

ポンペ病患者における ADL の調査研究

分担研究者：坪井 一哉(名古屋セントラル病院 血液内科 主任医長)

研究要旨

ポンペ病は、細胞内小器官であるリソソーム(ライソゾーム)において酸性 α -グルコシダーゼ活性の欠損または低下のため、本来分解されるグリコーゲンが分解できずに蓄積する先天性代謝異常症であり、遺伝形式は常染色体劣性遺伝である。本研究の目的は、ポンペ病患者の臨床症状および ADL に対する調査を行い、現時点での実態を明らかにすることである。

今回の調査結果より、ポンペ病における臨床的特徴として筋力の低下、呼吸不全などが認められ、多くの方が呼吸不全に対して若年時より在宅酸素療法を導入され、終日、酸素の吸入を行っていた。筋力低下や呼吸不全が、日常生活の低下や制限をもたらす重要な原因の一つと考えられ、このことがポンペ病患者における ADL の低下、特に運動項目の低下を招いていると考えられた。本研究は、ポンペ病の臨床像を把握すると共に、酵素補充療法の有効性、また、治療の適応や開始時期を検討するための必要な基礎的データになると考えられる。

A. 研究目的

ポンペ病は、細胞内小器官であるリソソーム(ライソゾーム)において酸性 α -グルコシダーゼ活性の欠損または低下のため、本来分解されるグリコーゲンが分解できずに蓄積する先天性代謝異常症であり、遺伝形式は常染色体劣性遺伝である。また、遺伝性であることに加え極めて稀な疾患でもあるため一般診療で診られる多くの疾患とは様々な点で異なっている。そのため、臨床症状、臓器障害のみを評価するだけでは不十分であり、社会的要因や個々の要因など様々な要因を含めた QOL(Quality of Life) や ADL(Activities of Daily Living) の評価が重要であると考えられる。

本研究の目的は、臨床疫学調査としてポンペ病患者における ADL の評価を行い、実態を把握することである。

B. 研究方法

1. 対象者

平成 20-22 年の調査期間中に、名古屋セントラル病院に通院中のポンペ病患者、または“ポンペ病の会(患者会)”に所属している方のうち、同意および疫学調査に回答の得られた 25 名(幼児型 4 名、小児型 13 名、成人型 8 名)を対象に調査を行った。

2. 方法

ADL には基本的 ADL と手段的 ADL に分類されている。基本的 ADL は、食事、入浴、更衣、整容などの身のまわり動作項目と、起居、移乗、歩行などの移動動作項目から構成され、手段的 ADL は、基本的 ADL レベルを超えたより複雑な行動や行為のことで、家計の管理、食事の準備、旅行など、社会生活の中で共通性の高い活動を総称している。本研究では基本的 ADL の評価尺度と

して、FIM(Functional Independence Measure) および Barthel Index を使用した。また、臨床的特徴として、無記名アンケート調査を行い、酸素吸入または人工呼吸管理の導入時期・頻度、車椅子または歩行器の導入時期・頻度、他疾患の既往歴、現在の臨床症状の集計結果を解析した。

(倫理面への配慮)

当研究は、「ヘルシンキ宣言」および厚生労働省の「臨床試験に関する倫理指針」に従い、また、「疫学倫理指針(平成16年12月28日改訂 文部科学省 厚生労働省)」に基づき、名古屋セントラル病院の倫理委員会の承認を得て行った。今回の調査は、対象患者の ADL を無記名アンケート調査形式で行うものであり、住所、氏名の記載欄は設けていない。また、匿名化により対象患者が特定できないようにし個人情報の保護対策を行い、アンケート結果を処理する際にも他施設へ持ち出すことはない。また、患者検体を用いるものではない。

C. 研究結果

1. 対象者の基本的属性

回答は、25名のポンペ病患者の方から得られ、回収率は、9割以上であった。調査時の年齢分布は、30歳代まで広く分布していた。性別は、男性32%、女性68%で、女性が多く認められた(Fig.1)。病型別では、乳児型12%、小児型56%、成人型32%であった。診断時の年齢分布は、10歳代までに約8割が診断をされた(Fig.1)、病型別の診断時平均年齢は、乳児型が0.3歳、小児型が6.6歳、成人型が18.9歳であった(Table 2)。

受診状況は、乳児型2名、小児型6名が入院で過ごされていたものの、成人型では主に外来での通院生活を送られていた(Table 1)。

臨床的特徴として、筋力低下、呼吸不全が最も認められ、呼吸不全は、重度が31%、中等度が17%、軽度が13%で約6割の方に認められた。他の所見として、心肥大は約2割、脊柱側湾症は約

5割、肝腫大は約4割、睡眠時無呼吸は約4割の方に認められた(Fig.2)。そのため、車椅子や歩行器は、約8割、酸素吸入や人工呼吸器は約6割の方が使用されていた(Fig.3)。

2. ADL の評価

a) FIM

運動項目に関して、セルフケア6項目、排泄コントロール2項目、移乗3項目、移動2項目の計13項目の全てにおいて低下が認められた。特に、移乗と移動に関しては著明な低下が認められた。しかし、認知項目では、コミュニケーション2項目、社会的認知3項目の計5項目は比較的保たれていた(Table 3, Fig.4)。

b) Barthel Index

食事や着替えなどのセルフケアに関しては比較的保たれていたが、ベッドへの移乗、トイレ動作、歩行、階段昇降などの運動項目に関しては、介助支援が必要であり、Barthel Index に関しても FIM と同様の所見が認められた。治療期間がまだ、短いため正確な判断は難しいが、一部の評価項目において酵素補充療法の開始後、自立と部分介助の割合が増え ADL の改善が認められた(Fig.5, 6)。

D. 考 察

今回の調査結果より、ポンペ病における臨床的特徴として筋力の低下、呼吸不全などが認められ、多くの方が呼吸不全に対して若年時より在宅酸素療法を導入され、終日、酸素の吸入を行っていた。筋力低下や呼吸不全が、日常生活の低下や制限をもたらす重要な原因の一つと考えられ、このことがポンペ病患者における ADL の低下、特に運動項目の低下を招いていると考えられた。

現在、ライソゾーム病における病状の評価の有効的な指標として、各疾患における障害臓器の病理検査、各臓器に特異性の高い血液検査、また、細胞や血漿中における代謝産物などが報告されている。しかし、近年では、医療の評価において ADL や QOL の評価が重要であると考えられるように

なり、「医療アウトカム」の重要な指標として明確に位置付けられてきている。本研究は、ポンペ病患者の臨床像を把握すると共に、酵素補充療法の有効性、また、治療の適応や開始時期を検討するための必要な基礎的データになると考えられる。

E. 結語

本年度は、ポンペ病患者を対象に ADL の評価を含めた臨床調査を行った。今後、経年的に追跡調査を予定している。また、他のライソゾーム病、特にファブリー病に関しては、現在、調査票の集計および解析中である。

謝辞

今回の調査に御協力頂いた、“ポンペ病の会”の皆様に謝意を表します。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 野々村大地, 坪井一哉. ファブリー病ヘテロ型の臨床的特徴の検討. 第 64 回日本交通医学会総会, 2010
- 北田雄太, 荘加静, 坪井一哉, 古田祐子. ファブリー病における眼科的所見と血管病変. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 2010
- 平野雅規, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病の遺伝子型・表現型相関の臨床的検討. 第 64 回日本交通医学会総会, 2010
- 坪井一哉, 鈴木貞夫, 永井正規. 臨床調査個人票を用いたファブリー病患者の疫学調査. 第 64 回日本交通医学会総会, 2010
- 坪井一哉, 野々村大地. ファブリー病ヘテロ型 24 例の臨床的検討. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 2010
- 荘加静, 坪井一哉, 古田祐子. ファブリー病における眼病変と血管病変の臨床的検討. 第 64 回日本交通医学会総会, 2010
- 山本浩志, 坪井一哉, 中島努, 内田郁恵, 杉浦綾子, 杉浦彩子, et al. ファブリー病における聴覚障害と同一世代一般住民聴力の比較. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 2010
- 山本浩志, 坪井一哉, 伊藤太. フィブリー病患者における加齢と聴力との関係. 第 64 回日本交通医学会総会, 2010
- 山田弘武, 光吉隆真, 坪井一哉. 無記名アンケート調査によるポンペ病患者の臨床的特徴の解析. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 2010
- 光吉隆真, 山田弘武, 坪井一哉. 無記名アンケート調査によるファブリー病患者の臨床的特徴の解析. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 2010
- 野々村大地, 坪井一哉. ファブリー病ヘテロ型の臨床症状の検討. 第 78 回日本交通医学会東海北陸地方会, 2009
- 平野雅規, 坪井一哉, 山本浩志. 日本人ファブリー病の遺伝子型・表現型相関の検討. 第 78 回日本交通医学会東海北陸地方会, 2009
- 荘加静, 坪井一哉, 古田祐子. ファブリー病における眼病変と血管病変の解析. 第 78 回日本交通医学会東海北陸地方会, 2009
- 山本浩志, 坪井一哉, 伊藤太. フィブリー病と聴力障害. 第 78 回日本交通医学会東海北陸地方会, 2009
- 坪井一哉, 鈴木貞夫, 柴崎智美, 永井正規. 臨床調査個人票を用いたゴーシェ病の疫学像の解析. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 2008

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

【参考文献】

1) 福原俊一, 鈴嶋よしみ. 健康関連 QOL 尺度 SF-36v2 日本語版マニュアル. NPO 健康医療評価研究機構, 2004

2) 福原俊一, 鈴嶋よしみ. 健康プロフィール型尺度(SF-36を中心に). 臨床のためのQOL評価ハンドブック, 医学書院, 2001

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

分担研究者：北川 照男(財団法人 東京都予防医学協会理事長)

研究要旨

Pompe 病は、新生児期に診断し、治療を始める必要のある疾患で、新生児マススクリーニングを行うのに最も適したライソゾーム病である。そこで、すでに Pompe 病のマススクリーニングに使用されている Chamoles らが 2004 年に報告した方法と我々が確立した免疫捕捉酵素活性測定法とを比較し、何れの方法が優れているかの研究を行った。また、MPS I 型、MPS II 型は早期に酵素補充療法を開始すると呼吸機能や運動機能の進行は改善できるが、神経症状に対する効果は殆どないので早期診断の効果について家族に説明しておく必要はあるが、大阪市大小児科の依頼があったので、同大学病院で出生し、新生児血液を採取された新生児のうち、本研究への協力に同意した児の血液を対象に、Pompe 病、MPS I 型、MPS II 型について試験的 newborn スクリーニングを行った。以下、その成績を報告する。

研究協力者

鈴木 健((財)東京都予防医学協会)
藤川 研人((財)東京都予防医学協会)
石毛 信之((財)東京都予防医学協会)
穴澤 昭((財)東京都予防医学協会)
大和田 操((財)東京都予防医学協会)
田中あけみ(大阪市立大医学部小児科)
大橋 十也(東京慈恵会医科大学小児科)
井田 博幸(東京慈恵会医科大学小児科)
衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学小児科)

A. 研究目的

大阪市立大学小児科グループの依頼をうけて、大阪市大で出生した新生児の濾紙血液について試験的なライソゾーム病の新生児スクリーニングの研究を試みた。対象とする疾患は、酵素補充療法の効果が著しく、且つ神経合併症が少ない MPS I 型の Scheie 病と MPS II 型の Hunter 病の軽症型および Pompe 病である。

Pompe 病は、乳児期から重篤な症状を呈する予後不良な疾患であるが、乳児期早期に酵素補充療法を開始すれば、救命できるばかりでなく、正常に近い成長発達も可能である。Pompe 病のスクリーニングには、2004 年に Chamoles らが発表した GAA の類似酵素を阻害剤で阻害し、GAA との活性比を求める方法で行うと共に、我々が確立したより簡便な蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法(免疫捕捉法)を同時に行い、何れの方法が Pompe 病のスクリーニングに適しているかを比較検討した。

また、MPS I 型と MPS II 型は遺伝形式は異なるものの臨床症状は著しく似ており、何れの疾患においても神経合併症が比較的軽い症例もみられる。そして酵素補充療法により呼吸機能や運動機能の改善がみられ、QOL は著しく向上する。従って、上記の 3 疾患を対象として newborn マススクリーニングを試みた。

予備試験において Pompe 病の一次スクリーニングには測定方法が簡便で正確な成績が得られる

免疫捕捉法を用い、二次検査には一次検査と同じ方法を行うと共に、Chamoles らの方法を用いるのがよいとの成績を得たので、その方法を用いた。

また、MPS I 型と II 型のスクリーニングは、それぞれの疾患で低下する酵素の活性を測定して行った。そこで、これらの方法によるライゾーム病の新生児マススクリーニングの有効性を検討するのが本研究の目的である。

B. 研究対象

スクリーニング精度を確かめるために既に診断されている GSD II 型 5 名、MPS I 型 7 名 (Hurler 病 6 例、Hurler・Scheie 病 1 例) MPS II 型 3 名 (重症型 2 例、軽症型 1 例)、および大阪市大で出生した新生児 531 名を研究対象とした。

C. 研究方法

1. Pompe 病のスクリーニング

1) 蛍光免疫捕捉酵素活性測定法¹⁾

抗 GAA ポリクローナル抗体をマイクロプレートウェルに固相化し、これに濾紙血液中の酵素 GAA を捕捉させた後に、基質である 4-methylumbelliferyl-glucopyranoside (4MU-glu) を反応させて GAA 活性を測定した。

2) Chamoles らの方法²⁾

蛍光基質である 4MU-glu を用いて GAA の類似酵素を阻害する薬剤 acarbose の存在下で濾紙血液の GAA 活性と中性 α -glucosidase 活性とを測定して、類似酵素を含めたそれぞれの活性比率を算出し、これらの値を Chamoles らの基準に従って使用して、Pompe 病をスクリーニングした。

2. MPS I 型および MPS II 型のスクリーニング

1) MPS I 型のスクリーニング³⁾

濾紙血液中の α -L-iduronidase (ID) 活性は、蛍光基質 4MU-iduronide と類似酵素を阻害する目的で加えた 3mM saccharic-acid-1,4-lactone を一緒に incubate する方法でスクリーニングした。ID 活性値は、1 disc の濾紙血液が単位時間内に分

解する基質量 (μmol) で表した。

2) MPS II 型のスクリーニング⁴⁾

濾紙血液中の α -L-iduronide-2-sulfatase (IDS) 活性の測定は、免疫捕捉法で行った。すなわち抗 IDS ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートウェルに濾紙血液中の IDS を捕捉させ、これに蛍光基質である 4MU-sulfate を加えて測定する方法でスクリーニングした。IDS 活性値は、1 disc の濾紙血液が単位時間内に分解する基質量 (μmol) で表した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学医学部倫理委員会、(財)東京都予防医学協会倫理委員会の承認を得て、本研究のライゾーム病患者と新生児正常対照者、および大阪市大で出生した新生児対象者の濾紙血液は、その用途、研究目的を事前に文章にて説明した後、承諾書に署名を得てから採取し、これらの検体を使用して本研究を行った。

D. 研究結果

1. Pompe 病 (GSD II 型) スクリーニング成績

免疫捕捉法で測定した新生児 531 名の濾紙血液 GAA の平均値は、 $2.678 \pm 1.54 \mu\text{mol/hr/L}$ (range $0.05 \sim 7.69 \mu\text{mol/hr/L}$, 3%ile 値は $0.350 \mu\text{mol/hr/L}$) であり、 $0.50 \mu\text{mol/hr/L}$ 以下の 19 名 (3.6%) が遺伝子解析で pseudo GAA deficiency と診断された。また Chamoles らの方法でもこれらの患者は、異常として検出された。一方、ポンペ病患者 5 名の濾紙血液 GAA 測定値は、免疫捕捉法では $0.004 \sim 0.016 \mu\text{mol/hr/L}$ と極めて低い値を示しており、同様に Chamoles らの方法でも明らかに異常値を示し、何れの方法も正常新生児と患者の判別は容易であった。

2. MPS I 型および MPS II 型スクリーニング成績

1) MPS I 型 Hurler 病 6 例の ID 活性値は $0.35 \pm 0.16 \mu\text{mol/hr/L}$ (range $0.15 \sim 0.63 \mu\text{mol/hr/L}$) であり、Hurler・Scheie 病 1 例では 0.910

$\mu\text{mol/hr/L}$ であった。MPS I型 ID 測定値の cut-off 値を正常新生児と Hurler・Scheie 病 1 例患者を含む 7 例の測定値から 2%ile ($1.39 \mu\text{mol/hr/L}$) とした。なお、この方法では Hurler 病と Hurler・Scheie 病との間で ID 活性に差はなかった。

新生児対象 531 名の ID 活性値は $3.56 \pm 1.63 \mu\text{mol/hr/L}$ (range $1.03 \sim 14.26 \mu\text{mol/hr/L}$) の範囲にあり、cut-off 値以下を示した陽性例は認められず、全例正常と判定された。

- 2) MPS II型の重症型 2 例と軽症型 1 例の活性値は、何れも測定値 0 の感度以下であり、両者の区別はできなかったが、患者と新生児対照との差は著しく大きく、その区別は容易であった。また、MPS II型のスクリーニングにおける cut-off 値を正常新生児と MPS II型の軽症型 1 例、重症型 2 例の測定値から 3%ile 値 ($0.041 \mu\text{mol/hr/L}$) とした。

正常新生児の IDS 活性値は、 $0.176 \pm 0.066 \mu\text{mol/hr/L}$ (range $0.034 \sim 0.526 \mu\text{mol/hr/L}$) の範囲にあり、8 例(再採血率 1.67%)が cut-off 値以下を示した。そのうち 5 例は男性で、1 例が精査の結果、尿デルマタン硫酸、尿ヘパラン硫酸の蓄積が認められ、これに加えて遺伝子解析の結果から MPS II型と診断された。他の 4 例は精査の結果正常と診断された。また、女児であった 3 例は、本症が X 染色体連鎖劣性遺伝であることから精密検査対象から除外された。本パイロットスクリーニングの中には blind test を目的とした MPS II患者が 5 例含まれていたが、全例異常として捕捉することが可能であった。

E. 考 察

Pompe 病スクリーニングにおける Chamoles らの方法は、GAA 類似酵素を阻害して得た酸性 GAA 活性値やこれと中性 α -glucosidase 活性値との比などによって判定するやや煩雑な方法であるのに対して、免疫捕捉法は直接的に GAA 活性

を測定して判定するので、より精度の高い検査法であり、また大量検体の処理が可能なので新生児期に Pompe 病を一次スクリーニングする方法として有用と考える。

他方、日本では pseudo GAA deficiency の頻度は多く、今回の検討でもそのことが確認されたが、新生児スクリーニングを行う場合はこの点を考慮して、二次スクリーニングでは免疫捕捉法を行うと共に、Chamoles らの方法を併用して確認するのがよく、また必要があれば遺伝子検索を行って診断するのがよいと思われた。

今回の試験的スクリーニングは、完全非連結方式で行われたため性別の情報が得られず、従って男女を区別せずに検査を行った。X 染色体連鎖遺伝病である MPS II型については、大阪市大小児科の取り決めで女児が患児である可能性がある場合は、敢えて診断しないことにされているので、一次スクリーニングで陽性を示した女児について再採血を行わず、再検査しなかった。このように X 染色体連鎖遺伝病である本症においては、スクリーニングによって、家庭内に問題が生じないように配慮した点はよかったと思っている。

また、MPS I型と MPS II型のスクリーニングにおいては、患児と思われた場合は、蓄積物質である尿中デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸量の測定と、遺伝子検索を行って診断を確認する必要があるが、大阪市大田中あけみ先生の報告によると、尿中デルマタン硫酸量は増加し、遺伝子検査でも異常を証明し、すでに酵素補充療法が開始され、予後の向上が期待されているという。

F. 結 論

新生児を対象とした Pompe 病の試験的一次スクリーニングに使用した免疫捕捉法による濾紙血液 GAA 活性の測定法は、Chamoles らの方法よりもより簡便で容易に測定できる上に、患者の GAA 測定値は正常対照と比較して明らかに低値を示しており、患者の診断を速やかに行うことができた。しかし、本邦に多い pseudo deficiency

の症例と患者の鑑別には必ずしも有用と云えず、今後の課題である。従って、この免疫捕捉法で一次スクリーニングを行い、陽性を示した例について本法と Chamoles らの方法を併用して二次スクリーニングを行えば、より精度の高いスクリーニングが可能となると思われる。

MPS I 型、MPS II 型の新生児マススクリーニングに、それぞれの疾患で低下する酵素活性を測定すれば早期発見が可能であるが、酵素補充療法は神経症状の進行を阻止することは困難なので、発見された症例が神経症状の乏しい軽症型の場合には有効であるが、重症型の場合はその効果が少ないので、早期発見の効果について予め家族に説明しておいた方がよいと思われる。

G. 研究発表

- 1) 藤川研人, 鈴木健, 北川照男, 他. 乾燥濾紙血液を用いた糖原病 II 型 (GSD II) スクリーニング法の研究. 日本マス・スクリーニング学会, 20(2) : 46(154), 2010
- 2) 田中あけみ, 鈴木健, 北川照男, 他. 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. 日本マス・スクリーニング学会, 20(2) : 50(158), 2010
- 3) 鈴木健, 藤川研人, 北川照男, 他. 蛍光的免疫捕捉測定法による新生児血液を用いた糖原病

II 型 (ポンペ病) スクリーニングの研究. 日本先天代謝異常学会雑誌, 26(2) : 103, 2010

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

【文献】

- 1) Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikel PJ. Determination of acid α -glucosidase activity in dried blood spots as a diagnosis test for Pompe disease. Clin Chem 47 : 1378-83, 2001
- 2) Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M. Glycogen storage disease type II : enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. Clin Chem Acta 347 : 97-102, 2004
- 3) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Hurler like phenotype : enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. Clin Chem 47 : 2098-2102, 2001
- 4) Dean JC, Bockmann MR, Hopwood JJ. Detection of mucopolysaccharidosis type II by measurement of iduronate-2-sulfatase in dried blood spots and plasma samples. Clin Chem 52(4) : 643-649, 2006

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

分担研究者：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

酵素補充療法が可能になったライソゾーム病のうちムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型、およびポンペ病の3疾患について、血液ろ紙を材料として酵素活性を測定することによる新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを行った。このなかで、ムコ多糖症Ⅱ型患者が診断された。遺伝子検査により点変異 P285L が認められたため、軽症型であると推測された。この症例について酵素補充療法を開始した。また、ポンペ病については、 α -グルコシダーゼ酵素活性の欠損が認められながらも、片方にのみ pseudodeficiency allele をもつ症例が見つけられた。他方の allele の遺伝子変異を見つけることはできなかったものの、酵素活性の低さから何らかの病因遺伝子変異を有するものと推測された。しかし、ひとつの pseudodeficiency allele による酵素活性のみでも正常な代謝を行うことは可能であると判断し、この症例は発病しないと推論した。

ライソゾーム病は、同一酵素の欠損であっても病態、経過、予後に大きな差があり、さらに治療効果についても不確実な要素が多いため、ライソゾーム病のスクリーニング事業推進に当たっては十分な経験を持つ専門医の指導が大切であると思われた。

研究協力者

澤田 智(大阪市立大学大学院医学研究科発達
小児医学・研究医)
坂口 知子(大阪市立大学大学院医学研究科発達
小児医学・技術職員)
斉藤 三佳(大阪市立大学大学院医学研究科・講師)
鈴木 健(東京都予防医学研究所)
北川 照夫(東京都予防医学研究所)
奥山 虎之(国立成育医療研究センター・部長)

A. 研究目的

一部のライソゾーム病に対して酵素補充療法の保険診療が行われるようになったことから、早期治療のための早期診断として新生児マス・スクリーニングを始めようという動きが出てきた。このことを踏まえて、小規模のパイロットスタディを行い、体制整備に向けての問題点を洗い出すこ

とを目的に研究を始めた。

B. 研究方法

1) 対象

大阪市立大学医学部附属病院にて出生した新生児を対象とした。対象疾患は、ムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型、および糖原病Ⅱ型の3疾患とした。

2) 検体採取と検査結果報告の方法

書面にて保護者の同意が得られた新生児について濾紙血を採取した。濾紙は連結可能な匿名化を行い、血液付着部分のみを切り離して東京都予防医学協会に郵送した。ここで3疾患のスクリーニングが行われ、結果は pdf ファイルにて分担研究者宛てにメールで送られた。検体の郵送は月末にまとめて行い、結果は翌月の10日前後に送られることとした。

陽性者には電話にて連絡し、代謝専門外来を受診させて再検検体を採取した。確定診断がついた際には、遺伝相談外来にてカウリセリングを行うこととした。すべてが正常であった新生児については、結果を郵送した。

3) 測定方法と再検方法

ムコ多糖症Ⅰ型は Chamoles の方法、ムコ多糖症Ⅱ型は抗体を用いた免疫捕捉法、糖原病Ⅱ型は Chamoles の方法と抗体を用いた免疫捕捉法の両方を用いた。

精度管理のために、実際の患者の濾紙検体をブラインドで混ぜた。

再検者は、ムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型については代謝専門外来にてヘパリン血を採取し、大阪市立大学にてリンパ球中の酵素活性を測定した。Ⅱ型は X-連鎖性劣性遺伝であることを考慮し、男児のみを再検とした。ポンペ病については代謝専門外来にて血液ろ紙 2 枚を再採取し、1 枚を東京都予防医学研究所に送付して酵素活性の再検査を依頼し、1 枚は国立成育医療研究センターに送付して遺伝子解析により pseudodeficiency の除外診断を行った。

C. 研究結果

平成 21 年 10 月～平成 22 年 11 月の 13 ヶ月間の結果は、検体数が 531、うち陽性検体数はムコ多糖症Ⅰ型 0 検体、Ⅱ型 11 検体、ポンペ病 19 検体であった。ブラインド患者検体はすべて陽性の結果が得られた。

ムコ多糖症Ⅱ型陽性者 11 名の内訳は、男児 7 名、女児 4 名であった。この中の男児についてリンパ球中の iduronate 2-sulfatase 活性の測定を行ったところ、6 名は正常活性であったが 1 名に酵素活性の欠損が認められた。この症例について尿中ムコ多糖の分析を行い、異常代謝産物であるデルマタン硫酸とヘパラン硫酸とを確認することができた。さらに、iduronate 2-sulfatase 遺伝子解析の結果、新規遺伝子変異 P285L が認められた。症例の外表所見に異常は認められなかった。4 か

月時より酵素補充療法を開始した。7 か月時のレントゲン検査にて椎骨 L1、L2 の卵円形の変化が明らかになってきた。

ポンペ病陽性者 19 名のうち、pseudodeficiency allele のホモ接合体は 12 名、ヘテロ接合体は 5 名で、pseudodeficiency allele を持たず再検酵素活性も正常であったのが 2 名であった。ヘテロ接合体であったうちの 1 名で再検酵素活性がほぼ患者域にまで低下していたため、さらに全領域の遺伝子解析が進められたが、pseudodeficiency allele がヘテロ状態であること以外酵素活性を低下させる変異を見つけることができなかった。

D. 考察

1) 方法について

現在、新生児マス・スクリーニングが行われているフェニルケトン尿症をはじめとする疾患では、異常代謝産物を検知する方法により陽性者を抽出し、次いで酵素活性や遺伝子検査により確定診断が行われる。従って、異常な代謝状態が現存しているということが発端となっている。これに対し、ライソゾーム病では酵素活性の低下を手掛かりに陽性者を抽出している。ムコ多糖症の場合には尿中に異常代謝産物としてデルマタン硫酸やヘパラン硫酸の排泄を確認することにより患者であると確定できる。しかし、ポンペ病については異常代謝産物を検知することが血液や尿ではできないため、その酵素活性の低下が病的代謝状態を引き起こして将来症状を起こすのか、一生症状を起こさずに済むのか、判断が難しい。近年、遺伝子変異 G576S は α -グルコシダーゼ酵素活性の低下をもたらすが、ポンペ病を発病することはないということが明らかにされ、pseudodeficiency allele とされた。さらに、このホモ接合体は、日本人集団では 100 人に 3 人という高頻度に存在することも明らかにされた (Kumamoto et al. Mol Genet Metab 97 : 190, 2009)。

今回のパイロットスタディにおいて、pseudodeficiency allele をヘテロにもち、酵素活性

が患者レベルにまで低下している症例が見つけた。この症例のもう一方の allele に変異を見つけないことができなかったものの、酵素活性の低さからこの allele は病的意義のある変異をもった allele であろうと推測される。この症例が、将来ポンペ病を発病してくるかどうかの予見は難しい。しかしながら、日本人集団における pseudodeficiency allele のホモ接合体の頻度から計算すると、ヘテロ接合体は 3 人に 1 人の頻度となる。もしも、pseudodeficiency allele と病的変異をもつ allele との複合ヘテロ接合体が患者として発病するならば、日本人における患者頻度は他の人種集団より 2 ケタ近く上がることになるが、実際はそうではない。従って、この pseudodeficiency allele は、生体内での天然基質に対する酵素活性は十分にありものと想像される。これらのことを考察し、今回見つけられた症例は将来ポンペ病を発病することはないと結論した。しかし、保護者の不安が強いため、年 1 回の受診により診察と血液検査を継続していくこととした。

2) 陽性者への説明について

ライソゾーム病の場合、ムコ多糖症において尿に異常なムコ多糖が検出されること以外、血液や尿の分析で異常代謝産物を検知することは難しい。酵素活性が欠損していることが明らかにされ遺伝子変異が確認されても、それが新規変異であった場合、異常代謝産物の確認ができない状況では新たな pseudodeficiency allele の存在を否定することは困難である。さらに、ムコ多糖症のように異常代謝産物が確認されて病的であると結論されても、新規遺伝子変異によるものであった場合、臨床的重症度を正確に説明することは困難である。

治療効果にしても、酵素補充療法が発病前に速やかに導入されても難治性の臓器には症状が発現してくることが推測されており、確実な治療効果が保障されているものではない。

このように、ライソゾーム病の新生児スクリー

ニングにおいて患者が発見された場合、予後も治療効果も不確実である事柄について説明をしなければいけない。従って、十分な経験のある専門医の存在が不可欠であろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox JF, Eto Y, Orii T. Japan Elapraser Treatment (JET) Study: Idursulfase Enzyme Replacement Therapy in Adult Patients with Attenuated Hunter Syndrome. *Mol Genet Metab* 99 : 18-25, 2010
- 2) Tanaka A, Takeda T, Hoshina T, Fukai K, Yamano T. Enzyme replacement therapy in a patient with Fabry disease and the development of IgE antibodies against agalsidase beta but not agalsidase alpha. *J Inher Metab Dis*. [Epub ahead of print] 2010.6.22
- 3) 田中あけみ. ライソゾーム病の治療 酵素補充療法. *血液フロンティア* 20 : 575-581, 2010
- 4) 田中あけみ. ライソゾーム病を見逃していませんか? *小児内科* 42 : 1161-1166, 2010
- 5) 田中あけみ. ムコ多糖症. *肝・胆道症候群 (第2版) I 肝臓編(上)* 509-514, 2010

2. 学会発表

- 1) 田中あけみ, 鈴木健, 奥山虎之, 他. 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 回日本人類遺伝学会, 大宮, 2010.10.27-29

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究

分担研究者：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)

研究要旨

ファブリー病は X 連鎖性遺伝形式の先天代謝異常症であり、 α ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。われわれは、酵素活性のろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたファブリー病の新生児マススクリーニングのパイロットスタディを行った。

A. 研究目的

ファブリー病は X連鎖性遺伝形式の先天代謝異常症であり、リソゾーム酵素である α ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。近年この疾患に対して酵素補充療法が導入され、患者の QOL の改善が可能になった。そのため、ファブリー病の早期発見と早期治療が重要となってきた。しかし、ファブリー病の症状は多様であるため、早期の診断は困難であることも少なくない。われわれは、新生児ろ紙血検体を用いたファブリー病のマススクリーニングを行った。

B. 研究方法

われわれは、新生児ろ紙血検体を用いたファブリー病のマススクリーニングを行った。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た。新生児ろ紙血検体中の α ガラクトシダーゼ酵素活性測定法を用いたファブリー病のマススクリーニングを試みた。平成 18 年 8 月から熊本県、その後、福岡市、宮崎県、佐賀県、広島市、香川県などの自治体において、現行の新生児マススクリーニングに加えて、説明と同意に基づいたファブリー病のマススクリーニングを開始した。このスクリーニング陽性者とその家族に遺伝カウンセリングをおこなったうえで、ダイレクトシーケンシング法を用いた α -ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。ま

た、この測定法を利用した成人のファブリー病ハイリスク者の酵素活性の測定を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と保護者への説明と同意に基づいて活性低値の新生児に対して、ファブリー病の説明と遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

熊本県、福岡市、佐賀県、宮崎県、広島県、香川県と、神戸市の一部、沖縄県の一部の産科施設において、現行の新生児マススクリーニングに加えて、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った。ろ紙血を用いた α ガラクトシダーゼ活性測定法を用いて、説明と同意に基づいたファブリー病の新生児マススクリーニングを行った。

遺伝子解析を含めた精密検査を行った。本研究では 1 年間に約 30,000 名の新生児の酵素活性を測定した。これまでの研究において約 214,000 名中 40 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。その中で古典型ファブリー病に認められる変異は 4 名の男児と 1 名の女児に認められた。また、ファブリー病を発症しうると考えられ

る変異は 13 名の男児に認められた。これらのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約 8,300 名に 1 名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約 27,000 名に 1 名であると推定された。

また、ファブリー病で見られる症状である腎不全、心不全、脳血管障害、四肢の痛みなどを持つ、ファブリー病のハイリスク者約 7,900 名の α ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。49 名に酵素活性の低下を認め、12 名に古典型の遺伝子変異を認めた。

D. 考 察

このスクリーニングによってわが国におけるファブリー病の頻度を推定することができた。また、簡便で安価な酵素測定法を用いることで、ファブリー病の発症前の診断も容易となった。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。

ファブリー病の新生児におけるスクリーニングは臨床的にも研究対象として有用であるため、今後もパイロットスタディを継続する予定である。さらに、成人のファブリー病のハイリスク者とされる心疾患・腎疾患・脳血管障害患者における本法を用いたファブリー病のスクリーニングは、早期発見と治療に有用と考えられる。本研究では先天代謝異常症の専門家のネットワークを用いることで対象地域を限った効率的な研究を行うことができた。

E. 結 論

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング

は、簡便で安価なファブリー病の検査法として有用であると考えられた。安定で輸送が容易であるろ紙血検体を用いた酵素測定法は、ファブリー病の診断法として有用である。さらにファブリー病の安価で簡便な診断法の開発とわが国におけるファブリー病の頻度の推定を行った。また、本疾患を疑ったときに簡便に試みることができる検査法としても利用されている。一方でファブリー病のスクリーニングや遺伝カウンセリングにおいて配慮すべき点も少なくない。スクリーニング検査を慎重に行うことによってファブリー病患者の予後を改善できると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S. Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet* 55 : 259-61, 2010
- 2) Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for lysosomal disorders. *Am J Med Genet*, 2011 in press
- 3) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJJ, Okumiya T Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol. Genet. Metab*, 2011 in press

分担研究報告書

Ⅱ. 病態解析

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

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

Twitcher マウス (*Galc*^{-/-}) は、ガラクトシルセラミド (GalCer)- β -ガラクトシダーゼ (*Galc*) の遺伝的欠損マウスで、クラッペ病のモデルマウスとして知られる。*Galc*^{-/-} は脳と脊髄にガラクトシルスフィンゴシン (*Psy*) が蓄積し、重度の脱髄病変による四肢麻痺を呈して、生後 45 日前後で死亡する。一方、グルコシルセラミド (*GlcCer*)- β -グルコシダーゼ (*GCCase*) の活性化タンパク質であるサポシン C の欠損マウス (*Sap-C*^{-/-}) は、生後 6 か月頃から神経軸索変性と小脳プルキンエ細胞の特異的脱落を呈する。

Galc^{-/-} と *Sap-C*^{-/-} の交配でサポシン C を欠損した *Twitcher* マウス (*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-}) を作成したところ、*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} は振戦と体重減少を呈し、*Galc*^{-/-} より早期の 30 日前後で死亡すること、*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} の脱髄病変は *Galc*^{-/-} と同程度であるが、脳では領域特異的な神経細胞死を認め、ラクトシルセラミド (*LacCer*) の蓄積が *Galc*^{-/-} に比して優位に高いことを見出した。*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} では、*Galc*^{-/-} には認められない神経細胞死が、海馬 CA2 錐体細胞、嗅内皮質、線条体、嗅索、視床、小脳顆粒細胞層で認められ、一部は TUNEL 陽性であった。これらの領域ではアストログリアの活性化が顕著で、特に海馬体では嗅内皮質から CA2 へ投射する貫通線維の走行に一致した領域に観察された。*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} の全脳および肝臓組織を用いた脂質分析では、重症度と相関して *LacCer* の蓄積を認めた。*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} の全脳の *Psy* は *Galc*^{-/-} の病末期と同程度であり、同胞の *Galc*^{-/-} に比し早期に *Psy* が蓄積する傾向にあった。肝臓組織を用いて *GCCase*、*GM1*- β -ガラクトシダーゼ (*Bgal*)、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定したところ、*Galc*^{-/-} *Sap-C*^{-/-} では野性型や *Galc*^{-/-} に比して *GCCase* に加え、*Bgal* の活性も低かった。

今回我々は脳組織に著明な *LacCer* の蓄積をきたすクラッペ病モデルマウスを作成し、*LacCer* の蓄積と神経細胞死が時間的/空間的相関を示すことを見出した。本マウスの表現型は *LacCer* の蓄積がクラッペ病の神経病態に関与している可能性を示唆している。

A. 研究目的

ラクトシルセラミド (*LacCer*) はゴルジ体でラクトシルセラミド合成酵素により合成され、多様なスフィンゴ糖脂質 (*GSL*) を合成するための重要な中間体となる。*LacCer* は好中球をはじめ血

球細胞に豊富に存在し、炎症反応時に細胞膜上の“マイクロドメイン”を構成して、細胞内外からのシグナル伝達に関与することが報告されている。一方、ニーマン・ピック病 C 型、プロサポシン欠損症など複数のライソゾーム病において組織内に

LacCer が蓄積することが知られており、病態への関与が指摘されている。LacCer のライソゾームにおける分解にはガラクトシルセラミド-β-ガラクトシダーゼ (GALC) と GM1-β-ガラクトシダーゼ (BGAL) の 2 つの β-ガラクトシダーゼに加え、複数のスフィンゴ脂質活性化タンパク質 (サポシン A, B, C) が関わりとされている (図 1)。マウスでは *Galc* と *Bgal* をダブルノックアウトすると全身に LacCer が蓄積することが報告されているが、このモデルでは神経系に GM1 が蓄積するため、LacCer の神経病態に対する影響を直接的に評価することが困難であった (Tohyama et al. Hum Mol Genet. 2000)。

B. 研究方法

Twitcher マウス (*Galc*^{-/-}) は、*Galc* の遺伝的欠損マウスで、乳児型クラッペ病のモデルマウスである。*Galc*^{-/-} は脳神経系にガラクトシルスフィンゴシン (GalSph) が蓄積し、脱髄病変による四肢麻痺

を呈して生後 45 日前後で死亡する。一方、グルコシルセラミド-β-グルコシダーゼ (GCCase) の活性化蛋白質であるサポシン C の欠損マウス (*Sap-C*^{-/-}) は、有意な GSL の蓄積を認めないが、生後 6 か月頃から進行性の神経軸索変性と小脳プルキンエ細胞の脱落を呈する (Yoneshige et al. J Neurosci Res. 2010)。LacCer の蓄積とライソゾーム病の神経病態との関連を明らかにする目的で、LacCer の分解能を低下させたモデル動物として、*Galc*^{+/-} と *Sap-C*^{-/-} の交配により *Galc* と *Sap-C* のダブルノックアウトマウス (*Galc*^{-/-}*Sap-C*^{-/-}) を作成した。

C. 研究結果

Galc^{+/-}*Sap-C*^{-/-} は全身の震えと体重減少を呈し、*Galc*^{+/-} より早期の 30 日前後で死亡した (図 2)。*Galc*^{+/-}*Sap-C*^{-/-} の脳では生後 20 日頃より重症度と相関して LacCer の著明な蓄積を認め、GM1 の有意な蓄積は認めなかった。GalSph は *Galc*^{+/-} の

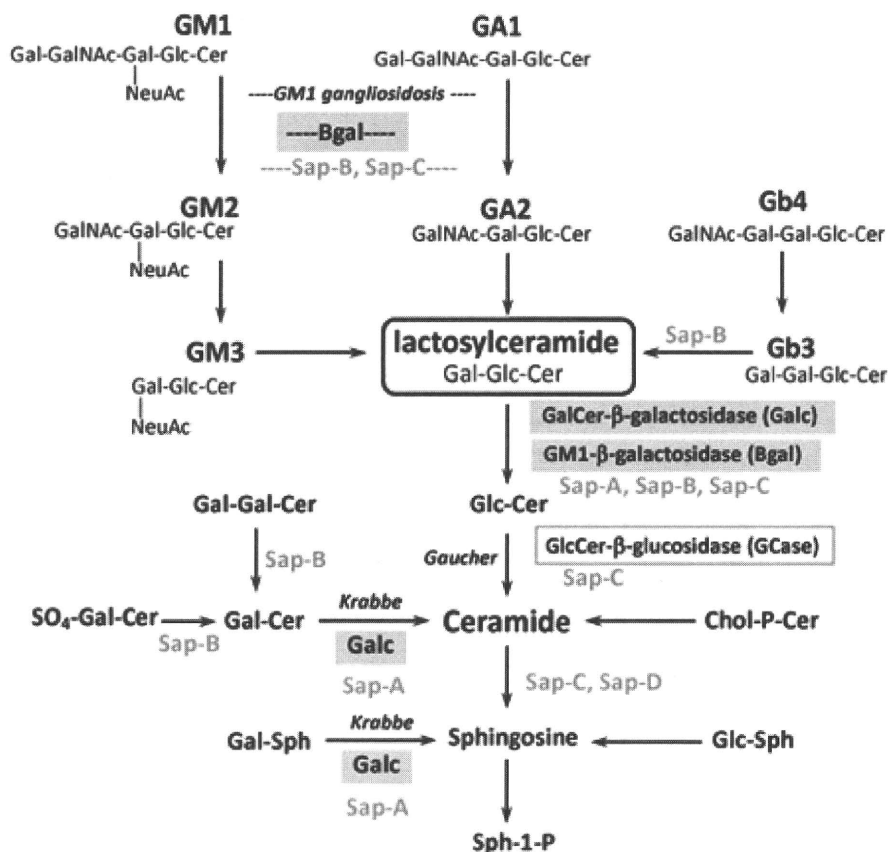


図 1 スフィンゴ脂質の分解代謝経路

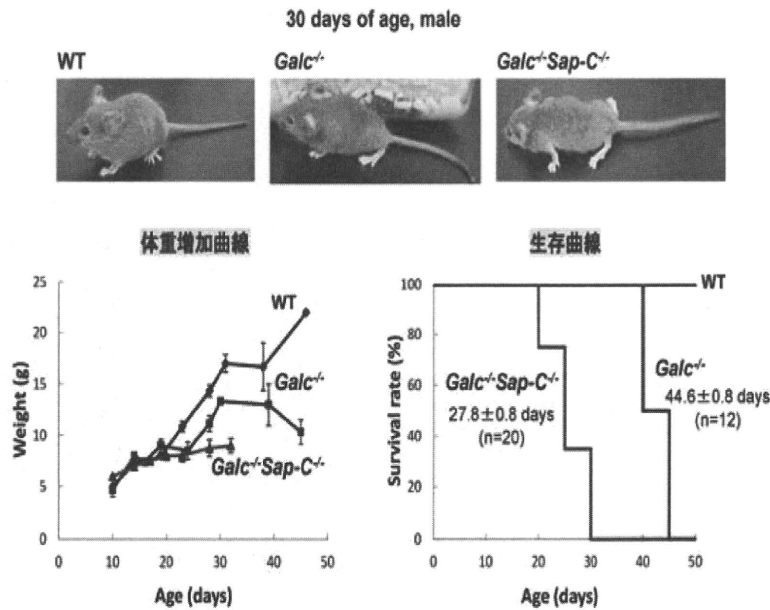


図2 *Galc*^{-/-}, *Sap-C*^{-/-}は *Galc* 単独欠損マウスより重症である

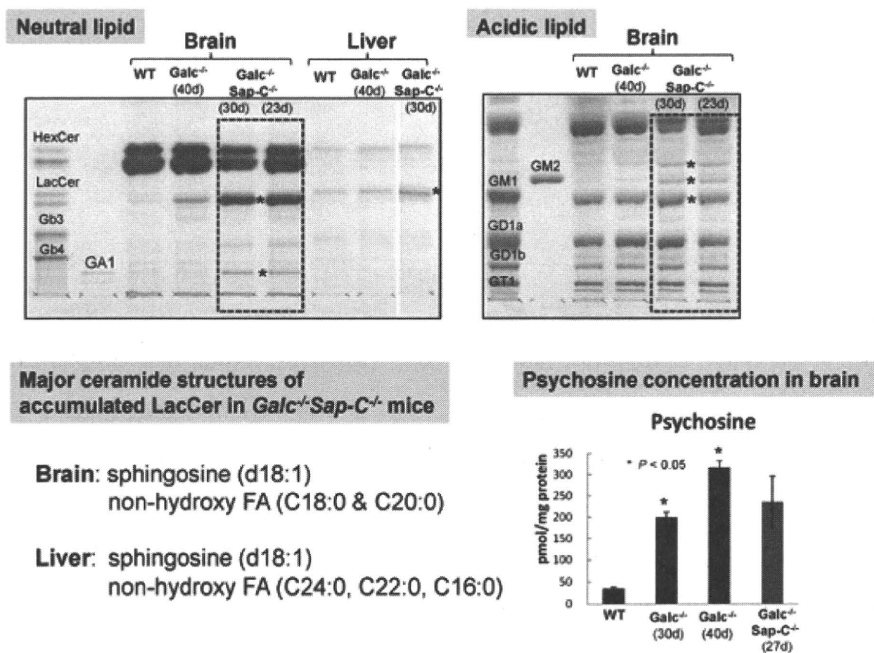


図3 *Galc*^{-/-}, *Sap-C*^{-/-}組織におけるラクトシルセラミドの蓄積

病末期と同程度で、LacSph は検出されなかった (図 3)。神経病理学的には、脱髄病変は *Galc*^{-/-}と同等であったが、生後 20 日頃より *Galc*^{-/-}には認められない急速進行性の神経細胞死を認めた。神経細胞死は海馬 CA2 錐体細胞、嗅内野、線条体、嗅索、視床、小脳顆粒細胞層に顕著であった。これらの領域ではアストログリアの活性化が顕著で、

特に嗅内野から CA2 へ投射する貫通線維の走行に一致してグリオーシスが観察された (図 4)。抗 LacCer 抗体 (CDw17) を用いて *Galc*^{-/-}, *Sap-C*^{-/-} の脳組織を免疫染色したところ、上記領域の神経細胞、アストログリアに病早期から LacCer の蓄積を認めた。

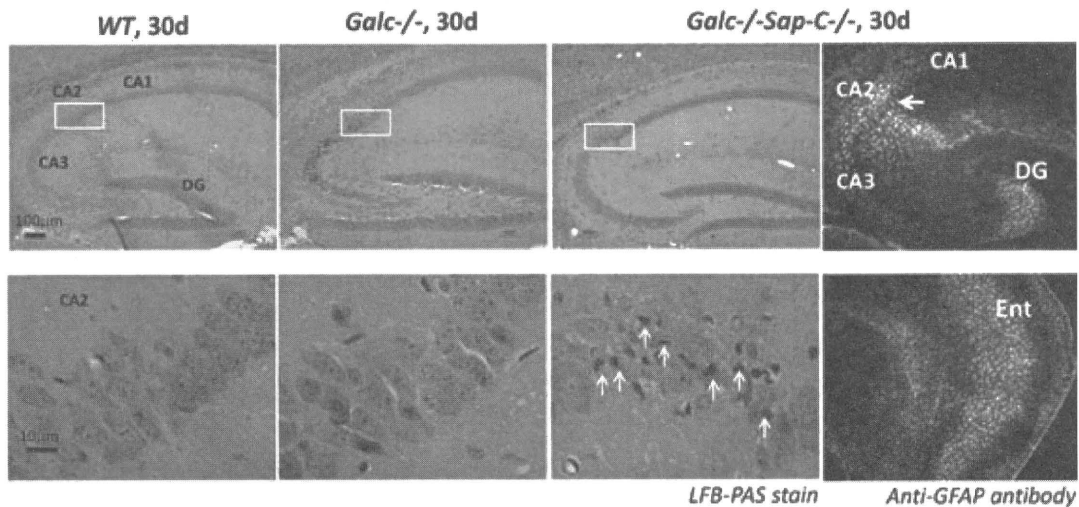


図4 $Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}$ 脳海馬体における神経細胞死

D. 考 察

$Galc$ と $Bgal$ のダブルノックアウトマウスでは全身に $LacCer$ が蓄積することがすでに報告されているが、このモデルマウスでは神経組織に $GM1$ が蓄積するために、 $LacCer$ の脳組織への蓄積は比較的軽度であった。今回我々は、脳組織に著明な $LacCer$ の蓄積をきたすクラッペ病モデルマウスを作成し、 $LacCer$ の蓄積と神経細胞死が時間的/空間的相関を示すことを見出した。サポシン C は $Bgal$ による $LacCer$ の分解に必要で、 $Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}$ では、 $Galc$ 欠損に加え $Bgal$ の活性低下をきたし、 $GM1$ の有意な蓄積を伴うことなく $LacCer$ が蓄積したと考えられた。 $Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}$ の表現型は $LacCer$ の蓄積がクラッペ病の神経病態に関与している可能性を示唆している。また、本マウスに認めた神経細胞死は他の神経型ライソゾーム病や、アルツハイマー病に見出されている比較的緩徐な神経変性の病像とは異なり、急速な細胞死が特徴的で、 $LacCer$ の神経細胞毒性を検討する上で興味深い。

E. 結 論

- $Galc^{-/-} Sap-C^{-/-}$ は $Galc^{-/-}$ よりも早期に死亡し、脳において $LacCer$ が蓄積していた。
- $Galc^{-/-} Sap-C^{-/-}$ では $Galc$ 欠損に加えて、 $Bgal$ の酵素活性も低下していた。

- $Galc^{-/-} Sap-C^{-/-}$ の脳では領域特異的な神経細胞死を認め、それらの領域では $LacCer$ の蓄積とアストログリオシスを認めた。
- $LacCer$ の蓄積がクラッペ病の神経病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hojo H, Katayama H, Tano C, et al. : Synthesis of the sphingolipid activator protein, saposin C, using an azido-protected O-acyl isopeptide as an aggregation-disrupting element. *Tetrahedron Lett.* 52 : 635-639, 2011
- 2) 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.* 88 : 2118-2134, 2010
- 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. Nutr. Biochem.* 21 : 214-226, 2010

2. 学会発表

- 1) 米重あづさ, 渡辺 昂, 武藤真長, 松田純子 : サポシン C 欠損 *twitcher* マウスにおける領域特異的な神経細胞死の解析. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 神戸, 2010.12
- 2) 渡辺 昂, 米重あづさ, 武藤真長, 鈴木明身, 松田純子: マウス消化管におけるスフィンゴ糖脂質のセラミド構造の発現制御. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010.12
- 3) 武藤真長, 米重あづさ, 渡辺 昂, 松田純子 : マウス胚発生におけるプロサポシンの役割. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010.12
- 4) 久樹晴美, 只野一有富桂子, 内田俊也, 松田純子, 岡崎具樹 : Saposin D 欠損マウスの多飲・多尿は中枢性の飲水行動異常によって引き起こされる. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010.12
- 5) 松田純子, 米重あづさ, 武藤真長, 渡辺 昂 : 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. 第 15 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2010.12
- 6) 松田純子: ラクトシルセラミドの蓄積と神経細胞死. 第 8 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム. 東京・品川, 2010.12
- 7) 松田純子, 武藤真長, 米重あづさ, 渡辺 昂 : マウス胚発生におけるプロサポシンの役割. 第 52 回日本先天代謝異常学会大阪, 2010.10
- 8) Yoneshige A, Matsuda J : Deficiency of saposin C in the mouse model of Krabbe disease showed neurodegeneration with accumulation of lactosylceramide. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, 2010.8
- 9) Watanabe T, Yoneshige A, Suzuki A, Matsuda

J : The differential ceramide structures of glycosphingolipids and their regulations in the mouse gastrointestinal tract The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, 2010.8

- 10) Mutou M, Yoneshige A, Matsuda J : Lack of prosaposin in mice causes embryonic lethal phenotype and placental dysgenesis. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, 2010.8
- 11) Matsuda J, Yoneshige A : The role of sphingolipid activator protein, saposins A-D in the nervous system : lessons learnt from mouse models of specific saposin deficiencies. Naito conference : Glycan Expression and Regulation [I] : Functions and Disease mechanisms. Kanagawa, Japan, 2010.8
- 12) Yoneshige A, Watanabe T, Suzuki A, Matsuda J : The differential ceramide structures of glycosphingolipids and their regulations in the mouse gastrointestinal tract. Naito conference : Glycan Expression and Regulation [I] : Functions and Disease mechanisms. Kanagawa, Japan, 2010.8

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
該当なし

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

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。今回、Pex3p と Pex19p の相互作用の分子構造基盤を明らかにするため、Pex3p と Pex19p 複合体の X 線結晶解析を行った。その結果、Pex3p は 6 本の α ヘリックスから構成される回転楕円状の新規構造を有し、その最先端部に Pex19p の N 末端側が結合していた。さらに両者の結合には、Pex19p の Leu-18、Leu-21、Leu-22、Phe-29 と Pex3p の Trp-104 が重要な役割を果たしていることが示唆された。Pex19p 欠損ヒト線維芽細胞に、上記の重要なアミノ酸残基に変異を入れた Pex19p を発現させるとペルオキシソームの形成は回復しなかった。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。さらに、Pex3p の分子表面のいくつかの領域に変異を導入した変異型 Pex3p を作製し、Pex3p の構造上の特性について考察した。

研究協力者

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)

加藤 博章：(京都大学大学院薬学研究科教授)

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、Pex3p、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、Pex3p と Pex19p 複合体の X 線構造解析により、両者の相互作用の分子構造基盤を明らかにすることを目的とした。さらに Pex3p、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

ヒト Pex3p の細胞質ドメイン GST-Pex3p (aa. 49-373)、ヒト GST-Pex19p (aa. 1-44) を大腸菌に発現させ、精製した。Pex3p と pex19p を 1:2 で混合し、ポリエチレングルコールを沈殿化剤よして結晶化させた。Spring-8 の BL41XU および BL38B1 にて X 線解析データを収集し、2.5 Å 分解能における複合体の結晶構造を決定した。また、GST-Pex19p と His₁₀-Pex3p との相互作用は、pull down assay により解析し、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性型もしくは変異型 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。