

表1 テイサックス病の保因者スクリーニング
保因者スクリーニング結果(1971～1992, 血清酵素活性測定による)

国名	被験者数	保因者数	リスクカップル数
アメリカ	712,818	27,150 (3.8%)	657
イスラエル	159,544	4,229 (2.6%)	263
ヨーロッパ	10,927	725 (6.6%)	21
全体	953,004	36,418 (3.8%)	1,056

(1)保因者スクリーニング：ライソゾーム病は遺伝性疾患であり、その多くは常染色体劣性遺伝形式である。すなわち、両親が保因者であれば1/4の確率で患者が発生する。したがって、保因者頻度が高く、保因者の同定方法が容易であれば遺伝カウンセリングを通して発症予防が可能となる。ユダヤ人を対象にしたテイサックス病の保因者スクリーニングなどが報告されている。

(2)ハイリスクスクリーニング：ライソゾーム病では蓄積する基質と臓器により特有の症状を呈する。したがって、これら症状を有する患者、あるいは家族歴を有する集団に対してスクリーニングを行えばマススクリーニングに比較して陽性頻度が増加する。腎不全の男性患者や肥大型心筋症患者を対象にしたファブリ病のハイリスクスクリーニングなどが報告されている。

(3)マススクリーニング：個々のライソゾーム病の頻度は少ないが、ライソゾーム病全体では1/8,000と比較的高頻度であるので、効率を考慮するとライソゾーム病全体をマススクリーニングの対象にした方がよいが、この場合、治療法の存在しない疾患も同定してしまうという不都合が生じる。これに対して、疾患特異的なマススクリーニングは、治療法がある疾患のみスクリーニングすることができるし、特定の酵素や基質をターゲットにしてスクリーニング法を確立すればよいので倫理的問題、方法論に関する問題は少ない

が、個々の疾患の頻度が少ないので効率が悪い。

2. スクリーニングの方法

ライソゾーム病は遺伝子変異が原因で当該酵素活性が低下し、その結果、基質が蓄積することによって発症する疾患なので、スクリーニングの方法としては、①遺伝子変異の同定、②酵素活性の測定、③基質濃度の測定、さらに基質が蓄積することによって増加する関連蛋白質（サポシン=SAP：Sphingolipid Activator Protein, LAMP：Lysosomal Associated Membrane Protein）濃度の測定などが報告されている。



III. 保因者スクリーニング

ここではテイサックス病の保因者スクリーニングについて記載する¹⁾。ユダヤ人におけるテイサックス病の発症頻度は3,900人に一人、保因者の頻度は28人に一人と極めて高い。本症はヘキササミニダーゼA遺伝子変異によって hexosaminidase A 活性が低下するため、中枢神経系に GM2 ガングリオシドが蓄積するリポドーシスのひとつである。治療法は存在せず、4～7歳で死亡する予後不良の疾患である。したがって、1970年代から血清の酵素活性を測定して保因者を同定する試みがアメリカユダヤ人に対して行われてきた。ユダヤ人の遺伝子変異は1278+TATC, 1421+1G→C, G269S という三つの遺伝子変異が全遺伝子変異の100%近くを占めてい

表2 テイサックス病の保因者スクリーニング
アメリカにおけるテイサックス病の発生頻度(年間発症数)

年代	ユダヤ人	非ユダヤ人	計
1970*	30~40	6~10	40~50
1980	13	11	24
1985	6	5	11
1990	5	11	16
1992	4	12	16

* 推測値

るので、現在では白血球、血小板の酵素活性の測定、あるいは遺伝子変異の同定による保因者スクリーニングがイスラエル、ヨーロッパユダヤ人に対しても行われている。

血清酵素測定によるスクリーニング結果を表1に示す。約95万人の被検者から約3万6千人の保因者が同定され(陽性率:3.8%), リスクカップル数は約1,000組であった。これらカップルの胎児に対して出生前診断を行うことにより、テイサックス病のアメリカでの発生頻度は激減した(表2)。すなわち、1970年代には全米で年間40~50名のテイサックス患者が発生していたが(うち、ユダヤ人は30~40名)、ユダヤ人テイサックス病の発生頻度は1992年には年間4名まで減少した。

IV. ハイリスクスクリーニング

ここではファブリ病に対するハイリスクスクリーニングについて記載する。ファブリ病は、 α -galactosidase 欠損によりその基質であるセラミドトリヘキソシド(=グロボトリアオシルセライド, GL3)が蓄積し、発症するX連鎖劣性遺伝形式をとるリポドーシスのひとつである。したがって、原則的には男性のヘミ接合体のみが発症するが、ヘテロ接合体の女性も発症する場合がある。古典型、心型そして腎型の3つの臨床亜型に分類されている。古典型は学童期に四肢疼痛で始まり、低汗症、被角血管腫などの症状が見られ、次

第に腎不全、虚血性心疾患、脳血管障害などの重篤な症状を呈する。心型そして腎型の患者では古典型に認められるような皮膚症状、神経症状なしに、それぞれ壮年期以後に肥大型心筋症あるいは腎不全で発見される。そこでファブリ病において報告されているハイリスクスクリーニング対象は、肥大型心筋症と腎不全の男性患者である。

Nakao ら²⁾は、左心室壁厚が13mm以上ある肥大型心筋症男性患者230名の血漿 α -galactosidase 活性を測定してスクリーニングを行い、7名をファブリ病と診断した(陽性率:3.0%)。Sachdev ら³⁾は、Nakao らと同様の診断基準を用いて、40歳以上で肥大型心筋症と診断された79名の男性と、40歳未満で肥大型心筋症と診断された74名の男性の血漿 α -galactosidase 活性を測定してスクリーニングを行い、前者で5名(陽性率:6.3%)の、後者で1名(陽性率:1.3%)のファブリ病患者を同定した。この結果は、高齢で発症した肥大型心筋症の患者ではファブリ病の頻度が高いことを示している。

男性腎不全患者において、血漿や乾燥濾紙血や全血を用いて、 α -galactosidase 活性を測定してスクリーニングが行われた⁴⁾⁵⁾。スクリーニング対象は406~1,903名で、陽性率は0.22~0.49%であった(表3)。透析腎不全患者登録プログラムにおいて原因疾患がファブリ病の割合は、ヨーロッパで0.019%、

表3 腎不全にて透析中の男性患者におけるファブリ病スクリーニング結果

報告者	国名	スクリーニング患者数	陽性患者数 (陽性率)	検体	文献
Utsumi et al.	日本	406名	2名 (0.49%)	血漿	Clin. Exp Nephrol 4 : 49, 1999
Walters et al.	アメリカ	1,903名	9名 (0.47%)	血漿	Abstract, Annal Clinical Genetic Meeting, 1999
Spada et al.	イタリア	1,765名	4名 (0.22%)	乾燥 濾紙血	J Inher Metab Dis 25 : 113, 202
Linthorst et al.	オランダ	508名	1名 (0.22%)	全血	Nephrol Dial Transplant 18 : 1581, 2003

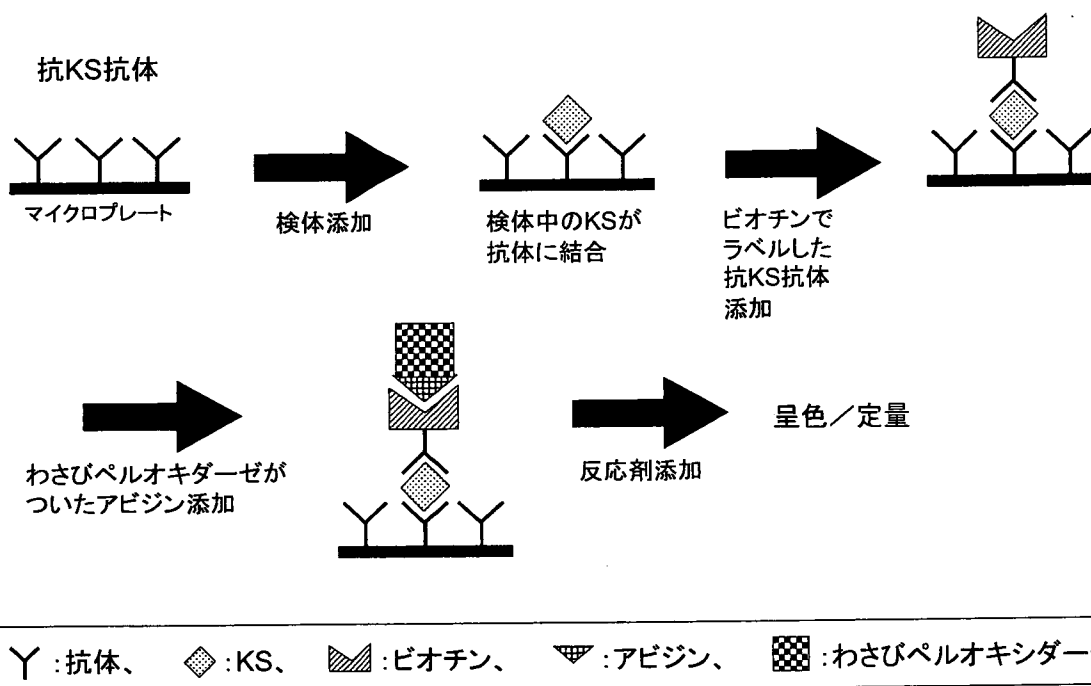


図1 ケラタン硫酸 (KS) に対するモノクローナル抗体を用いたムコ多糖症IV A型 (モルキオ症候群) のマススクリーニングの原理

アメリカで0.017%と報告されているので、ファブリ病のハイリスクスクリーニングにおける陽性率の高さはファブリ病が見逃され、腎不全に至っている可能性を示唆していると考えられる。

V. 疾患特異的なマススクリーニング

1. 尿中ケラタン硫酸濃度測定によるモル

キオ症候群のスクリーニング

(1)モルキオ症候群：N-acetylgalactosamine 6-sulfatase 欠損が病因のA型と、 β -galactosidase 欠損が病因のB型がある。どちらのタイプでも尿中にケラタン硫酸が過剰に排泄される。知能は正常であるが、椎骨・骨盤骨・大腿骨などの骨変形がムコ多糖症の中で最も著明である。骨髄移植や酵素補充療法が有効といわれているが、早期発見をしないと

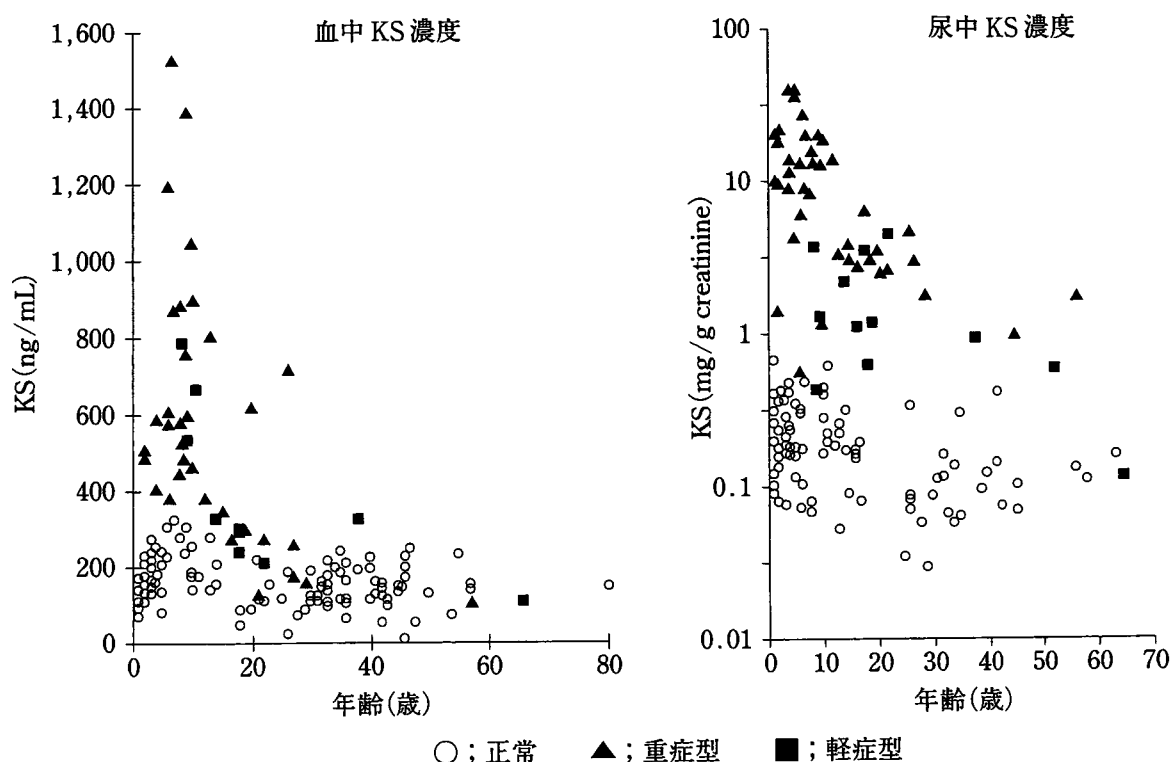


図2 ケラタン硫酸 (KS) に対するモノクローナル抗体を用いたムコ多糖症ⅣA型 (モルキオ症候群) のマススクリーニングの結果 (Tomatsu S et al: *Pediatr Res* 55: 592, 2004)

不可逆性の骨変化を生じ、治療効果は十分といえない。したがって、スクリーニングの意義は大きいと考えられている。

(2)方法: Tomatsu ら⁶⁾によって、抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体を用いたペルオキシダーゼサンドイッチ発色法で血液中と尿中のケラタン硫酸濃度を測定してスクリーニングする方法が考案されている (図1)。原理を以下に述べる。マイクロプレート上に抗ケラタン抗体を固定しておき、これに検体を入れ反応させる。ここにビオチンでラベルした抗ケラタン抗体を加える。さらにここにペルオキシダーゼを付着させたアビジンを添加し、酵素反応によりペルオキシダーゼを発色させて検体中のケラタン硫酸を定量する。

(3)結果: 図2に結果を示す。1歳から65歳のモルキオ症候群A型の尿中と血中のケラタン硫酸濃度を測定した。尿中ケラタン硫酸濃度は1歳から5歳にピークがあった (患者平均: 15.3mg/gクレアチニン, コントロー

ル平均: 0.26mg/gクレアチニン)。その後、その値は減少した。重症型は軽症型の6.7倍の排泄量を示していた (重症型56名, 軽症型12例)。また、血中ケラタン硫酸濃度については45例 (重症型36名, 軽症型9例) について検討した。血中ケラタン硫酸濃度は5歳から10歳にピークがあった (患者平均: 776ng/mL, コントロール平均: 234ng/mL)。重症型は軽症型の1.5倍の値を示していた。以上の結果から、尿中および血中ケラタン硫酸濃度の測定は早期診断や疾患重症度の評価に適していることを示唆している。

2. 尿中 GL3 濃度測定によるファブリ病のスクリーニング

(1)方法: Kitagawaら⁷⁾によって原尿あるいは抽出尿を検体として用いて、尿中 GL3 濃度をタンデムマススペクトロメトリーで測定する方法が報告されている。

(2)結果: 表4に結果を示す。ファブリ病患者21名 (古典型ファブリ病男性ヘミ接合

表4 尿中 GL-3 濃度 (Kitagawa T et al: Mol Genet Metabolism 85:196, 2005)

	古典型ファブリ病 ヘミ接合体			古典型ファブリ病 ヘテロ接合体		正常 コントロール
	症状(+) 腎機能 正常群	症状(+) 腎機能 低下群	無症状	症状(+)	症状(-)	
検体数 (n)	7	3	1	6	2	1,140
平均値 ($\mu\text{g}/\text{mg Cr}$)	15.76	11.28	4.35	1.01	0.57	0.17
測定値範囲 ($\mu\text{g}/\text{mg Cr}$)	17.71 ~ 32.27	1.72 ~ 28.38	—	0.27 ~ 1.71	0.06 ~ 1.08	0.08 ~ 0.42

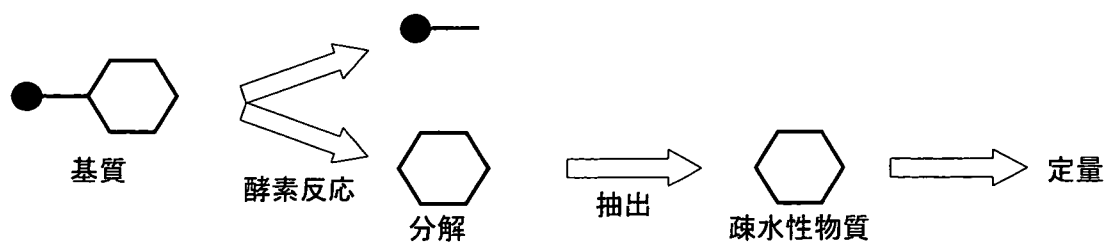
* 腎機能正常群: Ccr 30mL/分以上, 腎機能低下群: Ccr 30mL/分未満

体: 11名, 古典型ファブリ病ヘテロ接合体: 8名, 心型ヘテロおよびヘミ接合体: 2名) とコントロール1,140名について検討を加えた。コントロールでは, 平均尿中 GL3 濃度は $0.17\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン (Cr) で, 測定値は $0.08\sim 0.42\mu\text{g}/\text{mgCr}$ に分布していた。これに対して, 腎機能正常の有症状のヘミ接合体7名の平均尿中 GL3 濃度は $15.76\mu\text{g}/\text{mgCr}$ で, 測定値の範囲は $17.71\sim 32.27\mu\text{g}/\text{mgCr}$ と明らかにコントロールに比較して高値だった。腎機能低下群では, 尿中 GL3 濃度は腎機能正常群に比較して低値の傾向が認められたが, コントロールよりは明らかに高値であった。また, 1例のみではあるが, 無症状のヘミ接合体では $4.35\mu\text{g}/\text{mgCr}$ と尿中 GL3 濃度は高値であった。しかし, 古典型ファブリ病ヘテロ接合体8名中, 2名の尿中 GL3 濃度は正常範囲内だった。また, 心型のヘミ接合体1名そしてヘテロ接合体1名において尿中 GL3 濃度は正常範囲だった。以上の結果は, 古典型ファブリ病のスクリーニングは本法で可能であるが, 心型ヘミ接合体とすべての型のヘテロ接合体の一部は, この方法ではスクリーニング不能であることを示している。

VI. 複数のライソゾーム病に対するマスキング

1. 直接マルチアッセイ法によるライソゾーム酵素活性測定によるスクリーニング

Lin ら⁹⁾は特殊な基質を作成し, 現在の治療法の開発状況から早期診断が有効であると考えられるライソゾーム病であるゴーシェ病, ファブリ病, ポンペ病, ニーマンピック病, クラッペ病を対象にしてマスキングの可能性を検討した。方法の原理を図3に示す。合成基質は親水性部分と疎水性部分からなり, 親水性部分はそれぞれの疾患の欠損酵素に該当する糖鎖構造, 疎水性部分は欠損酵素に特有な分子量を持っている。この基質と緩衝液と乾燥濾紙血と反応させ, 酵素反応によって遊離した疎水性物質を抽出し, タンデムマスで質量特異的に疎水性部分を定量すると, これら5種類の酵素活性が同時に測定できる。表5にその結果を示す。ゴーシェ病6例, ニーマンピック病5例, クラッペ病9例, ポンペ病5例, ファブリ病5例を対象に検討したところ, いずれの疾患のいずれの酵素においても患者の酵素活性値の最高値は正常人の最低値より有意に低かった。また,



対象疾患	酵素名	親水性部分(●)	疎水性部分分子量(○)
ゴーシェ病	酸性β-グルコシダーゼ(ABG)	β-グルコース	482
ニーマンピック病	酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)	ホスホリルコリン	398
クラッペ病	ガラクトシルセラミドβ-ガラクトシダーゼ(GALC)	β-ガラクトース	426
ポンペ病	酸性α-グルコシダーゼ(GAA)	α-グルコース	498
ファブリー病	酸性α-ガラクトシダーゼ(GLA)	α-ガラクトース	484

Lin Y. et al. Clin. Chem 50:1785, 2004

図3 直接マルチアッセイ法によるリソゾーム酵素活性測定によるマススクリーニングの原理 (Lin Y et al : Clin Chem 50 : 1785, 2004)

表5 直接マルチアッセイ法によるリソゾーム酵素活性測定によるマススクリーニング結果 (Lin Y et al : Clin Chem 50 : 1785, 2004)

酵素	患者の最高値	保因者の最低値	正常成人の平均値 〔最低値～最高値〕	正常乳児の平均値 〔最低値～最高値〕
ABG	0.18 (n = 6)	0.81 (n = 5)	3.36 [0.94 ~ 8.49] (n = 48)	3.31 [0.89 ~ 9.60] (n = 32)
ASM	0.32 (n = 5)	0.40 (n = 5)	2.12 [1.05 ~ 8.53] (n = 48)	4.41 [0.92 ~ 11.3] (n = 32)
GALC	0.20 (n = 9)	—	0.72 [0.60 ~ 1.92] (n = 18)	1.01 [0.42 ~ 1.53] (n = 15)
GAA	0.33 (n = 5)	0.89 (n = 5)	2.19 [1.19 ~ 4.02] (n = 48)	3.12 [0.93 ~ 7.33] (n = 32)
GLA	0.17 (n = 5)	0.34 (n = 5)	1.91 [0.97 ~ 3.40] (n = 48)	2.23 [0.77 ~ 5.65] (n = 32)

値は $\mu\text{mol/hr/L}$

患者の酵素活性の最高値は保因者の最低値とオーバーラップすることはなかった。以上の結果は、本法によるスクリーニングでこれら5疾患を同定することが可能であることを示している。

2. 血漿中 LAMP1 濃度測定によるスクリーニング

LAMP1 はライソゾーム膜に結合する蛋白質で、ある種のライソゾーム病の血漿中で上

昇することが報告されていた。Hopwood らのグループはこの点に着目し、25種類のライソゾーム病の320検体について、LAMP1 に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により血漿中 LAMP1 濃度を測定し、マススクリーニングに応用できるかを検討した⁹⁾。その結果の一部を表6に示す。ゴーシェ病、ムコ多糖症などではコントロールと比較して、LAMP1 濃度は高値を示したが、フ

表6 種々のリソゾーム病における血漿中 LAMP-1 濃度 (Meikle PJ et al : Clin Chem 43 : 1325, 1997)

疾患名	サンプル数	平均値(μg/l)	コントロール値の95パーセンタイル以上を示すサンプルの割合(%)
コントロール	152	308	—
ファブリ病 ☆	24	359	25
ゴーシェ病 *	51	956	92
G _{M1} ガングリオシドーシス *	12	1,071	92
I-cell 病 *	15	1,815	100
クラッペ病 ☆	12	407	17
MLD ☆	32	379	19
MPS I 型 *	22	1,470	100
MPS II 型 *	23	1,406	100
MPS III A 型 *	20	1,039	100
MPS III B 型 *	16	880	100
MPS IV A 型 *	16	699	88
MPS VI 型 *	12	1,018	92
ニーマンピック病 A/B 型 ☆	9	385	33
ニーマンピック病 C 型 ☆	10	391	20
テイサックス病 ☆	17	425	41

MPS : ムコ多糖症, MLD : 異染性白質変性症, ☆ : LAMP-1 測定が無効な疾患, * : LAMP-1 測定が有効な疾患

ファブリ病, ニーマンピック病などでは有意な上昇が認められなかった。この結果, 72%の患者がこの方法によるスクリーニングで同定可能であった。

3. 血漿中サポシン濃度測定によるスクリーニング

サポシン (=SAP) は A, B, C, D の4種類存在し, 各サポシンは特定のライソゾーム酵素を特異的に活性化し, 糖脂質の分解に重要な役割を果たしている。リポドーシス患者臓器においてサポシン蓄積が報告された点に注目し, Hopwood らのグループは28種類のライソゾーム病において血漿サポシン濃度を測定し, マスクリーニングに応用できるかを検討した¹⁰⁾。その結果の一部を表7に示す。注目すべきは, LAMP1 と LAMP2 がスクリーニングに有効でなかった疾患においてサポシンすべて, あるいは一部が増加していたことである。この結果, 血漿中 LAMP1

濃度と血漿中サポシン濃度の両方を測定するスクリーニングを行うと, 85%のライソゾーム病が同定可能であった。

VII. 今後の方向性

ライソゾーム病においては治療法の発展により, スクリーニングを含めた早期診断に対する概念が変化してきている。クラッペ病, 異染性白質変性症, ムコ多糖症 I 型に対する早期骨髄移植の臨床的有効性が報告されている。また, ゴーシェ病, ファブリ病, ムコ多糖症 I 型, ムコ多糖症 VI 型では酵素補充療法が欧米では認可されており, ムコ多糖症 II 型, ポンペ病では酵素補充療法のヒト臨床試験が終了し, 認可申請を待っている段階である。さらにムコ多糖症 IV 型, ニーマンピック B 型では酵素補充療法の臨床試験が開始される予定である。

このように種々の治療法が開発されるにし

表7 種々のリソゾーム病における血漿中サポシン濃度 (Chang MHY et al : Clin Chem 46 : 167, 2000)

疾患名	サンプル数	平均サポシン値($\mu\text{g}/\ell$)			
		A	B	C	D
コントロール	111	12.2	54.8	14.6	23.8
ファブリ病 ☆	27	33.9 # (93)	82.5	29.3	37.9
ゴーシェ病 *	52	60.3	124.5	100.2	127.7
G _{M1} ガングリオシドーシス *	12	32.5	72.3	28.1	35.4
I-cell 病 *	16	27.3	47.5	53.3	122.0
クラッペ病 ☆	11	20.6 # (63)	54.1	22.3	41.1
MLD ☆	32	14.1	49.5	19.7	38.1 # (44)
MPS I型 *	18	23.0	56.2	39.2	47.9
MPS II型 *	24	20.6	42.7	32.4	37.1
MPS III A型 *	19	14.4	29.0	21.9	30.9
MPS III B型 *	16	14.3	35.0	24.1	31.6
MPS IV A型 *	16	21.2	50.1	20.7	32.3
MPS VI型 *	10	26.6	55.3	29.6	38.0
ニーマンピック病A/B型 ☆	9	51.5 # (89)	121.2 # (89)	141.7 # (100)	163.9 # (100)
ニーマンピック病C型 ☆	10	24.2 # (80)	49.3	50.0 # (100)	82.2 # (90)
テイサックス病 ☆	21	24.1 # (71)	59.6	23.7	35.4

MPS：ムコ多糖症，MLD：異染性白質変性症，☆：LAMP-1測定が無効な疾患，*：LAMP-1測定が有効な疾患，#：LAMP-1，2が上昇しなかった疾患において，有意な上昇を示したサポシン(コントロール値の95パーセントイル以上の値を示すサンプルの%)

たがって，中枢神経症状や骨病変や腎病変の不可逆性変化が起こる前に治療を開始することが，良好な治療効果を得るうえで重要視されるようになってきた。また，治療法が存在するのに診断がつかず，不幸な転帰をとるライソゾーム病患者が存在してはならない。この観点からすると，ライソゾーム病のスクリーニングが発展することは重要である。この半面，治療法が存在するにしても，ライソゾーム病は遺伝性疾患なのでスクリーニングがもたらす moral dilemma の問題が存在する。また，治療法の主流である酵素補充療法は極めて高価であり，スクリーニングにも費用がかかる。さらには，治療法が最近開発されたばかりであり，長期にわたる良好な帰結は不明であり，発症前患者における治療法や治療効果のモニター法なども議論されなければならない。

以上のように，ライソゾーム病に対する種々のスクリーニング法が開発されつつあるが，ライソゾーム病のスクリーニングにおいては倫理的，医療経済的，実地臨床的に解決すべき問題が存在する。近未来的には，ライソゾーム病のスクリーニングが開始されると考えられるが，開始前に少なくとも上記の問題点を解決した後に導入すべきであろう。

文 献

- 1) Bach G et al : Tay-Sachs screening in the Jewish Ashkenazi population : DNA testing is the preferred procedure. Am J Med Genet 99 : 70~75, 2001
- 2) Nakao S et al : An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. N Eng J Med 333 : 288~293, 1995
- 3) Sachdev B et al : Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 105 : 1407~1411, 2002

- 4) Utsumi K et al. Fabry disease in patients receiving maintenance dialysis. *Clin Exp Nephrol* 4 : 49~51, 1999
- 5) Linthorst GE et al : α -galactosidase A deficiency in Dutch patient on dialysis ; A critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol Dial Trasplant* 18 : 1581~1584, 2003
- 6) Tomatsu S et al : Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IV A. *Pediatr Res* 55 : 592~597, 2004
- 7) Kitagawa T et al : Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet and Metabolism* 85 : 196~202, 2005
- 8) Lin Y et al : Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 50 : 1785~1796, 2004
- 9) Meikle PJ et al. Diagnosis of lysosomal storage disorders ; Evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 43 : 1325~1335, 1997
- 10) Chang MHY et al : Saposin A, B, C and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 46 : 167~174, 2000

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

Ⅲ. 診断の進歩

遺伝子診断の実際

なん ば えい じ ひ がき かつ み
難 波 栄 二 檜 垣 克 美

Udin Bahrudin 鳥取大学生命機能研究支援センター遺伝子探索分野

要旨

遺伝子診断は、技術の進歩により出生前診断を含め先天代謝異常症の分野でも広く普及してきている。われわれは、WAVEシステムを用いたシステムを構築しており、GM1-ガングリオシドーシスを例に遺伝子診断の方法について述べる。倫理面では「遺伝学的検査のガイドライン」などを十分に配慮する必要がある。将来的には、DNA マイクロアレイなどの技術により多くの疾患の診断を、迅速に行うシステムが構築される可能性がある。

はじめに

先天代謝異常症では、従来、蓄積物質の同定や酵素活性の測定によって診断がなされてきたが、近年、多くの原因遺伝子が明らかにされ、その遺伝子診断が確立されてきた。遺伝子診断は、解析技術の進歩により、現在では、比較的簡便に行うことができ、広く普及してきている。ゲノム DNA を用いるために、末梢血をはじめすべての臓器で検査可能であり、出生前診断にも利用されている。遺伝子診断は PCR 法により、目的の DNA 部分を増幅し、塩基配列の決定により異常を検出することで行われるが、解析する領域が多い場合には、塩基配列の決定とその情報を処理することが大変になる。そのため、変異部位をスクリーニングする方法を導入する場合も多い。

われわれは、現在広く普及している WAVE システムを導入することにより効率的な遺伝子診断法を確立している。

本稿では、GM1-ガングリオシドーシスの遺伝子診断の例を示す。さらに、変異データの解釈、検体、倫理面、検査施設、最後に今後の解析技術についても述べる。

Key Words

先天代謝異常症

遺伝子診断

DHPLC

GM1-ガングリオシドーシス

解析の具体例

従来、遺伝子変異検索には SSCP 法 (single-strand conformation polymorphism) が汎用されてきた¹⁾。近年、低コストで効率よい DHPLC 法 (denatured high-performance liquid chromatography : イオン対逆相-変性高速液体クロマトグラフィー) が SSCP 法に代り普及してきている²⁾。

原理は、以下とおりである。正常型 DNA と変異型 DNA の変異を含む領域を PCR で増幅後、PCR 産物を 95 °C で加熱してから、ゆっくりと冷却し再重合させ、2 種類のヘテロ二重鎖と 2 種類のホモ二重鎖を形成させる。変異のある部位ではミスマッチのため、水素結合が形成されないために水素結合が形成されず、カラムへの結合力が弱くなり、溶出時間の差として検出することができるというものである (図 1)。フラグメント分離用のカラムと HPLC を組み合わせた装置として、WAVE™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Inc.) が市販されている。

以下に、われわれが解析した WAVE システムを用いた β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析について述べる。

ヒト β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (GLB1) は、3 番染色体 3q21.33 領域に位置し、16 エクソン、2,031 塩基をコードしている。これら 16 のエクソン・イントロンジャンクションを含む領域が増幅される PCR プライマーを設計した (表 1)。これらプライマーを用い、ヒト患者血液および皮膚繊維芽細胞より抽出したゲノム DNA を検体とし Ampli Taq Gold (Applied Biosystems) を用いた 95 °C 5 分、95 °C 1 分、60 °C 1 分、72 °C 1 分 (35 サイクル)、72 °C 5 分のサイクルで PCR 反応を行った (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems)。PCR 産物の一部をアガロースゲル電気泳動で確認後、サーマルサイクラーにて 95 °C 4 分間加熱後 45 分間かけて

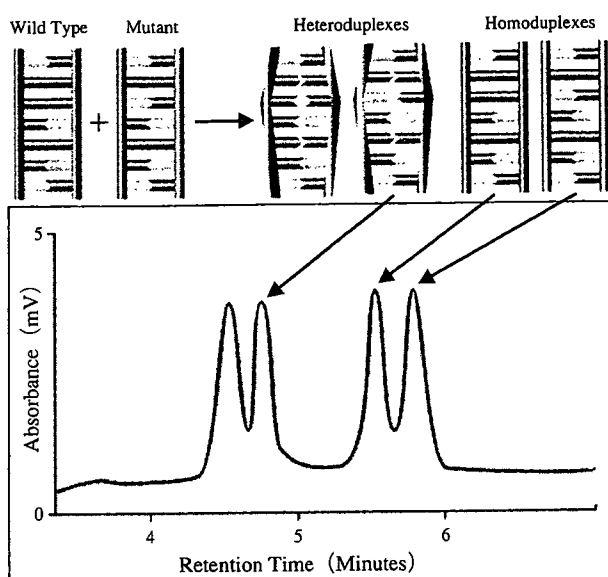


図 1 DHPLC 法による変異解析の原理

<http://www.transgenomic.com/>より引用

変異を含む PCR 産物と正常 PCR 産物を混在し加熱再重合することでヘテロ二重鎖とホモ二重鎖を形成させ、HPLC で分離することにより異なる複数のピークが検出できる

25 °C までアニーリングさせ、ヘテロ二重鎖の形成を行った。二重鎖の形成は正常型コントロール DNA、患者 DNA および正常と患者 DNA の混合液の 3 セットについて行い、DHPLC で解析した。

DHPLC 解析の変異検出感度を作用するのは、分離の温度 T_m および溶離液のグラジエントなどの分析条件の設定であるが、 T_m は付属するソフトウェア (WAVEMAKER™ software: Transgenomic, Inc.) と、the Stanford Genome Technology Center software (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) の両方を用い、計算された T_m 値および上下 2 °C の三点でのスクリーニングを行った。WAVE fragment 解析装置では、オートサンプラーにより 1 μ l のサンプルが分離カラムに注入後、DNA がイオン対逆相変性高速液体クロマトグラフィーにより分離される。検出は 254 nm における吸光度により行われる。正常型 DNA のみの場合、ホモ二重鎖の 1 本のピークが検出されるが、サンプル DNA に変異または多型が存在する場合、正常型 DNA とは異なる 2 本、もしくはそれ以上のピークと

して検出される。

最後に変異のピークが見られた産物については、直接シーケンス法 (ABI Prism 3130xl DNA Seqencer; Applied Biosystems) により遺伝子変異の同定を行った (図2)。これまで、13人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症の患者について変異解析を行った結果11人について20の変異を同定し、そのうち9種類が新規変異であった (表2)。

WAVE装置の解析時間は1検体あたり10分程度と迅速であり、WAVE解析装置の価格はSSCP法に比べ高価であるが、導入できれば迅速、簡便かつ低コストな方法である。

変異データの解釈

0.1%のゲノム配列はすべてのヒトで異なっており、見つかった遺伝子の変異が疾患の原因にあたるかどうかを十分に考慮する必要がある。理想的には発現実験などにより、遺伝子変異が遺伝子産物 (蛋白) の機能異常をきたすことを証明することが理想である。しかし、これは臨床診断として用いるには現実的ではない。

通常は、インターネット上で利用できるデータベースとの照合を行い、変異であるかどうかを確認する。正常多型のデータベースとしてはNCBIのSNPデータ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) があり、遺伝子変異のデータ

表1 ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に対するPCRプライマーとPCR増幅産物のサイズ

exon	sense (5'→3')	antisense (5'→3')	PCR size (bp)
1	caggcgcgtgggtccttagtcaagt	gccagcctgtcccctagcaatg	204
2	gctactctcaaaggatcggcttctgaaa	tatcttctctccagagtgggtgttcagg	303
3	gccttctccctcttatccatgtgttagc	taaaagacacctgtgctgggtacagtcc	401
4	ccccttgcccttgaagctttattctt	tgtatttttagtagggcgaggttttgc	347
5	agtttacgaatttgtgttggccacatt	gccttcccaatgcaattgaaactaaaag	358
6	aggatctcctcattttccctgctcttt	atgaaaaatctcaatctgcccatgacac	330
7	actaacattctgaccgtagcagggcttc	tcattcacaatgtccagaatggctatgac	325
8-9	ctttacacctgtcatagatggggcattg	cacacccctcctcaaatatcaacaga	412
10	cgtctgtgtctccaacaagtggtttta	gtgagttcaaaagaggctctgtccaaga	312
11	gcactgttgagtctttgacctgctttc	ttcgcagaaaaataacgaaccaattcct	301
12	gggagtagatggagaggactgaaggaga	ggatctgatgcatttgcttaccattttg	391
13	ggaggtggaggaagatttcattcctta	ctgaaaaggtgagcaaagaccccaat	343
14	tctccttgctgacctcttaccctcaat	tattttaccaggtggtcttgaactcc	348
15	atctcgaggttcatttctgttggtgtt	aagtttaggcctgaattcaaacccttc	427
16	ggggttgatggttctctgtctctctc	gaaacctcaggtgaaaatgcacatccta	467

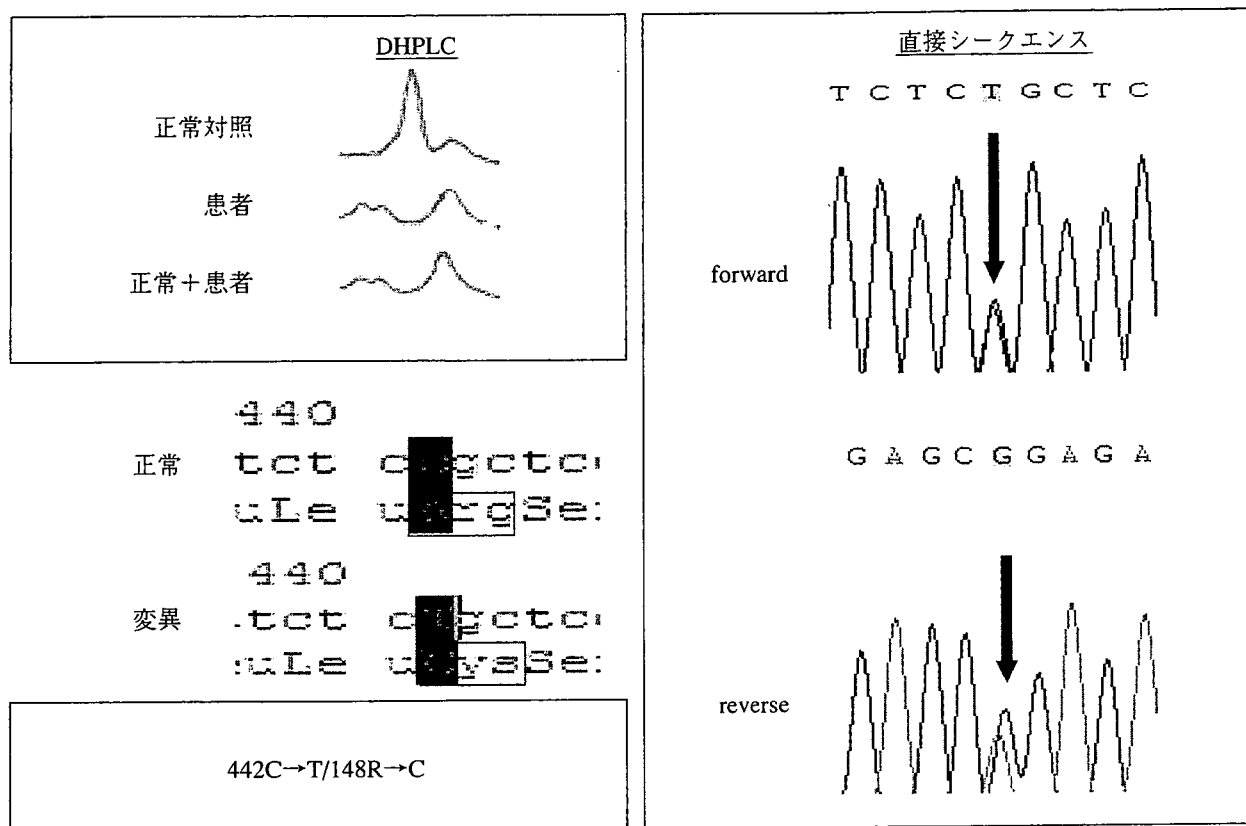


図2 ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の DHPLC 変異解析の結果

DHPLC 解析により正常とは異なるパターンが得られる。ホモ接合体異常の場合を考慮して、正常対照、検体、検体+正常の3セットのサンプルを検討する。最終的には直接シーケンスが変異を確認する

表2 ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子解析の結果 (MMBID より一部引用)

NS	mutation	exon	amino acid	base		phenotype	note
1	I181K	5	181Ile → Leu	542T → A	Hm	Turkish, Inf	GMnew
2	D640E	16	640Asp → Glu	1920C → G	ht	Japanese, Inf GM1	new
	M480V	14	480Met → Val	1438A → G	ht		new
	R482H	14	482Arg → His	1445G → A	ht		~ Italian Inf GM1, Caucasian MB
3	no mutation in all exons					Japanese, Inf GM1	
4	no mutation in all exons					Japanese, Inf GM1	
5	R148C	4	148Arg → Cys	442C → T	ht	Japanese, Inf GM1	new
6	R208C	6	208Arg → Cys	622C → T	Hm	Japanese, Inf GM1	~ American Inf GM1
7	R59H	2	59Arg → Cys	176G → A	ht	Japanese, Inf GM1	~ Brazilian Inf GM1
	D332E	10	332Asp → Glu	996C → G	ht		new
8	R482H	14	482Arg → His	1445G → A	ht	Japanese, Inf GM1	~ Italian Inf GM1, Caucasian MB
	P549L	15	549Pro → Leu	1646C → T	ht		new
9	276-277 ins G	3	frame shift + stop codon		Hm	Japanese, Inf GM1	new
10	R201C	6	201Arg → Cys	601C → T	ht	unknown	~ Japanese Juv. GM1
	R201H	6	201Arg → His	601C → T	ht		~ Caucasian Adult GM1
	R201Y	6	201Arg → Try	601-602CG → TA	ht		new
11	S54I	2	54Ser → Ile	161G → T	ht	unknown	new
12	R59C	2	59Arg → Cys	175C → T	ht	unknown	new
	T82M	2.3	82Thr → Met	245C → T	ht		~ Caucasian Adult GM1
13	R201C	6	201Arg → Cys	601C → T	ht	Jap Adult GM1	~ Japanese Juv. GM1
	T420K	13	420Thr → Lys	125C → A	ht		new

NS: Number of Patient Sample, Hm: homozygous, ht: heterozygous

ベースとしては The Human Gene Mutation Database (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.html>) などが存在し、これらのデータベースや過去の論文の記載などを参考に、既知変異、新規変異、正常多型などの判断を行う。

検体に関して

遺伝子解析の材料としては RNA と DNA が従来用いられてきた。現在では、DNA を解析することが主流となっている。一般的には末梢血を使うことが多いが、毛髪、頬粘膜、病理検体からの DNA を分離することが可能である。末梢血の場合は、EDTA を抗凝固薬として用いることが多い。4℃ または室温でも数日は保存が可能であり、1～5 ml 程度の採血で通常は十分な DNA が得られる。

倫理的な問題

遺伝子解析研究においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省 平成 13 年 3 月 29 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正) が定められており、各施設での倫理委員会の承認を得て行う必要がある。しかし、現在は研究目的よりも臨床の診断として日常的に遺伝子診断を行うことが多くなってきている。この場合には、「遺伝学的検査に関するガイドライン」(平成 15 年 8 月 遺伝医学関連 10 学会) に従って、十分な遺伝カウンセリング、書面によるインフォームド・コンセント、検体の匿名化などに留意し、遺伝子診断を進めていく。

遺伝子診断の検査施設に関して

そのほとんどが稀少遺伝病と考えられる先天代謝異常症においては、検査会社レベルでのコマーシャル検査の普及はむずかしく、研究室に頼らざるをえない状況にある。これらに対して、日本先天代謝異常学会のホームページ (<http://www.jsimd.org/>) 上の「各施設の専門分野」、また京都大学で構築されている「ヒト Germline 遺伝子・染色体検査オンラインデータベース」(<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/idennet/DB/index3.html>) などが参考になる。さらに Gene Tests (<http://www.genetests.org/>) のサイトを利用することによりアメリカなどの検査施設の情報を得ることも可能である。しかし、遺伝子診断は、大学での研究としては成り立たなくなっており、その遺伝子診断システムをどうするかは、今後の重要な課題である。

今後の解析技術について

われわれは、近年 WAVE システムを用いた解析技術を用いているが、DNA マイクロアレイ技術 (DNA チップ技術) の進歩には目をみはるものがある。最近開発された Genome Tiling Array³⁾ などを利用することにより、多くの遺伝子の変異を一度に見つけることが可能になってきた。将来的には先天代謝異常症の遺伝子異常を、一度に簡便にスクリーニングできる DNA チップの開発が行われる可能性がある。

●文 献

- 1) Orita W, Iwahana H, Knazawa H et al.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 86:2766-2770, 1986
- 2) White MB et al.: Detecting single base substitutions heteroduplex polymorphisms. Genomics 12:301-

306, 1992

- 3) Johnson JM, Edwards S, Shoemaker D et al.: Dark matter in the genome: evidence of transcription detected by microarray tiling experiments. Trends in Genet 21:93-102, 2005

著者連絡先

〒683-8503 鳥取県米子市西町 86
鳥取大学生命機能研究支援センター
難波栄二

第10回乳幼児けいれん研究会のお知らせ

会 期 2007 (平成 19) 年 4 月 7 日 (土曜) ~ 8 日 (日曜)
会 場 慶應義塾大学三田キャンパス北館 (東京) TEL 03-3453-4511
主 題 「乳幼児におけるけいれん準備性の生物学」
会 長 高橋孝雄 (慶應義塾大学小児科教授)
公用語 英語 (国際シンポジウム形式)
早期登録締切 2006 (平成 18) 年 11 月 30 日
出題抄録締切 2006 (平成 18) 年 11 月 30 日
詳しくは HP (<http://www.iss-jpn.info/>) をご覧ください

事務局 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
慶應義塾大学医学部小児科学教室 高橋孝雄
第10回乳幼児けいれん研究会事務局
TEL 03-5363-3816 FAX 03-5379-1978
e-mail : ttakahashi@z3.keio.jp

VII. 薬物治療の新しい薬

ケミカルシャペロン

すずき よしゆき 鈴木 義之 国際医療福祉大学大学院

要旨

ライソゾーム病の脳障害に対するケミカルシャペロン療法を開発中である。シャペロン化合物は酵素欠損症患者の細胞内で変異蛋白質分子を安定化し、酵素活性を発現する。G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスへの経口投与により、シャペロン化合物 NOEV は血液脳関門を通り脳に到達し、脳病変を改善させる。治療法効果判定のためにマウスの神経学的検査法を確定し、NOEVの長期投与実験における臨床評価を実施中である。

Key Words

シャペロン

NOEV

G_{M1}-ガングリオシドーシス

β-ガラクトシダーゼ

分子治療

シャペロンとは

遺伝子病治療の最終目標は、原因遺伝子を修復することである。しかし、遺伝子異常は全身性であり、すべての細胞を治療することは不可能である。多くは脳組織の原発性病変を発現する。われわれはライソゾーム病をモデルとして、脳の遺伝病に発現される変異蛋白質の機能を修復させるために、血液脳関門を通過する低分子シャペロンによる治療実験を始めた。

「シャペロン」は、元来フランス語 chaperon であるが、英国で、貴族（14世紀）、貴婦人（16世紀）のかぶる頭巾・帽子、ガーター勲位の装束の一部（16世紀）、棺を引く馬の前頭部につける飾り（17世紀）、などの意味を経て、若い未婚女性の社交界へのデビューに際し、行儀作法を指導監督する年配の既婚女性（18世紀）、などの意味に使われた。現在の臨床医学では、医師が異なった性（とくに女性）の患者を診察するときに医師に付き添う人（女性）、という意味で使われる。現代英語では、chaperone という女性形単語として使われることが多い。生物学では、熱ショック蛋白質などの「分子シャペロン」として、「他の蛋白質や蛋白質複合体の適正な折りたたみや構築を行う別の蛋白質」と定義される。

ライソゾーム病の分子病態とその矯正

ライソゾームは体細胞の小胞体である。数十の加水分解酵素が酸性の条件で高分子代謝産物を順序よく消化する。酵素遺伝子のひとつに変異がおこると酵素活性欠損、細胞機能障害、そして全身病として発現する（ライソゾーム病）。多くは小児期の進行性中枢神経疾患である¹⁾²⁾。われわれは、とくに脳に特異的な脂質であるガングリオシドの分解酵素 β -ガラクトシダーゼの病態を詳細に調べてきた³⁾。1988年に酵素の責任遺伝子構造を解明後、多くの変異遺伝子を発見し、患者細胞内での変異蛋白質の動態を調べ、「酵素欠損」と総称される病気の分子病態が一樣でないことを知った^{3)~6)}。つまり、蛋白質分子の合成障害、蛋白質分子の機能障害、蛋白質分子の細胞内不安定性、の3種である。

最初の二つの病態では、正常な酵素蛋白質あるいは遺伝子を補給しない限り、細胞の機能を正常化することは不可能である。しかし第三の場合、構造上活性をもつはずの酵素蛋白質が速やかに分解され、機能を発現できない。したがって、この蛋白質に適切な細胞内環境を提供すれば、働くべき場所で活性を復元できるかもしれない。

この論理をまず Fabry 病 (α -ガラクトシダーゼ A 欠損症) の分子病態に適用し、変異酵素蛋白質を安定化させる化合物を投与することにより、実際に活性の発現誘導が実現した⁷⁾。次に古典的な神経遺伝病 G_{M1}-ガングリオシドーシス (β -ガラクトシダーゼ欠損症) に対して脳の病態修復を試み、成功した⁸⁾。

ケミカルシャペロン療法の原理

変異蛋白質分子の立体的な折りたたみ (フォールディング) が不十分なため、細胞内

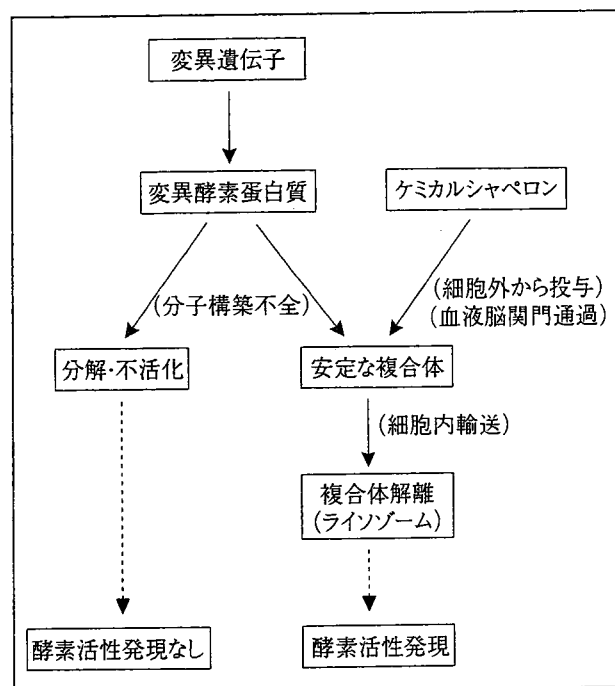


図1 ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の原理

投与した低分子シャペロン化合物は細胞内に入り、変異蛋白質と結合してその立体構造を修復し、細胞内輸送システムの働きによって無事にライソゾームに運ばれる。ライソゾームの酸性の環境で酵素分子とシャペロン分子の複合体は自動的に解離する。その結果、変異蛋白質は正常の構造を維持し、酵素としての活性を発現する。低分子化合物は経口投与後血流に入り、脳血管関門を通過して中枢神経系でシャペロン効果を示す

で速やかに分解、不活化される (つまり酵素活性が発現しない) ライソゾーム病患者が存在する。一般に酵素分子に親和性の高い基質類似化合物が大量に試験管内に存在すれば、酵素の競合的阻害剤となる。ところが、細胞内にこの化合物が低濃度に存在する場合には、図1のような機構により、ライソゾーム酵素の変異分子と安定な複合体を作り、ライソゾームに輸送される。ライソゾームでは酸性条件下で酵素分子が解離し、安定な触媒活性を示す。この種の化合物は、上記の分子シャペロンと本質的に同じはたらきをもつので、ケミカルシャペロン (chemical chaperone) とよぶことにする⁸⁾⁹⁾。

この細胞処理で酵素の基質処理能力がある閾値以上にすれば、病気の発症を遅らせることができる。β-ガラクトシダーゼ欠損症の場合、活性が正常の8~10%になれば、理論上発症年齢

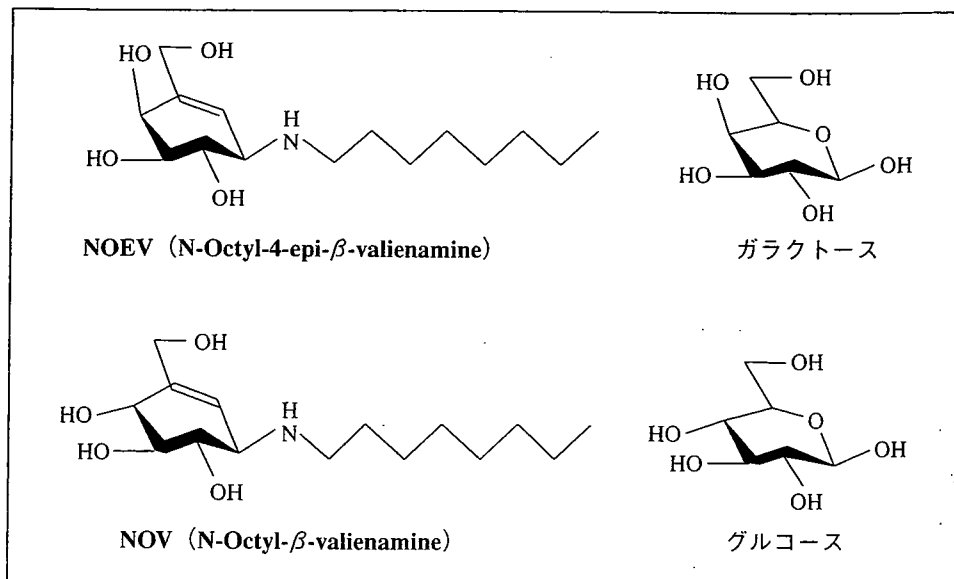


図2 NOEVとNOVの分子構造

NOEVはガラクトース、NOVはグルコース類似の化合物である。6環構造を持つがC1とC5を結ぶ分子は酸素ではなく炭素である。そしてC1の炭化水素側鎖は窒素分子を介して結合している

が無限大となる。

ケミカルシャペロン療法には、患者細胞が触媒活性をもつ変異蛋白質を発現する、という条件が必須である。同じ名前の病気のすべての患者に適用できるわけではない。しかし現在、治療のない病気の一部の患者でも、症状の軽減、予防が可能になれば、きわめて大きな学問的、社会的な意味をもつ。

新しいシャペロン化合物の検索とその成果

変異 α -ガラクトシダーゼA分子の詳細な分析データをもとに、Fabry病患者細胞にガラクトースを投与したところ、活性が著しく増加した¹⁰⁾。さらに、市販化合物、1-デオキシガラクトノジリマイシンがより低濃度で、この変異酵素にはたらくことがわかった⁷⁾。

次にG_{M1}-ガングリオシドーシスを調べた³⁾。1-デオキシガラクトノジリマイシンを試みたが、Fabry病と違い、 β -ガラクトシダーゼに対する効果は、 α -ガラクトシダーゼAの数十分の一であった¹¹⁾。次に新規合成化合物の酵素阻害ス

クリーニングを行った。その結果、NOEV (N-octyl-4-epi- β -valienamine) (図2) という化合物が β -ガラクトシダーゼ活性の強力な阻害薬であることがわかった⁸⁾。試験管内でのヒト β -ガラクトシダーゼに対する50%阻害濃度は0.2 μ Mであった。この化合物は、類似化合物NOV (N-octyl- β -valienamine) のエピマーとして開発された化合物である¹²⁾。NOVは β -グルコシダーゼ阻害薬であり、一部のGaucher病患者細胞で活性発現が誘導される¹³⁾。

シャペロン化合物NOEVの細胞内変異 β -ガラクトシダーゼに対する効果

患者由来の線維芽細胞培養液にNOEVを添加して4日間培養すると、酵素活性が著しく上昇する細胞株があった。若年型症例の変異酵素R201Cにもっとも有効であり、乳児型症例にも有効な変異があった。すべての症例をあわせて35%の細胞が陽性反応を示した¹⁴⁾。

すでに確立した β -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウト (KO) マウス^{15) 16)} の線維芽細胞に

表 3種の遺伝子型マウスにおける神経学的評価総スコアの月別変移

月齢	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
WT	0.4	0.4	0.5	0.4	0.2	0.6	1.1	0.6	1	
Tg			4	4	3.8	3.7	3.3	6	7.9	11
KO				14	16	17	18	25		

WT：野生型マウス、Tg：トランスジェニックマウス（軽症型 G_{M1} -ガングリオシドーシス）、KO：ノックアウトマウス（重症型 G_{M1} -ガングリオシドーシス）

R201Cを導入した。ガングリオシド負荷後この細胞は脂質が著しく蓄積したが、NOEVが蓄積を著しく減少させた⁸⁾。

遺伝子組み換えモデルマウスの作成とNOEV治療効果

動物個体実験のために、KOマウスにR201Cを導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した⁸⁾。正常な β -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入したマウスは正常化した。つまりマウスで遺伝子治療ができたということである。R201C変異を発現するTgマウスは、KOマウスよりも緩徐な臨床経過を示す。発現する酵素活性は野生型マウスの4%である⁸⁾。実験的には、Tgマウスが軽症型、KOマウスが重症型の G_{M1} -ガングリオシドーシスモデルとなった。

このTgマウスにNOEV水溶液を経口投与し、脳を含むすべての組織の酵素活性上昇、脳組織の脂質蓄積消失を確認した⁸⁾。脳内酵素活性は正常マウスの30%、脳内NOEV濃度は肝臓内濃度の30~45%であった（未発表データ）。この結果から、NOEVが腸管で吸収され、血液脳関門を通過して中枢神経系に到達し、酵素分子を安定化し、活性を発現させたとの結論を得た。

これまでのところ、この実験で体重、飲水量、血液生化学分析データに異常を認めていない。嗜好性や忌避はない。血液生化学、病理組織学的所見をさらに系統的に分析中である。

マウスの神経学的検査法の開発

NOEVの臨床効果を知るために、マウスの神経学的検査法を開発した。マウス脳の局在診断は困難であり、ヒト乳幼児の神経学的診察法をマウスに適用した。自発運動、個体各部位の姿勢肢位、原始反射、姿勢反射、平衡反応など、合計11項目をセットとした評価法を確立した（未発表データ）。それぞれの検査項目を4段階に評価し、最終的に合計点で総合評価を行った。

表に、3種の遺伝子型マウスにおける総スコアの時間的推移を示す。大まかな臨床観察では捉えられない初期変化を数字として表現することができた。加齢とともにWTマウス（野生型）、Tgマウス（軽症型）、KOマウス（重症型）の重症度の差が明確になった（投稿中）。さらに多数例についての時間経過観察、NOEV投与の臨床評価が進行中である。

他のライソゾーム病・他の遺伝病への応用

現在の主要な研究対象は β -ガラクトシダーゼ欠損症 (G_{M1} -ガングリオシドーシス) であるが、この新しいアプローチはすべてのライソゾーム病に適用できるはずである。NOEVは試験管内で、Krabbe病欠損酵素の強い競合的阻害薬でもある。しか細胞実験で、欠損酵素の活性還元効果がまだ確認できていない。 β -グルコシダーゼ欠損症 (Gaucher病) にも、NOVの有効性が培養細胞で確認された¹³⁾。

われわれはライソゾーム病という，細胞内分子病態解析がかなり進んだ疾患群を対象とした研究を行ってきた。ほかの遺伝病でも変異遺伝子の発現，変異蛋白質の分子修飾，活性発現部位への細胞内輸送，活性発現機構などが明らかになれば，ケミカルシャペロン療法が可能であるはずである。

今後，多くの種類の遺伝病についての研究が発展することを期待している。

謝 辞 この研究は文部科学省科学研究費(13680918, 14207106)ならびに厚生労働省科学研究費(H10-脳-006, H14-こころ-017, H17-こころ-019)の補助金を受けた。

NOEVとNOVの研究は，黒澤美枝子，岩崎博之，渡辺浩史，一ノ宮悟史(国際医療福祉大学)，松田潤一郎(医薬基盤研究所)，難波栄二，檜垣克美，大野耕策(鳥取大学)，滝本一広(国立感染症研究所)，伊藤雅之(国立精神・神経センター)，小川誠一郎(慶應義塾大学)，飯田真己，久保孝利(生化学工業株式会社)，田部美穂(株式会社エスアールエル)の諸氏のほか，多くの共同研究者のご協力により進行中である。ここに記して感謝の意をささげる。

●文 献

- 1) 鈴木義之：リソソーム病総論。最新内科学大系 11 井村裕夫，尾形悦郎，高久史磨，垂井清一郎・編，ミトコンドリア病・リソソーム病，中山書店，173-186, 1996
- 2) 鈴木義之：遺伝性ライソゾーム病。内科 87:737-742, 2001
- 3) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E: β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1} -Gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 3775-3809, 2001
- 4) 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

- 5) Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. J Inherit Metab Dis 29:471-476, 2006
- 6) 鈴木義之，一ノ宮悟史，丸山貴美子・他： 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。日本疾患モデル学会記録，印刷中，2006
- 7) Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y: Accelerating transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. Nat Med 5:112-115, 1999
- 8) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A et al.: Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} -gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA 100:15912-15917, 2003
- 9) 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，104-108, 2005
- 10) Okumiya T, Ishii S, Takenaka T et al.: Galactose stabilizes various missense mutants of α -galactosidase in Fabry disease. Biochem Biophys Res Commun 214:1219-1224, 1995
- 11) Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M et al.: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human β -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. Brain Dev 23:284-287, 2001
- 12) Ogawa S, Kobayashi Matsunaga Y, Suzuki Y: Chemical modification of the β -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- β -valienamine: synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-(β -D-galactopyransyl) derivatives. Bioorg Med Chem 10:1967-1972, 2002
- 13) Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y et al.: 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
- 14) Iwasaki H, Watanabe H, Iida M et al.: Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. Brain Dev, in press, 2006
- 15) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A et al.: Neurological manifestations of knockout mice with β -galactosidase deficiency. Brain Dev 19:19-20, 1997