

- 5) ホセイン モハンマト アリフ, 大友孝信, 濱田悠介, 赤木幹弘, 大藪恵一, 酒井規夫. Distribution of the Clinical Phenotype of Krabbe Disease in Japan. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 6) 濱田悠介, 大友孝信, 酒井規夫, 田中雅嗣, 大藪恵一. ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対するピルビン酸療法開始前後での呼気ガス試験による評価. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 7) 酒井規夫, シンポジウム 2; 先天性代謝異常症マス・スクリーニングのこれから. マス・スクリーニングにおける遺伝カウンセリング. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 8) 酒井規夫. 日本人クラッベ病の表現型の分布と新生児マススクリーニングを含めた診断/治療ガイドライン. 第 15 回日本ライソゾーム病研究会 2010.12
- 9) 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

## 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

分担研究者：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)

### 研究要旨

ニーマンピック病 A/B 型および C 型はライソゾームにおける水解酵素あるいは膜蛋白の異常でスフィンゴミエリンあるいはコレステロールがエンドゾームに蓄積し、肝脾腫、肺機能異常、多彩な神経症状などを示す稀な遺伝性疾患である。脂質の蓄積する病態を明らかにすることは今後登場する酵素補充療法への理解や新たな薬物療法の開発などに関連し重要である。本研究では培養細胞を用いて酸性スフィンゴミエリナーゼ(Acid sphingomyelinase : ASM) 酵素誘導薬のエンドゾームにおける脂質輸送調節と脂質蓄積に関して調べ、ASM 活性調節が細胞内コレステロール輸送調節に関与している新たな可能性を示した。

### A. 研究目的

ニーマンピック病 A/B 型は、ライソゾーム酸性スフィンゴミエリナーゼ(Acid sphingomyelinase : ASM) 異常によりライソゾームにスフィンゴミエリンが蓄積し、二次的にコレステロールが蓄積する。一方、ニーマンピック病 C 型は細胞内コレステロール輸送に関与する NPC1 あるいは NPC2 の異常によりライソゾーム・後期エンドゾームに遊離コレステロールが蓄積し、二次的にスフィンゴミエリンが蓄積する。コレステロールとスフィンゴミエリンは細胞内で親和性が強く、局在に関して互いに強く影響し合うとされている。

ニーマンピック病 C 型細胞に関して ASM 活性の二次的低下が観察されていたが、NPC1 あるいは NPC2 異常の有無に関わらずに細胞内コレステロール蓄積に伴い ASM の二次的な質的変化が生じ酵素活性が低下する事が示された(Reagan JW, et al. *J Biol Chem*, 275,38104-110, 2000)。本研究ではニーマンピック病 C 型細胞内脂質蓄積に伴う ASM 活性低下に対して ASM 酵素誘導剤(酪酸 butyrate)の二次的 ASM 酵素活性低下への影響およびコレステロール蓄積に関して解析した。

### B. 研究方法

血清含通常培地を用いて培養した正常培養リンパ芽球に対して酪酸(butyrate)を添加(0mM, 1mM, 5mM, 10mM)し、各細胞の ASM 活性を測定した。ニーマンピック病細胞 C 型培養リンパ芽球に関して酪酸添加(0mM, 10mM)し、各細胞の ASM 活性を測定した。ニーマンピック病 C 型脂肪に関しては、酪酸(butyrate)の有無により細胞内の総コレステロールおよび遊離コレステロールの含量をコレステロール・オキシダーゼ法で測定し比較検討した。

### C. 研究結果

正常リンパ球 ASM 活性 :  $15.1 \pm 0.6$  (0mM) nmol/mg/h,  $19.9 \pm 0.7$  (1mM) nmol/mg/h,  $32.3 \pm 3.2$  (5mM),  $34.3 \pm 2.8$  nmol/mg/h (10mM)。ニーマンピック病細胞 C 型培養リンパ球 ASM 活性 :  $5.2 \pm 0.1$  nmol/mg/h (0mM) 、  $21.9 \pm 2.1$  nmol/mg/h (10mM)。酪酸(butyrate)投与前後のニーマンピック病 C 型細胞のコレステロール含量は、酪酸投与(-) : 総コレステロール  $0.092 \pm 0.011$   $\mu$ g/mg、遊離コレステロール  $0.088 \pm 0.017$

$\mu\text{g}/\text{mg}$ 、酪酸投与(+): 総コレステロール  $0.095 \pm 0.013 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、遊離コレステロール  $0.081 \pm 0.006 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、と酪酸投与で遊離コレステロール減少傾向を認めたが、統計学的な有意差を認めなかった( $p=0.28$ )。

#### D. 考 察

正常培養リンパ球に対する酪酸 (butyrate) の ASM 活性上昇作用が確認された。また、ニーマンピック病細胞 C 型培養リンパ球では、正常リンパ球 ( $15.1 \pm 0.6 \text{ nmol}/\text{mg}/\text{h}$ ) に比較し ASM 活性の二次的低下 ( $5.2 \pm 0.1 \text{ nmol}/\text{mg}/\text{h}$ ) を確認し、酪酸添加での ASM 活性上昇作用 ( $21.9 \pm 2.1 \text{ nmol}/\text{mg}/\text{h}$ ) を確認した。二次的 ASM 活性低下が細胞内脂質輸送に影響を与えるとの報告もあり、細胞内コレステロール/スフィンゴリエリンの測定を行う事で細胞内脂質蓄積への酪酸の影響をより明解にできる。しかし、今回の培養リンパ球では酪酸投与の有無による遊離コレステロール含量の有意な差を認めず今後のさらなる検討を必要とした。酪酸 (butyrate) は腸管内に存在し腸管上皮細胞で MCT トランスポーターにより門脈系へ吸収され後、肝にて代謝されエネルギーとなる。

しかし、末梢血中には存在せず、ニーマンピック病の病態を考えると肝細胞内脂質蓄積への関わりが予想される。

#### E. 結 論

ニーマンピック病 C 型にて蓄積する遊離コレステロールに関してライソゾーム水解酵素である ASM が、エンドゾーム内の輸送調節をしている可能性を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miura S, Ishida NW, Ishida A, Kawamura M, Ohmura A, Oguma R, Sato Y, Takahashi T. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia *Brain Dev*, 31 : 307-317, 2009

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 分担研究報告書

## Ⅲ. 新規治療法開発

## 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

異染性白質ジストロフィー(MLD)に対する遺伝子治療法の可能性を検討している。通常の酵素補充療法は、脳血液関門(BBB)のため神経症状の改善には効果がない。BBBを非侵襲的に通過する方法として、BBBの幼若性が期待できる新生児期マウスへのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの全身投与を行った。生後1日以内の新生児マウスの経静脈にAAVベクターを投与したところ、広範囲の脳神経組織への遺伝子導入が確認された。AAVのサブタイプでは9型が最も高い導入効率を示した。6週齢のマウスに対するAAVベクターの全身投与では脳組織への遺伝子導入は認められなかった。新生児投与後の脳での遺伝子発現は少なくとも18ヶ月以上安定であった。これらの結果はAAVベクターを使った新生児遺伝子治療により広範囲な神経変性を伴う遺伝性神経疾患の治療が可能であることを示唆している。

### 研究協力者

三宅 弘一(日本医科大学・准教授)

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Arylsulfatase A(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。様々な神経症状を呈するが、最も頻度が高い乳児型では生後数年以内に除脳硬直状態となり死亡する。早期の骨髄移植が唯一の治療法とされているが、症状の出現を遅らせる効果しか報告されていない。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、イタリアでレンチウイルスベクターで遺伝子導入した骨髄細胞の移植が開始されたが、その有効性と安全性は明らかになっていない。

これまでの研究で、AAVタイプ1ベクターを直接脳内投与することでASAノックアウトマウス(MLDマウス)のスルファチドの減少や運動機能の回復を認めている。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。BBBを越えて脳組織を非侵襲的に治療する方法としてウイルスベクターの髄腔内投与と、BBBの幼若性が期待できる新生児期のベクターの全身投与を検討している。この実験では後者の可能性を検討した。

### B. 研究方法

GFP遺伝子を組み込んだサブタイプ1, 8, 9, 10型のAAVベクターを作製した。組換えベクターはベクタープラスミド、パッケージプラスミド、ヘルパープラスミドのトリプルトランフェクション法により作製し、Iodixanolの密度勾配遠心により精製した。

C57BL6新生児マウス(1日齢)の経静脈から

AAV ベクターを投与し、全身臓器及び中枢神経組織での遺伝子導入を PCR および組織学的検索により解析した。

(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

新生児期にベクターを投与したマウスの脳組織を4週令で解析したところ、広範囲な遺伝子導入を認めた。特に嗅球、大脳皮質、視床下部、脳幹部、脊髄で強く発現していた。脳表面での遺伝子発現と共に深部での遺伝子発現も認められた。サブタイプでは9型による遺伝子導入が最も高率であった。脳組織での遺伝子発現は少なくとも18ヶ月まで認められた。6週齢マウスに同様に AAV ベクターを静脈注射した実験では脳内での遺伝子発現は確認できなかった。

免疫組織学的解析結果から遺伝子導入された細胞はほとんど NeuN 陽性の神経細胞であったが、一部に GFAP 陽性のアストロサイトも認められた。

脊髄では後索の上向性線維に強い遺伝子発現が認められ後根神経節への遺伝子導入が考えられた。又、ChAT 陽性運動ニューロンへの遺伝子導入も確認された。

### D. 考察

この実験により成体マウスと異なり、新生児期の BBB は AAV ベクターが通過できることが明らかになった。特に9型 AAV ベクターにより広範囲な脳組織への遺伝子導入が可能であった。

脊髄を含む中枢神経系組織での遺伝子発現パターンから、ベクターの血中から脳組織への進入経路としては①脳内血管の BBB 経由に直接脳組織に入る経路と、②血液髄液関門経由に脳室内に入り、髄液を介して導入する経路が考えられた。

AAV ベクターがどのようなメカニズムで BBB を通過するかは分かっていない。可能性としては

①BBB が構造的に未熟でベクターの通過をブロックできない。②投与したベクター溶液の量が多いため、脳血管が機械的損傷を受けベクターが漏れた。③AAV ベクターの受容体が新生児期に特異的発現している。などが考えられる。機構の解明には今後の研究が必要である。

新生児期にベクターを全身投与すれば中枢神経組織に広範囲に遺伝子導入することが可能である。多くの遺伝性神経変性疾患は出生直後は症状がなく乳幼児期に診断されることが多い。従って、遺伝病の発端者に新生児治療を行う可能性は少ない。しかし、同胞に対しては出生前或いは出生直後の遺伝子診断後の重要な治療法の選択肢になることが期待される。

### E. 結論

AAV ベクターを新生児期マウスに全身投与すると広範囲な中枢神経系組織に遺伝子を導入することが可能であった。新生児遺伝子治療は重篤な遺伝性神経変性疾患に対する治療法の重要な選択肢になると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T. Successful treatment of metachromatic leukodystrophy using bone marrow transplantation of HoxB4 overexpressing cells. *Mol. Ther.* 18 : 1373-1378, 2010
- 2) Igarashi T, Miyake K, Masuda I, Takahashi H, Shimada T. Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. *Hum. Gene Ther.* 21 : 631-637, 2010
- 3) Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. A lentiviral strategy for highly efficient

retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. Hum. Gene Ther. 2010, In press

- 4) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In Vivo Application of an RNAi Strategy for the Selective Suppression of a Mutant Allele. Hum. Gene Ther. 22 : 27-34, 2011

## 2. 学会発表

- 1) Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto M, Shimada T. Long term correction of biochemical and neurological abnormalities of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Washington, DC, 2010.5
- 2) Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Okabe M, Yamamoto M, Shimada T. Global gene transfer in the CNS and phenotypic correction of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9 AAV vector. European Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden, 2010. 2010.6
- 3) Sugano H, Miyake N, Endo A, Miyake K, Shimada T. Systemic injection of AAV type 9 in utero facilitates global gene expression

in the CNS. 18th European Society of Gene and Cell Therapy Annual Congress, Milano, Italy, 2010.10

- 4) Sugano H, Miyake N, Endo A, Miyake K, Shimada T. Systemic injection of AAV type 9 in utero facilitates global gene expression in the CNS. International workshop of lysosomal storage disease, Prague, Czech, 2010.12
- 5) Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Okabe M, Yamamoto M, Shimada T. Widespread transduction in the CNS and phenotypic correction of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9 AAV vector. The 16th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tochigi, 2010.7
- 6) 菅野華子, 島田隆. Type 9 アデノ随伴ウイルスベクター(AAV9)を用いたマウス胎児への遺伝子導入. ライソゾーム病研究会, 東京, 2010.10

## 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

## 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

分担研究者：小林 博司(東京慈恵会医科大学講師)

### 研究要旨

ムコ多糖症Ⅶ型(MPSⅦ)、およびクラッペ病は、リソソーム性分解酵素欠損による常染色体劣性遺伝病である。我々はレンチウイルスを用いた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、更にマウス新生児静脈注射にて各臓器での酵素発現上昇、蓄積物質の改善も見られた。クラッペ病の欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスの感染実験では細胞株およびマウス新生児での肝臓での発現上昇を見、坐骨神経の病理上の改善および一定期間の有意な体重増加、寿命延長が得られた。高い効率で骨髄幹細胞へ導入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疾患の治療の臨床応用への道を探る。

研究協力者

有賀 賢典(東京慈恵会医科大学助教)

横井 貴之(東京慈恵会医科大学助教)

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 および欠損酵素の力価を計測した。

### A. 研究目的

ムコ多糖症およびクラッペ病の根本的治療のひとつとしての有効な遺伝子治療の開発

### 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週間まで臨床所見、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。

### 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 MPSⅦ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。

### C. 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。新生児モデルマウスへの遺伝子導入では 7 週での肝臓、脾臓、脳など主要臓器での酵素発現、蓄積物質の有意な低下が見られた。

#### 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

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。更に力価を 10 倍に上げることでマウス坐骨神経の病理学的な改善、一定期間(週令 3-4)の体重上昇、有意な寿命の延長が得られている。

#### D. 考 察

今回我々は MPSVII、Krabbe の二疾患に対する遺伝子治療の検討を行い、in vitro・in vivo での効果が得られた。レンチウイルスベクターのタイターの有意な上昇に伴い病理学的な改善を見た。今後長期発現、寿命延長の更なる改善に向けて検討を重ねていく。さらに ex vivo gene therapy として遺伝子導入した骨髄幹細胞および iPS 細胞を使用する方策も検討中である。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kobayashi H, Yohta S, Ikegami M, et al.

Prognostic factors for the late onset Pompe disease with enzyme replacement therapy : From our experience of 4 cases including an autopsy case. Mol. Genet. Metab. 100 : 14-19, 2010

2) Kobayashi H, Fujigasaki J, Fukuda T. et al. Pathology of the first autopsy case diagnosed as mucopolidosis type III alpha/beta suggesting autophagic dysfunction. Mol.Gnet. Metab. 102 : 170-175, 2011

##### 2. 学会発表

1) 小林博司, 飯塚佐代子, 有賀賢典, 島田洋太, 井田博幸, 衛藤義勝, 大橋十也. レンチウイルスベクターシステムを用いたクラッペ病の遺伝子治療(ポスター). 日本小児科学会, 盛岡, 2010.4

2) Kobayashi H, Ariga M, Shimada Y, Izuka S, Yokoi T, Iwamoto T. et al. Neonatal Gene Therapy for the mouse model of Krabbe Disease. Japanese Society of Gene and Cell Therapy. Utsunomiya, Tochigi, Japan. 2010.7

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療

分担研究者：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Ⅲ型(Sanfilippo 症候群)患者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。Genistein 5mg/kg をⅢ型 17 名に服用してもらい、臨床症状の変化・尿中 GAG・血中 Genistein 濃度・毛髪形態を比較検討した。その結果、これらのバイオマーカーは臨床症状や日常生活動作と緩やかな関係があることが推測されたが、明確な関係は証明できなかった。更なる症例の蓄積と、Genistein 服用量の再検討が必要であろう。

### 研究協力者

折居 忠夫(折居クリニック)

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、米国)

Wegrzyn G(グダニスク大学、ポーランド)

### A. 研究目的

ムコ多糖症は骨変形、関節拘縮、肝脾腫、聴力障害、閉塞性呼吸障害、中枢神経障害などを特徴とする一群の遺伝病であり、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があるが、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Ⅲ型(Sanfilippo 症候群)患者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。

### B. 研究方法

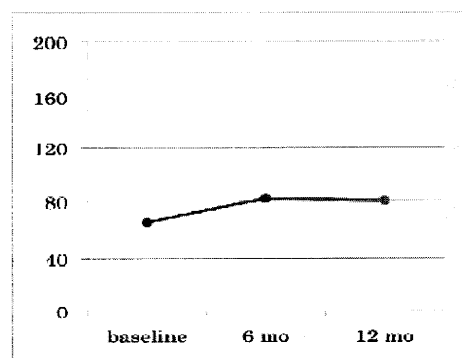
ムコ多糖症Ⅲ型 17 名に対し、イソフラボン(Genistein)5mg/kg を 1 年間投与し、身体所見、行動異常、睡眠障害、言語能力、理解力、運動能

力、日常生活動作の変化を観察し、尿中 GAG・血中 Genistein 濃度・毛髪形態との比較を試みた。

### C. 研究結果及び考察

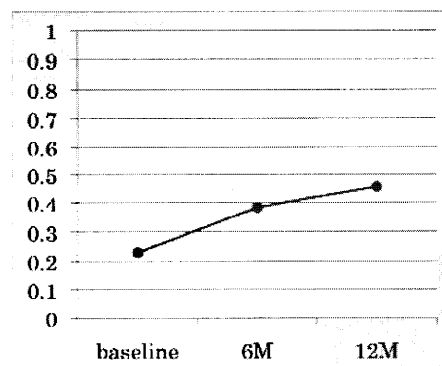
#### 1) 尿中 GAG 排泄量(mg/g creat)

4 例で GAG の減少を認めたが、6 例は増加した。



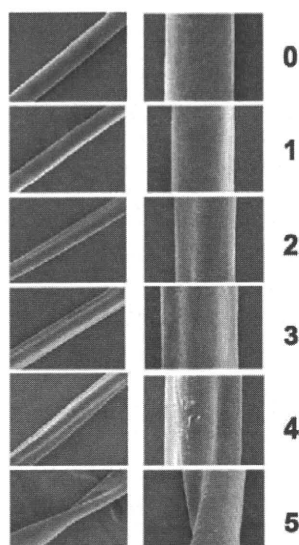
#### 2) 血中 Genistein 濃度(μg/ml)

5 例で Genistein の増加を認めた。



### 3) 毛髪形態 (FIM)

6例で改善、2例で悪化を認めた。



### 4) 臨床症状とバイオマーカーとの関係

尿中 GAG レベル、Genistein レベルは、臨床症状・ADL・毛髪形態との緩やかな相関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。

Age	4	4	6	7	8	9	9	11	12	14	16	27	27
症状	+2	0	0	+6	+1	+1	0	+8	+1	+3	0	+3	0
ADL base	40	44	57	44	43	33	63	29	20	60	22	18	18
ADL 12M	54	44	60	40	41	37	56	39	16	66	21	18	22
GAG base	11	60	54	64	86	84	74	92	100	33	88	80	50
GAG 0		118	80	50	86	141	77	85	132	23	82	192	70
GAG 78													
Genistein	0	0	0	0	0	0	0	0	1.1	1.3	0.2	0.1	0
base													
Genistein 12M	0.4	0.1	0.2	0.2	0	0.5	0.1	0	0.5	1.5	0.9	0.2	2.4
毛髪 base	0.8	0	0.3	1.7	1.2	1.8	1.1	0.8	1.1	0.4	0.6	0.2	0
毛髪 12M	1.0	1.3	1.0	0	1.2	1.7	0.7	0.5	0.3	0.2	0	0.2	0

□ 改善 ■ 不変 ■ 悪化

### D. 考 察

イソフラボン (genistein) は、ヘパラン硫酸の合成を抑制し、ムコ多糖症の症状を緩和することが期待されている。特に Sanfilippo 症候群は現時点で有効な治療法がなく、イソフラボンに対する期待は大きい。今回の検討で、Genistein は一部の患者で症状の緩和、ADL の改善、毛髪形態の改善を認めたが、一方で進行悪化する例もあり、明らかな有効性を証明できなかった。今後、症例を蓄積し、Genistein 服用量を再検討してゆきたい。

### E. 結 論

イソフラボン (Genistein) はムコ多糖症 III 型の補完・代替治療として可能性がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Tomatsu S, Montañó AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Guitiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Barrera L, Orii T. Validation of disaccharide composition derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* 99 : 124-131, 2010
- Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprased 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
- Tomatsu S, Montañó AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, de Carvalho TG, Gutierrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Sakura N, Barrera L, Kida K, Kubota M, Orii T. Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis.* 33 : 141-150, 2010
- Tomatsu S, Montañó AM, Oguma T, DunG VC, Oikawa H, Carvalho TG, Gutierrez MG, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Kida K, Kubota M, Kida K, Kubota M, Orii T. Validation of keratan sulfate level in Mucopolysaccharidosis IVA by liquid tandem mass spectrometry method. *J*

Inherit Metab Dis (Epub 2010).

## 2. 学会発表

- 1) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprase 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
- 2) Suzuki Y, Chinen Y, Tomatsu S, Tanaka A, Okuyama T, Orii T. Efficacy of Genistein on Mucopolysaccharidosis Type III and Mucopolysaccharidosis : A Preliminary Report. 1<sup>st</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases, Fukuoka, 2010.3.7-10
- 3) Tanaka T, Okuyama T, Suzuki Y, Sawada T, Tanaka T, Takakura H, Yabe K, Ohashi T, Ohura T, Suzuki N, Kato G, Adachi S, Wada M, Mugishima H, Kato S. Efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on the patients with mucopolysaccharidosis type II. 1<sup>st</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases, Fukuoka, 2010.3.7-10
- 4) 田中あけみ, 澤田智, 奥山虎之, 田中藤樹, 鈴木康之, 酒井規夫, 大橋十也, 高倉広充, 大浦敏博, 加藤俊一. ムコ多糖症Ⅱ型に対する造血幹細胞移植の効果に関する多施設共同調査研究. 第113回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 2010.4.23-25
- 5) Muenzer J, Beck M, Giugliani R, Suzuki Y, Tytki-Szymanska. Safety of idursulfase in patients aged under 6 years in the Hunter Outcome Survey. ACMG Annual Clinical Genetics Meeting, Albuquerque, 2010.3
- 6) 鈴木康之, 知念安紹, 戸松俊治. ムコ多糖症Ⅲ型に対する Genistein の効果. 第18回統合医療機能性食品国際会議, 札幌, 2010.7.24-25
- 7) 鈴木康之, 知念安紹, 田中あけみ, 澤田智, 奥山虎之, 田中藤樹, 折居忠夫, 折居恒治, 戸松俊治. ムコ多糖症Ⅲ型に対する Genistein 補充の効果. 第52回日本先天代謝異常学会, 大阪, 2010.10.21-23
- 8) Tomatsu S, Montano A, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T, Fujii T, Fukushi M. Newborn screening for MPS by using Liquid tandem mass spectrometry method. 第52回日本先天代謝異常学会, 大阪, 2010.10.21-23

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## $\beta$ -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

分担研究者：難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター教授)

### 研究要旨

$\beta$ -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、新規変異 H102D および L499Q を同定した。また皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン NOEV(N-octyl-4-epi- $\beta$ -valienamine)の酵素活性還元効果について検討を行った。

### A. 研究目的

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、培養細胞に対するケミカルシャペロンの効果の有無を判定し、変異型との相関を明らかにし、シャペロン療法の臨床応用のための基礎的結果を得ることを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシークエンス解析を行った。

#### 2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2  $\mu$ M の NOEV(N-octyl-4-epi- $\beta$ -valienamine)を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

### C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 2 検体について、遺伝子変異解析を行い、H102D/L499Q(ともに新規変異)と L162S/R590C 変異を同定した。H102D/L499Q 変異の皮膚線維芽細胞について NOEV の

シャペロン効果を検討した結果、0.2、2  $\mu$ M の NOEV によるシャペロン効果を認めなかった

### D. 考察

今回新たに 2 人の GM1-ガングリオシドーシスについて遺伝子変異を行い、新規変異 H102D と L499Q を同定した。これらの変異はともに NOEV のシャペロン効果を認めなかった。これまでの我々の解析から、NOEV は約 25% のミスセンス変異に対しシャペロン効果を示すことが明らかになっている(投稿中)。また、最近新規シャペロン化合物を同定し、解析を行っているが、今回の新規変異に対するシャペロン効果は NOEV 同様に認めなかった。今後は、このようなシャペロン効果を示さない変異を対象にした、大規模なシャペロン化合物の探索が必要と考える。

### E. 結論

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、新規変異を同定した。これらの変異は NOEV のシャペロン効果を認めなかった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E. Chemical chaperone therapy : Luciferase

assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. *Mol Genet Metab*, 101 : 354-369, 2010

- 2) Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A fluorescent sp2-imosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease : Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem*, 11 : 2453-2463, 2010

## 2. 学会発表

- 1) 難波栄二, 檜垣克美. GM1-ガングリオシドーシス脳神経細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積. 第 52 回日本小児神経学会総会, 福岡, 2010.5
- 2) 難波栄二. ケミカルシャペロン療法. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 3) 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二. ベータガラクトシダーゼに対するシャペロン活性測定のための新規細胞系の構築. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10
- 4) 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 榎原康文, 鈴木義之, 難波栄二. ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果. 第 83 回 日本生化学会大会, 神戸, 2010.12
- 5) 檜垣克美, 栞卓, 李林静, 難波栄二, 大野耕策, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández, 鈴木義之 : ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理的シャペロンの効果に関する検討. 第 15 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010.12

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当

## ライソゾーム病の新しい分子治療法開発

分担研究者：鈴木 義之(国際医療福祉大学特任教授)

### 研究要旨

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスのモデルマウスにシャペロン薬 NOEV を投与し、病理学的観察を行った。低濃度の NOEV 水溶液の投与により、神経細胞の変性、脂質蓄積の進行が抑えられた。他方、高濃度の NOEV 投与により、早期に腎障害が発現した。中枢神経系への効果と腎組織に対する毒性を考慮して、投与量を決定すべきであるという結論を得た。

研究協力者

伊藤 雅之(国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所研究員)

檜垣 克己(鳥取大学生命機能研究支援センター  
准教授)

### A. 研究目的

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスに対するシャペロン療法の神経組織、神経外組織に対する効果を病理学的に検討すること。

### B. 研究方法

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウスに、ヒト若年型変異遺伝子をトランスジーンとして挿入・作成した軽症型 G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスを用いたシャペロン投与実験を行った。シャペロン薬 NOEV(N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン)の 1mM または 10mM 水溶液を連日経口投与した。その経過中、臨床評価を行うとともに、投与前後の神経組織・神経外組織について病理学的、免疫組織化学的に観察し、半定量的に評価した。

(倫理面への配慮)

国際医療福祉大学の動物実験委員会の承認を受

けた。

### C. 研究結果(表 1)

非治療マウスでは、月齢とともに神経細胞の G<sub>M1</sub> 蓄積が増加し、変性脱落が進行した。これに対し NOEV を投与したマウスでは 2-7 か月間後まで、脳組織の変性・基質蓄積が進行しなかった。神経外組織では肝臓と胸腺に加齢に伴う変性萎縮が見られた。

1mM の NOEV 水溶液を投与したマウスでは脳の病的所見は進行せず、治療効果が確認された。神経外組織の加齢変化は NOEV 治療により修飾されることがなかった。

生後 2 か月から NOEV を投与し、生後 4 か月で解剖・検査したマウスでは、腎尿細管に著しい変性が見られた。肝、胸腺の変化は非治療マウス、低濃度シャペロン治療マウスと違いがなかった。

### D. 考察

この形態的検索により、シャペロン薬 NOEV の中枢神経組織に対する治療効果が確認された。治療開始が早いマウスほど、病変の進行が少なかった。非治療マウスは生後 2 か月ですでに中枢神経病変が著しく、脳障害に対する早期治療の重要性が明らかになった。

一方、高濃度の NOEV 水溶液を投与したマウスでは生後 4 か月で腎病変が認められた。1 匹だけの所見であるが、今後このシャペロン薬の腎毒性に配慮すべきと思われた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Luan Z, Li L, Ninomiya H, et al. The pharmacological chaperone effect of N-octyl-b-valienamine on human mutant acid b-glucosidases. Blood Cell Mol Dis 44 : 48 54, 2010
- 2) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, et al. The effect of N-octyl-b-valienamine on b-glucosidase activity in tissues of normal mice. Brain Dev 32 : 805-809, 2010
- 3) Jo H, Yugi K, Ogawa S, et al. Molecular basis of chemical chaperone effects of N-octyl-β-valienamine on human β-glucosidase in low/neutral pH conditions. J Proteomics Bioinform 3 : 104-112, 2010
- 4) Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, et

all. A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease : Synthesis and intracellular distribution studies. ChemBioChem 11 : 2453-2464, 2010

- 5) Li L, Higaki K, Ninomiya H, et al. Chemical chaperone therapy : Luciferase assay for screening of β-galactosidase mutations. Mol Genet Metab 101 : 364-369, 2010

2. 学会発表

- 1) Suzuki Y. Chemical chaperone therapy (Symposium), 11th International Child Neurology Congress, Cairo, 2010.5.1-7 (招待講演)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

新規出願なし。

2. 実用新案登録

なし。

表 1 NOEV 投与前後の組織内基質蓄積および細胞変性(半定量的評価)

NOEV 濃度 (月齢)	動物数 (治療期間)	脳		肝	腎	胸腺
		変性	G <sub>M1</sub> 蓄積	変性壊死	尿細管	萎縮・リンパ球減少
0 mM (2-19m)	24	3(+)->5(+)	2(+)->3(+)	1(+)->2(+)	1(+)	1(+)-3(+)
1 mM (4-14m)	9 (2-7m)	3(+)->3(+)	1/2(+)->1(+)	1(+)->2(+)	1(+)	1(+)-3(+)
10 mM (4m)	1 (2m)	3(+)		1(+)	3(+)	2(+)

## ニーマン・ピック病 C 型患者のシクロデキストリン治療

分担研究者：大野 耕策(鳥取大学・医学部・教授)

### 研究要旨

近年、N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) や Hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin などのニーマン・ピック病 C 型の新しい治療が開発されてきており、2009 年 1 月に EU で miglustat がニーマン・ピック病 C 型(NPC)の治療薬として承認された。2010 年 11 月、日本での承認を得るために治験が開始された。Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin はニーマン・ピック病 C 型モデルマウスの寿命を延長させることが報告され、アメリカで双子の女兒に投与が開始されている。我々のご家族の強い希望があり、鳥取大学倫理委員会の承認を得て、シクロデキストリンの週 2 回 2g/kg(6 か月後から 2.5g/kg)の静脈内投与を行った。

治療 3 か月、6 か月で肝臓と脾臓は CT および腹部エコーで明らかに小さくなり、脳波、視覚誘発電位、基底核 MRS での NAA/Cr の上昇があり、肝脾腫への効果に加え、中枢神経系症状に効果がある可能性が示唆された。現在、治療開始ほぼ 1 年になるが、バイタルサイン、血液生化学検査、検尿、聴力検査で有害な事象は認めていない。

### 研究協力者

戸川 雅美(鳥取大学医学部附属病院・助教)

西村 洋子(鳥取大学医学部附属病院・助教)

### A. 研究目的

ニーマン・ピック病 C 型(NPC)は後期エンドソーム/ライソゾームからの脂質輸送にかかわる小胞の膜たんぱく質である NPC1 の欠陥によって、ライソゾームにコレステロールや複合脂質が蓄積する疾患である。典型的な例は、幼児期に発病し発病後数年で寝たきりになる進行性の神経変性の症状を示す。現在まで、有効な治療法はなかった。

近年、糖脂質の合成を阻害する N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) や脂溶性の薬剤の包接剤として用いられる Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin がニーマン・ピック C 型モデルマウスの寿命を延長することが報告されている。N-butyl-deoxy-nojirimycin (miglustat) は 2001 年に経口投与で

NPC マウスの寿命を 75 日から 105 日に延長すること、2007 年には若年型患者へ 1 年間の投与で神経症状の改善が認められたことが報告された。この報告を受けて、2009 年 1 月に EU で miglustat がニーマン・ピック病 C 型の治療薬として承認された。2009 年に Hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin の静脈内投与で NPC マウスの寿命が 84 日から 120 日に延長し、Miglustat との併用で、NPC マウスの寿命を 2 倍に延長できることが報告された。この研究成果を受け、アメリカ FDA の人道的使用認可により、双子のニーマン・ピック病 C 型患者に投与が開始された。この報道に接したニーマン・ピック病 C 型患者の家族から、強い要望が出され、アメリカでの投与プロトコルに準じて、鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得て、投与を開始した。

## B. 研究方法

### 【患者】

患者は14歳の女児。生後7か月で脾腫を指摘されたが、その後は問題なく経過。4歳頃立位が不安定となり、7歳でてんかん発症、嚥下障害が出現した。8歳になって寝たきり、嚥下不能、有意語が消失した。10歳頃不随意運動が出現、胃瘻を設置した。12歳気管切開と喉頭分離術を受けた。13歳の時ニーマン・ピック病C型の診断を受けた。

### 【治療薬の調整】

Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin(以下シクロデキストリン)はロケット社から購入し、鳥取大学医学部附属病院薬剤部で静脈注射用の20%溶液として調整した。

### 【治療薬の投与方法】

左鎖骨下静脈に留置した中心静脈ポートより生理食塩水で希釈したシクロデキストリンを80mg/kg/日週2回から開始し、2週目から5週目は週100mg/kg増加し、その後6-7週目は週400mg/kg増加し、8-10週目は600mg/kg増量し、11週目から2g/kg週2回投与し、6か月後から2.5g/kg週2回とし、現在まで約1年間、週2回の投与を行った。

### 【治療効果の判定】

治療前には血液、尿検査、腹部エコー、腹部CT、脳MRI、MRS、脳波、聴性脳幹反応(聴力閾値)、短潜時SEP、視覚誘発電位の検査を行い、投与後投与開始から12週までは入院で投与し、毎週血液一般、血液生化学、尿検査を行い、12週目に腹部CT、脳MRI、MRS、脳波、聴性脳幹反応(聴力閾値)、短潜時SEP、視覚誘発電位の検査を行った。

その後は地元の病院で、週2回2g/kg(6か月後から2.5g/kg)の静脈内投与を行い、1か月毎に血液検査を行った。3か月から6か月毎に当院を受診し、画像、電気生理検査を行った。

## C. 結果

### 【1年間の治療経過による有害事象】

静脈内投与後、甘いにおいを感じられたが、投

与前後の呼吸、循環状態に変化はなく、2g/kgまで増量しても投与前後に変化はなかった。

ニーマン・ピック病C型モデルネコへの投与で神経症状の進行は著明に遅延させることが出来るが、難聴がおこることが知られている。血液検査、尿検査、聴性脳幹反応の閾値の変化で明らかな異常は認められなかった。

### 【肝臓・脾臓の変化】

腹部では治療開始前に肝臓、脾臓が腫大していたが治療により明らかに縮小した(図1)



図1 腹部CT

上：療前、下：治療後6か月

また、腹部エコーで脾臓の直径は治療開始前16cm、治療3か月14.2cm、治療6か月14.4cmと治療開始3か月で縮小し、その後の大きさには大きな変化はなかった。

肝臓は右前腋窩線、右鎖骨中線、正中、左鎖骨中線での大きさを比較した。右前腋窩線では、治療開始前16cm、治療3か月15.7cm、治療6か月14.7cmと縮小した。右鎖骨中線では治療開始前17cm、治療3か月12.5cm、治療6か月14.8cmと縮小した。正中線では開始前12cm、開始3か月後11.8cm、治療6か月10.2cmと縮小した。左鎖骨中線では開始前8.5cm、3か月7.3cm、6か月7.2cmと縮小した。

以上からシクロデキストリン投与によって、開

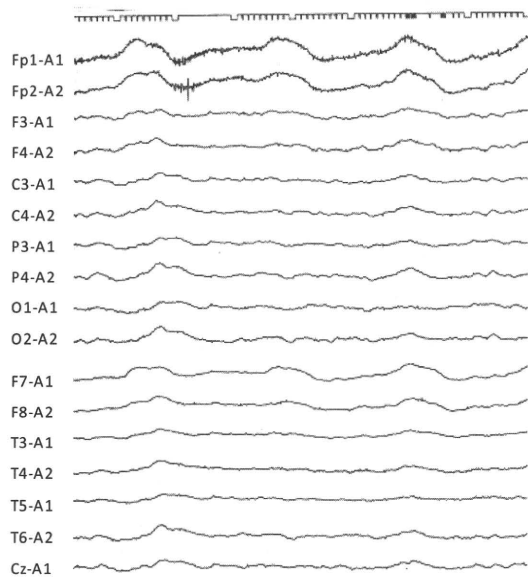


図2 治療前の脳波(覚醒)

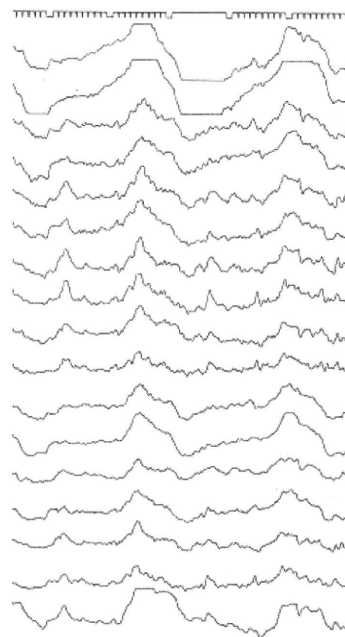


図3 治療3か月の脳波(覚醒)

始数ヶ月での肝脾腫の縮小が顕著であった。

#### 【脳 MRI、MRS の変化】

開始前、3 か月後、6 か月後の MRI には明らかな変化を認めなかった。

MRS 基底核の NAA/Cr が開始前 1.15、治療 3 か月 1.35、治療 6 か月 1.45 と増加した。Cho/Cr は明らかな変化はなかった。また、半卵円中心、小脳半球では NAA/Cr、Cho/Cr とも大きな変化を認めなかった。NAA のピークは神経細胞と軸索の障害を示唆すると言われる。大脳基底核の NAA/Cr の増加は神経細胞または軸索機能の改善の可能性を示唆している。

#### 【脳波の変化】

治療開始前の脳波は平坦に近く、明らかな基礎波を認めなかったは治療後、50-100 $\mu$ V のシータ波やベータ波の出現を認めた。

また、脳波については、地元の病院での検査でも治療前の平坦に近い脳波から、低振幅ではあるが律動性のある波が出現するようになった。

#### 【視覚誘発電位の変化】

治療前には再現性のある波形が得られなかったが、治療 3 か月及び治療 6 か月で再現性のある波形が得られるようになった。

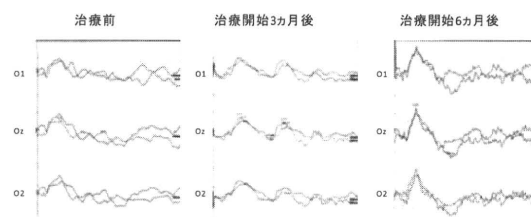


図4 視覚誘発電位の変化

#### 【その他の電気生理検査の変化】

末梢神経伝導速度、聴性脳幹反応、短潜時体性感覚誘発電位には明らかな変化を認めなかった。

#### D. 考 察

我々の施設以外で、佐賀医科大学小児科で4歳の女兒に同じプロトコールで治療を行っている。この女兒では神経症状の進行の遅延を認めたが治療開始後、ジストニアが進行してきた。

我々の例では、肝脾腫に対して明らかな効果があり、基底核 MRS、脳波、視覚誘発電位に改善が見られ、進行例でも脳機能に影響がある可能性が示唆された。

しかし、ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスやネコでは神経症状の進行の明らかな遅延化を認めていると報告されているが、シクロデキストリンの髄液移行が少ない可能性が示唆されており、

結果の評価には十分慎重でありたい。

## E. 結 論

ニーマン・ピック病 C 型患者へのシクロデキストリンの静脈投与で肝脾腫は確実に改善し、神経症状の進行へ効果がある可能性が示唆された。

さらに治療 1 年後の評価を含めて、ニーマン・ピック病 C 型の中樞神経系の治療薬と有効かどうか検討していく必要がある。

## 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. *Boll Cells Mol Dis* 44 : 48-54, 2010
- 2) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The effect of

N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev* 32 : 805-809, 2010

- 3) Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K., Nanba E. Chemical chaperone therapy : luciferase assay for screening of beta-galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101 : 364-369, 2010
- 4) Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y. A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease : synthesis and intracellular distribution studies. *Chembiochem* 11 : 2453-2464, 2010

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし