

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

D. 考察

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

早期治療の有用性を考える上で、乳児例を含むムコ多糖症 I 型 3 症例への酵素補充療法を行い、諸症状の改善を認めた。対症療法として鼓膜チューブ留置術などを行っているものの、ラロニダーゼの根治療法としての有用性は極めて高い。特に、乳児年齢でラロニダーゼを開始している 2 症例については発達の促進も見られており、中枢神経への酵素の直接の効果とは考えにくいですが、酵素補充療法、対症療法を早期から行うことで、QOL の向上に役立つ。また、

長期投与することにより気道症状や関節などにも改善が見られることが立証された。

2006 年 10 月 20 日に I 型治療薬であるラロニダーゼが国内で承認された。ムコ多糖症の治療薬としては本邦初である。今後は既に海外で承認されているムコ多糖症 II、VI 型やその他のライソゾーム病の酵素製剤に関して、早急に国内承認されていくことが望まれる。

E. 結論

ムコ多糖症患者において遺伝子診断を試行した。23 症例において、新規変異を含む 22 種の変異を同定した。発端者の変異が検出されたことにより、保因者診断や出生前診断が臨床応用可能となり、ムコ多糖症診断に対する家系内の幅広いニーズに応えることが可能となった他に、新たな早期治療への展望が開けた。

酵素補充療法は、早期治療によって、より有効性が高まることが判明した。また、酵素補充療法とともに、対症療法、特に中耳炎および難聴の状態を良好に保つことが、発達の促進、QOL の向上に役立つことが示された。今後、酵素到達が困難な脳、角膜、関節への治療向上に対する新たな治療法を開発することが急務である。

新生児マススクリーニングや遺伝子診断による早期診断や発症前診断を行い、酵素補充療法を早期から開始することにより症状の増悪を防ぐことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 奥山虎之：ムコ多糖症の先端的治療法の開発とその臨床応用：小児科 46、2005、2003-2009
2. Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells. Mol Ther. 2006 13:548-55.
3. 田中藤樹、奥山虎之：酵素補充療法ムコ多糖症 I 型、VI 型：小児科診療 69、2006、1735-1739

2. 学会発表

1. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by

Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells
"Workshop on the blood brain barrier" 9th
International Symposium on Mucopolysaccharide
and Related Diseases which Venice 29-July 2,
2006, Italy

2. Assessing Long-term outcomes in MPS I and
MPSII The 9th Annual Asia Lysosomal Storage

Disorders (LSD) Meeting Sept 10-12,2006
Makuhari Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

ライゾーム病（ファブリー病含む）に関する研究

分担研究者 三井純，高橋祐二，伊達英俊，岩田淳，後藤順，辻省次

研究要旨

GBA 遺伝子のヘテロ接合性変異が，パーキンソン病発症の遺伝的リスクファクターである可能性を見出した。

三井純，高橋祐二，伊達英俊
岩田淳，後藤順，辻省次
東京大学神経内科

A. 研究目的

Gaucher 病の病因遺伝子である glucocerebrosidase 遺伝子 (GBA) のヘテロ接合性変異がパーキンソニズムの発症の遺伝的リスクファクターとなっているかどうかを，明らかにする。

B. 研究方法

ゴーシェ病の病因遺伝子である GBA 遺伝子のエクソン配列全て（翻訳領域およびスプライス部位）をハイスループットに解析することができる DNA microarray-based resequence system を構築し，パーキンソニズムを呈する疾患患者において GBA 遺伝子の変異解析を行った。

C. 研究結果

これまでの研究で解析を行った疾患群は次の通りである。

- パーキンソン病 (PD) 47 例
- 若年性パーキンソン病 (JP) 11 例
- 進行性核上性麻痺 (PSP) 16 例
- 多系統萎縮症 (MSA) 30 例
- 大脳皮質基底核変性症 (CBD) 6 例

これらの症例を対象に GBA 遺伝子の resequencing を行い，変異の有無を解析した。その結果，PD 47 例中 3 例に RecNciI 変異を認め，同変異は対照 231 例およびその他のパーキンソニズムを呈する疾患患者において認められなかった。

D. 考察

PD と GBA 変異の相関を調べた過去の報告では，様々な種類の GBA 変異の総和を正常対象と比べて有意差ありとする報告となしとする報告が分かれている。過去の多くの報告は特定の変異に限って調べられており，本研究のように GBA 遺伝子の翻訳領域およびスプライス部位を網羅的に解析した報告は少ない。

我々が今回見出した変異は，過去の報告を含めて変異の種類毎にメタ解析すると，他の種類の変異と比べて著しく高い相関を示し，パーキンソン病の発症の遺伝的リスクファクターである可能性が示された。

RecNciI 変異がパーキンソン病の発症にどのように関与するかという病態機序については，RecNciI 変異を有する glucocerebrosidase の翻訳後修飾，安定性，小胞体ストレスへの関与などについて検討していく必要がある。

E. 結論

RecNciI 変異が PD 発症の遺伝的リスクファクターである可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表：作成中。
2. 学会発表：なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし。
2. 実用新案登録：なし。
3. その他：なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ライソゾーム病（ファブリー病含む）研究班

分担研究報告書

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

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

研究要旨

ArylsulfataseA(ASA)欠損症である異染性白質ジストロフィー (MLD) をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。リソゾーム酵素は、その一部が細胞外に分泌され、他の細胞に取り込まれる Cross-correction という現象が知られており、この特性を利用した治療法の開発を目指している。これまでの研究で、培養細胞やマウス肝臓での ASA の発現には sulfatase の活性化酵素である FGE(Formyl-glycin generating enzyme)の同時発現が重要であることを明らかにした。更に、ASA と FGE を発現する AAV タイプ 1 ベクターを使った MLD モデルマウスの遺伝子治療実験によりその有効性を示した。MLD に対する遺伝子治療臨床応用を計画している。

A. 研究目的

異染性ロイコジストロフィー (MLD) はリソゾーム酵素アリルスルファターゼ A (ASA) の遺伝性欠損によるリソゾーム病である。ミエリン脂質であるスルファチドが脳その他に蓄積することによって神経系のミエリン崩壊が起こり、種々の神経症状を呈する。今日まで有効な治療法はなく、遺伝子治療の重要な標的疾患と考えられている。

最近、一連のスルファターゼを共通に活性化する酵素が同定され、FGE (Formylglycine generating enzyme)あるいは SUMF1 (Sulfatase modifying factor 1)と名付けられた。本研究は MLD の遺伝子治療開発の一環として、ASA 発現に対する FGE の有効性を確かめるとともに AAV ベクターによる MLD 遺伝子治療への応用を検討した。

B. 研究方法

1. In vitro 実験：培養細胞にたいし ASA 或いは 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 μ 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-nitrocatechol 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。

C. 研究結果

1. In vitro 実験

HeLa, COS, 293 の3種類すべての細胞株において ASA と FGE の共発現は細胞内外の ASA 活性を増加させた。特に COS 細胞では細胞内で 20 倍、細胞外に分泌された ASA 活性で 71 倍の上昇が見られた。ASA 蛋白質と mRNA 発現は FGE との共発現による影響は見られなかった。これらの結果は ASA の FGE による修飾が翻訳後に起こることを示している。

2. プラスミドベクターを用いた In vivo 実験

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 蛋白質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。

D. 考察

FGE(formylglycine generating enzyme) とその遺伝子 SUMF1 (sulfatase modifying factor) は最近、2つのグループの異なるアプローチによって同定された。FGE は ASA を含む多くのスルファターゼの活性化に必須の小胞体局在酵素であり、正常下ではスルファターゼを活性化するのに十分量の FGE が恒常的に発現しているはずである。今回の実験により、遺伝子治療で大量の ASA を発現させる時は FGE の共発現が重要であることが明らかになった。

リゾゾーム酵素は M6P レセプターを介して細胞外に分泌されたり、細胞内へ取り込まれたりすることが知られている。この現象は cross-correction と呼ばれ、リゾゾーム病の酵素補充療法や遺伝子治療の理論的根拠となっている。しかし、糖脂質が脳神経系に蓄積するある種のリゾゾーム病では脳血液関門に阻まれて cross-correction による全身性の治療は困難である。欠損酵素を脳内で発現させるためには①ウイルスベクターの直接脳内投与、②遺伝子導入した組織幹細胞の脳内移植③造血幹細胞遺伝子治療等の方法が必要であると考えられる。本実験では AAV ベクターを使って、①の直接ベクター投与方法の有用性を検証した。

ベクターの脳内直接投与方法の問題点の一つは、脳全体にベクターを導入することが困難な点であると考えられている。ところが我々の実験では片側の海馬に一カ所ベクターを注入しただけなのに 7 ヶ月後の脳組織では注入部位の周囲のみならず、反対側

の脳半球や小脳にまで酵素活性が認められている。この実験結果及び GFP 遺伝子を使った予備実験の結果からは海馬に注入された AAV1 ベクターは反対側の海馬も含めた幅広い領域に分布していることが明らかになった。また、ASA 活性及びスルファチドの Alcian blue 染色の結果は、ASA 酵素が極めて広い範囲にまで分布し、スルファチドを減少させていることを示している。この結果はヒトの治療においても比較的少ない部位へのベクター注入により効果が認められる可能性を示唆している。現在、霊長類を使った実験により AAV ベクターの安全性と有用性を検証している。これらの基礎データを元に、MLD の遺伝子治療を実現したいと考えている。

E. 結論

AAV1 ベクターは MLD などの神経変性を伴う先天性代謝異常症の遺伝子治療に有用である。スルファターゼの活性化酵素 FGE の共発現は、ASA の大量発現を必要とする MLD の遺伝子治療のための重要な因子である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurai, T., Hisayasu, S., Kitagawa, R., et al., AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase A efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 15: 38-43, 2007
2. Yasuda, T., Miyachi, S., Kitagawa, R., et al., Neuronal specificity of α -synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience* 144:743-745, 2007
3. Kitagawa, R., Miyachi, S., Hanawa, H., et al., Differential Characteristics of HIV-based vs. SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neuroscience Res.* In press
4. Miyake, K., Miyake, N., Shimada, T., Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. *J. Biotech.* In press
5. Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., et al., Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human alpha-galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.* 51:341-52, 2006
6. Kawabata, K., Migita, M., Mochizuki, H., et al., Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res.* 1094: 13-23, 2006
7. Kinoshita, H., Watanabe, A., Hisayasu, S., et al., Targeted gene delivery to selected liver segments via isolated hepatic perfusion. *J. Surg. Res.* in press
8. Fujii, I., Matsukura, M., Ikezawa, M., et al., Adenoviral mediated MyoD gene transfer into fibroblasts: Myogenic disease diagnosis. *Brain Dev.* 28: 420-425, 2006
9. Inagaki, S., Migita, M., Hayakawa, M., et al., An asymptomatic heterozygous female with Fabry disease: implications for enzyme replacement therapy. *J. Nippon Med. Sch.* 72: 387-390, 2005
10. Kato, K., Miyake, K., Igarashi, T., et al., HIV vector mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* 25: 522-529, 2005
11. Takakusaki, Y., Hisayasu, S., Hirai, Y., et al., Co-expression of FGE is essential for synthesis and secretion of functional arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Gene Ther.* 16:

- 1-8, 2005
12. Hayakawa, M., Ishizaki, M., Hayakawa, J., et al., Role of bone marrow cells in the healing process of mouse experimental glomerulonephritis. *Ped. Research* 58:323-328, 2005
 13. Miyake, K., Inokuchi, K., Miyake, N., et al., Antiangiogenic gene therapy of myeloproliferative disease developed in transgenic mice expressing P230 ber/abl. *Gene Ther.* 12: 541-545, 2005
 14. Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., et al., Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12: 1126-1132, 2005
 15. Takahashi, H., Kato, K., Miyake, K., et al., Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23:7-12, 2005
2. 学会発表
- 1) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Suzuki, H., Shimada, T. A single unilateral injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in bilateral expression and widespread distribution of ASA and prevention of sulfatide storage in the whole brain of MLD model mice American Society of Gene Therapy 9th Annual Meeting (Baltimore) 2006. 6
 - 2) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Shimada, T. Co-injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in wide spread distribution of ASA and correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (Makuhari) 2006. 9
 - 3) Shimada, T. Local and systemic gene therapy for metachromatic leukodystrophy. 3rd annual world symposium of Lysosomal disease network (Orlando) 2006, 12
 - 4) Kurai, T., Shimada, T. Correction of metachromatic leukodystrophy in a mouse model by AAV1 mediated co-expression of ASA and FGE. The 12th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2006. 8

β -ガラクトシダーゼ欠損症に対する新しい分子治療法の開発

分担研究者 鈴木 義之 国際医療福祉大学大学院教授
研究協力者 岩崎 博之 国際医療福祉大学臨床医学研究センター講師
研究協力者 一ノ宮悟史 国際医療福祉大学大学院

研究要旨

β -ガラクトシダーゼ欠損症の脳障害に対する新しい分子治療法開発のため、まず患者由来の線維芽細胞ならびにモデル動物個体へのシャペロン化合物NOEVの投与実験を行った。その結果、患者細胞の30%に有意の活性上昇を認めた。特にR201C、R457Q変異に著しい効果があった。この化合物はガラクトシルセラミダーゼ活性阻害効果を持つが、クラッペ病患者細胞に対する効果は見られなかった。次にモデルマウスの神経学的検査法を確立し、シャペロン療法の臨床効果を評価した。NOEV経口投与がG_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの脳障害発生予防に効果のあることを示した。

A. 研究目的

われわれが提唱するケミカルシャペロン療法の対象として β -ガラクトシダーゼ欠損症を選び、シャペロン化合物NOEV(N-octyl-4-epi- β -valienamine)の効果を細胞・個体レベルで確認することを目的とした。G_{M1}-ガングリオシドーシスのヒト患者細胞ならびにモデルマウスについての実験を行った。

B. 研究方法

β -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- β -D-galactosideと6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- β -D-galactosideを用いて測定した。G_{M1}-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G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの臨床経過を正常野生型マウスと比較検討した。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。

C. 研究結果

細胞培養液中にNOEVを添加することにより、G_{M1}-ガングリオシドーシス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。

D. 考察

シャペロン化合物NOEVが、特定の変異遺伝子を持つ β -ガラクトシダーゼ欠損培養細胞内で酵素活性を上昇させることを確認した。この化合物はガラクトシルセラミダーゼに対して著しい阻害効果を示すが、培養細胞内での酵素活性上昇効果は認めなかった。これは今後の検討課題として残された。マウスに対して新しく開発した神経学的検査法は、G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの重症度や臨床的進行の評価に有用であった。そして今後進

める予定のシャペロン療法動物実験の効果判定に
広く使うことができると期待される。

E. 結論

シャペロン化合物NOEVは培養細胞、モデル動物に対する投与により、変異酵素活性の還元効果を示すことが明らかになった。特にマウス個体レベルでの臨床評価の目的で開発した神経学的検査法の妥当性を、疾患モデルマウスの時間経過を追跡することにより確認することができた。これは今後多くの他の疾患モデルマウスの簡易評価法として適用が可能であろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 鈴木義之:ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法. 小児科 45: 2313-2320, 2004.
2. 鈴木義之:薬物療法(遺伝病に対する新しい治療法). 小児科の新しい流れ:先端医療シリーズ34, 先端医療技術研究所, pp104-10, 2005.
3. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inher Metab Dis* 29: 471-476, 2006.
4. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, et al: Fibroblast screening for chaperone therapy in β -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): G_{MI} -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.
7. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, et al: Neurological assessment of G_{MI} -gangliosidosis model mice. *Brain Dev* 29: 210-216, 2007.
8. Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y: Development and

medical application of unsaturated carbamoyl-glycosylamine glycosidase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*, in press, 2007.

学会発表

1. 松田潤一郎、鈴木 治、大島章弘、山本美江、野口章、滝本一広、伊藤雅之、難波栄二、檜垣克美、鈴木義之: G_{MI} -ガングリオシドーシス幼児型モデルマウスの中中枢神経病変に対する新規治療法開発. 第51回日本実験動物学会総会、長崎 2004. 5. 20-22.
2. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. 19th United Leukodystrophy Foundation Scientific Symposium. DeKalb, 2004. 7. 14-15.
3. 渡辺浩史、岩崎博之、下重里江、渡辺織江、黒澤美枝子、柴田雅祥、松田潤一郎、飯田真己、久保孝利、小川誠一郎、鈴木義之: G_{MI} -ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床的酵素学的効果. 第47回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004.11.11-13.
4. 高村歩美、檜垣克美、山本浩一、富永里香、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之: G_{MI} -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回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004. 11. 11-13.
5. 檜垣克美、山本浩一、富永里香、難波栄二、鈴木義之: ヒト G_{MI} -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回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004. 11. 11- 13.
6. Suzuki Y: Recent advances in neurometabolic disorders. 8th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Delhi, 2004.10.7-10.
7. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for brain pathology in lysosomal storage diseases. International Conference: Current problems in Child Neurology, Moscow, 2004.11.7-9.
8. 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47回日本ライソゾーム病研究会、東京 2004.12.9-10.

9. Suzuki Y: Child Neurology: Many patients and many diseases. What next? 3rd International Conference on Child Neurology of Central Asian Countries. Almaty, Kazakhstan 2005.6.2-3.
10. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: An approach to chaperone therapy. 42nd Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Paris, 2005. 9. 6-9.
11. Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M: A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. European Paediatric Neurology Society Congress 2005, Goteborg, Sweden 2005. 9. 14-17.
12. 鈴木義之:ケミカルシャペロン療法:遺伝性ライソゾーム病に対する新しい分子治療. 第50回人類遺伝学会大会, 倉敷, 2005. 9. 19- 22.
13. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling in G_{M1} -gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸 2005. 10. 19-22.
14. Suzuki Y: New Therapies for Neurogenetic Disorders. XVIII World Congress of Neurology, Sydney, Australia 2005. 11. 5-11.
15. 一ノ宮悟史, 渡辺浩史, 松田潤一郎, 丸山貴美子, 戸田寛子, 岩崎裕之, 黒澤美枝子, 飯田真己, 小川誠一郎, 鈴木義之:遺伝子組換え G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48回日本先天代謝異常学会, 熊本 2005. 11. 16-18.
16. 大橋英美子, 檜垣克己, 山本浩一, 高村歩美, 飯田真己, 小川誠一郎, 岩崎博之, 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. 16-18.
17. 鈴木義之, 渡辺浩, 岩崎博之, 一ノ宮悟史, 丸山貴美子, 戸田寛子, 黒澤美枝子, 松田潤一郎, 飯田真己: G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発. 第22回日本疾患モデル学会, 伊香保 2005. 11. 24-25.
18. 高村歩美, 檜垣克己, 山本浩一, 飯田真己, 岩崎博之, 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回ライソゾーム病研究会, 東京 2005. 12. 2.
19. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered G_{M1} -gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol, 2006.1.18-20.
20. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor- mediated signaling causes neuronal death in G_{M1} -gangliosidosis. 第29回日本神経科学大会, 京都 2006.7.19-21.
21. 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.
22. 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. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 2006. 9. 12-16.
23. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk signaling in G_{M1} -gangliosidosis mice brains. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 2006. 9. 12-16.
24. 檜垣克美, 高村歩美, 山本浩一, 飯田真己, 小川誠一郎, 岩崎博之, 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29回日本人類遺伝学会大会, 米子 2006.10.17-20.
25. 鈴木義之:モデルマウスを用いた G_{M1} -ガングリオシドーシスの新しい治療法開発. 第29回日本人類遺伝学会大会, 米子 2006. 10. 17- 20.
26. Suzuki Y, Ichinomiya S, Maruyama K, Toda H, Watanabe H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J: Mouse Neurology: neurological assessment of G_{M1} -gangliosidosis model mice. 35th Annual

Meeting of the Child Neurology Society

Meeting, Pittsburgh 2006. 10. 18-21.

27. Suzuki Y: Molecular approaches to neuro-genetic diseases: G_{M1}-gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt 2007. 1. 25-26.

H. 知的財産権の出願・登録

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

ライソソーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究

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 平成 16 年度、17 年度はライソソーム病（LSD）患者の QOL 改善に資する研究を行った。重症心身障害児施設に通院、入所している患者について心肺機能、筋緊張軽減術について調査研究を行った。重症 LSD 患者の緊張亢進に対して選択的 脊髄後根遮断術或は Botox 筋注が有効である症例が認められた。平成 18 年度は LSD の細胞治療用の移植細胞の開発研究を行った。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。本研究の報告は SP 細胞の解析について記載した。継代 SP 細胞は、未分化細胞マーカーである Oct 4 が発現しており、多分化能（骨芽、軟骨、脂肪細胞）を保持していることを証明した。免疫学的に MHC class I 発現が微弱、MHC class II 発現が欠如している細胞であり、癌化試験およびウイルス検査では安全性が証明された。既報では、 β -glucuronidase 遺伝子導入した羊膜上皮細胞をモデルマウス（MPS VII）の脳内移植にした効果を報告している。本 SP 細胞も細胞ベクターとして他家移植による細胞遺伝子治療の可能性が示唆された。

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。

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。

（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

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、 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

羊膜由来 SP 細胞に幹細胞機能があるかどうかについて検討を加えてきた。今回、未分化細胞のマーカーといわれる Oct 4 の発現について継代培養細胞について調べた。1 2 継代目の細胞まで Oct 4 の発現が確認されたことは未分化能が維持されていることが証明さ

れた。多分化能についての検討を行った。骨芽、軟骨および脂肪細胞への分化誘導実験を行ったところ、免疫染色と RT-PCR により各々への分化機能について証明された。これより、羊膜由来 SP 細胞は幹細胞機能を持ちつことが判明した。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ている。そこで本細胞もライソソーム病の細胞遺伝子治療の候補細胞と考えられる。

E. 結論

ヒト羊膜由来 SP 細胞の分離、培養法を確立し、その性質検討を行った。継代細胞に未分化細胞マーカーの発現を証明した。そして、骨、軟骨及び脂肪細胞への分化機能を保持する細胞であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al: Human amnion mesenchyme cells express phenotype of neuronal progenitor cells. *J Neurosci Res.* 78:208-214, 2004
- 2) Kamiya K, Wang MC, Uchida S, et al : Topical Application of Culture Supernatant from Human Amniotic Epithelial Cells Suppresses Inflammatory Reactions in Cornea. *Exp Eye Res* 80: 671-679, 2005.
- 3) Kamo I, Kikuchi A, Tomoyasu H, et al: Analysis of cytokine network for initiation of immune responses in the hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis. *J. Clinical Immunol.* 193: 193-194, 2005.
- 4) 松田光展、山口恭子、桜川宣男 : 小児の運動障害の診かた。 *小児科* 46: 14-23, 2005.
- 5) 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
- 6) Hori J, Wang MC, Kamiya K, et al : Immunological Characteristics of Amniotic Epithelium. *Cornea*: s53-58, 2006
- 7) 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
- 8) 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

3. 学会発表

- 1) 椎木俊秀、桜川宣男 : BiPAP が有効であったムコ多糖症 II 型閉塞性呼吸障害の 1 例。第 30 回、全国重症心身障害児学会。旭川、2004.9
- 2) 椎木俊秀、桜川宣男、舟橋満寿子、他 : BiPAP が有効であったムコ多糖症 II 型無呼吸症候群の 1 例。日本小児神経学会。熊本、2005.5
- 3) 小林護、八鍬拓士、横山安延、他 : ヒト羊膜からの Side population (SP) 細胞の分離と細胞生物学的性質の検討。第 20 回日本生殖免疫学会、大阪、2005.12
- 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 5 回日本再生医療学会。岡山、2006.2
- 5) 小林護、佐々木孝司、八鍬拓士、他 : ヒト羊膜からの Side Population (SP) 細胞の培養と分化能の検討。第 5 回日本再生医療学会。岡山、2006.3
- 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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

- 10) 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 10, 18, 2006, Nagoya, Japan
- 11) Kamo I, Tomoyasu H, Kobayashi M, et al : Studies on myoid cells in hyperplastic myasthenia gravis. The 8th International Congress of Neuroimmunology 10, 18, 2006, Nagoya, Japan
- 12) 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, 6, 21, 2006, Kyoto, Japan
- 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)
総合研究報告書

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

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：1) ゴーシェ病では酵素補充療法が認可となり臨床的に治療が行われているが、中樞神経症状には効果がない。ゴーシェ病の新規治療法の開発を目指して、変異 β グルコシダーゼの活性を上昇させるグルコース類似体のスクリーニングを行い、低分子化合物 N-octyl- β -valienamine が、培養細胞レベルで F213I、N188S、G202R、N370S の変異を活性化することを明らかにした。今後、N-octyl- β -valienamine が個体レベルでも変異酵素を活性化し、中樞神経症状の治療に有効であるか検討していく。

2) ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は小脳失調が前景に立つ中樞神経障害を主徴とする常染色体劣性遺伝病であり、生化学的には LDL 由来コレステロールの細胞内小胞での蓄積を特徴とする。NPC 細胞では JAK/STAT シグナル伝達系が恒常的に活性化され、これは Toll-like 受容体 4 (TLR4) が増加し、この結果炎症性サイトカイン (IL-6/IL-8 および IFN- β) を産生するためであることを明らかにした。さらに NPC1 マウスの TOL-4 遺伝子を欠損させた場合、IL-6 の産生は減少したが、マウスの生存はのびなかった。一方、NPC1 マウスの IL-6 遺伝子を欠損させた場合にはアストロサイトの増殖が明らかに抑制され、寿命が約 15% 長くなったことから、サイトカイン産生/STAT 増加は NPC 脳でのグリア細胞の増殖及び神経変性に関与すると考えられた。

A. 研究目的

- 1) ゴーシェ病では、酵素補充療法が開発され神経症状のない 1 型では極めて有効な治療法になっているが、神経症状が強い 2 型や 3 型の神経症状には有効な治療はない。ファブリ病や GM1 ガングリオシドーシスでは、基質類似の低分子化合物が変異酵素を安定化することが見出され、新しい分子シャペロン治療法として期待されている。ゴーシェ病の分子シャペロン治療法の確立を目的とする。
- 2) ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) の病態生理を解明する手がかりを得ることを目的として、NPC 細胞でサイトカインが過剰に産生されることを見出し、この病態の解明と、この現象を標的とした神経症状の治療法の開発を目的とする。

の遺伝子発現パターンを解析し、神経細胞死につながる可能性のある変化をとらえることを計画した。

B. C. 研究方法および結果

- 1) ゴーシェ病の分子シャペロン療法に関する研究
変異型 α 及び β グルコシダーゼを活性化できる阻害剤のスクリーニングを行い、ゴーシェ病の欠損酵素 β グルコシダーゼの F213I 変異酵素を活性化する低分子化合物 N-octyl- β -valinamine (NOV) を見いだした (発表論文 2)。

NOV は酵素蛋白質を安定化し pH7 の中性域における酵素活性の失活を防ぎ、F213I 変異酵素のリソゾーム内濃度を高め、酵素活性を上昇させることを明らかにした。さらに

この類似体の存在下において、分解されるべき基質であるグルコシルセラミッドの蓄積の減少を確認した。その後、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、N370S/84GG、nt1447del20insTG/L444P、nt1447del20insTG/?、D409H/? の変異を持つ細胞に対しては無効だった。COS 細胞に Flag-標識 β -Glu を一過性に発現させ、NOV で処理した。F213I、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(発表論文1)。

2) ニーマン・ピック病C型に関する研究

NPC 細胞は炎症性サイトカイン (IL-6/IL-8 および IFN- β) を正常細胞の 100 倍以上の濃度で恒常的に産生することを見出した。IL-6 と INF- β は 6 つのサブタイプを持つ STAT を活性化することをレポータージーンアッセイおよび中和抗体による阻害実験から明らかにした。STAT1/STAT3 の増加は NPC1 および NPC2 欠損患者細胞、NPC1 欠損 CHO 細胞でも確認し、さらに薬理的に NPC1 と同じ状態を作り出す U18666A 処理でも STAT の増強を認めた。

これらの炎症性サイトカインの産生の背景について、Toll-like 受容体 4 (TLR4) の活性化が関係しているという仮説をたて、TLR4 について検討したところ TLR4 の蛋白質量は増加し、ラフト膜分画に存在していることがわかった。TLR4 と green-fluorescent protein の融合蛋白を発現させ、その局在を見たところ、後期エンドソーム/リソゾームに存在していた。さらに NPC1 患者細胞に TLR4siRNA を導入したところ IL-6 と INF- β の産生が減少した。

NPC1 欠損マウスで STAT の量を検討したとこ

ろ、マウスの脳でも STAT-3、STAT-6 の増加を認めた。さらに正常では TLR4 蛋白はほとんど見られないのに対し、NPC1 欠損マウスの小脳顆粒細胞層、白質のアストロサイトとミクログリアに増加を認めた。同様に IL-6 も正常マウスでは認められなかったのに対し、NPC1 欠損マウスのアストロサイトとミクログリアに認められた。

脳の変性と TLR4 の活性化とサイトカイン産生の関係を明らかにする目的で、NPC1 欠損マウスの TLR4 を欠損させたマウスを作成した。この NPC^{-/-}/TLR^{+/-}マウス由来線維芽細胞と比較して、NPC^{-/-}/TLR^{+/-}マウス由来線維芽細胞の IL-6 の産生は明らかに低下していたが、STAT のレベルは両者で明らかな差はなく、寿命も、PC^{+/-}/TLR^{+/-}マウスと NPC^{-/-}/TLR^{+/-}マウスの間で明らかな差はなかった。

一方、NPC1 欠損マウスの IL-6 を欠損させた場合、STAT の発現は明らかに減少し、GFAP 陽性細胞の数は著明に減少し、寿命が延長した。(発表論文3)

D. E. 考察と結論

N-octyl- β -valienamine は、ゴーシェ病の中で、F213I、N188S、N370S、G202R 変異の β グルコシダーゼを安定化してリソゾーム内の蛋白質を増加させる。従って、N-octyl- β -valienamine はゴーシェ病の中樞神経症状に対する分子シャペロンとして期待でき、今後、個体への治療実験で有効性と安全性を確認して、臨床応用を目指していく。

NPC 細胞は炎症性サイトカインを恒常的に産生しており、これらのサイトカインは NPC 脳でのグリア細胞の増殖及び神経変性に関与する。この炎症性サイトカインの産生には TLR4 の蓄積が関係する。脳内へ移行する薬物を用いて、STAT の発現を制御できれば、多少とも延命効果が得られることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

ゴーシェ病関係

- 1) 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
- 2) 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 and Suzuki Y. N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 1689:219-228 2004

ニーマン・ピック病C型関係

- 3) 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
- 4) 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

- 5) Yamamoto T, Feng J-H, 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
- 6) Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K. Degeneration of cholecystokinin-immunoreactive afferents to the VPL thalamus in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Brain Research* 1022:244-246 2004

2. 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 β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. 10th International Child Neurology Congress, Montreal (Canada), June 11-16, 2006.
- 2) 雷珂、侯琳、井上岳彦、大野耕策 ゴーシェ病の分子シャペロン療法 第47回日本小児神経学会総会、2005年5月19-21日、熊本
- 3) 杉本優子他「ニーマンピック C1 のコレステロール濃度依存性ユビキチン化」日本生化学会年会、横浜 2004
- 4) 鈴木倫毅他「ニーマンピック C 型細胞によるサイトカインの産生と JAK/STAT シグナルの活性化」日本生化学会年会、横浜 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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
5. Yuza Y, Yokoi K, Sakurai K, et al: Allogenic bone marrow transplantation for late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Pediatr Int 47(6):681-683, 2005
6. Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, et al: Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. Clin Nephrol64(4):281-287, 2005
7. Ichinose M, Nakayama M, Ohashi T, et al: Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. Clin Exp Nephrol9(3):228-232, 2005
8. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, et al: Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. Mol Genet Metab 85(3):196-202, 2005
9. Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, et al: Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study. J Inherit Metab Dis 28(4):575-583, 2005
10. Meng XL, Shen JS, Watabe K, et al: GALC transduction leads to morphological improvement of the twitcher oligodendrocytes in vivo. Mol Genet Metab 84(4):332-343, 2005
11. Shen JS, Meng XL, Yokoo T, et al: Widespread and highly persistent gene transfer to the CNS by retrovirus vector in utero; implication for gene therapy to Krabbe disease. J Gene Med 7(5):540-551, 2005
12. Shen JS, Meng XL, Maeda H, et al: Widespread gene transduction to the central