucopolysaccharide and related diseases. 2006. 6. 29-7. 2 Venice
4. Suzuki Y, Kato T, Kuratsubo I, Orii T, Kondo N: Evaluation of ADL in Hunter Disease Using FIM Score. 9th International Symposium on mucopolysaccharide and related diseases. 2006. 6. 29-7. 2 Venice

桜庭 均

【論文発表】

1. Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., Tajima, Y., Kotani, M.,

- Ohshima, T., Chiba, Y., Takashiba, M., Jigami, Y., Fukushige, T., Kanzaki, T., Itoh, K. : Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J. Hum. Genet.*, 51: 180-188, 2006.
2. Oheda, Y., Kotani, M., Murata, M., Sakuraba, H., Kadota, Y., Tatano, Y., Kuwahara, J., Itoh, K. : Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology*, 16: 271-280, 2006.
 3. Tatano, Y., Takeuchi, N., Kuwahara, J., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., Itoh, K. : Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal β -galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuraminidase-1 deficiencies. *J. Med. Invest.*, 53: 103-112, 2006.
 4. Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Takaoka, Y., Jigami, Y., Takahashi, H., Hirai, Y., Shimada, T., Hashimoto, Y., Ishii, K., Kobayashi, T., Watabe, K., Fukushige, T., Kanzaki, T. : Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human α -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, 51: 341-352, 2006.
 5. Kawashima, I., Takeuti, I., Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Inomata, T., Izumi, T., Sakuraba, H. : Phospholipid storage in the myocardium of a unique Japanese case of idiopathic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta.*, 372: 154-157, 2006.
 6. Tatano, Y., Takahashi, T., Tsuji, D., Takeuchi, N., Tsuta, K., Takada, G., Ohsawa, M., Sakuraba, H., Itoh, K. : Significant decrease in tropoelastin gene expression in fibroblasts from a Japanese Costello syndrome patient with impaired elastogenesis and enhanced proliferation. *J. Biochem.*, 140: 193-200, 2006.
 7. Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., Itoh, K. : Molecular pathogenesis and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases. *Curr. Drug Targets - Central Nervous System and Neurological Disorders.*, 5: 401-413, 2006.
 8. 桜庭 均 : α -galactosidase A. *腎と透析*, 61: 288-290, 2006.
 9. Kawashima, I., Ohsawa, M., Fukushige, T., et al. : Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin. Chim. Acta*, 378: 142-146, 2007.

【学会発表】

1. 田北博保, 村山耕一郎, 斉藤純代, 島田佳明, 村田真衣, 桜庭 均, 米谷 新: ガラクトシアリドシスの眼所見と網膜機能. 第 110 回日本眼科学会総会, 2006. 4. 13-16, 大阪.
2. 桜庭 均: Sandhoff 病モデルマウス胎児終脳由来のニューロスフェアおよび神経細胞の樹立. CREST プロジェクト: 糖鎖機能を利用した組み換えリソソーム酵素の新規脳内補充療法の開発. 第 6 回チームミーティング, 2006. 5. 30, 徳島.
3. 桜庭 均, 渡部和彦: ファブリー病マウス由来シュワン細胞株の樹立とその組み換えヒト α -ガラクトシダーゼの取り込み効果. 第 48 回日本小児神経学会, 2006. 6. 1-3, 東京.
4. 桜庭 均: 先天性代謝異常症の分子病態解明と診断および治療法の開発. 神奈川科学技術アカデミー, 2006. 6. 6, 東京
5. Murayama, K., Shimada, Y., Takita, H., Otake, A., Murata, M., Sakuraba, H., Yoneya, S.: Electrophysiological and clinical aspects of adult-form galactosialidosis. 44th Annual Symposium of International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. 2006. 6. 11-16, Fontevraud, France
6. Tajima, Y., Uyama, E., Go, S., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Kitajima, K., Sakuraba, H.: Distal myopathy with rimmed vacuoles impaired O-glycan formation in muscular dystrophy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan
7. Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Sakuraba, H., Itoh, K.: Effects of amino acid substitutions on intracellular processing and protective function of human cathepsin A revealed on structural modeling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan
8. Kawashita, E., Kuroki, A., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Tsuji, D., Matsuoka, K., Sakuraba, H., Itoh, K.: Functional alteration of human-murine chimeric lysosomal β -hexosaminidase A through homology modeling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan
9. Tsuji, D., Kuga, N., Murata, M., Sakuraba, H., Itoh, K.: Analysis of glycoconjugates accumulated in oligodendrocyte precursor cells and Schwann cells derived from Sandhoff disease model mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan
10. Aikawa, S., Matsuzawa, F., Sakuraba, H.: Structural study of lysosomal free

- sialic acid storage disease, Salla disease and infantile sialic acid storage disease. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6.18-23, Kyoto, Japan
11. Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sakuraba, H.: Molecular and structural study of GM2 gangliosidosis B and O variants. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6.18-23, Kyoto, Japan
 12. Tatano, Y., Tsuta, K., Fujinawa, R., Yamamoto, H., Kozutsumi Y., Takeuchi, N., Murata, M., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., Itoh, K.: Up-regulation of chemokine and cytokine expression in skin fibroblasts derived from a Costello syndrome case with impaired elastogenesis. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6.18-23, Kyoto, Japan
 13. 桜庭 均: 糖鎖と遺伝病: リソソーム病をモデルとして. 東京理科大学理工学部応用生物学科特別講義, 2006.6.29, 野田
 14. 桜庭 均: 神経障害を伴うリソソーム病の病態解明と治療に向けて—Sandhoff 病をモデルとして. Cell Biology Summer Meeting 2006, 2006.7.8-9, 箱根 (基調講演)
 15. 小谷政晴, 岡本土毅, 今田正人, 伊藤康一, 入江 敦, 桜庭 均, 久保英夫: RANDAM-2 の発現量を指標としたマウス neurosphere 由来細胞の FACS 解析. 第 29 回日本神経科学学会大会, 2006.7.19-21, 京都.
 16. 桜庭 均: シアリドーシスの生化学的基盤. 中野総合病院 CPC, 2006.7.26, 東京
 17. 笠原由子, 明星裕美, 千葉靖典, 桜庭 均, 川島育夫, 伊藤孝司, 地神芳文: GM2 ガングリオシドーシスに対する酵素補充療法のための HexA の生産と培養細胞による評価. 第 26 回日本糖質学会年会, 2006.8.23-25, 仙台.
 18. Itoh, K., Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Sakuraba, H., Satoh, T., Wakatsuki, S.: Predicted molecular interaction between human lysosomal sialidase (neuraminidase 1) and protective protein/cathepsin A. Sialoglycoscience2006, 5th International Conference, 2006.8.27-30, Mishima, Japan
 19. 桜庭 均: 遺伝性シアル酸代謝異常症の分子遺伝学. 2006 年度東京医科歯科大学神経内科同窓会勉強会, 2006.9.9, 東京
 20. Sakuraba, H.: Decision factors in treating patients with Fabry disease—From structural and biochemical aspects. 9th Annual Asia LSD Symposium. 2006.9.10-12, Makuhari, Japan.
 21. Tajima, Y., Uyama, E., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Kitajima, K., Sakuraba, H.:

- Distal myopathy with rimmed vacuoles: Impaired O-glycan formation in muscular glycoproteins. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2006.9.12-16, Makuhari, Japan
22. Kawashima, I., Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Itoh K., Watabe, K., Sakuraba, H.: Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human beta-hexosaminidase a on the accumulated GM2 ganglioside. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2006.9.12-16, Makuhari, Japan
 23. Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Chiba, Y., Kanzaki, T.: Structural basis of Fabry disease and corrective effect of yeast recombinant human alpha-galactosidase on Fabry mice. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2006.9.12-16, Makuhari, Japan.
 24. Akeboshi, H., Chiba, Y., Kasahara, Y., Takaoka, Y., Ohsawa, M., Kawashima, I., Tsuji, D., Itoh, K., Sakuraba, H., Jigami, Y.: Production of recombinant beta-hexosaminidase A that is applicable to enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis, in methylotrophic yeast. Glycobiology2006, Annual Conference of The Society for Glycobiology, 2006.11.15-18, Los angeles, CA, USA
 25. 川島育夫, 大澤真以, 福重智子, 他. : 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.
 26. 新井田要, 朝本明弘, 尾崎 守, 桜庭 均: I-cell 病の出生前診断の経験. 第27回北陸先天異常研究会, 2006.11.26, 金沢.

北川 照男

【論文発表】

1. 石毛信之、鈴木 健、大和田操, 他: タンデム質量分析計を尿中グロボトリアオシルセラミド測定によるファブリー病のスクリーニングの研究. 日本マス・スクリーニング学会誌、Vol. 16、No. 3 : 69-79, 2006
2. 北川照男、松田一郎、多田啓也, 他: タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報、No. 42 : 28-53, 2006
3. 北川照男、鈴木 健、石毛信之、他: 診断の進歩: マス・スクリーニングの最近の進歩. 小児科診療, 69 : 1595-1601, 2006
4. 北川照男、鈴木 健: 新生児マス・スクリーニング. 産婦人科治療, 92 : 972-976, 2006