

ion モードで測定し、各脂肪酸の m/z におけるマス
クロマトグラムを描出した。これを標準品分析
時の各脂肪酸の保持時間と照合することにより、
C22 : 0, 24 : 0, C25 : 0, C26 : 0 の各ピークを同
定し、C22 : 0 とのピーク面積比を算出した。

3. ペルオキシソーム形成異常症患者細胞よりの iPS 細胞の樹立及び神経分化 :

iPS 細胞樹立 : 診断に供与され、かつ同意が得
られた患者皮膚線維芽細胞を用いて、山中らの報
告 (Takahashi et al. Nature 2001) に基づき、皮
膚線維芽細胞 Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子
を導入し、SNL 細胞上で培養した。樹立した細胞
は SNL feeder 上で維持培養した。

神経分化 : PA6 と共培養を行う SDIA 法にて
行った。24 well plate を用いて培養し、Day21
に 4%PFA にて固定し、蛍光抗体染色にて神経幹
細胞マーカーである nestin およびニューロンマ
ーカーである TuJ の発現を検討した。

(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 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。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 患者を診断した。

2. LC/MS/MS による迅速診断法の開発 :

LC/MS/MS では 1 サンプルあたり 7 分で測定が
可能であり、GC/MS 測定よりも短時間に多検体
の解析が可能であった。24 : 0/C22 : 0, C25 :
0/C22 : 0, C26 : 0/C22 : 0 は、現時点では GC/MS
に比べて若干、ばらつきを認めるものの、対照と
比較してペルオキシソーム形成異常症および副腎
白質ジストロフィー患者血清では明らかな高値を、
ALD 保因者では高値傾向を示した。この解析結果
と遺伝子解析結果にて、小児大脳型 ALD 患者で
はいずれも検体受領より数日から一週間以内に、
診断結果を提供することが可能になった。

3. 患者細胞よりの iPS 細胞の樹立 :

神経分化条件での培養開始後、正常ヒト細胞由
来、患者皮膚細胞由来ともに、nestin positive の
細胞が認められ、現在、神経細胞への分化を確認
している。

D. 考 察

ペルオキシソーム病患者の診断支援による国際
貢献の取組みに関しては、従来のアラブ地域に加
えて、ベトナムハノイ小児病院と ALD 患者の診
断支援を開始した。その中には神経症状の未発症
患者も含まれており、今後、造血幹細胞移植を含
めた現地での治療体制の確立も課題である。国内
に関しては、ペルオキシソーム形成異常症患者で
は唯一の診断施設としてこの一年間に 5 症例を診
断するとともに、両親の希望に基づき保因者診断
も施行し、次子への対応の正確な情報提供も行っ
ている。また大脳型 ALD 患者の克服に向け、発
症後患者の LC/MS/MS による迅速診断と発症者
の家系解析による発症前診断を進めることにより、
本症の早期介入への取組みを支援している。
LC/MS/MS による迅速診断では ALD 患者では対
照に比して明らかな高値を示しており、今後も
GC/MS データと比較しながら解析数を増やして

より信頼性のある解析結果を提供して行くとともに、将来的にはろ紙血によるハイスループットな解析法を確立して、マススクリーニングの導入も視野に開発研究を進めていく。発症前患者に関しては、当施設での診断時からの長期にわたるフォローアップ体制を確立するとともに、ABCD1 遺伝子変異や家系に相関しない臨床型や発症を規定する因子を、ゲノムリソースやiPS細胞、さらにABCD1 ノックアウトマウスの発症実験等により、解明して行く。

ペルオキシソーム代謝機能全般については、今回、樹立中のペルオキシソーム形成異常症患者のiPS細胞や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、国内外のペルオキシソーム病患者を診断して最新の医療情報を提供するとともに、唯一、治療法のある大脳型ALDに対しては出来るだけ迅速な診断を可能にして早期移植に繋げている。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進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表(書籍)

- 1) 下澤伸行：脳肝腎症候群(ツェルウェーガー症候群)：症候群ハンドブック，東京：中山書店，126-127, 2011
- 2) 下澤伸行：Zellweger 症候群. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編，東京：診断と治療社，146-148, 2011
- 3) 鈴木康之，小関道夫，下澤伸行：副腎白質ジス

トロフィー. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編，東京，診断と治療社，149-151, 2011

- 4) 下澤伸行：RCDP type1. 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編，東京，診断と治療社，152-153, 2011

2. 論文発表(論文)

- 1) Shaheen R, Al-Dirbashi OY, Al-Hassnan ZN, et al. : Clinical biochemical and molecular characterization of peroxisomal diseases in Arabs. Clin Genet, 79 : 60-70, 2011
- 2) Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, et al. : 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, 12 : 41-50, 2011
- 3) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, et al. : ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. Current Drug Targets, 12 : 694-706, 2011
- 4) Shimozawa N, Honda A, Kajiwara N, et al. : X-linked adrenoleukodystrophy : Diagnostic and follow-up system in Japan. J Hum Genet, 56 : 106-109, 2011
- 5) Shimozawa N : Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases. Brain Dev, 33 : 770-776, 2011
- 6) Kozawa S, Honda A, Kajiwara N, et al. : Induction of peroxisomal lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. Mol Med Report, 4 : 1157-1162, 2011.
- 7) 三善陽子，酒井規夫，池田佳世，他：副腎白質ジストロフィーの日本人男児 11 例に置ける副

腎機能解析, 日本内分泌学会雑誌, 87 suppl
83-85. 2011

8) 下澤伸行: ペルオキシソーム病 (Zellweger 症
候群, 原発性高シュウ酸尿症 1 型). 別冊日本
臨床 新領域別症候群シリーズ No17 腎臓症

候群 (第 2 版), 369-373, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

E66Q アミノ酸置換を伴う α -ガラクトシダーゼ A の研究

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

近年、ファブリー病スクリーニングで高頻度に見つかる E66Q を伴う GLA が、ファブリー病の直接的な原因になるか否かが、臨床において問題になっている。我々は、E66Q に基づく GLA の構造変化を予測すると共に、当該 GLA を持つ症例から血液および生検皮膚組織を入手し、生化学的および病理学的解析を行った。in silico での構造解析の結果、E66Q のアミノ酸置換に基づき、GLA 活性部位から離れた分子表面領域に小さな構造変化が起こると考えられた。この構造変化により、E66Q を伴う GLA は、対照に比べて血漿での安定性が減少すると思われる。しかし、E66Q を伴う GLA を持つ症例の白血球には、かなりの残存活性が存在すると共に、皮膚組織においてファブリー病に特徴的な病理学的変化は見られず、線維芽細胞内のグロボトリアオシルセラミド量や血漿中のグロボトリアオシルスフィンゴシン量の増加も認められなかった。これらの解析結果から、E66Q はファブリー病の原因ではなく、機能的亜型であると考えられた。

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)
月村 考宏(明治薬科大学分析化学 大学院生)
児玉 敬(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)
齋藤 静司(北海道情報大学医療情報学 准教授)

ミノ酸置換を惹起する遺伝子変異を併せ持つ古典型ファブリー病患者で発見されたが、その後、亜型ファブリー病と考えられる患者で同定されたことから、亜型ファブリー病の原因遺伝子変異のひとつではないかと考えられて来た。しかし、最近、この塩基置換を持つ症例が、日本だけでなく、韓国でもかなりの高頻度で見つかること、その症例において白血球を試料とした GLA 活性測定を行うと、対照の 20%以上の残存活性を示すことが明らかになった。c.196G>C に基づく E66Q アミノ酸置換がファブリー病の直接的な原因となるか否かは、治療法を策定する上で大きな意義を持つ。

本研究は、E66Q を伴う GLA の性状を明らかにすることを目的として行った。

A. 研究目的

近年、ファブリー病に対する酵素補充療法の導入に伴い、早期診断と早期治療のため、乾燥濾紙血や血漿・血清を試料とした α -ガラクトシダーゼ A (GLA) 活性測定による本疾患のスクリーニングが行われている。その結果、GLA 遺伝子に c.196G>C 塩基置換 (GLA 蛋白質に E66Q アミノ酸置換を惹起する) を有する症例が、スクリーニングにおいて陽性を示した症例群の中に多数見つかった。

この塩基置換は、最初、同じアレルに R112C ア

B. 研究方法

1) 試料

原因不明の腎疾患、心疾患および脳血管障害を呈する約 2,500 名の日本人男性患者 (年齢: 45-83 歳)

に対して行われた、血清を試料とする GLA 活性測定において、1.5nmol/h/ml 以下の値を示し、遺伝子解析で c.196G>C 塩基置換(E66Q アミノ酸置換)が認められた 9 症例から血液を、その中の 1 症例からは生検皮膚組織を得て、試料として用いた。

2) GLA 活性測定

血漿および白血球中の GLA 活性測定は、4-メチルウムベリフェリル- α -D-ガラクトピラノシドを基質とした蛍光法で行った。酵素反応は 37°C で行い、反応時間は、血漿の場合には 4 時間、白血球の場合は 30 分間とした。また、血漿 GLA の安定性を調べるため、酵素反応時間を、夫々、15、30、60、120、180 および 240 分間とした場合の酵素活性値を求めた。

3) 血漿グロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) の測定

血漿中の Lyso-Gb3 をクロロホルム/メタノール法で抽出した後に、 α -フサルアルデヒド誘導体化を行い、高速液体クロマトグラフィーで、血漿中の Lyso-Gb3 濃度を測定した。

4) 生検皮膚組織の病理学的解析

生検で得られた皮膚組織を試料として、電子顕微鏡で病理学的解析を行った。

5) 培養皮膚線維芽細胞の免疫化学的解析

生検で得られた皮膚組織から培養皮膚線維芽細胞株を樹立し、これを試料として抗グロボトリアオシルセラミド(Gb3)抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

6) GLA の構造学的解析

ヒト GLA の結晶構造情報(PDB:1R46)を基に、ホモロジーモデリングにより、E66Q アミノ酸置換を持つ GLA 変異体の構造予測を行った。この変異体 GLA と野生型 GLA とを比較し、E66Q による GLA の立体構造変化を予測した。

(倫理面への配慮)

本研究は、明治薬科大学倫理委員会の承認を得るとともに、インフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

1) 血漿および白血球中の GLA 活性

E66Q を伴う GLA を有する 9 症例の血漿および白血球中の GLA 活性は、夫々、対照平均の $19 \pm 6\%$ および $42 \pm 13\%$ (平均 \pm 標準偏差) であり、既知のファブリー病患者における GLA 活性値(いずれも対照平均の 10%以下)に比べると高く、特に白血球で残存活性が高かった。

2) 血漿中の GLA 活性の安定性

血漿中の E66Q を伴う GLA の活性は、酵素反応時間が長くなると共に低下し、反応時間 240 分間での活性値は、反応時間 15 分間での活性値の約 35%にまで低下した。一方、対照 GLA の活性は約 95%の値を維持した。

3) 血漿中 Lyso-Gb3 の濃度

既知の古典型および亜型ファブリー病男性患者の血漿中 Lyso-Gb3 濃度は、夫々、 $100 \pm 48\text{nM}$ [n=15] および $35 \pm 25\text{nM}$ [n=5] と、対照値($< 2\text{nM}$ [n=20])に比べて高い値を示した。一方、E66Q を伴う GLA を有する男性の血漿中 Lyso-Gb3 濃度は、全例で 2nM 以下であった。

4) 皮膚組織の電子顕微鏡所見

E66Q を伴う GLA を有する男性から生検で得られた皮膚組織の血管、エクリン汗腺、末梢神経および立毛筋を電子顕微鏡で観察した所、ファブリー病患者で見られる特徴的な層状封入体は見られなかった。

5) 培養皮膚線維芽細胞中の Gb3 の免疫染色

生検皮膚組織から樹立した培養皮膚線維芽細胞を試料として、抗 Gb3 抗体を用いて免疫蛍光染色

を行った。既知のファブリー病患者由来の細胞では、細胞内に顆粒状の強い蛍光が検出されたが、E66Qを伴うGLAを有する男性由来の細胞では、Gb3に対する染色性が認められなかった。

6) E66Qに基づくGLAの構造変化

E66Qアミノ酸置換に基づくGLAの構造変化は、分子表面近くの領域に限定される小さなもので、活性部位に影響を与えないと考えられた。

D. 考察

E66Qアミノ酸置換により、GLAの分子表面に小さな構造変化が起り、コンフォーメーションが変わることになり、1分子当たりのGLA酵素活性は維持されるが、当該分子は不安定になると考えられた。そのため、長時間の反応時間が必要な乾燥濾紙血や血漿・血清を試料としたGLA活性測定によるファブリー病スクリーニングでは、E66Qを伴うGLAを持つ症例は、陽性として検出されるものと思われる。しかし、短時間の反応時間で行われる白血球中GLA活性測定では、本症例はかなりの残存活性を示すことになると考えられる。Lecらは、E66Qを伴うGLAの発現実験により、生合成された酵素の少なくとも一部がリソソームに到達することを報告している。この酵素の働きにより、リソソームではGb3の分解が起こると考えられる。電子顕微鏡を用いた病理学的解析や免疫蛍光染色による生化学的解析の結果は、それを裏付けるものであった。これらの解析結果から、E66Qは、ファブリー病の直接的原因にならないと考えられる。今後、その他の因子が加わることにより、ファブリー病を発症する可能性に関しては、十分に検討する必要があるが、E66Qを持つ症例の治療に当たっては、直ちに酵素補充療法を開始せず、真にファブリー病に特徴的な病理または生化学的特徴を有するか否かを検証する必要があると考えられる。

E. 結論

E66Qアミノ酸置換は、機能的亜型であり、ファ

ブリー病の直接的な原因ではないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Togawa T, Tsukimura T, Kodama T, et al : Fabry disease : Biochemical, pathological and structural studies of the α -galactosidase A with E66Q amino acid substitution. Mol Genet Metab doi : 10. 1016/j. ymgme. 2012. 01. 010
- 2) Saito S, Ohono K, Sekijima M, et al : Database of the clinical phenotypes, genotypes, and mutant arylsulfatase B structures in mucopolysaccharidosis type VI. J Hum Genet doi : 10. 1038/jhg, 2012.6
- 3) Saito S, Ohno K, Suzuki T, et al : Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. Mol Genet Metab, 105 : 244-248, 2012
- 4) Tsukimura T, Kawashima I, Togawa T, et al : Efficient uptake of recombinant α -galactosidase A produced with a gene-manipulated yeast by Fabry mice kidneys. Mol Med doi : 10. 2119/molmed. 2011. 00248
- 5) Tajima Y, Saito S, Ohno K, et al : Biochemical and structural study on a S529V mutant acid α -glucosidase responsive to pharmacological chaperones. J Hum Genet, 56 : 440-446, 2011
- 6) Tsukimura T, Chiba Y, Ohno K, et al : Molecular mechanism for stabilization of a mutant α -galactosidase A involving M51I amino acid substitution by imino sugars. Mol Genet Metab, 103 : 26-32, 2011

2. 学会発表

- 1) 児玉 敬, 兎川忠靖, 川島育夫, 石田洋一, 鈴木 實, 辻 大輔, 伊藤孝司, 千葉靖典, 月村

- 考宏, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: リゾ-GM2 ガングリオシド: GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカー, 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011.3
- 2) 黒田麻祐子, 鈴木俊宏, 小谷政晴, 田島陽一, 川島育夫, 兎川忠靖, 辻 大輔, 伊藤孝司, 千葉靖典, 福重智子, 金蔵拓郎, 櫻庭 均: Sandhoff 病モデルマウス由来ニューロスフェアにおけるヒト組み換え Hex A 酵素の取り込み. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011.3
 - 3) 月村考宏, 田中利絵, 児玉 敬, 川島育夫, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均: ファブリー病のハイリスク・スクリーニング. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011.3
 - 4) 兎川忠靖, 児玉 敬, 川島育夫, 月村考宏, 鈴木俊宏, 福重智子, 金蔵拓郎, 櫻庭 均: ファブリー病の治療のバイオマーカー: Lyso-Gb3. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011.3
 - 5) 櫻庭 均: ファブリー病データベース: その分子病態解明と臨床表現型予測への応用. 第 53 回日本小児神経学会総会, 横浜, 2011.5
 - 6) 北風圭介, 堂園幸恵, 辻 大輔, 櫻庭 均, 田島陽一, 伊藤孝司: ヒト β -hexosaminidase と GM2 activator protein との相互作用の解析. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 7) 月村考宏, 田中利絵, 児玉 敬, 川島育夫, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均: ファブリー病ハイリスク・スクリーニングの有用性と問題点. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 8) 兎川忠靖, 月村考宏, 児玉 敬, 田中利絵, 川島育夫, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: ファブリー病の診断における α -ガラクトシダーゼの E66Q アミノ酸置換の重要性. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 9) 堂園幸恵, 辻 大輔, 松岡和彦, 北風圭介, 櫻庭 均, 伊藤孝司: 改変型ヒト β -Hexosaminidase B の高発現 CHO 細胞株の樹立と無血清大量培養系の構築. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 10) 田島陽一, 横山清司, 川島育夫, 貞任大地, 設楽浩志, 多屋長治, 月村考宏, 廣井隆親, 芝崎太, 櫻庭 均: 免疫寛容ファブリー病モデルマウスを用いた新規ファブリー病酵素補充法の検討. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 11) 川島育夫, 渡邊 徹, 千葉靖典, 児玉 敬, 月村考宏, 兎川忠靖, 芝崎 太, 櫻庭 均: 遺伝子操作した酵母より生産した組換えヒトサポシン B の α -ガラクトシダーゼ A 活性増強効果. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 12) 児玉 敬, 兎川忠靖, 川島育夫, 石田洋一, 鈴木 實, 辻 大輔, 伊藤孝司, 千葉靖典, 月村考宏, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカーとしての Lyso-GM2. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
 - 13) 月村考宏, 兎川忠靖, 児玉 敬, 田中利絵, 川島育夫, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: GLA における p.E66Q は遺伝的多型か. 第 16 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2011.9
 - 14) 児玉 敬, 兎川忠靖, 川島育夫, 石田洋一, 鈴木 實, 辻 大輔, 伊藤孝司, 月村考宏, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: Lyso-GM2: GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカー. 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, 2011.11
 - 15) 兎川忠靖, 児玉 敬, 月村考宏, 柏 志保, 川島育夫, 鈴木俊宏, 櫻庭 均: ファブリー病のバイオマーカーとしての lyso-Gb3 の評価. 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, 2011.11
 - 16) 田中利絵, 月村考宏, 児玉 敬, 川島育夫, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均: ファブリー病男性患者のためのハイリスク・スクリーニング. 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, 2011.11

- 17) 森山厚子, 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 児玉 敬, 福重智子, 金蔵拓郎, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均: 改変型 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの生産と精製. 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, 2011.11
- 18) 月村考宏, 田中利絵, 児玉 敬, 川島育夫, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 櫻庭 均: E66Q を伴う α -ガラクトシダーゼ A の生化学的及び病理学的解析. 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, 2011.11

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

日本人ムコリピドーシスⅡ/Ⅲの病態解析と治療法の開発

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、この疾患の病態解明とライソゾーム酵素の補充による治療法の開発を行なった。正常細胞から塩化アンモニウム処理によりライソゾーム酵素の抽出法を用いて、疾患細胞に処理することにより、基質蓄積、pH 変化、オートファジー、エンドサイトーシス、病理などの病態が著明に改善することを確認した。

A. 研究目的

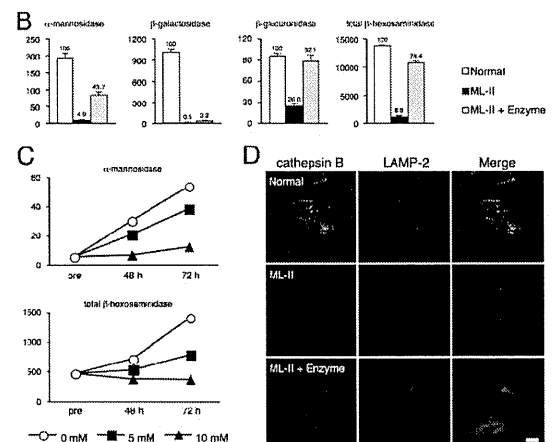
ムコリピドーシスⅡ/Ⅲ(MLⅡ/Ⅲ)の患者の培養皮膚線維芽細胞においてライソゾーム酵素の糖鎖のリン酸化が障害されることにより、様々な基質が蓄積することが基本病態と考えられるが、それ以外にライソゾームの pH、オートファジー、膜のエンドサイトーシスなどにおける病態を解明する。また正常細胞内のライソゾーム酵素を塩化アンモニウム処理することによって培養液中に放出する現象を用いて、ライソゾーム酵素の混合液を作成し、患者細胞に負荷して治療効果を調べる。

B. 研究方法

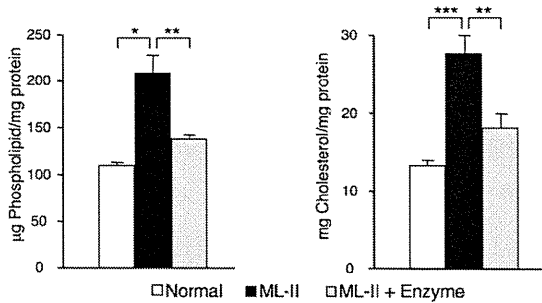
- 1) ライソゾーム酵素混合液の作成; 正常細胞に塩化アンモニウムを負荷し、培養液中に出てきた酵素を濃縮して作成した。
- 2) ライソゾームの pH の変化; LysoSensor を用いて細胞を染色し、ライソゾームの pH を測定し、正常との差を調べ、治療によってどうなるかを解析した。
- 3) ライソゾームの基質として Phospholipid と Cholesterol を例にとりその量を正常と比較し、治療効果を調べた。
- 4) ライソソームの数(量)を LysoTracker と DAPI との蛍光量を用いて測定し、正常細胞と

の差を調べ、治療による効果を解析した。

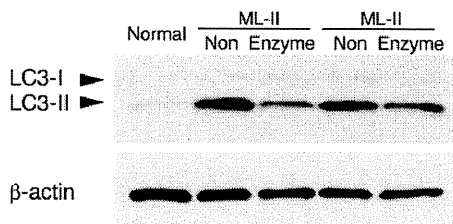
- 5) BODIPY-Cer を培養細胞に負荷し、その取り込みを最上細胞と比較し、治療効果を解析した。
 - 6) オートファジーの状態を LC3 の Western を用いて正常と比較し、酵素治療での反応を見る。またミトコンドリアの形態変化についても観察した。
 - 7) 電子顕微鏡で Inclusion body の様子を酵素治療の前後で観察した。
- 1) ライソゾーム混合液の酵素活性を、正常細胞の培養液上清と比較すると、 β -hexosaminidase A の 20 倍を最高に上昇しており、そのパターンは、MLⅡ細胞の上清における漏れ出た酵素活性の比と類似していた。これを疾患細胞に負荷したあと細胞内の酵素活性は負荷前より上昇し、これは M-6-P の濃度依存性に阻害された。



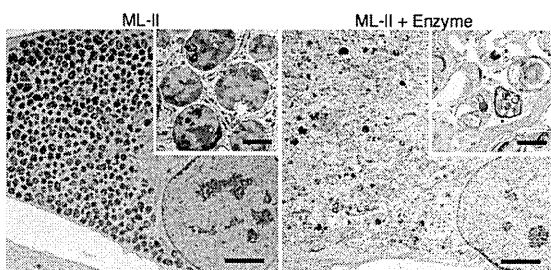
- 2) ライソゾームの pH は正常で 4.8 なのに対し、5.3 と上昇し、酵素治療に反応して 5.0 程度に回復した。
- 3) ライソゾームの基質は正常に比し疾患細胞で増加していたが、これは酵素治療に反応して回復した。



- 4) ライソゾームの DAPI 染色に対する比としての量は正常で 0.4 であったが疾患細胞で 1.2 と増加し、治療によって 0.8 と低下した。
- 5) エンドサイトーシスの状態を BODIPY-Cer の取り込みでみると、ML II ではゴルジ領域に停滞していた流れが、酵素治療後は正常化していた。
- 6) 正常細胞に比し ML II 細胞では LC3 の発現が上昇しているが、これも治療により改善が Western でみられた。またミトコンドリアの形態も ML II では fragmentation が多いのが治療により改善がみられた。



- 7) 顕微鏡で見る Inclusion body は酵素治療後に明らかに減少していることが観察された。



D. 考 察

ムコリピドーシスの繊維芽細胞ではライソゾーム酵素の運搬障害により、ライソゾーム内の酵素が減少し、その分解基質が蓄積するのみならず、pH 上昇、エンドサイトーシスの異常、オートファジー亢進、ミトコンドリアの形態異常など様々な細胞機能に異常を来していることが解明された。またこれがライソゾーム酵素の調整混合液を用いた治療により、多くの細胞機能がかなり改善することが認められ、今後 *in vivo* での効果を試す意義があると考えられる。

E. 結 論

ムコリピドーシスは大半のライソゾーム酵素の減少をとともなうことにより、基質の蓄積以上に細胞内の様々な機能異常を来しているが、ライソゾーム酵素の混合液の治療により、有効に細胞内に取り込まれることが明らかになり、今後の治療開発の将来性を示すものと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi H et al : Pathology of the first autopsy case diagnosed as mucopolipidosis type III α/β suggesting autophagic dysfunction., *Mol Genet Metab.* 102(2) : 170-5, 2011
- 2) Yamamoto T et al : Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy : The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening., *Mol Genet Metab.* 102(4) : 399-406, 2011
- 3) Otomo T et al : Lysosomal storage causes cellular dysfunction In mucopolipidosis II skin fibroblasts., *J Biol Chem,* 286(40) : 35283-90, 2011
- 4) Hashimoto N, Kagitani-Shimono K, Sakai N et al : SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1

- deficiency syndrome, *J Hum Genet*, 56(12) : 846-51, 2011
- 5) Akagi M et al : Clinicogenetical features of a Japanese patient with giant axonal neuropathy., *Brain Dev*, 34(2) : 156-62, 2012
- 6) Otomo T et al : Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolidosis II skin fibroblasts., *Mol Genet Metab*, 105(2) : 266-9, 2012
- ## 2. 学会発表
- 1) Sakai N, Hossain A, Otomo T, Hamada Y, Okinaga T, Ohta H, Ozono K : Patients with Krabbe disease in Japan : phenotype and treatment, 10th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Spain, 2011.4
- 2) 濱田悠介, 大友孝信, 酒井規夫, 大菌恵一, 田中雅嗣: ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対する呼気ガス試験による診断の試み, 第7回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2011.6
- 3) 濱田悠介, 東 純史, Hossain MA, 正嶋和典, 大友孝信, 曹 秀樹, 酒井規夫, 大菌恵一: 胆のう乳頭腫を呈した異染性白質ジストロフィーの2症例, 第7回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2011.6
- 4) 酒井規夫: ミニレクチャー「ライソゾーム病の遺伝カウンセリング」, 第7回近畿先天代謝異常症研究会, 大阪, 2011.6
- 5) 佐藤友紀, 酒井規夫, 金川武司, 大友孝信, 濱田悠介, 國府 力, 小巻正泰, 吉津紀久子, 西田千夏子, 市村沙希, 松村泰志, 野口眞三郎: 大阪大学病院における電子カルテによる遺伝子情報管理の取り組み, 遺伝医学合同学術集会 2011, 京都, 2011.6
- 6) 小巻正泰, 酒井規夫, 金川武司, 大友孝信, 濱田悠介, 國府 力, 佐藤友紀, 吉津紀久子, 西田千夏子, 市村沙希, 野口眞三郎: 全国遺伝子医療部門におけるホームページに関する実態調査報告, 遺伝医学合同学術集会 2011, 京都, 2011.6
- 7) Hossain MA, Otomo T, Hamada Y, Akagi M, Ozono K, Sakai N : Screening of seven common mutations is effective to predict the phenotypes of Krabbe disease patients in Japan, ライソゾーム病スクリーニング東京会議 2011, 東京, 2011.8
- 8) 酒井規夫, 濱田悠介, Hossain MA, 大友孝信, 大菌恵一: 後期乳児型異染性白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の効果について, 第16回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2011.9
- 9) 酒井規夫, 濱田悠介, 大友孝信, 乾 幸治, 大菌恵一: ゴーシェ病I型に対する酵素補充療法の長期経過について, 第16回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2011.9
- 10) 大友孝信: Mucopolidosis II : Pathophysiology to Therapy (ムコリピドーシスII型の病態解明と治療法の開発), 第16回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2011.9
- 11) 大友孝信, 檜垣克美, 難波栄二, 大菌恵一, 酒井規夫: ムコリピドーシスII型・III型に対する新しい治療法の開発(1)全ライソゾーム酵素補充法の確立, 第53回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 12) 大友孝信, 檜垣克美, 難波栄二, 大菌恵一, 酒井規夫: ムコリピドーシスII型・III型に対する新しい治療法の開発(2)酵素補充療法による治療効果, 第53回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 13) 大友孝信, 大菌恵一, 酒井規夫: ムコリピドーシスII型(I-cell disease)細胞におけるゲニステインの効果について, 第53回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 14) 濱田悠介, 中野さやか, 新寶理子, 東 純史, 大友孝信, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛志, 酒井規夫, 大菌恵一: ムコ多糖症II型の発達と

- 発育に対する酵素補充療法の効果, 第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 15) 濱田悠介, 林 真貴子, 豊田健太郎, 下野九理子, 沖永剛志, 酒井規夫, 大藺恵一, 松下賢治, 阿部暁子, 早坂 清: 多彩な症状を呈した OPA1 異常症の兄妹例, 第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 16) 濱田悠介, 中野さやか, 新寶理子, 東 純史, 大友孝信, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛志, 酒井規夫, 大藺恵一: 非常に緩徐な神経学的進行を呈した副腎白質ジストロフィーの一症例, 第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 17) ホセインモハンマドアリフ, 大友孝信, 濱田悠介, 赤木幹弘, 大藺恵一, 酒井規夫: In vitro transient experiment for the common mutations of Krabbe disease in Japan, 第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会, 千葉, 2011.11
- 18) Sakai N : Respiratory impairment and NPPV treatment in patients with late-onset Pompe disease receiving enzyme replacement therapy, 5th European Symposium on Steps Forward in Pompe Disease, Hungary, 2011.12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

特願 2011-101560(発明の名称: リソソーム病治療用医薬組成物)として 2011 年 4 月 28 日に
出願

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と関連し重要である。本研究では酸性スフィンゴミエリナーゼ (Acid sphingomyelinase : ASM) 酵素がエンドゾーム内においてコレステロール輸送調節作用を有することを明らかとし、脂質蓄積病治療に関して ASM 活性を調節する薬剤の可能性を示した。

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およびニーマンピック C 型 (NPC1^{Nova Scotia} : Nova Scotia 型遺伝子異常) リンパ芽球に対して、ASM アクチベーターである酪酸 (butyrate) を添加 (10mM) し、各細胞の 1) ASM 活性、2) ASM mRNA レベル、及び 3) 細胞内コレステロール含量を調べた。次に、ニーマンピック病 C 型皮膚線維芽細胞および ASM 欠損皮膚線維芽細胞に関して、酪酸 (butyrate) 添加の有無により細胞内遊離コレステロールをフィリピン染色で調べ検討した。

C. 研究結果

研究結果は以下の通りであった。

1) 24 時間 10mM 酪酸添加後、正常および NPC1^{Nova Scotia} 培養リンパ芽球の ASM 活性は、負荷前と比較しそれぞれ 3.3 倍および 4.6 倍と有意に増加した ($p < 0.01$)。特に、NPC1^{Nova Scotia} 培養リンパ芽球における ASM 活性は正常レベルまで回復した。2) 両細胞の ASM mRNA 発現レベルは、24 時間 10mM 酪酸添加後、著明に増加した ($p < 0.01$)。3) NPC1^{Nova Scotia} 培養リンパ芽球における、

酪酸添加前および 10mM 酪酸添加後の細胞内遊離コレステロール量は 0.026 ± 0.006 および $0.019 \pm 0.002 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$ であり、酪酸添加により有意に低下した ($p < 0.05$)。また、4) NPC1^{Nova Scotia} 皮膚線維芽細胞におけるフィリピン染色では、24 時間 10mM 酪酸添加後、細胞内遊離コレステロール蓄積の劇的な減少が観察された。しかし、5) 2 種類の ASM 欠損皮膚線維芽細胞では酪酸添加後フィリピン染色で、細胞内遊離コレステロールの蓄積の減少を認めなかった。

D. 考 察

ASM 活性のアクチベーターとして知られる酪酸 (butyrate) は、培養リンパ芽球に対して ASM mRNA を上昇させることで ASM 活性を上昇させる。そして、二次的 ASM 活性低下がみられる C 型細胞においては、ASM 活性を正常化する。また、この作用により C 型患者細胞の 1 つである NPC1^{Nova Scotia} では、細胞内蓄積遊離コレステロールを減少させた。細胞内遊離コレステロール蓄積は本疾患の基本病態であり、二次的 ASM 活性の低下を回復させることで、蓄積コレステロールを減少させたことは、今後の ASM 酵素を調節する薬剤開発の可能性を示すものである。

今回の対象とした C 型細胞は、比較的軽症のタ

イプであり、重症度の違う細胞に対する検討や新たな ASM 活性のアクチベーターの検索など今後の課題である。

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) Sato Y, Ishida-Nakajima W, Kawamura M, Miura S, Oguma R, Arai H, Takahashi T : Hypoxia-ischemia induces hypophosphorylation of collapsing response mediator protein 2 in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia, *Brain Res*, 1386, 165-174, 2011

2. 学会発表

なし

G. 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)に関する調査研究

分担研究者：大澤真木子(東京女子医科大学小児科主任教授)

研究要旨

小児型 Pompe 病における骨格筋画像評価の有用性について検討する

研究協力者

石垣 景子(東京女子医科大学小児科講師)

A. 研究目的

小児型 Pompe 病の骨格筋画像の特徴から、早期診断、治療経過評価への有用性を検討する。

B. 研究方法

3名の小児型 Pompe 病患者における骨格筋 CT・MRI について後方視的に検討した。うち2名は酵素補充療法(ERT)中であり、臨床症状の進行と画像所見を経時的に比較検討した。(倫理面への配慮)個人が特定される情報は厳密に管理し、患者両親よりインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

患者1は29歳で死亡した自然経過例の男性。患者2はERT開始後、一旦著明改善したが、その後退行した治療抵抗例の14歳男子。患者3は2歳6か月時よりERT開始した治療反応性良好な4歳3か月女児。患者1は診断時より骨格筋CTで大腿直筋に高吸収域を認め、自然経過と共に高吸収域がマーブル状に拡大し最終的に筋全体が高吸収域となった。経過不良な患者2は、経過中、骨格筋CTで局所的高吸収域の拡大を認め、徐々に低吸収域の混在を認めるようになった。MRIではT1Wで極わずか、脂肪抑制像で鮮明な高信号域を大腿直筋と大内転筋に認めた。臨床像の変化に無関係に脂肪抑制画像での高信号域は拡大した。経

過良好な患者3は、開始時に骨格筋全体のCT値上昇を認めるのみで、局所的高吸収域・脂肪抑制MRIの高信号を認めなかった。患者2、3で骨格筋全体のCT値上昇はERTにより改善したが、患者2の局所的高吸収域は治療に無反応に拡大した。

D. 考察

我々は以前、小児型における高吸収域がグリコーゲン蓄積によるのみでなく、貪食空胞内のカルシウム(Ca)沈着によることを証明した。骨格筋CTにおいて、ERTで改善を示した筋全体のCT値は含有グリコーゲンの減少、治療開始後も進行した骨格筋CTの局所的高吸収域、MRI脂肪抑制像における高信号域はCa沈着を反映していると推察する。治療抵抗性の患者2の骨格筋CTでは高吸収域に低吸収域が混在し、成人型と同様、脂肪置換と考える。

E. 結論

異なる治療反応性を示す両患者の骨格筋CT、脂肪抑制MRIの変化は臨床効果をよく反映し、治療効果判定に有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishigaki K, Murakami T, Osawa M et al. : Close monitoring of initial enzyme replacement therapy in a patient with childhood-onset Pompe disease. Brain Dev,

34(2) : 98-102, 2012.2

- 2) Ishigaki K, Yoshikawa Y, Osawa M et al. : High-density CT of muscle and liver may allow early diagnosis of childhood-onset Pompe disease. Brain Dev, 34(2) : 103-6, 2012.2

2. 学会発表

- 1) Ishigaki K, Saito T, Kuwatsuru R, Murakami T, Sato T, Onai S, Nonaka I, Osawa M : Longitudinal study of skeletal muscle images in childhood-onset Pompe disease patients receiving enzyme

replacement therapy (ERT). 16th International Congress of the World Muscle Society, Algarve, Portugal, 2011.10

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

パーキンソン病感受性遺伝子探索

分担研究者：辻 省次(東京大学神経内科教授)

研究要旨

ファブリー病の原因遺伝子である α ガラクトシダーゼ A 遺伝子について、PD の疾患感受性遺伝子の候補と考えて関連解析を行った。E66Q 変異が PD 群でやや高い傾向を認めた。

A. 研究目的

我々はパーキンソン病(PD)の疾患感受性遺伝子として、GBA 遺伝子が重要であることを既に報告した。

ライソゾーム病関連遺伝子と PD の関連をさらに探るため、ファブリー病の原因遺伝子 GLA に注目して関連解析を行った。

B. 研究方法

PD 患者(男性 78 例、女性 104 例、計 182)対照者(男性 124 例、女性 151 例、計 175)について GLA 遺伝子の全エクソンを直接塩基配列決定法にて解析した。

(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

患者群・対照群の全検体で E66Q 変異のみを認めた。PD 患者で 4 例(男性 3 例、女性 1 例)対照者で 2 例(男性 1 例、女性 1 例)アレル頻度で比較すると PD 患者で 1.5%、対照者で 0.5%と PD 患者でやや高い傾向を認めたが、Fisher exact テストでは p 値は 0.34 と有意差は認めなかった。

D. 考察

E66Q 変異は、酵素活性の低下を認め、ファブリー病の原因変異として報告されていた。しかし

その後、韓国のグループから E66Q は一般人口の 1%程度のアレル頻度をもつことが報告され、さらに E66Q 変異患者の生化学的解析で GL-3 の蓄積がみられないことから、病原性変異ではなく、機能的多型と考えられている。

E. 結論

GLA について PD の関連解析を行った。PD 患者群で E66Q のアレル頻度がやや高い傾向を認めたが、サンプル数が少なく結論には至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 三井 純: パーキンソン病における GLA 遺伝子解析. 第 7 回日本ファブリー病フォーラム, 東京, 2011.7

H. 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

Adrenoleukodystrophy の臨床病型を修飾する遺伝的要因の探索

分担分担者：辻 省次(東京大学神経内科教授)

研究要旨

副腎白質ジストロフィーの多様な臨床病型を規定する、遺伝的要因を探索することを目的として、ペルオキシソーム機能に関わる遺伝子を候補として探索するアプローチと、網羅的なゲノム配列解析に基づき、本疾患の臨床病型を規定する遺伝的要因を探索する。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、小児大脳型や思春期以降に発症する adreno-Myeloneuropathy (AMN) など多彩な臨床病型が知られており、同一家系内においても臨床病型は多様であり、genotype-phenotype correlation はないとされている。本研究では、ALD の臨床病型の多様性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的として、ペルオキシソーム機能に関連する遺伝子を候補遺伝子としたアプローチ、網羅的なゲノム配列解析に基づく探索を行う。

B. 研究方法

ALD 患者 55 例(小児大脳型 16 例, 思春期大脳型 3 例, 成人大脳型 6 例, AMN から大脳型への移行例 4 例, 小脳脳幹型 2 例, AMN21 例, Addison 病 1 例, 未発症 2 例)について PEX5, 13, 14 遺伝子の全エクソン, 5'UTR, 3'UTR を直接塩基配列決定法にて解析した。

次世代シーケンサーを用いて、exon capture により、全エクソンの塩基配列を決定する。

(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

PEX5 において 5 つの新規 SNP, 2 つの既知の SNP を, PEX13 において 2 つの既知の SNP を, PEX14 において 4 つの新規の SNP, 5 つの既知の SNP を認めた。日本人の ALD 患者において明らかな表現型との関連は認めなかった。

exon capture により、エクソン部分を濃縮し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な塩基配列解析システムを構築した。

D. 考察

今後、本研究で確立した網羅的な exome 解析を用いて、ALD の臨床病型を規定する遺伝的要因の探索を進める。

E. 結論

ALD の多彩な臨床像を規定する因子を探索するためには、今後さらに多数の症例に関して原因遺伝子及び関連遺伝子を解析、さらに関連が示唆された遺伝子多型については、その機能解析を行っていくことが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 松川敬志 他：副腎白質ジストロフィー患者における PEX5 遺伝子の全塩基配列解析及び表現型における関連解析第. 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011.5

2) Matsukawa T, et al. : Comprehensive resequencing of PEX5, PEX13 and PEX14 gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and

association studies with the phenotypes of ALD. American Society of Human Genetics, Montreal, 2011.10

H. 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

ライソゾーム病の病態・治療に関する基礎的研究—特に中枢神経障害に対する治療法の研究並びに iPS 細胞を用いての研究

研究代表者：衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座)

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

ライソゾーム病の 90%以上は中枢神経障害を来す。中枢神経障害の治療法として、髄注による治療法の開発を検討した。即ち酵素を直接ムコ多糖症 II 型のマウス脳室内に投与することにより中枢神経系並びに各臓器への治療効果を明らかにした。又 iPS 細胞を用いての研究として、ポンペ病は心筋、骨格筋を障害するが、ヒト並びにマウスポンペ病より iPS 細胞を作成し、骨格筋に分化させ病態並びに治療研究を目的に iPS 細胞を作成した。ポンペ病の iPS 細胞はPAS陽性であり、ACP染色にも強陽性である。iPS 細胞からポンペ病の骨格筋に分化を種々の筋特異マーカーで染色され、筋細胞の電顕所見でも筋細胞内にグリコーゲンの蓄積を確認した。又ゴーシェ病、ファブリ病の中枢神経障害の病態を明らかにする為に iPS 細胞を作成した

研究協力者

樋口 孝¹、河越しほ¹、清水寛美¹、小野寺雅史²、大橋十也³、奥山虎之⁴、藤本純一郎⁵、島田 隆⁶、小澤敬也⁷、金田安史⁸、河合利尚²

¹ 東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座

² 国立成育医療研究センター成育遺伝研究部

³ 東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部

⁴ 国立成育医療研究センター臨床検査部

⁵ 日本医科大学分子遺伝医学

⁶ 自治医科大学医学部

⁷ 大阪大学分子治療学講座

A. 研究目的

- (1) ムコ多糖症 II 型の中枢神経障害を酵素を髄注して神経組織、内臓器の治療効果を検討した。
- (2) ヒト並びにマウスポンペ病、ゴーシェ病、ファブリから iPS 細胞を作成し、病気の病態を明らかにした。

B. 研究方法&結果

(1) ムコ多糖 II 型マウスへの髄液内酵素治療：

ムコ多糖症 II 型(MPS II)ハンター症候群は、先天性代謝異常症の一つで iduronate 2-sulfatase (IDS) の機能異常により、グリコサミノグリカン類(GAGs)であるデルマタン硫酸(DS)とヘパラン硫酸(HS)が中枢神経系を含む様々な組織に異常蓄積する。臨床症状は特徴的な顔貌、肝脾の腫大、骨・関節障害、中枢神経障害を来す。ERTによる治療法は脳障害の治療は難しいことから、IDSを脳室内に直接投与することにより脳内に酵素を取り込ませることにより中枢神経障害並びに各臓器の治療の可能性を検討した。

【目的】

iduronate 2-sulfatase ノックアウト MPS II 型モデルマウス (IDS-KO mice) を用いて、その脳室内に IDS を投与し、IDS 脳室内酵素補充療法の効果並びに肝臓、脾臓、心筋、腎、精巣組織などへ