

Santa T, Meyer BF, Shimozawa N, Alkuraya FS : Zellweger syndrome caused by PEX13 deficiency : Report of two novel mutations. Am J Med Genet 149A : 1219- 1223, 2009

- 2) 福原 忍, 水江伸夫, 坂井拓郎, 稲澤奈津子, 池本 亘, 足立憲昭, 下澤伸行 : 同一遺伝子異常を持ちながら臨床型が異なる ALD 兄弟例. 小児科臨床, 62 : 457-461, 2009
- 3) 下澤伸行 : 日本人が発見に関わった疾患遺伝子ペルオキシソーム病. 小児科 50 増刊号. 特集「小児疾患における臨床医田楽の進歩」, 907-913, 2009
- 4) 下澤伸行 : ペルオキシソーム病. 小児内科 41 増刊号, 小児疾患診療のための病態生理 2 479-486, 2009

1. 論文発表

- 1) Shimozawa N, Arai A, Kajiwara N, Kozawa S, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y : Genotype and phenotype of Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. 59th

Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Honolulu, 2009.10

- 2) 下澤伸行, 荒井綾子, 梶原尚美, 小澤 祥, 長瀬朋子, 竹本靖彦, 鈴木康之 : 副腎白質ジストロフィー早期診断・早期治療へ向けての取組みー発症前診断に関するガイドライン作成に向けてー. 第 54 回日本人類遺伝学会, 東京, 2009.9
- 3) 鈴木康之, 下澤伸行 : ペルオキシソーム病との 30 年 : 二人三脚の旅 学会賞受賞講演. 第 51 回日本先天代謝異常学会, 第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 東京, 2009.11
- 4) 長瀬朋子, 玉置也剛, 梶原尚美, 本田綾子, 小澤 祥, 柴田敏之, 國貞隆弘, 下澤伸行 : ES 細胞からの分化系を用いたペルオキシソーム病解析の試み. 第 51 回日本先天代謝異常学会, 第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 東京, 2009.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ペルオキシソーム膜形成障害の分子機構

分担研究者：今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部 教授)

研究要旨

ペルオキシソーム膜に局在する Pex3p と生合成されたペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)を輸送する分子シャペロン Pex19p との相互作用は、ペルオキシソーム膜形成に重要である。Pex19p は N 末端側に Pex3p との結合領域、N 末端 90 アミノ酸以降に PMP 結合領域をもつ。今回、各種変異を導入したリコンビナント Pex19p と Pex3p との相互作用を解析し、Pex19p の Leu-21、Leu-22、Phe-29 が Pex3p との結合に重要であることを見出した。さらに Pex19p 欠損ヒト線維芽細胞に、野生型 Pex19p ならびに上記変異型 Pex19p を発現させると、野生型 Pex19p ではペルオキシソームの形成が回復したが、変異型では回復しなかった。細胞内でペルオキシソーム膜が正常に形成されるためには、Pex3p と Pex19p との相互作用が必要であることが示唆された。

研究協力者氏名

柏山恭範(富山大学大学院医学薬学研究部助教)

守田雅志(富山大学大学院医学薬学研究部准教授)

A. 研究目的

ペルオキシソーム膜形成には、ペルオキシソーム形成因子 Pex3p、Pex19p を必要とする。Pex3p はペルオキシソーム膜に局在し、遊離型ポリソームで生合成されたペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)と複合体を形成する Pex19p と相互作用し、PMP のペルオキシソーム膜への局在化に関与する。因に、Pex19p の欠損はペルオキシソーム形成不全を示す重篤な疾患である Zellweger syndrome の原因となる。今回、Pex19p において Pex3p との相互作用に必要なアミノ酸残基を明らかにするとともに、Pex19p 欠損細胞に野生型、変異型 Pex19p を導入することにより、Pex19p の構造とペルオキシソーム形成との関連性について検討した。

B. 研究方法

野生型ならびに変異型ヒト GST-Pex19p ならびにヒト Pex3p の細胞質ドメイン(His₁₀-Pex3p)を大腸菌に発現させ、精製した。GST-Pex19p と His₁₀-Pex3p との相互作用は、pull down assay により解析した。また、Pex19p によるペルオキシソーム形成能は、*pex19* Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型 Pex19p を導入し、ペルオキシソームの形成を蛍光抗体法で解析した。

(倫理面での配慮)

Zellweger syndrome 患者線維芽細胞は、提供者が乳児のため、両親の同意を得て採取したものを、岐阜大生命科学総合研究支援センター下澤伸行教授より供与を受けた。

C. 研究結果

1) Pex19p と Pex3p との相互作用の解析

リコンビナント Pex19p は分析用超遠心による解析により、単量体として存在することが示唆さ

れた。また Pex3p も単量体を示し、Pex3p と Pex19p では 1:1 の複合体を形成することが示唆された。全長 GST-Pex19p ならびに C 末端側より一定領域を欠失させた GST-Pex19p(1-90)、GST-Pex19p(1-44)、GST-Pex19p(1-28) と His₁₀-Pex3p との pull down assay を行なった結果、N 末端から 44 アミノ酸残基までで Pex3p との結合に十分であることが示唆された。そこで、この領域に特徴的である疎水性アミノ酸や酸性アミノ酸を Ala に置換し、Pex3p との結合を解析した。その結果、野生型は His₁₀-Pex3p に結合したが、L21A、L22A、F29A の置換をもつ GST-Pex19p は His₁₀-Pex3p に結合しなかった。一方、E17A、L26A は His₁₀-Pex3p に結合した。また、Pex19p の N 末側の Pex3p 結合領域と N 末端 90 アミノ酸以降の PMP 結合領域を結ぶリンカー領域を欠失させた Pex19p(D45-90)、Pex19p(D57-90) も His₁₀-Pex3p に結合した。よって、N 末端側の Pex3p 結合領域に存在する複数の疎水性アミノ酸が Pex3p との結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 野生型ならびに変異型 Pex19p によるペルオキシソーム形成回復能の解析

pex19 Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型 Pex19p を発現させ、ペルオキシソームの回復能を、ペルオキシソームマトリックスタンパク質ならびに PMP に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。その結果、野生型ならびに Pex3p との結合能を有する Pex19p(L26A)、Pex19p(E17A) ではペルオキシソームが検出された。一方、Pex3p との結合能を有さなかった Pex19p(L21A)、Pex19p(L22A)、Pex19p(F29A) ではペルオキシソームが検出されなかった。なお、リンカー領域を欠失させた Pex19p(D45-90)、Pex19p(D57-90) は Pex3p との結合能は有していたが、ペルオキシソームは検出されなかった。さらに、Pex3p 結合領域の酸性アミノ酸クラスターを塩基性アミノ酸に置換し

た Pex19p(E20KE23KD27KD30K) もペルオキシソームの形成を回復させなかった。よって、Pex19p によるペルオキシソームの形成は、Pex3p との結合のみでなく、Pex3p との結合領域と PMP との結合領域がある程度の距離をもっていることが必要であることが示唆された。なお患者線維芽細胞では Pex19p の N 末端から 255 番目の Met がフレームシフトにより Asn に変異し、続いて 24 アミノ酸が変異し終止コドンとなっている。大腸菌で発現した本変異体は Pex3p との結合能を有するので、患者線維芽細胞内での変異型 Pex19p の分解がペルオキシソーム形成異常の原因であると推定された。

D. 考察

遊離型ポリソームで生合成された PMP と Pex19p とが複合体を形成し、ペルオキシソーム膜前駆体上の Pex3p と相互作用し、Pex19p 上の PMP がペルオキシソーム膜に挿入されることにより、ペルオキシソーム膜が形成されていく。我々はこれまでに、生合成された PMP70 の Pex19p との相互作用に必要な領域を明らかにするとともに、Pex19p の N 末端側の領域が Pex3p との相互作用に重要であることを報告してきた。今回、Pex19p の Pex3p 結合領域における疎水性アミノ酸 Leu-21、Leu-22、Phe-29 が Pex3p との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、細胞内で正常なペルオキシソームが形成されるためには、Pex3p 結合領域の酸性アミノ酸クラスターならびに Pex3p 結合領域と PMP 結合領域を結ぶリンカー領域が一定の距離をもつこともペルオキシソーム膜形成に必要であることが示唆された。これらの部位は、Pex19p がペルオキシソーム膜上の Pex3p と結合後、積み荷である PMP をペルオキシソーム膜に挿入し、Pex19p が細胞質にリサイクリングする過程で必要なのかもしれぬ。これまでに報告された *pex19* 遺伝子異常の中には、Pex19p の機能ドメインは保持されているが、変異タンパク質の細胞内での分解がペルオ

キシソーム形成不全の原因となる例もある。今後、軽度のペルオキシソーム形成異常症の治療を考慮し、Pex3p と Pex19p との相互作用を促進もしくは安定化する化合物を検索する必要がある。

E. 結論

ペルオキシソーム膜の形成に 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 Pex19p の Leu-21、Leu-22、Phe-29A が関与する可能性が示唆された。今後、Pex19p が担う PMP のペルオキシソーム膜への挿入過程を解析するとともに、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が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cho AR, Yang KJ, Bae YS, et al : Tissue-specific expression and subcellular localization of ALADIN, the absence of which causes human triple A syndrome. *Exp Mol Med*, 41 : 381-386, 2009
- 2) Iwashita S, Tsuchida M, Tsukuda M, et al : Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. *J Biochem* in press

2. 学会発表

- 1) Kashiwayama Y, Narita K, Suzumura M, et al : Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with palmitoyl derivative. The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences : Bioactive Lipid Molecules and Transporters, Tokyo, 2009.5
- 2) Yokoyama K, Nagai T, Nishizawa C, et al : Lipid metabolome of fibroblasts with

peroxisomal diseases. The 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM 2009), Tokyo, 2009.5

- 3) Kashiwayama Y, Morita M, Imanaka T : Importance of the NH₂-terminal hydrophobic motifs on the peroxisome selective targeting of PMP70. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 4) Kashiwayama Y, Tomohiro T, Hatanaka Y, et al : Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with palmitoyl derivative. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 5) Shibata H, Sato Y, Nakatsu T, et al : Structural-basis for the Pex3p-Pex19p interaction in the translocation of class I peroxisomal membrane proteins. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 6) 柏山恭範, 朝比奈幸太, 守田雅志, 他 : ペルオキシソーム膜タンパク質局在化の分子機構 : PMP70 をモデルタンパク質としての解析. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会, 福井, 2009.5
- 7) 横山和明, 永井 徹, 西澤千穂, 他 : ペルオキシソーム病の繊維芽細胞に検出される極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造. 第 51 回日本脂質生化学会, 名古屋, 2009.7
- 8) 西澤千穂, 永井 徹, 池田和貴, 他 : ペルオキシソーム病の線維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造解析. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸, 2009.10
- 9) 柏山恭範, 成田琴美, 友廣岳則, 他 : 光反応性脂肪酸誘導体を用いたフォトアフィニティーラベルによるペルオキシソーム脂肪酸 β 酸化系酵素の基質認識部位の同定. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10
- 10) 佐藤康彦, 柴田洋之, 中津 亨, 他 : ヒト由来

ペルオキシソーム膜タンパク質輸送因子
Pex3p と Pex19p の構造基盤. 第 82 回日本生
化学会大会, 神戸, 2009.10

- 11) 五十嵐喜子, 柏山恭範, 平 裕幸, 他 : ペルオ
キシソーム膜形成因子 Pex16p のペルオキシ
ソーム局在化メカニズムの解析. 日本薬学会
北陸支部第 121 回例会, 富山, 2009.12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

サポシン 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

サポシン A、B、C、D は共通の前駆体であるプロサポ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。本研究では、ヒトのサポシン C 欠損症が亜急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に着目し、サポシン C 欠損マウス(Sap-C KO)を作成して、その脳病態を解析した。マウスプロサポシン遺伝子のサポシン 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、全サポ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、サポシン C を特異的にノックアウトした。Sap-C KO は、正常に出生、発育し、ゴーシェ病の主徴である肝脾腫や骨髄病変は認められなかった。しかしながら、5 ヶ月齢頃より進行性の歩行異常、振戦を呈した。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、大脳において acid β -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かつ進行性の脱落、小脳、脳幹、脊髄後角優位の神経軸索腫大、三叉神経節細胞の封入体の蓄積が認められた。ヒトのサポシン C 欠損症の報告例から、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 欠損症はゴーシェ病様の表現型を呈さず、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

ゴーシェ病はライソゾーム酵素である acid- β -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。本研究では、ゴーシェ病の神経病態の解明とライソゾーム病の神経病変に対する新たな治療戦略の開拓を目的に、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 をノックアウトし、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスの作成に取り組んだ。

B. 研究方法

スフィンゴ脂質活性化タンパク質(サポシン A、サポシン B、サポシン C、サポシン D)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ある。サポシン C は主として glucosylceramide(GlcCer) を分解する GCase を活性化し、ヒトのサポシン C 欠損症は GCase 欠損症であるゴーシェ病様の病像を呈する。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

Wild type prosaposin locus

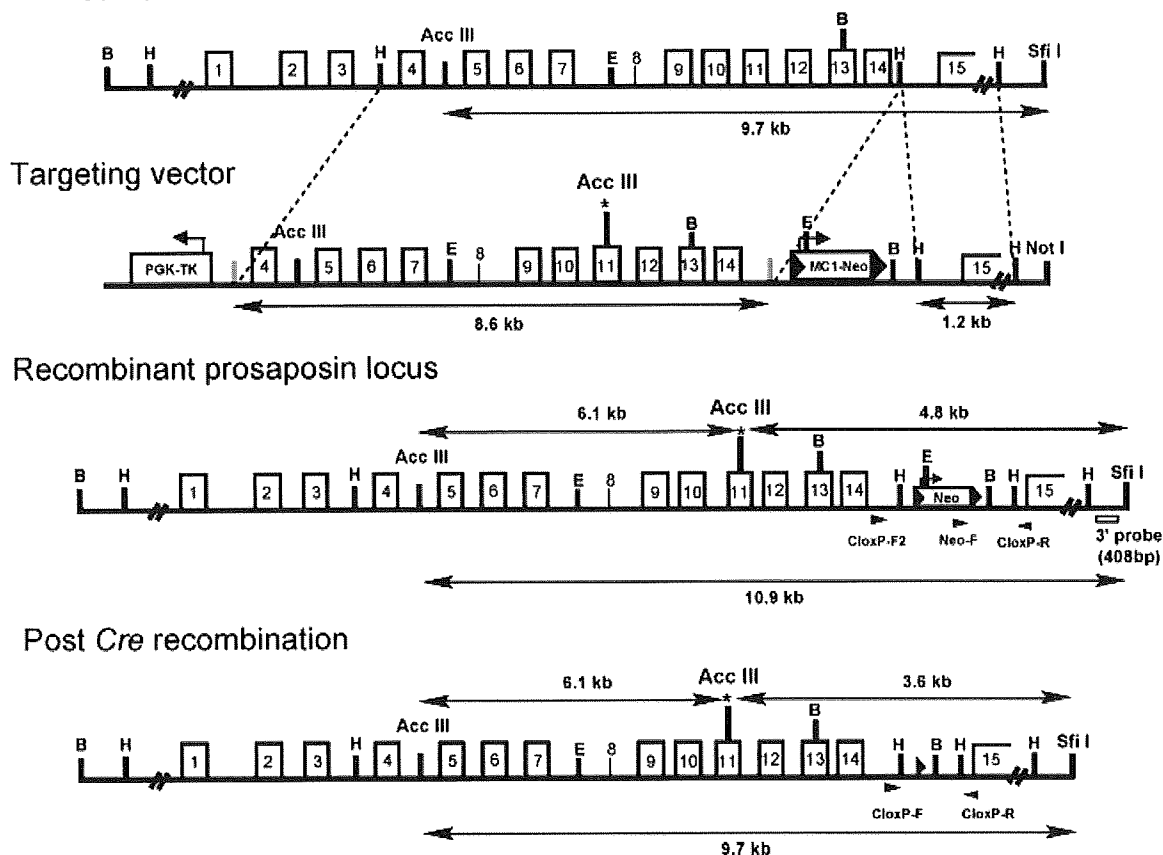


図 1 Targeting strategy for the *Sap-C*^{-/-}.

Restriction map of the wild-type *Psap* allele, the targeting construct, *lox Neo* allele, and the *Neo* deleted allele after Cre-mediated recombination. The 3'-probes used for Southern blot analysis are indicated by open boxes. The positions of PCR primers used for genotyping are indicated. Restriction enzymes are as follows : B *Bam*HI, H *Hind* III, and E *Eco*RI.

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*^{-/-}) を作成した。さらに、*Sap-C*^{-/-} をプロサポシンノックアウトヘテロマウス (*Psap*^{+/-}) と交配し、*Psap* の一方の allele が null で他方がサポシン C 領域の missense mutation (C384S) を持つ *Psap*^{+/-}C384S マウスを作成した (図 1)。

すべての遺伝子組換え動物を用いる実験は東海大学の審査委員会による研究計画書の承認を経て、法令を遵守して行われた。

C. 研究結果

Sap-C^{-/-} 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*^{+/-}C384S マウスは、*Sap-C*^{-/-} マウスより早期 (3 ヶ月齢頃) に同様の神経症状を発症し、その進行も速かった。生後 8 ヶ月齢までの観察では、*Sap-C*^{-/-}、*Psap*^{+/-}C384S マウス共に肝脾腫や骨髄病変は認められなかった。*Sap-C*^{-/-} 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 GlcCer、glucosylsphingosine (GlcSph) いずれの蓄積も認められなかった。*Sap-C*^{-/-} の肝臓では GCase の酵素活性が有意に低下していた (図 3、表 1)。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。

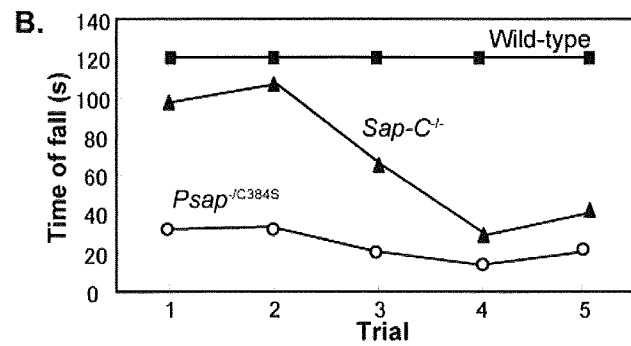
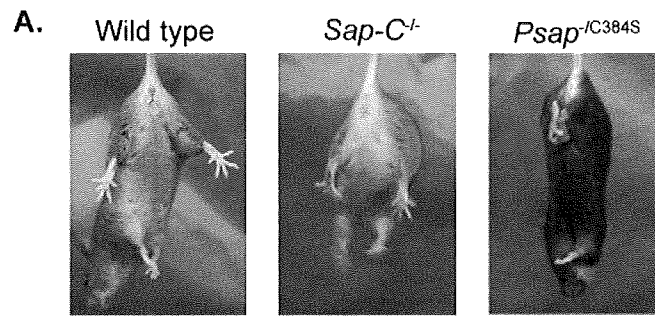


图 2 Behavioral abnormalities in *Sap-C^{-/-}* and *Psap^{-/C384S}* mice (4 months old)

- A. Abnormal limb-clasping of *Sap-C^{-/-}* and *Psap^{-/C384S}* mice compared to control wild-type mice when suspended by the tail.
- B. Rotarod testing of wild-type (closed square), *Sap-C^{-/-}* (closed triangle), and *Psap^{-/C384S}* (open circle) mice. The time until dropping from the rod (rotating at 8 rpm) of one female mouse for each genotype is shown.

表 1 Concentration of Lysosphingolipids in the Brains and Livers of Wild-Type and *Sap-C^{-/-}*.

	LacSph	GlcSph/GalSph	sphingosine	sphinganine
	(pmol/mg protein)			
Brain				
wild-type	n.d.	53.7 ± 4.5	106.1 ± 5.7	16.7 ± 1.9
<i>Sap-C^{-/-}</i>	n.d.	39.2 ± 2.0	88.3 ± 5.3	15.9 ± 2.0
Liver				
wild-type	20.0 ± 6.5	n.d.	29.2 ± 4.1	5.7 ± 0.7
<i>Sap-C^{-/-}</i>	11.4 ± 2.1	n.d.	34.7 ± 4.3	3.3 ± 0.4

All values are presented as means ± SE. Tissues obtained from four different mice of each genotype were analyzed. n.d. : not detected, LacSph : lactosylsphingosine, GlcSph : glucosylsphingosine, GalSph : galactosylsphingosine.

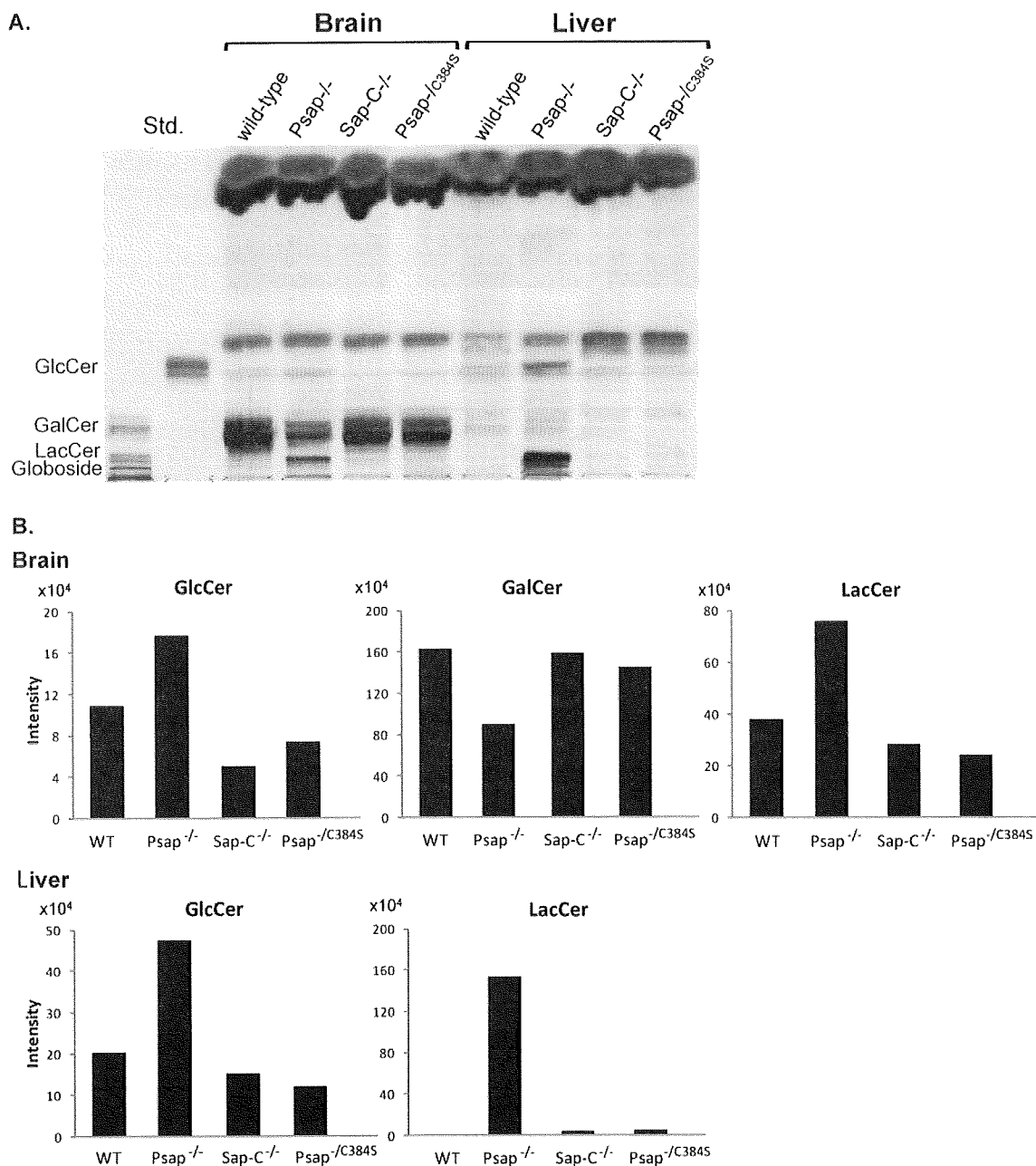


図3 Thin-layer chromatography (TLC) of lipids from the brains and livers of *Sap-C*^{-/-} and *Psap*^{/C384S} mice.

- A. TLC of neutral glycolipids of brain and liver tissues. The neutral lipid fractions equivalent to 20-mg wet brain tissue weight and 30-mg wet liver tissue weight from each genotype were applied to the borate-impregnated plate, developed in chloroform-methanol-ammonia (65 : 25 : 5, v/v/v), and visualized using orcinol spray.
- B. Histograms of the representative intensity of the bands of glucosylceramide (GlcCer), galactosylceramide (GalCer), and lactosylceramide (LacCer) in the brain and liver tissues.

病理学的解析では、*Sap-C*^{-/-}、*Psap*^{/C384S} マウス共に、8 ヶ月齢までの検討では、神経系および肝臓、脾臓にゴージェ細胞の浸潤は認めなかったが、神経系において、3 ヶ月齢頃より小脳プルキンエ細胞の選択的かつ進行性の脱落を認めた(図4)。さらに神経細胞の軸索変性を反映した軸索腫大(axonal spheroid)が小脳、脳幹、脊髄と広範囲

にわたって観察され(図5)、小脳顆粒細胞、三叉神経節細胞、血管内皮細胞等には、脂肪蓄積を推測させる soap bubble like inclusion body を認めた。*Sap-C*^{-/-}、*Psap*^{/C384S} マウスの神経病理所見は質的には同様であったが、*Psap*^{/C384S} マウスがより重症であった。

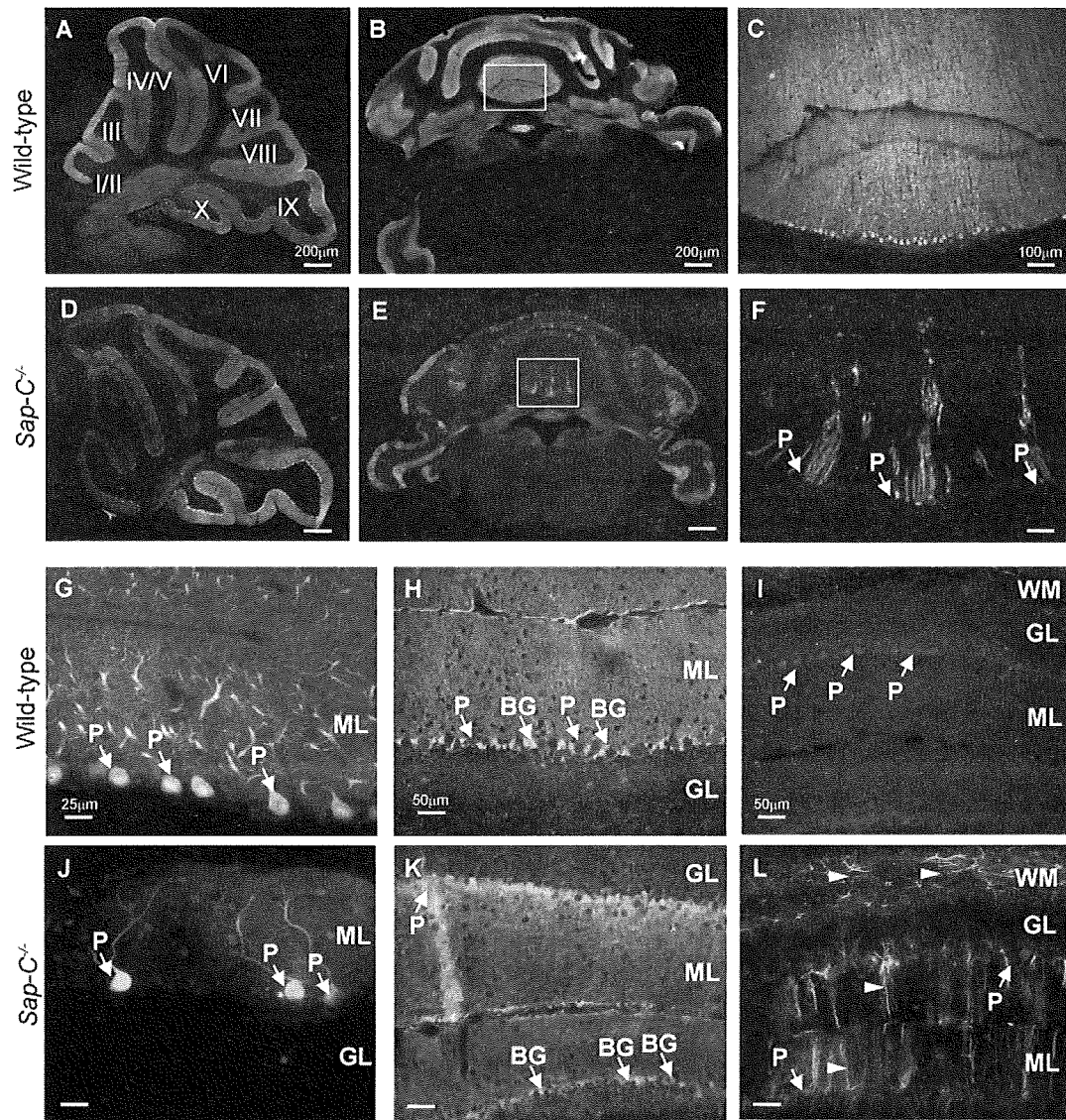


图 4 Patterned and selective loss of Purkinje cells in the cerebellum of *Sap-C^{-/-}* mice (6 months old) .

A–F. Multiple immunostaining with anti-calbindin D28k antibody (green), anti-parvalbumin antibody (red), and Hoechst (blue) in the cerebellum of wild-type (A–C) and *Sap-C^{-/-}* mice (D–F) .

G and J are higher magnifications of C and F, respectively.

H and K Multiple immunostaining with anti-S100 β antibody (green), anti-calbindin D28k antibody (red), and Hoechst (blue) in the cerebellum of wild-type (H) and *Sap-C^{-/-}* mice (K) .

In the parasagittal sections, the loss of Purkinje cells progressed from the first lobule to the ninth cerebellar lobule (D) . In the coronal sections, the surviving calbindin immunopositive Purkinje cells aligned symmetrically in stripes (E) .

I, L. Multiple immunostaining with anti- GFAP antibody (green), anti-calbindin D28k antibody (red), and Hoechst (blue) . Arrowheads indicate activated astrocytes.

ML : molecular layer, GL : granular layer, WM : white matter, P : Purkinje cell, and BG : Bergman glia. The lines indicate each scale.

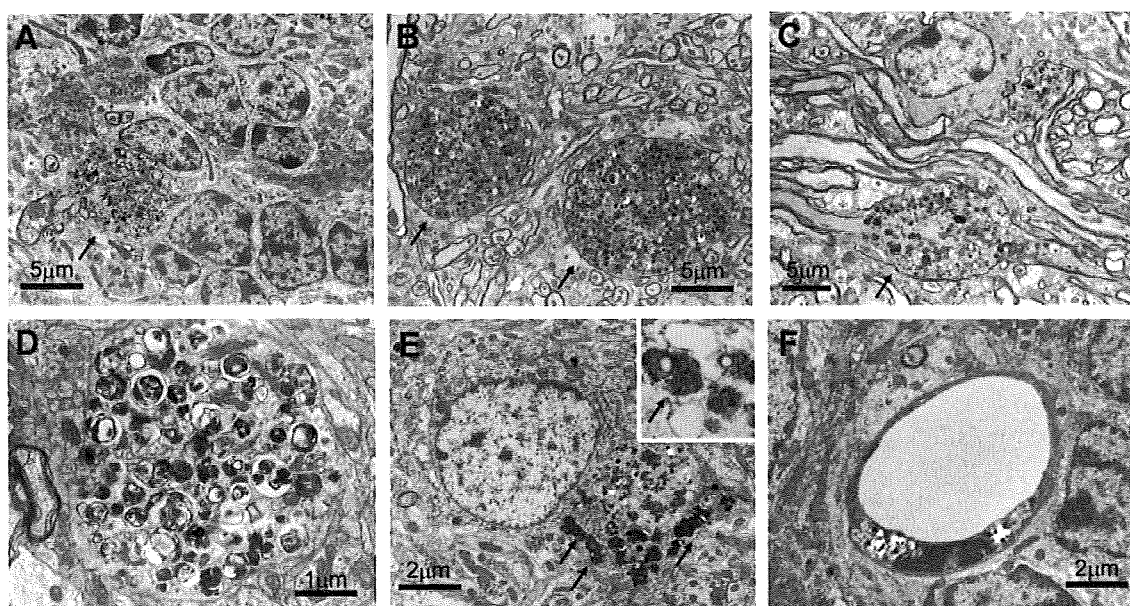


図5 Electron micrographs of the central nervous system of *Sap-C^{-/-}* and *Psap^{-C384S}* mice (6 months old).

Axonal spheroids (arrows) in the cerebellar granular layer (A) and brain stem (B).

(C) Longitudinal section of axonal spheroids in the cerebellum of *Psap^{-C384S}* mice. Internodal segments were focally enlarged.

(D) Axonal spheroids filled with concentric or lamellar electron-dense bodies of about 0.3–0.5 μm.

(E) Accumulation of lipofuscin-like deposits (arrows and inset) in the neuron of cerebellar nuclei.

(F) Inclusions in a vascular endothelial cell in the cerebellum. Arrows mark electron-lucent storage materials.

The lines indicate scales of 5 μm in (A–C), 1 μm in (D), and 2 μm in (E) and (F).

D. 考 察

本研究で、新たにサポシンCノックアウトマウス(*Sap-C^{-/-}*および *Psap^{-C384S}*)の作成に成功し、*Sap-C^{-/-}*および *Psap^{-C384S}* マウスの中樞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欠損症は亜急性神経型のゴーシェ病類似の病型を呈することから、当初、サポシンCノックアウトマウスは、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、サポシンCノックアウトマウスでは、GCaseの基質である GlcCer や GlcSph の蓄積を認めず、ヒトとは異なる表現型し、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。しかしながらサポシンCノックアウトマウスではプルキンエ細胞などの特定の神経細胞が選択的に細胞死に至り、軸索腫大が特徴的に見出された。これらの所見は、サポシンCが軸索におけるエンドソーム/ライソゾーム等の膜輸送に関与する可能性を

示唆する。今後は、サポシンと軸索輸送の関わり、軸索輸送障害とライソゾーム病の神経病態の関係を明らかにする必要がある。

E. 結 論

サポシンCノックアウトマウスの作成に成功し、これまでの我々の研究成果と合わせて、すべてのサポシン欠損マウスを確立した。サポシンCノックアウトマウスは、ヒトの神経型ゴーシェ病とは異なる表現型を呈したものの、小脳プルキンエ細胞の脱落と軸索腫大を主徴とする明瞭な神経変性疾患を発症すること明らかにした。これらの疾患モデルマウスはライソゾーム病の神経病態を解明し、新たな治療戦略を開拓する上で有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, et al. : A

Mutation in the Saposin C Domain of the Sphingolipid Activator Protein (Prosaposin) Gene Causes Neurodegenerative Disease in Mice. *J. Neurosci. Res*, 2009, in press.

- 2) Yoneshige A, Suzuki K, Kojima N, et al. : Regional expression of prosaposin in the wild-type and saposin D-deficient mouse brain detected by an anti-mouse prosaposin-specific antibody. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B*, 85 : 422-434, 2009
- 3) Yoneshige A, Sasaki A, Miyazaki M, et al. : Developmental changes in glycolipids and synchronized expression of nutrient transporters in the mouse small intestine. *J. Nutri. Biochem.* 2009.3.5. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Hojo H, Katayama H, Onuma Y, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Nakahara Y : Synthetic Study of Sphingolipid Activator Glycoprotein, Saposin C. 第46回ペプチド討論会, 福岡, 2009.11.4-6
- 2) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 第3回国際ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009.10.26-27
- 3) 米重あづさ, 渡辺 昂, 松田純子 : サポシン C 欠損 *twitcher* マウスは重症化する. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 4) 渡辺 昂, 米重あづさ, 鈴木明身, 松田純子 : ジヒドロセラミド : スフィンガニン C4-水酸化酵素 (DES2) ノックアウトマウスは腎臓および消化管のフィトスフィンゴ脂質を欠く. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 5) 久樹晴美, 只野一有富桂子, 内田俊也, 松田純子, 岡崎具樹 : 多飲多尿を示すサポシン D 欠損マウス腎集合管ではアクアポリン発現が著明に低下する. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 6) 山本順寛, 長谷川 誠, 西村真優子, 高瀬和成, 長尾美好, 松田純子, 加柴美里, 吉村真一 : プロサポシンはコエンザイム Q10 の吸収と輸送に不可欠である. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 7) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. Neuroscience 2009 Chicago, USA, 2009.10.17-21
- 8) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. Busan, Korea, 2009.8.23-28

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
特記事項なし

分担研究報告書

Ⅲ. 治療法の開発

ライソゾーム病に対するシャペロン療法の基礎研究

分担研究者：鈴木 義之(国際医療福祉大学教授)

研究要旨

ケミカルシャペロン療法における細胞内分子動態の解析を行った。バリエナミン系化合物 NOEV, NOV とともに、それぞれ対応する酵素 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼとの相互反応が pH 依存性であることを明らかにした。粗面小胞体・ゴルジ体の中性環境でシャペロンと酵素タンパク質の結合が起こり、複合体がライソゾームに運ばれたあと、その酸性環境で結合自由エネルギーの増加により解離することが、計算上予測できた。この結果により、細胞内で起こるシャペロン効果の発生機序を説明できることがわかった。

研究協力者

大野 耕策(鳥取大学医学部教授)
小川誠一郎(慶應義塾大学理工学部名誉教授)
黒澤美枝子(国際医療福祉大学教授)
榊原 康文(慶應義塾大学理工学部教授)
難波 栄二(鳥取大学研究支援センター長)
松田潤一郎(医薬基盤研究所生物資源研究部研究リーダー)

A. 研究目的

ライソゾーム病の新しい経口薬(シャペロン)治療法を開発するための基礎研究を行う。

B. 研究方法

新規に開発した β -ガラクトシダーゼシャペロン NOEV(N-アセチル-4-エピ- β -バリエナミン)の G_{M1}-ガングリオシドーシスモデル動物へのシャペロン効果を調べ、その分子機構を解析した。同時に β -グルコシダーゼシャペロン NOV(N-アセチル- β -バリエナミン)についても検討した。化合物の構造解析、酵素と阻害剤のドッキング・複合体生成、pH 条件における結合自由エネルギー計算はそれぞれ専用のソフトウェアを用いた。

C. 研究結果

シミュレーションによる結合自由エネルギー計算値は表 1 のとおりである。NOEV, NOV とともに pH5 の条件で pH7 より結合強度が低下す(自由エネルギーが上昇する)ことが確認された。

また pH による NOV について、配座の変化と酵素との水素結合の変化が観察された。配座は、pH7 において NOV が活性ポケットにより深く入るように変化した。

表 1 結合自由エネルギー(kcal/mol)

複合体	pH7	pH 5
NOEV/ β -ガラクトシダーゼ	-20.08	-18.06
NOV/ β -グルコシダーゼ	-38.44	-17.26

D. 考察

シャペロン療法の分子機構について明確な結論を得た。この新しい治療法の分子機序解明は、学術的に、そして診療への第一歩として、十分に評価されるであろう。今後は、分子、細胞、動物実験データを踏まえ、臨床応用に向けて前臨床試験、臨床試験を実施し、神経遺伝病の新しい治療法確立を目指す。

E. 結 論

この新しい治療アプローチが、現在治療法のないライソゾーム病の脳病変に有効であり、近い将来診療レベルに到達することを期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y : Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases : Competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Med Chem*, 3 : 7-19, 2009
- 2) Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncavo M, Ninomiya H, Ohno K, Garcia-Moreno I, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y : Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)-deoxynojirimycin. *ChemBioChem*, 10 : 2780-2982, 2009
- 3) Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The pharmacological chaperone effect of N-octyl- β -valienamine on human mutant acid β -glucosidases. *Blood Cell Mol Dis*, 44 : 48-54, 2010
- 4) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of N-octyl- β -valienamine on β -glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev*, in press, 2010

2. 学会発表

- 1) 鈴木義之: 神経遺伝病の新しい治療法—ケミカルシャペロン療法. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30
- 2) 難波栄二, 檜垣克美, 鈴木義之: 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—88種類のミスセンス変異に対する NOEV の効果. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30

- 3) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of 4-octyl- β -valienamine on the organs in normal mice. 第 51 回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30
- 4) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, Suzuki Y : Chaperone activity of bicyclic SP²-azasugars for Gaucher mutations, 10th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Daegu, Korea, 2009.6.10-13
- 5) Higaki K, Nanba E, Suzuki Y : Screening of chemical chaperone effect for GM1-gangliosidosis. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, San Diego, CA, USA, 2009.8.29-9.2
- 6) Suzuki Y : New Therapeutic approaches to neurogenetic diseases. International and IX Ukrainian Congress of Child Neurology, Kiev, Ukraine, 2009.9.9-12
- 7) Li L, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E : Screening for chemical chaperone therapy in β -galactosidosis. The Third International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 8) Higaki K, Takamura A, Li L, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E : Cellular dysfunction in murine GM1-gangliosidosis. The Third International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 9) Suzuki Y, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Sakakibara Y, Ogawa S, Iida M : Molecular basis of chaperone effect in lysosomal diseases. European Society of Child Neurology Congress 2009, Harrogate, UK, 2009.9.30-10.3

- 10) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy : A new molecular approach for brain pathology in lysosomal diseases. The 13th Asian Pacific Congress of Pediatrics and 3rd Asian Pacific Congress of Pediatric Nursing, Shanghai, 2009.10.14-18
- 11) 池端宏記, 檜垣克己, 李 林静, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二 : β ガラクトシダーゼ欠損症に対するケミカルシャペロン療法. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11.5-7
- 12) 欒 卓, 檜垣克己, 二宮治明, 大野耕策, Carmen Ortiz Mellet, Jose M Garcia Fernandez, 鈴木義之 : ゴーシェ病患者線維芽細胞での蛍光標識した二環系糖質 (SP2-azasugar) のシャペロン活性と細胞内局在. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11.5-7
- 13) Suzuki Y : Molecular basis of metabolic encephalopathy – Neurogenetic diseases : From molecule to patient. The 13th Infantile Seizure Study Group and International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases, Taipei, Taiwan, 2010.3.26-28
- 2) NOV
鈴木義之, 大野耕策 : 糖脂質代謝異常症の治療薬. 日本特許第 4299479 号
- 3) NOEV
鈴木義之, 難波栄二, 松田潤一郎 : 糖脂質代謝異常症治療剤. 日本特許第 4299517 号
- 4) NOEV, NOV(PTC)
米国 : NOEV 物質 (審査中) 10/793, 8; NOEV・NOV 用途 (審査中) 12/490,737
欧州 : NOEV 物質 NOEV・NOV 用途 (審査中) 0276296.1
カナダ : NOEV 物質、NOEV・NOV 用途 (審査中) 2459887
オーストラリア : NOEV 物質、NOEV・NOV 用途. 特許登録 2002328402
- 5) 二環系アザ糖 (RV21, MTD118 など)
J. Garcia Fernandez, C. Ortiz Mellet, M.I. Garcia Moreno, M.Aguilar Moreno, 鈴木義之, 大野耕策 : Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (変異グリコシダーゼ活性を上昇させる化合物), スペイン P0200802988 (公開中)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) NOEV

小川誠一郎, 鈴木義之 : カルバ糖アミン誘導体.
日本特許第 4057264 号

ニーマン・ピック病 C 型患者の調査研究

分担研究者：大野 耕策(鳥取大学 医学部 教授)

研究要旨

近年、N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) や Hydroxy-propyl- β -cyclodextrin などのニーマン・ピック病 C 型の新しい治療が開発されてきており、2009 年 1 月に EU で miglustat がニーマン・ピック病 C 型(NPC)の治療薬として承認された。アメリカでも 2010 年 1 月に承認されている。2010 年 1 月現在、日本では miglustat は未承認であり、日本国内で実施可能な NPC に対する治療法はない。治療法の開発や効果判定のために NPC の自然歴を把握する必要があると考え、調査を実施した。

過去 15 年間に鳥取大学脳神経小児科で診断した NPC 患者の主治医へ調査表を郵送し、発症時期、診断時期、医療的ケアの必要性、死亡時期などについて調査を行った。26 人中 17 例から回答があり、その内訳は乳児型 2 例(11.8%)、小児型 9 例(52.9%)、若年型 4 例(23.5%)、成人型 2 例(11.8%)で、小児型が日本における NPC の中心的な病型と考えられた。診断は幼児型、小児型は 11 例中 8 例が 2 年以内に診断されていたのに対し、若年型、成人型では 4~9 年と診断が遅い傾向にあった。経管栄養、気管切開などの必要性は小児型、若年型で必要性が高かった。同じ病型でも医療的ケアの導入時期に差があり、重症度にはばらつきがあると考えられた。今後、より詳細な調査で臨床経過を明らかにしていく必要があると考える。

研究協力者

戸川 雅美(鳥取大学医学部)

A. 研究目的

日本におけるニーマン・ピック病 C 型(NPC)患者の自然経過を調査し、その病型や症状の経過について把握することである。自然歴を把握することで、治療法の開発や効果判定への活用が期待できる。

今回は医療的ケアの必要性や導入時期を中心に調査を行った。

1. 研究の背景

近年、N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) や Hydroxy-propyl- β -cyclodextrin などのニー

マン・ピック病 C 型の新しい治療が開発されてきている。N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) は 2001 年に経口投与で NPC マウスの寿命を 75 日から 105 日に延長すること、2007 年には若年型患者へ 1 年間の投与で神経症状の改善が認められたことが報告された。この報告を受けて、2009 年 1 月に EU で miglustat がニーマン・ピック病 C 型の治療薬として承認された。アメリカでも 2010 年 1 月に承認された。また、2009 年に Hydroxy-propyl- β -cyclodextrin の静脈内投与で NPC マウスの寿命が 84 日から 120 日に延長し、Miglustat との併用で、NPC マウスの寿命を 2 倍に延長できることが報告された。これら新しい治療法は日本ではまだ承認されておらず、現時点で国内で実施可能な治療法はない。

また、われわれの知る限り、今までに国内で NPC 患者の実態調査は行われていない。

B. 研究方法

過去 15 年間に鳥取大学脳神経小児科で診断した NPC 患者の主治医へ調査票を郵送し、記入を依頼した。質問項目は発症時の年齢、診断時の年齢、現在の年齢、または死亡時の年齢、医療的ケア(吸引、経管栄養、気管切開(喉頭気管分離)、人工呼吸管理)の実施の有無、それぞれの開始時期とした。

患者は症状の出現時期により 4 型に分類し、新生児期～乳児期の発症を乳児型、幼児期発症を小児型、9 歳～思春期の発症を若年型、思春期以降の発症を成人型とした。

C. 結果

- ① 当科で過去 15 年間に診断した 26 人の NPC 患者の主治医へ質問紙を郵送し、17 人から回答を得た。17 例の内訳は 乳児型 2 例(11.8%)、小児型 9 例(52.9%)、若年型 4 例(23.5%)、成人型 2 例(11.8%)で、小児型が全体の 52.9%と最も多く、日本における NPC の中心的な病型と考えられた。過去にはスペインや 6 ヶ国合同(イギリス、スイス、フランス、イタリア、ドイツ、台湾)で NPC の患者調査結果が報告されている。2006 年スペインの調査で、患者 30 人中 perinatal 3 人(10%)、severe infantile (2 歳以下発症) 7 人(23.3%)、late infantile(3-5 歳発症) 6 人(36.7%)、juvenile(5-16 歳発症) 11 人(36.7%)、adult(16 歳以降発症) 3 人(10%)や 2009 年 6 ヶ国(イギリスなど)の調査では、患者 57 人中 early-childhood(診断時 6 歳未満) 23 人(40.3%)、late-childhood(診断時 6-11 歳) 12 人(21.0%)、juvenile+adult(診断時 12 歳以上) 22 人(38.6%)と、幼児期以前に発症する病型が約半数を占め、今回の結果と同様であった。
- ② 初発症状は 乳児型では肝脾腫、小児型では発

達遅滞や退行、若年型では学業不振や運動の退行、成人型では運動の悪化と発症時期により違いを認めた。発症から診断までの期間は乳児型では発症直後、小児型は 3 ヶ月～11 年(9 例中 6 例が 2 年以内)、若年型・成人型は兄弟例を除いて 4～9 年だった。

- ③ 調査時生存している症例は全部で 10 例、小児型 7 例(3～19 歳)、若年型 2 例(22 歳、30 歳)、成人型 1 例(24 歳)であった。発症から現在までの期間は小児型で 2～15 年、若年型は 12、19 年、成人型は 6 年経過していた。
- ④ 調査時点で 17 例中 7 例が死亡していた。死亡例は乳児型 2 例(100%)、小児型 2 例(22.2%)、若年型 2 例(50%)、成人型 1 例(50%)であった。乳児型の死亡原因は肝不全と血球貪食症の悪化で、2 例とも乳児期に死亡していた。小児型の死亡年齢は 12～13 歳で発症後 10 年前後、若年型の死亡年齢は 20 歳、23 歳で発症から 10 年前後、いずれも呼吸器感染症が死亡原因であった。成人型の症例は死亡時 29 歳、発症から 9 年後であった。
- ⑤ 経管栄養は 17 例中 12 例で実施された。病型別では乳児型が 2 例中 1 例、小児型が 9 例中 8 例、若年型が 4 例中 3 例で実施された。成人型の症例では経管栄養を実施されていなかった。経管栄養の手段は全 12 例中 胃瘻が 8 例と最も多く、経鼻胃管が 2 例、残り 2 例は手段不明だった。発症から経管栄養の導入までの期間は乳児型で発症後早期、小児型で発症後 1 年～9 年(8 例中 7 例が 5 年以内)、若年型で 7～8 年だった。
- ⑥ 気管切開は 17 例中 8 例で実施された。病型別では小児型が 9 例中 6 例、若年型が 4 例中 2 例で、乳児型、成人型では気管切開を実施されていなかった。気管切開を行った全 8 例中 2 例で最初から喉頭気管分離術が施行され、残り 6 例中 2 例で単純気管切開術の約 1 年後に喉頭気管分離術を実施されていた。

気管切開の実施時期は小児型で発症から 1～10 年(3～12 歳)、若年型は 10 年、18 年(19 歳、29 歳)だった。

D. 考 察

鳥取大学脳神経小児科で過去 15 年間に診断した 26 人の NPC 患者のうち、回答のあった 17 人について 検討した。17 例の内訳は、乳児型 11.8%、小児型 52.9%、若年型 23.5%、成人型 11.8%で、小児型が日本における NPC の中心的な病型と考えられた。乳児型、小児型は比較的早くに診断される傾向にあるのに対し、若年型、成人型は発症から診断まで時間がかかる例を多く認めた。

経管栄養、気管切開の必要性は小児型でもっとも高く、発症から 3～5 年と早期に導入される症例が目立った。若年型においても経管栄養、気管切開の必要性は高かった。

E. 結 論

医療的ケアの導入時期を見ると、同じ病型でも重症度にばらつきがあり、より詳細な調査で臨床経過を明らかにしていきたいと考える。可能であれば、鳥取大学脳神経小児科だけでなく他の医療機関で診断された症例についても調査を行いたい。NPC 患者の自然経過を明らかにして、新しい治療法の評価に役立て、治療法開発を行っていききたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The pharmacological chaperone effect of N-octyl-beta-valienamine on human mutant acid beta-glucosidases. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 Oct 24. [Epub ahead of print]
- 2) Zama K, Hayashi Y, Ito S, Hirabayashi Y, Inoue T, Ohno K, Okino N, Ito M : Simultaneous quantification of

glucosylceramide and galactosylceramide by normal-phase HPLC using O-phtalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide N-deacylase. *Glycobiology*, 19(7) : 767-75, 2009

- 3) Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y : Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl) deoxynojirimycin. *ChemBiochem*, 10(17) : 2780-92, 2009

2. 学会発表

- 1) Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y : Chaperone activity of bicyclic SP² azasugars for Gaucher mutations. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 2) Yokoyama A, Togawa M, Maegaki Y, Ohno K : Late-infantile and Juvenile/ Adults forms of Niemann-Pick type C1 diasease. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (変異グリコシダーゼ活性を上昇させる化合物)、発明者 : Jose Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, Yoshiyuki Suzuki, Kousaku Ohno、スペイン P200802988

PCT/ES2009/070449

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についての研究

研究分担者：田中 あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科 准教授)

研究要旨

アガルシダーゼ・アルファとベータの製剤をそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)としてIgG抗体陰性の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。アガルシダーゼ・アルファ、ベータともに、血漿中の酵素活性のピーク値は、投与速度(mg/kg/h)に比例し、投与量(mg/kg)には関係なかった。これに対し、リンパ球中の酵素活性のピーク値は、投与量に比例し、投与速度とは関係がなかった。

研究協力者

岡田志緒子(大阪市立大学大学院医学研究科・登録医)

澤田 智(和泉市立病院・医員)

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。

(倫理面への配慮)

それぞれの患者に書面で説明を行い、同意書を得た。大阪市立大学の倫理委員会の承認を得て行った。

A. 研究目的

ファブリー病の治療薬としてアガルシダーゼ・アルファとベータの2種の製剤が使用されている。両者の違いは、酵素蛋白に付加されている糖鎖にある。培養細胞系においては、マンノース6-リン酸の付加が多いベータ製剤のほうが細胞内への取り込みが多いという報告がされているが、生体内における両製剤の動態の差は明らかではない。生体内においては、マンノース6-リン酸受容体の分布に臓器差があるため、培養細胞とは異なる動態を示すものと想像される。ファブリー病患者において、投与された酵素製剤の血漿中と末梢リンパ球中での動態を比較することにより、各々の体内での動態を推測すると同時に効果的投与方法について検討する。

B. 研究方法

アガルシダーゼ・アルファとベータ製剤をそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)にしてIgG抗体陰性のファブリー病男性患者に投与し、血漿中および末

C. 研究結果

各々の酵素製剤の*in vitro*での酵素活性は、アガルシダーゼ・アルファが1.26 nmol/mg/h、アガルシダーゼ・ベータが3.59 nmol/mg/hで、単位蛋白あたりの酵素活性はベータが約3倍高かった。

血漿中においては、アルファ、ベータともに投与直後にピークを示し、その後急速に低下して約1時間後にはピーク値の半分の値となった。ピーク値の高さは、患者体重当たりの製剤投与速度(mg/kg/h)に比例し、相関係数は0.941であった。

リンパ球中においては、投与直後から24時間後までほぼ横這いの状態で酵素活性が上昇した。同じ投与量では、ベータはアルファの約2倍のピーク値を示した。ともに、2週間後には正常の10%程度の活性となった。リンパ球中のピーク値は患者体重当たりの製剤投与量(mg/kg)に比例し、相