

加と細胞内での STAT 系シグナルの活性化がおこっていることを明らかにした。モデルマウスの脳でも、細胞死をおこすプルキンエ細胞に STAT-1、STAT-3 が過剰に発現しており、また、グリア細胞は Toll-like 受容体 4 を発現し IL-6 も産生していた。

NPC の培養線維芽細胞や脳では細胞内脂質輸送の欠陥により Toll-like 受容体 4 が恒常的に活性化され、サイトカインが過剰な産生される結果、プルキンエ細胞などに STAT が過剰に発現し、この異常なシグナルが神経細胞脱落や脳内のグリオシスと関係している可能性を考えた。これを検証するために、Toll-like 受容体 4 (TLR4) のノックアウトと IL-6 のノックアウトを NPC マウスに導入した。TLR4 を遺伝学的にノックアウトした時、培養線維芽細胞では IL-6 の産生は低下したが、マウスの脳では STAT の発現レベルも、活性化グリア細胞の数もかわらず、マウスの寿命にも変化がなかった。一方、IL-6 をノックアウトしたマウスでは、IL-6 の産生はなくなり、プルキンエ細胞や分子細胞層の STAT-3 の発現は低下し、視床や小脳の GFAP 陽性グリア細胞は顕著に減少し、平均 9 週生存するマウスの寿命を約 2 週間延長した。

このことから NPC ではコレステロールや糖脂質の細胞内輸送の欠陥によって、サイトカインストームと言うべき過剰な IL-6 や IL-8 の産生がおこり、このサイトカインの産生を完全に制御することで脳内のグリアの反応を抑制し、モデルマウスの寿命が延長出来ることが示された。

以上は Suzuki M., et al. *J Neurosci* 2007 に発表。

2008 年度

NPC では、カタプレキシー、嚥下障害、垂直眼球運動障害、聴覚障害、ジストニアなど脳幹の機能障害と関係した症状が特異的に発現する。

モデルマウスでこのような症状は確認できないが、モデルマウスでこれらの症状と関係する脳

幹の神経病理学的検索を行った。黒質のドパミンニューロンの選択的脱落とグリオシスがあり、この選択的脱落がジストニアやパーキンソン症状と関係している可能性がある。また垂直性眼球運動障害は内側縦束吻側間質核障害による可能性があるが、モデルマウス脳ではこの領域を含む中脳被蓋部のグリオシスを認めた。カタプレキシーやナルコレプシーは上部橋でのコリン作動性活動の増加とモノアミン作動性活動の減少、青斑核の活動低下が関係していると考えられている。モデルマウス青斑核ではドパミンニューロンが減少しているのに対し、コリン作動性ニューロンには変化がないと言う特異な所見が得られた。この所見がカタプレキシーの発症と関係している可能性が高い。リズム的な嚥下のパターン運動を惹起する神経回路網 (CPG) は延髄の孤束核と疑核の近傍にあり、咽頭の感覚が孤束核に入り、舌、咽頭、喉頭、食道のパターン運動を支配する舌下神経核と疑核を含む回路網を活性化する。嚥下障害が早期にくる NPC では、薄束核の神経細胞が脱落し、舌下神経核や疑核のグリオシスがあり、これらが嚥下障害と関係している可能性がある。

2009 年度

欧米では、糖脂質の合成段階の初めにグルコシルセラミドを合成する酵素の阻害剤である Miglustat をモデルマウスに投与すると 9 週で死亡するマウスの寿命が 3 カ月延長することが 2001 年アメリカで報告された (Zerves M, Somers K, Thrall MA, Walkley SU. *Curr Biol* 2001)。その後、欧米を中心に NPC 患者で治験が行われ、患者の神経症状の進行に有効であることが 2007 年に報告された (Patterson MC, et al., *Lancet Neurol* 2007)。この結果を受けて EU では 2009 年の 1 月に Miglustat が NPC の神経症状への治療薬として承認された。日本では治験の動きはなく、承認のめどはたっていない。

また、ニーマン・ピック病 C 型のモデルマウスに、神経ステロイド (allopregnanolone) を投与す

る症状が改善することが知られていた (Griffins LD., et al. Nature Med. 2004)。この神経ステロイドはシクロデキストリンに包接されて投与されていたが、その治療効果はシクロデキストリンにあることが 2009 年に報告された (Liu B. et.al. PNAS 2009)。しかも、Miglustat とシクロデキストリンを併用すると NPC マウスの寿命が 9 週から倍近くまで延長することが報告され、ニーマン・ピック病 C 型の治療薬として期待が持たれるようになった。

しかしながら、シクロデキストリンは 1kg20 万円と安価であり、現在、シクロデキストリンをニーマン・ピック病 C 型の治療薬として治験を行う製薬メーカーはない。

我々の報告した IL-6 の抑制をはじめとして、糖脂質の合成を抑制する Miglustat、蓄積するコレステロールを引き抜くと考えられるシクロデキストリンが、モデルマウスの寿命を延長させることが明らかになり、今後、治験が行われる可能性が高くなった。

このため、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。現在までに 17 人の主治医から臨床経過の報告をいただき、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 (平成 21 年度分担報告書)。

日本では、その他秋田大学で 1 名、大阪大学で 1 名が診断されており、今後さらに正確に、日本人患者の生存と自然歴の調査を行っていく。

E. 結 論

2009 年までに我々の研究成果を含めて、NPC モデルマウスの寿命を延長させる複数の方法が明らかになった。

今後、ニーマン・ピック病 C 型患者の治療に向けた、厚生労働省から承認を受ける努力と、治験を行う体制の整備が必要である。

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. 2009.10.24
- 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
- 4) Hayashi Y, Zama K, Abe E, Okino N, Inoue T, Ohno K, Ito M : A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases, Anal Biochem, 2008.7.30, [Epub ahead of print]
- 5) Takano K, Shimono M, Shiota N, Kato A, Tomioka S, Oka A, Ohno K, Sathou H : Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis : The first reported case in Japan diagnosed by palmitoyl-protein thioesterase enzyme activity deficiency, Brain Dev, 30(5) : 370-3, 2008.5
- 6) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki

- Y, Nanba E : Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(3) : 616-22, 2008
- 7) Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E, Ninomiya H, Ohno K : Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Sci*, 268 : 108-116, 2008
- 8) Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Suzuki Y : Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, 1772 : 587-596, 2007
- 9) Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H : Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of STATs in Niemann-Pick disease type C fibroblasts : a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J Neurosci*, 27 : 1879-1891, 2007
- 10) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Ann Neurol*, 62(6) : 671-675, 2007
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 disease. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 3) Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucocerebrosidase activity of the organs in normal mice, 第50回日本先天代謝異常学会, 第7回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 米子市, 2008.11.6-8
- F. 知的所有権の取得状況
- 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(図1)。

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(図2)。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

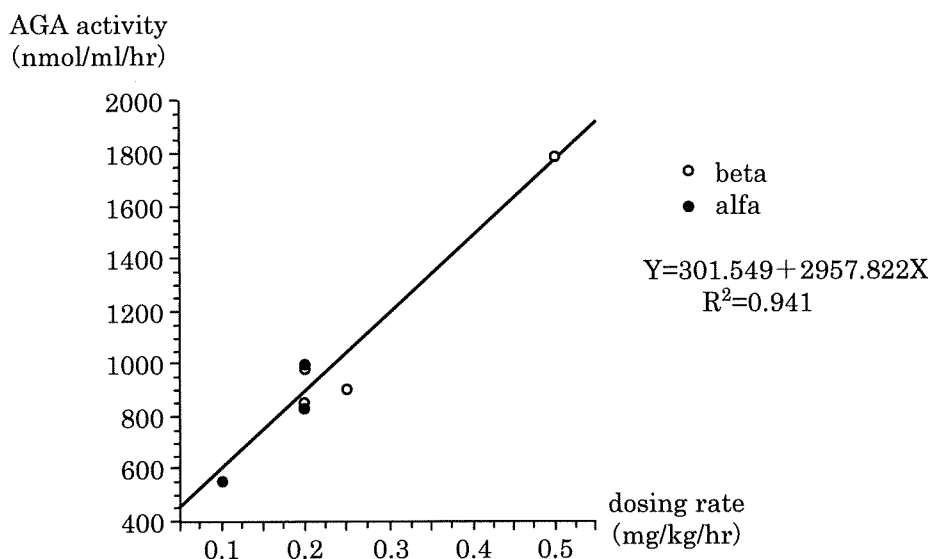


図1 投与速度と血漿中アガルシダーゼ活性ピーク値との関係

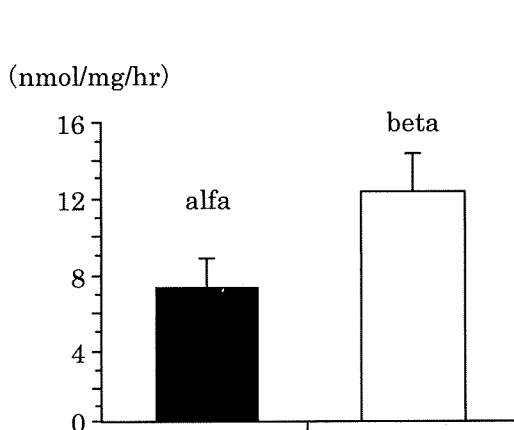


図2 投与量 0.2mg/kg でのリンパ球中アガルシダーゼ・アルファとベータのピーク値の酵素活性

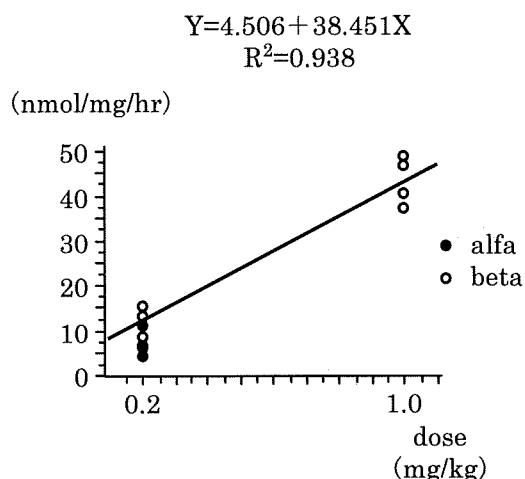


図3 投与量とリンパ球中アガルシダーゼ活性ピーク値との関係

は患者体重当たりの製剤投与量 (mg/kg) に比例し、相関係数は0.938であった(図3)。

D. 考 察

ベータ製剤はアルファ製剤よりもリンパ球への取り込みが多かった。これは、ベータ製剤のほうがマンノース6リン酸の付加量が多いためであろうと考えられる。しかし、細胞表面のマンノース6-リン酸受容体の分布には臓器差があり、リンパ球への取り込みは、主な罹患臓器である心臓や

腎臓への取り込みに一致するものではない。

他方、腎臓のタコ足細胞など血流の届きにくい細胞への移行は、酵素の投与量だけでなく、血漿中で半減期にも影響されることが推測されている。投与速度を変えることによって、罹患臓器への移行効率を良くすることができる可能性がある。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 岡田志緒子, 田中あけみ, 澤田 智, 岡村幹夫,

- 稲荷場ひろみ, 崔 吉永, 河野仁美, 寺柿政和, 根来伸夫, 山野恒一: 透析患者におけるアガリシダーゼ・アルファ(リプレガル)の血清中, およびリンパ球中の酵素活性について. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008
- 2) 岡田志緒子, 田中あけみ, 澤田 智, 岡村幹夫, 稲荷場ひろみ, 崔 吉永, 河野仁美, 寺柿政和, 根来伸夫, 小林郁江, 石村栄治, 西沢 良, 山野恒一: アガリシダーゼ・アルファとベータの末梢リンパ球中への移行動態. 第 13 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008
- 3) Okada S, Tanaka A, Takeda T, Kobayashi I, Ishimura E, Negoro N, Nishizawa Y, Yamano T, Yoshiyama M : Pharmacokinetics of agalsidase alpha and beta in three patients with Fabry disease. 第 11 回国際先天代謝異常学会, サンディエゴ, 2009
- 4) Okada S, Tanaka A, Takeda T, Kobayashi I, Ishimura E, Negoro N, Nishizawa Y, Yamano T, Yoshiyama M : Pharmacokinetics of agalsidase alpha and beta in male patients with Fabry disease. 第 2 回国際ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者：島田 隆(日本医科大学教授)

研究要旨

重篤な遺伝性神経変性疾患である異染性白質ジストロフィー(MLD)の非侵襲的遺伝子治療法として AAV ベクターの髄腔内注射と、HOXB4 発現細胞を使った造血幹細胞の移植の有用性を MLD モデルマウスを使って検証した。AAV1-GFP ベクターのマウス髄腔内注入により脳全域に渡る広範囲な遺伝子導入が可能であった。更に、脊髄神経節及び脊髄後索での高率な遺伝子導入を認めた。MLD モデルマウスに対し AAV1-ASA ベクターを注入する実験では ASA 活性の広範囲な発現とスルファチドの減少を確認した。造血幹細胞を自己増殖させる作用をもつ HOXB4 の遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した骨髄細胞を移植したマウスの脳内には大量のドナー細胞の侵入が確認された。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。MLD マウスに特徴的なスルファチドの蓄積の著明な減少が確認され、更に運動機能の改善も認められた。これらの結果は、HOXB4 発現造血幹細胞が脳血液関門(BBB)を越えて脳内に侵入して蛋白質を分泌させるキャリアーとして働いていることを示している。いずれの方法も患者にとっての侵襲性は低く、MLD のような広範囲な脳組織変性疾患の治療法としての臨床応用が期待される。

研究協力者氏名・

三宅 弘一(日本医科大学・准教授)

渡邊 淳(日本医科大学・講師)

岩本 直高(日本医科大学・大学院生)

三宅 紀子(日本医科大学・研究生)

A. 研究目的

異染性白質ジストロフィー(MLD)をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。MLD はライソゾーム酵素である ArylsulfataseA(ASA)の遺伝的欠損により脳白質や末梢神経でスルファチドが蓄積し、広範囲な脱髄を呈する。様々な神経症状が出現するが、最も頻度が高い乳幼児型では生後数年以内に除脳硬直状態となり死亡する。

ライソゾーム酵素は、その一部が細胞外に分

泌され、他の細胞に取り込まれる Cross-correctionという現象が知られており、この特性を利用した酵素補充療法が行われている。しかし、脳血液関門(BBB)が存在するため、神経症状を伴うライソゾーム病の治療法としては有効でない。神経症状を治療するためにはBBBを通過して広範囲な脳神経細胞にライソゾーム酵素を取り込ませる必要がある。

我々はこれまでに、ASAを発現するAAVベクターをMLDマウスの脳実質に直接投与すると、ライソゾーム酵素の軸索内移動や細胞間の移動が起こり、注射部位のみならず広い範囲の神経系細胞でASAが取り込まれMLDマウスの生化学的異常や、運動機能が改善されることを示した。しかし、臨床応用を行うためにはより侵襲性の低い方法でしかも数百倍の大きさのヒト脳

への遺伝子導入が必要である。本研究では非侵襲的遺伝子治療としてAAVベクターの髄腔内注射と、レトロウイルスベクターにより幹細胞増殖因子であるHOXB4の遺伝子を導入した造血幹細胞移植の有用性をMLDモデルマウスを使って検証した。

B. 研究方法

ASA遺伝子をノックアウトしたMLDモデルマウスは Gieselmann より、HOXB4 遺伝子は Humphries から供与された。

AAV-GFP、AAV-ASA ベクターを、C57BL/6 あるいは 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。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

① 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。

② 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。

D. 考察

様々なアプローチによる遺伝性神経変性疾患の治療を目指している。脳血液関門 (BBB) を越えて中枢神経系を治療する方法としてマウスの脳内に直接 AAV ベクターを注入する方法を検討してきたが、手法が侵襲的であり、しかもヒトの脳はマウスの脳と比べ数百倍も容積があることを考えると、直接注入法には限界があることが想定される。これらの問題を克服するためベクターの改良や、投与方法の工夫を進めている。

脳脊髄液中への薬剤の投与は臨床で一般に行われている手技であり、侵襲性も低い。又、大量持続投与も可能であり、脳組織全体への遺伝子導入法としては優れている。今後、サルを含む大型動物での前臨床試験も行い髄注による神経変性疾患治療の可能性を検討していきたい。

骨髄移植は異染色性白質ジストロフィー (MLD) の唯一の治療法として試みられているが、その有用性は確立していない。骨髄移植の効果は、血液細胞が脳内に侵入しミクログリアに分化して ASA を分泌するためと考えられている。最近、MLD マウスの治療実験で、ASA をレトロウイルスベクターにより強制発現させた細胞が移植されたが治療効果は無かった。一方、レンチウイルスベクターで ASA を発現させた細胞の移植では運動機能の改善が報告されている。この違いは ASA の発現量の違いによるものと考えられている。

HOXB4 は転写調節因子の一つで、造血幹細胞

の増殖に関係していると考えられており、強制発現させると、造血幹細胞の自己増殖が亢進することが報告されている。本研究では HOXB4 遺伝子を強制発現している細胞を使った骨髄移植により、脳内への侵入細胞数を増やすことで治療効果が上がることを明らかにした。

HOXB4 の強制発現により、脳内への侵入細胞数が増加した理由はわかっていない。一つの可能性は HOXB4 の作用で真に幼若な造血幹細胞が増加し、脳内でミクログリア細胞やオリゴデンドロ細胞に分化したと考えられる。見かけ上、移植率が高くても、真の幹細胞が少ないとミクログリア細胞にまで分化できないのかもしれない。別の可能性としては、HOXB4 の発現により細胞の分化の方向性が変化したことも考えられる。いずれにせよ、HOXB4 の発現で多くのドナー細胞を脳内に送り込むことが可能である。今後、HOXB4 発現の安全性への影響を評価する必要があるが、HOXB4 発現細胞をキャリアーとして使った様々な疾患の治療が可能になると期待される。

E. 結 論

AAV ベクターの髄腔内注入により脊髄を含む脳全体への遺伝子導入が可能であり、広範囲な脳神経変性疾患の遺伝子治療手技として有用である。BBB を越えて脳内に侵入できる HOXB4 発現造血幹細胞は、蛋白質を分泌するためのキャリアーとして様々な神経変性疾患の治療への応用が可能である。いずれの方法も患者にとっての侵襲性が低く、広範囲な脳組織の治療が可能であり早期の臨床応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kurai T, Hisayasu S, Kitagawa R, et al. : AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase A efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic

- leukodystrophy. *Mol. Ther*, 15 : 38-43, 2007
- 2) Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, et al. : Neuronal specificity of α -synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience*, 144 : 743-745, 2007
- 3) Kitagawa R, Miyachi S, Hanawa H, et al. : Differential Characteristics of HIV-based vs. SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neuroscience Res*, 57 : 550-558, 2007
- 4) Kato S, Inoue K, Kobayashi K, et al. : Efficient Gene Transfer via Retrograde Transport in Rodent and Primate Brains by an HIV-1-Based Vector Pseudotyped with Rabies Virus Glycoprotein. *Hum. Gene Ther*, 18 : 1141-1151, 2007
- 5) Ogawa K, Hirai Y, Ishizaki M, et al. : Long-term inhibition of glycosphingolipid accumulation in Fabry model mice by a single systemic injection of AAV1 vector in the neonatal period. *Mol. Genet. Metab*, 96 : 91-96, 2009
- 6) Hanawa H, Yamamoto M, Zhao H, et al. : Optimized lentiviral vector design improves titer and transgene expression of vectors containing the chicken beta-globin locus HS4 insulator element. *Mol. Ther*, 17 : 667-674, 2009
- 7) Hayakawa J, Migita M, Ueda T, et al. : Dextran sulfate and stromal cell derived factor-1 promote CXCR4 expression and improve bone marrow homing efficiency of infused hematopoietic stem cells. *J Nippon Med Sch*, 76 : 198-208, 2009
- 8) Iwamoto N, Watanabe A, Yamamoto M, et al. : Global Diffuse Distribution in the Brain and Efficient Gene Delivery to the Dorsal Root Ganglia by Intrathecal Injection of

- AAV1 Vector. *J. Gene Med*, 11 : 498–505, 2009
- 9) Nakajima M, Ueda T, Migita M, et al. : Hematopoietic capacity of preterm cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 389 : 290–294, 2009
2. 学会発表
- 1) Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T : herapeutic Effects of Bone Marrow Transplantation for Metachromatic Leukodystrophy Using HoxB4 Over-Expressing Cells. American Society of Gene Therapy, Seattle, 2007.5
- 2) Ogawa K, Hirai Y, Ishizaki M, Fukunaga Y, Shimada T : AAV1 mediated gene therapy of neonatal Fabry mice. American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, Seattle, 2007.5
- 3) Hanawa H, Shimada T : Development of leukemia/lymphoma after the long latency period in an X-SCID mouse model treated by retroviral gene therapy. American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, Seattle, 2007.5
- 4) Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T : Improvement of neurological disorders of metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation using HoxB4 over-expressing cells. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Hamburg, 2007.9
- 5) Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T : BMT based therapy for metachramtic leukodystrophy: The effect of HoxB4 over-expression. International Symposium of Lysosomal Storage Deseases, Maihama, 2007.11
- 6) Miyake K, Isotani M, Miyake N, Shimada T : Adeno-associated virus (AAV) type 8 mediated systemic antiangiogenic gene therapy for murine model of multiple myeloma. Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, 2007.6
- 7) Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T : Direct comparison of adeno-associated virus serotype for systemic delivery by monitoring of in vivo quantitative noninvasive imaging. Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, 2007.6
- 8) Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T : Therapeutic effects of bone marrow transplantation for metachromatic leukodystrophy using HoxB4 over-expressing cells. Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, 2007.6
- 9) Hanawa H, Shimada T : Development of leukemia/lymphoma after the long latency period in an X-SCID mouse model treated by retroviral gene therapy. Japan Society of Gene Therapy 13th Annual Meeting, Nagoya, 2007.6
- 10) Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T : Direct comparison of adeno-associated virus serotypes for systemic delivery by long term monitoring of *in vivo* quantitative noninvasive imaging. 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, 2008.
- 11) Miyake N, Miyake K, Atsumi M, Shimada T : Induction of immunotolerance and sustained expression of ASA by single intravenous injection of AAV vector in neonatal immunocompetent mice. 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, 2008.5
- 12) Miyake N, Miyake K, Shimada T :

- T. Induction of immunotolerance and sustained expression of ASA by single intravenous injection of AAV vector in neonatal MLD Mice. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Hokkaido, 2008.6
- 13) Shimada T : Neonatal gene therapy of metachromatic leukodystrophy. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, San Diego, 2009.5
- 14) Yamamoto S, Orimo H, Matsumoto T, Narisawa S, Millan JL, Shimada T : Long term phenotypic correction of severe infantile hypophosphatasia in a mouse model by neonatal injection of lentiviral vector. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, San Diego, 2009.5
- 15) Igarashi T, Miyake K, Masuda I, Shimada T : Adeno-associated vector (type 8) mediated expression of Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, San Diego, 2009.5
- 16) Miyake N, Miyake K, Odagaki Y, Yamamoto M, Shimada T : Direct comparison of adeno-associated virus serotypes for global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, San Diego, 2009.5
- 17) Yamamoto S, Orimo H, Matsumoto T, Narisawa S, Millan JL, Shimada T : Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 11th International Congress of Inborn Error of Metabolism, San Diego, 2009.9
- 18) Matsumoto T, Yamamoto S, Miyake K, Miyake N, Orimo H, Shimada T : Adeno-associated virus (AAV) type-8 mediated systemic neonatal gene therapy for Hypophosphatasia. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, 2009.10
- 19) Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Shimada T : Adeno associated virus (AAV)-mediated neonatal gene therapy of metachromatic leukodystrophy. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, 2009.10

G. 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

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

分担研究者：小林 博司(東京慈恵会医科大学講師)

研究要旨

ライソゾーム病は、ライソゾーム内の加水分解酵素の欠損または活性の低下により代謝が障害され、そのために発症する一連の先天性代謝異常症であり、ムコ多糖症Ⅶ型(MPSⅦ)、およびクラッペ病は、その代表的疾患である。今回我々はレンチウイルスベクターシステムを用いてこの二疾患に対する遺伝子治療の検討を進めた。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ため、モデルマウス新生児への静脈注射を施行し、寿命の延長、脳、肝臓をはじめとする臓器での酵素活性上昇が確認された。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をも開発し、細胞株およびモデルマウス新生児の肝臓での発現上昇を見るも、持続的発現および病理上の改善はまだ得られていないが、組替えウイルスベクターの力価を上げることによって治療群の体重上昇と寿命延長が見られた。また Ex Vivo Gene Therapy を睨みクラッペ病への新生児骨髄移植、更にクラッペ病・MPSⅦをはじめとする疾患のモデルマウス由来の iPS 細胞も作製した。骨髄幹細胞への導入が有意に高い効率を呈すると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遺伝性疾患の治療へとつなげていく。

研究協力者

有賀 賢典(東京慈恵会医科大学助教)

横井 貴之(同 助教)

A. 研究目的

現在酵素補充など有効な治療法がないライソゾーム蓄積性疾患のムコ多糖症Ⅶ型、クラッペ病の有効な根治療法のひとつとしての遺伝子治療の開発

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルス

HIV 由来であり NEF,VIF などの副蛋白を除去し、IRES 配列を介してレポーター遺伝子として GFP を組込んだレンチウイルスベクターに MPS

Ⅶの欠損酵素 HBG、さらに Krabbe 病の欠損酵素 GALC をクローニングし、2 種類の組換えレンチウイルスを作成した。更に 2008-2009 年にかけて作製に用いる 293T 細胞の培養量を増やすことなどによりウイルス力価(タイター)のアップに努めた。

2. 細胞培養

実験に使用する 293A 細胞は 10% ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた DMEM(D-10) 培地を用いて、5% 二酸化炭素の環境下において、37℃ で培養した。これに対し組替えウイルスを希釈を系列を作って感染させ、GFP および欠損酵素 GALC の発現量を計測した。

3. 新生児マウスへの投与

日令 0-2 の新生児マウスの顔静脈へ作成した組替えウイルスを静脈注射し、1 週間で臨床所見、病理、肝臓での欠損酵素およびレポーター遺伝子発現を評価した。

更に体重増加、寿命も経過観察した。

4. 骨髄移植

8 週令の若年正常マウスから採取した正常骨髄を日令 0-2 の新生児マウスの顔静脈を介して移植。

5. iPS 細胞の作製

若年モデルマウスの tail tip fibroblast を培養し山中ファクター(3 因子)をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで各疾患の iPS 細胞を作製した。

C. 研究結果

1. MPSVII の欠損酵素 HBG を組み込んだウイルスを感染させた細胞株(293A)は HBG と GFP 両方の発現が容量依存性に見られ、FITC フィルタを用いた蛍光顕微鏡では GFP 発現細胞を数多く確認できている。更にモデルマウスへ新生児注射による遺伝子導入を行い、長期にわたり各臓器での HBG の発現、蓄積物質であるグリコサミノグリカン(GAG)の減少が認められた。またリアルタイム PCR により 31 週令マウスの脳組織にもウイルスベクターの発現が見られ、長期ベクター発現が示唆された。
2. Krabbe 病の欠損酵素 GALC を組み込んだウイルスを感染させた細胞株(293A)では GALC、GFP 両方の発現が見られ、さらにモデルマウスへの新生児注射では 1 週間後の肝において正常の 10% の酵素活性が得られた。しかし病理上の改善は得られておらず、2009 年度以降ウイルス力価を上げて再度検討し、治療群の体重と寿命の一定の伸びを見ている。
さらに Krabbe 病の新生児マウスへの骨髄移植は肝・脾の酵素活性の上昇のみで病理学的改

善は得られなかった。

3. クラッペ病、MPSVII の iPS 細胞はいずれも Embryonal Body 形成、未分化性が確認され、作製に成功したことが示唆された。

D. 考 察

今回 MPSVII、Krabbe 病の 2 疾患に対するモデルマウスを用いた新生児遺伝子治療の検討を行なった。レンチウイルスベクターの力価を上げることで動物実験で MPSVII では寿命、酵素活性とも改善傾向にあるが、Krabbe ではいずれも不十分であり、基質合成阻害薬、抗炎症作用剤などの併用など随伴治療も検討し、更に今後は iPS 細胞を用いた exo vivo gene therapy も視野に入れて研究を進めていく。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 有賀賢典, 小林博司, 大橋十也, ほか: レンチウイルスベクターを用いたムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療(口演). 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部, 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11
- 2) 小林博司, 森田麻子, ほか: Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease (口演). 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部 厚生労働省班会議, 東京, 2008.11.27
- 3) 有賀賢典, 小林博司, 大橋十也, ほか: レンチウイルスベクターを用いたムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療(口演). 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部, 第 51 回日本先天代謝異常学会, 東京, 2009.11.15

ムコ多糖症の自然歴と治療法開発に関する研究

研究分担者：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Ⅱ型重症型 69 例について、自然歴と造血幹細胞移植の効果を検討した。言語能力、運動能力、介護度をスコア化したところ、重症型では運動能力に比べ、言語能力のスコア低下が顕著で、介護度は低年齢から低スコアであることが判明した。移植群もスコアの向上は認められず、15 歳を過ぎると全例が全介助となることが判明した。

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 17 名、mucopolidosis6 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、生化学的解析を進め、治療効果を明らかにして行く予定である。

研究協力者

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)
 奥山 虎之(国立成育医療センター)
 田中あけみ(大阪市立大学)
 知念 安紹(琉球大学)
 戸松 俊治(セントルイス大学)
 倉坪 和泉(岐阜大学大学院小児病態学)
 加藤 智美(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)

言語能力、運動能力、介護度をスコア化し、非移植群と移植群の比較を行った。

score	4	3	2	1	0
言語	会話	二語文	単語	喃語	なし
運動	独歩	杖	歩行具	車いす	臥床
介護	自立		半介助		全介助

ムコ多糖症Ⅱ型重症型の自然歴と BMT の効果に関する検討

A. 研究目的

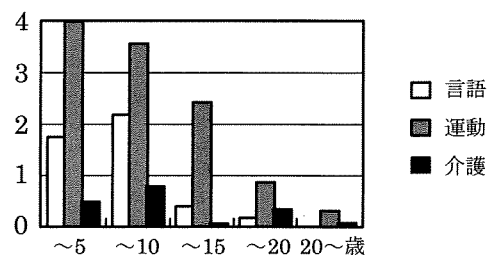
ムコ多糖症Ⅱ型は本邦で最も多い病型であるが、自然歴と造血幹細胞移植の効果の詳細は明らかにされていない。研究者らはムコ多糖症Ⅱ型の全国調査を行い、自然歴と移植効果を明らかにした。

B. 研究方法

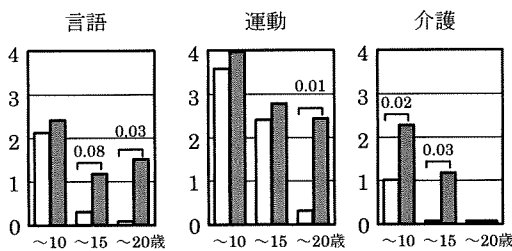
ムコ多糖症Ⅱ型重症型患者 69 例を対象とし、

C. 研究結果及び考察

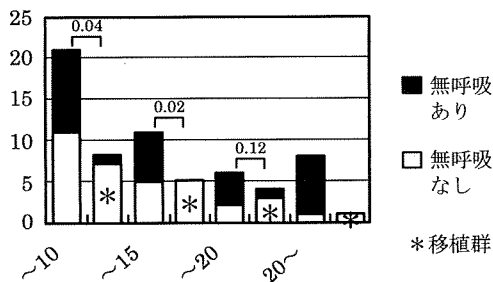
1) 非移植群(自然歴)：運動スコアは 10 歳までは比較的高く維持され、独歩可能であったが、15 歳を過ぎると車いす・臥床のレベルに低下した。言語スコアは 5~10 歳で単語レベルまで発達したのち、10 歳以降急速に低下した。介護スコアは全年齢を通じて全介助レベルであった。



2) 移植群(10歳未満8例、10~15歳6例、15~20歳4例)：言語スコアは10歳未満では非移植群と差を認めず、単語レベルであったが、10歳を超すと非移植群は発語が急激に低下するのに対して、移植群は単語レベルを維持していた。運動スコアは15歳まで両群に差を認めなかったが、15歳以降移植群でスコアの低下が少なかった。介護スコアは15歳までは移植群が有意に高かったが、15歳以降、両群に差がなく、全介助となった。



3) 睡眠時無呼吸の比較：非移植群46例中27例が睡眠時無呼吸を認め、7例が気管切開や呼吸管理を受けていたのに対し、移植群18例中、睡眠時無呼吸2例と有意に少なかった。



D. 考 察

ムコ多糖症Ⅱ型重症型では運動能力は10歳前後まで比較的高く維持されるものの、介護度は全年齢にわたって高いことが明らかとなった。移植によって運動・言語能力がある程度維持されるが、発達は改善せず、15歳以上で全例全介助となった。

E. 結 論

ムコ多糖症Ⅱ型重症型における自然歴を明らかにし、造血幹細胞移植の効果と問題点を明らかにした。

イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療

A. 研究目的

ムコ多糖症は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もあるが、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17名、mucopolidosis (ML) 6例に対し、イソフラボン5mg/kgを1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 (17名)		Ⅱ (4名)		ML (6名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
騒音呼吸	2	2		1		
肝腫	2	1			1	1
脾腫	2	1				
行動異常	1	2				
睡眠障害	5	2			1	

2) 保護者の観察記録

	Ⅲ (17名)		Ⅱ (4名)		ML (6名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
ことば	3	1		1	2	
理解力	5	1	2	1	2	
活動性	5		2	1	1	1
行動異常	2	4		1		
睡眠	4	3	2	1	1	
痛み	1	1		1		1
歩行	2	4		2		1
手の動き	1	1		2	1	
関節の動き	2	2		2		

	III (17名)		II (4名)		ML (6名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
呼吸(昼)	1		1	1		
呼吸(夜)	2		1	1		1
感染	1	1	2	1		1
視力	1			1		
聴力	1			1		
皮膚	2	1	1		1	
毛髪	4		1		4	
食欲	4		1			1
排便	3				3	

3) 日常生活動作(FIM)

	III (17名)		II (4名)		ML (6名)	
	改善	進行	改善	進行	改善	進行
運動面	7	5	2		1	1
認知面	1	1		1		
総合	7	5	2	1	1	1

4) 観察に関する自由記載

<ⅢA型>

便秘が改善、表情がいきいきする時がある(9歳女)。髪の毛が柔らかくなり、発作が減った(13歳女)。脱毛の減少、振戦の減少、体意思表示が出てきた。初めて「おかあさん」と言ってくれた(16歳女)。けいれん悪化、入眠不良(17歳男)。不随意運動、ぴくつき増加(27歳男)ⅢB型

<ⅢB型>

表情が豊かになり、よく笑うようになった(4歳男)。言葉のまねが増え、動く範囲が広くなり、目を離せなくなり、食欲が出てきた(4歳男)。かむ癖が悪化し、意味のある言葉が減っている。鼻閉がなくなり、呼吸が楽になっている(6歳女)。ことばが増えた(7歳男)。歌を思い出して歌う、食欲が改善、トイレで用をたす(8歳女)。ブロックの積み木を組み合わせる様になった(9歳男)。下肢の緊張が改善し、ソファにもたれる事ができるようになった。夜間の呼吸が規則的になった(11歳男)。手首の関節が伸びる様になったが、力が入る事が多い。表情が良くなり昼間は目がパッチリの日が多い(27歳男)。

<ML>

髪と鼻が少し柔らかくなった (ML-II, 9歳男)。お腹が少し柔らかくなった(ML-II, 15歳男)。

髪の毛がさらっとしてきた。夜中の排便がなくなった。気管カニューレの部分がしっかりしてきた。体調良い(ML-III, 24歳女)

D. 考察

イソフラボン服用前と服用後1年の状態を比較検討した。保護者の観察記録から、一部の症例で睡眠障害の改善、理解度・活動性の向上、食欲の向上、便通の改善、皮膚や毛髪の改善が認められた。一方、行動異常や歩行障害が増悪した症例も認められた。日常生活動作の評価でも改善例が複数ある一方で悪化例も認められた。

E. 結論

イソフラボンはムコ多糖症の補完・代替治療として可能性がある。今後、生化学的解析を進め、治療効果を明らかにして行く予定である。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Kato Z, Suzuki Y et al. : Evaluation of ADL in patients with Hunter disease using FIM score. Brain and Development, 29 : 298-305, 2007
- 2) Ochiai T, Suzuki Y, Kato T, et al. : Natural history of extensive Mongolian spots in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) : a survey among 52 Japanese patients. J Eur Acad Dermatol Venereol, 21 : 1082-5, 2007
- 3) 鈴木康之 : ムコ多糖症. 小児内科増刊号, 39 : 503-504, 2007
- 4) 鈴木康之 : ムコ多糖症1型. 骨系統疾患マニュアル改訂第2版, 南江堂, 東京, 120-121, 2007
- 5) 鈴木康之 : ムコ多糖症2型. 骨系統疾患マニュアル改訂第2版, 南江堂, 東京, 122-123, 2007

- 6) Kuratsubo I, Suzuki Y, Krii KO, Kato T, Orii T, Kondo N : Psychological status of patients with mucopolysaccharidosis type II and their parents. *Pediatr Intl*, 50 : 41-47, 2009
 - 7) Suzuki Y, Aoyama A, Kato T, Shimozawa N : Retinitis pigmentosa and mucopolysaccharidosis type II : an extremely attenuated phenotype. *J Inher Metab Dis*, 32: 582-583, 2009
 - 8) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T : Japan Elaprased Enzyme Replacement Therapy (JET) study : idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab*, 99 : 18-25, 2010
 - 9) Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Barrera LA, Kida K, Kubota M, Orii T : Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolysaccharidoses II and III by tandem mass spectrometry, *Mol Genet Metab* (in press)
2. 学会発表
- 1) 鈴木康之, 倉坪和泉, 加藤智美, 他 : 網膜色素変性を主徴候とする Hunter 症候群成人例. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17
 - 2) 鈴木康之, 折居建治, 奥山虎之, 他 : ムコ多糖症 I 型・II 型の全国疫学調査. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17
 - 3) 鈴木康之, 奥山虎之, 田中あけみ, 他 : ムコ多糖症 II 型の酵素補充療法: 日本人 14 例の解析. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17
 - 4) Syzuki Y, Kato T, Orii T : An extremely attenuated phenotype of Hunter disease with retinopathy. *International Symposium of Lysosomal Storage Disease, Urayasu*, 2007.11.29-12.1
 - 5) 鈴木康之 : MPS-III : イソフラボンの効果. 第 13 回日本ムコ多糖症研究会, 大阪, 2009.8.21
- H. 知的所有権の取得状況
なし

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

研究分担者：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)

研究要旨

先天性代謝異常疾患における造血幹細胞移植の後方視的調査を行い、標準的移植法の確立にむけての研究を行った。

初年度の平成 19 年度は全国における移植状況を調査し、わが国において 1985～2005 年の期間に 149 例の先天性代謝異常疾患症例で造血幹細胞移植が行われていたことが判明した。

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を実施した 53 例について詳細な解析を行った。

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。移植時年齢は 8 ヶ月から 15 歳までに分布し、中央値 5 歳であった。男女比では男性が 41 例、女性が 12 例で圧倒的に男性が多かった。

初回移植のドナーは 31 例が血縁者(同胞 24 例、父親 4 例、母親 3 例)、22 例で非血縁者であり、29 例で HLA が一致していた。移植細胞源は 44 例で骨髄、9 例で臍帯血であった。

44 例(83.0%)では初回移植でドナー由来の生着が得られ、9 例(17.0%)では拒絶されていたが、5 例で再移植、1 例では再々移植が行われ、最終的には 41 例(77.4%)が生存中で、12 例(22.6%)が死亡していた。Kaplan-Meier 法による長期生存率は、ALD66.8%、MPS77.4%、その他 78.6%であった。

ドナー細胞の生着が得られた上での生存(無イベント生存)に有意に有利に関連していた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA 適合、非照射前処置(ブスルファン主体の前処置)などであった。

以上の成績は全国集計と同様であり、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。

研究協力者

矢部 普正

(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・准教授)

清水 崇史

(東海大学医学部専門診療学系小児科学・講師)

高倉 広充

(東海大学医学部専門診療学系小児科学・助教)

A. 研究目的

本分担研究における目的は先天代謝異常症における造血幹細胞移植の成績を後方視的に解析し、標準的治療法を開発することにある。初年度は全国調査を行い、わが国における移植実施状況の把握を行い、以後の 2 年度は、東海大学において実施された先天性代謝異常疾患に対する造血幹細胞

移植について詳細な解析を行うことを計画した。

B. 研究方法

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

1) 全国における移植概況

わが国において1985年～2005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149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。

移植の対象となった疾患としてはムコ多糖症が最も多く(72例)、全体の約半数を占めていた。次いで副腎白質ジストロフィー(ALD)が45例であった。男女比では男性121例、女性28例で、圧倒的に男性が多かった。

初回移植のドナーは77例が血縁者(同胞64例、父親7例、母親6例)、72例が非血縁者であり、111例でHLAが一致していた。移植細胞源は122例で骨髄、1例は末梢血幹細胞、1例で骨髄+末梢血幹細胞、25例で臍帯血であった。

115例(77.2%)では初回移植でドナー由来の生着が得られ、24例(16.1%)では拒絶されていたが、15例で再移植、1例では再々移植が行われ、最終的には120例(80.5%)が生存中で、29例(19.5%)が死亡していた。

ドナー細胞の生着が得られた上での生存(無イベント生存)に有意に有利に関連していた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA適合、非照射前処置(ブスルファン主体の前処置)などであったが、多変量解析では移植細胞源が骨髄であるか臍帯血であるかのみが有意な因子

となっていた。

以上より、現時点では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。

2) 東海大学における移植症例

1986～2008年の期間に東海大学において実施された先天性代謝異常疾患における造血幹細胞移植症例は53例で、再移植が5回、3回目の移植が1回行われていた。

① 症例概要

対象となった疾患はムコ多糖症(以下MPS)19例(I型4例、II型12例、IV型2例、VI型1例)、副腎白質ジストロフィー(以下ALD)21例、その他13例(I-cell病2例、異染性ロイコジストロフィー(以下MLD)2例、Gaucher病3例、GM1 gangliosidosis 1例、Krabbe病1例、Nieman-Pick病1例、Alfa-Mannosidosis 1例、Pompe病1例、multiple sulfatase deficiency 1例)であった。

患者の性別は男性41例、女性12例で、初回移植時の年齢は0～5歳28例、6～10歳17例、11～15歳8例であった。

② ドナーおよび移植細胞源

初回移植時のドナーは31例が血縁者(同胞24例、父親4例、母親3例)、22例が非血縁者であり、29例でHLAが一致していた。

移植細胞源は44例で骨髄、9例で臍帯血であった。

③ 前処置

前処置は疾患により、また移植年代別に異なっており、副腎白質ジストロフィーでは初期の症例では部+エンドキサン+ATGが6例、最近の症例では胸腹部放射線照射(TAI)+メルファラン+ATGが12例、その他3例であった。

ムコ多糖症においてはTAI+メルファラン±ATGが6例、ブスルファン+エンドキサン+ATGが13例であった。

その他の疾患ではTAI±ブスルファン+エンドキサン±ATGが4例、ブスルファン+エンドキサン±ATGが9例であった。

④ 生着

44 例(83.0%)では初回移植でドナー由来の生着が得られ、9 例(17.0%)では拒絶された。生着に対して有利に有意の相関を示していた因子としては、移植細胞源としての骨髄(臍帯血に対して)、同胞ドナー、HLA 適合ドナーなどであった。

⑤ 生存率

53 例中 41 例が生存中で、12 例が死亡した。

初回移植の粗生存率(OS、Kaplan-Meier 法)を疾患別にみると、ALDが66.8%、MPSが77.4%、その他の疾患が78.6%であった。

ドナー別に粗生存率をみると、HLA 一致同胞からの移植では81.1%、その他の血縁者からの移植では70.0%、非血縁者間骨髄移植では85.7%、非血縁者間臍帯血移植では33.3%であった。

前処置別に粗生存率をみるとブスルファン+エンドキサンを主とする前処置では89.3%、放射線照射を含む前処置では57.1%であった。

粗生存率ならびに無イベント生存率(EFS、ドナー細胞の永続的な生着が得られた生存率)に有意に有利に相関していた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA 適合、などであった。

D. 考察と結論

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。

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。

移植が適応となる疾患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を立案することが必要であると考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 著書

1) 加藤俊一：移植造血幹細胞のソース(骨髄移植・末梢血幹細胞移植・臍帯血移植について)Annual Review 2009 血液, 2009年, 中外医学社

2. 論文発表

1) 加藤俊一:副腎白質ジストロフィーにおける造血幹細胞移植. BRAIN and NERVE, 59 : 339-346, 2007

2) Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, Morishima Y, Kodera Y, Harada M : Japan Marrow Donor Program. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia virus-I-negative donors for adult T-cell leukemia/lymphoma : retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. Biol Blood Marrow Transplant, 13(1) : 90-9, 2007.1

3) Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y : Japan Marrow Donor Program. Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. Biol Blood Marrow Transplant, 13(3) : 315-28, 2007.3

4) Ishiguro H, Yasuda Y, Tomita Y, Shinagawa T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M,