

## イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療

分担研究者：鈴木 康之(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)

### 研究要旨

ムコ多糖症各型に対するイソフラボンの効果を検討した。イソフラボン 5mg/kg をⅡ型 4名、Ⅲ型 14名、mucopolidosis3例に投与し、臨床症状の変化を検討した。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。

### 研究協力者

倉坪和泉(岐阜大学大学院小児病態学)

折居忠夫(折居クリニック)

折居恒治(岐阜県総合医療センター)

加藤智美(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)

### A. 研究目的

ムコ多糖症は骨変形、関節拘縮、肝脾腫、聴力障害、閉塞性呼吸障害、中枢神経障害などを特徴とする一群の遺伝病であり、造血幹細胞移植や酵素補充療法によって治療できる病型があるが、未だ治療法のない病型もあり、神経症状に関しては無効と考えられている。イソフラボンはムコ多糖の合成を抑制し、Ⅲ型に対する効果が期待されている。今回、ムコ多糖症各型に対するイソフラボンの効果を検討したので報告する。

### B. 研究方法

ムコ多糖症Ⅱ型 4名、Ⅲ型 14名、mucopolidosis 3例に対し、イソフラボン 5mg/kg を半年間投与し、身体所見、行動異常、睡眠障害、言語能力、理解力、運動能力、日常生活動作の変化を観察した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1) 医師の観察記録

	Ⅲ型 (14名)		Ⅱ型 (4名)		ML (3名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
騒音呼吸	1名			2		
肝腫	2名	1			1	
脾腫	1名	1				
行動異常	1名	3				
睡眠障害	4名	2				

#### 2) 保護者の観察記録

	Ⅲ型 (14名)		Ⅱ型 (4名)		ML (3名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
ことば	2名	2			1	
理解力	1名	1	2		2	
活動性	1名	2	2			
行動異常		2				
睡眠	3名	3	3		1	
痛み		1				
歩行		1		1		
手の動き	1名			1		
関節の動き	2名		1			1

	Ⅲ型 (14名)		Ⅱ型 (4名)		ML (3名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
呼吸(昼)	1名		1			
呼吸(夜)	1名	1	1			
感染		1	2			1
視力	1名			1		
聴力		1				
皮膚		1	1			
毛髪	3名	1			2	
食欲	3名		1			1
排便	3名				1	

### 3) 日常生活動作 (FIM)

	III型 (14名)		II型 (4名)		ML (3名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
運動面	2名	1			1	
認知面	3名	0		1		
総合	3名	1		1	1	1

### 4) 簡易知能検査 (BAE)

	III型 (14名)		II型 (4名)		ML (3名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
総合	2名	3				2

### 5) 観察に関する自由記載

- 手首の関節が伸びる様になった。以前に比べて表情が良く、昼間は目がパッチリしている。(III型、27歳)
- 「お母さん」と生まれて初めて言った。30分間、体を起こして座っても SPO<sub>2</sub>が下がらなくなった。(III型、16歳)
- 少し活発になっている。夜中に目を覚ます事が増えた。食欲が出てきている。便器に少し座る事が出来る様になった。(III型、8歳)
- ブロックの積み木を組み合わせる様になった。緊張が改善しソファにもたれる事が出来る様になった。(III型、8歳)
- かむ癖が悪化。意味のある言葉が減っている。鼻閉がなくなってきた。呼吸も楽になっている。(III型、6歳)
- 少しずつ言葉のまねが増えてきた。動く範囲が広がってきている。食欲が前よりある。(III型、4歳)
- 髪の毛がさらっとしてきた。便通が落ち着いてきた。気管カニューレの部分がしっかりしてきた。(ML、24歳)

- 髪と鼻が少し柔らかくなった。(ML、9歳)

### D. 考察

イソフラボン服用前と服用後6か月の状態を比較検討した。現段階では症例数が少なく、一定の傾向を認めないが、症状の改善を認めるケースと、進行するケースが認められた。保護者の自由記載から、何らかのメリットがあると推測された。今後、尿中・血中 MPS、genistein 血中濃度、毛髪形態などの客観的データを検討し、服用量についても検討して行きたい。

### E. 結論

イソフラボンはムコ多糖症の補完・代替治療として有望である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kuratsubo I, Suzuki Y, Orii KO, et al : Psychological Status of Patients with Mucopolysaccharidosis Type II and their Parents. Pediatrics International (in press)

#### 2. 学会発表

- 1) 鈴木康之: イソフラボンの治療効果<中間集計結果>. 第12回日本ムコ多糖症研究会, 東京, 2008.8.22

### H. 知的所有権の取得状況

なし

## アイセル病、ムコリビドーシスⅢ型の自然歴について

分担研究者：高柳 正樹(千葉県こども病院 医療局長)

### 研究要旨

5年前の当研究班の全国調査により把握された、アイセル病、ムコリビドーシス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。

新規の症例を加えて作成したアイセル病の生存曲線では、10年生存率は約55%であった。ムコリビドーシスⅢ型には死亡症例はなかった。

多くのアイセル病症例では5年間でADLは悪化している。ADLは早期から非常に悪い群と、年齢依存性に悪化していく群とに分けられた。

気管切開フリー・人工呼吸器フリーの期間についてグラフ化して表した。

アイセル病の自然歴は非常に重篤で生存年数も短い。年長になると気管切開、人工呼吸器などによる管理が必須となる。

研究協力者氏名・

酒井 規夫(大阪大学医学部小児科講師)

田中あけみ(大阪市立大学医学部小児科準教授)

芳野 信(久留米大学医学部小児科教授)

方法：症例の生死、ADL、気管切開・人工呼吸器管理の有無を調査表を用いて調査した。調査表の配布、回収は郵送を用いた。ADLの評価表は前回の全国調査と同じものを用いた。

### A. 研究目的

アイセル病やムコリビドーシスⅢ型は日本人においては比較的症例数の多いライソゾーム病である。しかしながらその自然歴については、ほとんど知られていないのが現状である。

これら疾患の自然歴の検討は、疾患の現状の把握のみならず、今後これら疾患の治療法が開発されたときの、治療法の効果の評価にも有効なものになると考えられる。

### B. 研究方法

対象：5年前の当研究班の全国調査により把握された、アイセル病、ムコリビドーシスⅢ型症例と問い合わせをした施設で新しく経験した症例を対象とした。今回の調査対象はアイセル病13例、ムコリビドーシスⅢ型7例であった。

(倫理面への配慮)

氏名はイニシャルで記載し、個人が特定できないこととした。

### C. 研究結果

アイセル病、ムコリビドーシスⅢ型症例の生存曲線を作成した。アイセル病の生存曲線を図1に示した。10年生存率は約55%であった。

ムコリビドーシスⅢ型は今回調査した7例全例が生存していた。

図2にアイセル病の症例のADLを示した。多くのアイセル病症例のADLは加齢に伴って経年的に悪化していく。ごく一部の症例は1-2歳といたきわめて年少のときから低いADLを示す。これは個々の症例の重症度に関連していると考えられた。

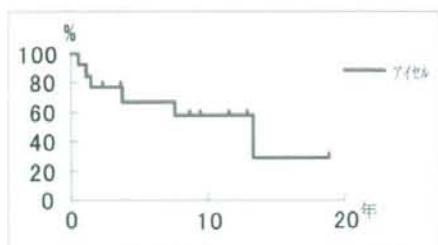


図1 アイセル病の生存曲線

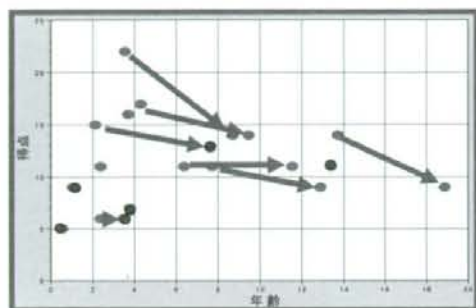


図2 アイセル病のADLの推移

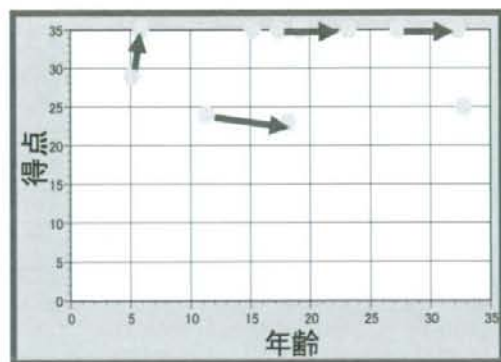


図3 ムコリポドーシスⅢ型のALDの推移

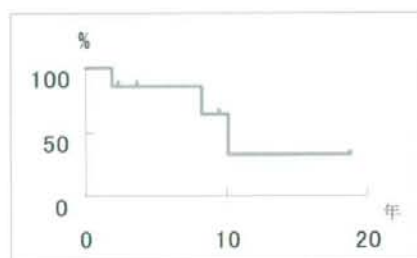


図4 生存しているアイセル病での気管切開フリー曲線

図3にムコリポドーシスⅢ型のADLを示した。多くの症例でADLは良好である。5年の経過ではADLは不変または改善していた。

図4にアイセル病生存症例における、気管切開フリーの曲線を示した。5歳では85%が、10歳では30%の気管切開フリーとなった。

人工呼吸器フリー曲線も製作したが症例数が少なく不正確だが、10歳では20%の症例のみが人工呼吸器フリーとなる事になった。

#### D. 考察

アイセル病の自然暦を調査したが、10歳で約半数の症例が死亡し、さらにADLも加齢に従い経年的に悪化していくことがわかった。年長になると気管切開、人工呼吸器などによる管理が必須となることも判明した。今後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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 分担研究報告書

## Ⅱ. ライソゾーム病の病態解析

## 日本人ムコリビドーシスⅡ/Ⅲの遺伝子解析

(分担)研究者: 酒井 規夫(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座)

### 研究要旨

リソソーム病の一つであり、著明な骨病変、心弁膜症、神経症状を来すムコリビドーシスは我が国に多い疾患とされるが、日本人患者 40 人に対して原因遺伝子 GNPTAB, GNPTG の解析を行った。遺伝子変異と臨床病型の比較を行なった結果、いくつかの高頻度変異についてその臨床病型との関連が判明した。

### A. 研究目的

ムコリビドーシスⅡ/Ⅲの遺伝子解析;日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。検体は全国専門施設から協力を得て、入手可能なものを解析して日本人の変異の特徴を解明することを目標とした。

### B. 研究方法

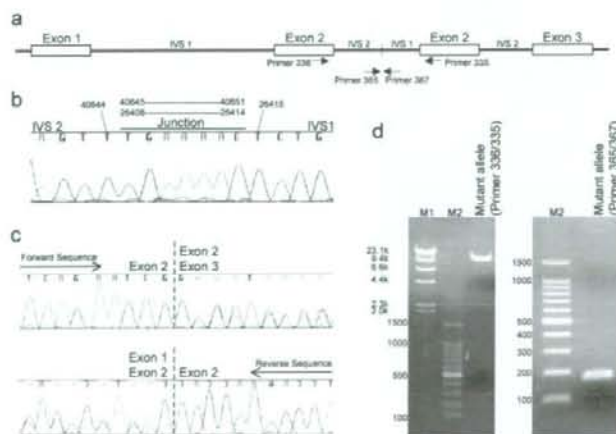
I-cell 病の患者 40 人について、同意取得の上皮膚生検を行い、その培養皮膚線維芽細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子の増幅を行い、GNPTAB 遺伝子の全翻訳領域を塩基配列決定を行った。一部は凍結細胞から直接 RNA を抽出して実験を行った。また各変異はゲノム DNA を用

いて確認を行った。

### C. 研究結果

I-cell 病患者 25 名とやや軽症で MLⅢと考えられる患者 15 名に関して、GNPTAB 遺伝子の変異を解析し、下表のような結果を得た。変異を認めなかった症例に関しては GNPTG についても解析した。

これにより、日本人における変異も停止コドン、frame shift が大半であり、なかでも R1189X 変異はアリアル頻度で 41%に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられる。またいくつかのミスセンス変異は MLⅢに見いだし、片方でもこの変異の場合表現型が軽症となると考えられた。



また、dup ex2 変異は2つのアレル間における組み替えによって起こったと考えられる特殊な変異であり、日本人に比較的多く見つかる新規突然変異であった。

#### D. 考察

ムコリビドーシスは典型的なものがII型(I-cell病)、軽症のものがIII型と呼ばれるが、GPTAB遺伝子の変異はその両者に見られ、日本人においても停止コドン、frame shift 変異が多いことが判明した。また F374L, dup ex2 などの変異を持つ場合には比較的軽症のIII型になると考えられ、予後推定にも役立つと考えられる。

#### E. 結論

ムコリビドーシスは日本人に多い疾患であり、本研究において日本人における大多数の患者の変異解析の情報が解明され、遺伝子型表現型の相関関係が明らかになった。これから遺伝子診断の実施が確定診断のみならず、病型診断にも役立つと考えられる。今後は変異と細胞レベルでの病態解明の基礎情報となると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokimasa S, et al : Umbilical cord-blood transplantations from unrelated donors in patients with inherited metabolic diseases : Single-institute experience., *Ped Transplant*, 12(6) : 672-6, 2008
  - 2) Gordillo M, et al. : The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity., *Hum Mol Genet*, 17(14) : 2172-80, 2008
  - 3) Nabatame S, Taniike M, Sakai N, et al. : Sleep disordered breathing in childhood-onset acid maltase deficiency. *Brain Dev*. 2008.5.19. [Epub ahead of print]
  - 4) Kubota T, et al. : Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd., *J Bone Miner Res*, 23(10) : 1661-71, 2008
  - 5) Takanobu Otomo, et al : Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype phenotype correlation, *J Hum Genet* (in press)
- #### 2. 学会発表
- 1) 新谷 研, 北井征宏, 星野奈津子, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛史, 毛利育子, 酒井規夫, 谷池雅子, 大藪恵一: 臍帯血幹細胞移植を施行した Hunter 症候群の中樞神経系における組織学的検討. 第50回日本小児神経学会, 東京, 2008.5.28-30
  - 2) 富永康仁, 森田祥子, 北井政宏, 新谷 研, 下野九理子, 沖永剛志, 酒井規夫, 永井利三郎, 大藪恵一: 糖原病2型(Pompe病)の若年型症例に対する酵素補充療法. 第50回日本小児神経学会, 東京, 2008.5.28-30
  - 3) 森田祥子, 赤木幹弘, 毛利育子, 加藤久美, 北井征宏, 新谷 研, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛志, 酒井規夫, 谷池雅子, 大藪恵一: Novel mutationによる giant axonal neuropathyの長期経過. 第50回日本小児神経学会, 東京, 2008.5.28-30
  - 4) 前木孝洋, 北井征宏, 藤原 誠, 別所一彦, 虫明総一郎, 下野九理子, 沖永剛史, 酒井 規夫, 大藪恵一: 喉頭軟化症を合併し急激な呼吸状態悪化を繰り返す Gaucher 病の1例. 第4回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2008.7.5
  - 5) 浦崎麻理恵, 大友孝信, 酒井規夫, 大藪恵一: 異染性白質ジストロフィーの原因遺伝子 ASA の pseudodeficiency の国内頻度について. 第4回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2008.7.5
  - 6) 大友孝信, 酒井規夫, 大藪恵一: 日本人ムコリ

ピドーシスⅡ/Ⅲ型 40 例の遺伝子解析. 第 50  
回日本先天代謝異常学会, 米子

- 7) Norio Sakai : Pathogenesis of leukodystrophy  
for Krabbe's disease - molecular mechanism

and clinical treatment, 3<sup>rd</sup> German-Japanese  
Symposium Paediatric Neurology, 8<sup>th</sup> - 10<sup>th</sup>  
Munich, Germany, 2008.9



## ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究

分担研究者：辻 省次(東京大学 神経内科 教授)

### 研究要旨

候補遺伝子を網羅的に resequencing することにより、GBA 遺伝子の多様で稀な病原性変異が Parkinson 病(PD)と関連することを示した。この結果は従来の SNP typing による関連解析では同定が困難な「多様で稀な変異が疾患と強く関連する」一例である。また、PD の病態解明・治療につながる重要な手がかりである。

分担研究者氏名・所属機関名及び

所属機関における職名

三井 純 東京大学神経内科 大学院生  
高橋祐二 東京大学神経内科 助教  
後藤 順 東京大学神経内科 講師  
辻 省次 東京大学神経内科 教授  
戸田達史 大阪大学臨床遺伝学 教授  
豊田 淳 国立遺伝学研究所  
菅野純夫 東京大学新領域創成科学研究科 教授

### A. 研究目的

我々は GBA 遺伝子が PD と関連することを示してきた。本年度は以下を目的とした。

- 1: 次世代シーケンサーを用いた関連解析を進めるためデザインの予備検討を行う
- 2: 病態解明・治療法開発を目指すためモデルマウス作成を行う

### B. 研究方法

- 1: 既に resequencing されているサンプルと領域を用いて DNA pooling を行い、次世代シーケンサーで解析した。
- 2: GBA 変異過剰発現マウスを作成する。  
(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得て、匿名化の上、解析された。

### C. 研究結果

- 1: 次世代シーケンサーの error rate から、全てのサンプルの変異を網羅的に同定するため必要な DNA pooling の水準を得た。
- 2: 過剰発現マウスの作成に成功した。

### D. 考察

- 1: DNA pooling による解析サンプル数拡大が可能になった。今後、exon capture 法による解析領域の拡大、barcode-indexing 法による解析サンプル数拡大を目指す。
- 2: 表現系解析・病理学的解析に進む。

### E. 結論

関連解析により、ライソゾーム病である Gaucher 病と神経変性疾患である PD の関連が確立された。さらなる疾患感受性遺伝子の同定および、モデルマウスの解析は、PD および Gaucher 病の病態理解・治療に大きく寄与するものと考えられる。

### F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al :  
Mutations for Gaucher disease confer a high  
susceptibility to Parkinson disease. Arch  
Neurol (in press)

2. 学会発表

- 1) Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al :  
Heterozygous Rare Variants Associated with  
Gaucher Disease Confer Robust

Susceptibility to Parkinson Disease. The  
60<sup>th</sup> American Academy of Neurology  
Annual Meeting. Philadelphia, 2008.4

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

## ニーマンピック病 A/B 型の病態・治療に関する研究

分担研究者：高橋 勉(秋田大学医学部教授)

### 研究要旨

ニーマンピック病 A/B 型の主要病態は、酸性スフィンゴミエリナーゼ異常により酵素基質スフィンゴミエリンが細胞内に蓄積することである。またスフィンゴミエリンと親和性の高い遊離コレステロールの二次的な蓄積もみられる。最近、ライソゾーム酵素異常症において種々の戦略で蓄積基質を減少させる治療法の臨床効果が示されている。細胞内脂質(主にコレステロールやリン脂質)排泄に関連する ABCA1 および ABCG1 遺伝子の研究報告が多いが、LXR アナログが両遺伝子を活性化し細胞からのコレステロール排泄を促すことが報告されている。コレステロール排泄にはスフィンゴミエリン排泄促進も伴うことが期待できる。本研究では、ニーマンピック病 A/B 型細胞に対して LXR アナログを用いて ABCA1 および ABCG1 遺伝子を活性化し、蓄積脂質スフィンゴミエリン/コレステロールの排泄を促す研究を培養系で試みた。脂質蓄積の程度の評価には、ライセニンを用いたスフィンゴミエリン染色とフィリピンを用いたコレステロール染色を行った。LXR アナログの蓄積脂質減少効果が観察された。

### A. 研究目的

ニーマンピック病 A/B 型はライソゾーム酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼの欠損が原因の疾患であり、一次病態は細胞内への脂質蓄積である。最近、病態の似たゴーシェ病で、脂質蓄積を間接的に減少させる薬物療法(miglustat)が臨床的な効果を示したことから、ニーマンピック病でも同様の方策が治療戦略の一つになる可能性がある。

ニーマンピック病で蓄積するスフィンゴミエリン/コレステロールに関して、細胞内輸送あるいは細胞外排泄に関する遺伝子群が発見され、現在、知見が蓄積されてきている。その中で ABC(ATP-binding cassette)蛋白 ABCA1 と ABCG1 がスフィンゴミエリン/コレステロールの細胞外排出に関係し LXR アゴニストが、発現調節薬として働くことが知られている。我々のこれまでの研究で、ニーマンピック病 A/B 細胞においては

ABCA1 および ABCG1 遺伝子の発現量が、正常細胞に比べて有意に(1/10 以下)低下していることを明らかとした。したがって二次的に細胞外コレステロール/スフィンゴミエリン排出が低下していることが考えられる。実際、ニーマンピック病患者では低 HDL 血症が特徴的な検査所見として観察されており、細胞レベルでの脂質排泄低下と合致している。

本研究ではニーマンピック病 A/B 型の培養細胞を用い、蓄積脂質の状態を観察することを目的に、免疫化学的手法を用いて蓄積脂質を可視化/定量化し、ABCA1/ ABCG1 蛋白を調節することで蓄積脂質の排泄を促す治療法の可能性を検討した。

### B. 研究方法及び結果

#### 1. 蓄積脂質の可視化/定量化

正常およびニーマンピック病 A/B 型患者の培養皮膚線維芽細胞を、LDL コレステロール加培地に

て培養後に固定し、Triton-X 100にて処理し、スフィンゴミエリン結合蛋白ライセニンを反応させ、一次抗体として抗ライセニン抗体を反応させた。

二次抗体として Alexia Fluor 結合抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。ニーマンピック細胞では正常細胞に比べ、強く染色されており本症の病態であるスフィンゴミエリン蓄積を示していた。この染色はライソゾームのマーカー Lyso-Tracker Red と Merge しておりライソゾームへのスフィンゴミエリン蓄積を示していた。

細胞内遊離コレステロールの染色としてフィリピン染色を行った。正常細胞に比べニーマンピック病 A/B 型細胞ではコレステロール蓄積が著明に観察された。

## 2. 薬物による細胞外脂質排泄

正常細胞およびニーマンピック A/B 型細胞の培養液中に、ABCA1 および ABCG1 遺伝子発現を増強させる LXR アゴニスト (TO-901317) を加え、ABCA1 および ABCG1 の発現状態及び、コレステロール/スフィンゴミエリン蓄積に関して、ライセニン染色およびフィリピン染色により評価した。

## 4. 結論

- 1) ニーマンピック A/B 細胞において LDL コレステロール存在下で、正常細胞に比べて著明に強いライセニン染色およびフィリピン染色が示された。このことはニーマンピック A/B 細胞においてコレステロール/スフィンゴミエリン蓄積が観察された。また、この方法を用いて疾患培養細胞の蓄積脂質の評価を行うこととした。
- 2) 正常細胞およびニーマンピック病 A/B 型細胞を LDL コレステロール存在下で培養、LXR アゴニストである TO-901317 を加え、その有無で細胞のコレステロール/スフィンゴミエリン蓄積に関して同条件で観察した。TO-901317 の存在下のニーマンピック病 A/B 型細胞では、非存在下の細胞に比べてライセニンおよびフィリピン染色は弱く観察された。このことは TO-901317 がニーマンピック病 A/B 型細胞

に対して脂質蓄積を減少させる作用を有する可能性を示唆している。

## C. 考察

細胞内ではコレステロールとスフィンゴミエリンは細胞膜上のマイクロドメインを形成する主要脂質であり、互いの親和性により細胞内輸送に関して影響しあっている。スフィンゴミエリン分解酵素酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症であるニーマンピック病 A/B 型ではスフィンゴミエリンの他にコレステロールが蓄積する。また細胞内コレステロール輸送調節に関与する NPC1 遺伝子異常ではコレステロールが主に蓄積するが、スフィンゴミエリンも蓄積する。細胞内脂質排泄に関する膜蛋白が見出されているが、ABCA1 は主にコレステロール排泄、ABCG1 は主にコレステロール/スフィンゴミエリンの排泄に関与することが報告されている。NPC1 異常であるニーマンピック病 C 型の培養細胞を用いた実験で、LXR アゴニストが ABCA1 と ABCG1 の発現調節により細胞内蓄積コレステロールを減少させた報告はすでに行われている。我々の試みは、ニーマンピック病 A/B 型に対して LXR アゴニストを用いて蓄積脂質を減少させる初めての試みです。結果に関しては、発現蛋白量の定量、可視化脂質の定量化など追加・確認すべき点も多いが、治療に結びつく可能性から展開してゆきたい。

## D. 結論

ニーマンピック病 A/B 型培養細胞において、病態上重要なスフィンゴミエリン/コレステロール蓄積状態をライセニン染色とフィリピン染色で可視化できた。脂質排泄に関与する ABCA1 および ABCG1 遺伝子の調節因子である LXR アナログ (TO-901317) で、ニーマンピック病 A/B 型細胞の蓄積脂質減少を目的として培養系を用いた研究を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tatano Y, Fujinawa R, Kozutsumi Y,  
Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K,

Takada G, Sakuraba H, Itoh K: Tropoelastin  
regulates chemokine expression in  
fibroblasts in Costello syndrome. BBRC,  
372 : 681-687, 2008

## 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

分担研究者：芳野 信(久留米大学医学部小児科学講座 教授)

### 研究要旨

ムコリビドーシスⅢ型成人患者で不随意運動を認めた。筋電図所見上、振戦、ミオクローヌスのいずれの要素も加味されていると考えられた。頭頸部画像上ではこの不随意運動の責任病巣と思われる特定部分の異常所見を認めなかったが、頸髄の圧迫所見と脊髄後角の高信号域を認めた。本症は不随意運動の原因疾患に追加すべきと考えられる。

研究協力者：

原 宗嗣(久留米大学医学部小児科学講座)  
松石豊次郎(久留米大学医学部小児科学講座)  
渡辺 順子(久留米大学医学部小児科学講座)  
谷脇 恭考(久留米大学医学部内科学講座神経内科部門)

### A. 研究目的

これまでムコリビドーシスⅢ型では不随意運動を伴うことは報告がない。われわれは不随意運動を呈する本症症例を経験した。今回はその電気生理学的および画像的検討を行った。

### B. 研究方法

#### 症例

当科初診時、37歳の男性。1歳半ばから身長伸びの遅滞、関節拘縮が出現、1歳10か月に股関節脱臼と診断され、装具装着。13歳時、心臓弁膜症と診断される。23歳時、緘黙、身体活動性の低下出現し、ついで24歳時から頭部のふるえが出現。29歳の時、指尖、趾尖の痛みが出現、B病院受診、ムコリビドーシスⅢ型が疑われるが確定せず。37歳のとき当科受診。

低身長、上顎、下顎突出、胸郭変形、脊椎側湾・前湾、肝脾腫、臍ヘルニア、大動脈弁・僧帽弁閉鎖不全を認める。神経学的診察では下肢優位の深

部腱反射の亢進を認めるが、病的反射や筋強剛、痙縮は認めず。他動的、自動的に上肢を動かしたり、精神緊張を強いられると、頭頸部および両側上肢の、数分持続する3~5 Hz前後の律動的な不随意運動が出現する。

リンパ球の $\beta$ -galactosidase 低値と血漿中の4種類のライソゾーム酵素の高値を認め、さらにGNPTAB遺伝子の解析で、2種類のcommon mutationを認め、ML3と確定した。

### C. 研究結果

#### 1. 頭部・頸部画像：

頭部MRI画像ではT2W1およびFLAIR画像で右前頭葉白質にleukoaraiosisと思われる高信号域が認められたほかは、基底核から間脳、小脳を含め、特記すべき所見を認めなかった。いっぽう頸部画像では頸椎レベルで脊髄が圧排された所見がみられ、T2W1で脊髄後角に高信号域が一部で見られた。また、SPECTでは前頭葉の血流低下を認めた。

#### 2. 電気生理学的検査：

表面筋電図では、記録の一部では主動筋と拮抗筋の興奮が交互に認められるような箇所もあるが、同期している部分もあり、振戦、ミオクローヌスのいずれの要素も考えられる所見であった。また

明らかな左右差は認められなかった。覚醒・睡眠脳波では基礎波は徐波化を認めず、突発波も認めなかった。

#### D. 考 察

本患者で見られる不随意運動は、筋電図上は、振戦、ミオクローヌスのいずれの要素も含むと考えられた。画像上はこれらの不随意運動の責任病巣は特定する所見は認めなかったが、錐体外路症状の一つと考えられる。ML3では錐体外路を含む大脳皮質から脊髓まで、部位別にその程度は差異があるが、神経細胞にリボフスチン様物質およびLuxol Fast Blue(LFB)染色陽性物質の蓄積を認めると報告されており(小林, 2008年)、錐体外路の機能異常と矛盾しない。

SPECTで見られた前頭葉の血流低下は、臍然や活動性の低下と関係している可能性がある。

#### E. 結 論

ムコリビドーシスⅢ型も不随意運動を呈する疾患の鑑別に含めるべきである。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 芳野 信: ゴーシェ病における骨粗鬆症の病態に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金(難

治性疾患克服研究事業), 平成 19 年度研究報告書, 54-55

- 2) 芳野 信, 岡田純一郎, 渡辺順子, 松石豊次郎, 谷脇考恭, 酒井規夫: 著明な不随意運動を呈するムコリビドーシス 3 型の成人例. 日本先天代謝異常学会雑誌, 24: 131, 2008

#### 2. 学会発表

- 1) 芳野 信, 岡田純一郎, 渡辺順子, 松石豊次郎, 谷脇考恭, 酒井規夫: 著明な不随意運動を呈するムコリビドーシス 3 型の成人例. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-11.8
- 2) 原 宗嗣, 日高正人, 廣瀧慎一郎, 飯塚千穂, 大矢崇志, 渡辺順子, 松石豊次郎, 芳野 信, 谷脇考恭: 著明な不随意運動を呈するムコリビドーシス 3 型の成人例. 第 452 回日本小児科学会福岡地方会例会, 福岡, 2008.12.13

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## サボシンC ノックアウトマウスの作成と表現型解析

分担研究者: 松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所 准教授)

### 研究要旨

サボシン A、B、C、D は共通の前駆体であるプロサボシンから誘導される相同性の糖蛋白質で、多くの疎水性スフィンゴ脂質のライソゾームにおける分解に必要である。これまでに我々はサボシン A および D の特異的欠損マウスの作成に成功している。今回新たにサボシン C 欠損マウス(Sap-C KO)を作成し、その脳病態を解析した。マウスプロサボシン遺伝子のサボシン C 領域の 5 番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異(C384S)を導入し、全サボシンに保存されている 3 つのジスルフィド結合のうち 1 つを破壊して、サボシン C を特異的にノックアウトした。Sap-C KO は、正常に出生、発育するが、5 ヶ月齢頃より歩行異常、振戦を呈した。生後 8 ヶ月齢までの観察では、肝脾腫や骨髄病変は認められなかった。生化学的分析では、脳、肝臓ともに glucosylceramide、glucosylsphingosine の有意な蓄積を認めなかったが、脳において acid  $\beta$ -glucosidase (GCase) の軽度の活性低下を認めた。病理学的解析では、肝臓、脾臓ともに明らかなゴーシェ細胞の浸潤は認めなかった。神経系では、3 ヶ月齢頃より小脳プルキンエ細胞の選択的脱落、脳海馬体の mossy fiber の異常発芽、三叉神経節神経細胞内の封入体の蓄積を認めた。ヒトのサボシン C 欠損症は亜急性性神経型のゴーシェ病(GCase 欠損症)類似の病型を呈することから、当初、Sap-C KO は、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとなることを予想したが、本研究により、マウスにおけるサボシン C 欠損症はヒトとは異なる表現型し、遅発性の神経変性疾患を発症することが明らかになった。

### A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質(GSL)は、生体膜の構成成分であると共に、さまざまな機能分子が会合する膜上の領域“マイクロドメイン”を提供し、細胞内外からのシグナル認識・伝達にかかわる。脳・神経系は、他の組織に比べ、多彩で豊富な GSL を含み、その代謝および発現には、発生段階別・領域別・細胞別に特異性がある。GSL のライソゾームにおける分解障害であるライソゾーム病の多くが神経機能に重篤な障害を引き起こすことは、多様な GSL の量的、質的な発現調節が個体レベルで神経機能の維持に重要であることを示唆する。

ライソゾーム病は、細胞内小器官であるライソゾームにおける物質の遺伝的分解障害により、スフィンゴ糖脂質、ムコ多糖、糖タンパク質、グリコーゲンなどが、ライソゾーム内に異常蓄積をきたす疾患群で、現在までに約 50 種類もの疾患が発見されている。その多くは、小児期に神経系を含む多臓器に障害をきたす難治性疾患である。個々のライソゾーム病は比較的稀であるが、疾患群全体としての発生頻度は出生 7,700-13,000 人に 1 人と決して稀ではない。ゴーシェ病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。

一方、スフィンゴ脂質活性化たんぱく質は、生体内のライソゾームにおいて、短い親水性の先端基をもつ疎水性のスフィンゴ脂質を、親水性の分解酵素(ライソゾーム酵素)と反応させるために必要な低分子量の糖タンパク質で、触媒活性をもたないコファクターである。このうち、サポシン A、サポシン B、サポシン C、サポシン D は、共通の前駆体であるプロサポシンから誘導される、約 80 個のアミノ酸からなる相同性の糖タンパク質である。4 種のサポシンはプロサポシンの中に、A、B、C、D の順に直列に並んだドメインとして存在し、プロテアーゼによるプロセッシングを経て生成される。これらは構造的に極めて相同性が高いにもかかわらず、いくつかのオーバーラップがあるものの、それぞれ特定のライソゾーム酵素を活性化する。サポシン C は主として glucosylceramide を分解する GCCase を活性化し、ヒトのサポシン C 欠損症は GCCase 欠損症であるゴーシェ病様の病像を呈する。

我々は、従来から、スフィンゴ糖脂質代謝関連

遺伝子ノックアウトマウスを用いた遺伝学的アプローチにより、GSL の神経系における生物学的・病理学的意義の解明に取り組んでいる。本研究では、ゴーシェ病の神経病態の解明を目的に、GCCase 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、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスの作成を試みた。

## B. 研究方法および研究結果

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、ヒトのサポシン C 欠損症で報告されている遺伝子変異(サポシン 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(5 番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異(C384S))を導入し、サポシン C 特異的欠損マウス(Sap-C KO)を作成した(図 1)。さらに、Sap-C KO をプロサポシンノックアウトマウスと交配し、Psap<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウス; Psap の一方の allele が null で他方がサポシン C 領域の missense mutation (C384S)を作成した。

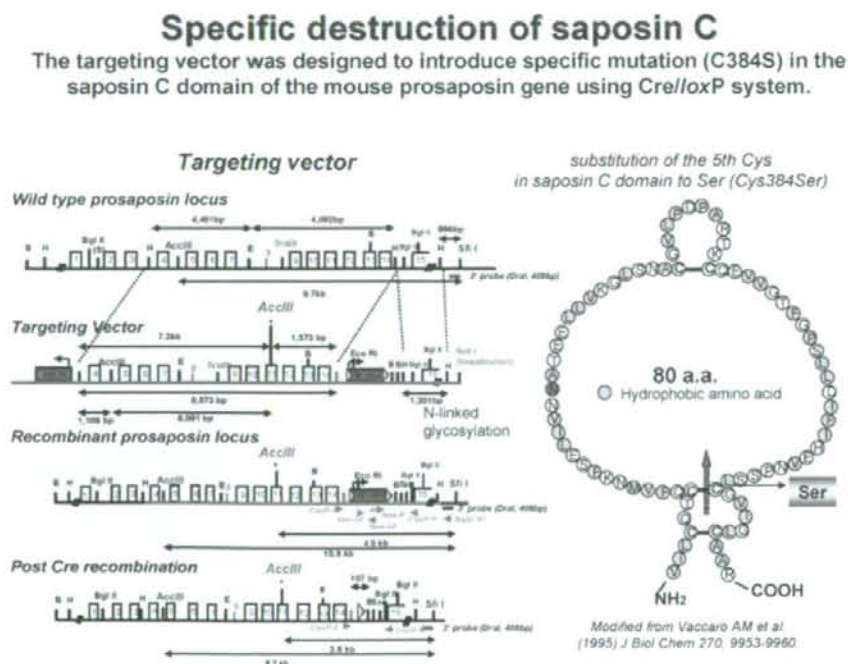


図 1

### Saposin C<sup>-/-</sup> mice develop neurodegenerative disease

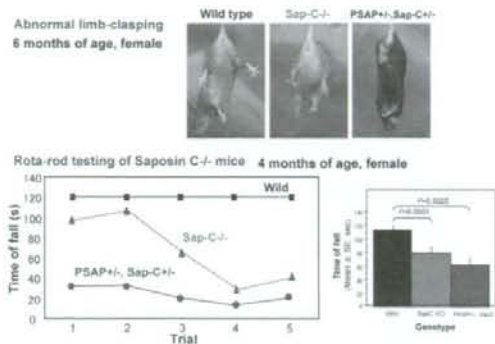


図 2

Sap-C KO は、正常に出生、発育するが、5 ヶ月齢頃より歩行異常、振戦を呈した(図 2)。Psap<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウスも同様の症状を呈したが、Sap-C KO より進行が早く重症であった。PSAP<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウスは、Sap-C KO より早期(3 ヶ月齢頃)に神経症状を発症し、その進行も速かった。生後 8 ヶ月齢までの観察では、Sap-C KO, PSAP<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウス共に肝脾腫や骨髄病変は認められなかった。

Sap-C KO の各種臓器(大脳、小脳、肝臓、脾臓、腎臓)の脂質分析の結果、生後 6 ヶ月齢では GCase の基質である glucosylceramide (GlcCer)、glucosylsphingosine (GlcSph) いずれの蓄積も認められなかった。また、他のサポシン欠損マウス組織に認められる蓄積物質; galactosylsphingosine (サポシン A ノックアウトマウス)、HFA-ceramide (サポシン D ノックアウトマウス)、lactosylceramide (プロサポシンノックアウトマウス)の蓄積も認められなかった。

Sap-C KO の大脳・小脳・肝臓では GCase の酵素活性が低下傾向にあり、大脳では有意に低値であった。この結果は、サポシン C が GCase の酵素タンパク質の安定化等に関与している可能性を示唆すると考えられた。

病理学的解析では、Sap-C KO, PSAP<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウス共に、8 ヶ月齢までの検討では、神経系および肝臓、脾臓にゴーシェ細胞の浸潤は

### Segmental loss of cerebellar Purkinje cells in Saposin C<sup>-/-</sup> mice at around 6 months of age

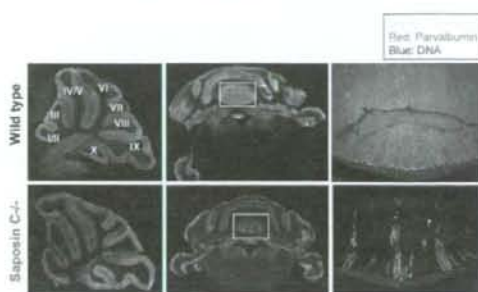


図 3

### Wide spread axonal degeneration and neuronal storage in Saposin C<sup>-/-</sup> mice at around 6 months of age

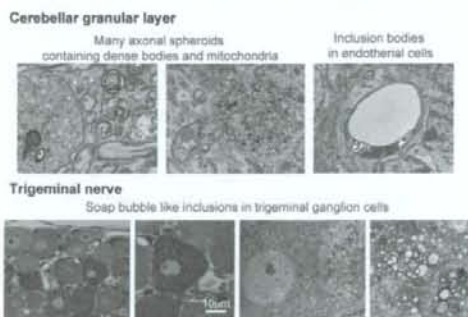


図 4

認めなかった。神経系では、3 ヶ月齢頃より始まる小脳プルキンエ細胞の選択的かつ進行性の脱落が特徴的であった(図 3)。

神経細胞の軸索変性を反映した病理像(axonal spheroid)が小脳、脳幹、脊髄と広範囲にわたって観察され、小脳顆粒細胞、三叉神経節細胞、血管内皮細胞等には、脂肪を推測させる soap bubble like inclusion body を認めた(図 4)。Sap-C KO, PSAP<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウスの神経病理所見は質的には同様であったが、PSAP<sup>+/+</sup>, Sap-C<sup>+/-</sup>マウスがより重症であった。

更に、脳海馬体において、歯状回顆粒細胞から海馬 CA3 野錐体細胞に投射する苔状線維(mossy fiber)の異常発芽と、大脳皮質において II-III 層の Calbindine 陽性ニューロン数の有意な低下を認めた。

## C. 考察

今回、新たに、サポシン C ノックアウトマウス (Sap-C KO) の作成に成功し、Sap-C KO の中枢神経系では特定の神経細胞が選択的に細胞死に至り、遅発性の神経変性疾患を発症することを明らかにした。ヒトのサポシン C 欠損症は亜急性性神経型のゴーシェ病類似の病型を呈することから、当初、Sap-C KO は、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとなることを予想したが、マウスにおけるサポシン C 欠損症はヒトとは異なる表現型し、Sap-C KO は、神経型ゴーシェ病の典型的な疾患モデルマウスにはならなかった。Sap-C KO では、GCase の基質である GlcCer や GlcSph の蓄積を認めないにもかかわらず、特定の神経細胞が選択的に細胞死に至ったことは、その神経細胞死の原因が GlcCer, GlcSph の蓄積とは別の原因、たとえば、サポシン C 自体の機能の欠損による可能性が示唆された。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。

近年、サポシン C はライソゾーム酵素のコファクター能に加え、脂質の輸送タンパク質として、膜脂質の再構成や NKT 細胞を活性化する CD1d 抗原への脂質抗原輸送への関与が注目されている (図 5)。Sap-C KO はこれらサポシン C の生物学的機能を解明する上で有用なモデルマウスとなることが期待される。

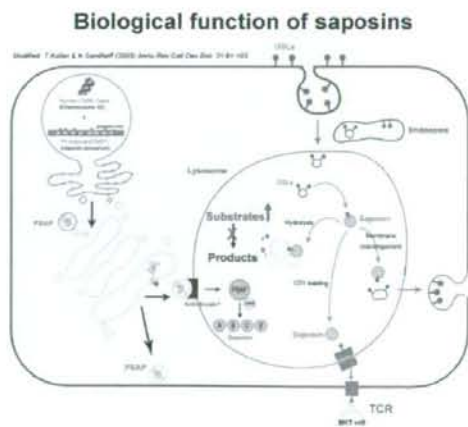


図 5

## D. 結論

サポシン C ノックアウトマウスの作成に成功し、Sap-C KO はヒト神経型ゴーシェ病の典型的な疾患モデルマウスにはならないものの、遅発性の神経変性疾患を発症することを明らかにした。サポシン C ノックアウトマウスは、すでに作成済みのプロサポシンノックアウトマウス、サポシン A、サポシン D の各特異的ノックアウトマウスと共に、スフィンゴ糖脂質およびサポシンの神経系における生物学的・病理学的意義を解明する上で有用なモデルマウスとなると考えられた。

## E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 雑誌

- 1) Yoneshige A, Sasaki A, Miyazaki M, et al : Developmental changes in glycolipids and synchronized expression of nutrient transporters in the mouse small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 2009, in press.
- 2) Miyazaki M, Yoneshige A, Matsuda J, et al : HPTLC-MS for rapid analysis of neutral glycosphingolipids. *J. AOAC Int.* 2008, in press.

#### 書籍

- 1) Matsuda J : Sphingolipid activator proteins. In *Experimental Glycoscience: glycobiology*, edited by Taniguchi, N. et al. 125-129, Springer, 2008.

### 2. 学会発表

- 1) 松田純子, 米重あづさ, 鈴木明身 : 新生仔マウス小腸におけるスフィンゴ糖脂質組成の発達変化 : トランスポーターの発現変化との関係. *BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会*, 神戸,

2008.12.9-12

- 2) 米重あづさ, 松田純子: サポシン C 欠損マウスは神経変性疾患を発症する. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
- 3) 久樹晴美, 只野-有富桂子, 青山晃治, 松村暢子, 中木敏夫, 内田俊也, 松田純子, 岡崎具樹: SaposinD 欠損多飲マウスの病態解析—飲水制限によって劇的に改善される運動障害. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第

81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008.12.9-12

- 4) 松田純子, 米重あづさ, 佐々木彩乃: サポシン C 欠損マウスは神経変性疾患を発症する(口頭発表) 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子市(鳥取県), 2008.11.15-17

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし