

200834008A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に 関する調査研究

平成20年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成21(2009)年3月

研究代表者

衛 藤 義 勝

(東京慈恵会医科大学遺伝病(ライソゾーム病)研究講座)

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ライソゾーム病(ファブリ病含む)に関する調査研究班

平成 20 年度総括・分担研究報告書

平成 21(2009)年 3 月

研究代表者

衛 藤 義 勝

目 次

はしがき	1
研究組織	2
総括研究年度修了報告	3
ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究 研究代表者 衛藤義勝	
付 1 平成 20 年度班会議プログラム	11
分担研究年度修了報告	
I. ライソゾーム病臨床像の把握	
1) ムコ多糖症患者における健康関連 QOL の調査研究	15
坪井 一哉(名古屋セントラル病院血液内科)	
2) 糖原病 II 型(GSD II、Pompe 病)およびムコ多糖症 I 型(MPS I、Hurler 病)、 ムコ多糖症 II 型(MPS II、Hunter 病)の新生児スクリーニング方法に関する研究	24
北川 照男((財)東京都予防医学協会)	
3) ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究(ろ紙血を用いたファブリー病の スクリーニングについて)	29
遠藤 文夫(熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野)	
4) ムコ多糖症における耳鼻科領域治療の検討	31
奥山 虎之(国立成育医療センター臨床検査部)	
5) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療	35
鈴木 康之(岐阜大学医学部 医学教育センター)	
6) アイセル病、ムコリビドーシス III 型の自然歴について	37
高柳 正樹(千葉こども病院代謝内分泌科)	

II. ライソゾーム病の病態解析

- 1) 日本人ムコリビドーシスⅡ/Ⅲの病態解明 41
酒井 規夫(大阪大学大学院系医学研究科 小児発達研究講座)
- 2) Gaucher 病の原因変異は Parkinson 病の遺伝的危険因子である 44
辻 省次(東京大学大学院脳神経医学専攻神経内科学)
- 3) ニーマンピック病A/B型の病態・治療に関する研究 46
高橋 勉(秋田大学医学部 小児科学)
- 4) ムコリビドーシスⅢ型成人患者の不随意運動に関する研究 49
芳野 信(久留米大学医学部小児科学教室)
- 5) サボシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析 51
松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所)
- 6) アガルシダーゼ・アルファとベータの血漿中および末梢リンパ球中の動態 56
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)
- 7) 血中 α -ガラクトシダーゼ活性および蛋白量の新規測定法の開発とその臨床応用 58
櫻庭 均(明治薬科大学 分析化学教室)
- 8) ペルオキシソーム病(ALDを除く)に関する診断・病態解明に関する研究 61
下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野)
- 9) ペルオキシソーム膜形成の分子病態解析 64
今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学講座)

III. ライソゾーム病の新規治療法の開発

- 1) ゴーシェ病の中樞神経症状に対する新しい治療法の開発：
正常マウスへ N-octyl- β -valienamine (NOV) を経口投与した時の臓器への
NOV の移行と臓器での酵素活性 69
大野 耕策(鳥取大学医学部 脳神経小児科学)
- 2) 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 72
難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター)
- 3) 疾患モデルマウスに対するシャペロン療法の臨床評価 74
鈴木 義之(国際医療福祉大学大学院)

4) ライソゾーム病の遺伝子治療	77
島田 隆(日本医科大学生化学・分子生物学)	
5) ムコ多糖症Ⅶ型、クラッペ病への遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究	80
小林 博司(東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部)	
6) 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的研究と標準的移植法確立 に関する研究	82
加藤 俊一(東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学)	
研究成果一覧	87

は し が き

平成 20 年度は本研究班の 2 年目の年となります。ライソゾーム疾患並びにペルオキシゾーム病の病態解明並びにシャペロン治療、細胞治療・遺伝子治療等新しい治療法の開発、酵素補充療法の効果並びに問題点に関して研究成果を上げることが出来ました。又ライソゾーム病モデルマウス、ファブリ病、Sly 病、クラベ病マウスでの iPS 細胞樹立に成功できたことは今後ライソゾーム病の病態解析、並びに治療法の開発に大きく貢献するものと考えられます。本研究班はライソゾーム病の調査研究、病態・メカニズムの解析、新規治療法開発、の 3 つの研究の柱で成り立ち、ライソゾーム病全体で多くの成果を上げることが出来ました。

これも班員ならびに研究協力者の皆様、更にご協力いただきました患者様、ご家族、関係者の方々のお力によるものと深く感謝いたします。本研究がライソゾーム病関連疾患で苦しむ方々やご家族のために少しでもお役に立てることを心から祈念しております。

平成 21 年 3 月 吉日
研究代表者 衛藤 義勝

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究組織

氏名	所属	職名	分担研究課題
研究代表者 衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学 遺伝病(ライソゾーム病)研究講座	教授	総括・新しい治療法の開発
分担研究者 鈴木 義之	国際医療福祉大学大学院	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
芳野 信	久留米大学 医学部 小児科学	教授	バイオマーカーの開発
田中あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科 医学部 発達小児医学	准教授	先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的調査 研究と標準的移植法確立に関する研究
島田 隆	日本医科大学 生化学・分子生物学講座	教授	新しい治療法の開発(遺伝子治療)
酒井 規夫	大阪大学大学院医学系研究科 小児発達医学講座	講師	病態に関する研究
高橋 勉	秋田大学 医学部 小児科学	教授	臨床学的研究
高柳 正樹	千葉県こども病院 代謝科	医療局長	臨床学的研究
大野 耕策	鳥取大学医学部 脳神経小児科学	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
辻 省次	東京大学大学院医学系研究科 医学部 神経内科学	教授	病態に関する研究
難波 栄二	鳥取大学 生命機能研究支援センター	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
鈴木 康之	岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター	教授	ADL,QOLに関する研究
櫻庭 均	明治薬科大学 分析化学研究室	教授	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
北川 照男	東京都予防医学協会	理事長	新しい診断法の開発(マスキリーニング法)
奥山 虎之	国立成育医療センター 臨床検査部	部長	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
坪井 一哉	名古屋セントラル病院 血液内科	医 長	ADL,QOLに関する研究
松田 純子	東海大学 糖鎖科学研究所	准教授	新しい治療法の開発(骨髄移植)
加藤 俊一	東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学	教授	先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的調査 研究と標準的移植法確立に関する研究
遠藤 文夫	熊本大学大学院医学薬学研究部 小児科学	教授	新しい診断法の開発 (マスキリーニング法)
下澤 伸行	岐阜大学生命科学総合研究支援セ ンターゲノム研究分野	教授	ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病の ADL,QOL に関 する研究
今中 常雄	富山大学大学院医学薬学研究部 分子細胞生物学	教授	病態に関する研究(ペルオキシゾーム病に関する)
小林 博司	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	講 師	新しい治療法の開発(遺伝子治療)

総括研究報告書

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究

研究代表者

衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学 遺伝病(ライソゾーム病)研究講座)

研究要旨

本年度はライソゾーム蓄積疾患(LSD)調査研究の第二年目の報告として、従来掲げてきた三つのテーマ、I. LSD 臨床像の把握、II. LSD 病態の解析、III. LSD 治療法の解析に沿って更に新しい検討が多数加えられた。臨床像ではムコ多糖症(MPS)での QOL、Pompe, MPSI, MPS II および Fabry 病におけるスクリーニング、MPS に対する耳鼻科領域治療、イソフラボン治療の実態調査、I-Cell 病、ムコリビドーシス(ML)の自然歴について。解析では ML の遺伝子解析、Parkinsonism と Gaucher 病遺伝子 GBA との関連、ニーマンピック A/B の病態、サボシン C ノックアウトマウス作製、アガルシダーゼアルファ・ペータの動態、血中アルファガラクトシダーゼ活性新規測定法、ペルオキシゾーム病の診断・病態解析について。治療法では Gaucher 病、fabry 病、GM1 ガングリオシドーシスにおけるケミカルシャペロン療法、Fabry 病 model に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療、クラッペ病、MPS VII (Sly 病)モデルに対するレンチウイルスを用いた遺伝子治療の検討、骨髄移植について、それぞれ検討が行なわれた。以上から LSD の予後の改善に向けて希望が持てる状況が続いているといえる。

A. 研究目的

本研究の最終目的は LSD 患者の予後、ADL、QOL の改善にあり、この点に関しては前年までと変わらない。この目的のために現時点での臨床像を明らかにし、同時に病態を詳細に解析することで、新たな診断・治療法の開発につなげていく。以上から上記の3つの研究の柱となるテーマが選定され、これらに沿って様々な観点からの研究がなされた。

B. 研究概要

1. 臨床像の把握

- 1) ムコ多糖症患者における健康関連 QOL の調査研究
- 研究結果の概要
ムコ多糖症患者における健康関連 QOL の解析

結果、身体的健康度で著明な低下が認められ、重要な因子として原疾患による骨や関節の異常が考えられた。また、精神的健康度に関しては、16 歳以上の解析では、国民標準値と同等であったが、疾患特異的に調査した結果、病気や治療、結婚、遺伝など多くの不安を抱えていることが明らかになった。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
現在、MPS における酵素補充療法の有効性として、尿中 GAG(ヘパラン硫酸とデルマタン硫酸)の減少、肝脾腫の改善などが報告されている。しかし、検査結果や臨床所見に加え、近年の医療では、患者自身の主観的な評価指標を重要視することが大きな特徴であり、医療の評価においても医療の受け手である患者の視点に立った患者立脚型アウトカムとしての健康関連 QOL の重要性

が考えられるようになり、今後ますます重要になると考えられている。

- 研究の実施経過

平成 16 年度は、当院通院中のライソゾーム病患者を対象に基本的 ADL および健康関連 QOL の調査を行い、予備調査をもとに平成 17 年度より全国調査を開始した。平成 17 年度は、ポンペ病患者を対象に、平成 18 年度は、ゴーシェ病患者を対象に、19 年度は、ファブリー病患者を対象に、健康関連 QOL 調査を行った。また、本年度は、ムコ多糖症患者を対象に QOL 調査を行った。

2) 糖原病 II 型(GSD II、Pompe 病)およびムコ多糖症 I 型(MPS I、Hurler 病)、ムコ多糖症 II 型(MPS II、Hunter 病)の新生児スクリーニング方法に関する研究

- 研究結果の概要

平成 19 年度に引き続き、新生児およびハイリスク対象者の濾紙血液を用いて、lyso-somal acid α -glucosidase および α -iduronidase の活性を 4-methylumbelliferylly 誘導体の蛍光基質を用いて測定し、GSD II と MPS I のスクリーニングを行った。本年度は、新たに iduronide-2-sulfatase (IDS) に対するポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートを用いた蛍光基質 4-MU による IDS 活性の測定法を確立し、さらにこの固相化プレートを利用して IDS 蛋白を測定する DELFIA 法を確立し、MPS II のスクリーニングも行った。

研究により得られた成果の今後の活用・提供

次年度はこれらの方法を用いて、新生児およびハイリスク対象者の乾燥濾紙血液による GSD II、MPS I および MPS II、3 疾患の試験的マルチプルスクリーニングを継続して行う予定である。わが国ではこれら 3 疾患の発生頻度はいまだ明らかにされておらず、新生児期に発見して早期治療を行った報告はまだ行われていない。この試みでは、検査陽性者について診断を確定して医療機関に報告し、適切な治療を行うように依頼すると共

に、新生児における各疾患の発生頻度を明らかにする。

- 研究の実施経過

本年度のスクリーニング成績は、保護者からインフォームドコンセントの得られた正常対照新生児の乾燥濾紙血液 352 名および GSD II 患者 6 名、GSD II が疑われるハイリスク対象者 4 名、MPS I 型患者 7 例、ハイリスク対象として第一子が MPS I 患者であった第二子、および MPS II 患者:重症型 1 名、軽症型 1 名を検査し、すべての疾患で患者と正常対照群とに著しい差があることを確認し、これらの方法が 3 疾患のスクリーニング法として有用であることを確認した。また、第一子が MPS I であった第二子は正常であった。

3) ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究

(ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニングについて)

- 研究結果の概要

新生児ろ紙血検体を用いてファブリー病のスクリーニングを試みた。説明と同意に基づいて α ガラクトシダーゼ活性を測定した。活性低値の新生児に対して、ファブリー病の説明と遺伝カウンセリングに基づく遺伝子解析を含めた精密検査を行った。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供

ろ紙血を用いた α ガラクトシダーゼ酵素活性の測定は安価で検体の取扱いも容易である。そのため、ファブリー病を疑った場合にはまず試みる検査のひとつとして活用することが可能である。依頼があれば活性の測定を行い、遺伝カウンセリングにも対応している。

- 研究の実施経過

熊本をはじめとする西日本地区において、同意の得られた新生児マススクリーニングろ紙を用いて、蛍光基質法による α ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。任意のカットオフ値より低値

の検体は再採血を行い、再度活性を測定した後、低値の新生児は各地区の先天代謝異常症の専門医による遺伝カウンセリング、精密検査を行っている。

4) ムコ多糖症における耳鼻科領域治療の検討

● 研究結果の概要

ムコ多糖症Ⅰ型の酵素補充療法を最長で約3年6ヶ月間行っており、長期効果の中でも特に聴力および閉塞性呼吸障害についての検討を行った。その結果、酵素補充療法と平行して中耳炎治療や睡眠時無呼吸治療などを組み合わせることにより、症状およびQOLの改善が認められた

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
難聴を発見し、早期から治療していくことは、他疾患でも行われている。ムコ多糖症でも同様に早期治療を行っていくが、今後は酵素補充療法との併用療法も同時に行うべく計画する。

また呼吸障害については、障害の原因となる舌、上気道部、アデノイド、気管などを精査する必要があり、部位毎に評価するべきである。またその原因に応じて保存的あるいは外科的な治療の選択の指標を考案する。

● 研究の実施経過

現在も酵素補充療法は継続して行っており、長期評価としての発達やQOLの向上について調査していく。酵素補充療法における耳鼻科領域の合併症への有効性に関して、難聴、難治性中耳炎については早期からの複合的な治療介入により発達遅滞の進行を防ぐことが可能であり、現在その経過を調査中である。睡眠時無呼吸に関しては症例ごとに治療の選択、組み合わせを考慮する必要があり、酵素補充療法経過中に呼吸障害が軽快、増悪するかを慎重に観察していく。

5) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療

● 研究結果の概要

ムコ多糖症各型90例について、イソフラボン5mg/kgを内服していただき、臨床症状の変化を

検討した。今回は集計のできている21名(Ⅱ型4名、Ⅲ型14名、mucopolipidosis 3例)について解析した。医師・家族の観察から、日常生活動作、睡眠、食欲、理解度などで改善の認められた例がある一方、症状の進行した例もあった。今後、さらに多数例を解析し、治療効果を明らかにして行く予定である。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
造血幹細胞移植、酵素補充療法の補助・代替治療として活用を図る

● 研究の実施経過

平成19年秋より平成20年秋までの1年間におたり、イソフラボンの服用を希望する90例のムコ多糖症患者に対してイソフラボン5mg/kgを内服していただき、臨床症状の変化を検討した。今後、生化学的解析を行う予定である。希望者に対しては研究終了後も内服を継続していただいている。

6) アイセル病、ムコリポドーシスⅢ型の自然歴について

● 研究結果の概要

アイセル病、ムコリポドーシスⅢ型症例についてその生死、ADL、気管切開・人工呼吸器管理の有無などを再調査した。アイセル病の10年生存率は約55%であった。ムコリポドーシスⅢ型には死亡症例はなかった。アイセル病では5年間の観察期間でADLは悪化していた。気管切開フリー・人工呼吸器が年長児の治療に必要であった。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
今後アイセル病に対する新たな治療法が開発されたときには、今回のデータと比較すればその治療法の効果がよりよく評価できるものと思われる。

● 研究の実施経過

今後さらに経年的に今回の症例を追跡することにより、アイセル病の自然歴はより明らかになるものと思われる。

II. 病態解析

1) 日本人ムコリビドーシス II/III の病態解明

● 研究結果の概要

日本人ムコリビドーシス II/III 型と生化学的に診断された症例 40 例について、GNPTAB、GNPTG 遺伝子の解析を行ない、全例に GNPTAB 遺伝子の変異を認めた。全部で 18 種類の変異が見つかり、14 種類が新規変異であり、停止コドンや欠失、挿入、frame shift などの変異がミスセンス変異より多数であることが判明した。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供

R1189X, F374L, dup ex2 などの頻度が高いことが判明し、これによる遺伝子検査による診断法が有用であり、また変異と臨床病型の関連がいくつかの変異については見いだされたため、疾患の予後推定等にも有効と考えられる。

● 研究の実施経過

患者検体を関連施設から患者からの同意のもと、血液ないし皮膚線維芽細胞で集めて、それから DNA, RNA の抽出を行なった。これに対して GNPTAB の全翻訳領域について塩基配列決定法による変異解析を行ない、変異の見つからなかった症例には GNPTG 遺伝子についても解析を行なった。

2) Gaucher 病の原因変異は Parkinson 病の遺伝的危険因子である

● 研究結果の概要

- GBA 遺伝子の resequencing による関連解析を行い、Parkinson 病 (PD) 患者 534 例中 51 例、正常対照 544 例中 2 例に Gaucher 病の原因変異をヘテロ接合性に認め、オッズ比 28.0 倍、Fisher exact test 6.9×10^{-14} と極めて強い関連を得た。個々の変異は多様で稀であった。

- 多様で稀な変異は従来の SNP typing により関連解析では同定が困難であり、次世代シーケンサーを用いた deep resequencing を多数のサンプルで行う必要がある。解析の効率

性を高めるため、exon capture、DNA pooling、barcode-indexing などの技術が必要であると考え、予備的な検討を行っている。

- また *in vivo* での検討のため、GBA 変異の過剰発現トランスジェニックマウスを作成した。
- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
 - 多様で稀な変異が疾患と強く関連する仮説 (common disease-multiple rare variants) の一例である。次世代シーケンサーによる新たな感受性遺伝子探索の方法論の開発を進める。
 - 孤発性 PD の病態解明・治療法開発の手がかりになると考え、モデルマウスの作成を行う。

● 研究の実施経過

関連解析は大阪大学医学部臨床遺伝学教室 戸田達史、国立遺伝学研究所 豊田敦らと共同で行った。次世代シーケンサーによる解析は東京大学新領域創成科学研究科 菅野純夫らと共同で行った。

3) ニーマンピック病 A/B 型の病態・治療に関する研究

● 研究結果の概要

ニーマンピック病 A/B 型の一次病態である細胞内蓄積脂質を、脂質排出に関する遺伝子 (ABCA1、ABCG1 等) を薬剤により活性化することで改善させようとする治療法の開発の試みを行う。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
 - 疾患培養細胞の蓄積脂質を可視化して脂質排出に関する遺伝子発現を調節する薬剤の影響を確立し、蓄積脂質の減少を目指す。

● 研究の実施経過

ニーマンピック病 A/B 型の培養細胞の蓄積脂質 (スフィンゴミエリン、コレステロール) をライセニンおよびフィリピンを用いて可視化した。脂質排泄に関する ABCA1 および ABCG1 遺伝子を

LXR アナログを用いて活性化し蓄積脂質を排泄減少を培養系で試みた。

4) ムコリビドーシスⅢ型患者における不随意運動に関する研究

● 研究結果の概要

従来、ムコリビドーシスⅢ型で不随意運動を伴うことは報告されていない。われわれは不随意運動を伴う本症の1例に遭遇し、不随意運動の機序について解析した。その結果、筋電図解析では上肢拮抗筋の同期、非同期の収縮が認められ、振戦、ミオクローヌスのいずれの要素もあると考えられた。画像上では頸椎レベルで脊髄が圧排された所見がみられた他は特定の部位の異常をみとめず、微視的变化の関与が推測された。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
ムコリビドーシスⅢ型も不随意運動を伴う疾患の鑑別対象となる。

● 研究の実施経過

酵素診断、遺伝子解析による診断を進めるのと平行して筋電図、画像解析を行い上記の結論に達した。

5) サボシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析

● 研究結果の概要

サボシン C ノックアウトマウスの作成に成功し、サボシン C ノックアウトマウスは遅発性の神経変性疾患を発症することを明らかにした。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
サボシン C ノックアウトマウスは、神経型ゴージェ病の典型的な疾患モデルマウスとはならなかったが、明らかな神経変性疾患を発症したことから、今後はその脳病態の分子メカニズムの解明が必要である。

● 研究の実施経過

ヒトのサボシン C 欠損症で報告されている遺伝子変異(サボシン C 領域の5番目のシステインのアミノ酸置換)を mimic したアミノ酸置換を

導入し、サボシン C ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

6) アガルシダーゼ・アルファとベータの血漿中および末梢リンパ球中の動態

● 研究結果の概要

アガルシダーゼ・アルファとベータそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)の製剤をファブリー病男性患者に投与し、血漿中および末梢リンパ球中の α -ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。血漿中および末梢リンパ球中ともにアガルシダーゼ・ベータのほうが高い活性を示したが、半減期には差がなかった。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
今後、症例を増やして検討する。抗体の上昇との関係も比較する。症例によって違いが出れば、各症例に適した薬剤が選択できる。

● 研究の実施経過

現在、1例の患者について結果が得られたところである。さらに症例を増やす予定である。

7) 血中 α -ガラクトシダーゼ活性および蛋白量の新規測定法の開発とその臨床応用

● 研究結果の概要

タイタープレートを用いた血清中の α -ガラクトシダーゼ活性測定法と MUSTag 法を用いた濾紙血中の α -ガラクトシダーゼ蛋白量測定法を開発し、そのファブリー病診療への応用を検討した。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
タイタープレートを用いた血清中の α -ガラクトシダーゼ活性測定法は簡便であり、ファブリー病の一次スクリーニングに利用出来ると考えられる。MUSTag 法を用いた濾紙血中の α -ガラクトシダーゼ蛋白量測定法は、極めて鋭敏であり、酵素補充療法開始時のアレルギー反応出現の予測などに利用出来るかも知れない。

● 研究の実施経過

微量の血清を試料として、タイタープレートで

反応を行わせてプレートリーダーで α -ガラクトシダーゼ活性を測定するシステムを構築した。本法は、従来法と比較して、簡便で、多数の検体を一括処理出来た。また、MUSTag 法を用いて濾紙血中の α -ガラクトシダーゼ蛋白量を測定する方法を開発した。本法は極めて鋭敏で、応用性が広いと期待出来た。

8) ペルオキシソーム病 (ALD を除く) に関する診断・病態解明に関する研究

● 研究結果の概要

ペルオキシソーム病患者の正確な診断を目的に診断パンフレットを作成して全国に配布するとともに、ホームページも公開している。また海外への医療貢献としてサウジアラビア国立病院と提携し、サウジでのペルオキシソーム病診断システムの確立を進めている。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
国内ならびに海外で診断・集積したペルオキシソーム病患者細胞を用いて、新たな疾患単位の発見から病態解明、治療法の実現を行うとともに、得られた知見を国内外の医療機関に提供している。

● 研究の実施経過

国内唯一のペルオキシソーム病診断センターとして1年間に100例以上の患者の血清脂肪酸分析による診断スクリーニングから細胞・タンパク・遺伝子レベルでの正確な診断を行っている。またサウジアラビアの症例も今年度8例の患者細胞を解析・診断している。

9) ペルオキシソーム膜形成の分子病態解明

● 研究結果の概要

ペルオキシソーム膜の形成には、Pex3p と Pex19p との結合が重要であることが示唆された。またその結合には Pex3p の Trp-104 が関与し、そのインドール環が Pex19p の N 末端の疎水性アミノ酸と相互作用している可能性が示唆された。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
ペルオキシソーム膜形成過程のメカニズムに

基づいたペルオキシソーム病治療薬開発のためのアッセイ系の確立に応用する。

● 研究の実施経過

リコンビナント Pex3p と Pex19p を作製し、Pex3p との相互作用に必要とする Pex3p のアミノ酸残基を同定した。また Pex3p と Pex19p との相互作用がペルオキシソーム形成に必須であることを、Pex3p 欠損患者線維芽細胞を用いて明らかにした。

III. 新規治療法の開発

- 1) ゴーシェ病の中樞神経症状に対する新しい治療法の開発：正常マウスへ N-octyl- β -valienamine (NOV) を経口投与した時の臓器への NOV の移行と臓器での酵素活性

● 研究結果の概要

これまで N-octyl- β -valienamine (NOV) (が、ゴーシェ病の原因である変異 β -glucosidase の活性を上昇させることを明らかにした。今回、正常マウスに NOV を経口投与した時、大きな副作用なく、脳を含めた臓器の β -glucosidase 活性が有意に上昇することを確認した。1週間の投与では、急性の毒性はないと評価した。

- 研究により得られた成果の今後の活用・提供
今後ゴーシェ病モデルマウスを用いて適正な投与量を決定し、臨床試験にむかう準備をする

● 研究の実施経過

2002年 NOV の特許申請 (Patent No. 02762961.7-2103-JP0208882) 発明者：小川誠一郎、鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎、大野耕策

2004年 NOV が F213I 変異酵素の活性を上昇させることを報告 (Lin H, et al, BBA)

2007年 NOV が N370S, G202R, N188S 変異の活性も上昇させることを報告 (Lei K et al, BBA)

今後、モデルマウスを用いた治療実験と臨床試験に向けた毒性実験を行う。

2) 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

● 研究結果の概要

β -ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異解析を行い、皮膚線維芽細胞を用いたケミカルシャペロン効果の検討を行った。マウスモデル細胞発現実験系により、遺伝子変異型とケミカルシャペロン効果の相関について検討を行った。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
ケミカルシャペロン効果は遺伝子変異型特異的に効果が認められた。この知見は将来的な臨床応用の際のケミカルシャペロンの適応を判断する上で、有用な情報を与える。

● 研究の実施経過

マウス細胞一過性発現実験により、48種類の β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異に対するケミカルシャペロン NOEV 効果を検討し、16種類の変異型で有意な酵素活性還元効果が認められた。

3) 疾患モデルマウスに対するシャペロン療法の臨床評価

● 研究結果の概要

遺伝子組み換え GM1-ガングリオシドーシスマウスに対するシャペロン NOEV の臨床効果を調べた。このマウスについては、これまで確立した11項目の神経検査法すべてを使う必要がないことが分かった。また少ない投与量でも効果が得られる可能性のあることが分かった。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
慎重な毒性試験のあと、ヒト患者への臨床試験を目指す。

● 研究の実施経過

濃度の異なるシャペロン水溶液をモデルマウスに投与し、神経学的評価により、シャペロン効果を判定した。

3) ライソゾーム病の遺伝子治療

● 研究結果の概要

Fabry 病モデルマウスに対する1型 AAV ベク

ターを使った遺伝子治療の可能性を検討した。ベクター静注後の α -galactosidase A (α -GalA)の発現のレベルや持続はマウスの年齢や性別で大きく異なることが明らかになった。新生仔に対する予防的遺伝子治療の有用性が示された。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
ライソゾーム病に対して行われている酵素補充療法は、繰り返し投与が必要のため、肉体的、経済的負担が大きい。遺伝子治療は一回のベクター導入で長期の治療が可能のため、将来の重要な選択肢になると期待される。

● 研究の実施経過

α -GalA 発現 AAV1 ベクターを成体マウスに経静脈的に投与したところ、オスではベクターの肝臓への選択的導入、肝臓、心臓での高い α -GalAの発現、血清 α -GalAの持続的上昇を認めたが、メスでのベクターの導入効率は低く、明らかな性差を認めた。一方、新生仔への経静脈的投与では性差に関係なく心臓での高い発現と、血清 α -GalA活性の持続的上昇を認めた。

4) ムコ多糖症VII型、クラッペ病への遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究

● 研究結果の概要

ムコ多糖症VII型(MPSVII)、およびクラッペ病は、リソゾーム性分解酵素欠損による常染色体劣性遺伝病である。我々は組替えレンチウイルスを用いたこの二疾患に対する遺伝子治療の検討を進めるため MPSVIIの欠損酵素 HBG(human beta glucuronidase、クラッペ病の欠損酵素 GALC beta-galactosidase)を組込んだレンチウイルスを開発し、培養細胞への導入、更にモデルマウスへの遺伝子導入を試みた。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
今後長期発現が得られた際、問題になる insertional genotoxicity などの安全性の検討も同時に行ないつつ、臨床応用への道を探る。

● 研究の実施経過

まず MPSVIIの欠損酵素 HBG を組込んだレン

チウイルスを作成し、細胞への導入を試みたところ有意な活性上昇を見た。次にクラッペ病の欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスも開発し、細胞株およびマウス新生児での肝臓での発現上昇を見たが、持続的発現および病理上の改善はまだ得られていない。この原因として組替えウイルスカバレッジの低さが大きいと思われ、今回作製方法を変更することで5-7倍のタイターの上昇が得られた。高い効率で骨髄幹細胞へ導入されるレンチウイルスベクターを用いて今後、長期の安定した遺伝子発現を図ることでこれらの疾患の治療の臨床応用への道を探る。

5) 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的研究と標準的移植法確立に関する研究

● 研究結果の概要

東海大学において過去 22 年間に実施された 53 例の先天性代謝異常疾患の成績について詳細に解析し、従来の全国集計と同様に、HLA 適合の同胞または非血縁者からの骨髄移植が最も安定した成績が期待されるという結論が得られた。

● 研究により得られた成果の今後の活用・提供
移植が適応となる症例においては、診断確定後速やかに造血幹細胞移植を考慮した治療計画が立案されることが必要である。

● 研究の実施経過

東海大学において 1986 年～2008 年に造血幹細胞移植が施行された先天性代謝異常疾患の患者 53 例について、その臨床的特徴、移植方法、移植結果、治療効果を検討した。

C. 総合的考察

今回も臨床像把握、病態解析、治療法開発の三つの柱に沿って様々な研究報告が為された。臨床像把握では QOL 調査、スクリーニング法開発に加え MPS の耳鼻科領域治療の現状、イソフラボンによる MPS 治療調査が新たに加わり成果を見ている。ペルオキシゾーム病に関する調査研究は昨年の全国調査による結果を基に、今回は病態解析に研究の主体が移行している。解析ではそのほかムコリビドーシス、ゴーシェ病、ファブリー病に焦点が当てられている。更に新規治療法開発ではシャペロン療法、遺伝子治療、骨髄移植の研究に発展が見られている。今後もこれらの結果を基に、ライソゾーム病の予後改善に向けた調査研究を推進していく方針である。

D. 結論

今回も引き続きライソゾーム疾患の臨床予後、QOL の改善を目指して様々な研究が行なわれた。酵素補充療法がいくつかのライソゾーム疾患で保険適応となり臨床面でも新しい展開を迎えつつある現在、ますます精力的な調査研究を進めていく必要があると思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

各分担研究者の報告書を参照

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生労働省 難治性疾患克服研究事業
ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究班会議

日 時：平成 20 年 11 月 27 日(木)12 時～

場 所：東京慈恵会医科大学 カンファレンスルーム B(オセビル 9 階)

総合司会：小林 博司

12:20

班長挨拶 衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学)

ご挨拶 海老名英治(厚生労働省健康局疾病対策課)

12:30

I. ライソゾーム病の病像

座長：遠藤 文夫、奥山 虎之

1) I-cell 病のナチュラルヒストリー

：高柳正樹(千葉県こども病院)

2) Pompe 病、MPS I および MPS II のスクリーニング法について

：北川照男、鈴木 健、石毛信之(東京都予防医学協会)

3) ムコ多糖症に対する酵素補充療法およびマススクリーニングに対する患者家族の意識

：奥山虎之(国立成育医療センター)

4) ムコ多糖症患者における健康関連 QOL の調査研究

：坪井一哉(名古屋セントラル病院)

5) ろ紙血検体を用いたファブリー病のスクリーニング

：服部希世子、中村公俊、遠藤文夫(熊本大学大学院医学薬学研究部)

13:20

II. ライソゾーム病の病態解析

座長：難波 栄二、酒井 規夫

6) ムコリピドーシス III 型患者にみられる不随意運動の電気生理学的解析

：芳野 信(久留米大学)

7) 日本人ムコリピドーシス II, III の病態解析

：酒井規夫(大阪大学)

- 8) ニーマンピック病の細胞内スフィンゴミエリン蓄積とその細胞外排出に関する研究
：高橋 勉、平井大士(秋田大学)
- 9) 次世代シーケンサーを用いた、パーキンソン病の疾患感受性遺伝子の探索子
：三井 純、高橋祐二、後藤 順、辻 省次(東京大学神経内科)
鈴木 譲、菅野純夫(東京大学医科学研究所)
- 10) 超高感度多項目解析システム MUSTag を利用したファブリー病の診断索
：櫻庭 均(明治薬科大学)
- 11) サボシン C 欠損マウスは神経変性疾患を発症する
：松田純子(東海大学未来科学技術共同研究センター)
- 12) ペルオキシソーム病の診断および病態解明に関する研究
：下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター)
- 13) ペルオキシソーム膜形成の分子病態解析
：今中常雄、柏山恭範、守田雅志(富山大学大学院・医学薬学研究部)

★ ☆ 休 憩 ☆ ★

15:00

Ⅲ. ライソゾーム病の治療

座長：大橋 十也、鈴木 義之

- 14) モデルマウスにおけるケミカルシャペロン療法の臨床効果
：鈴木義之(国際医療福祉大学)
- 15) ムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型の酵素補充療法の経過
：田中あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科)
- 16) 異染性白質ジストロフィーの新生児遺伝子治療
：三宅紀子、三宅弘一、島田 隆(日本医科大学)
- 17) ゴーシェ病の中樞神経系症状への治療法の開発
ー薬理的シャペロンのマウス個体に対する影響ー
：大野耕策、夔 卓、二宮治明(鳥取大学医学部)
久保孝利、飯田真巳(生化学工業株式会社中央研究所)
鈴木義之(国際医療福祉大学)

18) ベータ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効果の検討
：難波栄二、檜垣克美、李林静(鳥取大学生命機能研究支援センター)

19) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療
：鈴木康之、折居恒治、田中あけみ、奥山虎之、戸松俊治、折居忠夫
(岐阜大学医学教育開発研究センター、岐阜県総合医療センター、大阪市立大学、
国立成育医療センター、折居クリニック)

20) レンチウイルスを用いた遺伝子導入効率の検討
：小林博司(東京慈恵会医科大学)

16:20

研究費経理の処理に関して

相澤敏之(東京慈恵会医科大学研究支援課)

分担研究報告書

I. ライツゾーム病臨床像の把握