

201024058A

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**

平成 22 年度総括・分担研究年度終了報告書

平成 23（2011）年 3 月

研究代表者  
衛 藤 義 勝

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 22 年度総括・分担研究年度終了報告書

平成 23(2011)年 3 月

研究代表者

衛 藤 義 勝

## 目 次

はしがき .....	1
研究組織 .....	3
総括研究報告書 .....	7
ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究 主任研究者 衛藤 義勝	
付 1 平成 22 年度班会議プログラム .....	11
分担研究報告書	
I. 病像把握のための実態調査	
1) ポンペ病マススクリーニングシステムの開発 .....	17
奥山 虎之(国立成育医療研究センター臨床検査部)	
2) ポンペ病患者における ADL の調査研究 .....	20
坪井 一哉(名古屋セントラル病院 血液内科 主任医長)	
3) 濾紙血液を用いた Pompe 病(GSD II 型)、Hurler・Scheie 病(MPS I 型)、 および Hunter 病(MPS II 型)新生児スクリーニングの研究 .....	24
北川 照男(財団法人 東京都予防医学協会理事長)	
4) ライソゾーム病の新生児マス・スクリーニング体制確立に向けての研究 .....	28
田中あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科・准教授)	
5) ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究 .....	31
遠藤 文夫(熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野 教授)	
II. 病態解析	
1) クラッペ病モデルマウスにおけるラクトシルセラミドの蓄積と神経細胞死 .....	35
松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所 准教授)	
2) ペルオキシソーム膜形成の分子機構とその障害による病態 .....	40
今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部 教授)	

3) 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 .....	44
下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野・教授)	
4) ファブリー病バイオマーカーに関する基礎的研究 .....	48
櫻庭 均(明治薬科大学分析化学・臨床遺伝学 教授)	
5) 当院における酵素補充療法の問題点 .....	52
高柳 正樹(千葉県こども病院医療局長)	
6) 骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後に関する研究 .....	55
芳野 信(久留米大学教授)	
7) GM1 ガングリオシドーシスの臨床的特徴 .....	57
辻 省次(東京大学医学部附属病院 神経内科)	
8) 日本人ムコリピドーシス II/III の病態解析 .....	59
酒井 規夫(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座)	
9) ニーマンピック病 A/B 病および C 型の臨床および病態に関する研究 .....	62
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講座教授)	

### Ⅲ. 新規治療法開発

1) ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究 .....	67
島田 隆(日本医科大学教授)	
2) ムコ多糖症 VII 型、クラッペ病への遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究 .....	70
小林 博司(東京慈恵会医科大学講師)	
3) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療 .....	72
鈴木 康之(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)	
4) $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究 .....	75
難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター教授)	
5) ライソゾーム病の新しい分子治療法開発 .....	77
鈴木 義之(国際医療福祉大学特任教授)	
6) ニーマン・ピック病 C 型患者のシクロデキストリン治療 .....	79
大野 耕策(鳥取大学・医学部・教授)	

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 .....	83
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)	
8) ライソゾーム病の病態・治療に関する基礎的研究ー特に iPS 細胞を用いての研究 .....	87
衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座)	
<b>研究成果一覧</b> .....	<b>93</b>

## は し が き

ライソゾーム病研究班は 5 本柱のとして(1)ライソゾーム病(LSD) &ペルオキシゾーム(PD) &ALD 患者の自然歴、酵素補充療法による治療効果を ADL(activity of daily life)、QOL(quality of life)の解析により評価する(2)ライソゾーム病患者&ペルオキシゾーム病&ALD 患者の早期診断・治療の為のスクリーニングの開発(3)ライソゾーム病&ペルオキシゾーム病の病態解析：皮膚線維芽細胞から iPS 細胞法作成による病態解析(特に脳障害の解明)(4)遺伝子治療&細胞治療(iPS 細胞治療を含む)、シャペロン治療、基質合成抑制療法等の新規治療方法の開発に関して検討を加えた。また(5)新たなプロジェクトとして我が国の遺伝病の遺伝子治療体制の基盤整備の確立を目指すための協力体制の整備を行った。以下 5 本の柱の概要を示す。

### (1) ライソゾーム病(LSD)、ペルオキシゾーム病(PD)、ALD の自然歴、酵素補充療法の効果判定

特にファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病、ペルオキシゾーム病に於いて QOL, ADL の改善に関する調査を行う。又酵素補充療法の効果も同時に明らかにする。酵素補充療法の効果と抗体産生との関連性も重要課題である。

### (2) ライソゾーム病・ペルオキシゾーム病&ALD 患者のスクリーニング

早期診断、治療の為に濾紙血を用いたファブリ病、ポンペ病、ムコ多糖症 I 型、ムコ多糖症 II 型のスクリーニング法の開発を行う。酵素補充療法を中心とした治療可能なライソゾーム病の濾紙へのスポット採血など簡易なスクリーニング法の開発と実施。

### (3) LSD、PD 患者の病態解析

①ゴーシェ病遺伝子異常とパーキンソン病発症との関連 ②ニーマンピック A/B/C での脂質輸送障害の解析 ③ファブリ病・ゴーシェ病、ポンペ病の iPS 細胞を用いての病態解析 ④酵素補充療法での酵素製剤の動態解析並びに抗体産生の機序解明 ④サポシン A, C, D ノックアウトマウスの作製による脂質輸送、免疫に関する機能解析 ⑤ムコリポドーシスの繊維芽細胞を用いた病態解析、ペルオキシゾーム機能障害の解析を行なった。

### (4) ケミカルシャペロン・AON 療法開発、細胞・遺伝子治療の開発

シャペロン、AON 療法の開発を各種 LSD 細胞での治療を検討する。血液幹細胞移植の効果と適応に関する研究、イソフラボンによるムコ多糖症治療研究、更に iPS 細胞を用いた LSD&PD の病態解析、治療法開発の推進を行った。

### (5) 我が国の遺伝病の遺伝子治療体制の基盤整備

我々は All Japan の体制で LSD, PD, ALD の遺伝子治療体制を整備の為にベクター産生施設、臨床治験体制、安全性のチェック施設、企業との連携体制などの整備を行う為のグランドデザインを構築する。

平成 22 年度は以上のプロジェクトを班員 22 名の協力のもとに研究を推進し、実りある成果を挙げる  
ことが出来ました。ご協力頂いた班員並びに研究協力者の皆様に深く感謝申し上げます。本研究がライ  
ソゾーム病関連疾患で悩む患者、並びに御家族の為にも少しでもお役に立てることを、心から祈念して  
おります。

平成 23 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

平成 22 年度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	国際医療福祉大学大学院	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
芳野 信	久留米大学 医学部 小児科学	教授	バイオマーカーの開発
田中あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科 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 化学・分子生物学	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 発達小児医学講座	講師	病態に関する研究
高橋 勉	秋田大学 医学部 小児科学	教授	臨床疫学的研究
高柳 正樹	千葉県こども病院 代謝 小児科学	医療局長	臨床疫学的研究
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、iPS)
辻 省次	東京大学大学院医学系研究科 医学部 神経内科学	教授	病態に関する研究
難波 栄二	鳥取大学 生命機能研究支援センター	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
鈴木 康之	岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター	教授	ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病、ADL, QOLに関する研究
櫻庭 均	明治薬科大学 分析化学研究室	教授	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
北川 照男	東京都予防医学協会	理事長	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
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	ライソゾーム病の 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 小児科学	教授	先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的調査研究と標準的移植法確立に関する研究
遠藤 文夫	熊本大学大学院医学薬学研究部 小児科学	教授	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
下澤 伸行	岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター	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研究講座)

### 研究要旨

本年度はライソゾーム病(Lysosomal Storage Disease, LSD)調査研究の第一年度(初年度)の報告として、従来掲げてきた四つの柱、I. 病像把握のための実態調査、II. 病態の解析、III. 治療法の開発、IV. 遺伝病遺伝子治療体制の整備 に沿って新たに展開する報告が集まった。

#### I. 臨床病像把握のための実態調査

ポンペ病、ムコ多糖症をマスキング、ポンペ病患者における Activity of Daily Living(ADL)の調査研究、ろ紙血液を用いた Pompe 病、Hurler・Scheie 病、および Hunter 病の新生児スクリーニングの研究、ライソゾーム病の新生児マスキング体制確立に向けての研究

#### II. 病態の解析

クラッペ病モデルマウスにおけるラクトシルセラミドの蓄積と神経細胞死、ペルオキシゾーム膜形成の分子機構とその障害による病態、ペルオキシゾーム病に関する診断・病態解明に関する研究、ファブリー病バイオマーカーに関する基礎的研究、当院における酵素補充療法の問題点、骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後に関する研究、GM1 ガングリオシドーシスの臨床的特徴、日本人ムコリピドーシスの病態解析、ニーマンピック病 A/B 型および C 型の臨床および病態に関する研究

#### III. 治療法の開発

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究、ムコ多糖VII型、クラッペ病への遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究、イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療、βガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究、ライソゾーム病の新しい分子治療法開発、ライソゾーム病の新しい分子治療法開発、ニーマンピック病 C 型患者のデキストリン治療、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、ライソゾーム病の病態・治療に関する基礎的研究—特に iPS 細胞を用いての研究

#### IV. 遺伝病遺伝子治療体制の整備

欧米では遺伝病遺伝子治療が先天性免疫不全症を初め、Adrenoleukodystrophy (ALD)、ライソゾーム病でレンチウイルス、レトルウイルスベクターで遺伝子治療の成果が出始めている。我が国はベクターの作成、あるいは安全性の評価などの体制が整備されていない。そこで本研究班では遺伝子治療体制の整備を目指して活動する。

以上のタイトルで四つの柱に沿った総合的な研究報告が為され、それぞれ本文に示すような成果を挙げており、今後の研究の更なる発展・継続が期待される。

## A. 研究目的

本研究の目的はライソゾーム病 (LSD) 患者の生命予後、日常生活動作 (ADL)、生活の質 (QOL) の改善にある。そのために従来3本の柱として、(I)現在のLSD患者の現状および実態を調査、把握し、更に(II)病態を解析し、その理解を深め、これらを基に(III)早期診断法や新規治療法を開発していくことに重点をおいて研究を推進していく。(IV)我が国での遺伝病の遺伝子治療体制の整備を進める。

## B. 研究方法

\*詳細は各研究分担者の報告欄参照

### (I) 病像把握のための実態調査

奥山らはポンペ病マススクリーニングとして健康対照と保因者・患者の血液ろ紙中の酵素活性値を *umberlliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside* を用いて GAA活性、t-GAA活性、NAG活性を測定し%阻害率を算出、更に遺伝子解析により Pseudodeficiency の頻度を調べた。坪井らはポンペ病ADL調査では基本的ADL (FIM, functional independence measure/Barthel index) と手段的ADLを調査。また北川、田中らはPompe病の一次スクリーニングに免疫捕捉法を用い、二次検査でChamolesらの方法を用いた。MPS I, IIのスクリーニングはろ紙血液の各酵素活性を測定した。

### (II) 病態解析

松田らはラクトシルセラミドの蓄積とライソゾーム病の神経病態の関連性を調べるため、*Gal-C*、*Sap-C*のダブルノックアウトマウスを作成した。今中らはペルオキシゾーム膜に局在するPex3pと生合成された膜たんぱく質を輸送する分子シャペロンpex19pとの相互作用を調査するためX線結晶解析を行った。下澤らはペルオキシゾーム病の患者診断としてガスクロマトグラフィー質量分析機器を用いて、極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラズマローゲンなどの代謝産物、培養線維芽細胞の解析により確定診断をつけた。更に生活習慣病におけるペルオキシゾーム代謝機能の関連を検討す

るために、肥満モデルマウスにおいて血清脂肪酸分析と肝臓における遺伝子発現をリアルタイムPCRで検討した。櫻庭らはファブリー病バイオマーカーを検討するためモデルマウスの臓器や血液を試料としてグロボトリアオシルスフィンゴシンを測定。高柳らは千葉こども病院における酵素補充療法の問題点を検討した。芳野らは骨髄移植を受けたI-cell病患者の長期予後を調査した。辻らはGM1ガングリオシドーシス33例の臨床的特長を検討した。酒井らは日本人ムコリピドーシスII/III型の病態を患者皮膚線維芽細胞を用いて、M6Pレセプターの細胞内動向、膜上セラミドの動向を調べた。高橋らはニーマンピック病C型の細胞(培養リンパ球)を用いて二次性ASM低下に対してASM酵素誘導剤(酪酸)を加え細胞内コレステロール蓄積などに対する効果を検討した。

### (III) 新規治療法開発

島田らは異染性白質ジストロフィー (MLD) をモデルとしてAAVベクター全身投与(新生児モデルマウスに対する静脈注射)による遺伝子治療の検討を行った。小林らはムコ多糖症 (MPS) VII型、クラッペ病の新生児モデルに対するレンチウイルスベクターの全身投与による遺伝子治療の検討を行った。鈴木らはMPS III型患者17名に対するイソフラボン (Genistein) の服用効果を各種バイオマーカーに関して検討した。難波らは $\beta$ ガラクトシダーゼ欠損症患者2検体について遺伝子変異解析を行い、また皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロンNOEVの酵素活性還元効果について検討した。鈴木らはGM1ガングリオシドーシスモデルマウスにNOEVを投与し病理学的観察を行った。大野らはニーマンピックC型の未承認の新しい治療シクロデキストリンの静脈内投与を家族の希望のもと倫理委員会の承認を得て開始し、1年の経過をみた。加藤らは小児領域の移植症例は日本小児血液学会の造血細胞移植登録、成人領域における移植症例は日本造血細胞移植学会の全国登録、非血縁者間骨髄移植症例は骨髄バンクの移植登録、非血縁者間臍帯血移植症例は日

本さい帯血バンクネットワークの登録と4つのレジストリーに登録されていたが、2006年よりこれらの造血細胞移植症例を統合して一元管理するための委員会を設置し、約4年の期間で一元化のための作業を行った。一元管理された移植データを疾患別あるいは横断的に解析するためのワーキンググループ(WG)が設置され、遺伝性疾患のWG内に先天性代謝異常疾患に関する研究グループが形成された。衛藤らはMPS II型モデルマウスに対して脳室内に治療酵素を投与し中枢神経系への効果を検討した。更にヒト、マウスポンペ病からiPS細胞を作成し、骨格筋に分化させた。

#### (IV) 遺伝病遺伝子治療体制の整備

我が国の遺伝病遺伝子治療体制を整備するために欧米の遺伝子治療を実際行っているイタリアのHSR-TIGETのAiuti教授並びに、GenethonのGaly, Gasmi先生、ジザイム社のKaplan先生を招聘して欧米のベクター産生、並びに安全性の体制作りなどを第1回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムを開催してマスコミ、行政に啓蒙活動と同時に我が国の遺伝子治療に関わる研究者に多大な影響を与えた。また、国の担当大臣太政官岡本充功衆議院議員をお呼びして国の対応を御講演頂いた(資料参照)。

### C. 研究結果および考察

\*詳細は各研究分担者の報告欄参照

#### (I) 病像把握のための実態調査

奥山らのポンペ病マススクリーニングでは正確に患者群、pseudo-deficiency群に分けることが可能であった。坪井らのADL調査からは臨床的特徴として筋力低下、呼吸不全が認められ、ADLの低下の要因と考えられた。北川、田中らのポンペ病マススクリーニングでは免疫捕捉、Chamolesらの方法ともに正常新生児と患者との判別は容易であり、MPS I, IIのスクリーニングも正常と患者の判別が十分可能であった。

#### (II) 病態解析

松田らによると *Gal-C*, *Sap-C*のダブルノック

アウトマウスでは *Gal-C*単独欠損マウス(Twitcher)よりも早期に死亡し、脳に領域特異的な神経細胞死を認め、ラクトシルセラミドの蓄積が有意に高かった。今中らによるとX線結晶解析によりPex19p, Pex3pの3次元構造、Pex19p, Pex3pの相互作用とペルオキシソーム膜形成の関連性、Pex3pの分子構造の特性が明らかになった。下澤らはペルオキシソーム形成異常症4例、RCDP 1例、副腎白質ジストロフィー男性20例、女性保因者20例、発症前患者1例を診断。また肥満モデルマウスでは極長鎖脂肪酸の低下、肝におけるペルオキシソーム代謝関連遺伝子発現の増加を認めた。櫻庭らによるとモデル動物のグロボトリアオシルスフィンゴシンは酵素製剤投与により減少し病理学的改善に矛盾せず、バイオマーカーとして有用と考えられた。高柳らの調査では千葉こども病院における酵素補充療法はコンプライアンスをたもつことの難しさなどが問題点として検討された。芳野らによると、骨髄移植を受けたI-cell病患者は1歳2ヶ月で同種骨髄移植を受け、10歳までは精神運動発達の獲得が見られたがその後は退行し20歳で呼吸不全のため死亡しており、生化学的な改善とともに臨床症状の進行の緩和が見られた。辻らの調査ではGM1ガングリオシドーシス3型は顔面を中心とした全身性ジストニアが特徴で比較的均一な疾患と考えられた。酒井らによると日本人ムコリピドーシスII/III型ではエンドサイトーシス、細胞内輸送障害が疑われた。高橋らによるとニーマンピックC型細胞は酪酸添加でASM活性上昇が確認されたが、有意なコレステロール含有量低下は認められなかった。

#### (III) 新規治療法の開発

島田らによるとMLDモデルマウスへのAAVベクター全身投与は有効で広範囲の脳組織に遺伝子導入が確認された。サブタイプでは9型がもっとも効率よかった。小林らによると、レンチウイルスベクターの新生児モデルマウス全身投与ではMPSVII型では肝臓脾臓、脳をはじめとする主要臓器に酵素活性上昇、蓄積物質低下が認められ、寿

命の延長がみられた。クラッペ病では同様に脳、肝臓で酵素活性上昇、蓄積物質低下が認められ、症状進行は抑制された。鈴木らによるとMPSⅢ型に対するイソフラボン服用効果は、臨床症状の変化、尿中GAG・血中Genistein濃度は臨床症状、ADL、毛髪形態と緩やかな相関関係があると推測されたが、明らかな相関は証明できなかったため、今後も症例数を重ねて服用量を検討する。難波らによるとβガラクトシダーゼ欠損症患者2検体について新規変異H102D/L449Qを同定し、この変異の皮膚線維芽細胞についてはNOEVのシャペロン効果を認めなかった。鈴木らによるとGM1ガングリオシドーシスモデルマウスにおいて低濃度のNOEV投与で神経細胞の変性・蓄積が抑えられたが、高濃度では早期に腎障害が発生した。大野らによると、ニーマンピックC型に対するシクロデキストリンの静脈内投与は、肝脾腫の効果に加え、中枢神経症候にも効果のある可能性が示唆された。加藤らによると1985～2009年の期間にわが国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症例のうち、一元化データベースに登録された症例は186例であった。このうち179例では生存に関する転帰情報が判明しており、138例(77%)が生存中であった。今後詳細な移植関連情報を追加することによって、先天性代謝異常疾患に対する移植成績の解析を行う基盤が整備された意義は大きい。衛藤らによると、MPSⅡ型モデルマウスに対して脳室内に治療酵素を投与したところ脳内酵素活性は正常コントロールと比べ100倍以上、小脳では正常レベルまで上昇し3週間維持可能であった。またヒト、マウスポンペ病由来の線維芽細胞からiPS細胞を作成し、骨格筋に分化させることに成功した。

#### (IV) 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムの開催

平成23年1月26日に我が国の遺伝病遺伝子治療体制の確立に向けてのフォーラムを女性と仕事の未来館で開催し約140名の参加者があり、活発な討論が行われた。

#### D. 総合的考察

病像把握のための実態調査、病態解析、新規治療法の開発、の三本柱に沿って今回も多くの研究報告が為されている。酵素補充療法が保険適応となり、更にシャペロン療法や遺伝子治療など酵素補充・骨髄移植などの現行の治療法を補完する新規治療法の開発も進んでいるが、副反応や実際の治療中のQOL評価など新たな課題も山積する。今後も継続的な研究推進が必要と思われる。

#### E. 結論

今回も引き続きライソゾーム疾患の予後、QOL改善を目指して様々な研究が行われ、酵素補充が保険適応となり予後改善が現実化していく中、更にこれまでの知見を総集しよりよい根治療法や予後改善対策などの精力的な調査研究を推進する必要がある。

#### F. 健康保険情報

なし

#### G. 研究発表

各研究分担者の報告欄参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

日 時：平成 21 年 12 月 11 日(金)12 時～  
場 所：東京慈恵会医科大学 GH 会議室

総合司会：小林 博司

12:20

班長挨拶 衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座)

ご挨拶 大竹 輝臣(厚生労働省健康局疾病対策課 課長補佐)

12:30

I. 実態調査

座長：奥山 虎之

- 1) ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法に関する意識調査  
：田尾絵里子、奥山虎之(国立成育医療センター 臨床検査部)
- 2) ライソゾーム病患者における健康関連 QOL の調査研究  
：坪井一哉(名古屋セントラル病院 血液内科)
- 3) ろ紙を用いたファブリー病のスクリーニング  
：中村公俊、遠藤文夫(熊本大学大学院医学薬学研究部)
- 4) 濾紙血液を用いた GSD II 型(Pompe 病)スクリーニング法の研究  
—酸性  $\alpha$ -glucosidase に対するポリクローナル抗体を固相化法の確立—  
：鈴木 健、石毛信之、藤川研人、穴沢 昭、北川照男((財)東京都予防医学協会)  
大和田操(女子栄養大学大学院 小児栄養学)  
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)  
小林博司、大橋十也、井田博幸、衛藤義勝(東京慈恵会医科大学)
- 5) ニーマン・ピック病 C 型患者の調査研究  
：戸川雅美、大野耕策(鳥取大学医学部脳神経小児科学)

★☆☆ 休 憩 ☆☆☆

13 : 40

Ⅱ. 病態解析

座長：高橋 勉

- 6) 分泌型シフエラーゼを用いたケミカルシヤペロン探索のための新規細胞系の構築  
：李林静、檜垣克美、難波栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター)
  
- 7) I-celi 病の Autophagy の解析について  
：大友孝信、酒井規夫(大阪大学大学院医学研究科内科系臨床医学専攻)
  
- 8) ニーマンピック病 A/B 型：細胞内脂質輸送に関する研究  
：平井大土、小山千嘉子、高橋 勉(秋田大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野)
  
- 9) Fabry 病の新規マーカーとしての Lyso-Gb3  
：兎川忠靖、櫻庭 均(明治薬科大学分析化学教室)
  
- 10) パーキンソン病の疾患感受性遺伝子としての glucocerebrosidase 遺伝子  
～メタ解析による検討～  
：三井 純、辻 省次(東京大学神経内科)  
水田依久子、戸田達史(神戸大学神経内科)
  
- 11) ペルオキシソーム代謝異常症研究の展開  
：下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター)
  
- 12) ペルオキシソーム膜形成障害の分子機構  
：今中常雄、柏山恭範、守田雅志(富山大学大学院・医学薬学研究部)
  
- 13) 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  
：松田純子(東海大学未来科学技術共同研究センター)

★★☆ 休 憩 ☆★★

15 : 20

Ⅲ. 治療開発

座長：大野 耕策

- 14) ライソゾーム病に対する新しい治療法開発  
：鈴木義之(国際医療福祉大学大学院)
  
- 15) ハンター症候群患児における酵素補充療法の効果  
：大平智子、西村美穂、渡辺順子、芳野 信(久留米大学医学部小児科学)

- 16) 酵素製剤アガルシダーゼ・アルファとアガルシダーゼ・ベータの薬物動態について  
：岡田志緒子、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)
- 17) ライソゾーム病疾患に対するレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療および  
iPS 細胞を用いた解析・治療開発  
：小林博司(東京慈恵会医科大学 DNA 研医学研究所)  
衛藤義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病講座)

16 : 00

座長：島田 隆

- 18) AAV ベクターによるライソゾーム病の遺伝子治療  
：島田 隆(日本医科大学生化分子生物学講座)
- 19) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療：第 2 報  
：鈴木康之(岐阜大学医学教育開発研究センター)  
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)  
奥山虎之(国立成育医療センター)  
戸松俊治(セントルイス大学)  
折居恒治、折居忠夫(折居クリニック)
- 20) 東海大学における先天性代謝異常疾患に対する造血細胞移植  
：高倉広充、矢部普正、矢部みはる、清水崇史、  
森本 克、小池隆志、柳町徳春、加藤俊一  
(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)

16 : 30

**研究費経理の処理に関して**

松本亜由美(東京慈恵会医科大学研究支援課)

# 分担研究報告書

## I. 病像把握のための実態調査

## ポンペ病マススクリーニングシステムの開発

分担研究者：奥山 虎之(国立成育医療研究センター臨床検査部)

### 研究要旨

酵素補充療法の実用化により、ポンペ病患者の早期発見・早期治療の重要性が世界的に高まっており、一部の国ではポンペ病新生児マス・スクリーニングがすでに開始されている。我が国で新生児マス・スクリーニングを行うためには、“Pseudodeficiency”の存在を考慮しなければならない。我々は、日本人正常対照群、ポンペ病保因者、ポンペ病患者および Pseudodeficiency の血液ろ紙検体を使って、適切なスクリーニング法の検討を行った。その結果、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency 15 症例中 1 症例と保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、より正確に患者群と Pseudodeficiency および健康対照者を分けることが可能であった。本スクリーニングの偽陽性率は 0.2% であった。2011 年 1 月より国立成育医療研究センターで本スクリーニング法を用いて、ポンペ病新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始した。

### A. 研究目的

ポンペ病はライソゾーム内のグリコーゲン分解酵素である酸性  $\alpha$  グルコシダーゼ (GAA) の欠損によりグリコーゲンが蓄積し、著明な筋力低下、呼吸筋障害、心肥大を来す先天代謝異常症である。最重症型である乳児型ポンペ病は、生後 1 才前後に心不全、呼吸不全で死に至る。2007 年 4 月に本疾患に対する酵素製剤アルグルコシダーゼアルファが我が国でも承認された。乳児型ポンペ病に対して早期に酵素補充療法を開始することにより、ほとんどの患者の救命が可能となり、ポンペ病の早期発見・早期治療の重要性が認識されている。すでに台湾や米国の一部の州ではポンペ病の新生児マス・スクリーニングが導入されている。

日本を含むアジア地域には、p.G576S 多型を有し、GAA 活性が正常コントロールの 10–15% 程度であるが、臨床症状を呈しないと考えられる、“Pseudodeficiency”が多く見られ、ポンペ病マス・スクリーニングの実施を困難にしている。今回、我々は日本における遅発型も含む全てのポン

ペ病患者を対象とするスクリーニング法を検討した。また本法におけるマス・スクリーニングに対する“Pseudodeficiency”の影響についても併せて検討した。

### B. 研究方法

健康対照者 496 名(乳児 400 名、成人 96 名)、あらかじめ診断されているポンペ病保因者 5 名およびポンペ病患者 29 名(成人型 13 名、小児型 14 名、乳児型 2 名)の血液ろ紙中の GAA 酵素活性値を人工蛍光基質 umbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside を用いて、以下の条件で測定した。1) GAA 活性：酸性条件下で、アカルボースによって GAA 異性体であるマルターゼグルコアミラーゼ (MGA) を阻害した活性。2) t-GAA 活性：酸性条件下で、アカルボース阻害なしによる GAA と MGA 活性の総和。3) NAG(中性  $\alpha$  グルコシダーゼ)活性：中性条件下でのグルコシダーゼ活性。これらの活性値を用いて、% 阻害率 = (t-GAA 活性 - GAA 活性) / t-GAA 活性  $\times$  100、NAG/GAA 比 = NAG 活性

/GAA 活性を算出する。またすべての血液ろ紙検体に対して、PCR ダイレクトシーケンス法による p.G576S 多型解析を行い、“Pseudodeficiency”の頻度を調べた。

さらに本検査法によるポンペ病新生児マス・スクリーニングを 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。対象は、国立成育医療研究センターで出生した在胎週数 35 週以上かつ出生体重 2000g 以上の新生児の中で親権者が本検査実施に同意した新生児である。現行の先天性代謝異常症マス・スクリーニングのために新生児からろ紙採血をする際、本検査用のろ紙にも血液を採取し、GAA 酵素活性測定を行った。

### C. 研究結果

NAG/GAA 比のカットオフラインを 30 倍以上、阻害率のカットオフラインを 60%以上に設定し、両方満たす場合をスクリーニング陽性とする欧米の基準を我々の研究対象の結果に当てはめると、ポンペ病患者 29 症例中 29 症例、Pseudodeficiency 15 症例中 4 症例と保因者 5 症例中 1 症例がスクリーニング陽性となった。一方、上記の条件値に加えて、さらに GAA 活性のカットオフラインを正常コントロールに対して 8%とし、すべてを満たす場合にスクリーニング陽性とする我々の基準を用いると、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency 15 症例中 1 症例と保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、より正確に患者群と Pseudodeficiency および健康対照者を分けることが可能であった。また p.G576S 多型解析の結果については、対照者 469 例のうち、G576S 多型を AA 型のホモ接合体でもつ Pseudodeficiency は 15 例であり、全体の約 3 パーセントであった。この結果は、日本における Pseudodeficiency の割合は約 4%であるとする既報告とほぼ一致した結果だった。

当センターでのポンペ病新生児マス・スクリーニングを 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。これまでに 54 名が対象となり、

GAA 活性値の異常低下を示す症例はなく、すべて正常と診断された。

### D. 考 察

我々の基準を用いると、ポンペ病症例は見逃すことなく、すべて陽性と判定可能であっただけではなく、Pseudodeficiency 15 症例中 1 例と保因者 5 症例中 1 例と偽陽性例を減らすことが可能であった。この結果から本ポンペ病新生児スクリーニングの偽陽性率は 0.2%であった。しかし、その際にはスクリーニング陽性群の中に含まれる Pseudodeficiency を除外するためには、p.G576S 多型解析を行うことが必要である。

実際に運用開始された本検査方法によるポンペ病新生児マス・スクリーニングでは、ポンペ病患者、保因者や Pseudodeficiency と思われるスクリーニング陽性例はいまだ発見されておらず、今後、検査対象例の結果を蓄積し、ある程度症例数が増えたところで本検査のカットオフ基準値が適正であるかどうかについて、レトロスペクティブに検討していく必要があると考える。

### E. 結 論

日本におけるポンペ病スクリーニング法を検討した。我々の基準を用いることでポンペ病患者はすべて検出することが可能であったが Pseudodeficiency を含めた偽陽性も 2 症例認めた。またスクリーニング陽性例については、G576S 多型解析を行うことにより Pseudodeficiency のついて検討を行うことは重要であると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hayashi S, Okuyama T, Ohki H, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 2010.10.28

- 2) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, et al. Japan Elaprase((R)) Treatment (JET) study : Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). Mol Genet Metab. 99 : 18-25, 2010
- 3) Furukawa Y, Okuyama T, Iwasa K, et al. Cervical pachymeningeal hypertrophy as the initial and cardinal manifestation of mucopolysaccharidosis type I in monozygotic twins with a novel mutation in the alpha-l-iduronidase gene. J Neurol Sci. 2010.12.20
- 4) 奥山虎之. 「ライソゾーム病の診断」特集「わが国のライソゾーム病の病因、病態、診断、治療」: 血液フロンティア 20(4) : 47-50, 2010
- 5) 小須賀基通、奥山虎之. 「先天代謝異常症の遺伝学・遺伝相談」見逃せない先天代謝異常、小児科臨床ピクシス 23 : 197-201, 2010
2. 学会発表
- 1) 田尾絵里子, 徐朱玟, 四元淳子, 小須賀基通, 田中藤樹, 大森美香, 川目裕, Dong-kyu Jin, 奥山虎之. 日韓のムコ多糖症における新生児マス・スクリーニングに関する意識調査. 第 37 回日本マス・スクリーニング学会, 横浜, 2010.8.29
- 2) 中島英規, 小須賀基通, 巽国子, 藤直子, 藤本純一郎, 奥山虎之, 瀧紙血検体を用いたライソゾーム酵素活性測定法の開発, 第 37 回日本マス・スクリーニング学会, 横浜, 2010.8.28
- 3) 中島英規, 小須賀基通, 藤直子, 巽国子, 藤本純一郎, 奥山虎之, タンデムマス質量分析器を用いたポンペ病の診断法の開発. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会・第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 大阪, 2010.10.22
- 4) Tao-Nishida E, See JH, Sohn YB, Yotsumoto J, Kosuga M, Tanaka T, Omori M, Kawame H, Jin DK, Okuyama T. WHAT DO YOU THINK OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY AND NEWBORN SCREENING FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS? OPINIONS FROM PATIENTS AND FAMILIES OF PATIENTS IN JAPAN AND KOREA. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) ANNUAL SYMPOSIUM 2010, イスタンブール, 2010.8.
- 5) 田中あけみ, 鈴木健, 奥山虎之, 藤川研人, 坂口知子, 小田絵里, 藤直子, 斎藤三佳, 澤田智, 北川照男. ライソゾーム病マス・スクリーニングの試みと遺伝カウンセリング. 第 55 回人類遺伝学会, 大宮, 2010.10.28

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし