

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 高柳正樹 千葉県こども病院医療局長

研究要旨：ライソゾーム病患者の QOL を向上する方法について以下の 3 点について研究を行った。

1. ゴーシェ病の病型の早期の鑑別を行い、適切な治療を行うことは患者の QOL を向上させるには必要である。ゴーシェ病の中枢神経合併症の早期発見に、ABR は有効な方法であることを確認した。早期の鑑別が可能なることにより、骨髄移植や大量酵素補充療法などの治療法の選択の機会が増多する。これにより、より良い QOL を得られることが期待される。2. 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：今回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) を行ったので報告した。

HMV のほうが明らかに患者さん家族の介護の負担は減少し、患者さんの肺感染症の頻度も減少した。HMV を行うには公的な援助、および地域での援助体制の確立が不可欠であることを再確認した。患者さんの QOL を向上させるには早期診断が必要である。

3. 日本においては希少疾患と思われるサラ病を診断した。多くの患者が見逃されているものと考えられる。患者を長期に観察しえたのでサラ病の自然歴も知りえた。今後尿中シアル酸の簡便で正確な測定法を、タンデムマスによる分析などを開発していくことが、重要なことと考えられる。

A. 研究目的

われわれはこれまで臨床的な観点から、いかにすればライソゾーム病の患者の QOL を向上することができるかを検討してきた。当初はゴーシェ病に対する酵素補充療法の効果について、特に神経型のゴーシェ病に対する効果について検討を行った。

さらにこの 3 年はライソゾーム病患者の病態を詳細に検討して、患者の QOL の向上にいかなる方策が必要かを検討してきた。すなわち①ゴーシェ病の患者の ABR を検討しⅢ型患者の早期診断が可能か検討した。②各種疾患の呼吸不全を呈する患者に在宅呼吸器療法を導入して患者の QOL の向上

を図った。③希少ライソゾーム病のサラ病症例の診断過程を通じて、診断法の問題点を検討した。

B. 研究方法、C. 研究結果

①：ゴーシェ病症例、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。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。早期診断により骨髄移植、大容量酵素補充療法の早期導入ができ患者の QOL の向上が期待される。

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。

②：ライソゾーム病は中枢神経系に重篤な合併症をきたすことが多く、長い経過中に呼吸障害をきたし人工呼吸器装着を余儀なくされることも多い。今回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) を行ったので報告した。

当院で 2000 年 4 月より治療、管理しているがライソゾーム病症例 18 症例中 6 例に気道、呼吸機能の問題から気管切開を行っている。早期に死亡した 4 例を除けば 14 例中 6 例と高頻度である。これら症例は症状が進行していけば、いずれ在宅呼吸器治療管理が必要になっていくものと思われる。

HMV のほうが明らかに患者さん家族の介護の負担は減少し、患者さんの肺感染症の頻度も減少した。HMV を行うには公的な援助、および地域での援助体制の確立が不可欠であることを再確認した。

③：サラ病はライソゾームの膜における anion transport の障害によって引き起こされる。フィンランドに多く報告があるが、日本においてはこれまで一例のみが報告されているのみである。

今回ガルゴイリズム様顔貌、知能発達遅延、肝脾腫、尿中フリーシアル酸の排泄増

多、線維芽細胞に多数の空砲と層状の蓄積物を認めた症例を経験し、サラ病と考えられたので報告した。

患者は現在 15 歳となった。身長は -2.8SD と低身長を示す。知能発達遅延は認められるが、全身の骨変化は少なく、心血管および腎臓にも異常は認められない。サラ病の思春期までの成長に伴う natural history が理解されたものと思われる。

サラ病は日本ではきわめて症例が少ない疾患と考えられている。おそらく診断がなされていない症例も多くいるものと思われる。今後尿中シアル酸の簡便で正確な測定法を、タンデムマスによる分析などを開発していくことが、重要なことと考えられる。

D. 考案、E. 結論

現在ライソゾーム病患者の QOL は低いものと思われる。いろいろな臨床的な取り組みを通じて患者の QOL の改善を目指すことが必要である。QOL を客観的に把握することが、酵素補充療法をはじめとする治療法の有効性の評価を行う基礎データとなるとと思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ムコ多糖症の ADL、QOL、精神心理に関する研究

分担研究者 鈴木康之 (岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)

研究要旨

ムコ多糖症II型患者のADL, QOL, 精神心理を明らかにし、今後の治療・フォローアップに役立てることを目的とし、以下の検討を行った。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。

研究協力者

加藤智美 (岐阜大学医学教育開発研究センター)
倉坪和泉 (岐阜大学小児病態学)
折居忠夫 (中部学院大学)

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型 (Hunter 病) は骨変形、関節拘縮、肝脾腫、聴力障害、閉塞性呼吸障害、中枢神経障害などを特徴とする X連鎖劣性遺伝病であり、本邦では最も多い病型であるが、患者の ADL, QOL, 精神心理についての詳細は明らかにされていない。Functional Independence Measure (FIM) 質問紙を用いて ADL 評価を行い、各種精神心理検査法を用いて、患者と家族の心理状態を評価したので報告する。

B. 研究方法

【対象】

ADL: 日本人ムコ多糖症 II 型患者 29 名 (5-41 歳、重症型 14 名、軽症型 15 例名)

精神心理: 軽症ムコ多糖症 II 型患者 12 名 (成人 9 名、小児 3 名、VIQ 平均 78.3、PIQ 平均 82.0) (父 7 名、母 6 名)

【方法】

ADL: FIM 質問紙に Wee FIM の内容を追加した質問紙を作成し、患者が自宅でどの程度日常生活動作を行っているかを、介助者(家族)が記入し、専門医が判定を行った。

<運動> 食事、整容、清拭、更衣 (上半身)、

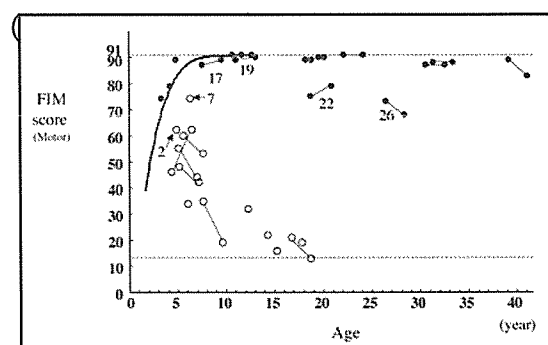
更衣 (下半身)、トイレ動作、排尿、排便移乗 (ベッド、椅子、車椅子)、移乗 (トイレ)、移乗 (浴槽)、移動 (歩行、車椅子)、階段 <認知> 理解、表出、社会的交流、問題解決、記憶<採点方法> 各項目とも 7 段階評価で、全項目全介助の場合 18 点、完全自立の場合 126 点。

精神心理: General Health Questionnaire 60 (GHQ60)、State and Trait Anxiety Inventory (STAI)、Yatabe-Guilford 性格検査 (Y-G)、Tree Drawing Test (Baum Test)を行った。

C. 研究結果

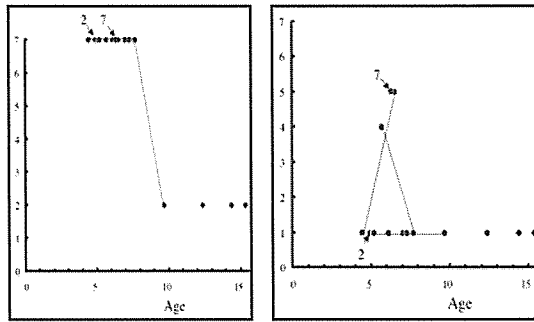
(1) ADL-運動面

軽症型は●で示すとおり、ほぼコントロールと同じ値をとり、10歳以降ではほぼ満点(完全自立)となったが、成人後、数点の低下を認めた。重症型は○に示すとおり、6歳前後でピークとなり、その後、退行を示し、10歳以降はスコアが最低ラインに近づいた。



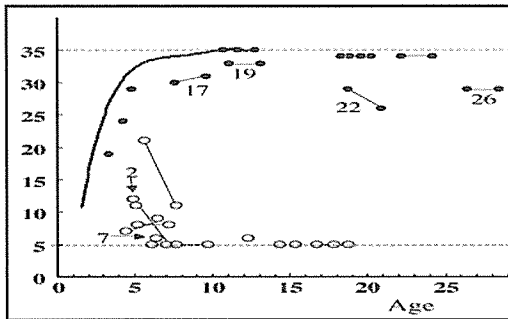
(2) 運動面の個別スコア

重症患者の運動面の個別スコアを比較すると、大きく2つのパターンを示すことが明らかとなった。1つは比較的スコアが高く、年齢が進んでも機能が保たれるもので、歩行や移動などである。一方、初期から低値を示すもので、トイレ動作や整容に関するものである。これらは認知機能に大きく左右されると推測される。



(3) ADL-認知面

軽症患者では認知面の発達もほぼ健常児と同じであったが、成人期以降、全例で軽度低下を示した。一方、重症例では5歳をピークに低下し、10歳では全例最低点となった。



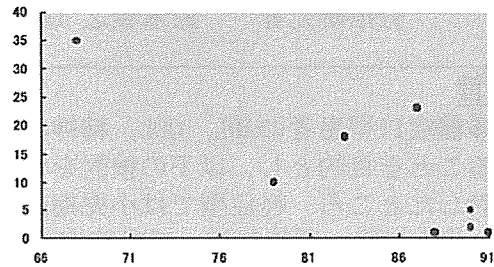
(4) 成人例のスコア低下要因

成人におけるスコア低下の要因は以下のとおりであった。

食 事：時間がかかる
整 容：歯磨粉をつける、洗顔、整髪
入 浴：体を洗う、タオルしぼり 柄つきブラシ
更 衣：下着、服の着脱、ジッパー
トイレ：お尻を拭く、ジッパー
歩 行：時間がかかる、50m歩けない
階 段：1人で昇れない、手すりが必要
理 解：補聴器、ゆっくり大声で話す必要
表 出：理解してもらえない
社会性：慣れるのに時間がかかる
問題解決：料金支払い、書類手続き

(5) GHQ 60

成人軽症患者・両親とも、日本人平均スコアより高く、全般的な精神的健康度は低いと考えられた。また日常生活動作が障害されている患者ほど精神健康度が低い傾向を示した。



(6) STAI

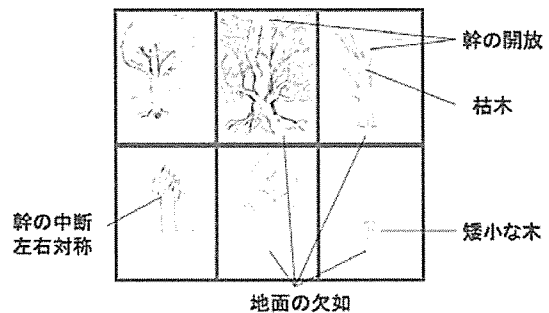
患者・両親ともに、現在の不安状態 (state anxiety)・生来の不安傾向 (trait anxiety) がいずれも高いことが明らかになった。

(7) YGテスト

患者の性格検査では、ほとんどが標準的な日本人の性格パターンを示したが、1名は神経症的傾向を示した。

(8) Baum テスト

樹木描画では、地面の欠損や幹の上方への開放などが、特徴的所見として認められ、不安定な心理状態であることが示唆された。



D. 考 察

FIM 質問紙によって Hunter 病の ALD を明らかにすることができた。軽症例と重症例、運動面と認知面、小児期と成人期の違いを明らかにした。FIM 質問紙は各年齢層で利用でき、ADL の経時的変化を定量化ができる。ムコ多糖症では造血幹細胞移植、酵素補充療法が行われており、それらの治療効果判定に有用と考えられた。一方、患者家族が高い不安状態にあり、精神的に不安定であることが明らかとなった。ムコ多糖症の診療や遺伝カウンセリングにおいて十分な心理的配慮が必要である。酵素補充療法などの治療法の進歩に伴い、身体的には軽症化・延命が図られたとしても、精神的不安がむし

ろ長期化することも予想され、今後の課題と思われる。

E. 結論

ムコ多糖症の ADL、QOL、精神心理の特徴を明らかにし、今後の治療フォローアップに役立てることが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kato T, Kato Z, Kuratsubo I, Tanaka N, Ishigami T, Kajihara J, Sukegawa-Hayasaka K, Orii K, Isogai K, Fukao T, Shimozawa N, Orii T, Kondo N, Suzuki Y. Mutational and structural analysis of Japanese patients with mucopolysaccharidosis type II. *J Hum Genet.* 2005;50(8):395-402. 2005

2) Tomatsu S, Gutierrez MA, Ishimaru T, Pena OM, Montano AM, Maeda H, Velez-Castrillon S, Nishioka T, Fachel AA, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Laybauer LS, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Noguchi A. Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Inherit Metab Dis.* 2005 Jan;28(5):743-757.

3) Tomomi Kato, Koji Isogai, Koji Orii, Izumi Kuratsubo, Naomi Kondo, Tadao Orii Yasuyuki Suzuki: Portal hypertension in a patient with Hunter disease. *J Inherit Metab Dis* 29(5):686, 2006

4) 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)

5) 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

2. 学会発表

倉坪和泉、鈴木康之、加藤智美、折居忠夫、下澤伸行、近藤直実: Hunter 病軽症成人例の神経心理学的検討 (第二報): 性格特性について. 第 47 回日本小児神経学会総会、2005.5.19-21, 熊本

加藤智美、加藤善一郎、倉坪和泉、田中 登、石神太人、梶原淳一、早坂-祐川和子、折居

恒治、磯貝光治、深尾敏幸、下澤伸行、折居忠夫、近藤直実、鈴木康之: ムコ多糖症 II 型 (Hunter 病) における遺伝子変異・蛋白立体構造解析. 第 50 回日本人類遺伝学会、2005.9.19-22, 倉敷

倉坪和泉、鈴木康之、折居恒治、加藤智美、折居忠夫、近藤直実: Hunter 病患者のメンタルヘルスについての検討. 第 48 回日本先天代謝異常学会、2005.11.16-18, 熊本

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

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

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

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

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 16-18 年度厚生科学研究費補助金（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）調査研究

分担研究者：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）

研究要旨

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。患者は、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。

研究協力者：澤田智（大学院生）

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型は、日本人において、症例数として多いだけでなく、臨床症状のバリエーションも大きく、兄弟間でも症状が異なることがある。従って、種々の治療効果を症例ごとに正確に判定することは困難である。正確な効果判定の指標とするため、近似する臨床症状の症例をグループ化することを行い、グループ内で臨床経過を比較することによる効果判定を試みた。

B. 研究方法および対象

1、臨床所見の分析による分類

当科でフォロー中の 22 家系 24 症例を対象とし、病歴と検査所見を比較検討し、グループ分けを行った。グループ分けにあたり、中枢神経症状を主とし、身体症状を従とした。さらに、骨髄移植を受けた症例について、同一グループ内での経過を比較することにより効果判定を試みた。

2、アンケート質問の分析による分類

日本ムコ多糖症親の会の家族の、II 型 80 家族、III 型 20 家族にアンケート用紙を郵送し質問に答えてもらい、その回答の分析

により、同様の分類を試みた。また、骨髄移植の効果についても、同様に効果判定を行った。

(倫理面への配慮) 患者は番号化し、個人名が分からないように配慮した。患者各人および日本ムコ多糖症親の会に対し、口頭で説明を行い、承諾を得た。

C. 研究結果

1. 臨床所見の分析による分類

22家系のうち、知能障害が無く軽症型と判定された患者は6家系(27%)、知能障害を伴い重症型と判定された患者は16家系(73%)であった。軽症型は、より身体症状の軽いA群(1家系、5%)とより重いB群(5家系、23%)とに分けられた。重症型は、より軽いC群(5家系、23%)、中間的なD群(8家系、36%)、より重いE群(3家系、14%)に分けられた。表1に各々の群の臨床経過を示した。

表1. ムコ多糖症 II 型の臨床分類

群	初発年齢	初発症状	一語文	痙攣 言語喪失	歩行不能	生命予後
A	5歳以降	関節拘縮	1歳頃	無し		30歳代後半
B	3~5歳		1歳頃			30歳前後
C	2~3歳	言語発達遅延 (大頭症、肝腫 大、ヘルニア)	1~1.5歳	10歳頃	10歳前後	20歳前後
D	1~2歳		1~2歳	10歳頃	10歳以降	10歳代
E	1歳以前		2歳	不明	不明	10歳未満

骨髄移植を行った患者は、B群で3症例、C群で2症例、D群で2症例であり、A群、E群にはいなかった。全ての移植症例で、肝脾腫、皮膚の肥厚、閉塞性呼吸障害、関節拘縮の改善が認められた。中枢神経所見においては、B群ではMRI所見上篩状変化の改善が認められた。C群では白質の異常信号の改善、脳室拡大所見の進行停止が認められた。臨床症状においても、C、D群の移植症例で痙攣の発症が認められていない。さらに、C群の1症例で、失われていた言葉が再び獲得されてきたことは特記すべきであった。また、IQについては、骨髄移植を受けた患者にIQの高い症例があったが、全体での差は明らかでなかった。

2. アンケート質問の分析による分類

アンケート調査からは、II型重症型で骨

髄移植を受けていない29例のうち、一語文が1歳前後に現れた症例は7例で、これらは全員二語文を獲得していた。一語文が現れるのが2歳以降であった症例は13例で、うち8例が二語文の獲得がなかった。二語文が現れた群(C群)と現れなかった群(D群)とに分けて症状発症の平均月齢を比較すると、発達の遅れ、言葉の減少、言葉の消失、痙攣、歩行不能のそれぞれの発症時期に差が認められた。すなわち、II型重症型の症例は、知能障害の進行度から、少なくとも2群(C,D)に分けることができた。月齢72-248か月の二語文が現れた症例(C群)のなかで、骨髄移植を受けなかった13例と受けた6例とを比較した。前者では、言葉の減少9例、言葉の消失6例、痙攣発症3例、歩行不能3例であった。後者では、

それぞれが 1 例のみで、歩行不能である症例は無かった (表 2)。すなわち、二語文が現れた症例で骨髄移植を受けた症例では、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。

表 2. C 群患者の骨髄移植の効果

	否移植群	移植群
n	13	6
暦年齢 (月)	72-248 平均: 124.9	72-248 平均: 121.8
移植生着月 齢 (平均)	—	58.3
一語文獲得 月齢 (平均)	17.1	17.0
言葉の減少 (例数/n)	9/13	1/6
言葉の消失 (例数/n)	6/13	1/6
痙攣発症 (例数/n)	3/13	1/6
歩行不能 (例数/n)	3/13	0/6

D. 考察

ムコ多糖症 II 型は、日本人ムコ多糖症患者の約 6 割を占める。ムコ多糖症の治療法として、現在、骨髄移植と酵素補充とが行われている。欧米では、骨髄移植はムコ多糖症 I 型、VI 型では適応とされているが、II 型はされていない。これは、脳に対して有意な効果が認められないということが主な理由である。日本においては、II 型についても軽症型、重症型を問わず、骨髄移植が行われている。酵素療法は、ムコ多糖症 I 型、II 型、VI 型ですでに商品化されている。酵素療法は、骨髄移植に比べ副反応が少なくドナーの必要も無いが、脳に対する効果は期待されない。知能障害を呈するム

コ多糖症には、IH 型、II 型重症型、III 型、VII 型があり、いずれの神経症状にも、効果的な治療法が無い。しかしながら、IH 型や VII 型では骨髄移植の脳に対する効果はある程度あるのではないかといわれ、II 型重症型では無いとされている。しかし、日本、韓国においてかなりの II 型重症型の症例に骨髄移植が施行され、効果があるのではないかとされている。それぞれの型における神経症状の発症の仕方や進行の状態は微妙に異なっており、神経細胞の障害の様相が異なっていることが推測される。このことが、型による効果の差を導いているのかもしれない。

II 型は、知能障害を伴わない軽症型と、伴う重症型とに大きく分けられているが、バリエーションが大きい。病歴、臨床所見を詳細に検討することにより、軽症型は 2 群 (A, B) に、重症型は 3 群 (C, D, E) に分類された。そして、同じグループ内で、骨髄移植を受けた症例と受けなかった症例とを比較すると、神経症状への効果が認められた。しかし、骨髄移植を受けた症例数が少ないため、個々の経過比較にとどまり有意差の証明には至らなかった。アンケート調査からは、II 型重症型は、2 群 (C, D) に分けることができた。しかし、3 群に分類することは不可能であった。骨髄移植の知能障害に対する効果は、より軽症の C 群では認めることができたが、より重症の D 群では明らかでなかった。

今回の研究分担者の行った II 型患者の分類は、過去に行われた骨髄移植の効果の評価に有用であるだけでなく、今後普及する酵素治療の評価にも有用であると考えられた。また、質問に答えてもらうだけで簡

単に分類ができ、予後推定も可能である方法を確立できた。

E. 研究発表

(学会発表)

- 1) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、山野恒一 「ムコ多糖症 II 型患者の検査所見と生化学的所見」 第 46 回日本小児神経学会 (2004 年 7 月、東京)
- 2) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、澤田 智、山野恒一 「当科外来におけるムコ多糖症 II 型患者の臨床像のまとめ」 第 49 回日本人類遺伝学会 (2004 年 10 月、東京)
- 3) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、澤田 智、山野恒一 「ムコ多糖症 II 型の臨床分類と自然歴比較から見た骨髄移植の脳に対する効果」 第 47 回日本先天代謝異常学会 (2004 年 11 月、栃木)
- 4) Efficacy estimation of bone marrow transplantation on the brain in mucopolysaccharidosis type II: a comparative study with natural histories. Tanaka A, Sawada T, Seto T, Yamano T: The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism: 2006.9.12-16 (Makuhari, Japan)
- 5) ムコ多糖症 II 型患者に対する骨髄移植の中樞神経への効果の評価について。田中あけみ、澤田智、酒井規夫、加藤俊一、山野恒一: 厚生労働省何知性疾患克服研究事業 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 公開班会議 H18.11.24 (東京)

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・糖鎖工学研究施設 助教授

研究要旨

我々が独自に作成したスフィンゴリピドーシス疾患モデルマウス（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）の脳病態を解析と、新たな疾患モデルマウスであるサポシンCノックアウトマウスの作成に取り組んだ。

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。我々は、まず、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。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。

A. 研究目的

我々は、スフィンゴリピドーシス（脂質蓄積症）の中枢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、各種疾患モデルマウスを用いて、平成17年度から18年度の2年間にわたり、下記の3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。

- 3) 神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとしてのサポシンCノックアウトマウスの作成。

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。

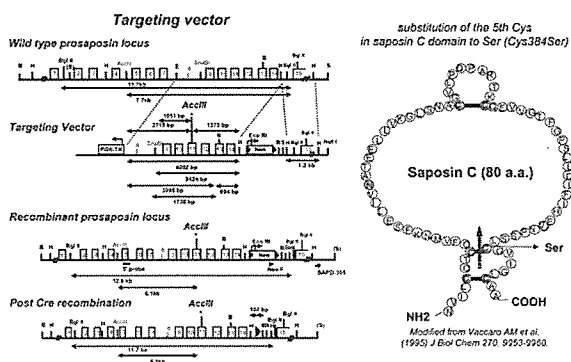
サポシンD ノックアウトマウス(Sap-D KO)はスフィンゴ脂質活性化たんぱく質のひとつであるサポシンDを遺伝的に破壊した遺伝子改変動物で、多尿と運動失調をきたし、腎臓と小脳に脂肪酸に水酸基のついたセラミド(HFA-セラミド)の蓄積が認められる。このSap-D KOの小脳病変に注目し、その神経病理変化を、免疫組織化学的手法を用いて解析した。

3) 神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとしてのサポシンCノックアウトマウスの作成。

マウスプロサポシンのゲノムDNA (Exon 1-15, 129Sv系統) をpBluescript SK (-) およびpGEM 3Zf (+) にサブクローニングし、サポシンCの3つのジスルフィド結合のうち1つが破壊されるように、5番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異 (C384S, Exon 11) をマウスプロサポシン遺伝子のサポシンCドメインに導入した (図1)。この変異により、同時にAccIIIサイトが新しく導入されるようにデザインし、ターゲティング操作時、操作後の遺伝子型を容易に確認できるように工夫した。変異の導入には mismatches プライマーによるPCR法を用いた。loxPサイトに挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクター (OSdupdel) を基本ベクターに用いることにより、正しく相同組み換えの起こったES細胞クローンに対して一過性にCreリコンビナーゼを発現させ、ネオマイシン耐性遺伝子を除去し、C384S変異のみを導入した。これにより、1つのloxPサイトがイントロン内に残ることになるが、遺伝子の翻訳には影響しないものと推定した。129Sv系統マウス由来のES細胞にジーンターゲティングを行い、正しく相同組み換えの起こったクローンを同定した後、変異ES細胞クローンをC57BL/6J系統マウス由来の胎盤胚に注入し、生まれた雄キメラマウスを

C57BL/6J雌マウスと交配して、サポシンC変異ヘテロマウス(Sap-C +/-)を得た。Sap-C +/-の交配により、サポシンCノックアウトマウスを得て、その表現型の解析を行う。

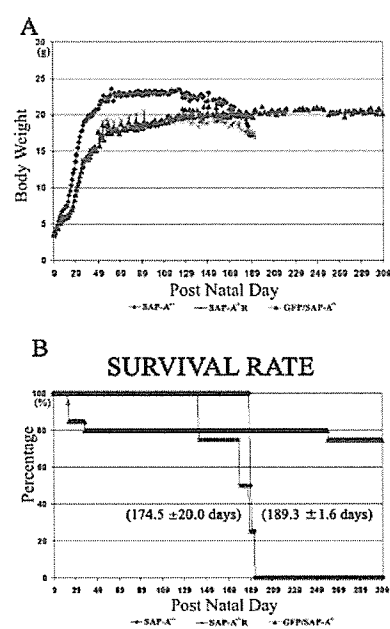
図 1



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-AKO 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-AKO 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 (図2)。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。

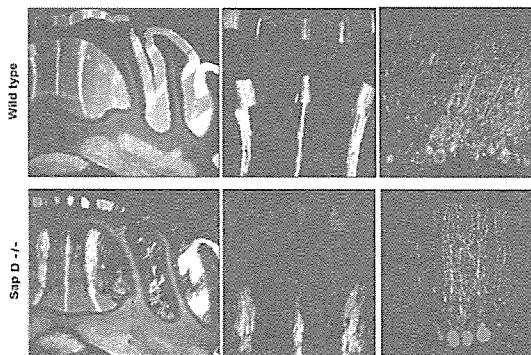
図 2



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ゼブラ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

(図3)。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。

図3



3) 平成18年度末にサポシンC変異ヘテロマウスの作成に成功した。F1ヘテロマウスは生後3ヶ月となるが、現時点で特に症状は認められていない。今後はF1ヘテロマウスの交配によりサポシンCノックアウトマウスを作成し、その症状（寿命、体重増加、各種症状、特に神経症状）の観察、生化学的、神経病理学的、神経生理学的分析を行い、その神経病態を検討する予定である。

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。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。

ゴーシェ病は最も頻度の高いライソゾーム病で3つの臨床病型 (Type 1 (慢性非神経型), Type 2 (急性神経型)、Type 3 (亜急性神経型)) に分類される。Type 1に対しては、近年、酵素補充療法が画期的な治療効果をあげているが、神経症状を主要症状とするType 2、Type 3には酵素補充療法は十分な治療効果が得られず、新たな治療戦略の開拓が望まれている。ゴーシェ病の責任遺伝子はacid- β -glucosidase (GCase)で、1992年頃より、GCase遺伝子を改変することにより (Null変異, 各種点変異導入等)、ゴーシェ病のモデルマウスを作成する試みが世界の複数の研究室で行われた。その結果、胎生致死のもの、無症状のもの、Type 1のモデルは作成されたが、いまだヒトの神経型ゴーシェ病のモデルマウスは存在しない (The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. (2001), 3635-3668.). まれな小児遺伝性神経変性疾患の治療戦略を立てる上で、マウスモデルは必須であり、神経型ゴーシェ病のマウスモデルは国内外の研究者が待ち望んでいる。

一方、ヒトのサポシンC欠損症は世界で2

症例のみであるが、ともにType 3のゴーシェ病類似の病型を呈することが知られており、*in vitro*でもサポシンCはacid- β -glucosidaseに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る (The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. (2001), 3371-3388.)。これらの事実から、サポシンCの特異的ノックアウトマウスは生化学的、病理学的に神経型ゴーシェ病のモデル動物となることが予想される。我々は同一遺伝子にコードされるサポシンAおよびDの特異的ノックアウトマウス作成の実績があり、サポシンCの特異的ノックアウトマウス作成にも成功する可能性が高い。サポシンCノックアウトマウスが作成できれば、Substrate reduction therapyなどの、脳・神経系をターゲットとした各種治療戦略をテストすることが可能となり、その有用性は基礎的研究のみならず、臨床医学的にも大きい。

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シ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. Hematopoietic cell transplantation ameliorates clinical phenotype and progression of the CNS pathology in the mouse model of late onset Krabbe disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65, 565-575, 2005.

2) Wu YP, Mizukami H, **Matsuda J**, Saito Y, Proia LR, Suzuki K. 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, 2005.

3) Sun Y, Witte DP, Zamzow M, Ran H, Quinn B, **Matsuda J**, Grabowski GA. Combined saposin C and D deficiencies in mice lead to a neuronopathic phenotype, glucosylceramide

and α -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 2007 (*in press*).

4) **Matsuda J**, Yoneshige A, Suzuki K. The function of sphingolipids in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J. Neurochem.* 2007 (*in press*).

5) 松田純子. 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. 日本先天代謝異常学会雑誌 Vol.22, 35-41, 2006.

6) **Matsuda J**, Vanier MT, Popa I, Portoukalian J, Suzuki K. GD3-and O-acetylated GD3-gangliosides in the GM2 synthase-deficient mouse brain and their immunohistochemical localization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 82: 189-196, 2006.

7) **Matsuda J**, Suzuki K. Krabbe disease (Globoid cell leukodystrophy). In Lysosomal Storage Disorders edited by Barranger, J., Cabrera-Salazar, M.A., Springer, New York, 2006 (*in press*).

2. 学会発表

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

2) **Matsuda J**, Yamazaki A, Kido M, Toida K, Tadano-Aritomi K, Ishizuka I, Suzuki K. Patterned cerebellar Purkinje cell death with accumulation of HFA-ceramide in the new mouse model of sphingolipidosis. 20th Biennial meeting international society for neurochemistry jointly with the European society for neurochemistry. August, 21-26, 2005, Innsbruck, Austria.

3) 松田純子. 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. 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）.

4) 松田純子. 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. 東海大学ハイテク整備事業成果報告会. 2005年9月21日、東海大学校友会館、東京都霞ヶ関.

5) **Matsuda J.**, Suzuki K. The function of sphingolipid in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiency. Second Special Meeting of the International Society of Neurochemistry, on Neural Glycoproteins and Glycoproteins. (招待講演) December 1-5, 2006, Antigua, West Indies.

6) **Matsuda J.**, Yoneshige A., Kubo N., Suzuki K. Prosaposin is up-regulated in the brain and placenta of lysosomal storage disorders (LSDs) in the mouse: Possible markers for the neonatal screening for LSDs? The 6th meeting of the international society for neonatal screening. September 16-19, 2006, Awaji, Hyogo and Tokushima, Japan.

7) Yoneshige A., Kubo N., Suzuki K., **Matsuda J.** Generation of a specific anti-mouse prosaposin antibody: Specific up-regulation of prosaposin in the brain of saposin D knockout mouse. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.

8) 松田純子. ライソゾーム病モデルマウスを用いた脳の発達、維持、病態におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析. 東海大学糖鎖工学研究施設・Hi Tech Research Center 合同研究発表会. 2006年11月24日、東海大学校友会館、東京都霞ヶ関.

9) 松田純子. 脳の発生、発達、病態におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析. 第12回日本ライソゾーム病研究会. 2006年11月25日、東京慈恵会医科大学.

G. 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)

(分担)研究報告書

クラッベ病の病態解析と I-cell 病の変異解析

(分担)研究者 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

研究要旨

リソソーム病のうち遺伝性脱髄疾患の1つであるクラッベ病の病態解明をめざすために、遺伝子解析を行い、日本人の遺伝子変異の特徴を見だし、また患者会を通じて自然歴調査を行った。もう一つの疾患として I-cell 病の変異解析を行い、日本人に特徴的な高頻度変異を同定した。

A. 研究目的

- 1) クラッベ病の病態解明; 日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。
- 2) 自然歴調査; 疾患の自然歴を把握することにより、進行に伴う合併症、死亡原因などを明らかにし、家族に満足の得られる治療方針を立てることを目的とする。
- 3) I-cell 病の遺伝子解析; 日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。検体は全国専門施設から協力を得て、入手可能なものを解析して日本人の変異の特徴を解明することを目標とした。

B. 研究方法

- 1) クラッベ病の病態解明; 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) 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。

C. 研究結果

- 1) 1) クラッベ病の病態解明; 17例の新規患者の解析結果と過去の報告を合わせたものを表1に示す。また表2に日本人クラッベに見いだされた変異と表現型の関係を表2に示す。本研究により17症例の34アレル中、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。

Patient No	Genotype	Phenotype	Age at onset
A1**	W115X/P302A*	Infantile	6M
A2	R204X/12Del3Ins*	Infantile	<6M
A3	R204X/1234T	Infantile	<6M
A4	L364R/T652P	Infantile	5M
A5	12Del3Ins/-	Infantile	6M
A6	T652P/T652P	Infantile	4M
A7	12Del3Ins/T652P	Infantile	6M
A8	393delT/-	Infantile	4M
A9	S257F/-	Infantile	6M
A10	P302A/L618S	Late-infantile	8M
A11	G270D/R515H	Late-infantile	2Y
A12	I66M+I289V/12Del3Ins	Juvenile	5Y
A13	I66M+I289V/W647X*	Juvenile	3Y
A14	I66M+I289V/1719-1720insT	Juvenile	3.5Y
A15	12Del3Ins/-	Juvenile	3.5Y
A16	G270D/G270D	Adult	69Y
A17	I66M+I289V/I66M+I289V	Adult	59Y

Patient No	Genotype	Phenotype	Age at onset
B1	12Del3Ins/12Del3Ins	Infantile	4 M
B2	12Del3Ins/12Del3Ins	Infantile	3M
B3	S52F/W410G	Infantile	<6M
B4	12Del3Ins/T652P	Infantile	4M
B5	R515H/R515H	Infantile	5M
B6	T262I/12Del3Ins	Infantile	1Y
B7	G270D/G270D	Adult	10-20Y
B8	I66M+I289V/I66M+I289V	Adult	10-20Y
B9	I66M+I289V/Y354X	Adult	10-20Y
B10	L618S/IVS6+5G>A	Adult	10-20Y
B11	L618S/L618S	Adult	51Y

表1

Mutation	Infantile	Late-infantile	Juvenile	Adult	Total allele
12Del3Ins	9	0	2	0	11
T652P	5	0	0	0	5
R515H	2	1	0	0	3
R204X	2	0	0	0	2
P302A	1	1	0	0	2
S52F	1	0	0	0	1
W115X	1	0	0	0	1
393delT	1	0	0	0	1
1234T	1	0	0	0	1
S257F	1	0	0	0	1
T262I	1	0	0	0	1
L364R	1	0	0	0	1
W410G	1	0	0	0	1
1719-1720insT	0	0	1	0	1
W647X	0	0	1	0	1
IVS6+5G>A	0	0	0	1	1
Y354X	0	0	0	1	1
I66M+I289V	0	0	3	5	8
G270H	0	1	0	4	5
L618S	0	1	0	3	4
Total allele	27	4	7	14	52

表2

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、効率に遺伝子変異の検索を行うことが可能となった。また変異と表現型の相関に関しても日本人に特有な変異において情報が得られた。

- 2) 自然歴調査;疾患の自然歴調査に関してまず、親の会の同意を得ることができたので、アンケート形式案を作成した。主たる項目は下記の通りである。A)診断に関するもの;診断方法、診断年齢、家族歴、B)臨床経過に関するもの;出生時、乳児期の発育発達、初発症状、神経症状の経過 C)合併症に関するもの;易感染性、胃食道逆流、誤嚥性肺炎、痙攣、無呼吸、嚥下困難、D)現在の症状;視力、聴力、歩行状態、食事、学校、E)現在の介助、治療;車椅子、栄養法(鼻注、胃ろう)、酸素療法、気管切開、人工呼吸器、F)家族の満足度;疾患に対する理解、受け入れ、主治医との信頼関係、医療に対する要望。また、このアンケートによる情報が、1回だけの断片的な情報にとどまらず、経過が追跡できるように、計時的に情報を親の会が中心に情報の更新を行うことを検討した。

I-cell病患者11名とやや軽症でMLIIIと考えられる患者2名に関して、GPTAB 遺伝子の変異を解析し、下表のような結果を得た。

Pt.No	phenotype	cDNA	protein
1	MLIII	3565C>G 3565C>G	R1189X R1189X
2	MLIII	324delAG 933ins123b	fs fs
3	MLII	3565C>G	R1189X
4	MLII	dup(ex2) c2089insC	fs fs
5	MLII	?	
6	MLII	dup(ex2) 2541delA	fs fs
7	MLII	?	
8	MLII	3565C>G 3565C>G	R1189X R1189X
9	MLII	3565C>G 3565C>G	R1189X R1189X
10	MLII	?	
11	MLII	3565C>G 3565C>G	R1189X R1189X
12	MLII	3458A>G 3565C>G	N1153S R1189X
13	MLII	324delAG dup(ex2)	fs fs

表3

- 3) これにより、日本人における変異も停止コドン、frame shift が大半であり、なかでも R1189X 変異はアリアル頻度で42%に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられる。

D. 考察

- 1) クラッペ病の病態解明;日本人 Krabbe 病患者における 12Del3ins と I66M+I289V は37%allele を占めており、日本人における特徴と考えられる。また 12Del3ins, T652P, R515H は乳児型もしくは重症型に寄与していると考えられ、I66M+I289V, G270H, L618S は若年型もしくは軽症型に関与すると考えられた。この6つの変異を足すと、日本人の変異の70%に達することがわかった。また各の検索方法が確立したことは、早期の診断、予後の推定に重要な知見と考えられる。
- 2) 自然歴調査;クラッペ病の大半を占める乳児型についてはまだ根本的な治療がなく、対症療法が中心となるが、治療と生活の質の関係を考えた上での、家族主体の治療選択が重要と考えられるため、このアンケートの結果が患者や主治医の参考になると考えられる。

- 3) Mucopolipidosis は典型的なものが II 型(I-cell 病)、軽症のものが III 型と呼ばれるが、GPTAB 遺伝子の変異はその両者に見られ、日本人においても停止コドン、frame shift 変異が多いことが判明した。高頻度変異 R1189X については、これがホットスポットなのか創始者効果によるものかについては検討を要する。

E. 結論

クラッペ病は全世界に認められる疾患であり、民族による違いなどは良くわかっていなかったが、日本人の遺伝子変異を解析することにより、いくつかの日本人特有の変異が判明したことは、意義があると考えられる。これが今後日本人クラッペ病の診断、治療において、基礎的なデータになると思われる。また患者主体の自然歴調査が、今後患者主体の治療選択を考えるためにも重要なステップとなることが予想される。

I-cell 病は日本人に多い疾患であり、本研究において日本人における遺伝子異常の概略が初めて明らかにされたことになる。この結果は今後確定診断の確実で迅速な方法となりえると考えられ、またこの解析が今後の本疾患に対する治療法の開発の基本となると考えられる。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Chikara Kokubu Ulrich Heinzmann, Norio Sakai, et al., Skeletal defects in *ringelschwanz* mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis, *Development* 131:5469-80 2004
- 2) Okano Y, Hase Y, Sakai N, et al., In Vivo Studies of Phenylalanine Hydroxylase by Phenylalanine Breath Test: Diagnosis of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency., *Pediatr Res.* 56:714-719 2004

- 3) Ihara-Watanabe M, Uchihashi T, Sakai N, et al., Involvement of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in chondrocytic differentiation of ATDC5 cells: Application of a gene-trap mutagenesis. *J Cell Biochem.* 93:418-426, 2004
- 4) Tamamori A, Fujimoto A, Sakai N, et al., Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency., *Pediatr Res.* 56(4):608-14. 2004
- 5) Yamada M, Inui K, Sakai N, et al., Analysis of recombinant human saposin A expressed by *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 588-593, 2004
- 6) Sangkhathat S, Kusafuka T, Sakai N, et al., Renal cell carcinoma in a pediatric patient with an inherited mitochondrial mutation., *Pediatr Surg Int.* 21:745-8, 2005
- 7) Eto Y, Ohashi T, Sakai N, et al H., Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study., *J Inherit Metab Dis.* 28:575-83, 2005
- 8) Vega H, Waisfisz Q, Sakai N, et al., 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.* 37:468-70, 2005
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) Kawai M, Sakai N, Miyake S, et al., Novel mutation of gene coding for glial fibrillary acidic protein in a Japanese patient with Alexander disease. *Brain Dev.* 28(1):60-2, 2006
- 13) 酒井規夫、神経症状でみつける先天代謝異常症 小児科診療 69; 1579-84, 2006
- 14) 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
- 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
第47回日本先天代謝異常学会：栃木 04. 11. 11-11. 13
大友孝信、青天目 信、神尾範子、沖永剛志、今井克美、酒井規夫、谷池雅子、大藪恵一、3-メチルグルタコン酸尿症の一症例
許 成哲、酒井 規夫、谷池 雅子、赤木 幹弘、乾 幸治、大藪 恵一、Krabbe 病患者における DHPLC 法を用いた遺伝子変異の検索(第二報)
第31回日本小児栄養消化器肝臓学会：東京 04. 9. 17-9. 19
酒井規夫、谷口真理子、吉津紀久子、谷池雅子、大藪恵一、Wilson 病の遺伝相談の経験
第46回日本小児神経学会：東京 04. 7. 15-7. 17
酒井規夫、青天目信、神尾範子、谷池雅子、立花直子、大藪恵一、若年型糖原病 II 型4例における睡眠時無呼吸に関する検討

- 酒井規夫、下野九理子、沖永剛志、今井克美、谷池雅子、大藪恵一、視神経萎縮、尿細管性アシドーシス、難聴など多彩な合併症を伴った hereditary motor and sensory neuropathy の兄妹例
- 第107回日本小児科学会学：岡山 04. 4. 9-4. 11
酒井規夫、青天目信、神尾範子、谷池雅子、立花直子、大藪恵一、若年型糖原病 II 型3例における睡眠時無呼吸に関する検討
- 第4回関西出生前診療研究会：大阪 04. 2. 28
酒井規夫、吉津紀久子*、谷池雅子、大藪恵一、出生前診断の適応について
- 第22回臨床細胞分子遺伝研究会；大阪 04. 1. 31
酒井規夫、ライソソーム病の治療の進歩
酒井規夫、染色体異常と遺伝相談
- 第25回臨床細胞分子遺伝研究会；04. 6. 18
酒井規夫、神尾範子、沖永剛志、谷池雅子、Pallister-Hall 症候群の一例
- 第48回日本先天代謝異常学会：熊本 05. 11. 16-11. 18
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
- 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
- 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47回日本小児神経学会：05. 5. 19-5. 21、熊本
酒井規夫、大場志保子、青天目信、神尾範子、沖永剛史、今井克美、鈴木保宏、津留陽、田中あけみ、谷池雅子、大藪恵一、白質ジストロフィー7例に対する造血幹細胞移植の効果とリスク
- The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, 06. 09. 12-16
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
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
Akagi M, Miyoshi Y, Sakai N, Taniike M, Ozono K, Novel mutations of ZMPSTE24 in a Japanese family with madibuloacral dysplasia.
- 第33回大阪大学阪神地区小児科勉強会；神戸 06. 9. 7
小児の白質ジストロフィー

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

ポンペ病の分子病理

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： ポンペ病の病態を蛋白質分子レベルで明らかにして、本疾患の理解と治療法策定などの臨床に役立てるため、構造学および生化学的解析を行った。乳児型ポンペ病の病因となる R600C 変異においては、酸性 α -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たす結果、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。

A. 研究目的

ポンペ (Pompe) 病は、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) の活性低下により、その基質であるグリコーゲンがリソソームに蓄積する常染色体劣性遺伝病である。本症の臨床表現型は多様であり、乳児期に発症して心拡大、肝腫、筋緊張低下や筋力低下などの全身症状を示す「乳児型」と、若年または成人期に発症して骨格筋症状を示す「遅発型」とに大別される。これらの病因となる GAA 遺伝子変異に関しては、これまでに多くの報告があるが、その変異により、発現蛋白質にどんな変化が起こり、病態が形成されるかに関しては、不明である。

ポンペ病に対してはチャイニーズハムスター卵巣細胞で作られた組み換えヒト GAA が、新薬として申請されており、今後、適切な治療法を策定するためには、その分子病理の解明が必要となる。そこで、ポンペ病の病因遺伝子変異に基づいて、GAA 蛋白質の立体構造にどんな変化が起こり、その結果、

GAA の量や酵素活性にどんな異常を来たすかについて、構造学および生化学的な方法で解析した。

B. 研究方法

1) 生化学的分析

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砕液を試料として、人工基質 4-methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside (Sigma, St. Louis, MO) を用いた蛍光法で行った。蛋白質については、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