

200936002B

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19年～21年度 総合研究報告書

平成22(2010)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 19 年度～21 年度 総合研究報告書

平成 22 (2010) 年 3 月

研究代表者

衛 藤 義 勝

目 次

はしがき	1
研究組織	2
総括研究報告書	5
ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究 主任研究者 衛藤義勝	
付 1 平成 19 年度班会議プログラム	17
付 1 平成 20 年度班会議プログラム	20
付 1 平成 21 年度班会議プログラム	23
分担研究報告書	
I. 病臨床像の把握	
1) ライソゾーム病患者における健康関連 QOL を中心としたアウトカム研究	29
坪井 一哉(名古屋セントラル病院血液内科)	
2) ムコ多糖症の酵素補充療法の効果について	35
奥山 虎之(国立成育医療センター臨床検査部)	
3) 新生児ファブリー病スクリーニングに関する研究	38
遠藤 文夫(熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野)	
4) 治療可能なライソゾーム病スクリーニング法の研究 「ファブリー病ハイリスク・スクリーニングの研究」および「濾紙血液を用いた GSD II型、MPS I型、および MPS II型スクリーニング法の研究	40
北川 照男((財)東京都予防医学協会)	
5) ライソゾーム病患者の Quality of life(QOL)をあげるには、いかなる方策が必要か	48
高柳 正樹(千葉こども病院代謝内分泌科)	

II. 病態の解析

- 1) β -ガラクトシダーゼ欠損症の病因、病態、治療法に関する研究 53
難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター)
- 2) ライソゾーム病の病態と治療に関する臨床的研究 57
芳野 信(久留米大学医学部小児科学)
- 3) 日本人ムコリピドーシス II/III の遺伝子解析 60
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)
- 4) ニーマンピック病 A/B 病の臨床および病態に関する研究 63
高橋 勉(秋田大学大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系小児科学)
- 5) 微量の血液検体を用いたファブリー病診断法の開発とバイオマーカーの探索 65
櫻庭 均(明治薬科大学 分析化学・臨床遺伝学)
- 6) 孤発性パーキンソン病における GBA (Glucocerebrosidase) 遺伝子変異に関する研究 72
辻 省次(東京大学大学院脳神経医学専攻神経内科学)
- 7) ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究 74
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)
- 8) ペルオキシソーム膜形成の分子病態機構 78
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)
- 9) サボシン欠損マウスを用いたライソゾーム病の神経病態解明に関する研究 82
松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所)

III. 治療法の開発

- 1) ライソゾーム病に対するシャペロン療法の基礎研究 95
鈴木 義之(国際医療福祉大学)
- 2) ニーマン・ピック病 C 型の調査研究とリソゾーム病の中樞神経症状
に対する治療法の開発 101
大野 耕策(鳥取大学医学部 脳神経小児科学)
- 3) 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 105
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)

4) ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究	108
島田 隆(日本医科大学生化学・分子生物学)	
5) Sly 病(ムコ多糖症Ⅶ型)、Krabbe 病を中心としたライソゾーム病の 遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究	113
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) ムコ多糖症の自然歴と治療法開発に関する研究	115
鈴木 康之(岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター)	
7) 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	119
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	127

は し が き

本研究班は平成 19 年度から 21 年度までの 3 年間の期間に合計 22 名の班員で構成される。本研究班はライソゾーム病の調査研究だけでなく、ペルオキシゾーム病に関する調査研究も同時に研究課題として研究班を構成している。本研究班は 4 本の柱で構成され、1) ライソゾーム病患者の QOL&ADL に関する調査研究 2) ライソゾーム病&ペルオキシゾーム病の病態の解析並びに診断法の確立に関する研究 3) 早期治療の為に新生児並びにハイリスク患者のスクリーニング法の確立 4) ライソゾーム病&ペルオキシゾーム病の治療法 (iPS 細胞を含めた細胞治療、遺伝子治療) の開発、更には酵素補充療法の評価など調査研究を行い、これらの成果を 3 年間の報告書として纏めた。

平成 22 年 3 月吉日

東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座
研究代表者 衛藤 義勝

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	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	秋田大学大学院医学系研究科医学 専攻機能展開医学系小児科学	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	東京大学大学院脳神経医学専攻 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・臨床遺伝学	教授	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
北川 照男	(財)東京都予防医学協会	理事長	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
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 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	熊本大学大学院生命科学研究部 小児科学	教授	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
下澤 伸行	岐阜大学医学部生命科学総合研究 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

平成 13-15 年、16-18 年に引き続き、今回平成 19 年度より 3 年間、ライソゾーム病(Lysosomal storage Disease, LSD)調査研究班が組織され、従来掲げてきた三つの柱、I. 臨床像の把握、II. 病態の解析、III. 治療法の開発、に沿って様々な角度から精力的な研究が行なわれ、今回その総括と今後に向けた報告が為された。

- I. では、坪井らのゴーシェ、ファブリー、ポンペ、ムコ多糖症患者に対する包括的尺度を用いた健康関連 QOL 測定調査、奥山らの酵素補充療法の評価・意識調査、遠藤・北川らのスクリーニング開発(ファブリー病、ポンペ病)、高柳らの自然歴調査(GM1 ガングリオシドーシス、ムコリピドーシス II/III 型)が施行された。
- II. では、難波らのケミカルシャペロン効果検討、芳野らのゴーシェ病骨病変の検討、酒井らのムコリピドーシスの遺伝子解析、高橋らのニーマンピック A/B 病態、櫻庭らのファブリー病の早期診断治療開発、辻らのパーキンソン病における GBA(ゴーシェ病)遺伝子変異、今中、下澤らのペルオキシゾーム病病態、松田らのサポシン欠損マウスを用いた LSD の神経病態解明に関する研究、が施行された。
- III. では、鈴木義之らの経口シャペロン治療薬開発、大野らのニーマンピック C に対する脳内グリオシス抑制治療、田中らのファブリー病酵素補充における血中酵素動態解析、島田、小林らの MLD、MPSVII、クラッベ病に対する遺伝子治療、鈴木康之らのイソフラボンの臨床効果、加藤らの造血幹細胞移植研究、が為された。

以上のように三つの柱に沿って総合的な研究報告が為され、LSD に苦しむ患者の方々の予後の改善に直結する成果を上げて居り、LSD の予後改善に向け今後も大いなる期待が持てる状況であり、研究の更なる発展、継続が重要と思われる。

A. 研究目的

ライソゾーム病(Lysosomal storage Disease, LSD)は細胞内小器官であるライソゾームに存在する酵素の遺伝的異常により、当該酵素の基質が蓄積し多彩な臨床症状を呈する疾患群である。現在までに持続的・基礎的な調査研究によって病態が明らかとなった疾患も増え、近年特に酵素補充、骨髄移植といった治療法が実際の予後を改善させつつあるが、治療が開始されたことによる新たな

課題も多い。本研究では 3 本の柱として(I)現在の LSD 患者の現状および実態(activity of daily life [ADL]、quality of life [QOL]および現行の治療効果を含めたもの)を調査、把握し、更に(II)LSD の病態を解析しその理解を深め、(III)これらを基に早期診断法、新規治療法を開発していくことに重点を置いて研究を推進していき、成果を相互にフィードバックさせていくことで、LSD 患者の生命予後、ADL、QOL の改善の実現を目指すこと

が本研究の最終的な目的である。

B. 研究方法

I. 臨床像の把握

1. 症例数、ADL, QOLに関する調査： ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症の患者会に所属されている患者または家族の方で同意の得られた症例を対象に健康関連 QOL を測定する包括的尺度、疾患特異的尺度を用いて総合的に QOL 評価を行なった。平成 16 年度に予備調査として名古屋セントラル病院通院中のライソゾーム病患者における QOL 調査を行った。その後、これらの調査を基にして平成 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、平成 20 年度は、ムコ多糖症患者を対象に、健康関連 QOL 調査を行った。また、平成 21 年度は、ライソゾーム病全体の QOL 調査および総括を行った。

2. 現行の治療法の評価

- (1) ムコ多糖症酵素製剤アウドラザイムおよびエラプレースをムコ多糖症 I 型、および II 型患者に投与し、その効果を長期的に経過観察した。
- (2) アンケート調査により、ムコ多糖症の酵素補充療法に対する意識、期待度などについて検討した。

3. 診断法(スクリーニング)の開発

ファブリー病、ポンペ病の濾紙血液を用いたスクリーニング方法を検討し実態を調査した。ファブリー病では Chamoles らの方法を改変し、ろ紙血検体の α ガラクトシダーゼ酵素活性を測定し、西日本において新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行った。(遠藤)更に Fabry 病(FD)が疑われる症状を有するか、あるいは家族歴がある FD ハイリスク症例 112 名を対象に、尿

α -galactosidase A 蛋白(α -gal AP)を ELISA 法で測定すると共に、尿 GL-3 をタンデム質量分析計で測定するスクリーニング方法を開発し、この 2 つのマーカーを同時に測定し、FD のハイリスクスクリーニングを行った。(北川)また合成基質 4-Metylumbelliferyl 誘導体を用いた Chamoles らの従来法および蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法で酵素活性を測定し両者を比較した。また、MPS I 型と MPS II 型のハイリスクスクリーニング法についても検討した。(北川)

4. 自然歴および治療中の死亡例検討

新生児聴覚異常スクリーニングで発見された GM1 ガングリオシドーシス症例の臨床経過を調査、さらに 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アンケートにて再調査した。また酵素補充中に死亡した 3 例の LSD の臨床経過を詳細に検討した。

II. 病態解析

1. ベータガラクトシダーゼ欠損症の病因、病態、治療法に関する研究:ベータガラクトシダーゼ欠損症患者末梢血または皮膚線維芽細胞からゲノム DNA を抽出し、シーケンス解析を行った。ケミカルシャペロン効果の検討は、ヒト患者由来培養皮膚線維芽細胞または変異ヒトベータガラクトシダーゼ cDNA 発現マウス皮膚線維芽細胞の培養液に NOEV を添加後、細胞抽出液を調整し、酵素活性測定により行った。酵素活性測定は 4-MU 人工基質を用いた。新規ケミカルシャペロン候補化合物探索のためのルシフェラーゼを用いた酵素蛋白質検出系を構築した。また神経変性とオートファジー異常についての関連性の検討のため、10 ヶ月齢の正常および β -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス大脳皮質から Triton X-100 難溶性画分を抽出し、オートファジー形成に関して抗 LC3、抗 Beclin-1 抗体を、Akt-mTOR シグナ

ルは抗 Akt、Erk、mTOR、S6 抗体およびリン酸化抗体を用い、ウェスタンブロット法により発現定量解析を行った。

2. 1) ゴーシェ病の骨病変の病態解明：血中サイトカインなどおよび血液、尿中の骨代謝マーカーなどの値をそれぞれの方法で測定し、単変量解析を行った。2) ムコリピドーシスⅢ型患者の不随意運動の病態解明：神経学的診察、表面筋電図、脳および脊髄画像を解析した。3) ハンター症候群患児2名に対してイデュルスルファターゼの補充療法を行い効果を検討した。
3. ムコリピドーシス (ML) の病態解析：(I) 日本人 ML-Ⅱ型およびⅢ型患者から採取したリンパ球および皮膚線維芽細胞を用い、責任遺伝子である *GNPTAB* 遺伝子変異を解析した。同時に多型 (SNPs) の解析を行い、これらの変異が日本人に特異的な創始者効果 (Founder Effect) があるかどうかの検討を行った。次に臨床型と遺伝子変異の型を比較する事によって genotype phenotype correlation について検討した。(II) 次に ML-Ⅱ、ML-Ⅲにおけるオートファジーの機能を解析するために、培養皮膚線維芽細胞を用いて、Cathepsin B/D の活性、ユビキチン化タンパク、オートファジーのマーカーをウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色において評価した。ミトコンドリア機能を形態および活性染色で評価した。オートファジーの阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を投与してミトコンドリア機能の変化を観察した。
4. ニーマンピック病 A/B 型の病態に関する研究：国内症例を対象に培養皮膚線維芽細胞を用いてニーマンピック病の確定診断を酸性スフィンゴミエリナーゼ活性測定し行った。酵素活性低下を認めれば NP-A/B とし、活性が正常の場合にフィリピン染色を行い蓄積 Ch 陽性であればニーマンピック病 C 型 (NP-C) とした。NP-A/B の基本病態である SM 代謝異常は、SM および SM と親和性の強い Ch の細胞内輸

送障害を引起す。疾患細胞を用いて SM および Ch の細胞内輸送に関わる新規蛋白との関係を調べた。

- 1) NP-A/B 培養皮膚線維芽細胞を用いて Ch 輸送に関与する ABC 蛋白 (ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1) の mRNA および蛋白発現レベルを調べた。
- 2) ABCA1 および ABCG1 の細胞内発現レベルを調節する LXR アゴニスト T0901317 の NP-A/B 細胞蓄積 SM および Ch への影響を調べた。
- 3) NP-A/B 細胞において SM 合成系酵素インヒビターの蓄積 SM、Ch への影響を調べた。
- 4) NP-A/B 細胞においてエンドゾーム内 Ch 排泄に関与する NPC1 に関与する薬剤の影響を調べた。細胞内 SM は SM 結合蛋白ライセニンを使用した免疫染色、Ch はフィリピン染色を用いた免疫染色を用いて解析した。
5. ファブリー病 (α -ガラクトシダーゼ欠損症) の早期診断および治療法の策定に役立つ方法の開発：1) 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 (GLA) 活性測定：10 名のファブリー病ヘミ接合体男性、27 名のファブリー病ヘテロ接合体女性および 10 名の対照者由来の血清 10 μ l を試料として、それと人工蛍光基質との酵素反応を 96 穴のタイタープレートで 1 時間行わせ、酵素反応によって生じた蛍光を検出することにより、各試料中の GLA 活性を測定した。2) MUSTag 法による乾燥濾紙血中の GLA 蛋白質量の測定：2 種類の抗 GLA 抗体 (そのうちの 1 種類の抗体にはオリゴ DNA を付着させた) を用いた免疫固相法と抗 GLA 抗体に付けたオリゴ DNA を Real-Time PCR で増幅定量する方法とを組み合わせ、MUSTag 法を利用した GLA 蛋白質の測定法を開発した。4 名のファブリー病ヘミ接合体男性と 10 名の対照者由来の乾燥濾紙血を試料とし、MUSTag 法で血中 GLA 蛋白質を定量した。3) 血漿中のリゾグロボトリアオン

ルセラミド(Lyso-Gb3)の測定。8名のファブリー病ヘミ接合体男性、8名のヘテロ接合体女性(臨床症状を伴うもの5例と無症状のもの3例を含む)および6名の対照者由来の血漿100 μ lを試料として、脂質画分を抽出した後、高速液体クロマトグラフィー法で血漿中のLyso-Gb3を定量した。

6. パーキンソン病の発症リスクとしてのゴーシェ病の変異解析研究：日本人パーキンソン病患者群と対照群に対してGBA遺伝子の塩基配列決定を行い、全ての変異を網羅的に同定して、関連を検証した。国際多施設共同研究を行い各施設のデータをメタ解析した。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。GBA変異過剰発現マウスを作成した。なお、研究対象者に対する書面によるインフォームドコンセントのうえ、検体は匿名化して解析した。
7. ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究：ペルオキシソーム病の診断システムは臨床症状よりペルオキシソーム病が疑われた患者血清を用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)により極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラスマローゲンなどペルオキシソーム代謝産物を測定し、異常を認めた患者については皮膚生検による培養線維芽細胞の樹立から細胞、タンパク、遺伝子レベルの解析を経て、確定診断を行う。その際に同意を得られた患者試料については本症の病態解明から治療法の開発研究を進めて行く。その1つとしてペルオキシソーム形成異常症と対照細胞から全転写産物と代謝産物をマイクロアレイおよびGC-MS+LC-タンデムマスにて網羅的に解析することにより、ペルオキシソームの新たな機能や生活習慣病に関連する脂質代謝異常症や神経変性疾患における疾患感受性遺伝子としての可能性を検討する。一方で、発展途上にある本疾患群の国内医療機関への更

なる周知を目的に、ペルオキシソーム病に属する各疾患概要から診断フローチャート等の医療情報を掲載した「ペルオキシソーム病診断パンフレット」を作成して全国に配布している。さらに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内のホームページにペルオキシソーム病に関するページを設置して(<http://www1.gifu-u.ac.jp/~lsrc/dgr/shimozawa-hp/index.html>)、以下の診断フローチャートも含めた最新の医療情報を更新し、全国に配信している。

8. ペルオキシソーム病におけるペルキシソーム膜形成障害の分子機構:野生型ならびに変異型ヒトPex3pの細胞質ドメインにHis-tagを導入したHis₁₀-Pex3p、野生型ならびに変異型ヒトPex19pにGST-tagを導入したGST-Pex19pを大腸菌に発現させ、精製した。Pex3pとPex19pとの相互作用は、ゲル濾過、トリプトファンの蛍光スペクトル、表面プラズモン共鳴、pull down assay等により解析した。Pex3pならびにPex19pによるペルオキシソーム形成能は、Pex3pもしくはPex19pを欠失したCHO細胞やZellweger syndrome患者線維芽細胞に、目的とする遺伝子を導入し、ペルオキシソームの形成をペルオキシソームマトリックスタンパク質ならびに膜タンパク質PMP70に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。
9. サポシン欠損マウスを用いたLSDの神経病態解明に関する研究：1)サポシンC欠損マウスの作製: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^{-/-})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。2) 小脳プルキンエ細胞死の病態解析: サポシン D 欠損マウスとニーマン-ピック病 C 型のモデルマウス (NPC1^{-/-}) における小脳プルキンエ細胞死のパターンを組織免疫学的手法を用いて経時的に解析し、その脱落パターンとスフィンゴシンにリン酸基を付加しスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を合成する酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の発現パターンと比較検討した。3) プロサポシン特異抗体の作成と野生型およびサポシン D 欠損マウスにおけるプロサポシンの発現解析: プロサポシンのみを検出するプロサポシン特異抗体を作成し、プロサポシンのマウス脳組織での分布および神経細胞内での動態を検討した。

III. 治療法の開発

1. ライソゾーム病の新しい経口薬 (シャペロン) 治療の開発: ケミカルシャペロン治療のひとつの試みとして、軽症型 G_{M1}-ガングリオシドーシス (トランスジェニック R201C 変異) モデルマウスに NOEV (1mM 水溶液) をアドリブ経口投与し、その臨床効果を、NOEV 組織濃度、 β -ガラクトシダーゼ活性、G_{M1} 蓄積量、神経学的重症度などを指標として総合的に評価した。またシャペロンと酵素たんぱく質の相互作用を NOEV と NOV (N-octyl- β -valienamine) について結合自由エネルギー計算により検討した。
2. ニーマン・ピック病 C 型の調査研究と LSD 中枢神経症状に対する治療法の開発: 2007 年には Toll-like 受容体 4 と IL-6 ノックアウトをニーマン・ピック病 C 型モデルマウスに導入し、その効果を検討した。2008 年には NPC モデルマウスの脳幹病理を検討し、モデルマウスは NPC 患者に特徴的に見られる眼球運動障

害やカタプレキシーと関係する部位に病変を持つか否か検討。また 2009 年には Miglustat の欧米での承認を契機に日本人ニーマン・ピック病 C 型患者の実数を把握し、日本人 NPC の自然歴を明らかにする必要があると考え、今年度は、我々が診断した 26 例の NPC 患者の追跡調査を行った。

3. ファブリー病酵素補充における血中動態解析: 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。
4. MLD の遺伝子治療: AAV1-GFP、AAV1-ASA ベクターを、C57BL6 或いは ASA ノックアウトマウスの後頭蓋窩からの髄腔内投与を行ない 8 週後に解析した。ASA 活性は ELISA 法で、スルファチドの定量は TLC 法で行った。5-FU で前処置した GFP+C57BL/6 マウス (GFP トランスジェニックマウス) から (GFP+) 骨髄細胞を調整し、レトロウイルスベクターにより HOXB4 遺伝子を導入した。HOXB4 陽性骨髄細胞を放射線照射した MLD マウスに移植し、移植効率、ドナー細胞の分布、スルファチドの変化、運動機能を調べた。
5. MPS、Krabbe 病の遺伝子治療: Lentivirus ベクターを各モデルマウスの新生児期に静脈注射を行い、臨床効果、酵素活性 (蛍光基質法)、遺伝子発現 (real time PCR) を確認した。Krabbe 病モデルマウス新生児に対する骨髄移植も施行した。
6. イソフラボンの臨床効果: 主治医に同意を得た MPS 患者にイソフラボンを無償供与しアンケート調査でその効果を確認した
7. 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: 初年度は日本小児血液学会造血幹細胞移植委員会と合同で先天性代謝異常疾患における造血幹細胞移植の実施状況に関する全国調査を行った。以後の

2年度にわたり、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、移植後1年以上経過した先天性代謝異常疾患の患者53例を対象として、移植成績に及ぼす因子について詳細な解析を行った。

C. 研究結果および考察

I. 臨床像の把握

1. 症例数、ADL, QOLに関する調査：ライソゾーム病患者(平成17年度はポンペ病患者、平成18年度はゴーシェ病患者、19年度はファブリー病患者、平成20度はムコ多糖症患者)を対象にした健康関連QOLの臨床疫学的調査を行った。解析の結果として、各疾患における身体的健康度、精神的健康度は、国民標準値に比べ、同等もしくは低値を示していた。比較的、精神的健康度は保たれていたものの、各疾患すべてにおいて身体的健康度は国民標準値を下回る傾向が認められた。身体的健康度の低下の要因としては、原疾患による臓器の障害が健康度の低下・QOLの低下に影響を及ぼしていると考えられた。また、精神的健康度に関しては国民標準値と同等であったものの、病気や治療、結婚、遺伝などに関し多くの不安を抱えていることが明らかになった。ライソゾーム病は、希少性疾患でもあるため、一般診療で診られる疾患とは多くの点で異なり、対応可能な医師や医療機関も少なく、さらに患者自身の症状の自覚、病名の告知、現在の病状や治療の説明、また、本疾患が遺伝性疾患であるための婚姻や家族(子供)に対する不安、情報の不足など様々な要因が相互に作用し、健康度の低下を来していると考えられた。
2. 現行の治療法の評価：(1) 酵素補充療法の有効性と安全性について：投与したすべての症例で、尿中ウロン酸の低下、肝容積の正常化、皮膚の湿潤化、中耳炎・聴力の改善、睡眠時無呼吸の改善、精神運動発達遅延の改善、肩関節可動域の改善を認めた。また投与関連反応が見

られた症例があったが、投与速度をおそくする、抗ヒスタミン剤やステロイド剤を事前に投与するなどを行ったところ、投与を再開することができた。(2) 酵素補充療法に対する意識調査：日本ムコ多糖症親の会に所属する患者家族にアンケートを行った結果、酵素補充療法の効果が限定的である、特に中枢神経症状に効果が期待できないということを認識した上でも、早期の酵素補充療法を希望する患者家族がほとんどであることが示された。ムコ多糖症の酵素補充療法が、日本人患者に対して、安全に導入できること、および、患者家族の期待が高いことが示された。

3. 診断法(スクリーニング)の開発：

- 1) ファブリー病(FD)スクリーニング：グループA(α ガラクトシダーゼ(GLA)値とGL-3値が何れもcut-off値超え)の女性27例のうち26例はFDヘテロ接合体(古典型23例、心型異型症2例、腎型異型症1例)で、1例は正常であった。グループB(GLA値とGL-3値がどちらかがcut-off値超え)の女性15例のうち10例はFDヘテロ接合体(古典型6例、心型異型症4例)で、5例は正常であった。グループC(GLA値とGL-3値が何れもcut-off値超えていない)の女性7例のうち6例は正常で、1例が古典型ヘテロ接合体であった。また熊本地区をはじめとする西日本において、ファブリー病の新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行い、これまでに新生児において約182,000名中33名の酵素活性の異常低値者が明らかになった。活性低値の新生児と家族に対して遺伝カウンセリングを行い、 α ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。その中で遺伝子異常を認めたものが26名であった。特に古典型ファブリー病に認められる変異は4名の男児に認められた。そのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約5,700名に1名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約23,000名に1名であると推定された。

このスクリーニングによって発見された新生児の家系の解析を行うことで、家族に存在するファブリー病の発症前の診断も可能となった。同様の方法を用いることで、成人のファブリー病についても酵素活性の診断を簡便に安価に行うことが可能となった。

2) Pompe 病スクリーニング

同一検体を従来の方法(Chamolés ら)と蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法で測定した成績は、図 6 に示すように、いずれの方法でも GSD II 患者 4 例および酸性 α -glucosidase pseudo deficiency 1 名は、正常対照群との区別は明確で、容易に患者を診断することが可能であった。

3) MPS I 型スクリーニング

MPS I スクリーニング成績は、正常対照群 42 例では mean \pm SD 139.2 \pm 34.1pmol/hr/mL (range172.4-233.5pmol/hr/mL) の範囲にあるのに対して、患者群 7 例では mean \pm SD 7.8 \pm 3.8 pmol/hr/mL (range 3.3-14.0pmol/hr/mL) と著しく低値を示し、患者の判定は容易であった。また、ERT を開始した患者では ERT 開始前と開始後の測定値はいずれも低値であったが、両者の測定値に差はみられなかった。

4) MPS II 型スクリーニング

(1) iduronate-2-sulfatase (IDS) 活性測定によるスクリーニング成績

IDS 活性測定値は、新生児対照群 90 で mean \pm SD165.9 \pm 71.5pmol/hr/disk (range 47.0-339.5pmol/hr/disk) であるのに対して、ERT 開始前の重症型 1 例、軽症型 1 例の測定値はそれぞれ 19.1、23.1pmol/hr/disk で、正常対照群より明らかな低値を示した(図 8)。

(2) 酵素蛋白測定による成績

図 9 に示すように、DELFI[®]を用いた IDS 酵素蛋白測定値は新生児対照で mean \pm SD 120.5 \pm 43.4pmol/hr/disk (range 37.0-237.5 pmol/hr/disk) であるのに対して、患者では活性と同様に重症型、

軽症型共に 0 であり、感度以下であった。

4. 自然歴:新生児聴覚異常スクリーニングで発見された GM1 ガングリオシドーシス症例の臨床経過を調査では、現在の新生児聴覚異常スクリーニングでは小児科医は全く関与していない。今後このスクリーニングに小児科医を積極的に関与させることで、GM1 ガングリオシドーシスをはじめとする、ライソゾーム病を早期発見できる可能性があると考えられた。さらに 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、ムコリピドーシス 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アンケートにて再調査した。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。ムコリピドーシス 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。QOL を保って長期生存するためには気管切開、在宅人工呼吸器療法が必須であると考えられた。治療中に死亡した書例検討に関しては本稿参照。

II. 病態解析

1. ベータガラクトシダーゼ欠損症の病態、治療法に関する研究: 11 人のベータガラクトシダーゼ欠損症患者について遺伝子変異解析を行い、新規変異型(L146del, G190D, W92ter)を含む変異型を同定した。また、患者皮膚線維芽細胞を用いた解析により、新規変異 G190D について NOEV による有意なケミカルシャペロン効果を認めた。マウス細胞発現実験系を用いた解析の結果、48 種類の変異ベータガラクトシダーゼのうち 14 種類の変異型で NOEV の効果を認めた。以前に行った 40 種類の変異型についての結果とあわせ、88 種類中 22 種類(25%)の変異型で NOEV が有効であることが分かった。また、患者変異型リストを検索した結果、

NOEV はベータガラクトシダーゼ欠損症患者の 30~40%に適応できる可能性があることが分かった。

- 1) ゴーシェ病の骨病変の病態解明：ゴーシェ病では、macrophage-colony stimulating factor の過剰により骨吸収が亢進し、反面 transforming growth factor- β 1 の過剰が骨吸収に対して抑制的に作用し、いっぽう interleukin-18 の増加により骨形成が亢進した状態であることが分かった。
 - 2) ムコリピドーシス III 型患者の不随意運動の病態解明：ムコリピドーシス III 型成人患者で不随意運動を認めた。筋電図所見上、振戦が主体と考えられた。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。
 - 3) Hunter 症候群患者の酵素補充療法に対する効果を分析し、ウロン排泄の正常化、身長伸び率の改善、肝脾腫の縮小、心筋肥厚の軽減の効果はあるが関節拘縮や脳室拡大の進行は阻止できず、臓器毎に差異があることが明らかになった。
2. ムコリピドーシス (ML) の病態解析：(I) 日本人 ML-II 型および III 型患者における遺伝子変異解析 日本人 ML-II 型患者 25 名および III 型患者 15 名の *GNPTAB* 遺伝子変異解析を行った。40 名 80 アリルにおいて、のべ 73 個の変異が同定された。うち新規の変異が 14 種類であった。(欠失 5 種類、挿入 3 種類、塩基置換 4 種類、挿入+塩基置換 1 種類、エクソン重複 1 種類) 日本人における変異は停止コドン、frame shift が大半である事が分かった。なかでも p.R1189X 変異はアリル頻度で 41%に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられた。p.F374L はアリル頻度が 10%で、軽症型の ML-III に見いだされたため、片方でもこ

の変異をもつ場合に表現型が軽症となると考えられた。exon2 の duplication 変異は 2 つのアリル間におけるゲノムレベルでの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、アリル頻度も 7.5%と日本人に比較的多く見つかる新規変異であった。これら 3 種類の変異については簡便なスクリーニング方法を確立した。ML-II、ML-III の分類と症状の関係では、立位、独歩、会話は ML-II で著しく障害されていた。一方、心雑音、鼠径ヘルニア、肝脾腫は ML-II と ML-III で差がなかった。ある種の変異には genotype phenotype correlation が認められ、SNPs の解析では 2 つの変異において Founder Effect が示唆された。(II) ML-II、ML-III 皮膚線維芽細胞におけるオートファジーの解析 ML 細胞においては CathepsinB/D の低下が確認され、また、ユビキチン化された基質が蓄積していた。オートファゴソームの膜に局在する LC3-II 蛋白は著明に増加しており(ウェスタンブロット)、MDC 染色陽性で、Lamp-2 と共局在する LC3 陽性の小胞(オートライゾーム)が多数細胞質内に蓄積していた(免疫蛍光染色)。ミトコンドリアは細く断片化しており、JC-1 染色では膜電位が低下していたが、3-MA の 16 時間の投与によりオートファジーの誘導を阻害する事でミトコンドリアの形態は著明に改善を認め、膜電位も回復を認めた。ライゾゾーム病ではオートファゴソームとライゾゾームの融合が障害されていると言われているが、ML においては融合後の分解が障害されているためにオートライゾームのクリアランスが低下していると考えられた。また、オートファジー分解経路の障害による異常ミトコンドリアの二次的な蓄積のみならず、正常ミトコンドリアもオートライゾームにより直接障害されている可能性が示された。オートファジーを薬剤で調整する事でミトコンドリアの一時的な回復を確認した事は、今後治療法の開発においても

興味深い知見である。

3. ニーマンピック病 A/B 型の病態に関する研究：1) NP-A/B 細胞において ABCA1 および ABCG1 の発現低下が確認された。特に ABCG1 に関し蛋白レベルでの低下が確認された。ABCG1 は細胞から SM や Ch の細胞外排出に関与する。したがって疾患特徴的な泡沫細胞形成を説明する病態かも知れない。2) NP-A/B 細胞に対して LXR アゴニスト T0901317 を用いると ABCG1 の蛋白発現量の上昇が観察された。蓄積 SM および Ch の減少も観察された。3) SM 細胞内合成系に関与する酵素 SPT 抑制薬 myriocin、SMS 抑制剤 D609 のエンドゾーム蓄積 SM、Ch への影響を調べたが明らかでなかった。また、エンドゾームから Ch の細胞内輸送を調節する NPC1 を調節する薬剤 forskolin、thapsigargin も同様に明らかな影響を示さなかった。SM に関しては形質膜からエンドゾームへの経路に関与する薬剤の影響を調べるのが今後の課題である。
4. ファブリー病 (α -ガラクトシダーゼ欠損症) の早期診断および治療法の策定に役立つ方法の開発：1) タイタープレート法による血中 α ガラクトシダーゼ (GLA) 活性測定 本法による血清中 GLA 活性の測定値は、ファブリー病ヘミ接合体男性における値と対照者の値との間には明らかな差が認められた。一部タイタープレート法での測定値は、従来法での測定値に比べてやや低かった(約 50%) が、よく相関しており、ファブリー病の診断法として十分に使用可能と考えられた。本法は、その簡便性から、腎や心疾患を伴う患者群からファブリー病男性患者を見つけるためのハイリスク・スクリーニングに利用出来ると考えられた。2) MUSTag 法による血中 GLA 蛋白質の定量 今回測定したファブリー病患者群と対照とを比較すると、前者で明らかな血中 GLA の減量が認められた。一般に、当該酵素蛋白質が欠損した患者に対して酵素補充療法を行うと、酵素

- に対する抗体が出来、アレルギー反応などの有害副反応を生じ易いことが知られている。MUSTag 法により、微量の血液試料で GLA の量が測定出来れば、その結果により、酵素補充療法を行う際にアレルギー反応の発生を予測して予防処置をとるなど適切な治療法の策定にも利用出来ると期待される。3) 血中 Lyso-Gb3 の測定 対照者では、全例、血中 Lyso-Gb3 の値が 2nmol/l 以下であったのに対して、ファブリー病ヘミ接合体男性およびファブリー病ヘテロ接合体女性では、それぞれ、平均 160nmol/l (範囲 58~403) および平均 18nmol/l (範囲 9~35) であった。ファブリー病男性患者においては、血中 Lyso-Gb3 の著明な増加が認められた。また、ファブリー病ヘテロ接合体女性においては、臨床症状の有無を問わず全例で血中 Lyso-Gb3 の増加がみられた。これらの結果から、本法がファブリー病の診断補助に役立つ可能性があると考えられた。また、Lyso-Gb3 は血管増殖作用を持ち、ファブリー病と密接に関係することがすでに明らかにされており、本症による血中 Lyso-Gb3 測定は、ファブリー病の病態把握にも有用と思われる。
5. パーキンソン病の発症リスクとしてのゴーシェ病の変異解析研究：日本人サンプルでは GBA 遺伝子変異のキャリアはパーキンソン病の 10% 弱に認められ、オッズ比 28 倍の強い危険因子であった。キャリアでは発症年齢が若年化し、認知症の頻度が多かった。また家族性パーキンソン病の一部にも関与していた。メタ解析による検証でも、GBA 遺伝子変異はパーキンソン病と有意に関連した。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。過剰発現マウスの作成に成功した。
 6. ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究：平成 19-21 年の 3 年間に全国の医療機関より依頼された約 240 例に及ぶ血清

の脂肪酸分析を行い、80例のペルオキシソーム病患者または保因者を診断している。さらに診断した患者の主治医に対してパンフレット、ホームページも含めて疾患の治療情報や予後、国内患者の状況を個人情報に留意して情報提供を行っている。また国際貢献としてサウジアラビア国立病院とペルオキシソーム病患者の診断協力に関する協定を締結し、20-21年度にアラブ地域において副腎白質ジストロフィーを除いた11例のペルオキシソーム病患者の確定診断を行っている。患者細胞を用いたペルオキシソーム代謝機能の解明では温度感受性を有する遺伝子型の異なる6種類のペルオキシソーム形成異常症患者細胞に2種類の対照細胞において培養温度を変えて得られたRNAを用いてGene chip解析を行い、8ペア16検体からなる転写産物の網羅的データを作成した。今後、このデータをもとに広く代謝病の病態に関わる遺伝子群におけるペルオキシソームの関与を検討していく。また生下時より普通食と高脂肪食を投与した2群のマウスにおいて、極長鎖脂肪酸を含めたペルオキシソーム代謝系の血清脂肪酸分析と肝臓におけるペルオキシソーム関連遺伝子発現を比較解析し、現在、そのデータをもとに生活習慣病モデルマウスにおけるペルオキシソーム代謝機能の変化を検討している。

7. ペルオキシソーム病におけるペルオキシソーム膜形成障害の分子機構: リコンビナントPex3pとPex19pは単量体として存在し、両者は1:1の複合体を形成した。Pex19p存在下でのPex3pのトリプトファン蛍光(340 nm)のblue shift、GSP-Pex19pとのpull down assay等より、Pex3p中のTrp-104がPex19pとの結合に重要であることが示唆された。一方、Pex19pのPex3pとの相互作用には、pull down assay等によりPex19pのN末端から44アミノ酸残基が関与することが示唆された。この配列中の特徴あるドメイン構造より各種

の変異型Pex19pを作製しpull down assayを行った結果、Leu-21、Leu-22、Phe-29がPex3pとの結合に重要であることが示唆された。さらにPex19pを欠損したZellweger syndrome患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型pex19p(L21A)、Pex19p(L22A)、Pex19p(W29A)を発現させると、野生型ではペルオキシソームが形成されたが、変異型では形成されなかった。よって、Pex19p N末端の疎水性アミノ酸の重要性が示唆された。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。

サポシン欠損症モデルマウスの作製と解析: 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^{7C384S})の作成に成功し、Sap-C^{-/-}およびPsap^{7C384S}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特定の神経細胞が選択的に細胞死に至ったことから、その神経細胞死の原因は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。

III. 治療開発

1. ライソゾーム病の新しい経口薬(シャペロン)
治療の開発:シミュレーションによる結合自由エネルギーを計算し NOEV、NOV とともに pH5 の条件で pH7 より結合強度が低下する(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ていた。これらにより G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する NOEV のシャペロン効果を確認した。形態・化学・臨床などの多面的な評価により、代謝動態の矯正、神経学的進行の停滞などが明らかになった。ただし、進行の完全な阻止はできておらず、今後、投与量、投与方法などの検討が必要であると思われる。さらにシャペロン療法の分子機構について明確な結論を得た。
2. ニーマン・ピック病 C 型の調査研究と LSD 中枢神経症状に対する治療法の開発:ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスへ Toll-like 受容体 4 のノックアウトを導入したがマウスの寿命は変化なかった。一方、IL-6 ノックアウトを導入したマウスでは、寿命が 2 週間延長し、脳の反応性グリオシスが抑制された。このことはニーマン・ピック病 C 型では細菌内毒素によるシグナルが活性化し、IL-6、IL-8、INF- β 、MAPK の恒常的活性化を引き起こし、これらが脳内の炎症や tau の過剰リン酸化を引き起こしている可能性が示唆され、このシグナルの抑制が延命効果と脳内グリオシスの抑制につながることを明らかにした。またモデルマウスでシクロデキストリンが治療薬として有効であることが確認され、今後、日本での治療の開始を目指して、日本人患者の自然歴を明らかにすることを目指している。過去 15 年間に診断した 26 名の NPC 患者の主治医にアンケートを送り 17 名(死亡 7 名)の情報がえられ、同じ病型でも医療的ケアの導入時期に差が

あり、重症度にばらつきがあることが明らかになった。

3. ファブリー病酵素補充における血中動態解析: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。
4. MLD の遺伝子治療:AAV ベクターの髄腔内注射 AAV-GFP の髄腔内投与後、GFP の発現は脳室上衣細胞、脈絡叢、嗅球、視床下部、脳幹部、小脳プルキンエ細胞、脊髄実質、脊髄神経節など脳全域で認められた。脳組織を 13 領域に分割し ELISA 法にて ASA 活性を、TLC 法にてスルファチドの測定したところいずれの領域でも酵素活性の上昇とスルファチドの減少を認めた。
5. HOXB4 発現細胞の骨髄移植:HOXB4 発現細胞を移植したところ、90%以上の血液細胞がドナー由来に置換した。移植後 8 ヶ月の HOXB4 発現細胞移植マウスでは大量のドナー細胞が脳内に侵入していることが確認された。免疫染色の結果、ほとんどはミクログリア細胞であったが、一部にオリゴデンドロ細胞も含まれていた。10 ヶ月のコントロールマウスでは大量のスルファチドが蓄積していたが、HOXB4 発現細胞移植マウスでは顕著な減少が認められた。運動機能テストでは HOXB4 発現細胞移植マウスで著明な運動機能の改善が認められた。
6. MPS、Krabbe 病の遺伝子治療:Lentivirus ベクターの新生児遺伝子治療では MPSI、VII型に対しては欠損酵素の長期発現、病理の改善、寿命の延長と非常に効果的であったが、Krabbe 病に関しては十分な効果がみられていない。こ

れはおそらくサイトカインなどの欠損酵素以外の病態に関する影響が大きいと思われる。また Exo Vivo Gene Therapy を考慮して施行した骨髄移植だが、モデルマウス各臓器での酵素活性は上昇したが、病理改善は十分ではなかった。

7. イソフラボン効果:治療効果に関しアンケート調査の結果、肝脾腫大や髪の毛の硬さ、表情の変化などには効果が見られたが、悪影響を示唆する報告も見られ今後の更なる調査が必要と考えられた。
8. 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: 東海大学における先天性代謝異常疾患に対する造血幹細胞移植は1986年のMPS4(Morquio病)に始まり、以後移植症例数が増加し、2008年までに53例で58回の移植が実施されている。先天性代謝異常疾患に対するわが国の移植の約3分の1を占めている。移植の対象となった疾患としては副腎白質ジストロフィー(ALD)が最も多く(21例)、全体の約半数を占めていた。次いでムコ多糖症が19例であった。いずれの疾患においても病初期に移植を実施できた症例ほど治療効果は高く、進行期の移植例は予後が不良であった。また結果として従来 of 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。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。

D. 総合的考察

この3年間で基礎研究として上記のなかでも

シャペロン療法など従来になかった新しい治療法、検査・スクリーニング法が開発されつつある。更にメカニズムとしてオートファジーに関わる経路が新たに注目されつつある。これらは将来LSDを取り巻く臨床環境を劇的に改善させる可能性を秘めているといえる。また保険適応で酵素補充療法が出来る疾患が増え、予後改善もいよいよ実際の臨床の場で実現されつつあるが、これに伴い副反応や実際の治療中のQOL評価など新たな課題が出現し更なる研究が必要とされる。その他の疾患も基礎的研究の進歩は早く、これに伴う課題は山積しており、今後も継続的な研究努力が非常に重要と思われる。

E. 結論

これまでLSDの臨床予後、QOL改善を目指して様々な研究が行われてきた結果、酵素補充療法が保険適応となり一部のLSD疾患群では予後の改善が現実化していく状況にある。これにより以前とは異なりLSDは治療可能な疾患群のひとつとして再認識されつつあり、臨床現場も活気を帯びつつある。今後、更によりよい根本治療や他の疾患に対する対策などを中心とした基礎研究が今までもにまして必要となり、ますます精力的な調査研究を推進する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担研究者の報告書欄参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究者の報告書欄参照