

(倫理面での配慮)

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

## C. 研究結果

### 1) Pex19p と Pex3p の 3 次元構造

Pex3p は、6本の  $\alpha$  ヘリックスから構成される回転楕円状の新規な構造 (twisted six-helix bundle) であることが判明した。最も長い  $\alpha 2$  が中心に位置し、他の 5つの  $\alpha$  ヘリックスが  $\alpha 2$  に巻き付く構造をとっていた。Pex19p ペプチドは  $\alpha$  ヘリックス構造をとり、Pex3p の最先端部に結合していた。Pex3p は Typ-104 で区分される 2つの疎水性の cavity をもち、分子表面に近い cavity で Pex19p の Leu-18、Leu-21、Leu-22 と結合し、分子内の cavity で Pex19p の Phe-29 と結合していた。各アミノ酸を Ala に置換した変異体を作製し、Pex3p と Pex19p の解離定数 ( $K_D$ ) を surface plasmon resonance (SPR) で解析すると、各変異体では、 $K_D$  が 100~500 倍増加していた。さらに CD スペクトルの解析より、Pex19p (aa.1-44) 単独では、ランダムコイル構造をとるが、ペプチド溶液にメタノールを添加していくと  $\alpha$  ヘリックス構造をとるようになることが示唆された。

### 2) Pex3p と Pex19p の相互作用とペルオキシソーム膜形成の関連性

X線結晶解析により Pex3p と Pex19p との相互作用に重要である可能性が示唆された Pex19p の Leu-18、Leu-21、Leu-22、Phe-29 を Ala に置換した GST-Pex19p を作製し、His<sub>10</sub>-Pex3p を用いた pull down assay を行った。その結果、野生型は His<sub>10</sub>-Pex3p に結合したが、L18A、L21A、L22A、F29A の置換をもつ GST-Pex19p は His<sub>10</sub>-Pex3p に結合しなかった。一方、Pex3p の Trp-104 を Ala に置換した His<sub>10</sub>-Pex3p は、GST-Pex19p に結合しなかった。

さらに、*pex19* Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型 Pex19p を発現させ、ペルオキシソームの回復能を、ペルオキシソームマトリックスタンパク質ならびに PMP に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。その結果、野生型 Pex19p ではペルオキシソームが検出された。一方、Pex3p との結合能を有さなかった Pex19p (L21A)、Pex19p (L22A)、Pex19p (F29A) ではペルオキシソームが検出されなかった。一方、*pex3* Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に変異型 Pex3p (W104A) を発現させても、ペルオキシソームは検出されなかった。

### 3) Pex3p の分子構造の特性

Pex3p の機能不全を起こす変異体 G138E、Pex3p の分子表面の疎水性領域の変異体 V69Q、L80Q、L133Q、L168N、構造的に不安定な  $\alpha 4$  ヘリックス領域の変異体 W224A、K227A を GST-Pex3p (aa. 49-373) として大腸菌に発現させた。その結果、V69Q、L80Q、G138E は凝集体を形成した。よって、 $\alpha 2$  に近接する  $\alpha 1$  や  $\alpha 2$  領域に存在し、 $\alpha 6$  に近接する領域は Pex3p の twisted six-helix bundle 構造を形成するために重要であることが示唆された。

## D. 考 察

遊離型ポリソームで生合成された PMP と Pex19p とが複合体を形成し、ペルオキシソーム膜前駆体上の Pex3p と相互作用し、Pex19p 上の PMP がペルオキシソーム膜に挿入されることにより、ペルオキシソーム膜が形成されていく。我々はこれまでに、生合成された PMP70 の Pex19p との相互作用に必要な領域を明らかにするとともに、Pex19p の N 末端側の領域が Pex3p との相互作用に重要であることを報告してきた。今回、Pex3p と Pex19p 複合体の X 線結晶解析により、両者の相互作用における分子基盤が明らかになった。すなわち、Pex3p の細胞質側の先端に位置し、Trp-104 で隔てられた 2つの cavity に Pex19p の

疎水性アミノ酸 Leu-18、Leu-21、Leu-22 と Phe-29 が結合することが示された。またその相互作用はペルオキシソーム形成に必須であることが、各種変異体を用いた Pex3p と Pex19p との結合実験と Zellweger syndrome 患者線維芽細胞でのペルオキシソーム形成回復実験から示された。また Pex19p の Pex3p 結合領域は、単独ではランダムコイルを示し、Pex3p とのみ特異的に結合する可能性が示唆された。

## E. 結 論

ペルオキシソーム膜形成における Pex3p と Pex19p との相互作用における分子構造基盤が明らかになった。今後、Pex19p が担う PMP のペルオキシソーム膜への挿入過程を解析するとともに、ペルオキシソーム膜形成過程の分子メカニズムに基づいたペルオキシソーム病治療薬開発のためのアッセイ系の確立が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iwashita S, Tsuchida M, Tsukuda M, et al. Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. *J Biochem* 147 : 581-590, 2010
- 2) Woudenberg J, Rembacz PK, Hoekstra M, et al. Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells. *Hepatology* 52, 623-633, 2010
- 3) Kashiwayama Y, Tomohiro T, Narita K, et al. Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. *J Biol Chem* 285, 26315-26325, 2010
- 4) Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, et al. Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its

receptor Pex3p. *EMBO J* 29, 4083-4093, 2010

- 5) Kouno T, Watanabe N, Sakai N, et al. The Structure of physarum polycephalum hemagglutinin I suggests a minimal carbohydrate recognition domain of legume lectin fold. *J Mol Biol* 405, 560-569, 2011
- 6) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, et al. ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr Drug Targets* in press

### 2. 学会発表

- 1) 横山和明, 西澤千穂, 池田和貴, 永井徹, 守田雅志, 原田史子, 佐藤典子, 唐沢健, 今中常雄, 下澤伸行, 田口良. ペルオキシソーム病の線維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質. 第 52 回日本脂質生化学会. 渋川, 2010.6
- 2) 志村裕介, 川道美里, 谷口範壮, 新保沙織, 渡辺志朗, 守田雅志, 今中常雄. 野生型および ABCD1 欠損マウス脳における極長鎖脂肪酸延長反応と関連タンパク質 ELOVL1 の発現. 日本薬学会北陸支部第 122 回例会. 金沢, 2010.11
- 3) 柏山恭範, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリー-D 群のオルガネラ選択的局在化機構. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 富山, 2010.11
- 4) 五十嵐喜子, 柏山恭範, 平裕幸, 今中常雄. ペルオキシソーム膜形成因子 Pex16p のペルオキシソーム局在化シグナルの解析. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 富山, 2010.11
- 5) 新保沙織, 志村祐介, 守田雅志, 渡辺志朗, 今中常雄. ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトを用いた ALD 分子病態の検討. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 6) 柏山恭範, 今中常雄. ペルオキシソーム膜上

に存在する raft 様構造体の解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12

- 7) 李朝香, 朝日彰子, 赤池 宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化と N 末端アミノ酸配列. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 8) 中野雄太, 森達哉, 楠本梨賀, 柏山恭範, 今中常雄. ペルオキシソーム形成因子 Pex3p の存在状態と Pex19p との相互作用に伴う高次構造変化. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 9) 土屋裕貴, 柏山恭範, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 raft 様構造体の機能解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12
- 10) 東野和直, 上杉泰介, 柏山恭範, 今中常雄. 小胞体膜上に存在する ABC タンパク質 P70R(ABCD4) の存在状態と機能の解析. 第

83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12

- 11) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐澤健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明. ペルオキシソーム病の線維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造決定. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会. 神戸, 2010.12

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 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

分担研究者：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)

### 研究要旨

平成 22 年の 1 年間の国内診断実績として、ペルオキシソーム形成異常症 4 例、近位肢型点状軟骨異形成症(RCDP)1 例、副腎白質ジストロフィーの男性患者 20 例、女性保因者 20 例、発症前患者 1 例を診断した。その中で国内初例となるペルオキシソーム形成異常症の最軽症型である乳児型 Refsum 病とプラスマローゲン合成系酵素異常の RCDP type3 の遺伝子レベルでの病因を明らかにした。両患者とも長期にわたり診断の手がかりが掴めず、亡くなられたあとに確定診断されており、今後、国内におけるペルオキシソーム病のより一層の周知が必要と思われる。またサウジアラビア国立病院との国際共同研究では、平成 20-22 年の 3 年間にアラブ地域において副腎白質ジストロフィーを除く 15 例のペルオキシソーム病患者の確定診断を行った。さらに生活習慣病におけるペルオキシソーム代謝機能の関連を明らかにするために、肥満モデルマウスにおけるペルオキシソーム関連遺伝子発現の変動を血中脂肪酸分析と併せて検討した。

長瀬 朋子(岐阜大学ゲノム研究分野・助教)

荒井 綾子(岐阜大学ゲノム研究分野・研究補佐員)

梶原 尚美(岐阜大学ゲノム研究分野・技術補佐員)

桐山 寛子(岐阜大学ゲノム研究分野・技術補佐員)

### A. 研究目的

リソソーム病やミトコンドリア病とともに新たな疾患概念として確立しているペルオキシソーム病患者の正確かつ迅速な診断を目的に、ペルオキシソーム病患者診断スクリーニングから確定診断のシステムを確立して、全国の医療機関にその情報を提供する。さらにそのシステムをアジア地域における医療機関にも共同研究として適応し、国際貢献を目指している。一方で、集積した患者細胞等を対象に転写産物や代謝産物を網羅的に解析するシステムを確立し、本症の病態解明から新たなペルオキシソーム代謝機能を探索する。さらにそれらの神経変性疾患や生活習慣病の発症への関

わりも明らかにして治療法の開発に繋げて行く。

### B. 研究方法

#### 1. ペルオキシソーム病患者診断：

臨床症状よりペルオキシソーム病が疑われた患者に対してガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)を用いた血中極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラスマローゲンなどの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を樹立し、細胞、タンパク、遺伝子レベルでの解析を経て、確定診断を行っている。

#### 2. 肥満モデルマウスにおけるペルオキシソーム代謝機能の検討：

生活習慣病におけるペルオキシソーム代謝機能の関与を明らかにするために、高脂肪食群と普通食群に分けて飼育した生後 20 週齢のマウスにおい

て血清脂肪酸分析と肝臓におけるペルオキシソーム代謝関連遺伝子の発現の変動をリアルタイムPCRにて比較検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究に関しては、岐阜大学医学研究等倫理委員会での審査、承認を得た上で、研究対象者への人権養護に十分配慮し、インフォームドコンセントを得て行っている。また動物実験に関しても岐阜大学生命科学総合研究支援センター動物実験施設に申請、許可のもと、動物愛護に十分配慮して行っている。

## C. 研究結果

### 1. ペルオキシソーム病患者診断実績：

平成 22 年の 1 年間の国内診断実績として、ペルオキシソーム形成異常症 4 例、近位肢型点状軟骨異形成症(RCDP) 1 例、副腎白質ジストロフィーの男性患者 20 例、女性保因者 20 例、発症前患者 1 例を診断した。その中で国内初例となるペルオキシソーム形成異常症の最軽症型である乳児型 Refsum 病とプラスマローゲン合成系酵素異常の RCDP type3 を遺伝子レベルで病因を明らかにした。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。

またサウジアラビア国立病院との国際共同研究では、平成 20-22 年の 3 年間にアラブ地域においてペルオキシソーム病が疑われて送付された患者の培養皮膚線維芽細胞を解析することにより、ペルオキシソーム形成異常症 10 例、二頭酵素欠損症 4 例、アシル CoA オキシダーゼ欠損症 1 例の、副腎白質ジストロフィーを除く併せて 15 例のペルオキシソーム病患者の確定診断を行った。

### 2. 肥満モデルマウスにおけるペルオキシソーム代謝機能の検討：

20 週齢の高脂肪食投与マウス群では普通食投

与マウス群に比べて著明な体重増加と血中レプチン値の増加を認めた。その条件下で比較した結果、血中脂肪酸分析ではペルオキシソーム  $\beta$  酸化系代謝能を反映する極長鎖脂肪酸値の低下、肝臓より抽出した RNA を用いた定量 PCR 解析では各ペルオキシソーム代謝関連遺伝子の発現の増加を認めた。

## D. 考 察

ペルオキシソーム病診断システムの確立とその普及については、GCMS を用いた血清脂肪酸による診断スクリーニングから遺伝子解析まで迅速な診断体制を確立するとともに、診断パンフレットの作成やホームページにも掲載して周知活動を行っている。その状況下でも、今回の研究成果により新たに国内初の診断例として病因を遺伝子レベルで明らかにした 2 疾患の患者は、いずれも長期にわたり診断の手がかりが掴めず、亡くなられたあとに確定診断されている。今後、国内におけるペルオキシソーム病の更なる周知活動を続け、早期かつ効率的な診断に繋げて、治療に結びつけていくことが重要と思われる。

その中で、集積したペルオキシソーム患者の臨床情報、細胞や遺伝子等のリソースを用いた病態解明、治療法の開発を進めて行く。さらに診断スクリーニングシステムを拡充し、新たなペルオキシソーム病の疾患単位の発見を目指す一方で、早期発見、早期介入を目的としたマススクリーニング法の開発研究も行っていく。また既存の診断システムによる国際的な共同研究も対象国を広げて進めていく予定である。

ペルオキシソーム代謝機能の検討についても、動物モデルも取り入れて、ペルオキシソーム機能関連の転写産物や代謝産物の網羅的解析法を充実させ、先天代謝異常症の領域に留まらず、生活習慣病や神経変性疾患も対象にした広い意味での代謝病におけるペルオキシソームの関わりを明らかにしていきたいと考えている。

## E. 結 論

国内唯一のペルオキシソーム病診断施設として、多くのペルオキシソーム病患者を診断する中で、国内初の診断例となる乳児型 Refsum 病と RCDP type3 の患者を診断した。さらに倫理面に配慮して患者リソースを用いた遺伝性ペルオキシソーム病の病態解明・治療法の開発、動物モデルも取り入れた広い意味での代謝病におけるペルオキシソーム機能異常の解明を目指している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表(書籍)

- 1) 下澤伸行. 極長鎖脂肪酸測定. 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常. 中山書店 112-115, 2010
- 2) 下澤伸行. ペルオキシソーム病. 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常. 中山書店 214-217, 2010
- 3) 下澤伸行. ペルオキシソーム形成異常症 — Zellweger 症候群 —. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No13 肝・胆道系症候群(第2版), 日本臨床社 515-518, 2010

### 2. 論文発表(論文)

- 1) Miyoshi Y, Sakai N, Hamada Y, Tachibana M, Hasegawa Y, Kiyohara Y, Yamada H, Murakami M, Kondou H, Kimura-Ohba S, Mine J, Sato T, Kamio N, Ueda H, Suzuki Y, Shiomi M, Ohta H, Shimozawa N, Ozono K. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocr J*. 2010.9.16 [Epub ahead of print]
- 2) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, Suzuki Y, Imanaka T. ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy *Current Drug Targets* [Epub ahead of print]

3) Shimozawa N, Honda A, Kajiwara N, Kozawa S, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y. X-linked adrenoleukodystrophy : Diagnostic and follow-up system in Japan. *J Hum Genet* [Epub ahead of print]

4) Shaheen R, Al-Dirbashi OY, Al-Hassnan ZN, Al-Owain M, Makhshed N, Basheeri F, Seidahmed MZ, Salih MAM, Faqih E, Zaidan H, Al-Sayed M, Rahbeeni Z, Al-Sheddi T, Hashem M, Kurdi W, Shimozawa N, Alkuraya FS. Clinical, biochemical and molecular characterization of peroxisomal diseases in Arabs. *Clin Genet* 2010 [Epub ahead of print]

5) Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 2010 [Epub ahead of print]

6) 下澤伸行. ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー, Zellweger 症候群), 小児科診療 2010 年 増刊号, 小児の治療指針. 515-517, 2010

7) 下澤伸行. ペルオキシソーム病を見逃していませんか? *小児内科* 42 : 1167-1173, 2010

8) 鈴木康之, 下澤伸行. 日本先天代謝異常学会 学会賞受賞論文「ペルオキシソーム病との 30 年: 二人三脚の旅」日本先天代謝異常学会雑誌 26 : 2-12, 2010

### 3. 学会発表

- 1) 下澤伸行, 本田綾子, 梶原尚美, 桐山寛子, 小澤 祥, 長瀬朋子, 竹本靖彦, 鈴木康之. 副腎白質ジストロフィー発症前患者に対する早期介入の取組み. 第52回日本先天代謝異常学会,

第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム，大阪，2010.10

- 2) 下澤伸行，本田綾子，梶原尚美，小澤 祥，長瀬朋子，竹本靖彦，杉尾陽子，塚原正人，鈴木康之，Ronald JA Wanders. 岐阜大学ペルオキシソーム病診断システムの展開ープラスマローゲンによる近位肢型点状軟骨異形成症の診断ー 第 52 回日本先天代謝異常学会，第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム，大阪，2010.10
- 3) 長瀬朋子，玉置也剛，梶原尚美，本田綾子，小澤 祥，柴田敏之，國貞隆弘，下澤伸行 ペルオキシソーム病患者皮膚線芽細胞からの iPS

細胞樹立. 第 52 回日本先天代謝異常学会，第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム，大阪，2010.10

- 4) 下澤伸行，本田綾子，梶原尚美，小澤 祥，長瀬朋子，竹本靖彦，杉尾陽子，塚原正人，鈴木康之，Ronald JA Wanders. 近位肢型点状軟骨異形成症におけるペルオキシソーム病診断システムの有用性ー日本人初の RCDP type3 同胞例の診断解析ー 第 55 回日本人類遺伝学会，大宮，2010.10

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## ファブリー病バイオマーカーに関する基礎的研究

分担研究者：櫻庭 均(明治薬科大学分析化学・臨床遺伝学 教授)

### 研究要旨

ファブリー病の診断や治療評価に役立つバイオマーカーを見つけるため、ファブリー病モデルマウスを用いて基礎的検討を行った。ファブリー病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(Lyso-Gb3)を測定した所、腎臓、心臓、肝臓、肺、脾臓などの臓器や血漿において、Lyso-Gb3 含量の著明な増加が認められた。これらの臓器や血漿中の Lyso-Gb3 含量は、組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の投与により減少し、病理学的改善所見に矛盾しない結果であった。Lyso-Gb3 は、ファブリー病バイオマーカーとして有望であると考えられる。

### 研究協力者

兎川 忠靖(明治薬科大学分析化学 准教授)  
鈴木 俊宏(明治薬科大学分析化学 講師)  
川島 育夫(明治薬科大学臨床遺伝学 客員教授)  
児玉 敬(明治薬科大学分析化学 大学院生)  
月村 考宏(明治薬科大学分析化学 大学院生)  
福重 智子(鹿児島大学皮膚疾患学 助手)  
金蔵 拓郎(鹿児島大学皮膚疾患学 教授)

### A. 研究目的

ファブリー病( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A 欠損症)に対する酵素補充療法の導入と展開に伴い、その診断および治療効果に対する評価に役立つバイオマーカーが求められている。我々は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A(GLA)の基質となる糖脂質の中のひとつであるグロボトリアオシルスフィンゴシン(Lyso-Gb3)に注目した。Lyso-Gb3 は、機能性糖脂質であり、その蓄積により血管平滑筋の増殖や腎臓タコ足細胞の障害を惹起することからファブリー病の病態形成に関与する可能性が考えられている。

本研究では、ファブリー病モデルマウスの臓器と血漿中の Lyso-Gb3 含量を測定すると共に、組

み換えヒト GLA 投与によるその変化について解析し、Lyso-Gb3 がファブリー病のバイオマーカーとして適当か否かを検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 試料

野生型およびファブリー病モデルマウス、さらに酵素治療後のファブリー病モデルマウスから、腎臓、心臓、肝臓、肺、脾臓および血漿を採取し、これらを試料とした。ファブリー病モデルマウスに対する酵素治療として、毎日、1mg/kg 体重の組み換えヒト GLA(アガルシダーゼ-ベータ)を4日間、尾静脈から血管内投与した。本実験は、大学動物実験委員会の指針を遵守して行われた。

#### 2) 臓器および血漿中 Lyso-Gb3 含量の測定

各臓器および血漿を試料として、クロロホルム/メタノール法により、脂質画分を抽出した。この脂質画分の一部をとり、これを乾固後に、*O*-フタルアルデヒド(OPA)試薬を用いて Lyso-Gb3 を OPA 誘導体化し、高速液体クロマトグラフィーで定量した。定量については、既知量の精製 Lyso-Gb3 を野生型マウス由来の試量に加えたも



のを用いて標準曲線を作製し、その標準曲線を基準として行った。

### 3) 電子顕微鏡による腎臓組織の病理学的解析

ファブリー病における主な障害臓器である腎臓組織を試料として、これを固定し、薄切した後に電子顕微鏡で観察した。

## C. 研究結果

### 1) 臓器および血漿中の Lyso-Gb3 含量と酵素補充によるその変化

腎臓、心臓、肝臓、肺、脾臓および血漿中の Lyso-Gb3 含量の測定結果を表に示した。野生型マウスにおいては、いずれも測定感度以下の値であったが、ファブリー病モデルマウスでは、著しい高値を示し、その値は、酵素投与により減少した。

表 ファブリー病モデルマウスの臓器および血漿中 Lyso-Gb3 含量と酵素補充による変化

	野生型	ファブリー	ファブリー +酵素
腎臓	<0.02	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.1
心臓	<0.02	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
肝臓	<0.02	2.1 ± 0.5	0.2 ± 0.1
肺	<0.02	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.2
脾臓	<2	133 ± 35	23 ± 5

臓器および血漿における Lyso-Gb3 濃度の単位は、それぞれ nmol/g および nmol/l である。各グループの試料数は 3 であり、無処理のファブリー病モデルマウス(ファブリー)および酵素補充後のファブリー病モデルマウス(ファブリー+酵素)の Lyso-Gb3 含量の数値は、平均±標準偏差で示した。

### 2) 腎臓の病理学的所見と酵素補充によるその変化

ファブリー病モデルマウスの腎臓組織を電子顕微鏡で観察した所、ヒトのファブリー病患者で認められるのと同様の層状封入体が尿管細胞内に多数見られ、酵素補充を行ったマウスでは、その数が著明に減少していた。

## D. 考察

ファブリー病の特異的バイオマーカーとして、これまでは蓄積糖脂質のひとつであるグロボトリ

アオシルセラミド(Gb3)が主に用いられてきた。しかし、Gb3 は良いバイオマーカーではあるが、診断や治療評価では必ずしも充分ではないことが報告されている。我々は、Gb3 の誘導体である Lyso-Gb3 に注目し、動物実験により基礎的検討を行った。その結果、ファブリー病モデルマウスの臓器や血漿中での Lyso-Gb3 含量の増加が認められ、治療による病理学的改善と相関して Lyso-Gb3 も減少していることが判明した。

これらの基礎的検討の結果、Lyso-Gb3 はファブリー病のバイオマーカーとして有望と考えられることから、今後、多数のファブリー病患者の試料を用いて検証していく価値があると思われる。

## E. 結論

Lyso-Gb3 は、ファブリー病のバイオマーカー候補として有望である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Togawa T, Kawashima I, Kodama T, et al. Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 399 : 716-720, 2010
- 2) Saito S, Ohno K, Sese J, et al. Prediction of the clinical phenotype of Fabry disease based on protein sequential and structural information. *J Hum Genet* 55 : 175-178, 2010
- 3) Togawa T, Kodama T, Suzuki T, et al. Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol Genet Metab* 100 : 257-261, 2010

### 2. 学会発表

- 1) 櫻庭均. 分子設計による新規ファブリー酵素補充療法の開発. 日本薬学会第130年会, シンポジウム. 岡山, 2010.3

- 2) 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 千葉靖典, 菅原佳奈子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭均. 基質アナログによる変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの安定化とそのファブリー病酵素増強療法への応用. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010.3
- 3) 菅原佳奈子, 川島育夫, 田島陽一, 月村考宏, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 渡邊徹, 千葉靖典, 地神芳文, 櫻庭均. 酵母で生産した新規高機能酵素によるファブリー病酵素補充療法の開発. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010.3
- 4) 櫻庭均. ファブリー病疑い例から確定診断に至るプロセスに関して. 第 109 回日本皮膚学会総会. 大阪, 2010.4
- 5) 櫻庭均. ファブリー病の基礎と臨床—診断と治療のための小知識—. 第 51 回日本神経学会総会, ランチョンセミナー. 東京, 2010.5
- 6) 菅原佳奈子, 櫻庭均. 酵母で生産した新規酵素のファブリー病モデルマウス末梢神経および腎臓に対する効果の検討. 第 52 回小児神経学会総会. 福岡, 2010.5
- 7) 櫻庭均. ファブリー病を知り、診断と治療に生かすために. 第 53 回日本腎臓学会学術総会. イブニングセミナー. 神戸, 2010.6
- 8) 櫻庭均. ファブリー病の診断と治療へのアプローチ. 第 34 回日本小児皮膚科学会学術大会, ランチョンセミナー. 松山, 2010.7
- 9) 櫻庭均. ファブリー病診断と治療のためのロードマップ. 仙台 Fabry 病研究会. 仙台, 2010.10
- 10) Sakuraba H. Biomarkers. 11th European Round Table on Fabry Disease, Istanbul, Turkey, 2010.10
- 11) 櫻庭均. ファブリー病の ABC. 診断と治療のために. 金沢ファブリー病研究会. 金沢, 2010.10
- 12) 月村考宏, 千葉靖典, 川島育夫, 渡邊徹, 児玉敬, 福重智子, 金蔵拓郎, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭均. メタノール資化性酵母で生産した組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼのファブリー病マウスに対する効果. 第 52 回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010.10
- 13) 児玉敬, 兎川忠靖, 川島育夫, 月村考宏, 鈴木俊宏, 福重智子, 金蔵拓郎, 櫻庭均. 臓器組織の Lyso-Gb3 はファブリー病の酵素補充療法における治療のバイオマーカーになり得る. 第 52 回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010.10
- 14) 川島育夫, 月村考宏, 児玉敬, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 渡邊徹, 千葉靖典, 福重智子, 金蔵拓郎, 田島陽一, 芝崎太, 櫻庭均. メタノール資化性酵母により産生した組換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A はファブリー病モデルマウスに蓄積する基質を分解する. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 2010.12
- 15) 兎川忠靖, 月村考宏, 川島育夫, 田中利絵, 児玉敬, 鈴木俊宏, 櫻庭均. ファブリー病のハイリスク・スクリーニング診断システムの構築. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸 2010.12
- 16) 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 千葉靖典, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭均. 酵素増強療法が有効な変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼと基質アナログの分子間相互作用解析. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 2010.12
- 17) 児玉敬, 兎川忠靖, 川島育夫, 月村考宏, 鈴木俊宏, 福重智子, 金蔵拓郎, 櫻庭均. ファブリー病治療のためのバイオマーカーとしての臓器組織中 Lyso-Gb3. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸, 2010.12
- 18) 櫻庭均, 齋藤静司, 大野一樹, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 月村考宏. ファブリー病データベースの構築. 第 15 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2010.12
- 19) 櫻庭均. ファブリー病の診断から治療へ. 多摩ファブリー病研究会, 東京, 2010.12

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 当院における酵素補充療法の問題点

分担研究者：高柳 正樹(千葉県こども病院医療局長)

### 研究要旨

当院においてゴーシェ病5例、ハーラー病1例、ハンター病3例、ファブリー病1例の計10症例で酵素補充療法を行った。

酵素補充療法は定期的な(1回/週または1回/2週病院への来院が必要である。このため酵素補充のコンプライアンスを保つことが難しい症例がある。また何らかの工夫を加えることでコンプライアンスを保つことに成功している症例もある。

ゴーシェ病Ⅱ型1名、Ⅲ型1名は現在在宅人工呼吸器治療中である。患者のQOLをあげるためには、各種の社会的医療資源を利用した、総合的な医療、療育が必要である。

死亡症例に関しては疾患の進行によって死亡したと考えられる症例もあったが、死亡の原因が詳細にはわからない症例もあった。今後のさらなる検討が「必要であると考えられる。

### A. 研究目的

当院においてこれまでに施行したライソゾーム病に対する酵素補充療法は、各種疾患合計10症例である。これら症例に行った酵素補充療法における問題点を検討して報告する。

### B. 研究方法

症例はゴーシェ病5例、ハーラー病1例、ハンター病3例、ファブリー病1例の計10症例である。それぞれの症例の酵素補充療法の開始年齢と開始年、および投与期間をまとめて図に表した。使用した製剤は、ゴーシェ病に対してはセラダゼ®1例、セラザイム®5例、アウドラザイム®1例、エラプレース®3例、リプラガル®1例である。

(倫理面への配慮)

個人が特定されなように配慮した。

### C. 研究結果

酵素補充療法は定期的な(1回/週または1回/2

週)病院への来院が必要である。このため酵素補充のコンプライアンスを保つことが難しい症例がある。また何らかの工夫を加えることでコンプライアンスを保つことに成功している症例もある。

1. ファブリー病 28歳。現在定職がなくいわゆるニートである。腎型ファブリー病であり病識がほとんどないことから、定期的な受診困難であった。
2. ハーラー病 13歳。施設入所中であり、通院は施設の職員の付き添いが必須である。このため週1回の通院には多くの困難がある
3. ゴーシェ病3型 重症な中枢神経障害から在宅人工呼吸器療法を受けている。このため患者を連れて当院へ通院するのは大きな困難が生じている。月2回の酵素補充のうち1回は自宅近くのかかりつけ医で受けている

ゴーシェ病Ⅱ型1名、Ⅲ型1名は現在在宅人工呼吸器治療中である。神経型のゴーシェ病は現在の酵素補充療法のみでは、その効果が不十分である。

患者の QOL をあげるためには、各種の社会的医療資源を利用した、総合的な医療、療育が必要である。

酵素補充療法中に死亡した症例が 3 例あった。いかに経過を記載する。

- ① 酵素補充療法開始後2ヵ月後の22歳2ヶ月時に、気管切開カニューレによる肉芽からの出血で入院となる。入院後出血などなく経過していたが、14日後突然に心停止となった。カニューレからは血液、吐物など引けなかった。緊急蘇生行おうも反応なく死亡した。かなり以前よりゼロゼロなど強く、呼吸器症状は慢性的に存在していた。剖検は行われていない。最終酵素補充療法から3日後であった。
- ② 治療開始後13ヵ月後に、感冒症状(腹痛、嘔吐、呼吸苦)発症後、原因不明の多臓器不全で死亡した。肝のネクロプシーを行ったが、病因は明確にはならなかった。ライソゾーム病患者におけるサイトカインなどの動態の検討が必要であると考えられた。最終の酵素補充から少なくとも3日以上経過していた。
- ③ 治療開始後9年11ヵ月後、自宅にて突然に死亡しているところを発見された。自宅での死亡であったので、レントゲン検査、血液検査など行われていない。いくつかの臓器のネクロプシーでは異常所見を得られなかった。最終酵素補充から12日経過していた。

#### D. 考 察

酵素補充療法はライソゾーム病の治療法としては、いまだ多くの問題点を抱えている。コンプライアンスに関しては、血友病をはじめとして多くの疾患において行われている在宅治療の可能性を検討する必要があると思われる。

死亡症例に関しては疾患の進行によって死亡したと考えられる症例もあったが、死亡の原因が詳細にはわからない症例もあった。今後のさらなる検討が「必要であると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 【文献】

- 1) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, et al. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency : the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med.* 221(3) : 191-5, 2010
- 2) Fukao T, Horikawa R, Naiki Y, et al. A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Mol Genet Metab.* 100(4) : 339-44, 2010.8. Epub 2010.3.19
- 3) Kimura A, Kage M, Nagata I, et al. Histological findings in the livers of patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Hepatol Res.* 40(3) : 295-303, 2010.3.1. Epub 2010.1.11
- 4) Fukao T, Ishii T, Amano N, et al. A neonatal-onset succinyl-CoA : 3-ketoacid CoA transferase (SCOT)-deficient patient with T435N and c.658-666dupAACGTGATT p.N220\_I222dup mutations in the OXCT1 gene. *J Inherit Metab Dis.* 2010.1.21. [Epub ahead of print]

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

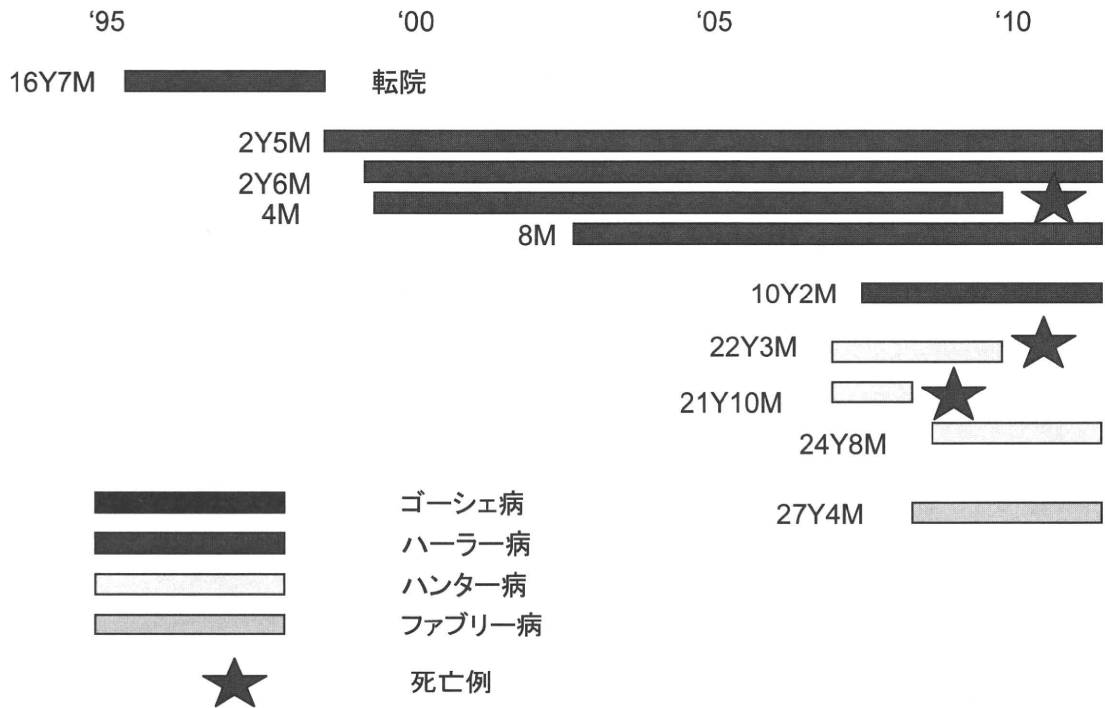
##### 2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 酵素補充療法を受けた各症例の経過について



## 骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後に関する研究

分担研究者：芳野 信(久留米大学教授)

### 研究要旨

I-cell 病患者に 1 歳 2 ヶ月時、同種骨髄移植を行った。移植後、GlcNAc-1-phosphotransferase 活性(最大 2.28 倍)、 $\alpha$ -mannosidase、 $\beta$ -hexosaminidase 活性(最大 4.8 倍、2.8 倍)まで上昇し、10 歳頃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た。I-cell 病患者に対する骨髄移植は一定の生化学的改善をもたらし、臨床症状の進行緩和効果がある可能性がある。

### 研究協力者

渡邊 順子(久留米大学小児科、講師)

大平 智子(久留米大学小児科、助教)

岡田純一郎(久留米大学小児科、助教)

加藤 俊一(東海大学基盤診療学系再生医療科学、教授)

矢部 普正(東海大学基盤診療学系再生医療科学、准教授)

酒井 規夫(大阪大学小児科、講師)

大友 孝信(大阪大学小児科、大学院生)

をドナーとして同種骨髄移植(BMT)を施行した。その後、1 歳 7 ヶ月より寝返り、3 歳頃から独座可能となり、養護学級で他児と学習活動ができる時期もあったが、11 歳頃より徐々に独座ができなくなり、寝たきり状態となった。同時期より呼吸器感染、尿路感染を繰り返すようになり、12 歳時から間欠的導尿、浣腸を必要とした。また気道・肺病変および心弁膜症のため、11 歳から在宅酸素療法、心不全に対する薬物療法を必要とするようになった。14 歳 4 ヶ月時呼吸不全のため約 1 年間入院、睡眠時無呼吸の増悪もあり BIPAP による補助呼吸を導入した。その後も時折呼吸器感染にて入退院を繰り返し、20 歳 1 カ月時に肺炎、ARDS により死亡した。

### A. 研究目的

ムコリピドーシス II 型(I-cell 病)は現在、有効な根治治療法はない。骨髄移植が試みられた例はあるがその長期的治療効果は不明である。我々は 1 歳時に骨髄移植を施行し、その後約 20 年間にわたり経過観察し得た I-cell 病症例を経験したので経過を分析し、その治療的効果につき考察する。

### B. 症例の概要

当院初診時 8 ヶ月。在胎 38 週 3 日、体重 2278g、身長 46cm で特に合併症なく出生。4 ヶ月時に定頭可能となったが、その後発達の獲得を認めず。8 ヶ月時当院受診。血清中ライソゾーム酵素 4 種類の活性上昇および臨床症状、検査所見、家族歴(長姉が I-cell 病にて 2 歳 11 か月で死亡)から I-cell 病と診断。1 歳 2 ヶ月時に健常同胞(次姉)

### C. 研究結果

末梢血リンパ球 GlcNAc-1-phosphotransferase(GNPT)活性(北海道大学・賀佐伸省先生測定)は移植直後 33 週間の観察期間中、前値に比べ最大 2.28 倍まで上昇した。また、末梢血リンパ球中の  $\alpha$ -mannosidase、 $\beta$ -hexosaminidase 活性(岐阜大学・祐川和子先生測定)は移植直後 6 週間の観察期間中、それぞれ前値に比べ最大 4.8 倍、2.8 倍まで上昇したが血清中の活性は異常高値に留まり低下傾向は認めなかった。なお、遺伝子

(GNPTAB)解析(大阪大学・大友孝信先生、酒井規夫先生測定)では2種の変異(p.Q104X/p.R1189X)を認めた。

#### D. 考察

I-cell 病においていまだ有効な治療法は確立していない。BMT 施行例は少なくまた観察期間も短く、その治療的効果の評価は困難である。本症例ではBMTは本症の臨床経過そのものを変えることは不可能であったが、観察し得た期間内では生化学的には一定の改善が認められた。また臨床経過についても遺伝子型、環境要因とも同じ同胞例と比較しても症状の進行は緩徐であった。以上からBMTが経過を修飾した可能性はある。また10歳頃までは遅れてはいたものの精神・運動機能の発達が認められたが、その後退行した。この退行に拒絶が関与していたかどうかを現在検討中である。

#### E. 結論

I-cell 病患者に対する骨髄移植は一定の生化学的改善をもたらし、臨床症状の進行緩和効果がある可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 渡邊順子, 大平智子, 加藤俊一, 矢部普正, 酒井規夫, 大友孝信, 芳野信. 骨髄移植を受けたI-cell 病患者の長期予後. 第15回日本ライソゾーム病研究会 2010.12.10-11, 東京
- 2) 芳野信, 渡邊順子, 大平智子, 岡田純一郎. ライソゾーム蓄積病の病態におけるサイトカインなど生体活性物質の役割. 第15回日本ライソゾーム病研究会 2010.12.10-11, 東京
- 3) 芳野信, 大平智子, 渡邊順子, 加藤俊一, 矢部普正, 酒井規夫, 大友孝信. 骨髄移植を受けたI-cell 病患者の長期予後. 平成22年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2010.12.9, 東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## GM1 ガングリオシドーシスの臨床的特徴

分担研究者：辻 省次(東京大学医学部附属病院 神経内科)

### 研究要旨

GM1 gangliosidosis type 3 の神経症候学を含む臨床的特徴を検討した。本邦の症例で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。

研究協力者

間野 達雄(東京大学 神経内科)

### A. 研究目的

GM1 gangliosidosis type 3(成人型とも呼ばれる)は3歳以降に発症し、比較的軽度な骨格異常とジストニアを中心とした神経症状を呈するとされる。GM1 gangliosidosis type 3 は症例が少なく、特に神経症候学に関して詳細な臨床的特徴を検討した報告は少ない。自験例と併せて本邦からの報告症例について、神経症候学を含む臨床的特徴を検討した。

### B. 研究方法

当院での自験例3症例、および本邦からの報告30症例について臨床的特徴を検討した。診断は主として $\beta$ -galactosidaseの酵素活性の低下により診断されており、10症例については遺伝子検査も行われている。

(倫理面への配慮)

患者より研究協力の同意を得た

### C. 研究結果

発症年齢は3歳~30歳(平均11.1歳)、神経所見としては全身性のジストニアが97%でみられており、特に顔面領域に強いジストニアが80%において、発話障害が83%において認められている。

知能低下については13%で認められた。骨格異常は76%でみとめられたものの、ガーゴイル様顔貌は6%とまれであり、cherry-red spots、心疾患、肝脾腫合併はみられなかった。 $\beta$ -galactosidase 遺伝子の変異については、遺伝子変異が検討されている10症例のうちで9症例がI51T/I51T変異、1症例はI51T/R457Qであった。

### D. 考察

GM1 gangliosidosis type 3 の臨床的特徴については、海外からの総説もあるが、今回まとめた本邦からの報告と相違点がある。神経症状については、顔面を中心としたジストニア、発話障害、歩行障害といった症候は本邦からの報告では広く共通してみられるのに対し、海外の総説では半分に満たないと報告されている。ガーゴイル様顔貌、心疾患については、本邦ではほとんどみられないのに対し、海外では約1/4の症例でみられると報告されている。これら相違点の背景として、日本人の背景が比較的均一であること、酵素活性のみならず遺伝子変異の報告もされており、酵素活性で診断し発症年齢からのみ分類した海外での報告と比較して、均一な症例が集積されている可能性が考えられる。GM1 gangliosidosis type 3 は本邦からの報告が多く、症例の蓄積により正確な臨床的な知見の集積が期待され、今後の治療法開発を考えていく上で重要であると考えられる。

## E. 結 論

今回の検討から、日本における本疾患の臨床的特徴は比較的均一であり、顔面領域に強いジストニアが主要な神経徴候であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

特記事項なし

### 2. 学会発表

- 1) 間野達雄, 松田俊一, 山本知孝, 清水純, 辻省次. 骨格異常を伴い10歳代より緩徐に進行するジストニアを呈する G<sub>M1</sub> gangliosidosis type 3 の32歳男性例. 第194回日本神経学会

関東・甲信越地方会. 東京, 2010.9

- 2) 間野達雄, 辻省次. G<sub>M1</sub> gangliosidosis type 3 の臨床的特徴の検討. 第15回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2010.12

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特記事項なし

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他

特記事項なし

## 日本人ムコリピドーシスⅡ/Ⅲの病態解析

分担研究者：酒井 規夫(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座)

### 研究要旨

リソソーム病の一つであり、著明な骨病変、心弁膜症、神経症状を来すムコリピドーシスの培養皮膚線維芽細胞を用いて、この疾患の特徴である **Inclusion body** がなにかを調べ、細胞における病態解明を行なった。今年度は本疾患におけるライソゾーム酵素や基質の細胞内での運搬の 패턴について解析し、エンドサイトーシスもしくは細胞内輸送障害が疑われる結果が得られ、病態における重要性がうかがわれた。

### A. 研究目的

ムコリピドーシスⅡ/Ⅲ(MLⅡ/Ⅲ)の患者の培養皮膚線維芽細胞においてライソゾーム酵素の運搬に重要な M6PR や基質アナログの運搬状況を解析し、膜における細胞内の運搬障害について解明することを目的とする。

### B. 研究方法

- 1) M6PR の搬送 ; MLⅡ/Ⅲの培養皮膚線維芽細胞を用いて、ライソゾーム酵素のレセプター M6PR がどのように細胞内で搬送されるかを調べた。M6PR の抗体を用いて、培養液中に蛍光ラベルの抗体を負荷することにより、結合した M6PR が細胞内をどのように移動するかを正常細胞と比較して検討した。
- 2) 膜上のセラミドの搬送;培養皮膚線維芽細胞に蛍光ラベルしたセラミドを負荷し、エンドサイトーシスで取り込まれたあとに、どこに搬送されるかを、正常細胞と比較した。

### C. 研究結果

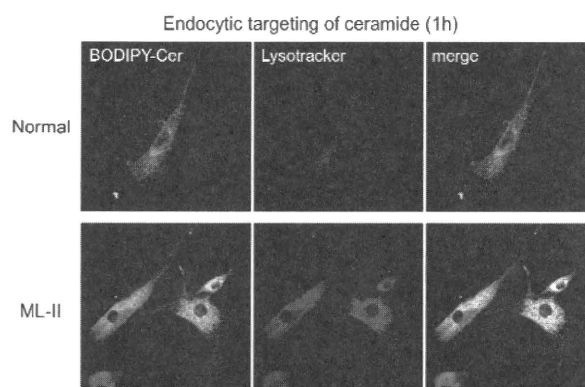
#### 1) M6PR の搬送

M6PR 抗体を処理して2時間経過して観察すると、正常では細胞内の小胞に分布しているが、ML

Ⅱ細胞では小胞以外にゴルジ領域に停滞していることが観察された。

#### 2) 膜上のセラミドの搬送

BODIPY-FL C5ceramide を培養皮膚線維芽細胞に負荷1時間後に観察すると、正常では大半が分解され一部がゴルジ領域に観察されるのに対し、MLⅡ細胞では取り込まれたセラミドは多くは小胞に分布しており、取り込み後の搬送、分解が停滞していることがうかがわれた。



### D. 考 察

ムコリピドーシスはライソゾーム疾患の中においても、ライソゾーム酵素の多くが合成はされるがライソゾームへの M6PR による搬送障害から、多くの酵素欠乏状態を来す疾患として特徴的であり、その病態解明は治療をめざす上で必須の情報

である。今回我々は酵素運搬のキャリアである M6PR の細胞内での搬送が正常と比較することにより、正常ではゴルジ、小胞体、小胞、ライソゾーム、細胞膜の間でサイクルすると考えられているが、MLII 細胞ではゴルジ領域に停滞することから、ゴルジ以降の搬送が停滞していると考えられた。また細胞膜から取り込まれたセラミドは、正常では小胞、小胞体、ゴルジと流れるが、MLII 細胞では小胞に多く留まっており、ゴルジに至っていないものが多いと考えられた。合わせて、ライソゾームの膜にあり、小胞体、ゴルジ、細胞膜と移動すると考えられている M6PR や脂質の流れが本疾患で滞っていることが示され、基質がライソゾームに蓄積するのみならず、膜上の蛋白、脂質の流れも障害されていることが判明した。

## E. 結論

我々は昨年までの本研究班の研究において、ムコリポドーシスの遺伝子解析、オートファジーの機能異常、ミトコンドリアの機能異常などを解析し報告して来た。今年度の研究により、本疾患の病態において、ライソゾーム酵素の M6P 負荷異常によるライソゾーム酵素の欠乏だけではなく、このことから細胞内におけるライソゾームを中心とした膜上の蛋白、脂質の搬送、局在に異常を来していることが明らかとなった。今後はこれが疾患の重症度などどのように関係するかなど、病態における意義について解明してゆく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Kotobuki Y, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Yutsudo M, Ozono K, Katayama I., Cutaneous symptoms in a patient with cardiodiagnostic syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts., *Br J Dermatol.* 163(4) : 881-4, 2010.10
- 2) Kobayashi H, Takahashi-Fujigasaki J,

Fukuda T, Sakurai K, Shimada Y, Nomura K, Ariga M, Ohashi T, Eto Y, Otomo T, Sakai N, Ida H., Pathology of the first autopsy case diagnosed as mucopolysaccharidosis type III  $\alpha/\beta$  suggesting autophagic dysfunction., *Mol Genet Metab.* 2010.11.2. [Epub ahead of print]

- 3) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R., Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy : The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening., *Mol Genet Metab.* 2010.12.14. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

- 1) 田中あけみ, 酒井規夫, 奥山虎之, 鈴木康之, 澤田智, 大橋十也, 大浦敏博, 麦島秀雄, 田中藤樹, 大友孝信. ムコ多糖症 II 型における造血幹細胞移植の中樞神経系への効果について (多施設共同研究)., 第 52 回日本小児神経学会総会, 横浜, 2010.5
- 2) 大友孝信, 檜垣克美, 難波栄二, 大菌恵一, 酒井規夫. ムコリポドーシス II 型の皮膚線維芽細胞ではライソゾームの成熟異常と pH 上昇を来している. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 3) 赤木幹弘, 豊島光雄, 山村なつみ, 鈴木保宏, Hossain Arif, 濱田悠介, 大友孝信, 酒井規夫, 大菌恵一. 日本人 PKAN 症例の遺伝子解析, 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 4) 長谷川泰浩, 池田佳世, 橘真紀子, 山田寛之, 清原由起, 近藤宏樹, 三善陽子, 酒井規夫, 大菌恵一. 小児期発症 Wilson 病 13 例における酢酸亜鉛製剤の有用性について. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10