

酵素補充療法を受けたポンペ病患者のフォローアップの研究 「ポンペ病酵素補充療法の有効性評価および早期診断の検討」

研究分担者 田中藤樹 遺伝診療科医員

研究要旨

我々は酵素補充療法を行っている成人型ポンペ病患者に対し、臨床症状、検査所見およびQOL評価であるFIM(Functional Independence Measure)スコアを用いて、日本人における有効性、安全性を評価した。特に、FIMスコアが短期的には鋭敏に評価可能であることが示唆された。これにより筋症状が不可逆的な変化となる前の早期治療法が重要であると思われた。

共同研究者

奥山虎之（国立成育医療センター・臨床検査部）
小須賀基通（国立成育医療センター・臨床検査部）
小田絵里（国立成育医療センター・遺伝診療科）

A. 研究目的

ポンペ病は2006年に欧米で、2007年に本邦で酵素製剤アルグルコシダーゼアルファが承認されたことにより、治療法のない疾患から根治可能な疾患へと認識が大きく変化した。本邦では約50名の患者が酵素補充療法を受けている。しかし、本邦では欧米の臨床試験データを用いて承認を受けているため、日本人における有効性、安全性を評価していくことは重要な課題である。そのため、投与患者においては治療の評価を追跡する必要があり、臨床症状、検査のみではなくQOLの改善など多角的に評価していくことが重要となっている。そこで我々は酵素補充療法を行っている成人型ポンペ病患者に対し、臨床症状、検査所見およびFIM (Functional Independence Measure) スコアを用いて、酵素補充療法の有効性を評価した。

B. 研究方法

症例は国立成育医療センターで酵素補充療法を受けている37歳の女性。20歳時に易疲労感があり、歩行困難、肝機能障害を認め、21歳時に培養皮膚線維芽細胞の酸性 α -グルコシダーゼ活性低下より、ポンペ病と確定診断されている。その後呼吸困難が出現し、

33歳から呼吸不全となり、24時間NIPPVを装着した。それにより体重減少、反復性気胸などが合併するようになった。また、歩行困難は徐々に進行し、車椅子の補助が必要になった。2006年12月20日よりアルグルコシダーゼアルファ20mg/kgを隔週で点滴静注を開始した。現在まで投与は安全に継続されており、約2年間酵素補充療法を受けている。有効性評価項目として、臨床症状、血液・尿検査、画像検査(MRI、CT、Xp)、心電図、心エコー、肺機能検査、6分間歩行検査、徒手筋力検査、抗アルグルコシダーゼアルファIgG抗体などを測定した。また、患者のADLを評価するFIM: Functional Independence Measure(機能的自立度評価表)を用いて、QOLも評価する。FIMとは機能的自立度評価表(質問紙)を用いたADL評価法であり、介助者が客観的に患者の可能な日常生活動作を記載するものである。

C. 研究結果

1. 酵素開始前の状態

呼吸器装着後より、体重が39kgから30kgへ落ちていた。自立歩行不能で車椅子を使用しており、肺機能検査は%VCが21.2%、FEV_{1.0}が43.8%と重度の呼吸不全を認めた。また気胸を繰り返していた。筋力検査では、握力が右17.8kg、左16.3kgであり、徒手筋力検査においては上肢前腕4、下肢膝関節屈曲4、下肢膝関節伸展4、足関節背屈4、足関節底屈4、股関節屈曲2であった。側面つまみ検査でも右51N、

左 45.9 N であり、遠位筋筋力は比較的保たれていた。6 分間歩行は施行不能であり、近位筋の萎縮、筋力低下は著しかった。大腿筋の骨格筋 CT では、大内転筋や半膜様筋の特異的萎縮を認めた。血液検査では軽度の高 CK 血症が続いていた。心電図、心エコーは正常であり、心疾患の合併はなかった。FIM score では、日常生活項目（食事、整容、入浴、更衣、トイレ、排尿、排便）が要軽～中等度介助であり、移動項目（移乗、トイレ移乗、浴槽移乗、車椅子移動、階段）が要中等度～全介助であった。知能項目（理解、表出、社会的交流、問題解決、記憶）はすべて完全自立であり、運動障害のみが主体であることが示された。

2. 酵素補充療法後での有効性評価

肺機能検査については投与経過中に気胸が出現したため、気胸再発時に%VC が低下、その後徐々に上昇し、結果として不変であった。呼吸器条件にも変化なかった。しかし、臨床症状の改善点として、呼吸器からの離脱時間が数分から数十分に延長することが可能となり、それによりシャワー浴から入浴可能になり、食欲が増加し、頭痛の回数減少が認められ、体重が 3kg 増加した。筋力検査では、徒手筋力検査に変化はなかったが、側面つまみ検査では右 51→58 N、左 45.9→50.1 N と軽度上昇を示した。骨格筋 CT では筋萎縮に改善なく、筋肉量には変化はなかった。臨床症状では座位での姿勢保持が良くなり、易疲労感が改善した。血清 CK 値は投与前後で変化がなかった。心電図、心エコーは正常状態を維持していた。

FIM スコアは投与前後で、73 点→82 点/126 点満点へと上昇した。上昇項目は 5 項目であり、そのうち 4 項目が日常生活項目（整容 2 点→5 点、更衣上半身 3 点→5 点、更衣下半身 3 点→5 点、排尿コントロール 3 点→4 点）で、1 項目が移動項目（トイレ移乗 1 点→2 点）

D. 考察

ポンペ病に対する酵素補充療法について、乳児型においては生存期間の延長など著明な効果が報告されている。しかし、小児型、成人型についての有効性については不明な点が多い。そのため、成人型ポンペ病について、日本人での安全性評価を確認して

いくとともに、有効性を観察していくことは重要な意義がある。本症例は典型的な成人型の発症経過をたどっており、酵素補充療法前には歩行困難、呼吸障害により車椅子、NIPPV を使用しており、体重減少、気胸など合併症も出現している。骨格筋 CT でも特徴的な筋萎縮を呈していた。アルグルコシダーゼアルファを 1 年間投与し、特に副作用などはなく忍容性は認められた。有効性については呼吸機能、筋力検査、骨格筋 CT などには有意な改善が得られなかったが、自覚症状、日常生活に改善点が散見され、それらについて QOL を評価するための FIM スコア：機能的自立度評価を用いたところ、臨床症状と相関する結果が得られた。これにより、臨床検査では評価が現れにくい短期の評価指標として、臨床症状の改善を表す FIM スコアは有用な指標になると考えられる。また、筋萎縮などの改善が見られない原因として、発症から投与開始までの期間が長いことが考えられ、筋症状が不可逆的な変化となる前の早期治療法が重要であると思われる。

E. 結論

ポンペ病に対する酵素補充療法の有効性評価に関し、FIM スコアが短期的には鋭敏に評価可能であることが示唆された。また、本症例の経過より、筋症状が不可逆的な変化となる前の早期治療法が重要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中藤樹：先天性糖代謝異常。肝胆膵 56-1 号 2008, 27-34.
- 2) 田中藤樹：アウドラザイム。メディクイック 08 2008, 489-490.
- 3) 田中藤樹、奥山虎之：ムコ多糖症 II 型の酵素製剤の承認と治療の実際。在宅と難病 2008 Vol.14 No.3 49-52
- 4) 田中藤樹、奥山虎之：ムコ多糖症 I 型の最新治療

- 薬と臨床具体的事例。在宅と難病 2008
Vol.14 No.5 40-42
- 5) 奥山虎之、田中藤樹、小須賀基通、三原喜美恵、
四元淳子：ムコ多糖症に対する酵素補充療法の導
入と新生児マス・スクリーニングの可能性。日本
マス・スクリーニング学会誌 18巻 1号 2008,
23-28.
2. 学会発表
- 1) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、岡
田美智代、小崎里華、大矢 寧、大澤真木子、奥
山虎之：成人型ポンペ病における酵素補充療法の
評価。第50回日本小児神経学会総会。東京、2008.
- 2) 三原喜美恵、李紅蓮、右田王介、田中藤樹、小崎
里華、斉藤理恵子、北川道弘、奥山虎之：母体血
清マーカー検査に関する意識調査。第7回日本遺
伝看護学会学術集会。東京、2008.
- 3) 奥山虎之：酵素補充療法、イソフラボン療法の現
状-MPS I・VI。第12回日本ムコ多糖症研究会。
東京、2008.
- 4) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小
須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之：ろ
紙を用いたポンペ病スクリーニング法の検討。第35
回日本マス・スクリーニング学会。松江、2008.
- 5) Torayuki Okuyama, Toju Tanaka: ENZYME
REPLACEMENT THERAPY FOR
MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I
IN JAPAN. SOCIETY FOR THE STUDY OF
INBORN ERRORS OF METABOLISM
ANNUAL SYMPOSIUM, LISBOA 2-5
SEPTEMBER 2008
- 6) Toju Tanaka, Mahoko Furujo, Tetsuo Kubota,
Tohya Ohashi, Akemi Tanaka, Yasuyuki
Suzuki, Yoshikatsu Eto, Tadao Orii, Torayuki
Okuyama: ERT USING GALSULFASE FOR
MAROTEAUX-LAMY SYNDROM IN JAPAN.
SOCIETY FOR THE STUDY OF INBORN
ERRORS OF METABOLISM ANNUAL
SYMPOSIUM, LISBOA 2008
- 7) 奥山虎之：保険収載された遺伝病的検査と遺伝
カウンセリング加算。日本人類遺伝学会 第53
回大会。横浜、2008.
- 8) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小
須賀基通、小崎里華、奥山虎之：FIM スコアを
用いたポンペ病における酵素補充療法の評価の
確立。日本人類遺伝学会 第53回大会。横浜、
2008
- 9) 田中藤樹、右田王介、小田絵里、岡田美智代、三
原喜美恵、李紅蓮、小須賀基通、小崎里華、林
聡、左合治彦、奥山虎之：先天代謝異常症に対す
る出生前遺伝カウンセリング。日本人類遺伝学会
第53回大会。横浜、2008.
- 10) 四元淳子、田尾絵里子、小須賀基通、田中藤樹、
三原喜美恵、千代豪昭、奥山虎之：ムコ多糖症の
酵素補充療法に対する患者家族の意識とは。日本
人類遺伝学会 第53回大会。横浜、2008
- 11) Torayuki Okuyama: RECENT CLINICAL
PROGRESS IN LSDs: NEW DATA FROM
LSD CLINICAL TRIALS AND REGISTRIES,
MPS I DISEASE, Japanese case. 11th Annual
Asia LSD Symposium. Beijing, 2008.
- 12) 田中藤樹、田中あけみ、鈴木康之、井田博幸、奥
山虎之、衛藤義勝、折居忠夫：Hunter 症候群成
人10例における酵素補充療法 JET Studyの治
療成績第50回日本先天代謝異常学会総会。米子、
2008.
- 13) 田中藤樹、古城真秀子、小倉和郎、久保田哲夫、
大橋十也、田中あけみ、鈴木康之、奥山虎之、衛
藤義勝、折居忠夫：Maroteaux-Lamy 症候群に
対する酵素補充療法～国内3症例の治療例。第
50回日本先天代謝異常学会総会。米子、2008.
- 14) 田中藤樹、三原喜美恵、種元智洋、中村知夫、石
毛信之、奥山虎之：タンデムマススクリーニングに
よるPTPS欠損症の早期診断～出生前遺伝カウ
ンセリングの効用。第50回日本先天代謝異常学
会総会。米子、2008.
- 15) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小
須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之：ポ
ンペ病スクリーニング；日本人特有の遺伝子多型
の影響。第50回日本先天代謝異常学会総会。米
子、2008.

- 16) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之：
Functional Independence Measure (FIM) スコアを用いたポンペ病治療効果の検討。第50回日本先天代謝異常学会総会。米子、2008。
- 17) 三原喜美恵、李紅蓮、四元淳子、右田王介、小須賀基道、田中藤樹、小崎里華、奥山虎之：オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症の遺伝カウンセリング。第50回日本先天代謝異常学会総会。米子、2008。
- 18) 小須賀基通、田中藤樹、小田絵里、岡田美智代、右田王介、小崎里華、望月弘、小林靖明、奥山虎之：ムコ多糖症 I 型に対する酵素補充療法の治療効果：3年間の成績。第50回日本先天代謝異常学会総会。米子、2008。
- 19) 四元淳子、田尾絵里子、小須賀基道、田中藤樹、三原喜美恵、千代豪昭、奥山虎之：ムコ多糖症の酵素補充療法に対する患者家族の意識調査。第50回日本先天代謝異常学会総会。米子、2008。
- 20) 小須賀基通、田中藤樹、小田絵里、岡田美智代、右田王介、小崎里華、奥山虎之：ムコ多糖症 I 型に対する酵素補充療法-長期投与における有効性・安全性の評価。第13回日本ライソゾーム病研究会。東京、2008。
- 21) 岡田美智代、小田絵里、三原喜美恵、右田王介、田中藤樹、小須賀基通、小崎里華、左合治彦、奥山虎之：ムコリポドーシス II 型(I-cell 病)の出生前診断。第13回日本ライソゾーム病研究会。東京、2008。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果刊行に関する一覧表

別紙4

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
奥山虎之、 田中藤樹、 小須賀基 通、三原喜 美恵、四元 淳子	ムコ多糖症に対する酵素補充療 法の導入と新生児マス・スクリー ニングの可能性	日本マス・スク リーニング学会 誌	18巻 1号	23-28	2008
Nakamura K, Mitsubuchi H Endo F et al	Animal model of tyrosinemia.	J. Nutrition	137	1573S-1575S	2007
Matsumoto S, Nakamura K and Endo F et al.	Isolation of Tissue Progenitor Cells from Duct-Ligated Salivary Glands of Swine.	Cloning and Stem Cells	9	176-190	2007
Hattori K, Nakamura K, Endo F et al.	Arrhythmia Induced by Spatiotemporal Overexpression of Calreticulin in the Heart	Mol. Genet. Metab.	91	285-293	2007
Yabe M, Kato S, et al	Fatal giant cell myocarditis after allogeneic bone marrow transplantation	Bone Marrow Transplant.	41(1)	:93-4	2008
Yasuda Y, Kato S, et al	Progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic bone marrow transplantation for Wiskott- Aldrich syndrome	Pediatr Int.	50(2)	238-40	2008
Narimatsu H, Kato S, et al.	Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan.	Blood	112(6)	2579-82	2008
Nagamura- Inoue T, Kato S, et al	Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis.	Bone Marrow Transplant.	42(4)	241-51.	2008
Yoshimi A, Kato S, et al	Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia	Blood Marrow Transplant	14(9)	1057-63.	2008
Yahata T, Kato S, et al.	Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis.	Stem Cells	26(12)	3228-36	2008
Kawase T, Kato S, et al	HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular mechanism	Blood.	Nov 7.		2008

別紙4

加藤俊一	臍帯血移植の今後	総合臨床	Vol57.No.4	632-638	2008
田中藤樹	先天性糖代謝異常	肝胆膵	56-1号	27-34	2008
田中藤樹	アウドラザイム	メディクイック		489-490	2008
田中藤樹、 奥山虎之	ムコ多糖症II型の酵素製剤の承認 と治療の実際.	在宅と難病	Vol.14 No.3	49-52	2008
4) 田中藤樹、 奥山虎之	ムコ多糖症I型の最新治療薬と臨 床具体的事例	在宅と難病	Vol.14 No.5	40-42	2008
奥山虎之、 田中藤樹、 小須賀基 通、三原喜 美恵、四元 淳子	ムコ多糖症に対する酵素補充療 法の導入と新生児マス・スクリーニ ングの可能性	日本マス・スク リーニング学会 誌	18巻 1号	23-28	2008

研究成果の刊行物・別刷り

ムコ多糖症に対する酵素補充療法の導入と 新生児マススクリーニングの可能性

奥山虎之^{1,2}、田中藤樹²、小須賀基通¹、三原喜美恵^{1,2}、四元淳子^{1,3}

国立成育医療センター 臨床検査部¹、遺伝診療科²、
お茶の水女子大学遺伝カウンセリングコース³

要 旨

ムコ多糖症 I 型、II 型、VI 型の酵素製剤が日本でも使用可能となった。これをうけて、上記 3 疾患についての新生児マススクリーニングへの導入が考慮されている。しかし、酵素補充療法が中枢神経系への治療効果に乏しいこと、X 染色体連鎖性疾患であるムコ多糖症 II 型の診断は母方の家族に影響を与える可能性があることなどを考慮すると、十分な事前説明と同意および遺伝カウンセリング体制の整備など、あらたな体制構築が必要となる可能性がある。

1) ムコ多糖症とは

ムコ多糖症は、グリコサミノグリカン（ムコ多糖）の分解に必要な約 10 種類のライソゾーム酵素の中の一つが先天的に欠損しているため、全身の臓器組織に分解できないグリコサミノグリカンが蓄積し機能障害を呈する遺伝性疾患である。欠損している酵素の違いから 6 つの型に分類される（表 1）。ムコ多糖症 II 型（ハンター症候群）は X 染色体連鎖性劣性遺伝形式をとるが、その他はすべて常染色体劣性遺伝の遺伝形式をとる。欠損している酵素の違いから、蓄積物質と臨床症状に差がある。たとえば、ヘパラン硫酸の蓄積が主であるムコ多糖症 III 型（サンフィリポ症候群）では、精神運動発達遅滞が主症状になるが、ケラタン硫酸が蓄積するムコ多糖症 IV 型

（モルキオ症候群）では、骨の変形が著しい反面、知的障害は伴わない。肝臓脾臓の肥大、閉塞性呼吸障害、関節拘縮（ムコ多糖症 IV 型を除く）、ヘルニアなどの諸症状については、病型に関係なく共通の症状である。以下、酵素補充療法が適応できるムコ多糖症 I、II、VI 型の臨床像と治療を中心に述べたい。

a. ムコ多糖症 I 型

グリコサミノグリカンの中で、デルマタン硫酸（DS）とヘパラン硫酸（HS）の分解に必要な酵素のひとつである α -L-イドロネートの先天的欠損に起因する常染色体劣性伝病である。精神運動発達障害を伴う重症型のハーラー症候群（H）と精神運動発達障害を伴わず発症も緩徐なシャイエ症候群（S）とその中間型である（HS）に分類される。日本で確認されている患者数は、約 30 名であるが、軽症のシャイエ病は診断されていない症例もあるといわれている。今後、酵素補充療法の普及につれて、症例数の増加も期待される。

症状：精神運動発達障害、水頭症、特徴的なガーゴイル様顔貌、関節拘縮、低身長、X

（連絡先）

奥山 虎之

〒157-8535 世田谷区大蔵 2-10-1

国立成育医療センター遺伝診療科

Tel: 03-3416-0181 Fax: 03-3416-2222

表1. ムコ多糖症の病型分類

	type	Enzyme	GAG	
IH	Hurler	α -L-Iduronidase	DS, HS	AR
IH/S	Hurler/Scheie			
IS	Scheie			
II	Hunter, severe	Iduronate sulfatase	DS, HS	XLR
	Hunter, intermediate			
	Hunter, mild			
III	Sanfilippo A	Heparan N-sulfatase	HS	AR
	Sanfilippo B	α -N-Acetylglucosaminidase		
	Sanfilippo C	Acetyl CoA: α -glucosaminidase acetyltransferase		
	Sanfilippo D	N-Acetylglucosamine 6-sulfatase		
IV	Morquio A	Galactose 6-sulfatase	KS	AR
IV	Morquio B	β -Galactosidase		
VI	Maroteaux-Lamy	N-Acetylgalactosamine 4-sulfatase (arylsulfatase B)	DS	AR
VII	Sly	β -Glucuronidase	DS, HS, CS	AR

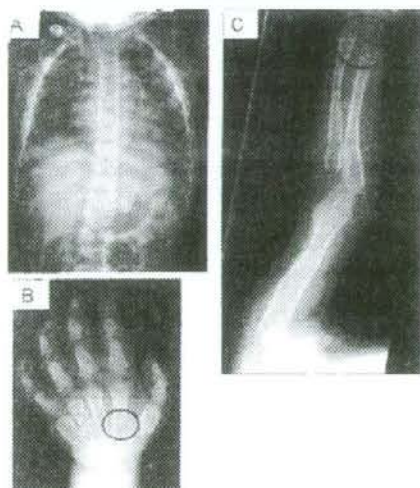
ムコ多糖症は、6病型に分類される。DS: デルマタン硫酸、HS: ヘパラン硫酸、KS: ケラタン硫酸、CS: コンドロイチン硫酸、AR: 常染色体劣性遺伝、XLR: 染色体劣性遺伝

線所見として、Dysostosis Multiplex とよばれる全身性の骨の変形(図2)、閉塞性呼吸障害、睡眠時無呼吸、心臓弁膜症(大動脈弁や僧帽弁閉鎖不全が多い)中耳炎、難聴、角膜混濁、網膜変性、多毛、蒙古斑の消失遅延、

異所性蒙古斑、そけいヘルニア、肝臓脾臓の肥大などの症状がある。

治療: 対症療法と原因療法からなる。対症療法の主なものは中耳炎に対するチューブの挿入、水頭症に対するVPシャントの挿入、心臓弁の置換術、角膜混濁に対する角膜移植などである。原因療法としては、欠損している酵素 α -L-イズロネートを体内に供給することを基本とした治療法である。細胞治療と酵素補充療法がある。細胞治療とは、 α -L-イズロネートを産生・分泌できる細胞を移植して、恒常的に酵素を体内で供給できるようにする治療法である。細胞治療法として骨髄移植や臍帯血移植などの造血幹細胞移植が行われる。2歳以下で発達指数が70以上の場合は治療による効果が期待できるという。しかし、造血幹細胞移植の場合、適切なドナーが必ずしも見つかるとは限らないこと、拒絶反応による生着不全や移植片対宿主反応(GVH)など移植に伴う重篤な副作用のために命を失う事もあること、生命は維持できても、自己の造血細胞に再び置き換わってしまうことや、慢性的GVHに悩む可能性があることなど多くの問題がある。そのため、自

図1. ムコ多糖症の骨病変



Dysostosis Multiplex と呼ばれる多彩な病変を呈する。肋骨のオール状変形(A)と手の基節骨端の先細り様変化(Metacarpal Pointing)(B)、と橈骨頭と尺骨頭の変形(Madelung変形)(C)

己の骨髄細胞を取り出し、遺伝的な改変を行い α -L-イズロネートを産生分泌できるようにして、再び移植する遺伝子治療が期待されている。遺伝子治療は、造血幹細胞移植の副作用を回避できる可能性があるが、レトロウイルスやレンチウイルスによる遺伝子導入では、外来遺伝子が宿主の染色体にランダムに挿入されるため、挿入変異による白血病の出現などの新たな問題が生じている。

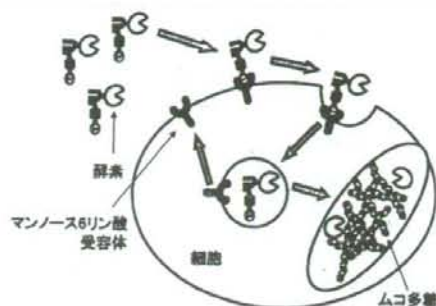
b. ムコ多糖症 II 型

グリコサミノグリカンの中で、デルマタン硫酸 (DS) とヘパラン硫酸 (HS) の分解に必要な酵素イズロネート2-サルファターゼの先天性欠損に起因する X 染色体劣性遺伝病で、原則的には男児にのみ発症する。精神運動発達障害を伴う重症型のハンター症候群と精神運動発達障害を伴わず発症も緩徐な軽症型ハンター症候群とその中間型ハンター症候群に分類される。

症状：精神運動発達障害、水頭症、特徴的なガーゴイル様顔貌、関節拘縮、低身長、X線所見として、Dysostosis Multiplex とよばれる全身性の骨の変形 (図 2)、閉塞性呼吸障害、睡眠時無呼吸、心臓弁膜症 (大動脈弁や僧帽弁閉鎖不全が多い) 中耳炎、難聴、網膜変性、多毛、蒙古斑の消失遷延、異所性蒙古斑、そけいヘルニア、肝臓脾臓の肥大などムコ多糖症 I 型の症状とほぼ同じであるが、角膜混濁を伴わないのが特徴である。個々の症状の発症年齢や病態の進行は、症例によってばらつきがあるが、症状は加齢により進行する。日本の患者数は、約 200 名前後とされており、70%が重症型である。

治療：対症療法と原因療法からなる。対症療法の主なものはムコ多糖症 I 型と同様である。中耳炎に対するチューブの挿入、水頭症に対する VP シャントの挿入、心臓弁の置換術、角膜混濁に対する角膜移植などである。原因療法としては、細胞治療と酵素補充療法がある。細胞治療とは、イズロネート2-サルファターゼを産生・分泌できる細胞を移植

図 2. 酵素補充療法の原理



細胞外のライソゾーム酵素はマンノース 6 リン酸受容体を介して細胞内に取り込まれ、ライソゾームに輸送される。

して、恒常的に酵素を体内で供給できるようにする治療法である。しかし、ムコ多糖症 I 型と異なり、欧米では、ムコ多糖症 II 型に対する骨髄移植は、効果が期待できないとされている。しかし、わが国では、ハンター症候群に対して骨髄移植がひろく行われており、一定の効果が認められている。

c. ムコ多糖症 VI 型

グリコサミノグリカンの中で、デルマタン硫酸 (DS) の分解に必要な酵素のひとつである N-アセチル 4-サルファターゼ (アセチルサルファターゼ B) の先天性欠損に起因する常染色体劣性遺伝病である。骨の変形などの臨床症状は、ムコ多糖症 I 型とほとんど一致しているが、精神運動発達障害を伴わないのが特徴である。きわめてまれな疾患であり、日本で確認されている総患者数は 10 名以下である。

治療：対症療法と原因療法からなる。対症療法は、ムコ多糖症 I 型と同様である。原因療法として、骨髄移植と酵素補充療法が行われている。

2) 酵素補充療法の原理と臨床応用

酵素補充療法は、個々の疾患で欠損している酵素タンパクを週 1 回定期的に点滴静注することにより、体内に蓄積するグリコサ

ミノグリカンの分解を促進することを目的とした治療法である。経静脈的に投与された酵素は、細胞膜上に存在するマンノース6リン酸受容体を介して細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれ、最終的にはライソゾーム内に輸送される(図2)。体内に欠損している酵素を供給するという治療の概念は骨髄移植も酵素補充療法も同一である。酵素補充療法のメリットは、診断された患者全員が治療を受けられること、骨髄移植に見られる重篤な副作用を回避できること、ドナー検索やコーディネーションなど時間のかかる準備が不要のため診断後すみやかに治療を開始できること、などである。デメリットは、週1回の点滴静注を一生継続しなければならないこと、莫大な医療費がかかること(患者一人当たりの薬剤価格が、1年間で数千万円から一億円以上になる場合もあること)などである。日本では、公費負担制度により患者負担はほとんどないが、今後酵素補充療法を受ける患者数が増加してゆくと、医療費の問題が深刻化する可能性もある。

酵素補充療法が利用できるライソゾーム病は、ゴーシェ病、ファブリー病、ボンペ病、ムコ多糖症I型、II型、VI型の6疾患で、わが国では2008年4月現在、500人以上の患者が酵素補充療法を受けている。

ムコ多糖症I型酵素製剤アウドラザイムは2006年10月に承認され、20名の患者に投与されている。ムコ多糖症II型酵素製剤エラプレースは、2007年10月に承認され、約100名の患者に投与されている。また、ムコ多糖症VI型治療薬ナグラザイムは、2008年3月に承認され、3名に投与されている。この3剤とも、厚生労働省未承認薬使用問題検討会議での検討を経て、欧米での治験データのみによる新薬承認申請が認められ、迅速審査によるスピード承認が実現している。

いずれの薬剤についても、6分間歩行距離の改善、1秒率などの呼吸機能の改善、睡眠時無呼吸の改善、肝臓・脾臓サイズの正常化、

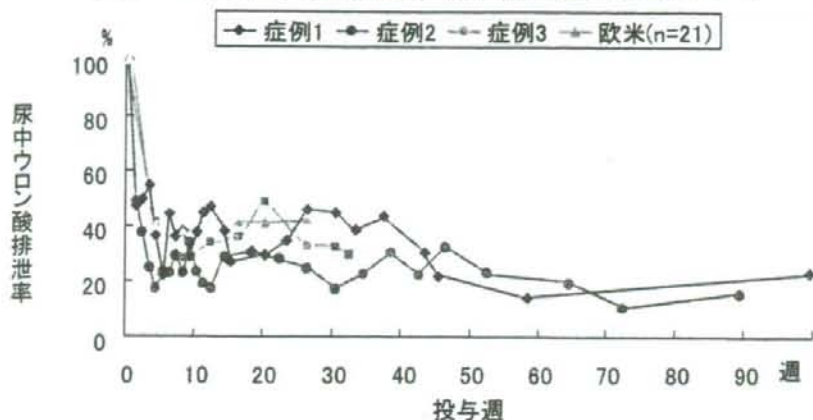
尿中グリコサミノグリカンの減少、関節可動域の増加などで有効性が確認されている(図3)。ただし、心臓弁膜症、角膜混濁に対しての効果は認められていない。また酵素は高分子糖タンパクであるため、血液脳関門を越えることが難しく脳内の蓄積を除去できる可能性は少なく、精神遅滞などの脳病変の改善は期待できないとされている。酵素製剤の長期効果の検証は今後の課題である。多施設共同研究による国内患者登録と長期フォローアップの実現やグローバルレジストリーへの積極的な参加によるデータの蓄積と評価が不可欠である。

3) ムコ多糖症の治療法の進歩と新生児マススクリーニングの妥当性について

酵素補充療法の導入により、ムコ多糖症の治療の可能性は拡大した。しかし、中枢神経系への治療効果は現行の治療法では期待できない。従って、「治療法が確立している疾患であること」という新生児マススクリーニングの本来の趣旨を考慮すると、知的障害を伴わないムコ多糖症VI型がまず候補となるだろう。酵素補充療法の効果を最大限に引き出すためには、骨病変のない新生児早期からの治療開始が望ましいことから、新生児マススクリーニングに適している疾患といえるが、ムコ多糖症VI型の国内患者総数が10名以下というきわめてまれな疾患であるので、新生児スクリーニングへの適応は医療経済学的には困難といえるかもしれない。

ムコ多糖症I型およびII型の酵素補充療法の長期予後を考えると、治療困難な知的障害が残る可能性が高い。新生児マススクリーニングの意義を考慮すると知的障害を伴わない(あるいは軽度である)、軽症型のハンター症候群やシェイエ病・ハーラーシェイエ病を選択的に診断できる方法が確立されることが望ましい。しかし、現在研究が進んでいる血液ろ紙を使った酵素診断法や蓄積物質であるグリコサミノグリカンを検出する方法では、軽症型だけを選択的に診断することは事実上不

図3. ムコ多糖症Ⅰ型患者に対する酵素補充療法の効果について



ムコ多糖症Ⅰ型3症例でのアウドラザイム自験例の結果を示す。3症例とも尿中ムコ多糖(ウロン酸)の急激な低下を示す。この結果は、欧米での治験結果と同様である。

可能である。

また、ムコ多糖症Ⅱ型はX染色体連鎖劣性遺伝病であり、診断は母親の家系に影響を与える可能性があり、遺伝カウンセリング体制の整備も必要となる。現行の新生児マススクリーニングが対象としている疾患は、早期に診断し治療が開始されれば、知的な障害の回避や身体的症状の改善などの顕著な治療効果が期待されるため、対象となる児およびその家族のデメリットは少ない。そのため、その実施に際しての事前説明は極めて簡略化されているが、それほど大きな問題を生じていない。

一方、ムコ多糖症Ⅰ型やⅡ型の新生児スクリーニングの導入にあたっては、「知的障害が回避できない疾患を生まれて間もない時期に告知される可能性がある」という内容を検査前に十分説明し、同意が確認された場合にだけ実施するなど、新たなシステムが必要になる。これは、遺伝学的検査を行う際の検査前遺伝カウンセリングに相当するものであり、その説明についても認定遺伝カウンセラーや臨床遺伝専門医が行うのが適当かもしれない。

現行の新生児マススクリーニング体制のもとでムコ多糖症スクリーニングを導入すること

は、知的障害を回避できない疾患も同時にスクリーニングすることになる。事前の十分な説明と同意なくして行うことは、極めて深刻な問題をもたらす可能性がある。スクリーニング検査といえども、その目的とするところは「遺伝病の診断」であり、遺伝学的検査としてのガイドラインの順守は不可欠である。すなわち、まず検査前の十分な説明と同意を取得する体制および検査前後の遺伝カウンセリング体制を整備する必要がある。

結語

ムコ多糖症に対する酵素補充療法の効果と限界について概説し、現状において新生児マススクリーニングを実施する場合の問題点とその対策を検討した。

参考文献

- Sifuentes M, Doroshov R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diamant M, Okazaki S, Huff K, Cox GF, Swiedler SJ, Kakkis ED. A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genet Metab.* 2007; 90: 171-180.

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu ZF, Wittes J, Berger KI, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ; MPS VI Phase 3 Study Group. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr.* 2006;148:533-539.

Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Gucsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med.* 2006;8:465-73.

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* 2005;46:2003-2009

受付日:平成20年5月8日



Animal Models of Tyrosinemia¹⁻³

Kimitoshi Nakamura, Yasuhiko Tanaka, Hiroshi Mitsubuchi, and Fumio Endo*

Department of Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Kumamoto 860-8556, Japan

Abstract

Hereditary tyrosinemia I (HT I) is a genetic disorder of tyrosine metabolism characterized by progressive liver damage from infancy and by a high risk for hepatocellular carcinoma. HT I is due to mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) gene, which encodes the last enzyme in the tyrosine catabolic pathway. Disturbances in tyrosine metabolism lead to increased levels of succinylacetone and succinylacetoacetate. However, the mechanisms causing liver failure, cirrhosis, renal tubular dysfunction, and hepatocarcinoma are still unknown. Lethal albino deletion c14CoS mice and mice with target-disrupted Fah are models for HT I. They die in the perinatal period, although with a different phenotype from that seen in HT I in humans. In addition, 2 mouse strains that carry N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutations in the Fah gene have been described. Mice with a splice mutation exhibit the milder features of the clinical phenotype. In mice that carry both Fah and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene mutations, administration of homogentisate results in rapid apoptosis of hepatocytes. Simultaneously, renal tubular epithelial cells are injured, resulting in Fanconi syndrome. These are central features of visceral injury in patients with HT I. Apoptosis of hepatocyte and renal tubular cells is prevented by the caspase inhibitors acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO or acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO. Apoptosis of hepatocytes and renal tubular epithelial cells are central features of this disease. Alterations in gene expression found in the liver of patients with HT I are responsible for the pathogenesis of this disease, for example, acute liver failure. Therefore, gene expression analysis allows a better understanding of the specific pathogenesis. Cell fusion of hematopoietic stem cells with hepatocytes leads to liver regeneration after liver injury. This finding was possible after using the liver injury model of HT I in Fah null mice. Thus, animal models of tyrosinemia are unique and useful tools to reveal mechanisms of interest to both clinical and basic science. *J. Nutr.* 137: 1556S-1560S, 2007.

Hereditary tyrosinemia I (HT I)⁴ is an amino acid metabolism disorder with an autosomal recessive trait. HT I is due to defects

¹ Published in a supplement to *The Journal of Nutrition*. Presented at the "Conference on Aromatic Amino Acids and Related Substances: Chemistry, Biology, Medicine, and Application" held July 20-21, 2006 in Vancouver, Canada. The conference was sponsored by Ajinomoto Company, Inc. The organizing committee for the symposium and Guest Editors for the supplement were Katsuji Takai, Dennis M. Bier, Luc Cynober, Sidney M. Morris, Jr., and Yoshiharu Shimomura. Guest Editor disclosure: Expenses to travel to the meeting were paid by Ajinomoto Company, Inc. for K. Takai, D. M. Bier, L. Cynober, S. M. Morris, Jr., and Y. Shimomura; D. M. Bier has consulted for Ajinomoto Company, Inc. on scientific issues.

² Author disclosure: K. Nakamura, Y. Tanaka, and H. Mitsubuchi, no conflicts of interest; F. Endo, travel expenses to attend the meeting were paid by the Ajinomoto Company, Inc.

³ Supported by a Grant-in-Aid for Research for the Future Program from the Japan Society for the Promotion of Science; a Grant-in-Aid for Scientific Research and a Grant-in-Aid for 21st Century COE Research (Cell Fate Regulation, Research and Education Unit) from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture; a Grant-in-Aid for Pediatric Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare; a Grant-in-Aid for the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and by National Agriculture and Bio-oriented Research Organization, Japan.

⁴ Abbreviations used: DEVD, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO; FAA, fumarylacetoacetate; Fah, fumarylacetoacetate hydrolase; HGA, homogentisate; Hpd, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; HT I, hereditary tyrosinemia I; HT III, hereditary tyrosinemia III; NTBC, 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione; Illi mice, model mice for HT III; PFU, plaque forming units.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: fendo@kumamoto-u.ac.jp.

in the fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase (Fah) gene (Fig. 1), located in q23-q25 of chromosome 15 in humans (1,2) and in chromosome 7 in mice (3). HT I patients display a variety of clinical symptoms, such as liver damage from infancy that advances to cirrhosis; reduced coagulation factors; hypoglycemia; high concentrations of methionine, phenylalanine, and aminolevulinic acid in serum plasma; high risk of hepatocellular carcinoma; and tubular and glomerular renal dysfunction. Pathological features of the liver in HT I patients are characteristic but not diagnostic. In its severe form, a pattern of progressive liver damage begins from early infancy. In its mild form, chronic liver damage with a high incidence of hepatoma is characteristic. Renal De Toni Fanconi syndrome and developmental hypophosphatemic rickets are features of the kidney involvement. Organic acid analysis of urine demonstrates increased excretion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid, and 4-hydroxyphenylacetic acid, and the presence of succinylacetone is diagnostic (3). 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) is an inhibitor for 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and administration of this compound is very effective in ameliorating liver and kidney damage in patients with this disease (4). Although such features are presumably related to events leading to hepatocyte injury and death, the actual process of liver damage has not been defined. The enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (Hpd) participates in the oxidation of the keto acids of tyrosine. Homogentisate (HGA) is

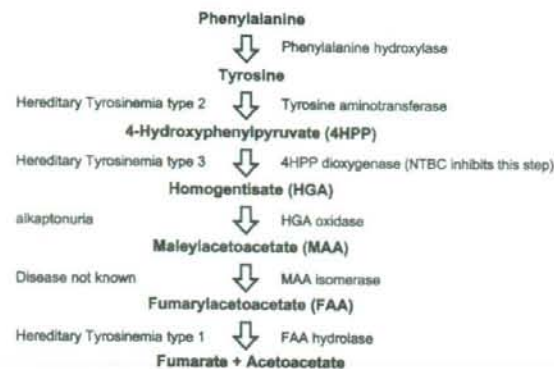


FIGURE 1 Tyrosine catabolic pathway and related diseases. Enzymes that catalyze each step are listed (right) opposite the disorders caused by the deficiency of the individual enzyme (left). As shown, NTBC is an inhibitor for Hpd. In our study, we used mice with a deficiency of Hpd and mice with a deficiency of Fah. The double-mutant (Fah^{-/-} Hpd^{-/-}) mice carry metabolic blocks at the steps of Hpd and Fah.

produced from 4-hydroxyphenylpyruvate by this enzyme and the reaction involves decarboxylation, oxidation, and rearrangement (5).

In mammals, genetic deficiency of Hpd has been detected by measuring Hpd activity. Human HT type III (HT III) is caused by lack of Hpd activity. Model mice for HT III (III mice) are a strain that exhibits high levels of serum tyrosine. The mice lack the entire exon 7 sequence of the Hpd gene and have no activity of Hpd enzyme (6,7). Thus, HT III mice are an animal model for human HT III. The mice have no evidence of liver or kidney damage, probably because the accumulation of 4-hydroxyphenylpyruvate does not cause any specific pathogenesis. Meanwhile, lethal albino c14CoS mice are an animal model of HT I (3,4,8,9). They have a large deletion on chromosome 7, including the albino locus and the Fah gene. We will discuss here the apoptosis of hepatocytes and renal tubular epithelial cells in animal models that are characteristic features of HT and recent approaches to establishing the genetic and pathophysiological feature of this disease.

Animal models of tyrosinemia

There are 2 strains of mutant mice that carry Fah deficiency. One is an albino lethal c14CoS mouse, which is neonatally lethal (10). A transgenic experiment revealed the lethal phenotype of these mice was caused by a deficiency of Fah. These mice have a large deletion on chromosome 7, including the albino locus and the Fah gene (11,12). The lethal phenotype of the homozygous c14CoS mice is related to impaired expression of hepatocyte-specific genes in the liver during the perinatal period (12-14). The other Fah-deficient mice were generated by targeted disruption of the Fah gene and these knockout mice are neonatally lethal (15). A study on these Fah-deficient mice suggested that neonatal death is probably due to hypoglycemia (11). There are no gross abnormalities in the histology of the liver of the Fah-deficient mice; however, ultrastructural investigations of homozygous c14CoS mice revealed altered membranous components. In the kidney of homozygous mice, dilatation and vesiculation of the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus have been described (16). When the Fah-deficient mice are treated with NTBC, they avoid early lethality; however, hepatocellular car-

cinomas develop after several months of life. In the kidney of NTBC treated-Fah-deficient mice, focal degeneration, regeneration of proximal tubular epithelium, and aggregates of cytoplasmic microfilaments have all been observed (17).

Alternatively, rescue of Fah-deficient mice has been achieved by the introduction of a mutant Hpd (EC 1.13.11.27) gene into homozygous c14CoS mice (Fig. 2); the double mutant mice (Fah^{-/-} Hpd^{-/-}) are viable (18). The double mutants carry mutant Hpd gene from III mice, a model for HT III. The phenotype of III mice is hypertyrosinemia without visceral injury (19) and there is a C to T transition at nucleotide +7 on exon 7 of the Hpd gene on chromosome 5, the result being premature termination of translation (20). As the formation of HGA is exclusively dependent on Hpd activity, a complete block of tyrosine catabolism at this step would result in depletion of HGA and its oxidative products. The complete block of tyrosine catabolism was expected to obliterate any clinical symptoms related to Fah deficiency.

Phenotype of the double mutant

The clinical phenotype of the double mutant (Fah^{-/-} Hpd^{-/-} mice) was indistinguishable from that of the III mice. The findings in liver and kidney sections from Fah^{-/-} Hpd^{-/-} mice were completely normal. Long-term investigations of Fah^{-/-} Hpd^{-/-} mice (12-18 mo) revealed no evidence of hepatocellular carcinomas or preneoplastic lesions. Thus, the mutant Hpd alleles from the III mice not only rescued the lethal phenotype of the Fah^{-/-} mice but also eliminated the critical visceral phenotype of Fah deficiency (19). These data suggest that liver carcinomas in the target-disrupted Fah-deficient mice under NTBC treatment could be caused by small amounts of the oxidative product(s) of HGA or their derivatives, produced by an incomplete block of the oxidation of 4-hydroxyphenylpyruvate by this drug.

Induction of visceral injuries in the double mutants

In the double mutant, we expected that recovery of the activity of Hpd in the liver would induce liver damage and that the investigations of the induced damage would provide some clues to the mechanism of cellular injury in Fah deficiency. At first, administration of recombinant adenovirus-expressing human

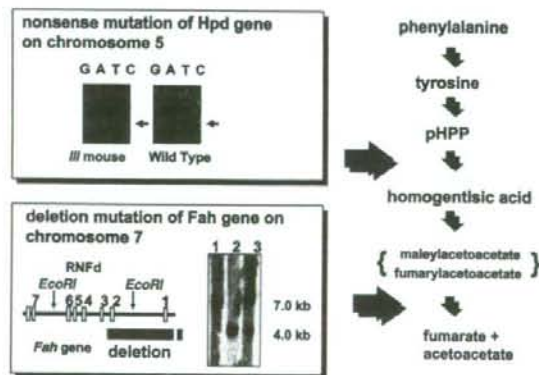


FIGURE 2 Mutations and metabolic defects in the double mutant. Rescue of Fah-deficient mice is achieved by introduction of mutant Hpd gene into homozygous c14CoS mice; the double mutant mice (Fah^{-/-} Hpd^{-/-}) are viable. The double mutants carried mutant Hpd gene from HT III mice, a model for HT III.

Hpd was attempted. Administration of this recombinant adenovirus into the 8-wk-old III mice resulted in a rapid appearance of the enzyme protein and activity in the liver within 1 h (21). Normalization of blood tyrosine levels was achieved within 12 h. When the recombinant virus was administered into the double mutant, they became evidently ill within 12 h after the injection. Mice had reduced mobility and lost appetite, and most often the mice died within 30 h after injection of the recombinant virus at a dose of 5×10^8 plaque forming units (PFU). However, the clinical symptoms in the control mice did not differ, indicating that the symptoms are caused by the appearance of Hpd activity in the liver of the double mutant. The changes in the histology of liver were striking in the double mutants administered the recombinant adenovirus (19). There was death of massive numbers of hepatocytes and no infiltration of inflammatory cells, but there were small areas of bleeding. Some of the damaged cells showed evidence of chromatin condensation, suggesting apoptosis as a cause of the cell death. When the liver sections were investigated with the TUNEL method, <15–25% of the hepatocytes were positive for the signals, indicating apoptosis, at a dose of 5×10^8 PFU. Examination of nuclear DNA of the livers by gel electrophoresis from the recombinant virus-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice revealed fragmentation, with sizes corresponding to typical nucleosome units. Thus, the most striking changes of the liver after the recovery of Hpd function in Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice was the massive apoptosis of hepatocytes. This result suggests that apoptosis is a central feature of the cellular damage observed in Fah deficiency. HGA, an intermediate metabolite of the tyrosine catabolic pathway, had similar effects on hepatocytes with Fah deficiency (19). When 400 mg/kg of neutralized HGA was injected intraperitoneally into 8-wk-old Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice, all of the mice died within 16 h. There are no clinical symptoms or histological changes in the liver sections of the control mice or the III mice after injection of 400–4000 mg/kg intraperitoneally, suggesting HGA is a relatively innocuous chemical in the control mice and III mice.

On the other hand, the liver sections from the HGA-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice had massive numbers of dead hepatocytes with fragmentation of nuclei. Ultrastructural analyses revealed that the nuclear chromatin was condensed peripherally, many mitochondria were swollen, and cytoplasmic vacuolation was evident. With the TUNEL method, ~20–30% of the hepatocytes gave positive signals by in situ detection of DNA fragmentation after the administration of 400 mg/kg of neutralized HGA in the double mutants. Apoptosis was demonstrated by experiments using primary cultured hepatocytes obtained from the double mutants after the addition of the recombinant adenovirus-expressing human Hpd or addition of HGA into the medium. In such experiments, caspase inhibitors, acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO (YVAD), which is a potent, selective, cell-permeating inhibitor of caspase-1, and acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (DEVD), which specifically inhibits caspase-1 and caspase-3, effectively prevent apoptosis of the Fah-deficient hepatocytes (22). These results suggest that the apoptosis seen in Fah-deficient hepatocytes involves mitochondria and the caspase 3 pathway. In vivo administration of YVAD or DEVD effectively prevented apoptosis of hepatocytes in the double mutant treated with HGA; when the Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice were given 200 mg/kg of YVAD or DEVD intraperitoneally 2 h before they were killed, <1% of hepatocytes were apoptotic (22).

Release of cytochrome c from liver mitochondria

Cytochrome c is localized in the intermembrane space and on the surface of the inner mitochondrial membrane. Cytochrome c re-

leased from the mitochondria interacts with Apaf-1, and caspase-9, pro-caspase-3, to activate caspase-3 and the caspase cascade, leading to fragmentation of the nucleus. The apoptosis of hepatocytes in Fah deficiency seems to involve the caspase 3 pathway, so it was postulated that cytochrome c plays some role in the apoptosis related in Fah deficiency. There was a considerable release of cytochrome c into the cytosol of hepatocytes in the HGA-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice but no significant release in the HGA-treated III mice. The release of cytochrome c occurred as early as 1 h after the administration of HGA, and apparently preceded the onset of apoptotic hepatocyte death and liver failure. These results suggest that the release of cytochrome c is the trigger leading to death of Fah-deficient hepatocytes following the administration of HGA. Release of cytochrome c from mitochondria was observed in a cell free system when mitochondria from control mice were incubated with soluble fractions from HGA-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice (22). The release did not differ when the soluble fraction from the control mice was added to the incubation medium. These investigations indicate that there is a low molecular weight substance(s) in the cytosol of the liver of HGA-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice that induces the release of cytochrome c from mitochondria. HPLC analysis showed that FAA, the substrate for Fah enzyme, was predominantly present in the soluble fraction. In the experiments in which purified FAA was incubated with control mitochondria, a considerable amount of cytochrome c was released into the medium. Thus, it is highly likely that FAA causes the apoptosis of hepatocytes in Fah-deficient mice via the caspase 3 pathway. The release of cytochrome c from the mitochondria seems to be an essential step in initiating the process of apoptosis in Fah deficiency.

Apoptosis of renal tubular cells

Apoptosis was seen in the proximal renal tubular epithelial cells from the double mutants after the administration of HGA (23). Pathological features included bleeding in vast areas, accumulation of mononuclear cells at the interstitium, proximal tubular dilatation, and cytoplasmic vacuolation. The number of apoptotic cells in the proximal renal tubules from the HGA-treated Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice depended on the dose of HGA administered. Electron microscopic analysis of proximal tubular cells revealed that droplets of fat and large lysosomes were present and many mitochondria were swollen (23). The breakage and vacuolization were present at the brush border. In some cells, compaction and degradation of chromatin were present in association with convolution of the nuclear profile. Thus, severe cellular damage and apoptosis might be central features of proximal renal tubular cells in Fah deficiency.

The urinary excretion of glucose and phosphate in the double mutants was used to evaluate the renal tubular function (23). The urinary glucose/creatinine ratio was markedly increased in the Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice after the administration of 100–400 mg/kg of HGA. In contrast, the urinary glucose/creatinine ratio was essentially unchanged in the control. These results suggest that, in the Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice, the administration of HGA resulted in a reduced reabsorption of glucose by the renal tubules. The caspase inhibitor YVAD effectively prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells when administered 2 h prior to the administration of HGA (23). Preadministration of YVAD did not alter the urinary levels of glucose and phosphate. In hepatocytes, pretreatment with YVAD did not have any influence on the release of cytochrome c from mitochondria in the double mutant after the administration of HGA. A similar phenomenon is likely to occur in the renal tubular cells. The

persistence of renal tubular dysfunction in the YVAD-treated and HGA-treated double mutants might be related to the reduction of cytochrome c in the mitochondria of the proximal renal tubular epithelial cells.

Microarray analysis of tyrosinemia model mice

Recently, microarrays have become established as a valuable tool to measure gene expression. A microarray is an application of thousands of target sequences representing individual genes onto a substrate that is investigated with a sample labeled to enable detection after hybridization in a single experiment (24). It is useful in finding new candidate genes related to metabolic disorders (24,25). Microarray analysis was applied to investigate the pathogenesis of HT I. Numerous expressed genes have been identified and validated in the liver of HT I model mice that induced liver damage upon HGA administration (26). These genes were related to apoptosis, tyrosine metabolism, and hepatocyte regeneration and were not expected to be involved in the liver dysfunction of HT I (Table 1). The fact that aminolevulinic acid dehydratase is downregulated in HGA-treated HT I model mice may suggest a role for this enzyme in the liver dysfunction and neuropathy of the HT I patient. It was found that 3 genes representing liver function were downregulated in the HT I model mice during the liver dysfunction process. The systematic approach used in the study provides an effective and efficient method for identifying genes involved in the pathogenesis of the HT I patient.

Liver regeneration in tyrosinemia model mice

Fah-deficient mice are utilized for a model of persistent liver damage and regeneration for the hepatocyte replacement. Administration of NTBC prevents progression of liver lesions in Fah-deficient mice (17,27). Withdrawal of NTBC leads to liver injury by apoptosis. After the liver damage, liver regeneration proceeds during the administration of NTBC while the progression of the damage is arrested. Thus, the regulation of liver damage and regeneration enables the replacement of hepatocytes in the Fah-deficient liver (27). The model revealed that cell fusion of hematopoietic stem cells with hepatocytes leads to liver regeneration after liver injury (28).

TABLE 1 Genes up- or downregulated in HT I injured liver

Genes downregulated	Genes upregulated
Amino acid metabolism	Apoptosis-related genes
HGA 1,2-dioxygenase	Caspase2
S-adenosyl homocystine hydrazase	Caspase3
Histidine ammonia lyase	Caspase 8
Pyruvate metabolism	Caspase 9
Pyruvate carboxylase	Caspase12
Pyruvate dehydrogenase E1 α	TGF β
Liver function-related genes	Tyrosine metabolism-related genes
Coagulation factor VII	Tyrosine aminotransferase
p450 3a16	Hpd
Flavin-containing monooxygenase	
Liver regeneration	
HGF activator precursor	
Others	
Liver carboxylase precursor	
Nuclear hormone receptor isoform CAR2	
Δ -Aminolevulinic acid dehydratase	

Double mutant (Fah^{-/-}Hpd^{-/-}) mice were used to study the mechanism of visceral injury in HT I. These investigations have provided important information concerning the disease process. The knowledge provided by this model mouse is summarized as follows. The Fah^{-/-}Hpd^{-/-} mice appear normal, at least until the age of 18 mo, and there is no evidence of liver or kidney disease. The complete block of the tyrosine catabolic pathway at the step of Hpd effectively prevents the development of clinical phenotypes. Apoptosis of hepatocytes and renal tubular epithelial cells is a central feature of the visceral injury observed in patients with HT I. Apoptosis of hepatocyte and renal tubular cells is prevented by either of the caspase inhibitors, YVAD or DEVD. However, the inhibitors do not prevent the release of cytochrome c. A systematic approach using microarrays provides an effective and efficient method for identifying the genes involved in the pathogenesis of the HT I patient. HT I model mice were used to show that cell fusion of hematopoietic stem cells with hepatocytes leads to liver regeneration after liver injury. Fah null mice enable this finding after using the liver injury model of HT I. Thus, animal models of tyrosinemia are unique and useful tools to reveal the mechanisms of interest to both clinical and basic science investigation.

Literature Cited

- Berger R, Smit GP, Stoker-de Vries SA, Duran M, Ketting D, Wadman SK. Deficiency of fumarylacetoacetase in a patient with hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta*. 1981;114:37-44.
- Kvittingen EA, Jellum E, Stokke O. Assay of fumarylacetoacetate fumarylhydrolase in human liver: deficient activity in a case of hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta*. 1981;115:311-9.
- Mitchell GA, Lambert M, Tanguay RM. Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill. 1995. p. 1077-106.
- Sakai K, Kitagawa T. An atypical case of tyrosinosis. Part 1. *Jikei Med J*. 1957;2:1-10.
- Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Michaud J, Grenier A, Ogier H, Gauthier M, Lacroix J, Vanasse M, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med*. 1990;322:432-7.
- Lindblad B, Lindstedt S, Steen G. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:4641-5.
- Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. Treatment of hereditary tyrosinemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet*. 1992;340:813-7.
- Phaneuf D, Lambert M, Laframboise R, Mitchell G, Lettre F, Tanguay RM. Type 1 hereditary tyrosinemia: evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a French Canadian patient. *J Clin Invest*. 1992;90:1185-92.
- Awata H, Endo F, Tanoue A, Kitano A, Nakano Y, Matsuda I. Structural organization and analysis of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene in tyrosinemia type I. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994;1226:168-72.
- Gluecksohn-Waelsch S. Genetic control of morphogenetic and biochemical differentiation: lethal albino deletions in the mouse. *Cell*. 1979;16:225-37.
- Ruppert S, Kelsey G, Schedl A, Schmid E, Thies E, Schutz G. Deficiency of an enzyme of tyrosine metabolism underlies altered gene expression in newborn liver of lethal albino mice. *Genes Dev*. 1992;6:1430-43.
- Klebig ML, Russell LB, Rinchik EM. Murine fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) gene is disrupted by a neonatally lethal albino deletion that defines the hepatocyte-specific developmental regulation 1 (hsdr-1) locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1363-7.
- Ruppert S, Bothart M, Bosch F, Schmid W, Fournier REK, Schutz G. Two genetically defined trans-acting loci coordinately regulate overlapping sets of liver-specific genes. *Cell*. 1990;61:895-904.
- Kelsey G, Ruppert S, Beermann F, Grund C, Tanguay RM, Schutz G. Rescue of mice homozygous for lethal albino deletions: implications for an animal model for the human liver disease tyrosinemia type I. *Genes Dev*. 1993;7:2285-97.

15. Grompe M, Al-Dhalimy M, Finegold M, Ou CN, Burlingame T, Kennaway NG, Soriano P. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev.* 1993;7:2298-307.
16. Trigg MJ, Gluecksohn-Waelsch S. Ultrastructural basis of biochemical effects in a series of lethal alleles in the mouse. *J Cell Biol.* 1973;58:549-63.
17. Grompe M, Lindstedt S, Al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, Ou CA, Finegold M. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Nat Genet.* 1995;10:453-60.
18. Endo F, Kubo S, Awata H, Kiwaki K, Katoh H, Kanegae Y, Saito I, Miyazaki J, Yamamoto T, et al. Complete rescue of lethal albino c14CoS mice by null mutation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and induction of apoptosis of hepatocytes in these mice by in vivo retrieval of the tyrosine catabolic pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:24426-32.
19. Endo F, Katoh H, Yamamoto S, Matsuda I. A murine model for type III tyrosinemia: lack of immunologically detectable 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase enzyme protein in a novel mouse strain with hypertyrosinemia. *Am J Hum Genet.* 1991;48:704-9.
20. Endo F, Awata H, Katoh H, Matsuda I. A nonsense mutation in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (Hpd) causes skipping of the constitutive exon and hypertyrosinemia in mouse strain III. *Genomics.* 1995;25:164-9.
21. Kubo S, Kiwaki K, Awata H, Katoh H, Kanegae Y, Saito I, Yamamoto T, Miyazaki J, Matsuda I, et al. In vivo correction with recombinant adenovirus of 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase deficiencies in strain III mice. *Hum Gene Ther.* 1997;8:65-71.
22. Kubo S, Sun MS, Miyahara M, Umeyama K, Urakami K, Yamamoto T, Jakobs C, Matsuda I, Endo F. Hepatocyte injury in tyrosinemia type I is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9552-7.
23. Sun MS, Hattori S, Kubo S, Awata H, Matsuda I, Endo F. A mouse model of renal tubular injury of tyrosinemia type I: development of de Toni Fanconi syndrome and apoptosis of renal tubular cells in Fah/Hpd double mutant mice. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:291-300.
24. Shackel NA, Gorrell MD, McCaughan GW. Gene array analysis and the liver. *Hepatology.* 2002;36:1313-25.
25. Qin L, Qiu P, Wang L, Li X, Swarthout JT, Soteropoulos P, Tolias P, Partridge NC. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem.* 2003;278:19723-31.
26. Tanaka Y, Nakamura K, Matsumoto S, Kimoto Y, Tanoue A, Tsujimoto G, Endo F. Gene expression profiles of homogentisate-treated Fah-/-Hpd-/- mice using DNA microarrays. *Mol Genet Metab.* 2006;89:203-9.
27. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000;6:1229-34.
28. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003;422:897-901.

Isolation of Tissue Progenitor Cells from Duct-Ligated Salivary Glands of Swine

SHIROU MATSUMOTO,^{1,5,6} KENJI OKUMURA,^{2,6} AKIRA OGATA,¹
YUICHIRO HISATOMI,¹ AYUMI SATO,^{1,5} KIYOKO HATTORI,^{1,5}
MITSUHITO MATSUMOTO,⁴ YUJI KAJI,⁴ MASASHI TAKAHASHI,⁴
TETSURO YAMAMOTO,³ KIMITOSHI NAKAMURA,² and FUMIO ENDO^{1,2}

ABSTRACT

Tissue stem cells participate in the repopulation of tissue after injury. Tissue injury stimulates the normally quiescent tissue stem cells to differentiate and proliferate, in the process of replacing and/or repairing the damaged cells, and hence effecting tissue regeneration. The salivary glands retain the ability for frequent regeneration. Previously, we isolated progenitor cells from the injured salivary glands of mice and rats that differentiated into hepatic and pancreatic lineages. The isolated progenitors were CD49f-positive and intracellular laminin-positive, and proliferated on type I collagen while maintaining their multipotency. In this study, we analyzed the tissue stem cells induced by ligating the main excretory duct of the salivary gland in swine. After duct ligation of the gland, acinar cells receded due to apoptosis, and epithelial cells subsequently proliferated. We cultured cells obtained from the duct-ligated salivary gland and purified the cells by limited dilution. The isolated cells were positive for CD29, CD49f, intracellular laminin, AFP, CK19, CK18, and Thy-1(CD90), and weakly positive for c-Kit (CD117). After three-dimensional formation, the cells expressed insulin and albumin. We designated the cells as swine salivary gland-derived progenitor cells. Gene expression of insulin and albumin was significantly increased (five-fold) and that of insulin was also increased (3.8-fold) with differentiation medium with nicotinamide and/or GLP-1 treatment in spherical culture. The expressions of albumin and insulin were 1/10-fold and 1/4-fold compared to porcine hepatocytes and pancreatic endocrine cells. The differentiated SGP cells could release insulin, which were stimulated by glucose and potassium. These results indicate that swine SGP cells could differentiate into hepatocytes and β -cells, functionally. Swine SGP cells were useful tools for therapy and analyzing endodermal regenerative models in large animals.

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

²Department of Pediatrics, Kumamoto University School of Medicine, ³Department of Molecular Pathology, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, ⁴Department of Animal and Grassland Research, National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, ⁵The 21st Century COE "Cell Fate Regulation Research and Education Unit," Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

⁶JSPS (the Japan Society for the Promotion of Science) Research fellow.