

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。

2) 構造学的分析

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。

C. 研究結果

1) 酵素活性測定

GAA 活性は乳児型ポンペ病患者由来の培養線維芽細胞 (F661) において、 $< 1 \text{ nmol/h/mg protein}$ 、遅発型ポンペ病患者由来の培養線維芽細胞 (F664) において、 $1 \text{ nmol/h/mg protein}$ (対照の平均 \pm 標準偏差[試料数]: $108 \pm 42[10]$) と、どちらも著明に低下していた。

2) Western blotting

対照では、分子量 95 kDa の中間体 GAA と分子量 76 kDa の成熟体 GAA に相当するバンドが検出された。一方、ポンペ病患者由来の細胞では、F661 および F664 の双方ともにバンドは検出されず、GAA 蛋白質の量が著減していると考えられた。

3) GAA 構造モデリング

ヒト野生型 GAA において、R600 のアミノ酸残基は、第 5 β -ストランドにあり、基質の認識に関係すると予想された。R600C 変異では、酵素の活性部位を含む広い範囲に構造変化が生じて、酵素蛋白質の基本となるバレル構造が失われると考えられた。一方、R437 のアミノ酸残基は、バレル構造を構成する第 3 β -ストランドの N 末端にあり、その側鎖は分子表面に露出すると予想された。R437C 変異では、分子表面に局限した、比較的小さな構造変化が起こると考えられた。

D. 考察

乳児型ポンペ病の病因となる遺伝子変異 R600C に基づき、GAA のバレル構造に大きな立体構造変化が起こり、酵素蛋白質は不安定となって、過剰に分解された結果、酵素活性はほぼ完全に失われるものと考えられた。一方、遅発型ポンペ病の病因となる遺伝子変異 R437C 変異による GAA 構造変化は、分子表面に局限し、その程度は、R600C に比べて、やや軽いと考えられた。R437C においても、酵素蛋白質は不安定となるが、ごく軽度の残存活性がみられた。

E. 結論

in silico でヒト野生型 GAA の立体構造モデルを構築し、乳児型および遅発型ポンペ病の病因となる遺伝子変異によって、各々どんな変化が起こるかを解析した。また、ポンペ病患者由来の培養線維芽細胞を試料とした生化学的解析により、GAA の量および酵素活性を測定した。これらの解析結果を統合することで、ポンペ病の病態を蛋白質分子レベルで明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., et al.: Structural and immunocytochemical studies on α -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *J. Hum. Genet.*, 49: 1-8, 2004.

2) Kotani, M., Yamada, H., Sakuraba, H.: Cytochemical and biochemical detection of intracellularly accumulated sialyl glycoconjugates in sialidosis and galactosialidosis

- fibroblasts with *Maackia amurensis*. *Clin. Chim. Acta*, 344: 131-135, 2004.
- 3) Ishiwari, K., Kotani, M., Suzuki, M., et al.: Clinical, biochemical, and cytochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder. *J. Hum. Genet.*, 49: 656-663, 2004.
 - 4) 桜庭 均, 伊藤孝司: リソソーム性ノイラミニダーゼ (ノイラミニダーゼ-1). *日本臨床 増刊「広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (第6版) - その数値をどう読むか -」*, 62:517-520, 2004.
 - 5) Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., et al.: Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human beta-hexosaminidase A on the accumulated GM2 ganglioside. *J. Hum. Genet.*, 50: 460-467, 2005.
 - 6) Kanekura, T., Fukushige, T., Kanda, A., et al.: Immunoelectron microscopic detection of globotriaosylceramide accumulated in the skin of patients with Fabry disease. *Br. J. Dermatol.*, 153: 544-548, 2005.
 - 7) Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., et al.: Fabry disease: Correlation between structural changes in α -galactosidase, and clinical and biochemical phenotypes. *Hum. Genet.*, 117: 317-328, 2005.
 - 8) Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., et al.: 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.
 - 9) Oheda, Y., Kotani, M., Murata, M., et al.: Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology*, 16: 271-280, 2006.
 - 10) Tatano, Y., Takeuchi, N., Kuwahara, J., et al.: 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.
 - 11) 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: 341-352, 2006.
 - 12) Kawashima, I., Takeuti, I., Ohsawa, M., et al.: Phospholipid storage in the myocardium of a unique Japanese case of idiopathic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta*, 372: 154-157, 2006.
 - 13) Tatano, Y., Takahashi, T., Tsuji, D., et al.: 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.
- 14) Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., et al.: Molecular pathogenesis and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases. *Curr. Drug Targets – Central Nervous System and Neurological Disorders.*, 5: 401-413, 2006.
 - 15) 桜庭 均: α -galactosidase A. *腎と透析*, 61: 288-290, 2006.
 - 16) 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.
2. 学会発表
- 1) Sakuraba, H., Chiba, Y., Jigami, Y.: Enzyme-replacement trials for Fabry mice and cultured human fibroblasts with recombinant alpha-galactosidase produced in yeast. 4th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. Natural course, pathophysiology and therapy, 2004.4.23-24, Sevilla, Spain
 - 2) 桜庭 均: ファブリー病治療薬 アガルシダーゼベータ, ラジオたんぱ SW 2004. 4. 5 放送, BS 2004. 4. 26 放送
 - 3) 桜庭 均: 遺伝性筋疾患の分子病理. 徳島大学大学院薬学系特別講演, 2004. 5. 26, 徳島
 - 4) 桜庭 均: ファブリー病の酵素補充療法. 第521回日本小児科学会東京都地方会講話会, 指定発言, 2004. 6. 26, 東京
 - 5) 桜庭 均: ファブリー病の発症機構に関する構造学的研究. 第46回小児神経学会総会, 2004.7.15-17, 東京
 - 6) 桜庭 均: 酵母の発現系を利用したリソソーム病治療薬の開発. 臨床研セミナー・ゲノム健康医科学とトランスレショナル・リサーチ, 2004. 7. 22, 東京
 - 7) 田島陽一, 宇山英一郎, 松澤史子, 他.: 縁取り空胞を伴う遠位ミオパチーにおけるシアリル糖蛋白質糖鎖の異常. 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節シンポジウム, 2004.9.26-27, 木更津
 - 8) 福重智子, 神崎 保, 小谷政晴, 他.: Fabry 病ノックアウトマウスに対する酵素補充療法の光顕・電顕的検索. 第31回日本電顕皮膚生物学会, 2004.10.8-9, 鹿児島.
 - 9) 出石知子, 神崎 保, 桜庭 均, 他.: 電顕的検索を行ったシアリドーシスの一例. 第31回日本電顕皮膚生物学会, 2004.10.8-9, 鹿児島
 - 10) 田島陽一, 宇山英一郎, 小谷政晴, 他.: 縁取り空胞型ミオパチー(DMRV)における糖鎖異常. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜
 - 11) 大枝由加子, 小谷政晴, 桜庭 均, 他.: レクチン染色を用いたノイラミニダーゼ-1欠損細胞におけるシアル酸含有糖鎖蓄積の解析. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜
 - 12) 多田野 豊, 竹内直博, 桑原 淳, 他.: β -galactosidase 欠損症とコステロ症候群における 67-kDa エラスチン結合タンパク質 (EBP) の発現解析. 第77回日本生化学会大会,

- 2004.10.13-16, 横浜
- 13) 内田佳人, 佐藤百合恵, 相川聖一, 他.: 分子モデリングに基づくヒトカタペシン A (セリンカルボキシペプチダーゼ)の微生物由来のインヒビターに対する感受性の遺伝的改変. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜
 - 14) 明星裕美, 笠原由子, 辻 大輔, 他.: メタノール資化性酵母における組換えヒト β -ヘキソサミニダーゼの精製と諸性質. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜
 - 15) 千葉靖典, 桜庭 均, 高岡友紀, 他.: 酵母による組換え α -ガラクトシダーゼの機能解析. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜
 - 16) 桜庭 均: ファブリー病ってどんな病気? ジェンザイム講演会, 2004.10.16, 東京
 - 17) 桜庭 均: 先天代謝異常症の分子病態解明と治療法開発. 神奈川科学技術アカデミー, 2004.10.28, 東京
 - 18) 福重智子, 神崎 保, 小谷政晴, 他.: Fabry病ノックアウトマウスに対する酵素補充療法の形態学的検索. 第45回日本組織細胞化学会, 2004.10.29-30, 鹿児島
 - 19) 出石知子, 神崎 保, 桜庭 均, 他.: 本邦16例目のシアリドーシスの臨床的・電顕的検索. 第45回日本組織細胞化学会, 2004.10.29-30, 鹿児島
 - 20) 桜庭 均, 松澤史子, 相川聖一, 他.: ファブリー病の発症機構に関する構造学的研究. 第47回日本先天代謝異常学会, 2004.11.11-13, 宇都宮
 - 21) 桜庭 均, 田島陽一, 松澤史子, 他.: 縁取り空胞を伴う遠位ミオパチーにおけるシアリル糖蛋白質糖鎖の異常. 第47回日本先天代謝異常学会, 2004.11.11-13, 宇都宮
 - 22) 田島素子, 溝口枝里子, 立川恵美子, 他.: ミオクローヌスで発症したシアリドーシスの一例. 第47回日本先天代謝異常学会, 2004.11.11-13, 宇都宮
 - 23) 桜庭 均: 神経難病の分子病態解明と新規治療法の評価に関する基礎的検討. CREST. 「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」研究班会議, 2004.12.2, 東京
 - 24) 桜庭 均: 遺伝病研究の最前線-基礎から治療へ. 能代市山本群医師会講演会, 2004.12.9, 能代
 - 25) 桜庭 均: 進む難病対策. 酵素補充療法. NHKきょうの健康, 2005.2.28 放送
 - 26) 桜庭 均: 遺伝病の分子病態解明と治療法開発に向かって-ファブリー病をモデルとして. 2005年トップフォーラム「生命科学・ゲノム科学からみた医学とオーダーメイド医療」, 2005.3.5, 東京
 - 27) 桜庭 均: ファブリー病の病態と治療. 第41回東京腎生検カンファレンス, 2005.3.11, 東京
 - 28) 桜庭 均, 小谷政晴, 田島陽一, 他.: レクチンおよび特異抗体を用いたリソソーム病蓄積物質の同定とその臨床への応用. 平成16年度都立病院共同研究成果報告会, 2005.3.18, 東京
 - 29) 桜庭 均: リソソーム病の分子病態解明と新規治療薬開発. 平成16年度特殊疾病(難病)に関する専門研究報告会, 2005.3.29, 東京

- 30) 桜庭 均: 神経難病の分子病態解明と新規治療法の評価に関する基礎的検討. CREST.「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」研究班会議, 2005.4.15, 東京
- 31) Sakuraba, H. : A Japanese female patient with Fabry disease. Fabry Disease Training, 2005.5.12, Boston, USA
- 32) 桜庭 均: リソソーム性遊離シアル酸蓄積症の構造生物学的研究. 第 47 回日本小児神経学会, 2005.5.19-21, 熊本
- 33) 桜庭 均: 糖質と遺伝病: リソソーム病の分子病態解明と治療法開発に向かって. 東京理科大学理工学部応用生物学科特別講義, 2005. 6. 30, 野田
- 34) 竹内直博, 多田納 豊, 桜庭 均, 他.: コステロ症候群患者由来皮膚線維芽細胞におけるプロテオーム解析. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 2005.7.7-8, 徳島
- 35) 多田納 豊, 竹内直博, 桜庭 均, 他.: エラスチン繊維形成不全を伴うコステロ症候群の発症機構の解析. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 2005.7.7-8, 徳島
- 36) 桜庭 均: ファブリー病の分子病態解明と治療法開発. Cell Biology Summer Meeting, 2005. 7. 15, 熱海
- 37) 千葉靖典, 明星裕美, 高岡友紀, 他.: メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を利用した糖タンパク質生産と糖鎖改変. 第 25 回日本糖質学会年会, 2005.7.20-22, 大津
- 38) 桜庭 均: ファブリー病の病態解明そして治療へ. 順天堂大学附属順天堂医院腎高血圧内科セミナー, 2005.7.21, 東京
- 39) 福重智子, 永山善久, 桜庭 均, 他.: I-cell diseaseの電顕的検索. 第 32 回日本電顕皮膚生物学学会学術学会, 2005.9.17-18, 札幌
- 40) 相川聖一, 松澤史子, 桜庭 均: リソソーム性遊離シアル酸蓄積症: 乳児型シアル酸蓄積症とSalla病の構造生物学的研究. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-22, 神戸
- 41) 田島陽一, 宇山英一郎, 北島 健, 他.: 縁取り空胞型遠位ミオパチーにおける筋糖蛋白質 O 結合型糖鎖の形成異常. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-22, 神戸
- 42) 黒木 綾, 辻 大輔, 石橋靖浩, 他.: Sandhoff 病モデルマウス由来不死化グリア前駆体細胞に対するレンチウイルスベクターによる遺伝子導入効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-20, 神戸
- 43) 竹内直博, 多田納 豊, 桜庭 均, 他.: コステロ症候群患者由来皮膚線維芽細胞におけるプロテオーム解析. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-20, 神戸
- 44) 多田納 豊, 竹内直博, 桜庭 均, 他.: エラスチン繊維形成障害コステロ症候群患者由来皮膚線維芽細胞株の特徴付け. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-21, 神戸
- 45) 村田真以, 小谷政晴, 田島陽一, 他.: Sandhoff 病マウス由来 Schwann 細胞に対する組換えヒトヘキサミンダーゼの治療効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005.10.19-21, 神戸
- 46) 桜庭 均: 先天代謝異常症の分子病態解明と治療法開発. 神奈川技術アカデミー, 2005. 11. 1, 東京
- 47) 桜庭 均, 村田真以, 川島育夫, 他.: ファブリー病患者線維芽細胞及びファブリー病マウスに対するアガルシダーゼ・アルファとベータの効果の

- 比較. 第 48 回日本先天代謝異常学会, 2005.11.16-18, 熊本
- 48) 大澤真以, 小谷政晴, 三川浩輝, 他.: ザンドホッフ病マウス由来 Schwann 細胞の樹立と組み換えヒト・ベータ-ヘキソサミニダーゼの取り込みの解析. 第 11 回日本ライソゾーム病研究会, 2005.12.2, 東京
- 49) 相川聖一, 松澤史子, 奥宮敏可, 他.: Fabry 病の分子病態解析: ミスセンス変異が alpha-galactosidase の立体構造に与える影響と臨床的および生化学的表現型との関連性の解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.12.7-10, 福岡
- 50) 松澤史子, 相川聖一, 田中あけみ, 他.: GM2 ガングリオシドーシス B 異型及び O 異型におけるベータ-ヘキソサミニダーゼの構造学的解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.12.7-10, 福岡
- 51) 桜庭 均: ファブリー病ヘテロ接合体の診断法開発と酵素補充療法による治療効果の評価. 平成 17 年度東京都難病に関する専門研究報告会, 2006.3.28, 東京
- 52) 田北博保, 村山耕一郎, 斉藤純代, : ガラクトシアリドー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
- 53) 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ゾ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
- 54) 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
- 55) 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
- 56) Murayama, K., Shimada, Y., Takita, H., et al.: 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
- 57) Tajima, Y., Uyama, E., Go, S., et al.: 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
- 58) Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., et al.: 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
- 59) Kawashita, E., Kuroki, A., Matsuzawa, F., et al.: 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
- 60) Tsuji, D., Kuga, N., Murata, M., et al.: 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
- 61) 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
- 62) Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., et al.: 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
- 63) Tatano, Y., Tsuta, K., Fujinawa, R., et al.: 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
- 64) 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
- 65) 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)
- 66) 小谷政晴, 岡本土毅, 今田正人, 他.: 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 回日本神経科学会大会, 2006.7.19-21, 京都
- 67) 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
- 68) 笠原由子, 明星裕美, 千葉靖典, 他.: 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
- 69) Itoh, K., Kadota, Y., Aikawa, S., et al.: Predicted molecular interaction between human lysosomal sialidase (neuraminidase 1) and protective protein/cathepsin A. Sialoglycoscience2006, 5th International Conference, 2006.8.27-30, Mishima, Japan
- 70) 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
- 71) 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
- 72) Tajima, Y., Uyama, E., Matsuzawa, F., et al.: 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
- 2006.11.26, 金沢
- H. 知的財産権の出願・登録状況なし。
- 73) Kawashima, I., Ohsawa, M., Kotani, M., et al.: 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
- 74) Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, et al.: 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
- 75) Akeboshi, H., Chiba, Y., Kasahara, Y., et al.: 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
- 76) 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, 2006.11. 24-25, 東京
- 77) 新井田要, 朝本明弘, 尾崎 守, 他. : I-cell 病の出生前診断の経験. 第 27 回北陸先天異常研究会,

平成 16～18 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 型の日本での頻度を調査し、ニーマンピック病は 0.9 %の医師で経験ありとの回答を得た。病型別では A 型 2 例、B 型 2 例、C 型 13 例、不明 2 名であり、ニーマンピック病 A/B 型の頻度は極めて低かった。国内症例で同病 A 型と B 型臨床型と臨床型を調べ、S231P が国内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。また S436R/S436R による B 型の症例で心筋内動脈壁の肥厚（動脈壁平滑筋細胞の腫大）を伴う左心機能異常を示した症例を経験した。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（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ミエリナーゼの欠損が原因の疾患で、酵素補充療法の対象疾患である。本疾患に関して遺伝子レベルでの解明は進んだが未だ不明の点も多い。本疾患に関して疫学、臨床及び病態に関する研究を行った。

2. 研究方法

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って、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、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 の異常により引き起こされる。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ミエリナーゼ（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 を用いたハイブプロローブ法にて測定した。

3. 研究結果および考察

1) 疫学的研究: 2,785 名の対象に対して回答が得られた 1,052 名で、ニーマンピック病の経験ありが 25 名 (0.9%)、うち 14 名では A 型 2 例、B 型 2 例、C 型 13 例、不明 2 名であった。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) 臨床的研究: ニーマンピック病 B 型 (遺伝子型 S436R/S436R) で左心機能異常を呈した姉妹例を提示した。1 例は急速な心不全の進行により死亡した。剖検の結果、心筋内動脈壁の肥厚という特徴的な所見が認められた。組織学的にはニーマンピック細胞 (CD68 陽性細胞) の浸潤ではなく動脈壁平滑筋細胞の腫大が主な所見であった。本疾患では細胞のコレステロール排泄障害により低 HDL 血症を伴う。動脈壁肥厚の原因に関して脂質輸送異常から考察した。

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 例は子をもっている会社員の女性である (S231P/c.567delT)。S231P は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ある。

3) 病態に関する研究 1: 2 つ NPC 培養皮膚線維芽細胞およびプロゲステロンと LDL コレステロールを添加した正常細胞では細胞内コレステロールの蓄積と酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) の低下 (60~70%) が観察されコレステロール依存性 ASM 活性調節機構の存在を示唆した。これら細胞の ASM の免疫化学染色を行ったが LysoTracker 陽性のライゾゾームと局在が一致しており、コレステロール蓄積により ASM 蛋白の局在変化は観察されなかった。コレステロール蓄積による酵素分子レベルの調節機構の存在を示唆した。

4) 病態に関する研究 2: 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 蛋白と相溶性が高く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型が多彩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 型は稀な疾患だが軽症例が存在する可能性があり、S231P は日本人において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。細胞内コレステロールおよびスフィンゴミエリン蓄積によるASM 活性調節機構の存在が考えられる。またニーマンピック病 A/B 型の病態を考える上で、細胞内脂質輸送に関する ABC 蛋白の機能との関係も重要と思われた。

5. 研究発表

論文発表

1. Takahashi I, Takahashi T, Mikami T, Komatsu M, Ohura T, Schuchman EH, Takada G. Acid sphingomyelinase: Relation of ⁹³Lys residue on the ratio of intracellular to secreted enzyme activity. *Tohoku J Exp Med*, 206: 333-340, 2005.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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）
（総合）研究報告書

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

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

ゴーシェ病患者では、血中の IL-18、TGF- β 1 の上昇がみられ、IL-18 は2つの骨形成マーカーと、M-CSF は骨吸収マーカーと、それぞれ相関を示した。また、血液所見との関連を検討したところ、M-CSF および TNF- α は血色素濃度と逆相関を示した。また M-CSF、TGF- β 1、TNF- α は治療効果のバイオマーカーとして利用可能である。ファブリー病で血液中の一酸化窒素代謝産物の濃度とその基質であるアルギニン濃度や一酸化窒素産生調節に関係する VEGF、TGF- β 1、PDGF-AB の関係を検討したところ、相関は認めず、またアルギニン濃度は低値であった。このことからファブリー病患者では一酸化窒素産生調節機構の破綻およびアルギニン供給不全により血管のトーンスの調節が異常となっていると推測された。以上の結果から、新しい治療の方策としてこれらの因子の modulation が有益である可能性が考えられた。

A. 研究目的

〔背景〕 ゴーシェ病ではサイトカインの増加が知られているが、それらが病態における役割は明らかではない。ファブリー病を含めゴーシェ病以外のライソゾーム病（ファブリー病を含む）の病態におけるサイトカインの関与についてはほとんど知られていない。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ス調節に関与するといわれている。

〔目的〕 1. ゴーシェ病での骨病変と血液異常の発生機序へのサイトカインの関与の有無、2. ファブリー病患者で血管トーンスに関わるサイトカインその他の物質の関与の変化があるか否か、3. それらの物質が酵素補充療法(ERT)の経過中にどの

ように推移するかを明らかにすること。

B. 研究方法

〔対象と方法〕 ゴーシェ病患 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。

〔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. ゴーシェ病

1) すべての患者で IL-18 と TGF- β 1 の上昇

がみられた。2) サイトカインと骨代謝マーカとの関連を検討したところ IL-18 は2つの骨形成マーカ; 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- α は血色素濃度と逆相関を示した。4) ERT の経過をおって観察できた例では M-CSF、TGF- β 1、TNF- α は ERT の経過と共に低下し、治療効果のバイオマーカ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- β 1、PDGF-AB の上昇を認めた。2) VEGF、TGF- β 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 μ mol/l) 以下であった。さらに NOx 濃度は、Arg の濃度と 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。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- 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。

D. 考察

以上から、ゴーシェ病では IL-18、M-CSF の高レベルが骨代謝、M-CSF、TNF- α は赤血球造血と関連していることが明らかとなった。新しい治療戦略としてこれらのサイトカインの modulation が考えられる。ファブリー病では NOx 濃度は、VEGF、TGF- β 1、PDGF-AB などのサイトカインによる NOx 産生の調節も破綻し、また Arg の供給不全による血管平滑筋のトーン調節が障害されていることが推測された。これらの是正がファブリー

病患者の血管の機能的障害の改善に有益である可能性がある。

E. 結論

ゴーシェ病では IL-18、M-CSF の高レベルが骨代謝、M-CSF、TNF- α は赤血球造血と関連していることが明らかとなった。また M-CSF、TGF- β 1、TNF- α は病勢のバイオマーカとして有益と考えられる。ファブリー病患者では 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、これは血管病変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

渡辺順子、徳永泰幸、原田英明、井田博幸、小林正久、大橋十也、衛藤義勝、芳野 信: 1 型、3 型 Gaucher 病患者における血中サイトカインと骨代謝マーカ、血液像との相関. 日本先天代謝異常学会雑誌 2004; 20: 203.

芳野 信、渡辺順子: Fabry 病患者血液中のサイトカインなどの動態. 厚生労働省科学研究 難治性疾患克服研究事業「ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究」報告書 p43-44. 2004 年 3 月.

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

渡辺順子、芳野 信：リソソーム病患者の血中サイトカイン等の動態. 第 107 回日本小児科学会学術集会（岡山）2004 年 4 月 9 日- 4 月 11 日.

渡辺順子、徳永泰幸、原田英明、井田博幸、小林正久、大橋十也、衛藤義勝、芳野 信：1 型、3 型 Gaucher 病患者における血中サイトカインと骨代謝マーカー、血液像との相関. 日本先天代謝異常学会（宇都宮）2004. 11. 11 日-13.

Watanabe Y, Tokunaga Y, Ida H, Kobayashi M, Ohashi T, Eto Y, Yoshino M: Correlations among cytokines and bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. 41st Annual Symposium, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Amsterdam) 2004. 8. 31. - 9. 3.

芳野 信：Plasma Cytokines and nitric oxide in patients with Fabry' s disease off and on enzyme replacement therapy 平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2005. 12. 1（東京）

芳野 信：ライソソ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変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究

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法によるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系を確立し、13種類の新規遺伝子変異を同定した。また、この新規変異を含む41種類の遺伝子変異に対しマウスモデル細胞実験系でケミカルシャペロン（NOEV）の効果を調べた結果、8種類の変異で有意な活性還元効果を認めた。マウス脳組織を用いたマイクロアレイ発現解析を行い、G_{M1}-ガングリオシドーシス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の開発を行うことを目的とした基礎研究を行った。また、モデルマウス神経変性の分子機構の解析とケミカルシャペロン効果について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

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を組み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-actyl-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_{M1}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

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。

C. 研究結果

17人の β -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 G_{M1} 抗体を用いた免疫蛍光染色により、NOEVにより細胞内 G_{M1} 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 β -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。

D. 考察

DHPLC法は従来のPCR-SSCP法に比べはるかに迅速、簡便でしかも高効率な変異遺伝子解析法である。今回17人の患者に対し27種類の変異を同定し、79%の検出効率を得られた。また、マウスモデル細胞系を用いた解析により8種類の変異についてNOEVによる有為な酵素活性還元効果を認めた。現在まで、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。今後はまだ検討を行っていない変異型に対してNOEV効果の検討を行う予定である。

また、マウス脳組織を用いたマイクロアレイ解析の結果、小胞体ストレス関連分子シャペロンであるBip/Grp78の発現が β -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳で亢進していることが分かった。さらにこの発現はNOEVを投与したR201C発現マウスで抑制されていた。これらの結果は小胞体ストレス応答の亢進が G_{M1} -ガングリオシドーシスマウス脳神経変性と関連している可能性を示唆する。小胞体ストレスは他の神経変性疾患との関連性も示されており、共通の神経変性機構である可能性も考えられる。今後は G_{M1} 蓄積が引き起こす過剰な小胞体ストレス応答の詳細な分子機構について培養細胞およびマウス組織を用いた解析を行うつもりで

ある。

E. 結論

DHPLC法によるヒト β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析と、マウスモデル細胞を用いたNOEV効果試験によりケミカルシャペロン療法の有効な変異型を同定した。マイクロアレイ解析により、小胞体ストレス応答の亢進と G_{M1} -ガングリオシドーシス神経変性との関連性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y, Sawa M, Inoue T, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y: N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, 1689: 219-228, 2004
- 2) Yamamoto T, Feng JH, Higaki K, Taniguchi M, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K: Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain Dev*, 26: 245-250, 2004
- 3) 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、山本浩一、富永里香、松田潤一郎、難波栄二、鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシス神経変性分子メカニズムの解明とケミカルシャペロン法の研究. 第47回日本先天代謝異常学会総会、宇都宮、2004.11
- 2) 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、富永里香、難波栄二、鈴木義之: ヒト G_{M1} -ガングリオシドーシス変異とケミカルシャペロン法の検討. 第47回日本先天代謝異常学会総会、宇都宮、2004.11
- 3) 山本浩一、檜垣克美、高村歩美、飯田真己、難波栄二、鈴木義之: ヒト変異 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するマウス細胞株の樹立と解析. 第10回日本ライソゾーム病研究会、東京、2004.12
- 4) 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モデルマウス脳におけるTrk受容体シグナルの異常. 第78回日本生化学会大会、神戸、2005.10
- 5) 大橋英美子、檜垣克美、山本浩一、高村歩美、飯田真己、小川誠一郎、岩崎浩之、鈴木義之、難波栄二: ヒト G_{M1} -ガングリオシドーシス遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法. 第48回日本先天代謝異常学会、

熊本、2005.11

6) 高村歩美、檜垣克美、山本浩一、飯田真巳、岩崎浩之、鈴木義之、難波栄二：マウスモデル細胞を用いたG_{M1}-ガングリオシドーシスの解析. 第11回日本ライソゾーム病研究会、東京、2005.12

7) 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

8) 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 Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006.9

9) 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 Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006.9

10) 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 Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006.9

11) 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 of 検討. 第51回日本人類遺伝学会大会、米子、2006.10

12) 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

13) 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：G_{M1}-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 of 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、22 種の変異を同定した。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り、新たな早期治療への展望が開けた。

そのため、5 歳以下の乳幼児 2 例を含む日本人ムコ多糖症 I 型の 3 症例において、ラロニダーゼによる酵素補充療法を行い、その有効性と安全性を評価し、酵素補充療法の早期投与の重要性について検討した。

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。根治療法の中で、酵素補充療法はムコ多糖症 I、II、VI 型において酵素製剤が開発されており、2006 年 10 月 20 日には I 型治療薬であるラロニダーゼが国内で承認された。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、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。また、5 歳以下の乳幼児 2 例を含む日本人ムコ多糖症 I 型の 3 症例において、ラロニダーゼによる酵素補充療法を行い、早期治療による治療の有効性について検討した。

B. 研究方法

1) ムコ多糖症の遺伝子解析

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 -イゾロニダーゼ、ムコ多糖症 II 型ではイゾロネート-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。

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。

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 ヶ月男児、症例 2: 3 歳 7 ヶ月女児、症例 3: 8 歳 11 ヶ月女児）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 ヶ月、症例 2: 2 歳 1 ヶ月、症例 3: 8 歳 2 ヶ月である。本研究は、国立成育医療センター倫理委員会により承認され、患者保護者の同意を得て、治療を行った。

C. 研究結果

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 アリルが未同定であった。