

厚生労働省科学研究費補助金

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

平成 16～18 年度総括・分担研究報告書

平成 19（2007）年 3 月

主任研究者

衛 藤 義 勝

## 目次

はしがき	1
研究組織	2
総括研究報告書	
ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究	5
主任研究者 衛藤 義勝	
付1 平成16年度 班会議プログラム	
付2 平成17年度 班会議プログラム	
付3 平成18年度 第1回 班会議プログラム	
付4 平成18年度 第2回 公開班会議プログラム	
分担研究報告書	
ライソゾーム病の実態調査、酵素補充療法の効果、および新規治療の開発に 関する研究	33
衛藤義勝 東京慈恵会医科大学小児科学 DNA 医学研究所	
ライソゾーム病患者における健康関連 QOL および基本的 ADL の調査	40
坪井 一哉 名古屋セントラル病院 血液内科	
尿を用いた Fabry 病の無侵襲ハイリスク・スクリーニングの開発—3 年間のまとめ—	50
北川 照男 (財) 東京都予防医学協会	
ライソゾーム病患者の QOL を向上する方法についての研究	61
高柳 正樹 千葉県こども病院	
ムコ多糖症の ADL、QOL、精神心理に関する研究	63
鈴木 康之 岐阜大学医学部 医学教育開発センター	
ライソゾーム病 (ファブリー病含む) 調査研究	66
田中 あけみ 大阪市立大学大学院医学研究科 医学部 発達小児医学	

ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究	70
松田 純子	
東海大学 未来科学技術共同研究センター	
クラッペ病の病態解析と I-cell 病の変異解析	75
酒井 規夫	
大阪大学大学院医学系研究科 医学部 小児発達医学講座	
ポンペ病の分子病理	80
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	
ニーマンピック病に関する臨床的・分子遺伝学的解析	89
高田 五郎	
秋田大学医学部 小児科学	
ライソゾーム病の病態における血中サイトカインなどの意義	93
芳野 信	
久留米大学医学部 小児科学	
$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究	96
難波 栄二	
鳥取大学生命機能研究支援センター	
ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究	100
奥山 虎之	
国立成育医療センター 遺伝心療科	
ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する研究	103
辻 省次	
東京大学大学院医学系研究科 医学部 神経内科学	
ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究	104
島田 隆	
日本医科大学 生化学第二講座	
$\beta$ -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	108
鈴木 義之	
国際医療福祉大学大学院	
ライソゾーム（ファブリー病含む）に関する調査研究	112
桜川 宣男	
北里大学医療衛生学部再生医学寄附講座	
ゴーシェ病とニーマン・ピック病 C 型の中樞神経症状治療法開発に関する研究	115
大野 耕策	
鳥取大学医学部 脳神経小児科学	
研究成果の刊行に関する一覧表	121

はしがき

今回の平成 16－18 年度に組織された本研究班、ライソゾーム病（ファブリー病を含む）に関する調査研究班では、ADL、QOL、自然歴、酵素補充療法の効果などの実態調査を中心に、臨床基礎両面にわたる多彩な研究が展開されました。臨床像の把握、病態の解明、新規治療法の開発その他有望な結果を得ることができ、ここに 3 年間の総括を報告します。

平成 13 年度より厚生労働省関係各位のご援助により特定疾患としてライソゾーム病が追加され、13－15 年の 3 年間、ライソゾーム病の病態解明および治療法の開発に関する研究班が組織され、一定の成果を収めました。今回の調査研究班はそれに引き続くものとして平成 16 年度より 3 年間組織されたものです。

最後に班員の研究者の方々の多大なご尽力に改めて深謝申し上げます。

主任研究者 衛藤義勝

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）に関する調査研究組織

氏名	所属	職名	分担研究課題
主任研究者 衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学 小児科学・DNA 医学研究所	教授	総括・新しい治療法の開発・酵素補充療法の効果に関する研究
分担研究者 鈴木 義之	国際医療福祉大学大学院	教授	新しい治療法の開発
芳野 信	久留米大学 医学部 小児科学	教授	病態に関する研究
田中 あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科 医学部 発達小児医学	助教授	LSD 患者さんの自然歴に関する研究、骨髄移植療法の効果に関する研究
島田 隆	日本医科大学 生化学第二講座	教授	新しい治療法の開発
酒井 規夫	大阪大学大学院医学系研究科 小児発達医学講座	講師	LSD 患者さんの自然歴に関する研究、病態に関する研究及び調査研究
高田 五郎	秋田大学 医学部 小児科学	教授	病態に関する研究及び調査研究
高柳 正樹	千葉県こども病院	部長	病態に関する研究及び調査研究
大野 耕策	鳥取大学医学部 脳神経小児科学	教授	LSD 患者さんの病態に関する研究、新しい治療法の開発
辻 省次	東京大学大学院医学系研究科 医学部 神経内科学	教授	診断法及び重度臓器障害の予防のための早期診断法の開発に関する研究
難波 栄二	鳥取大学 生命機能研究支援センター	教授	病態に関する研究及び調査研究
鈴木 康之	岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター	教授	LSD 患者さんのADL, QOL に関する研究
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	診断法開発に関する研究
北川 照男	(財) 東京都予防医学協会	理事長	診断法開発に関する研究
桜川 宣男	北里大学医療衛生学部 再生医学寄附講座	客員教授	新しい治療法の開発
奥山 虎之	国立成育医療センター 遺伝心療科	医長	診断法開発に関する研究
坪井 一哉	名古屋セントラル病院	医長	ADL, QOL に関する研究
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	病態に関する研究

# 総括研究報告書

## ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究

主任研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科教授

### 研究要旨

平成13-15年の3年間ライソゾーム病（Lysosomal Storage Disease, LSD）の病態解明および治療法の開発に関する研究班が組織され、それに引き続くものとして平成16年度より3年間、本調査研究班が組織され、主にLSDの（I）自然歴、ADL、QOLといった臨床像に関して、（II）遺伝子解析を中心とした病態解析に関して、（III）新規治療法の開発に関して、さまざまな角度より検討を加えた。

（I）では坪井らによるLSDのQOL、ADLについてのアンケート、北川らによるファブリー病のハイリスクスクリーニング、衛藤らによるファブリー病の酵素補充療法の効果と副作用に関する調査、ファブリー病ヘテロ女性症例に関する臨床調査、高柳らによるGaucher病の早期病型鑑別、鈴木康之らによるムコ多糖症（MPS）IIのADL、QOLおよび精神心理に関してFIM質問紙を用いて検討、また田中らによる同じくII型の治療効果判定指標のための臨床分類、衛藤らによるMPS VI型での全国実態調査、Pompe病の全国実態調査が施行された。

（II）では松田らが新しいスフィンゴリピドーシス疾患モデルマウスとしてサポシンA, D, Cノックアウトマウスを作成、また酒井らによるクラッペ病の日本人変異、Icell病の遺伝子解析、桜庭らによるポンペ病の分子病理、高田らによるニーマンピック病A/B型の実態調査と解析、芳野らによるLSD（Gaucher病、ファブリー病）における血中サイトカインについての検討、鈴木義之らによるβガラクトシダーゼ遺伝子解析とケミカルシャペロン療法に関する研究、奥山らによるMPSの遺伝子解析、酵素補充療法効果の検討、更に辻らによるパーキンソニズムを呈する患者のGaucher病原因遺伝子GBA遺伝子に関する検討が行われた。

（III）では遺伝子治療として島田らによるAAVベクターを用いた異染性白質ジストロフィ（MLD）マウスに対する治療、衛藤らによるレンチウイルスベクターを用いたKrabbe病マウスに対する治療の検討が行われた。また鈴木義之らによるβガラクトシダーゼ欠損症に対するケミカルシャペロン療法、桜川らによるLSDの細胞治療用の移植細胞としてのヒト羊膜細胞の開発研究が行われた。

以上のように多彩な観点から様々な研究がなされ、LSDに苦しむ患者の方々の予後の改善に直結する成果が生まれつつあり、我々としては今後もこれらの研究を発展継続させていく方針である。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設 における職名	
鈴木義之	国際医療福祉大学大学院 教授
芳野信	久留米大学小児科 教授
田中あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科発達 小児医学 助教授
島田隆	日本医科大学学生化学第二教授
酒井規夫	大阪大学大学院医学研究科 講師 小児発達医学
高田五郎	秋田大学小児科教授
高柳正樹	千葉県こども病院部長
大野耕策	鳥取大学医学部脳神経小児科 教授
辻省次	東京大学大学院医学研究科 神経内科 教授
難波栄二	鳥取大学医学部生命機能研究支援セン ター教授
鈴木康之	岐阜大学医学部医学教育開発 研究セ ンター教授
桜庭均	(財) 東京都医学総合研究所東京都 臨床医学総合研究所 参事研究員
北川照男	(財) 東京都予防医学協会 理事長
桜川宣男	北里大学医療衛生学部再生医学寄付 講座 客員教授
奥山虎之	国立成育医療センター遺伝心療科 医長
坪井一哉	名古屋セントラル病院医長
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

#### A. 研究目的

ライソゾーム病は細胞内小器官であるライソゾームに存在する酵素の遺伝的異常により、当該酵素の基質が蓄積し多彩な臨床症状を呈する疾患群である。現在患者数、ADL、QOLなど明らかでない部分も多く、現状を把握することにより行政面、基礎・臨床研究面でも重要な基礎データとなる。また近年骨髄移植、酵素補充などの治療法の発達が著しく、これらの治療をより効果的に行うために早期発見が重要となり、マススクリーニングの開発の必要性がクローズアップされる。更に遺伝子、分子レベルでの各疾患の病態解析も治療法の選択などにも重要な情報を与える可能性がある。また現行の治療では改善の認められない疾患群に対する新しい治療法の開発も予後改

善に大きく寄与すると考えられる。

#### B. 研究方法

##### I. 自然歴などの臨床像の把握

(1) LDのQOL・ADL実態調査：健康関連QOLを測定する包括的尺度としてShort-Form 36-Item Health Survey (SF-36)を使用し、疾患特異的尺度としては新たにゴーシェ病に対してG-QOL調査票、ファブリー病に対してF-QOL調査票、ポンペ病に対してP-QOL調査票、ムコ多糖症に対してM-QOL調査票を作成し、また、基本的ADLの測定する尺度としてFunctional Independence Measure (FIM)を使用し、ライソゾーム病患者のQOLおよびADLの実態調査を開始した。平成16年度は、当院通院中のライソゾーム病患者を対象に、健康関連QOLおよび基本的ADLの評価を行った。平成17年度は、ポンペ病患者における健康関連QOL調査を同意の得られた23症例に行った。平成18年度は、ゴーシェ病患者における健康関連QOL調査を同意の得られた57症例に行った。

##### (2) Fabry病の無侵襲ハイリスク・スクリーニングの開発：

平成16年に、Millsらのタンデム質量分析計を用いた血漿 globotriaosylceramide (GL-3) の測定法を改変して尿GL-3の定量法を開発した。この方法で古典型および心型異型ファブリー病 (FD) ヘミ接合体とヘテロ接合体の尿GL-3を測定した。平成17年度は、血漿と尿の $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -gal A) の活性とELISA法で測定した酵素蛋白値との間には相関関係を調査。平成18年度は、この開発した尿 $\alpha$ -gal A PとGL-3の測定法を使用してFDを疑わせる症状や家族歴のあるハイリスク症例についてFDのスクリーニングを行



った。

### (3) LSDのQOLを向上するする方法に関する

**検討** まずゴーシェ病の病型の早期の鑑別を行い、適切な治療を行うためI型3名、II型1名、III型1名に対して聴力検査、ABRを検討した。また、進行したライソゾーム病患者における在宅呼吸器療法の検討としてテイザックス病とゴーシェ病の各1症例において在宅での人工呼吸器治療(HMV)を行った。更に日本においては希少疾患と思われるサラ病を診断した。

(4) ムコ多糖症(MPSII型)のADL、QOL、精神心理に関する研究: 日本人MPSII29名に対し運動・認知両面のADL評価をFIM質問紙を用いて検討した。

(5) ファブリー病の酵素補充療法に関する調査その他: 1. ファブリー病の酵素補充療法の副作用に関して、出現の有無、出現の時期と時間、回数、症状、対応などをアンケート調査, 更に酵素補充療法の効果に関して、酵素補充療法を受けた患者に2ヶ月から4年の間、血清Cr値、心エコー、心電図を施行・またファブリー病の酵素補充療法の副作用に対するステロイド前投の効果进行调查するため開始2時間前にPSL 0.5 mg/kgの内服を施行。

2. ムコ多糖症(MPS)VI型、ファブリー病女性ヘテロ症例、ポンペ病の自然歴調査のため、アンケート調査を施行した。

(6) MPSIIの臨床分類に関する検討: ムコ多糖症II型は、日本人ムコ多糖症患者の約6割を占め、比較的多いライソゾーム病である。近年、骨髄移植、酵素補充などの治療法が開発され普及しつつあるが、表現型のバリエーションが大きいため、特に神経症状に対する効果判定が困難である。この効果判定の指標のため、II患者22家系24症例について、臨床

分類を試みた。

## II. 病態解析研究

(1) スフィンゴリピドーシス疾患モデルマウスの検討: 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A、BおよびCの特異的欠損症が知られており、それぞれ、クラッペ病様、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。スフィンゴリピドーシス(脂質蓄積症)の中樞神経病変に対する新たな治療戦略を開発することを目的とし、サポシンA・D・C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、その表現型を検討した。

(2) 1. クラッペ病の病態解明: 日本人症例17例に関して、galactocerebrosidase遺伝子の変異をゲノム遺伝子を用いDHPLC法で検索し、塩基配列決定法にて調べた。一部はRNAを用いたRT-PCRによりcDNAでの変異を解析した。また過去の日本人変異報告と合わせて、日本人の変異分布と臨床症状について検討した。

2. クラッペ病の自然歴調査: 患者家族の医療に対する意識も含め、さまざまな合併症や家族の心理的問題点を調査するために、家族会を通じて患者主体の調査を行うこと目指し、経年的な変化についてもフォローできるシステムを検討する。

3. I-cell病の遺伝子解析: I-cell病の患者13人について、同意の上皮膚生検を行い、その培養皮膚線維芽細胞からRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子の増幅を行い、GPTAB

遺伝子の全翻訳領域を塩基配列決定を行った。一部は凍結細胞から直接RNAを抽出して実験を行った。また各変異はゲノムDNAを用いて確認を行った。

(3) ポンペ病の分子病理；生化学的分析として日本人の乳児型ポンペ病患者（遺伝子型：R600C/未同定）由来の培養線維芽細胞（F661）と遅発型ポンペ病患者（遺伝子型：F437C/R437C）由来の培養線維芽細胞（F664）とを試料として用いた。また、健常者由来の細胞を対照とした。酵素活性測定は、上記の細胞の超音波破碎液を試料として、人工基質 4-methylumbelliferyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside（Sigma, St. Louis, MO）を用いた蛍光法で行った。蛋白量については、ウシ血清アルブミンを標準として、DC assay kit（Bio-Rad, Richmond, CA）を用いて行った。Western blottingについては、polyacrylamide gel（第一化学，東京）を用いた電気泳動により蛋白質を分離展開し、Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane（Millipore, Bedford, MA）に転写した後、抗ヒトGAAポリクローナル抗体を用いてGAA蛋白質を検出した。次に構造学的分析としてヒト野生型GAAおよびR600C, R437Cを持つ変異GAAの3次元構造モデルについては、大腸菌由来の第31群グルコシダーゼYic I（PDB ID: 1XSK）の結晶構造情報を基に、分子モデリングソフトウェアSYBYL/BIOPOLYMER（Tripos, St. Louis, MO）を用いて、ホモロジーモデリングにより構築した。

(4) ニーマンピック病に関する臨床的・分子遺伝学的解析：1) 疫学的研究：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

因不明の肝脾腫の有無、③原因不明の低HDL血症の有無、④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) 臨床的研究：国内患者の酵素診断、遺伝子診断を通じて心合併症を示した特異な経過をとったニーマンピック病B型の症例を経験したが病理学的な検討を行った。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。3) 病態に関する研究1：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。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ではニーマンピック病A/B型の病因である酸性スフィンゴリエナーゼ（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。2名の日本人NPC患者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。4) 病態に関する研究2：ニーマンピック病A/B型で種々の脂質異常が見られる。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）に関して最近明らかにされてきた脂質輸送に関する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。

(5) LSDにおける血中サイトカインについての検討：ゴーシェ病患者8名、ファブリー病患者11名（うちERT開始前から経時的に経過を追えた患者は5名）のファブリー病男性患者。サイトカインはELISA法、一酸化窒素代謝産物（NOx）はHPLC、アルギニン（Arg）濃度はアミノ酸分析

機で定量した。

(6) β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究;

1. DHPLC遺伝子変異解析： ヒトβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来皮膚繊維芽細胞およびリンパ球よりゲノムDNAを抽出し、WAVE fragment解析システム (Transgenomic社) を用いDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 解析を行った。プライマーはヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子16エクソンに対し15セットを設計した。変異部位についてdirect sequencingにより遺伝子変異を同定した。

2. ケミカルシャペロンNOEV効果のスクリーニング：CMVプロモーター下流にヒトβ-ガラクトシダーゼcDNAを組込んだ発現ベクターを構築した。変異導入はsite-directed mutagenesisにより行った。構築した変異ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子発現ベクターは、リポフェクション法によりβ-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス繊維芽細胞に導入した。NOEV (N-acetyl-4-epi-β-valienamine) 投与は0.2μMのNOEV (を含む培養液で48時間培養することにより行った。β-ガラクトシダーゼ酵素活性は4-MU人工基質を用い測定した。免疫蛍光染色は、抗G<sub>M1</sub>抗体を用い行った。

3. 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からRNAを抽出し、イルミナSentrix mouse-6 expression beadchipを用いマイクロアレイ発現解析を行った。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。

(7) ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究 :

1. ムコ多糖症の遺伝子解析； これまでにムコ多糖症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-イズロニダーゼ、ムコ多糖症II型ではイズロネート-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型ではアリルサルファターゼ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。

2. ムコ多糖症I型酵素補充療法：ムコ多糖症I型3例 (症例1：3歳2ヵ月男児、症例2：3歳7ヵ月女児、症例3：8歳11ヵ月女児) においてラロニダーゼ0.58mg/kg (100単位/kg) を毎週点滴投与した。投与開始時年齢は症例1：1歳7ヵ月、症例2：2歳1ヵ月、症例3：8歳2ヵ月である。

(8) パーキンソニズムとGBA遺伝子変異：パーキンソニズムを呈する疾患患者においてゴーシェ病の原因遺伝子であるGBA遺伝子を解析して、相関の有無を調べる目的で GBA遺伝子のエクソン配列全てを短時間で大量に解析可能なDNA microarray-based resequence systemを構築した。

III. 新規治療法の開発

(1) 異染性白質ジストロフィー (MLD) に対する遺伝子治療 :

1. In vitro 実験：培養細胞にたいしASA あるいはFGE発現プラスミド (pCAG-ASA、pCAG-FGE) を、FuGENE法によりtransfectionした。72時間後にASAの酵素活性、酵素蛋白質、mRNAを測定した。

2. プラスミドベクターを用いたin vivo

実験：MLDマウスにpCAG-ASA、pCAG-FGEのプラスミドの各100  $\mu$ gを尾静脈よりHydrodynamics法で注入した。18時間後に血清および組織抽出液を調製し、ASAの酵素活性、酵素蛋白質、mRNAを測定した。

3. AAVベクターを用いたin vivo実験：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HEK293細胞にたいするトリプルトランスフェクションにより作製した。ベクターはIodexanol連続勾配遠心法、Microconにより精製濃縮した。感染力価は抽出したDNAスロットブロットにより測定した。AAVベクターはハミルトンシリンジを使って麻酔下のMLDマウスの海馬部位に定位脳手術手技により注入した。ASA酵素活性はp-nitro catechol法により測定した。スルファチドの定量はFolch法により抽出した脂質をTLCにより分離同定して行った。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。行動機能はロタロッドテストにより評価した。

(2)  $\beta$ -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： $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびガラクトシルセラミダーゼ活性は蛍光人工基質4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidと6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosideを用いて測定した。GM1-ガングリオシドーシス、モルキオB病、クラッペ病患者由来の培養細胞は国内外の研究者から供与を受け、NOEV投与後の酵素活性の変化を調べた。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のGM1-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。

この実験結果をもとに、NOEVを軽症型モデルマウスに経口投与し、その臨床経過を追跡した。

(3) LSDの細胞治療用の移植細胞としてのヒト羊膜SP(side population)細胞の開発研究：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する。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する。そして細胞分離装置を用いて、side population cells (SP細胞)を分取する。種々の表面抗原を用いて、本細胞の性質検討を行う。次に細胞の多分化能の検討を行う。即ち神経系細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を検討する。さらに細胞の癌化試験および安全性試験をin vitro, in vivoで行った。

(4) Krabbe病の遺伝子治療：Krabbe病の遺伝子治療の基礎的実験として欠損酵素であるgalactocerebrosidase発現遺伝子を組み込んだHIVベクターを構築した。更に細胞株、モデルマウス（新生児）での発現実験を行った。

## C. 研究結果

### I. 自然歴などの臨床像の把握

(1) LSDのQOL・ADL実態調査：解析の結果としてポンペ病およびゴーシェ病の患者は共に、国民標準値に比べ身体的健康度および精神的健康度は共に低下が認められ、特に身体的健康度においては著明な低下が認められた。また、疾患や治療、遺伝など様々な不安を抱え、このことが精神的健康度の低下をきたす一因であると考えられた。現在、ファブリー病患者、ムコ多糖症患者を対象に同調査を行い解析中である。

(2) Fabry病の無侵襲ハイリスク・スクリー

ニンゲの開発：平成16年に、Millsらのタンデム質量分析計を用いた血漿globotriaosylceramide (GL-3) の測定法を改変して尿GL-3の定量法を開発した。この方法で古典型および心型異型ファブリー病 (FD) ヘミ接合体とヘテロ接合体の尿GL-3を測定し、心型異型FDのヘミの一部と、無症状の古典型および異型FDのヘテロはGL-3が低く、この方法で診断すると見逃される可能性があった。平成17年度は、血漿と尿の $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -gal A) の活性とELISA法で測定した酵素蛋白値との間には正の相関々係にあることを明らかにし、尿中 $\alpha$ -gal Aの安定性を研究して酵素蛋白の測定法を確立した。平成18年度は、この開発した尿 $\alpha$ -gal A PとGL-3の測定法を使用してFDを疑わせる症状や家族歴のあるハイリスク症例についてFDのスクリーニングを行い、この方法が本症のスクリーニング法として極めて有用なことを明らかにした。

### (3) QOLを向上する方法に関する検討

：ゴーシェ病症例に対して聴力検査、ABRを検討しⅢ型ゴーシェ病の早期診断にABRは有用であることが判明した。ゴーシェ病における聴覚に関する研究は少なく、不明な点が多く存在する。今後聴覚障害を呈するゴーシェ病の患者の検討を進め、ゴーシェ病における聴覚障害の機序についての検討が必要と思われる。

### (4) MPSのAOL, QOL, 精神心理に関する研究

；運動・認知両面のADL評価をFIM質問紙を用いて検討したところ、軽症型では小児期は健康者と同等の伸びを示し、満点に近い得点を示したが、成人以降、関節拘縮、呼吸障害、難聴に起因するADLの低下が明らかとなった。重症型では5～6歳をピークに

退行する自然歴を明らかにした。神経・心理学的解析では、患者・家族ともに不安状態が高く、精神的にも不安定な状態にあり、神経症的な傾向があることを明らかにした。酵素補充療法の進歩に伴い、治療効果の評価は重要であり、また、軽症化・延命が図られても、精神的不安が長期化することも予想され、今後の課題と思われる。

### (5) ファブリー病の酵素補充療法に関する調査その他

：ファブリー病の酵素補充療法を受けた20例中9例に副作用。ファブリー病の酵素補充療法効果：血清クレアチニンはヘミ接合23人中16人(70%)がベースライン維持。ベースライン維持した投与開始時平均年齢は28.8歳、透析に至った症例では33.0歳。心機能は僧帽弁逆流の23%、大動脈弁逆流の25%、壁肥厚の70%に改善をみたが、房室ブロック、心房細動などは改善例がなかった。またファブリー病の酵素補充療法の開始2時間前ステロイド前投した6例中5例83%は副作用を防止しステロイドも漸減中止とした。MPSVI調査では全国で6例が生きていることが判明しそれらの症例に関して2次調査を行なったところ1例が新規の酵素補充療法の対象者であることが判明した。ファブリー女性ヘテロ例では初発症状として最も多かったのは四肢末端痛であり、平均発症年齢は23.5才、平均診断年齢は35.0才であった。各症状の発症率は、四肢末端痛 50.0%、発汗異常 16.7%、角膜混濁 50.0%、尿蛋白 38.9%、透析を要する腎不全 5.6%、左心肥大 38.9%、脳梗塞 8.3%であり、これらのいずれかの症状を有する症候性ヘテロの割合は86.1%であった。

Pompe病の調査ではわが国のPompe病患者数は今回の結果では37名であり、男女ほぼ同数で遅発発症型が過半数を占める。Activity of Daily Life (ADL)は外来管理が主体で比的自立度は高いといえるが、呼吸補助を必要としている割合も64.2%と高い。

症候として知能低下はほぼなく、酵素補充の効果は早期であればきわめて高いとされ、治療による社会還元効果も大きいといえる。

(6) MPSII臨床型調査：軽症型が2群(A, B)に、重症型は3群(C, D, E)に分けられた。このグループ分けに従って、骨髄移植をされた7症例(軽症型3症例、重症型4症例)について効果判定を試みた。骨髄移植患者を同じグループ内患者と比較すると、全ての症例について身体所見の改善が認められただけでなく、軽症型、重症型とも脳MRI所見の改善ないしは進行停止が見られ、また、重症型患者では痙攣の発症阻止(あるいは発症の遅延)が見られた。さらに、日本ムコ多糖症親の会の患者家族にアンケートに答えてもらうことにより、同様の臨床分類を試みた。これによれば、II型重症型は、より軽症のC群とより重症のD群に分けることができたが、3群に分けることは困難であった。どちらの群に属するかは、一語文の獲得月例と二語文の獲得の有無により判定が可能であった。また、C群の患者では、骨髄移植により知能障害の進行が緩徐になる傾向が認められたが、D群では明らかではなかった。

## II. 病態解析研究

### (1) スフィンゴリピドーシス疾患モデル

マウスの検討：サポシンAノックアウトマウス(Sap-A KO)は遅発型クラッベ病の表現型を呈し、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。本研究課題ではSap-A KOに対する骨髄移植の脱髄病変への治療効果を検討し、中枢神経系の脱髄病変がほぼ完全に抑制されることを明らかにした。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。本研究課題ではSap-D KOの小脳病変を解析し、Sap-DKOでは小脳プルキンエ細胞が、進行性に、ゼブラ状に脱落すること、そのパターンが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することを明らかにした。平成18年度からは最も頻度の高いライソゾーム病でありながら未だ有用なモデルマウスは存在しない神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスの作成を試みた。マウスプロサポシン遺伝子のサポシンC領域に、遺伝子変異(5番目のシステインをセリンに置換)を導入するターゲティングベクターを構築し、サポシンC変異ES細胞を経てサポシンC変異ヘテロマウスを得ることに成功した。

(2) クラッベ病の病態解明等；本研究により17症例の34アリル中、すでに既報の

3変異をのぞき、27変異を同定した。このうち6つの新規変異を同定した。これにより、日本人に多い変異の同定ができ、これらのスクリーニングを行うことで、効率的に遺伝子変異の検索を行うことが可能となった。またIcell病11名、MLIII2名にGPT AB遺伝子の変異を解析し、日本人における変異も停止コドン、フレームシフトが大半であり中でもR1189Xが日本人に最も多いと考えられた。

(3) ポンペ病の分子病理；乳児型ポンペ病の病因となるR600C変異においては、酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼの活性部位を含む広い範囲に構造変化が起こり、蛋白質は不安定になって細胞内で過剰に分解され、酵素活性がほぼ完全に失われると考えられた。一方、遅発型ポンペ病の病因となるR437C変異では、酵素蛋白質の表面に比較的小さな構造変化を来す結果、蛋白質は不安定であるものの、ごく僅かの残存活性が生じたと推察された。

(4) ニーマンピック病に関する臨床的・分子遺伝学的解析；病態の解析として細胞内コレステロールの蓄積に伴う酸性スフィンゴミエリナーゼの低下に関して酵素分子レベルの調節機構の存在を示唆した。最近、細胞内脂質輸送に関するトランスポーターABC蛋白質が報告されている。細胞内コレステロール・スフィンゴミエリンの蓄積のみられる細胞における4種ABC蛋白質(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。

(5) LSDにおける血中サイトカインの意義について； 1. ゴーシェ病： 1) すべての患者でIL-18とTGF- $\beta$ 1の上昇がみられた。

2) サイトカインと骨代謝マーカーとの関連を検討したところIL-18は2つの骨形成マーカー；血中の骨特異的アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンと、いっぽうM-CSFは骨吸収マーカーである尿中N-telopeptide to helixと、それぞれ相関を示した。3) 血液所見との関連を検討したところ、M-CSFおよびTNF- $\alpha$ は血色素濃度と逆相関を示した。4) ERTの経過をおいて観察できた例ではM-CSF、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ はERTの経過と共に低下し、治療効果のバイオマーカーとして有益であることが証明された。いっぽうIL-18は高値のままであった。

2. ファブリー病： 1) 対象患者の10-90%にVEGF、TGF- $\beta$ 1、PDGF-ABの上昇を認めた。2) VEGF、TGF- $\beta$ 1、PDGF-ABの濃度は相互に有意の正の相関を認めた。3) 一酸化窒素代謝産物(NOx)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  $\mu$ mol/l)以下であった。さらにNOx濃度は、Argの濃度とVEGF、TGF- $\beta$ 1、PDGF-ABのいずれの濃度とも有意の相関を示さなかった。4) 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- $\beta$ 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。

#### (6) @-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究；

17人の@-ガラクトシダーゼ欠損症患者から抽出したゲノムDNAを用い、DHPLC変異解析を行った結果、15人について27種類の遺伝子変異を同定した。そのうち13種類(S54I、R59C、I181K、E131K、R148C、W273R、D332E、T420K、D448V、M480V、P549L、W582X、276-277 insG)は新規変異であり、

酵素活性の欠損はマウス細胞発現系により確認した。これら新規変異を含む41種類の変異について、NOEVの残存酵素活性還元効果を調べた結果、8種類の変異（R201C、R201H、R201Y、V216A、Q255H、D332N、D332E、R457Q）について、NOEV非投与活性の3倍以上、かつ正常の10%以上の酵素活性還元効果を認めた。また、抗GM1抗体を用いた免疫蛍光染色により、NOEVにより細胞内GM1蓄積が解消されることも確認した。

11ヶ月齢正常マウスと9ヶ月齢 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス大脳皮質からそれぞれRNAを抽出し、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、炎症関連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群についてパスウェ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亢進し、NOEV投与R201C発現マウスでは抑制された。

(7) ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究：1)ムコ多糖症の遺伝子解析：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アレ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。2)ムコ多糖症I型酵素補充療法：全例で尿中グリコサミノグリカンの低下、肝腫大の改善、乾燥性皮膚の湿潤化、慢性中耳炎、聴力の改善が見られた。また、症例1、2では睡眠時無呼吸の改善、関節可動域の改善を認め、精神運動発達遅延の改善については2症例とも独歩が可能となり、発語が出現し、症例2は二語文が可能なほど発達が促進している。投与関連反応は症例2、3では認めず、症例1で発疹、喘鳴が時折認められたが、投与速度の減速や抗ヒスタミン剤、ステロイド剤でコントロール可能であり、3症例ともラロニダーゼ投与を継続中である。

(8) パーキンソン病とGBA遺伝子：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。RecNciI変異がPDと関連している可能性が示唆された。

### III. 新規治療法の開発

(1) 異染性白質ジストロフィー（MLD）に対する遺伝子治療：プラスミドベクターを用いたIn vivo 実験ではMLDマウス肝臓におけるASAとFGEの共発現は肝臓のASA活性を3.7倍、血清中では1.4倍の上昇を誘導した。ASAだけの発現では血清に分泌されるASA活性はごく僅かであった。また、In vitroの結果とは異なり、肝臓のASAは活性のみなら



ず酵素蛋白質も有意に増加することを認めた。この結果からFGEにより修飾された活性型ASAは不活性型ASAよりも生体内では安定性が高いことが示唆された。MLDマウスにおけるFGE mRNA発現の生体内分布はヒトと同様に腎臓で最も高く、脳での発現は比較的少なかった。ヒトの脳でのFGEの発現は非常に低いことが確認された。次にMLDモデルマウスに対しAAVベクターを使った治療実験を行った。AAV1-ASA単独、または、AAV1-ASA+AAV1-FGEを、生後8ヶ月のMLDマウスの右の海馬CA3領域に注入した。注入後7ヶ月にASA酵素活性、組織染色、スルファチドの定量、行動実験などで分析した。AAV1-ASA単独の注入では導入側における酵素活性を増加と非導入側においてASAのわずかな酵素活性の増加を示した。AAV1-ASA及びAAV1-FGEの同時導入では、導入側および非導入側においても酵素活性を著しく増加した。ASA蛋白の広範囲にわたる分布は、抗ASA抗体を用いて免疫組織学分析によって確認された。スルファチドを特異的に染色するAlcian Blue染色、及びTLC分析によりスルファチドの定量を行った。注入された半球におけるスルファチドがAAV1-ASA注入後導入側では減少することを確認した。AAV1-ASAとAAV1-FGEを同時に導入したとき、導入側のみならず脳全体におけるスルファチドの減少が観察された。ロタロッドテスト、及び、歩行パターンによる行動機能の評価では、治療マウスでの有意な改善が認められた。これらの結果はAAV1ベクターにより脳内でASAが長期に発現分泌し、広い範囲のスルファチドの蓄積を減少させたことを示している。これらの治療効果はFGEの同時発現により顕著に増強されており、FGEのMLD遺

伝子治療での重要性が確認された。

(2)  $\beta$ -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: 細胞培養液中にNOEVを添加することにより、GM1-ガングリリオシドーシスR201CおよびR457Q変異において特に著しい酵素活性上昇を認めた。49種の細胞株中、17種に有意の反応があった。NOEVの長期投与による細胞増殖への影響は認めなかった。ガラクトシルセラミダーゼに対してもNOEVが阻害効果を示したが、10例のクラッペ病患者細胞には酵素活性還元効果は見られなかった。

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。NOEV投与実験により、投与開始数ヶ月後、総スコア値上昇傾向が抑制された。

(3) LSDの細胞治療用の移植細胞としてのヒト羊膜SP(side population)細胞の開発研究: 羊膜間葉細胞から、約0.2%のSP細胞を分取できた。本細胞の増殖率は、80日で40であった。MHC class IIの発現が欠如し、MHC Class Iの発現は弱かった。また約50%はMHC Class I, IIの両者の発現していないdouble negative cellsの存在を確認した。Oct 4の発現が認められ、神経細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能について、免疫染色法、遺伝子解析により証明した。細胞の癌化試験はin vitro及びマモセットに本細胞を移植して行った。結果本細胞は癌化しないことを証明した。安全性試験は、種々のウイルス、マイコプラズマ、細菌について本細胞および細胞を移植したマモセットの血清について検索した結果、すべて陰性であった。さらに各種のライソソーム酵素活性を測定した

ところ、 $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -hexosaminidase, iduronate-2-sulfatase, arylsulfatase の酵素活性が高いことが判明した。

(4) Krabbe病の遺伝子治療：組換えHIVベクターはフローサイトメトリーにより  $2 \times 10^8$  TU/mlの力価を呈した。新生児Krabbeモデルマウスへの組換えHIV投与では1週間後に肝臓のみ活性上昇が見られたが、脳など他臓器では上昇が見られなかった。

#### D. 考察

自然歴調査ではGaucher, MPS, Fabry, Pompeに関するアンケート調査を中心に報告され、今後これらの疾患の診断治療の再検討、改善に役立つものと思われる。特に今回はQOLに重点を置いた調査がなされ、臨床応用度が高いと考えられた。ファブリー病のハイリスクスクリーニングも尿を用いた無侵襲性のものであり、高い普及率が期待される。病態解析では神経型Gaucher, I-cell病、ニーマンピック病A/B型、GM1-ガングリオシドーシス、MPSについての新たな病態解析方法の開発が進み、更にパーキンソンズムとゴーシェ病の原因遺伝子であるGBA遺伝子との関連性についても研究が進んでいる。また新規治療法開発ではMLD、Krabbeに対する遺伝子治療の検討が進み、またシャペロン療法の実用に向けての準備も着々と進んでいる。このように多方面にわたる臨床基礎両方の観点から今後もLDの予後改善を目指し研究を推進させていく予定である。

#### E. 結論

LSDに苦しむ患者の方々の予後やQOLを改善するためにさまざまな検討を行った。アンケート調査による現在の日本における臨床の現状把握、ファブリー病などに対するスクリーニング法の開発、各疾患の病態の解析、更には遺伝子治療、シャペロン療法といった新規治療法の開発などの柱を中心に研究が進められ、一定の成果が得られつつある。遺伝子治療ではマウス実験に加え、今後のヒトへの臨床応用の端緒として霊長類を用いた実験も一部開始されている。今後更に研究を進展させ、LSDの予後の改善に結びつけていく方針である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

各分担研究者の報告書を参照

#### H. 知的財産の出願・特許状況

なし

厚生労働省 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会議

日時：平成 16 年 12 月 9 日（木）

場所：東京慈恵会医科大学

中央棟 8 階会議室

総合司会： 大橋十也

挨拶

衛藤義勝

## I. 新しい治療

座長：奥山虎之

- 1) AAV ベクターを使ったライソゾーム病の遺伝子治療  
： 島田 隆
- 2) GM1 ガングリオシドーシス神経変性に対するケミカルシャペロン  
法による治療法の開発研究  
： 難波栄二
- 3)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症に対する新しい分子治療の効果予測  
： 鈴木 義之

## II. 調査研究

座長：大野耕策

- 1) ムコ多糖症 II 型における ADL 評価—FIM 質問紙を用いて—  
： 鈴木康之
- 2) i) Fabry 病酵素補充療法の実態調査  
ii) ライソゾーム病の新規治療法の開発  
： 大橋十也
- 3) ライソゾーム病における ADL および QOL 評価  
： 坪井一哉

4) クラッペ病の病態解析と患者アンケート  
: 酒井規夫

5) ライソゾーム病患者の QOL 改善に向けた調査研究-ムコ多糖症の呼吸障害について-  
: 桜川宣男

### III. 診断

座長：酒井規夫

1) Fabry 病患者の尿 GL3 測定の意義に関する研究  
: 北川 照男

2) ハンター症候群の遺伝子診断と遺伝カウンセリング  
: 奥山虎之

### IV. 酵素補充療法、BMT

座長：酒井規夫

1) ムコ多糖症 II 型の臨床分類と治療効果判定  
: 田中あけみ

### V. 病態

座長：鈴木康之

1) Gaucher 病 I, III 型患者の血液像と血中サイトカイン等の相関  
: 芳野 信

2) クモ膜下出血を合併した Fabry 病の剖検例  
: 辻 省次

3) ニーマン・ピック病 C 型でのコレステロール濃度依存症性ユビキチン化  
: 大野耕策

座長：田中あけみ

4) レクチンを利用したアシドーシス/ガラクトシリアドーシスにおける蓄積物質の検出  
: 桜庭 均