

## 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 准教授)

### 研究要旨

ゴーシェ病(GD)はライソゾーム酵素である acid- $\beta$ -glucosidase(GCase)の欠損を病因とするライソゾーム病で、日本では神経症状を呈する病型の頻度が高いのが特徴である。本研究では、GDの神経病態の解明を目的に、GCaseの生体内での必須の活性化たんぱく質であるサポシンCをノックアウトすることにより、神経型GDの疾患モデルマウスの作成を試みた。マウスのスフィンゴ脂質活性化タンパク質(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ノックアウトマウス(Sap-C<sup>-/-</sup>)を得た。Sap-C<sup>-/-</sup>は肝臓の脂質分析で HFA-glucosylceramideの有意な蓄積を認めたが、正常に出生、発育し、生後3ヶ月までの観察では明瞭な神経症状を呈さないことが明らかになった。ヒトのサポシンC欠損症は遅発型の神経症状を呈することから、今後はより長期の観察を行うとともに、詳細な神経病理学的解析を進める予定である。

### A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は、生体膜に存在し、シグナルの認識・伝達にかかわる生体超分子構造“ミクロドメイン”を形成する重要な脂質成分である。スフィンゴ糖脂質は糖鎖部分、スフィンゴ塩基部分、脂肪酸部分から構成され、それぞれの構造の違いにより数千種類もの分子種が存在し、その組成は臓器別、細胞別に特異性がある。なかでも脳・神経系は、他の組織に比べ、多彩で豊富なスフィンゴ糖脂質を含み、各分子種の分布には、領域別・細胞別のみならず、発生段階別にも際立った特異性がある。これらの事実は、各スフィンゴ糖脂質が、生物機能の発現において、重要な役割を演じていることを示唆している。

我々は、スフィンゴ糖脂質の生物機能の中でも脳機能における役割に興味を持ち、スフィンゴ糖脂質代謝関連遺伝子のノックアウトマウスを作成し、研究を展開している。最近ではスフィンゴ脂質活性化たんぱく質(サポシンA、B、C、D)に着

目し、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作成に成功し、サポシンCノックアウトマウスの解析にも着手したところである(図1)。以下に本年度の研究の進展を報告する。

### B. 研究方法および研究結果

#### 1) サポシンCノックアウトマウス(神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウス)の作成

ゴーシェ病(GD)はライソゾーム酵素である acid- $\beta$ -glucosidase(GCase)の欠損を病因とするライソゾーム病で、日本では神経症状を呈する病型の頻度が高いのが特徴である。本研究では、GDの神経病態の解明を目的に、GCaseの生体内での必須の活性化たんぱく質であるサポシンCをノックアウトすることにより、神経型GDの疾患モデルマウスの作成を試みた(図1)。マウスのスフィンゴ脂質活性化タンパク質(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

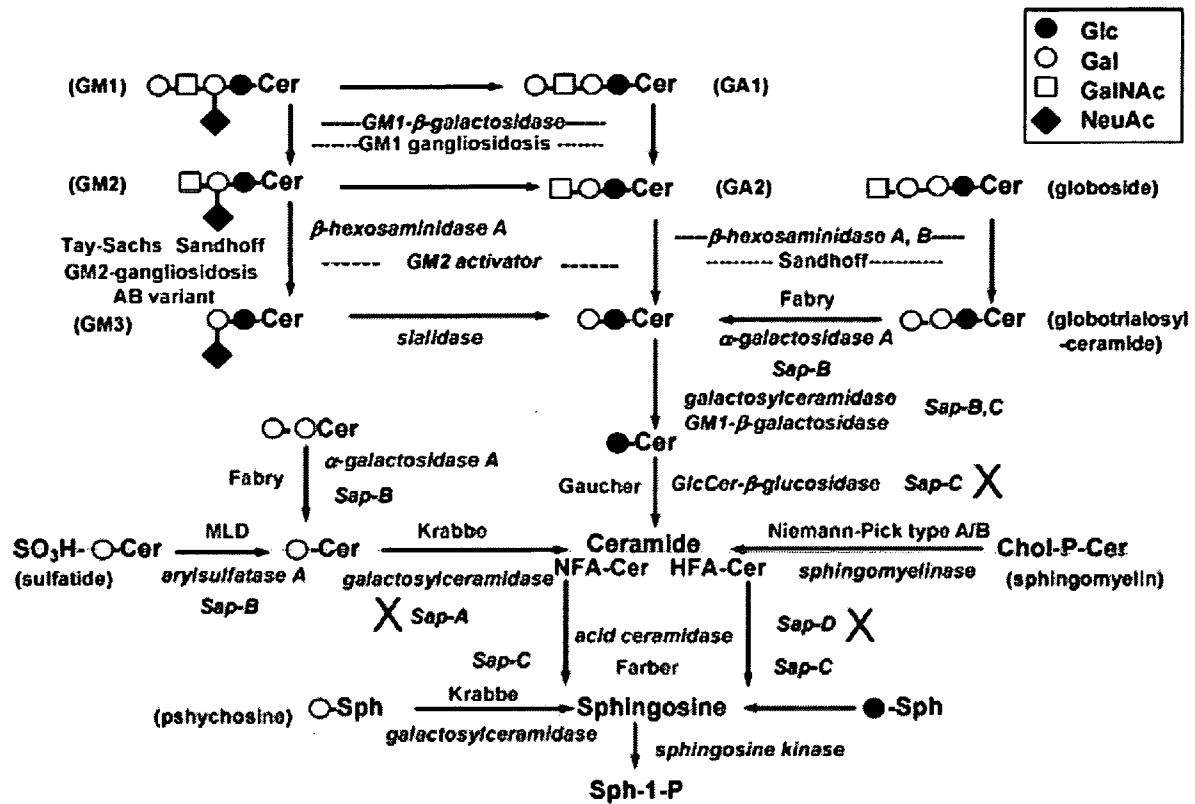


図 1 哺乳動物におけるスフィンゴ糖脂質の分解経路

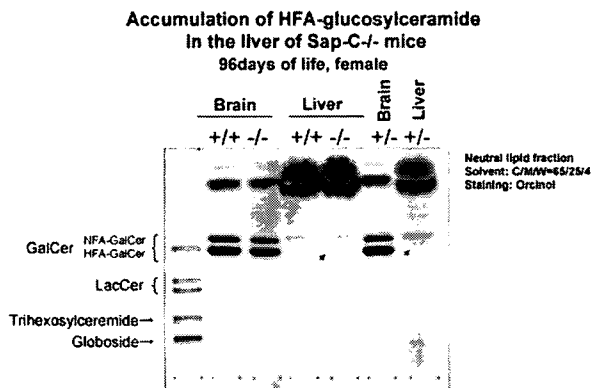


図 2

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 ノックアウトマウス (Sap-C<sup>-/-</sup>) を得た。Sap-C<sup>-/-</sup> は肝臓の脂質分析で HFA-glucosylceramide の有意な蓄積を認めたが(図 2)、正常に出生、発育し、生後 3 ヶ月までの観察では明瞭な神経症状を呈さないことが明らかになった。ヒトのサポシン C 欠損症は遅発型の神経症状を呈することから、今後はより長期の観察を行うとともに、詳細な神経病理学的解析を進める予定である。

## 2) 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死の病態解明

小脳プルキンエ細胞の脱落は、ヒト Niemann-Pick 病 A/B 型、C 型をはじめとする神経型ライソゾーム病において特徴的な神経病理所見のひとつである。しかしその病理メカニズムは十分に明らかではない。我々は、これまでの研究により、サポシン D は酸性セラミダーゼの活性化蛋白質であり、サポシン D ノックアウトマウス (Sap-D<sup>-/-</sup>) (図 1) で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、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、その結果多尿と運動失調を主症状とすることを明らかにした (2)。そこで我々は、Sap-D<sup>-/-</sup> における小脳プルキンエ細胞死の分子メカニズムを検討する目的で、プルキンエ細胞死の空間的・時間的パターンを検討した。その結果、小脳プルキンエ細胞の脱落は、左右対称性のゼブラ状に進行性すること、そのパターン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 (SPHK1) の発現パター

The pattern of cerebellar Purkinje cell death in saposin D knockout mouse was well associated with the selective expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1)

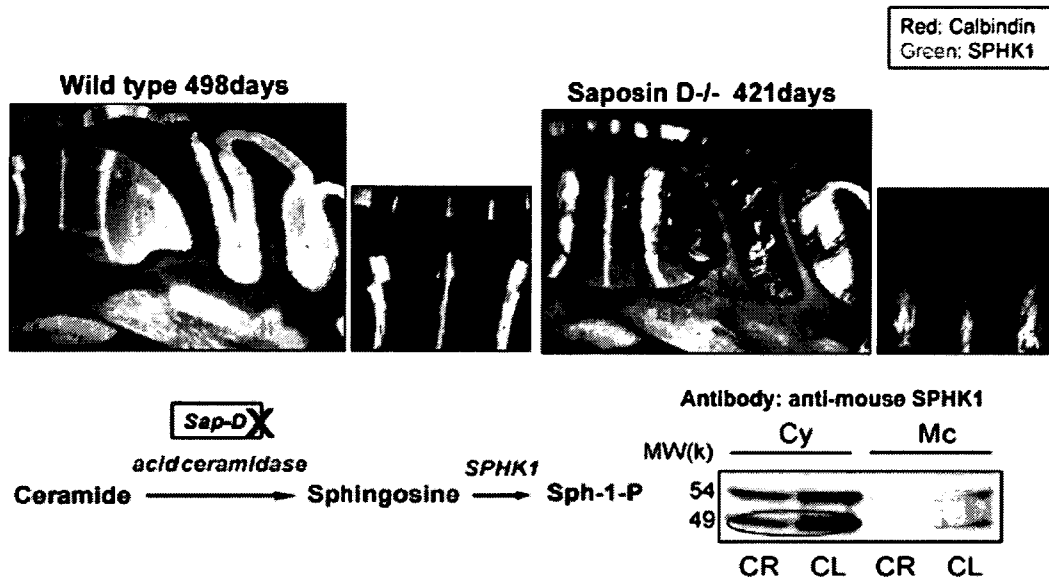


図 3

ンと逆相関することが明らかになった。SPHK1 はサポシン D の関与する酸性セラミダーゼの下流に位置し、スフィンゴシン (Sph) をスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) にリン酸化する酵素であることから、セラミド・スフィンゴシン・スフィンゴシン 1 リン酸代謝系のバランスの崩壊が神経細胞死と深くかかわっている可能性が示唆された。また、ウエスタンブロッティングにより SPHK1 は小脳の細胞質分画に多く存在することも示された (図 3)。

次に、我々は、同じく小脳プルキンエ細胞の脱落が特徴である Niemann-Pick 病 C 型モデルマウス (NPC1-/-) における小脳のプルキンエ細胞死のパターンを免疫組織学的手法を用いて Sap-D-/- と比較検討した。

NPC1-/-、Sap-D-/- および同胞の野生型マウスを還流固定し、その小脳組織を 50  $\mu$ m 厚にスライス後、抗 SPHK1 抗体および各種抗体 (抗 Calbindin 抗体、抗 Parvalbumin 抗体、抗 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 抗体) で多重免疫染色を行い観察した。NPC1-/- においては 6 週齢頃から小脳プルキンエ細胞の脱落を認め、それは冠状断において左右対称性のゼブラ状に進行した。

9 週齢において生存しているプルキンエ細胞は SPHK1 免疫陽性のものが多く、そのパターンは Sap-D-/- と類似していた。しかし、Sap-D-/- においては病末期 (16 月齢) においても SPHK1 陽性のプルキンエ細胞群は陰性群と明瞭な境界をもって生存していたのに対し、NPC1-/- では病末期には SPHK1 陽性のプルキンエ細胞群にも脱落が目立った (図 4, 5)。これらの結果から、NPC1-/- の小脳プルキンエ細胞の脱落パターンも Sap-D-/- と類似して SPHK1 の小脳における発現と逆相関する傾向にあることが明らかになった。すなわち、NPC1-/- においても Sap-D-/- と同様に SPHK1 の発現量の高いプルキンエ細胞は細胞死に抵抗性であった。しかし、その相関は Sap-D-/- に比べると弱く、NPC1-/- における神経細胞死にはセラミド・スフィンゴシン・スフィンゴシン 1 リン酸代謝系の異常以外の原因も推定された。

SPHK1 の小脳プルキンエ細胞におけるゼブラ状の発現パターンは非常に興味深い所見であり、今後は培養神経細胞を用いた実験系の構築により、セラミド代謝産物の小脳プルキンエ神経細胞回路における生理機能の検討を行う必要がある。

**Sphingosine kinase 1 (SPHK1)-positive Purkinje cells were resistant to cell death in both saposin D<sup>-/-</sup> and NPC1<sup>-/-</sup> mice**

Green: SPHK1  
Red: Calbindin  
White: GFAP  
Blue: DNA

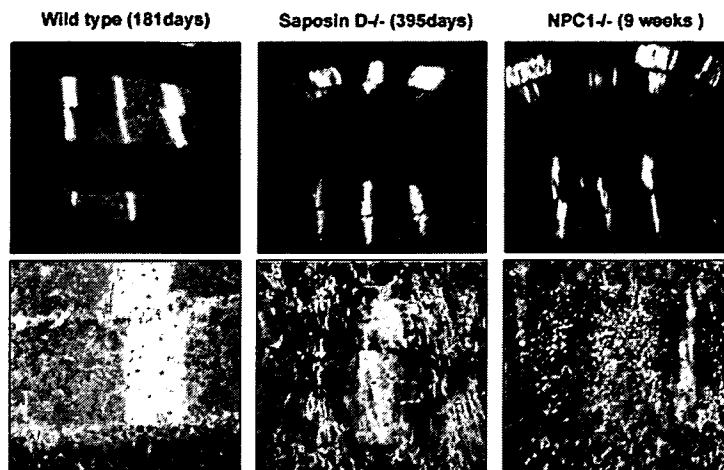


図 4

**Progressive symmetrical cerebellar Purkinje cell death in Saposin D<sup>-/-</sup> mice and NPC1<sup>-/-</sup> mice**

Anti-Calbindin antibody

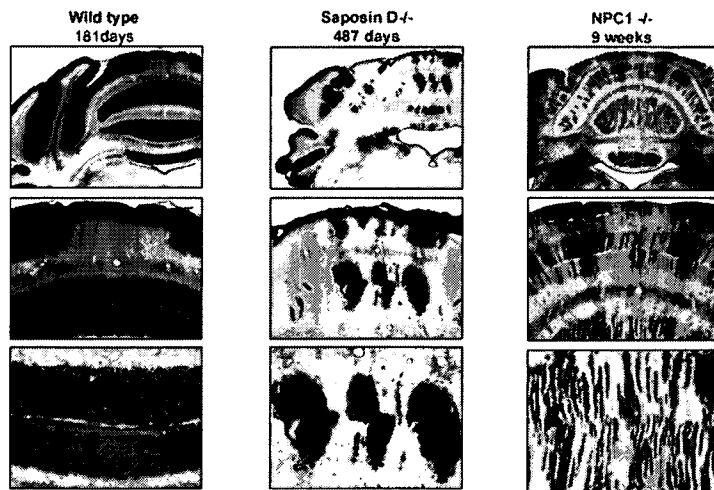


図 5

#### D. 考 察

これまでに、我々の研究グループでは、Krabbe 病のマウスモデルである *twitcher* 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をはじめ、galactosylceramide 合成酵素ノックアウトマウス、acid  $\beta$ -galactosidase ノックアウトマウス=GM1-gangliosidosis、prosaposin ノックアウトマウス等、主として、スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける遺伝的分解障害のデルマウスを用いて、スフィンゴ糖脂質の神経系における生理・病理機能にアプローチしてきた。

ライソゾーム病の多くは、小児期に神経系に障害をきたす難治性疾患で、近年、酵素補充療法、骨髄移植、臍帯血移植などが一部のライソゾーム病患者に臨床の場で実施され、その治療効果が報告されはじめています。これら治療法の進歩をうけて、早期発見・早期治療により患者の正常な発育発達を目指す観点から、ライソゾーム病の新生児マススクリーニングの導入も世界的に現実味を帯びてきている。しかしながら、ライソゾーム病の神経病変の病態生理は未知な部分が多く、神経病変の治療はいまだ困難で、患児の生命予後、QOL

の十分な改善が得られる治療法は限られているのが現状である。

我々の本年度の研究成果も示すように、スフィンゴ糖脂質の多様性が、各組織あるいは細胞における機能発現に重要であり、その質的、量的変化は生体において重篤かつ特徴的な病変を引き起こすことは明白である。しかしながらその多様性ゆえに細胞単位での分子メカニズムはいまだ不明な点が多い。神経病変に対する新たな治療戦略の開拓には細胞単位での分子メカニズムの解明が不可欠であり、今後は分解経路のみならず、合成経路の代謝関連遺伝子にも注目し、細胞レベルでの研究の展開が必要と考えている。

## E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.* 103:Supplement 1, 32-38, 2007.
- 2) 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  $\alpha$ -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 16 : 957-971, 2007.
- 3) Matsuda J, Suzuki K : Krabbe disease (Globoid cell leukodystrophy). In *Lysosomal Storage Disorders* edited by Barranger, J., Cabrera-Salazar, M.A., Springer, New York, pp. 269-283, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K :

Generation of the anti-mouse prosaposin specific antibody : Regional accumulation of prosaposin in the hippocampus of saposin D knockout mouse. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 23-27, 2007, San Diego, California, USA.

- 2) Yoneshige A, Matsuda J, Sasaki A, Suzuki K : Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 23-27, 2007, San Diego, California, USA.

- 3) 米重あづさ, 佐々木彩乃, 松田純子 : サポシン D 欠損マウスおよびニーマンピック病 C 型マウスの小脳プルキンエ細胞死とスフィンゴシンキナーゼ発現. 第 49 回日本先天代謝異常学会. 2007 年 11 月 15-17 日・山形市.

- 4) Yoneshige A, Sasaki A, Suzuki K, Matsuda J : Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. November 29-December 1, 2007, Tokyo, Japan.

- 5) 佐々木彩乃, 米重あづさ, 松田純子 : スフィンゴリピドーシスモデルマウス組織中のスフィンゴシン 1 リン酸およびスフィンゴ糖脂質リゾ体濃度の測定. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会. 2007 年 12 月 11-15 日・横浜市.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

# 分担研究報告書

## Ⅲ. ライソゾーム病の新規治療開発

: 遺伝子治療、細胞治療、シャペロン療法

## 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・准教授)

### 研究要旨

2007年10月にムコ多糖症Ⅱ型の酵素治療薬が承認され、全国的に酵素治療が行われるようになった。Ⅱ型患者について、酵素補充療法と以前より行われていた造血幹細胞移植との効果を比較した。肝臓や皮膚においては、酵素補充療法、造血幹細胞移植ともに良好な効果が得られていた。関節可動域、心機能についても造血幹細胞移植では目だった病状の進行は認めず、良好な効果を示していたが、酵素補充療法では改善は認められなかった。今回、酵素補充療法は病状の進行した患者に行われており、また、治療期間も短いため効果の比較はできないと思われる。今後、早期治療患者の長期の経過観察が必要である。

### 研究協力者

澤田 智(大学院生)

麻生和良(大学院生)

軽症型では6～9歳、重症型では2～6歳で移植を行っている。

### A. 研究目的

2007年10月にムコ多糖症Ⅱ型の酵素治療薬が承認され、全国的に保険診療がなされるようになった。我々の施設では、承認以前より4例のムコ多糖症Ⅱ型患者(全て軽症型)に対し、酵素補充療法を行い、最長の症例で4年になる。他方、我々は、造血幹細胞移植を行った6例のムコ多糖症Ⅱ型患者(軽症型2例、重症型4例)を長期にわたり経過観察している。これらの患者について、酵素補充療法と造血幹細胞移植との効果を比較した。

### B. 研究方法および対象

酵素補充療法を行っているムコ多糖症Ⅱ型軽症型の患者4例と造血幹細胞移植を施行したムコ多糖症Ⅱ型軽症型2例、重症型4例の患者について臨床経過を観察した。酵素補充療法を行っている患者のうち、3例は成人に達した後に治療を開始、1例は小児期に開始している。造血幹細胞移植は、

### C. 研究結果

各症例の効果をそれぞれ表1と2に示した。

### D. 結論と考察

造血幹細胞移植症例(表1)では、皮膚所見は全症例でほぼ正常、肩関節可動域でも日常生活にはほぼ差支えが無かった。症例1において、やや効果が乏しいのは、ドナーがヘテロ保因者である理由からかもしれない。症例5は、移植後の経過時間が短いので、まだ十分な効果が現れていないことが推測された。心機能においても、全症例で生活に支障はなかった。

酵素補充療法症例(表2)では、治療開始からの経過時間が短いため、効果判定は難しいが、全症例において皮膚所見の改善と肝腫大の軽減を認めた。肝腫大については、今後さらに徐々に改善していくと思われる。肩関節可動域については、全症例で著しい動きの制限がある。症例4において、4年間も治療を続け、また、低年齢であるにもか

表 1 造血幹細胞移植

症例	年齢	移植時年齢	移植後 経年	ドナー	肩関節 可動域*	皮膚	肝腫大	心機能		呼吸機能 (%FVC)	生活状況	脳萎縮
								NYHA	EF			
1(軽)	27	9歳1ヶ月	19年	同胞ヘテロ	II	正常	+	I	82		就労	-
2(軽)	16	6歳0ヶ月	10年	同胞正常	I	正常	-	I	77	62.4	普通学校	-
3(重)	13	5歳5ヶ月	8年	臍帯血	I	正常	±	I	72	35.1	養護学級	-
4(重)	11	2歳1ヶ月	9年	同胞正常	I	正常	-	I	82		養護学級	-
5(重)	7	6歳6ヶ月	0.5年	同胞正常	O~I	正常	+	I	79		養護学級	+
6(重)	7	3歳7ヶ月	4年	母	O~I	正常	-	I	-		養護学級	-

表 2 酵素補充療法

症例	年齢	開始時年齢	治療 期間	-	肩関節 可動域*	皮膚	肝腫大	心機能		呼吸機能 (%FVC)	生活状況	脳萎縮
								NYHA	EF			
1(軽)	9	5歳	4年	-	III	正常	+	I	74	77.7	普通学校	-
2(軽)	28	27歳	1年	-	III	正常	+	III	12	40.0	自宅療養	-
3(軽)	24	23歳	9ヶ月	-	III	正常	+	III	84	19.1	自宅療養	-
4(軽)	54	53歳	6ヶ月	-	III	正常	+	III	60	56.0	自宅療養	-

(軽)：軽症型、(重)：重症型

\*肩関節可動域：O：180° ほぼ垂直挙上、I：150° 前後、II：120° 前後、III：90° 前後

かわらず改善が見られないことから、他の症例においても、今後の治療効果はあまり期待できないと思われる。心機能は、低年齢の症例 1 以外は良い状態ではない。症例 2 において治療開始後のこの 1 年間でも、徐々に状態が悪化していることから、ある程度進行した心病変には効果がないものと推測される。

造血幹細胞移植は小児期に行われており、これに対し酵素補充療法は成人期に開始した症例が主であることから、両者の効果を比較することはできない。しかし、肝臓と皮膚については、両者の

効果に大きな違いはないものと思われる。今後、小児期より酵素補充療法を開始した症例について長期の臨床データの蓄積が重要である。

## E. 研究発表

(学会発表)

- 1) ムコ多糖症の酵素補充療法：I 型 5 例、II 型 4 例の使用経験。澤田智、田中あけみ、麻生和良、他。第 111 回日本小児科学会：2008 年 4 月 25-27 日(東京)



## ムコ多糖症 I 型患者由来の細胞に対するラロニダーゼの効果に関する研究

分担研究者：櫻庭 均(明治薬科大学分析化学教室教授)

### 研究要旨

ムコ多糖症 I 型(MPS I)は、リソソーム性加水分解酵素である $\alpha$ -L-イズロニダーゼが欠損することによって起こる常染色体劣性遺伝病である。最近、その酵素補充療法薬として組み換えヒト $\alpha$ -L-イズロニダーゼ(ラロニダーゼ)が承認を受けた。このラロニダーゼの酵素学的パラメーターを決定し、日本人 MPS I 患者の培養線維芽細胞に対する投与効果を生化学的および病理学的に解析した。その結果、ラロニダーゼは、マンノース 6-リン酸受容体を介して MPS I 患者の培養線維芽細胞に取り込まれ、蓄積していた基質を分解し、基質蓄積に基づく封入体の数を減少させることが示された。さらに、マウス由来の骨芽細胞と線維芽細胞におけるラロニダーゼの取り込み効率を比較した。その結果、マウスの骨芽細胞では、線維芽細胞に比べてラロニダーゼの取り込み効率が低いことが明らかになった。

### A. 研究目的

日本人のムコ多糖症 I 型(MPS I)患者由来の培養線維芽細胞を試料として、組み換えヒト $\alpha$ -L-イズロニダーゼ(ラロニダーゼ)の細胞内取り込みと生化学的および病理学的効果を調べると共に、骨芽細胞および線維芽細胞へのラロニダーゼの取り込みを比較する目的で、マウス由来の骨芽細胞および線維芽細胞へのラロニダーゼ取り込み機構の解明と取り込み効率の決定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 精製酵素

ラロニダーゼ(IDUA)は Genzyme Japan (Tokyo)より購入した。

#### 2. 細胞培養

日本人 MPS I 患者(F17)および対照健常者(F592)の生検皮膚組織から培養線維芽細胞株を樹立した。これらの細胞は、10%ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた Ham's F-10 培地

(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、5%二酸化炭素の環境下において、37°Cで培養した。マウス線維芽細胞は、20%ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた Ham's F-10 培地を用いて、5%二酸化炭素の環境下において、37°Cで培養した。また、マウス骨芽細胞(MC3T3-E1)は 10%ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた  $\alpha$ -MEM 培地(Nacalaitesque, Kyoto)を用いて培養した。

#### 3. 酵素活性測定

IDUA の酵素活性測定は、4-メチルウンベリフェロン(4-methylumbelliferone, 4-MU と略記)誘導体である 4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -L-イズロニド(4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduronide, 4-MU- $\alpha$ -Idu と略記)を基質として、測定を行った。

細胞内の酵素活性の測定においては、細胞ホモジネート 10  $\mu$  L に対して、1.0mM 4-MU- $\alpha$ -Idu、12mM D-saccharic acid 1,4-lactone を含む 0.1M ギ酸緩衝液(pH 3.5) 40  $\mu$  L を添加して混合した後、37°Cで 30 分間反応させた。反応後に 0.2M グリ

シン緩衝液 (pH 10.7) 950  $\mu$ L を添加して該当反応を停止させた。

ラロニダーゼの酵素学的パラメーターの決定においては、酸性リン酸緩衝生理食塩水 (pH 5.0) で希釈した精製酵素 (0.11  $\mu$ g/ml) 20  $\mu$ L に対して、0.020, 0.040, 0.20, 0.40 および 2.0mM の 4-MU- $\alpha$ -Idu を含むギ酸緩衝液 (pH 3.5) 20  $\mu$ L を添加して混合した後、37°C で 10 分間反応させた。反応後に 0.2M グリシン緩衝液 960  $\mu$ L を添加して該当反応を停止させた。精製酵素の酵素学的パラメーターは、Lineweaver-Burk プロットを作製して、決定した。

#### 4. 蛋白質定量

蛋白質定量は、牛血清アルブミン (Albumin standard, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) の濃度を基準として、Micro BCA 法 (Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) で行った。

#### 5. 培養細胞へのラロニダーゼの取り込みの解析

細胞を培養して、コンフルエントになった後に、0, 0.10, 1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼおよび 5.0mM のマンノース 6-リン酸 (M6P と略記) を加えたラロニダーゼ (ヒト線維芽細胞では 1.0  $\mu$ g/ml, マウス線維芽細胞とマウス骨芽細胞では 5.0  $\mu$ g/ml) を含む培地を用いて 2 日間培養を行った。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で細胞を 3 回洗浄した後に、細胞を機械的に採取し、MilliQ 水に懸濁した。さらに、超音波処理を行い、細胞ホモジェネートを調整し、これを分析試料として、細胞内酵素活性を測定した。

#### 6. 電子顕微鏡観察による培養線維芽細胞へのラロニダーゼの取り込み効果の解析

MPS I 型患者由来の培養線維芽細胞 (F17) を、Lab-Tek slip (Miles Laboratories, Naperville, IL) を用いて 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼを含む、または含まない培地中で 2 日間培養した。その後、

細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収した。この細胞を冷却した 2.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドとを含む 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で 30 分間固定した。これを試料として、電子顕微鏡 (H-7100, Hitachi, Tokyo) で病理学的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト由来の培養線維芽細胞の使用は、明治薬科大学倫理委員会の許可を得て行い、匿名化の下に行った。

### C. 研究結果

#### 1. ラロニダーゼの特異的酵素活性および酵素学的パラメーターの決定

ラロニダーゼの特異的酵素活性は  $7.4 \pm 0.4$  mmol/h/mg [ $n=3$ ] (平均  $\pm$  標準偏差 [試料数]) であった。

また、酵素学的パラメーターは Lineweaver-Burk プロットにより計算した。 $K_M$  は 0.22mM、最大酵素活性は 7.9 mmol/h/mg であった。

#### 2. 酵素活性測定による、ラロニダーゼの取り込みの解析

0.10, 1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼおよび 5.0mM のマンノース 6 リン酸を含む 1.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼが添加された培地で、健常者由来の培養線維芽細胞 (F592) と MPS I 患者由来の培養線維芽細胞 (F17) を 2 日間培養した後に、細胞内の IDUA の酵素活性を測定した。健常者、MPS I 患者共に、培地中のラロニダーゼの濃度増加に伴い、細胞内酵素活性は増加した。また、1.0  $\mu$ g/ml 以上の濃度では、ほぼ飽和状態に達した。そして、5.0mM のマンノース 6-リン酸を含む培地で培養した場合には、ほとんど酵素は取り込まれなかった。

#### 3. 電子顕微鏡観察によるラロニダーゼの取り込み効果の解析

ラロニダーゼを添加していない MPS I 患者由

来の細胞線維芽細胞(F17)内には、基質蓄積に基づく封入体が多数存在していた。しかし、5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼを含む培地で 2 日間培養した MPS I 患者由来の線維芽細胞では封入体の数が著明に減少していた。

#### 4. 酵素活性測定によるマウス線維芽細胞とマウス骨芽細胞へのラロニダーゼの取り込みの解析

0.10, 1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼおよび 5.0mM のマンノース 6-リン酸を含む 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼが添加された培地で 2 日間培養したマウス線維芽細胞とマウス骨芽細胞の酵素活性測定を行った。

両者共に、培地中のラロニダーゼ濃度増加に伴い、細胞内酵素活性も増加していた。1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml では、ほぼ飽和状態に達した。また、0.10  $\mu$ g/ml のラロニダーゼ添加ではマウス線維芽細胞とマウス骨芽細胞で取り込みに差はないが、1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml ではマウス骨芽細胞に比べ、マウス線維芽細胞の方が約 2 倍の取り込みがみられた。

マウス線維芽細胞とマウス骨芽細胞の両方において、5.0mM マンノース 6-リン酸を含む培地で培養した場合、添加しない場合の 10 分の 1 程度に活性が抑えられた。

#### D. 考 察

今回は、MPS I 患者の培養線維芽細胞を用いて、ラロニダーゼの生化学的性質とその取り込み効果を解析した。

日本人 MPS I 患者由来の培養線維芽細胞への酵素取り込みは、マンノース 6-リン酸により阻害されたことから、マンノース 6-リン酸受容体を介して行われると考えられる。MPS I 患者の培養線維芽細胞に蓄積したグリコサミノグリカンに基づくと考えられる封入体の数が、ラロニダーゼを添加することによって大幅に減少することが、電子顕微鏡観察によって確認された。以上の結果より、ラロニダーゼはリソソームに輸送され基質を分解すると考えられる。

MPS I は骨や軟骨組織の異常が特徴であるが、イヌへの酵素投与実験では軟骨への取り込みがほとんど観察されていない。今回、骨組織由来の培養細胞である培養骨芽細胞を試料として、培養線維芽細胞への取り込みと比較した。1.0 および 5.0  $\mu$ g/ml のラロニダーゼ添加では、骨芽細胞は線維芽細胞の約半分しかラロニダーゼを取り込まなかった。また、両者ともマンノース 6-リン酸による取り込みの阻害がかかっていることから、ラロニダーゼはマンノース 6-リン酸レセプターを介して細胞内に取り込まれると考えられる。これらのことから、骨芽細胞と線維芽細胞における取り込みの差は、骨芽細胞の方が線維芽細胞に比べて、細胞表面にあるマンノース 6-リン酸レセプターの数が少ないためであると推測された。

#### E. 結 論

今回の結果から、ラロニダーゼは MPS I に有効であると考えられた。今後、酵素に結合しているマンノース 6-リン酸の数を増やすことにより、骨組織由来の細胞に対しても取り込み効率がよい新規酵素を開発する必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 櫻庭 均, 月村孝宏, 田島陽一, 他: ムコ多糖症 I 型患者由来の培養線維芽細胞に対するラロニダーゼの取り込み効果. 第 49 回日本先天代謝異常学会報会. 山形, 2007.11. 15-17.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

β-ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異解析(6人)を行い、3種類の新規変異を同定した。そのうちG190D変異はケミカルシャペロンNOEV(N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン)により酵素活性還元効果を示した。ヒト・マウス線維芽細胞を用いたDNAマイクロアレイ解析を行い、NOEVによる遺伝子発現変動の解析を行った。

### A. 研究目的

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス遺伝子変異解析を行い、新規変異についてNOEVのシャペロン効果を検討する。マイクロアレイ解析を用い、NOEVのシャペロン効果による遺伝子発現変動の解析を行う。

### B. 研究方法

#### 1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とNOEV効果の検討

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者末梢血または培養皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、WAVE fragment解析(Transgenomic社)を行った。変異が検出されたエクソンについてシーケンス解析を行い遺伝子変異を同定した。NOEVの酵素活性還元効果の検討は、培養皮膚線維芽細胞培養液に0.2、2μMのNOEVを4日間添加した。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。

#### 2. マイクロアレイ発現解析

培養ヒト正常およびG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス(R201C/R201C)線維芽細胞、マウス正常線維芽細胞株GP8およびヒトR201C変異β-ガラクトシダーゼ発現細胞株R201C、またそれぞれ0.2μM NOEVを含む培養液で4日間培養した細胞から

RNAを抽出した。マイクロアレイはイルミナSentrix human(or mouse)-6 expression beadchipを用い、発現結果の解析はGenespring GXとIngenuity Pathway Analysisソフトウェアを用いた。

### C. 研究結果

6人のG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者について遺伝子変異解析を行い、それぞれR59H/L608P, L146del/?, R59H/R59H, G190D/G190D, W92ter/W92ter, Ins20bp; ex1/2 / Ins2020bp : ex1/2変異を同定し、そのうちL146del、G190D、W92terは新規変異であった。また、4人のG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞(R59H/R59H, W92ter/W92ter, G190D/G190D, G438E/G438E)についてNOEV効果の検討を行った結果、G190D/G190Dで3-4倍の酵素活性還元効果を認め、他の変異はNOEV効果を認めなかった。

マイクロアレイ解析の結果は、正常に比べR201Cで有意な発現変動を示し、かつNOEVにより正常化した遺伝子が、ヒト線維芽細胞で6,684遺伝子、マウス線維芽細胞で4,889遺伝子見つかった。また、R201Cで有意な発現変動を示し、NOEV添加後も発現が変動したままの遺伝子を、ヒト線維芽細胞で7,283遺伝子、マウス線維芽細胞で563遺伝子同定した。

## D. 考 察

今回新たに4検体の線維芽細胞についてNOEV効果の検討を行った結果、新規変異 G190D に対し NOEV の有為な酵素活性還元効果を認めた。これまで、ヒト線維芽細胞およびマウス細胞発現系により44の変異型に対しNOEV効果の検討を行った結果、G190D を含め9種類の変異型で効果が認められている。今後、他の変異型についても引き続き検討を行う。

ヒト、マウス線維芽細胞を用いたマイクロアレイ解析によりNOEV添加により発現が変動した遺伝子群には、シグナル伝達、細胞接着、細胞死、細胞内輸送に関連した遺伝子が含まれていた。今後はそれぞれの遺伝子機能および機能パスウェイについて詳細な解析を行うと共に、蛋白質発現について検討を行うことで、NOEVのシャペロン効果の分子機構についての基礎的な知見を得たいと考えている。

## E. 結 論

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析により3種類の新規変異を同定し、NOEV効果のあるG190D変異を同定した。NOEVのシャペロン効果の分子機構の解明についてマイクロアレイによる網羅的な発現解析を行った。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO. Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Ann Neurol* 62, 671-675, 2007
- 2) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine

GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 482-486, 2008

### 2. 学会発表

- 1) 難波栄二, 檜垣克美: DNA マイクロアレイを用いたGM1-ガングリオシドーシス神経変性機構の解明. 第49回日本小児神経学総会, 大阪, 2007.7
- 2) 澤田 智, 田中あけみ, 瀬戸俊之, 松田潤一郎, 難波栄二, 山野恒一: ライソゾーム病の脳内病変に対する細胞治療. 第49回日本小児神経学総会, 大阪, 2007.7
- 3) 高村歩美, 檜垣克美, 松田潤一郎, 飯田真巳, 鈴木義之, 難波栄二:  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の神経変性における Trk 受容体の機能異常. 第30回神経科学大会, 横浜, 2007.9
- 4) 檜垣克美, 高村歩美, 梶巻賢哉, 飯田真巳, 鈴木義之, 難波栄二: GM1-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のマウスモデル細胞を用いた解析. 第49回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
- 5) 澤田 智, 田中あけみ, 瀬戸俊之, 前田光代, 高村歩美, 檜垣克美, 難波栄二, 松田潤一郎, 山口悦子, 山野恒一: 細胞移植によるライソゾーム病脳病変の長期治療の可能性についての検討. 第49回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
- 6) 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真巳, 檜垣克美, 鈴木義之: GM1-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効果. 第49回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
- 7) Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E: Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk receptors in the neurons of GM1-gangliosidosis mouse brain. *International Symposium of Lysosomal Storage Diseases*. Tokyo, 2007. 12

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## ライソゾーム病の脳障害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：一ノ宮悟史(国際医療福祉大学大学院)

### 研究要旨

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的検査法を開発し、病型、重症度、月齢との相関を解析した。脳障害の進行とともに評価スコア値が上昇した。シャペロン化合物 NOEV 投与により、神経学的進行が抑制・停止することが分かった。

### A. 研究目的

疾患モデル動物に対するケミカルシャペロン療法実験を行い、形態・化学・臨床的側面から評価を試みた。G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスに対する NOEV(N-octyl-4-epi-β-valienamine)の有効性を確認した。

### B. 研究方法

ケミカルシャペロン治療のひとつの試みとして、軽症型 G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス(トランスジェニック R201C 変異)モデルマウスに NOEV(1mM 水溶液)をアドリブ経口投与し、その臨床経過を、NOEV 組織濃度、β-ガラクトシダーゼ活性、G<sub>M1</sub>蓄積量、神経学的重症度などを指標として総合的に評価した。

### C. 研究結果

生後 2 ヶ月までは疾患モデルマウスの神経学的スコアは正常であったが、以後徐々に異常所見が強くなった。生後 2 ヶ月から NOEV 投与を開始したところ、最初の 2 ヶ月間は野生型マウスとの間に症状の差を見なかったが、生後 5 ヶ月からは有意の進行停止が見られた。ところが生後 5 ヶ月から治療を開始したマウスはその後数ヶ月間、明らかな効果がなく、生後 11 ヶ月に初めて神経学的スコアの差が出現した。

数ヶ月治療後の病理所見は改善し、脳組織の酵素活性は正常の 30-40%に上昇、そして G<sub>M1</sub>蓄積量は未治療マウスと比較し著しく低かった。NOEV の組織内代謝動態は早く、投与開始 3-7 日には飽和量に達し、投与中止後 3-7 日以内に測定感度以下のレベルまで減少した。

投与実験中、特異的な毒性効果は見られなかった。

### D. 考察

本年度の研究により、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスへのシャペロン効果が確認された。形態・化学・臨床などの多面的な評価により、代謝動態の矯正、神経学的進行の停滞などが明らかになった。しかし今回の実験では、進行の完全な阻止はできておらず、今後、投与量、投与方法などの検討が必要であると思われた。

### E. 結論

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスに対する臨床効果がマウスにおいて確認された。更に他の動物種について毒性の有無を検討し、最終的にヒト患者の治療実験を始めたい。

### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y : Neurological assessment of GM1-gangliosidosis model mice. *Brain Dev* 29 : 210-216, 2007.
  - 2) Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y : Development and medical application of unsaturated carbamoylamine glycosidase inhibitors. *Mini-Rev Med Chem* 7 : 679-691, 2007.
  - 3) Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Kaneski C, Brady RO, Suzuki Y : Enzyme enhancement activity of *N*-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1772 : 587-596, 2007
  - 4) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Ann Neurol* 62 : 671-675, 2007 (Online, November 9, 2007).
  - 5) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Cell Molec Life Sci* Online, January 18, 2008.
  - 6) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka Susumu, Ninomiya, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
- ### 2. 学会発表
- 1) Suzuki Y : Molecular approaches to neurogenetic diseases : GM1-gangliosidosis as a model target disease. International

Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt, January 25-26, 2007.

- 2) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy : molecular mechanism and possible clinical application. International Symposium of Child Neurology, Ljubljana, Slovenia, June 1, 2007.
- 3) García-Moreno MI, Aguilar M, Ortiz Mellet C, Iwasaki H, Ohno K, Suzuki Y, García Fernández JM : sp<sup>2</sup>-Azasugar glycosidase inhibitors as chemical chaperons for the treatment of lysosomal storage disorders. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Saint Petersburg, Russia, August 27-31, 2007.
- 4) Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E : Dysregulation of Trk receptor signaling in  $\beta$ -galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会, 横浜, 2007.9.10-12.
- 5) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Matsuda J, Iida M, Kubo T, Ogawa S : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. 7th European Paediatric Neurology Society Congress, Kusadasi, Turkey ; September 26-29, 2007
- 6) 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真己, 檜垣克美, 鈴木義之 : GM1-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効果. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.10.15-17.
- 7) 檜垣克美, 高村歩美, 梶卷賢哉, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-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のマウスモデル細胞を用いた解析, 山形, 2007.10.15-17.
- 8) Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E : Lysosomal storage and enhanced

signaling of Trk receptors in the neurons of GM<sub>1</sub>-gangliosidosis mouse brain. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Maihama, Japan, November 29-December 1, 2007.

- 9) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy : a new molecular therapeutic approach to

lysosomal diseases. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases., Maihama, Japan, November 29-December 1, 2007

H. 知的財産権の出願・登録

なし



## 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(日本医科大学教授)

### 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。AAV1-GFP ベクターのマウス髄腔内注入により脳全域に渡る広範囲な遺伝子導入が可能であった。更に、脊髄神経節及び脊髄後索での高率な遺伝子導入を認めた。MLD モデルマウスに対し AAV1-ASA ベクターを注入する実験では ASA 活性の広範囲な発現とスルファチドの減少を確認した。AAV ベクターの髄腔内注射は脳実質内注射に比較して非侵襲的であり臨床応用可能な方法であると考えられた。

### A. 研究目的

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、AAV タイプ 1 ベクターを直接脳内投与することで ASA ノックアウトマウス (MLD マウス) のスルファチドの減少や運動機能の回復を認めているが、臨床応用を行うためにはより侵襲性の低い方法でしかも数百倍の大きさのヒト脳への遺伝子導入が必要である。本実験ではウイルスベクターの髄腔内投与の可能性を検討した。

### B. 研究方法

AAV1-GFP、AAV1-ASA ベクターを、C57BL6 あるいは ASA ノックアウトマウスの後頭蓋窩からの髄腔内投与を行ない 8 週後に解析した。ASA 活性は ELISA 法で、スルファチドの定量は TLC 法で行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

GFP の発現は脳室上衣細胞、脈絡叢、嗅球、視床下部、脳幹部、小脳プルキンエ細胞、脊髄実質、脊髄神経節など脳全域で認められた。脳組織を 13 領域に分割し ELISA 法にて ASA 活性を、TLC 法にてスルファチドの測定したところいずれの領域でも酵素活性の上昇とスルファチドの減少を認めた。

### D. 考察

様々なアプローチによる遺伝性神経変性疾患の治療を目指している。脳血液関門 (BBB) を越えて脳組織を治療する方法としてマウスの脳内に直接 AAV ベクターを注入することにより広い範囲の脳組織を、生化学的、組織学的に治療できることを示してきた。しかし、手法が侵襲的であり、しかもヒトの脳はマウスの脳と比べ数百倍も容積があることを考えると、直接注入法には限界があることが想定される。これらの問題を克服するため

ベクターの改良や、投与方法の工夫を進めている。

脳脊髄液中への薬剤の投与は臨床で一般に行われている手技であり、侵襲性も低い。又、大量持続投与も可能であり、脳組織全体への遺伝子導入法としては優れている。今後、サルを含む大型動物での前臨床試験も行い髄注による神経変性疾患治療の可能性を検討していきたい。

今回、新たに AAV1 ベクターの髄注投与により脊髄後根神経節及び脊髄後索に極めて高率に遺伝子が導入されることが明らかになった。これは脊髄後根神経節の解剖学的位置とベクターの親和性が影響していると考えられる。脊髄後根神経節に存在する感覚ニューロンは痛みの重要な経路であり、AAV ベクターの髄注による痛みの遺伝子治療という新しい分野に発展する可能性がある。

## E. 結 論

AAV1 ベクターの髄腔内注入により脊髄を含む脳全体への遺伝子導入が可能であった。

## F. 健康危険情報

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kurai, T., Hisayasu, S., Kitagawa, R., Migita, M., Suzuki, H., Hirai, Y., Shimada, T. (2007) 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
- 2) Yasuda, T., Miyachi, S., Kitagawa, R., Wada, K., Nihira, T., Ren, Y.-R., Hirai, Y., Ageyama, Y., Terao, K., Shimada, T., Takada, M., Mizuno, Y., Mochiduki, H., (2007) Neuronal specificity of  $\alpha$ -synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience* 144 : 743-745
- 3) Kitagawa, R., Miyachi, S., Hanawa, H.,

Takada, M., Shimada, T., (2007) Differential Characteristics of HIV-based vs. SIV-based lentiviral vector systems : gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neuroscience Res.* 57 : 550-558

- 4) Miyake, K., Miyake, N., Shimada, T., (2007) Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. *J. Biotech.* 129 : 532-8
- 5) Watanabe, A., Yamamasu, S., Shinagawa, T., Suzuki, Y., Miyake, H., Takeshita, T., Orimo, H., Shimada, T. (2007) Prenatal genetic diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. *J Nippon Med Sch.* 74 : 65-9
- 6) Watanabe A., Kosho, T., Wada, T., Sakai, N., Fujimoto, M., Fukushima, Y., Shimada, T. (2007) Genetic aspects of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome (vEDS, EDSIV) in Japan. *Circ J.* 71 : 261-5.
- 7) Igarashi, T., Miyake, K., Hayakawa, J., Kawabata, K., Ishizaki, M., Takahashi, H., Shimada, T. (2007) Apoptotic cell death and regeneration in the newborn retina after irradiation prior to bone marrow transplantation. *Curr Eye Res.* 32 : 543-53.
- 8) Tahara, I., Miyake, K., Hanawa, H., Kurai, T., Hirai, Y., Ishizaki, M., Uchida, E., Tajiri, T., Shimada, T. (2007) Systemic Cancer Gene Therapy Using Adeno-associated Virus Type 1 Vector Expressing MDA-7/IL24. *Mol Ther.* 15 : 1805-1811
- 9) Miyake, K., Inokuchi, K., Miyake, N., Dan, K., Shimada, T. (2007) HIV vector mediated targeted suicide gene therapy for adult T-cell leukemia. *Gene Ther.* 14 : 1662-1667
- 10) Kato, s., Inoue, K., Kobayashi, K., Yasoshima, Y., Miyachi, S., Inoue, S., Hanawa, H.,

- Shimada, T., Takada, M., Kobayashi, K. (2007) Efficient Gene Transfer via Retrograde Transport in Rodent and Primate Brains by an HIV-1-Based Vector Pseudotyped with Rabies Virus Glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 18 : 1141-1151
- 11) Kawakami, T., Kanazawa, H., Satoh, T., Ieda, M., Ieda, Y., Kimura, K., Mochizuki, M., Shimada, T., Yokoyama, C., Ogawa, S., Tanabe, T., Fukuda, K. (2007) AAV-PGIS gene transfer improves hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 : 656-661
- 12) Ogawa, R., Fujimura, J., Hanawa, H., Hirai, Y., Kurai, T., Shimada, T. Comparison of the gene transfer efficiency of mesenchymal stem cells harvested from murine fat and bone marrow. *Adipocytes* : in press, 2007.
2. 学会発表
- 1) Orimo, H., Goseki-Sone, M., Hosoi, T., Shimada, T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and mineralization : Effects of inhibitors and application to the functional assay of mutations in short-term cultures of human osteoblastic cell lines. 5<sup>th</sup> International Alkaline Phosphatase Symposium (Huningue, France) May 2007
- 2) Miyake, N., Miyake, K., Karlsson, S., Shimada, T. Therapeutic Effects of Bone Marrow Transplantation for Metachromatic Leukodystrophy Using HoxB4 Over-Expressing Cells. American Society of Gene Therapy (Seattle) May 2007
- 3) Ogawa, K., Hirai, Y., Ishizaki, M., Fukunaga, Y., Shimada, T. AAV1 mediated gene therapy of neonatal Fabry mice. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (Seattle) May 2007
- 4) Hanawa, H., Shimada, T. Development of leukemia/lymphoma after the long latency period in an X-SCID mouse model treated by retroviral gene therapy. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (Seattle), may 2007
- 5) Miyake, N., Miyake, K., Karlsson, S., Shimada, T. Improvement of neurological disorders of metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation using HoxB4 over-expressing cells. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Hamburg) Sep 2007
- 6) Miyake, N., Miyake, K., Karlsson, S., Shimada, T. BMT based therapy for metachromatic leukodystrophy : The effect of HoxB4 over-expression. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases (Maihama) Nov 2007
- 7) Miyake, K., Isotani, M., Miyake, N., Shimada, T. : Adeno-associated virus (AAV) type 8 mediated systemic antiangiogenic gene therapy for murine model of multiple myeloma. Japan Society of Gene Therapy (Nagoya) Jun 2007
- 8) Miyake, K., Miyake, N., Hirai, Y., Shimada, T. : Direct comparison of adeno-associated virus serotype for systemic delivery by monitoring of in vivo quantitative noninvasive imaging. Japan Society of Gene Therapy (Nagoya) Jun 2007
- 9) Miyake, N., Miyake, K., Karlsson, S., Shimada, T. : Therapeutic effects of bone marrow transplantation for metachromatic leukodystrophy using HoxB4 over-expressing cells. Japan Society of Gene Therapy (Nagoya) Jun 2007
- 10) Hanawa, H., Shimada, T. : Development of leukemia/lymphoma after the long latency period in an X-SCID mouse model treated

- by retroviral gene therapy. Japan Society of Gene Therapy 13<sup>th</sup> Annual Meeting (Nagoya) 2007.6
- 11) 渡邊 淳, 島田 隆: 血管型 Ehlers-Danlos 症候群を巡る遺伝診療の問題点と課題、第 14 回日本遺伝子診療学会(松山), 2007.7
- 12) 三宅 紀子, 三宅 弘一, 島田 隆: HOXB4 発現造血幹細胞移植による異染性白質ジストロフィー(MLD)の治療、第 52 回日本人類遺伝学会(東京), 2007.9
- 13) 岩本直高, 渡辺 淳, 三宅紀子, 寺本 明, 島田 隆: 異染性白質ジストロフィーに対する髄腔内遺伝子治療の検討、第 52 回日本人類遺伝学会(東京), 2007.9
- 14) 塙 秀樹, 島田 隆: 感染効率と安全性を両立させたインスレーターを導入した HIV-1 ベクターの開発、第 52 回日本人類遺伝学会(東京), 2007.9
- 15) 山本基子, 渡邊 淳, 小坂 仁, 山下純正, 右田真, 島田 隆: 同一アレルに複数の遺伝子変異を有した異染性白質ジストロフィーの 1 男児例、第 49 回日本先天代謝異常学会(山形), 2007.11