

## 副腎白質ジストロフィー(ALD)の造血幹細胞移植成績

分担研究者：鈴木 康之(岐阜大学医学教育開発研究センター)

### 研究要旨

小児・思春期大脳型副腎白質ジストロフィー(ALD)患者 47 名に対して実施された造血幹細胞移植の効果を解析した。Busulfan を含まない前処置と、頭部 MRI における Loes score 10 未満は、有意に生存率を向上させた。診断～移植の期間が 6 か月未満、脱髄部位が前頭葉、PIQ 80 以上、ALD disability rating scale (ALD-DRS)=0 でも生存率の向上傾向が認められた。2005 年以降、移植前処置の改良などにより、生存率・有効率ともに改善しており、ALD に対する造血幹細胞移植のガイドライン作成が可能と考えられた。

### 研究協力者

下澤伸行、小関道夫(岐阜大学)

矢部普正、加藤俊一、高倉広充(東海大学)

加藤剛二(名古屋第一赤十字病院)

辻 省次(東京大学)

加我牧子(国立精神・神経医療研究センター)

酒井規夫、大田秀明(大阪大学)

小林博司、西山由梨佳(東京慈恵会医科大学)

小田 慈(岡山大学)

足立壮一、加藤竹雄(京都大学)

平山雅浩(三重大学)

藤田直人(広島赤十字・原爆病院)

新妻秀剛(東北大学)

### A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)は中枢神経の脱髄、副腎機能障害、極長鎖脂肪酸の蓄積を特徴とする X 連鎖劣性遺伝病であり、造血幹細胞移植による治療が行われているが、我が国の実態と生存率や有効性に関わる因子の解析はいまだ行われていない。

今回、47 例の小児・思春期大脳型 ALD 患者の造血幹細胞移植の効果について検討したので報告

する。

### B. 研究方法

国内で施行された ALD 症例に対する造血幹細胞移植 47 例について、移植施設から情報提供いただき、解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は各施設倫理委員会の承認のもと、匿名化されたデータを使用した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1) 患者の特徴、移植状況

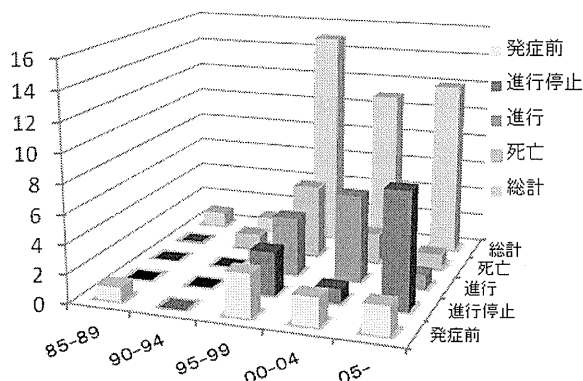
移植時平均年齢 8.6 歳、診断から移植までの期間 6.7 か月、移植年(1993-2004 年 28 例、2005-2011 年 19 例)、脱髄部位(前頭葉型 9 例、後頭頭頂葉型 28 例)、ドナー(同胞骨髄 20 例、非血縁骨髄 11 例、臍帯血 15 例)、HLA(完全一致 26 例、不完全一致 17 例)、前処置(BU/CY 18 例、Mel/ATG/TAI 12 例、Flu/Mel 14 例、その他 2 例)、Loes score(10 未満 19 例、10 以上 11 例)、ALD-DRS(0 : 9 例、I : 14 例、II : 13 例、III : 9 例、IV : 1 例)、副腎不全あり 5 例、なし 41 例。

## 2) 治療成績

47 例中、進行停止 13 例、進行 13 例、死亡 8 例、発症前移植 7 例(無症状)、拒絶 6 例で、移植後の生存率は約 80%であった。

## 3) 移植成績に関与する因子

- ・移植年：2005 年以降は生存率が向上する傾向を認めた( $p=0.063$ )。進行停止した 13 例中 9 例が 2005 年以降の症例であり、2005 年以降、移植の有効性が向上していると考えられた。



- ・移植時年齢：8 歳以前と以降で比較したが差を認めなかった。
- ・診断から移植までの期間：6 か月未満では生存率が向上する傾向を認めた( $p=0.09$ )。
- ・移植ドナーの差は認めなかった。
- ・ドナーの保因者、非保因者の差を認めなかった。
- ・移植前処置に Busulfan (BU) を使用すると、有意に生存率が低下した( $p=0.05$ )。Flu/Mel 主体の前処置で進行停止例が多い傾向を示した。
- ・Loes score 10 以上で有意に生存率が低下したが( $p<0.01$ )、効果には差を認めなかった。
- ・後頭頭頂葉型で生存率の低下傾向を示した( $p=0.11$ )。前頭葉型では死亡例がなかった。
- ・ALD-DRS がゼロの症例では死亡例がなかった。
- ・PIQ>80 の症例は生存率が高い傾向を示した( $p=0.058$ )。

## D. 考察

BU を含まない前処置、Loes score 10 未満、診断から移植までが 6 か月未満、前頭葉型、PIQ>

80 などは生存率向上に寄与すると考えられた。

2005 年以降、早期診断、移植技術の向上、適正な適応判断などによって ALD に対する造血幹細胞移植の成績(生存率、有効性)は向上していると考えられた。

## E. 結論

ALD に対する造血幹細胞移植の成績に関与する因子を明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimozawa N, Nagase T, Suzuki Y, et al. : Diagnostic and follow-up system of patients with X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. J Hum Genet 56 : 106-109, 2011
- 2) Morita M, Suzuki Y, Imanaka T, et al. : ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. Curr Drug Targets. 12 : 694-706, 2011

### 2. 学会発表

- 1) 小関道夫, 下澤伸行, 矢部普正, 加藤俊一, 加藤剛二, 加我牧子, 辻 省次, 鈴木康之 : 副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植効果 : 国内症例の包括的検討. 第 53 回日本先天代謝異常学会, 幕張, 2011.11
- 2) 長瀬朋子, 梶原直美, 鈴木康之, 下澤伸行 : LC/MS を用いた極長鎖脂肪酸迅速測定の開発. 第 53 回日本先天代謝異常学会, 幕張, 2011.11

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的研究と 標準的移植法確立に関する研究

分担研究者：加藤 俊一(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授)

### 研究要旨

わが国において造血細胞移植が実施されたムコ多糖症 1 型(MPS-IH ; Hurler 病、MPS-HS ; Hurler-Scheie 病)について、日本造血細胞移植学会と日本小児血液学会の造血細胞移植登録データに基づいて解析を行った。

1989～2008 年の間に 18 例の MPS-IH において 25 回の造血細胞移植が実施された。病型は MPS-IH が 14 例、MPS-HS が 4 例であった。初回移植におけるドナーは 7 例が血縁者、11 例が非血縁者、HLA 適合性は 13 例が一致、5 例が不一致で、移植細胞源は 12 例が骨髄、6 例が臍帯血であった。移植時の年齢中央値は MPS-IH で 2 歳 9 か月、MPS-HS で 2 歳 5 か月であった。

病型別の粗生存率(無イベント生存率)は MPS-IH で 84%(64%)、MPS-HS で 75%(50%)、移植細胞別では骨髄で 83%(75%)、臍帯血で 83%(33%)、ドナー別では血縁者 86%(71%)、非血縁者 82%(55%)、HLA 適合別では一致 78%(64%)、不一致 100%(60%)であった。

生着率は移植細胞源で骨髄の 91%に対し臍帯血は 50%と低かったが(P=0.069)、病型別、ドナー別、HLA 適合別での差は認められなかった。

生着例においては酵素活性の正常化と尿中ウロン酸の減少が認められ、皮膚硬化、肝脾腫、関節拘縮などの臨床症状はほぼ全例で改善が認められた。また、角膜混濁は一部の症例で軽減が認められたが、脳 MRI での改善は明確でなかった。MPS-IH では発達や知能の改善度に個人差があったが、MPS-HS では全例で知能は正常に保たれていた。

総合的な評価では、主治医は MPS-IH では長期生存例 7 例中 6 で著効もしくは有効、MPS-HS では 3 例中 3 例で著効と回答し、患者家族は MPS-IH では 7 例中 4 例で満足、3 例でやや満足、MPS-HS では 3 例中 1 例で満足、1 例でやや満足、1 例は不明という結果であった。

### 研究協力者

矢部普正(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・准教授)

清水崇史(東海大学医学部専門診療学系小児科学・講師)

高倉広充(東海大学医学部専門診療学系小児科学・助教)

### A. 研究目的

本分担研究における目的は先天代謝異常症における造血幹細胞移植の成績を後方視的に解析し、標準的治療法を開発することにある。

本年度はわが国におけるムコ多糖症 1 型に対する造血細胞移植結果について解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 造血細胞移植実施状況

わが国においては、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、2010年にこれらの造血細胞移植登録が一元化され、疾患別のワーキンググループ(WG)が形成された。本研究は遺伝性疾患における造血細胞移植WGの1テーマとして解析を実施した。

### 2) 長期生存例における臨床効果

日本小児血液学会造血細胞移植委員会が2004～07年に実施した「先天代謝異常に対する造血細胞移植の調査」の際に収集された治療効果に関するデータにより解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 症例と移植概況

#### ①症例数と移植回数

1989～2008年の期間に18例のMPS1型に対して25回の造血細胞移植が行われていた。MPS-IHの5例とMPS-HSの1例において拒絶または生着不全のために再移植が実施されていた。

#### ②初回移植時の移植種類

移植細胞源、ドナー、HLA適合、移植時年齢による移植数は以下の表のとおりである。

		MPS-IH (N=14)	MPS-HS (N=4)
移植細胞	骨髄	9	3
	臍帯血	5	1
ドナー	血縁	4	3
	非血縁	10	1
HLA適合	一致	10	3
	不一致	4	1
移植時年齢	範囲	1.8-5.4歳	2.1-5.3歳
	中央値	2.9歳	2.5歳

### 2) 移植結果

生着率、粗生存率(overall survival; OS)、無イベント生存率(ドナー細胞が生着して生存、event-free survival; EFS)を病型別、移植細胞別、ドナー別、HLA適合別にみると、以下の表のとおりである。

		生着率	OS	EFS
病型	MPS-IH	77%	84%	67%
	MPS-HS	75%	75%	50%
移植細胞	骨髄	91%*	84%	75%**
	臍帯血	50%*	83%	33%**
ドナー	血縁	71%	86%	71%
	非血縁	80%	82%	55%
HLA適合	一致	83%	76%	62%
	不一致	60%	100%	60%

\*P=0.069, \*\*P=0.093

### 3) 治療効果

#### ①臓器別・機能別評価

生着例においては酵素活性の正常化と尿中ウロン酸の減少が認められ、皮膚硬化、肝脾腫、関節拘縮などの臨床症状はほぼ全例で改善が認められた。また、角膜混濁は一部の症例で軽減が認められたが、脳MRIでの改善は明確でなかった。MPS-IHでは発達や知能の改善度に個人差があったが、MPS-HSでは全例で知能は正常に保たれていた。

#### ②主治医による総合評価と家族の満足度

総合的な評価では、主治医はMPS-IHでは長期生存例7例中6で著効もしくは有効、MPS-HSでは3例中3例で著効と回答し、患者家族はMPS-IHでは7例中4例で満足、3例でやや満足、MPS-HSでは3例中1例で満足、1例でやや満足、1例は不明という結果であった。

## D. 考察と結論

MPS-IHは先天代謝異常症の中でも造血細胞移植の有効性が高い疾患で、欧米においては数多くの移植実施が報告されている。わが国においてはムコ多糖症のなかではII型が多いこともあり、移植の実施例は少なく、その効果についても系統

的な調査は行われていなかった。

一方、ムコ多糖症の多くの病型で酵素補充療法が開発され、造血細胞移植よりも安全に行えることやすべての症例で実施可能であることから、急速に普及しつつある。しかしながら、酵素補充療法においては投与した酵素が中枢神経系に到達しないために、その効果が限定的であることが判明し、再び造血細胞移植に対する期待が高まっている。

今回の調査により、MPS-I型に対する酵素補充療法が健康保険で承認される前だけでなく承認後にも造血細胞移植が実施されていることが明らかとなった。移植方法やドナー、移植細胞の選択などについてさらなる検討が必要であることが再確認された。

また、移植による治療効果は酵素補充療法が導入される以前の時代の症例であることから、造血細胞移植のみの効果を知る上で貴重なデータと言える。治療効果について主治医は著効ないしは有効との評価が多いのに対して、家族の満足度はやや低い傾向があった。家族にとっては同一家系内で初めての症例であることなどから、移植を行わなかった場合の自然経過との比較ができないことなどができにくかったためではないかと思われる。

結論として、今回の調査により MPS I 型に対する造血細胞移植の実施状況とその有効性が明らかとなったものの、酵素補充療法との比較や、酵素補充療法と組み合わせた治療戦略の考案などが今後の課題と言える。

## E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Arakawa S, Kato S, Yabe H : Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient

17 years after allogeneic BMT. Bone Marrow Transplant, 46(7) : 1023-5, 2011.7, doi : 10.1038/bmt.2010.224. Epub 2010.9.27

- 2) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N, Kato S, Yabe H : Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. Bone Marrow Transplant, 46(8) : 1148-50, 2011.8, doi ; 10.1038/bmt.2010.241. Epub 2010.10.18
- 3) Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S : Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Brit J Haematol, 154(3) : 363-72, 2011.8, doi : 10.1111/j.1365-2141.
- 4) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S : for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan : The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. Biol Blood Marrow Transplant. 17(12) : 1814-21, 2011.12, Epub 2011.5.25
- 5) Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K : Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. Blood, 118(11) : 2941-50, 2011.9.15, Epub 2011.7.6
- 6) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato

- S, Kawase T, Morishima Y, Koder Y : Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*, 118(11) : 3186-90, 2011.9.15, Epub 2011.7.14
- 7) Kawaguchi AT, Aokawa J, Yamada Y, Yoshida F, Kato S, Kametani Y : Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Antigen-Presenting Cells in Mice. *Artif Organs*, 2011.7.25, doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01269.x.
- 8) Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H : Intrabone Marrow Transplantation of Unwashed Cord Blood Using Reduced-Intensity Conditioning Treatment : A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011.8.23, [Epub ahead of print]
- 9) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Koder Y, Kato S : for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011.10.18, [Epub ahead of print]
- 10) Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E : Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children : A nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 2011.10.28, doi : 10.1002/pbc.23384. [Epub ahead of print]
- 11) Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S : High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011.12.23, [Epub ahead of print]
- 12) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T : Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia : a retrospective cohort study. *Blood*, 2012.1.10, [Epub ahead of print]
- 13) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S, Shiraishi K, Minemura T, Kato S : Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, in press

## 2. 著書

- 1) 加藤俊一. 造血細胞移植. 衛藤義勝編 : ライソゾーム病. 診断と治療社, 東京, 93-99, 2011
- 2) 加藤俊一. ムコ多糖症に対する造血幹細胞移植の現状と課題(骨髄、臍帯血、末梢血). 折居忠夫編 : ムコ多糖症 UPDATE. イーエヌメディアックス, 東京, 212-218, 2011

### 3. 学会発表

- 1) 加藤俊一：造血幹細胞移植の現状と展望. 第28回日本医学会総会, 東京, 2011.4.
- 2) Kato S, et al. : High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma (RICH) in long-term survivors who underwent blood and marrow transplantation (BMT) in childhood. ESLCCC2011, Amsterdam, 2011.9
- 3) Kato S, et al. : Early and quantitative assay to detect HHV-6 viremia and evaluation of cellular response specific against HHV-6 after hematopoietic stem cell transplantation. The Joint Meeting of The XVII<sup>th</sup> International

Symposium on Gnotobiology and The XXXIV<sup>th</sup> Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Yokohama, 2011.11

### 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

# 分担研究報告書

## Ⅱ. 病態解析



## スフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発に関する研究

分担研究者：松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所 教授)

### 研究要旨

スフィンゴ脂質のライソゾームにおける分解には、ライソゾーム酵素に加えてサポシンと呼ばれる糖タンパク質が必要である。サポシンは前駆体タンパク質のプロサポシンから4種類のサポシン A、B、C、D が生成される。我々はサポシンおよびプロサポシンの機能解明を目指して、本年度、下記の二つの研究課題に取り組んだ。1) ゴーシェ病の欠損酵素であるグルコシルセラミド- $\beta$ -グルコシダーゼ(GCase)の酵素製剤の活性に対する化学合成マウスサポシン C の影響を検討した。その結果、化学合成サポシン C は GCase 酵素製剤に対して活性化作用と安定化作用を持つことがわかった。このことからゴーシェ病の酵素補充療法におけるサポシン補充の有用性が示唆された。2) プロサポシン欠損マウスの胚の解析とマウス胎生期のプロサポシンおよびサポシンの発現変化を検討した。その結果、プロサポシン欠損マウスは胎齢 7.5 日(E7.5)頃の異常で胎生致死となること、野生型マウス胚においてプロサポシンおよびサポシンは E7.5-9.5 に高発現し、その発現部位は脱落膜や栄養芽細胞層、臓側卵黄嚢であることがわかった。これらの結果から、プロサポシンおよびサポシンの胚発生における機能が示唆された。

### A. 研究目的

我々はライソゾームにおけるスフィンゴ脂質の分解異常症であるスフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発を研究目的としている。

スフィンゴ脂質のライソゾームにおける分解には、加水分解酵素(ライソゾーム酵素)に加えて、スフィンゴ脂質活性化タンパク質と呼ばれる触媒活性をもたない補因子が必要である。サポシンはスフィンゴ脂質活性化タンパク質の1つで、前駆体タンパク質のプロサポシンからライソゾーム内のプロテアーゼによるプロセッシングを経て、4種類のサポシン A、B、C、D が生成される。各サポシンは構造的に極めて相同性が高いが、ヒトの欠損症やモデルマウスの解析から、生体内においていくつかのオーバーラップがあるものの、特定のライソゾーム酵素を活性化することが知られ

ている(図 1)。一方、プロサポシンは脳脊髄液、精液、母乳などの細胞外分泌液に豊富に存在することから、神経栄養因子、精子形成促進因子などの独自の生理活性が報告されているが未だ不明な点が多い。

我々はサポシンおよびプロサポシンの機能解明を目指して、本年度、下記の二つの研究課題に取り組んだ。

1) ゴーシェ病はグルコシルセラミド(GlcCer)の分解酵素である GlcCer- $\beta$ -グルコシダーゼ(GCase)の欠損症で、その治療には酵素補充療法が有効である。しかしながら、酵素製剤は血中で不安定であり、酵素の安定性を高める低分子化合物の開発やより安定で活性の高い酵素製剤の開発などの取り組みが行われている。そこで、我々は GCase による GlcCer の分解

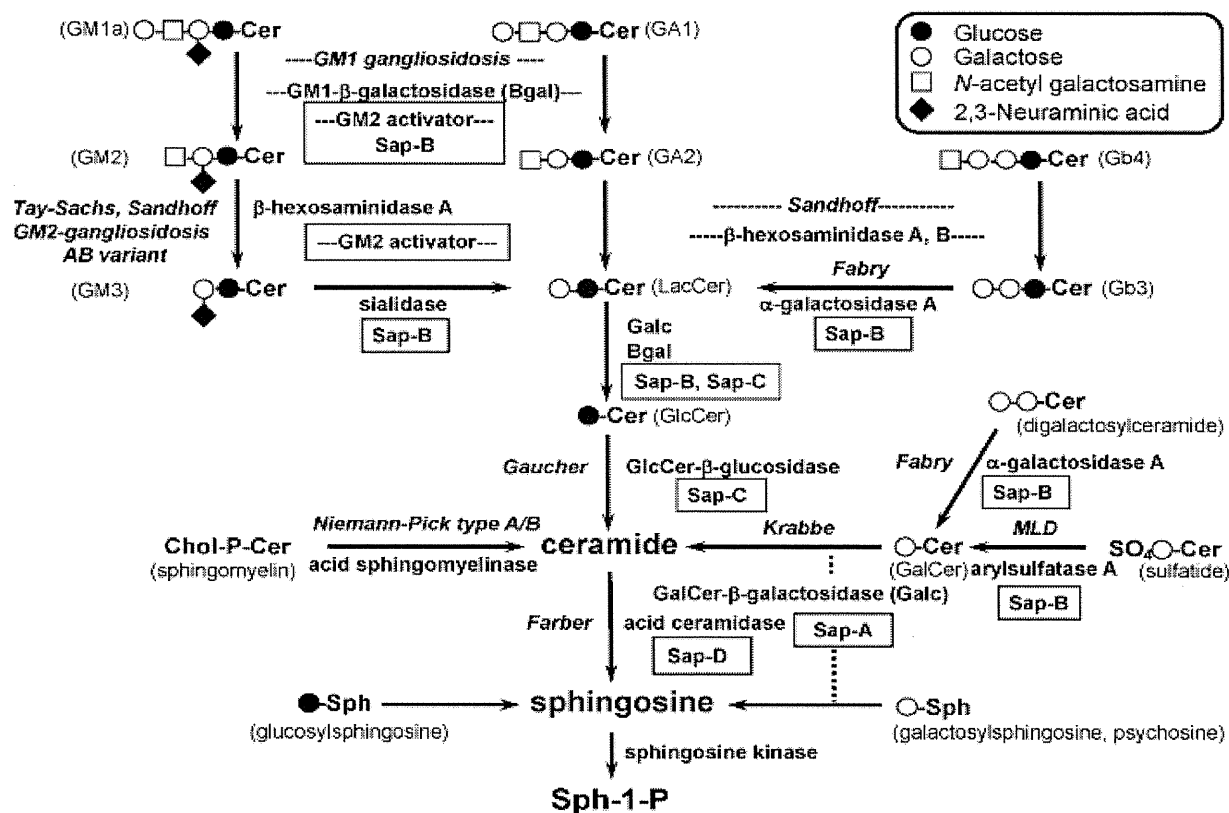


図1 スフィンゴ糖脂質の主な分解経路(酵素, 活性化タンパク質, 病気)

にはサポシン C が必須であることに着目し、化学合成マウスサポシン C の GCase 酵素製剤 (セレザイム®, Genzyme Co. Ltd.) の活性に対する影響を検討した。

- 2) プロサポシン欠損マウスはスフィンゴ脂質が全身組織に蓄積し、生後 30 日程度で死に至ることがわかっているが、その出生率が極めて低いことが示されている (Fujita et al. *Hum Mol Genet.* 1996, 6 : 711-725.)。そこで、プロサポシン欠損マウスの胎生致死の原因解明を目的に、プロサポシン欠損マウスの胚の解析とマウス胎生期のプロサポシンの発現変化を検討した。

## B. 研究方法

- 1) O-アシルイソペプチド法を併用したネイティブケミカルライゲーション反応によってマウスサポシン C を化学合成し (Hojo H, et al. *Tetrahedron Lett.* 2011, 52 : 635-639)、セレザイム®による人工基質 4-methylumbelliferyl

$\beta$ -D-glucopyranoside (4MU-Glc) の分解活性に及ぼすサポシン C の影響を検討した。

- 2) プロサポシンヘテロマウス同士を交配して、胎齢 6.5 日 (E6.5) から E19.5 まで経時的に遺伝子型別の存在率を決定した。同時に胚の組織標本作製し、プロサポシン欠損マウスの胚の病理組織学的検討を行った。野性型マウスの胚組織および羊水におけるプロサポシンおよびサポシンの経時的な発現変化を、ウエスタンブロット法と免疫組織染色法により検討した。

## C. 研究結果

- 1) サポシン C は疎水性のタンパク質で、その不溶性から化学合成が難しいタンパク質である。東海大学の北條らは、N 端側ペプチド鎖 Val<sup>1</sup>-Ala<sup>34</sup> を O-アシルイソペプチド法を併用した Boc (t-butoxycarbonyl) 法で、C 端側ペプチド鎖 Cys<sup>35</sup>-Arg<sup>80</sup> を Fmoc (fluorenylmethoxy carbonyl) 法で固相合成し、両者をネイティブケミカルライゲーション法で縮合して、マウス

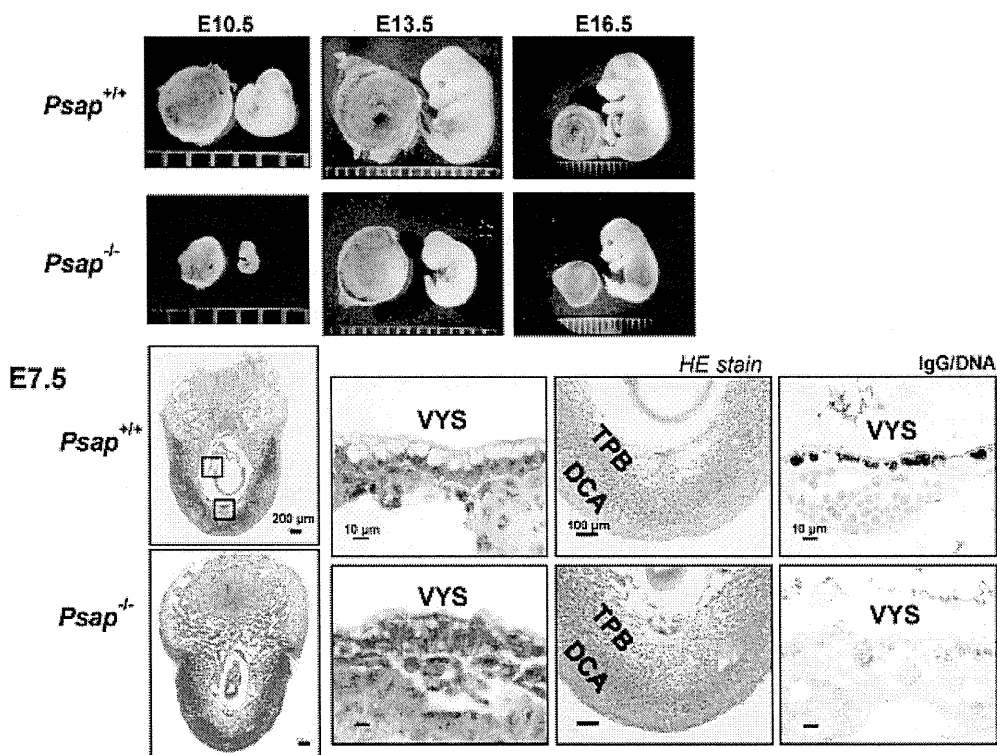
サポシン C を合成した。合成されたサポシン C は既報の内在性サポシン C などと同様の  $\alpha$  ヘリックス構造に富む CD スペクトルを示し、ウェスタンブロット解析において、プロサポシン・サポシン抗体に陽性で、サポシン B 特異抗体では検出されなかった。

セレザイム®に対する酵素活性化作用を、L- $\alpha$ -phosphatidylserine 存在下、界面活性剤非存在下で、人工基質 4MU-Glc を基質として検討したところ、化学合成サポシン C 添加によって濃度依存性にセレザイム®の酵素活性が上昇し、1nM のセレザイム®に対して 2 $\mu$ M の合成サポシン C を添加すると、約 40 倍の酵素活性上昇が得られた。この活性上昇は遺伝子組み換え技術により発現させたサポシン C の効果より約 3 倍高い傾向にあった。界面活性剤存在下 (0.4% Triton X-100) で、2.5mM 4MU-Glc、1nM セレザイム®の反応液中に 0-15 $\mu$ M の化学合成サポシン C を加えて遊離 4MU 量を測定したところ、3 $\mu$ M 以上の化学合成サポシン C の存在下において酵素活性の上昇が得られ、15 $\mu$ M の化学合成サポシン C 存在下 (1.51 $\pm$ 0.17 nmol/hr/ng protein, n=3, means $\pm$ SE) では非存在下 (0.78 $\pm$ 0.10 nmol/hr/ng protein) に比べて 1.94 倍 ( $P=0.0495$ ) の活性上昇がえられた。

次に、セレザイム®の安定性に対するサポシン C の影響を検討する目的で、まずセレザイム®の安定性試験を行った。点滴静注および Genzyme 社による薬剤安定性試験で用いられる溶解濃度では、中性域で 37°C インキュベートにおいて、2 時間後で 80% 以上、24 時間後でも 70% 近く、セレザイム®の酵素活性は保たれるが、20 nM に溶解すると 30 分後には活性は半分以下になり、2 時間後には測定限界を下回った。そこで、安定性の低下が明らかな 20nM の溶解濃度において、37°C で 4 時間までインキュベーションし、化学合成サポシン C の添加の影響を検討した。15 $\mu$ M の化学合成

サポシン C および BSA 添加では、ともに低濃度のセレザイム®の酵素活性低下を同等に緩和した。次に、サポシン C と BSA の濃度を 0~1.5 $\mu$ M で変化させて、37°C インキュベート 2 時間後のセレザイム®活性を測定したところ、BSA よりもサポシン C の方が、より低濃度で活性低下の抑制効果を示した。

- 2) プロサポシンヘテロマウス同士を交配し、胎生期の遺伝子型別の存在率を解析した結果、プロサポシン欠損マウスは E10.5 頃から存在率が低下し、多くが胎生致死であることがわかった (図 2)。プロサポシン欠損マウスの胚の組織病理学的解析により、プロサポシン欠損マウスは胎生早期の E7.5-9.5 頃から胚発生の遅延が見られ、臓側卵黄嚢の形態変化が認められた。臓側卵黄嚢内皮細胞に存在する巨大ライソゾームにエンドサイトーシスされることの知られている IgG を抗 IgG 抗体で免疫組織染色したところ、プロサポシン欠損マウスでは IgG の免疫反応性が弱く、巨大ライソゾームの大きさが不均一であることがわかった。胎盤では海綿状栄養膜の低形成が観察された。
- 野性型マウス胚を用いて、胎生期のプロサポシンおよびサポシンの経時的な発現変化を、抗サポシン B 抗体を用いたウェスタンブロット解析で検討したところ、E6.5 の胚ではプロサポシン、サポシン共に殆ど発現を認めないのに対し、E 7.5 ではプロサポシンの発現量が急激に増加し、E10.5 頃より低下することが分かった。プロサポシンの発現ピークは E7.5 に、サポシンは E9.5 に発現のピークがあった (図 3)。プロサポシン mRNA の発現レベルをリアルタイム RT-PCR により解析したところ、E6.5 日では殆ど発現していないが、E7.5 から 9.5 にかけて発現のピークを認め、ウェスタンブロット解析の結果と一致していた。E10.5-17.5 の胎盤と羊水中にもプロサポシンは検出され、E10.5-11.5 に発現のピークがあり、胎生後期にかけて発現量が減少した。プロサポシン欠損



プロサポシンノックアウトマウス ( $Psap^{-/-}$ ) は胎生早期 (胎生7.5日) から形態異常を認める。  
 VYS: 臓側卵黄嚢、TPB: 海綿状栄養膜、DCA: 脱落膜。

図2 プロサポシンノックアウトマウスの多くは胎生致死である

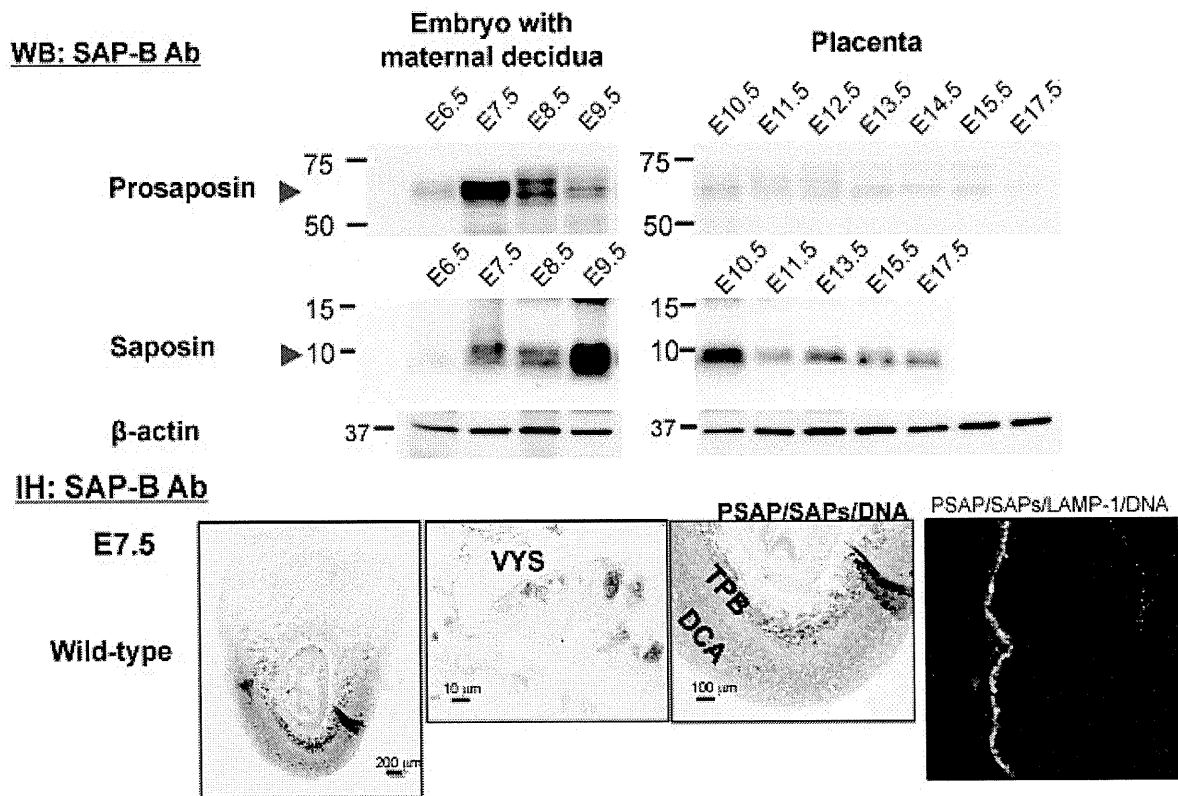
マウスの羊水ではプロサポシンのバンドが消失したことから、羊水中のプロサポシンは胎仔由来と考えられた。また、羊水中のプロサポシンの分子量は胎盤や脳由来のものに比して大きく、共に Glycopeptidase F 処理により約 50kDa のバンドへのシフトを認めたことから、胎盤と羊水ではプロサポシンに付加されているアスパラギン結合型糖鎖に違いがあると考えられた。

抗サポシン B 抗体と抗プロサポシン特異抗体を用いて、野性型マウスとプロサポシン欠損マウスの胚の免疫組織染色を行ったところ、野性型マウスでは、サポシンおよびプロサポシンは E6.5 の胚ではほとんど検出されないが、E7.5 から 9.5 にかけて脱落膜周辺、臓側卵黄嚢内皮細胞の巨大ライソゾーム内に明瞭な発現を認めた。胎盤では、E10.5 以降の脱落膜、栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜に発現を認めた。胚体組織には E8.5 以降に発現を認めた。プロサポシン欠損マウスの胚では、胚体組織および胎盤の

栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜の発現は消失していたが、脱落膜、臓側卵黄嚢の発現は野性型マウスと同等に認められた。このことから、脱落膜周辺、臓側卵黄嚢のサポシンおよびプロサポシンは母体由来であると考えられた。

#### D. 考 察

- 1) サポシン A, B, C, D はいずれも疎水性アミノ酸に富む約 80 個のアミノ酸からなり、3つのジスルフィド結合と 1つのアスパラギン結合型糖鎖の付加を持つ。これらの構造は種を超えて保存されている。結晶構造解析によりサポシン C には 4つの  $\alpha$  ヘリックス構造が存在し、可変部位によって動的な三次構造をとること、酸性条件下では二量体を形成し“疎水性のポケット”を形成することが明らかになった。サポシン C はこの”疎水性のポケット”を介して膜脂質の疎水性部分と相互作用し、膜から脂質分子を引き抜き、親水性の頭部を加水分解酵素に提示するというモデルが示されている。



プロサポシン、サポシンは胎生早期(胎生7.5-9.5日)に強く発現している。  
 VYS: 臓側卵黄嚢、TPB: 海綿状栄養膜、DCA: 脱落膜。

図3 マウス胎生期のプロサポシンおよびサポシンの発現変化

我々は、サポシン C ノックアウトマウスが小脳プルキンエ細胞の脱落と、神経細胞の軸索変性を特徴とする神経変性疾患を発症すること、ヒトのサポシン C 欠損症とは異なって、GlcCer の蓄積を認めないが、GCCase および、GM1-beta-galactosidase (Bgal) の活性が界面活性剤存在下においても有意に低下することを報告した (Yoneshige A, et al. *J. Neurosci. Res.* 2010, 88: 2118-2134.)。これらの結果は、サポシン C が神経細胞において独自の機能を持つことを示唆するとともに、スフィンゴ脂質の分解においては、上述の膜脂質の引き抜きとは別に、GCCase や Bgal などの酵素タンパク質と直接相互作用し、保護タンパク質あるいはシャペロンタンパク質として作用する可能性を示唆する。

そこで、我々は外来性に投与される GCCase 酵素製剤の活性に対する化学合成サポシン C の影響を検討した。その結果、化学合成サポシン

C はセレザイム®の活性化だけでなく、安定化にも有用であることが示唆された。GCCase 酵素製剤はゴーシェ病に対する治療製剤であるが、他の酵素製剤と同様に血中での不安定性が問題の 1 つである。今回の結果は、ゴーシェ病の酵素補充療法におけるサポシン補充の有用性を示唆していると考えられる。今後はセレザイム®の安定性維持がプロテアーゼからの保護作用なのか、シャペロン作用なのかなど、そのメカニズムの解析を加える必要がある。また、ゴーシェ病モデルマウスにおけるセレザイム®とサポシン C との共投与の効果などを検討する必要がある。

一方、化学合成による目的タンパク質の作製には、遺伝子組み換えによる発現系に比べていくつかの利点がある。一つは精製実験をする必要がないため、宿主生物由来のタンパク質の持ち込みがなく、発現ベクター由来の配列を持たないサポシンを得ることができる。次に、発現系

の場合、糖鎖構造は不均一であるが、化学合成なら均一な糖鎖を持ったサポシンを得ることができる。また、合成できる糖鎖構造に制限はあるものの、異なる糖鎖構造を持ったサポシンを作ることもできる。今回は、糖鎖修飾なしの化学合成マウスサポシン C のセレザイム®に対する影響を検討したが、現在、均一な 1 糖および 9 糖の複合型のアスパラギン結合型糖鎖が付加された化学合成サポシン C を準備中で、これらを用いてサポシンにおける糖鎖修飾の役割も明らかにすることができると考えている。さらには、化学合成サポシン C を用いて神経系におけるサポシン C の生理機能を明らかにしたいと考えている。

- 2) 野生型マウスの胚においてプロサポシンおよびサポシンは E7.5-9.5 の胚発生の早期に明瞭なピークを持って高発現し、その発現部位は脱落膜や栄養芽細胞層、臓側卵黄嚢であることがわかった。一方、プロサポシン欠損マウスは胚発生の早期 (E7.5-9.5) から異常をきたし、胎生致死となることがわかった。これらの結果から、プロサポシンおよびサポシンが胚発生において重要な生物機能を持つことが示唆された。例えば、臓側卵黄嚢内皮細胞は胎生早期において、エンドサイトーシスにより母体からの栄養成分を取り込み、巨大ライソゾーム内で分解し、胎仔へ供給する組織と考えられており、その機能異常がプロサポシン欠損マウスの胎生致死の原因である可能性がある。また、受精卵が子宮に着床する際の脱落膜形成反応における機能も推定される。今後はプロサポシン欠損マウスの胎仔の詳細な形態学的解析を進めるとともに、胚組織由来の細胞を用いたプロサポシンの機能解析が必要である。

## E. 結論

- 1) ゴーシェ病の欠損酵素である GCCase の酵素製剤の活性に対する化学合成マウスサポシン C の影響を検討した。その結果、化学合成サポシ

ン C は GCCase 酵素製剤に対して活性化作用と安定化作用をもつことがわかった。このことからゴーシェ病の酵素補充療法におけるサポシン補充の有用性が示唆された。

- 2) プロサポシン欠損マウスの胚の解析とマウス胎生期のプロサポシンおよびサポシンの発現変化を検討した。その結果、プロサポシン欠損マウスは E7.5 頃の異常で胎生致死となること、野生型マウス胚においてプロサポシンおよびサポシンは E7.5-9.5 に高発現し、その発現部位は脱落膜や栄養芽細胞層、臓側卵黄嚢であることがわかった。これらの結果から、プロサポシンおよびサポシンの胚発生における機能が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki A, Miyazaki M, Matsuda J, et al. : High-performance thin-layer chromatography/mass spectrometry for the analysis of neutral glycosphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*. (Molecular and Cell Biology of Lipids), 1811 : 861-874, 2011
- 2) 松田純子: サポシン欠損と神経機能障害. 脳 21 「特集;糖鎖と神経疾患 糖脂質」金芳堂, 14 : 55-60, 2011
- 3) 松田純子: サポシン欠損症. ライソゾーム病—最新の病態, 診断, 治療の進歩. 診断と治療社, 180-183, 2011
- 4) 松田純子: シアリドーシス. ライソゾーム病—最新の病態, 診断, 治療の進歩. 診断と治療社, 223-225, 2011

### 2. 学会発表

- 1) Yoneshige A, Muto M, Matsuda J : Prosaposin during the embryogenesis of mouse. The 31<sup>st</sup> Naito conference : Glycan Expression and Regulation [ II ] : Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond,

2011.9

- 2) Matsuda J, Watanabe T Yoneshige A, Hama H : Sphingolipid compositions in the gastrointestinal tract of fatty acid 2-hydroxylase (*Fa2h*)-deficient mouse. The 31<sup>st</sup> Naito conference : Glycan Expression and Regulation [ II ] : Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond. 2011.9
- 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. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 4) 米重あづさ, 田野千春, 北條裕信, 松田純子: グルコシルセラミド- $\beta$ -グルコシダーゼ活性に対する化学合成サポシン C の影響. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 5) 渡辺 昂, 米重あづさ, 武藤真長, 鈴木明身, Hama H, 松田純子: FA2H 欠損マウス消化管

におけるスフィンゴ脂質の構造解析. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9

- 6) 米重あづさ, 田野千春, 北條裕信, 松田純子: グルコシルセラミド- $\beta$ -グルコシダーゼ活性に対する化学合成サポシン C の影響, 第16回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9

#### 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

## ABCD タンパク質の機能解析及び副腎白質ジストロフィーALD の分子病態の解明

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

ABC タンパク質サブファミリーD に属する ABCD タンパク質は、哺乳動物で 4 つ報告されており、ABCD1~3 はペルオキシソーム膜に存在し、脂肪酸 CoA のトランスporter と考えられる。ABCD1 は副腎白質ジストロフィーALD と呼ばれる神経変性疾患の原因タンパク質で、その機能欠損により極長鎖脂肪酸の異常蓄積を特徴とする。しかし、その発病メカニズムは明らかになっていない。一方、ABCD4 はペルオキシソームではなく小胞体に存在していることを最近報告したが、その機能は未知のままである。本研究では、ABCD1 及び ABCD4 の機能解析を目的に 2 つの課題について検討を行った。ABCD1 に関しては、中枢神経系アストロサイトに着目して、ABCD1 機能欠損による脂質代謝や遺伝子発現の違いを明らかにした。一方、ABCD4 の小胞体膜上での存在様式を明らかにし、さらに酵母発現系による大量精製を可能にした

### 研究協力者

守田雅志(富山大学大学院医学薬学研究部・准教授)

川口甲介(富山大学大学院医学薬学研究部・助教)

### A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、X連鎖劣性の遺伝子疾患で、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 をコードする ABCD1 遺伝子の変異により発症する。この疾患は、極長鎖脂肪酸の異常蓄積を生化学的特徴とし、大脳における脱ミエリン化や副腎不全を主症状とするが、その発病メカニズムは明らかになっていない。一方、ABCDファミリーの中で、ABCD4 はペルオキシソームでなく小胞体膜に存在している。ABCD4 の機能についてはこれまで報告がなく、その機能は未知のままである。最近、シアノコバラミン代謝障害をもつ患者 2 名で、ABCD4 の変異が発見され、ライソゾーム病との関連性が推察される。

本研究では、中枢神経系細胞の中で ABCD1 を

多く発現しているアストロサイトに着目して、ABCD1 機能欠損による極長鎖脂肪酸代謝の変動、及び遺伝子発現解析を行い、発病におけるアストロサイトの役割について検討した。一方、ABCD4 の構造解析や機能解析を目的として小胞体膜上での存在様式や酵母発現系による大量精製を試みた。

### B. 研究方法

生後 1~2 日の *Abcd1* 欠損マウス脳より調製した混合グリア細胞から、プラスチックシャーレへの吸着性の違い、及び Ara-C や LME の感受性の違いを利用して、初代培養アストロサイトを分離培養した。

脂肪酸の  $\beta$  酸化活性は、放射性リグノセリン酸 ( $[1-^{14}C]C_{24:0}$ ) を基質として細胞を代謝ラベルし、水溶性画分への放射活性の取り込みを測定することにより行った。一方、極長鎖脂肪酸含量の測定は、抽出した脂質を加水分解し、遊離した脂肪酸をメチルエステル化した後、ガスクロマトグ



ラフィーにより定量化した。遺伝子の発現解析は、抽出した mRNA を逆転写酵素で cDNA にした後、DNA マイクロアレイ法及びリアルタイム PCR により行った。

ABCD4 の細胞内局在性は ABCD4-His を安定過剰発現させた CHO 細胞から調製したオルガネラ粗分画をショ糖密度勾配遠心により分離することにより解析した。小胞体膜上での複合体の解析は、細胞ライセートに光反応性膜透過架橋剤を加えた後、UV 照射を行うことにより行った。またホモダイマー形成は、安定過剰発現細胞に ABCD4-HA を発現させ、可溶化後、TALON Resin を用いた pull down により解析した。一方、ABCD4-GFP-His を酵母 *Pichia pastoris* に発現させ、膜画分を 0.5% n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside で可溶化し、Ni Resin を用いて精製した。分散性は蛍光ゲル濾過クロマトグラフィにより解析した。精製 ABCD4 の ATPase 活性は、リン酸モリブデート法を用いて測定した。

(倫理面での配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### 1) ABCD1 欠損アストロサイトの遺伝子発現解析

生後 1~2 日のマウス脳より混合グリア細胞を調製した後、混入ミクログリアを除去しアストロサイトを調製した。野生型及び *Abcd1* 欠損マウスから調製した初代培養アストロサイトについて、極長鎖脂肪酸含量を分析した結果、極長鎖脂肪酸含量 (C26 : 0/C22 : 0) は、*Abcd1* 欠損アストロサイトで野生型に比べ約 2 倍に増加していた。また極長鎖脂肪酸 (C24 : 0) の  $\beta$  酸化活性は野生型に比べ 40% 程度減少していた。一方、[1-14C] C24 : 0 由来の放射活性の C26 : 0 画分への取り込みは、*Abcd1* 欠損アストロサイトにおいて顕著に増加していた。このことからアストロサイトにおいても ALD に認められる生化学的特徴が認められた。

野生型及び *Abcd1* 欠損アストロサイトの遺伝

子発現解析を行った。その結果、極長鎖脂肪酸代謝に関わる遺伝子、及び発病に関わると予想される酸化ストレス関連 (Cat, MnSOD, Homx1 など) や炎症性サイトカイン遺伝子 (Tnfa, Il-1b, Cxcl1 など)、及び小胞体ストレス関連の遺伝子 (Chop, Bip, Oasis など) の発現量に有意な違いは認められなかった。一方、DNA マイクロアレイによる解析で増減が認められた遺伝子について real-time PCR による再解析を行ったところ、*Abcd1* 欠損アストロサイトではケモカインレセプターの一つである *Darc* 遺伝子、細胞接着分子 *Cadm3* 遺伝子の増加、及び *Egr2* 遺伝子の発現低下が認められた。

### 2) ABCD4 の存在様式と機能

ABCD4-His 安定過剰発現 CHO 細胞から粗オルガネラ分画を調製し、ショ糖密度勾配遠心法で分離した結果、ABCD4 は小胞体マーカーである calnexin と分布が一致し、ペルオキシソームマーカーである ABCD3 の分布とは一致しなかった。よって、ABCD4 は小胞体膜に存在していることが確認された。この細胞ライセートを SDA で架橋すると、抗 ABCD4 抗体を用いたイムノブロッティングによって分子量約 200kDa のバンドが新たに検出された。また、ABCD4-His 安定過剰発現 CHO 細胞に ABCD4-HA を一過性に発現させ pull down assay を行うと、ABCD4-His と ABCD4-HA が共沈した。このことから、ABCD4 は小胞体膜上でホモダイマーを含む複合体を形成していることが示唆された。

一方、酵母 *P. pastoris* による His-GFP-ABCD4 の大量発現系を構築した。膜画分を DDM で可溶化後、抗 ABCD4 抗体でイムノブロッティングを行うと、約 100kDa のバンドを検出した。この膜ライセートを蛍光ゲル濾過クロマトグラフィ (FSEC) 解析を行うと、ダイマーの位置 (約 500kDa) に GFP の蛍光ピークを検出した。また、精製した His-GFP-ABCD4 に ATPase 活性が検出された。

## D. 考 察

ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA のトランスポーターと考えられるが、神経変性との関連性はわかっていない。今回、Abcd1 欠損アストロサイトにおいても ALD 患者で認められる極長鎖脂肪酸蓄積が認められた。しかし、アストロサイトでは ABCD1 機能欠損による極長鎖脂肪酸代謝異常がサイトカインなどの直接発病に関わる因子を産生する原因にはなっていないことが明らかとなった。また増加が認められた遺伝子(Darc, Cadm3)については今後検討が必要だが、Abcd1 欠損アストロサイトではサイトカインに対する反応性や他の細胞との相互作用などに異常がある可能性が推察された。

一方、ABCD4 安定過剰発現 CHO 細胞を用いた実験で、ABCD4 が小胞体膜に存在することが確認され、さらに ABCD4 はホモダイマーを形成し、約 80kDa のタンパク質と結合した複合体として存在していると推察された。一方で、ABCD4 を *P. pastoris* に発現させることにより、活性を保持した状態で精製することができた。今後、リポソームに精製 ABCD4 を組み込んだプロテオリポソームを構築することにより、ABCD4 の機能が明らかになると考えられる。

## E. 結 論

アストロサイトの極長鎖脂肪酸蓄積は、直接 ALD 発病と関連していないが、他のグリア細胞との相互作用に違いがある可能性が考えられた。今後、サイトカイン等の刺激に対する反応性の違いについて検討し、発病におけるアストロサイトの役割について検討したい。一方、ABCD4 については小胞体膜上でダイマーを含む複合体を形成し、生理的に重要な機能を担っている可能性が考えられた。今後、疾患との関わりについても解析する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kawaguchi K, Yurimoto H, Oku M et al :

Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS One*, 6, e25257, 2011

2) 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* 12, 694-706, 2011

3) Morita M and Imanaka T : Peroxisomal ABC transporters : structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* in press

### 2. 学会発表

1) Tomohiro T, Kashiwayama Y, Imanaka T, Hatanaka Y : Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzyme by diazirine-based photoaffinity labeling. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium : Frontier of Medicinal Science, Tokyo, 2011.9

2) 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 の細胞内局在化における N 末端疎水性アミノ酸配列の役割. 日本生化学会北陸支部第 29 回大会, 金沢, 2011.5

3) 守田雅志 : 極長鎖脂肪酸代謝異常と副腎白質ジストロフィー. 第 12 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム, 富山, 2011.6

4) 谷口範壮, 新保沙織, 守田雅志, 今中常雄 : ABCD1 欠損マウス脳由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝発現解析. 第 12 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム. 富山, 2011.6

5) 守田雅志, 新保沙織, 今中常雄 : ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 欠損アストロサイトの遺伝子発現解析. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9

6) 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) の存在状態の解析. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 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 の細胞内局在化機構ーヒト, 線虫及び粘菌での共通性ー. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 8) 李朝香, 朝日彰子, 阪口雅郎, 柏山恭範, 今中常雄: ABC タンパク質サブファミリー D のオルガネラ膜への選別輸送機構: N 末端マルチオルガネラ移行シグナルの解析. 第 10 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム, 仙台, 2011.10
- 9) 上杉泰介, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 加藤博章, 今中常雄: 小胞体膜上に局在する ABCD4 (P70R) の存在様式と機能. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 岡山, 2011.11
- 10) 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) の存在状態の解析. 日本薬学会北陸支部平成 23 年度第 1 回総会及び第 123 回例会, 金沢, 2011.11
- 11) 守田雅志, 新保沙織, 浜田知世, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーモデルマウス由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解析. 第 53 回日本先天代謝異常学会総会・第 10 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 千葉 2011.1
- 12) Uesugi T, Kashiwayama Y, Imanaka T: Complex formation of ABC protein, P70R/ABCD4 on endoplasmic reticulum membranes. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12
- 13) Morita M, Shinbo S, Asahi A, Imanaka T: Very long chain fatty acid  $\beta$ -oxidation in astrocytic cells ; contribution of ABCD1-dependent and -independent pathways. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12

#### 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 23 年の 1 年間の国内診断実績として、Zellweger 症候群 5 例、副腎白質ジストロフィー(ALD)のうち、小児大脳型 7 例、成人大脳型 2 例、AMN 1 例、女性保因者 12 例、発症前患者 2 例を診断した。このうち小児大脳型 ALD については、唯一の治療法が発症早期の造血幹細胞移植であることより、LC/MS/MS を用いた極長鎖脂肪酸分析と遺伝子解析による迅速診断を稼動し、いずれも数日から一週間以内に結果を提供して早期治療に繋げている。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 23 年の 1 年間に Zellweger 症候群を 6 例診断するとともに、新たにベトナムハノイ小児病院への診断支援として 6 家系 7 症例の ALD 患者を診断している。さらにペルオキシソーム病の病態解明のために、ペルオキシソーム形成異常症患者の線維芽細胞より iPS 細胞の樹立を行い、現在、神経細胞への分化を含めた研究を進めている。

長瀬 朋子(岐阜大学ゲノム研究分野・助教)

本田 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)

豊吉佳代子(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計(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末梢血ゲノムや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. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた極長鎖脂肪酸迅速診断システムの開発：

GC/MS 分析時と同様、血清を前処理にてメチル化、抽出後、アセトン 100  $\mu$ l にて再融解させたものをサンプルとした。移動相として酢酸アンモニウムおよびアセトニトリルを用い、C8 逆相カラムを用いて脂質を分離し、ESI 法でイオン化して Q-TOF に導入して MS 解析を行った。negative