

序の解明、治療法の開発に繋げる。

- ・ モルフォリノ、TALEN を用いて PEX 遺伝子発現を調整してペルオキシソーム欠損モデルフィッシュを作製し、発生過程での病態を解明する。

C. 研究結果

1. ペルオキシソーム病患者診断の成果：

平成 24 年の 1 年間の国内診断実績として、Zellweger Spectrum 4 例、副腎白質ジストロフィー (ALD) 小児大脳型 5 例、成人大脳型 1 例、AMN 1 例、アジソン病 1 例、女性保因者 12 例、発症前患者 4 例を診断し、適切な診療情報を提供して早期治療に繋げた。また海外への診断支援として 3 年間に 15 例のペルオキシソーム患者を診断した。また過去に診断した国内初の乳児型 Refsum 病と CADDS 症例の詳細な検討結果を原著として英文誌に掲載した (添付 PDF)。

さらにペルオキシソーム病に関する総説の執筆や学会シンポジウムの発表等を通じて、国内臨床医への啓蒙を行っている。

2. 患者細胞よりの iPS 細胞の樹立：

同意を得たペルオキシソーム形成異常症患者 2 例の iPS 細胞を樹立し、神経細胞への分化を進めている。

3. 疾患モデル生物による検討：

- ・ ALD 遺伝子改変マウスに PPAR α アゴニスト等を投与し、極長鎖脂肪酸やペルオキシソーム代謝系遺伝子発現の変動を検討している。
- ・ ALD 遺伝子改変マウスによる中枢神経症状の発症実験：催炎症性薬剤投与や頭部外傷後の経過を観察中である。
- ・ モルフォリノを用いてペルオキシソーム形成に関わる PEX 遺伝子をノックダウンしたゼブラフィッシュの作成を進めている。

D. 考察

本分担研究のテーマとして、①国内外のペルオキシソーム病患者の診断率の向上、早期診断の取組み、②ALD 患者リソースを用いた発症機序の解明、③ALD 遺伝子改変マウスを用いた生化学的レベルでの病態解明、治療法の開発、④ALD 遺伝子改変マウスの中枢神経症状発症による大脳型モデルの開発、⑤ペルオキシソーム形成異常症患者 iPS 細胞樹立による病態解明、⑥ペルオキシソーム欠損モデルフィッシュ作製による病態解明、⑦患者会と協力した疾患克服への取組み、が挙げられる。このうち①については疾患の啓蒙から診断システムの確立、疾患情報の提供、成果発表に脂肪酸分析の保険収載への働きかけ等を通して、順調に達成されている。さらにろ紙血によるハイスループットな解析法を確立して、ハイリスクから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る。②、③、④に関しては①の成果により多くの ALD 発症前患者が発見されており、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、本研究班内に構築した複数の共同研究グループにより、病型規定因子が解明され、治療時期の選択から難病克服に繋がることが期待される。⑤、⑥に関しては iPS 細胞、モデルフィッシュの作製系は既に確立し、順調に推移している。

ペルオキシソーム代謝系は発展途上であり、本研究班による単一遺伝子病の解明を通してペルオキシソーム機能を網羅的に明らかにし、生活習慣病や神経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の総合診断施設として、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

に、早期治療が不可欠な大脳型 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た患者リソースに、疾患モデル生物も取り入れて、遺伝性ペルオキシソーム病の診断・病態解明・治療法の開発を進めている。

F. 研究発表

1. 原著論文(英文):

- 1) Shuji Matsui, Masuko Funahashia, Ayako Hondab, Nobuyuki Shimozawa. Newly identified milder phenotype of peroxisome biogenesis disorder caused by mutated PEX3 gene. *Brain Dev*, in press
- 2) Yumi Mizuno, Yuichi Ninomiya, Yutaka Nakachi, Mioko Iseki, Hiroyasu Iwasa, Masumi Akita, Tohru Tsukui, Nobuyuki Shimozawa, Chizuru Ito, Kiyotaka Toshimori, Megumi Nishimukai, Hiroshi Hara, Ryouta Maeba, Tomoki Okazaki, Ali Nasser, Ali Alodaib, Mohammed Al Amoudi, Minnie Jacob, Fowzan S. Alkuraya, Yasushi Horai, Mitsuhiro Watanabe, Hiromi Motegi, Shigeharu Wakana, Tetsuo Noda, Igor V. Kurochkin, Yosuke Mizuno, Christian Schönbach, Yasushi Okazaki. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLOS Genetics*, in press
- 3) Masashi Morita, Junpei Kobayashi, Kozue Yamazaki, Kosuke Kawaguchi, Ayako Honda, Kenji Sugai, Nobuyuki Shimozawa, Reiji Koide Tsuneo Imanaka. A novel double mutation in the ABCD1 gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J Inher Metab Dis*, in press
- 4) Iwasa M, Yamagata T, Mizuguchi M, Itoh M, Matsumoto A, Hironaka M, Honda A, Momoi

M, Shimozawa N. Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case. *Neuropathology*. 2012 Sep 21. [Epub ahead of print]

- 5) Noriyuki Kanzawa, Nobuyuki Shimozawa, Ronald J.A. Wanders, Kazutaka Ikeda, oshiko Murakami, Hans R. Waterham, Satoru Mukai, Morihisa Fujita, Yusuke aeda, Ryo Taguchi, Yukio Fujiki, and Taroh Kinoshita. Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger yndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Lipid Res* 53: 653-63, 2012
- 6) Mizumoto H, Akashi R, Hikita N, Kumakura A, Yoshida Y, Honda A, Shimozawa N, Hata D. Mild case of D-bifunctional protein deficiency associated with novel gene mutations. *Pediatr Int* 54(2): 303-4, 2012.

2. その他の論文(和文)

- 1) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 小児科診療 76(1) 35-43. 2013年1月
- 2) 下澤伸行 ペルオキシソーム代謝異常症 内分泌・糖尿病・代謝内科 34(3) 198-203. 2012年3月
- 3) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 *Brain Medical* 24(3) 261-270. 2012年9月
- 4) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィーの診療アップデート 小児内科 44 (10) 1667-1672. 2012年10月
- 5) 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. 日本臨床社. 東京. 2012年1月
- 6) 鈴木康之、下澤伸行 副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植法 *Annual Review神経* 2012. 241-245. 中外医学社. 東京. 2012年1月

- 7) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 今日の
小児治療指針 第 15 版 大関武彦、古川
漸、横田俊一郎、水口 雅編. pp212-213
医学書院、東京、2012 年 2 月.
- 8) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 (副腎白質ジ
ストロフィー) 最新ガイドライン準拠 小
児科 診断・治療指針 pp299-302. 中山書
店、東京、2012 年 9 月
- 9) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 : 概論 別冊
日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20
先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下 pp389-397.
日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 10) 下澤伸行 ツェルウェガー (Zellweger) 症
候群 別冊日本臨床 新領域別症候群シリー
ズ No20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下
pp398-404. 日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 11) 下澤伸行 新生児型副腎白質ジストロフィー
別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ
No20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下
pp405-408. 日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 12) 下澤伸行 乳児型レフサム病 別冊日本臨床
新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝
異常症候群 (第 2 版) 下 pp409-413. 日本臨
床社. 東京. 2012 年 12 月
- 13) 下澤伸行 Rhizomelic chondrodysplasia
punctata (RCDP) type 1 別冊日本臨床
新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝
異常症候群 (第 2 版) 下 pp414-417. 日本
臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 14) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 別冊日
本臨床 新領域別症候群シリーズ No20
先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下 pp418-427.
日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 15) 下澤伸行 アシルCoAオキシダーゼ (AOX)
欠損症 別冊日本臨床 新領域別症候群シ
リーズ No20 先天代謝異常症候群 (第 2
版) 下 pp428-432. 日本臨床社. 東京. 2012
年 12 月
- 16) 下澤伸行 二頭酵素 (D-bifunctional
protein: DBP) 欠損症 別冊日本臨床 新領
域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常
症候群 (第 2 版) 下 pp433-438. 日本臨床
社. 東京. 2012 年 12 月
- 17) 下澤伸行 Rhizomelic chondrodysplasia
punctata (RCDP) type 2, RCDP type 3 別
冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ
No20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下
pp439-442. 日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 18) 下澤伸行 レフサム病 別冊日本臨床 新領
域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常
症候群 (第 2 版) 下 pp443-446. 日本臨床
社. 東京. 2012 年 12 月
- 19) 下澤伸行 アカタラセミア 別冊日本臨床
新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝
異常症候群 (第 2 版) 下 pp447-449. 日本
臨床社. 東京. 2012 年 12 月
- 20) 下澤伸行 新たに分類されたペルオキシソー
ム病 別冊日本臨床 新領域別症候群シリー
ズ No20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下
pp454-455. 日本臨床社. 東京. 2012 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

小児副腎白質ジストロフィー症の早期診断における神経心理・生理学的検査の意義 小児大脳型 ALD における病型特異的な突発性徐波成分の特徴

分担研究者：加我 牧子（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）

研究要旨

小児副腎白質ジストロフィー症 ALD の前頭型 3 例、後頭型 10 例、未発症型 7 例につき安静覚醒時に前頭、中心、頭頂、後頭の 4 電極から記録されたデジタル脳波の $\delta \sim \gamma$ 周波数帯域毎にフーリエ解析を行い、特に δ 波含有量につき、脳表電極の前後に分けて検討した。発症例の δ 波含有量は前頭型では前方、後頭型では後方に多く、未発症型では 2 例が前頭型、5 例が後頭型に類似した型を示した。未発症型 1 例で治療後は δ 波含有量の減少が認められた。脳波の周波数解析が ALD の早期診断と発症部位推定に役だつ可能性を示唆した。今後症例を重ねての検討が必要である。

研究協力者：

崎原ことえ、軍司敦子、中村雅子、稲垣真澄
国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部

A. 研究目的

小児副腎白質ジストロフィー症（ALD）、特に大脳型の自然歴では発症後数年以内に死に至ることが知られ、発症早期の幹細胞移植のみが現実的には唯一の治療法となっている。大部分が伴性劣性遺伝で、発端者親族では新生児期からの ALD と診断される症例も現実のものとなっている。この間の班研究の中で、MRI 病変が確認される前に神経心理学的検査に異常を生じる症例の存在を明らかにしてきた。しかし発症をより早期に、より簡便に診断できる方法を確立することは急務であり、本研究の目的とした。これまでの研究の一環として事象関連電位を記録中に突発的な徐波の存在が確認されており、これが発症の超早期の診断に役だつ可能性を検討することにした。

B. 研究方法

2000 年 1 月から 2012 年 12 月までの間に幹細胞移植治療前後の評価のため当院に紹介された 20 歳以下の小児 45 例を対象として解析を行うことにした。このうち 39 症例は治療前に受診された。これらの症例のうち後頭型は 24 例（21 例）、前頭型は 8 例（6 例）、側頭型 1 例、未発症型 12 例（11 例）であった（（）内は治療前受診例）。解析対象とした脳波は本研究班における検査の一環である聴覚性事象関連電位検査において記録された安静覚醒時のデジタル脳波で、4 つの電極（前頭部 Fz、中心部 Cz、頭頂部 Pz、後頭部 Oz）から記録された脳波につき、 $\delta \sim \gamma$ （1-45Hz）の周波数帯域毎にフーリエ解析を行った。特に δ 波含有量につき電極の脳表前半（Fz と Cz）と後半（Pz と Oz）に分けて分析した。眼球運動や体動などアーチファクトが混入している脳波は除外した。前頭型 3 例、後頭型 10 例、未発症型 7 例の解析が可能であった。

C. 研究成果

発症例の δ 波含有量は前頭型3例ではFz、Czにより多く、後頭型の発症例10例ではPz、Ozにより多く認められた。後頭型でFz、Czの、前頭型でPz、Ozの徐波の方が多かった症例はなかった。未発症型では前頭型類似パターンを示した者が2例、後頭型に似たパターンを示した者が5例あった。前頭型に似たパターンを示した未発症型の1例は、臨床的にもMRIの変化も認められない状態で幹細胞移植治療を受け、治療後には δ 波含有量が減少していることが確認された。

D. 考察

脳波上の δ 波含有量と局在はALDの早期診断と局在部位の推定に役だつ可能性がある。今後、症例を重ね、治療前後の脳波の徐波含有量変化を検討し、早期診断の真の指標として確立しうるかどうか検討する必要がある。

E. 結論

小児ALDにおいて脳波の局在性徐波化が、早期診断に際して発症と発症部位の推定に役だつ可能性を指摘した。

F. 研究成果

1. 論文発表

- 1) Kokubo N, Inagaki M, Gunji A, Kobayashi T, Ohta H, Kajimoto O, Kaga M: Developmental change of visuo-spatial working memory in children: Quantitative evaluation through and Advanced Trail Making Test. Brain Dev 34: 799-805, 2012.
- 2) Inoue Y, Sakihara K, Gunji A, Ozawa H, Kimiya S, Shinoda S, Kaga M, Inagaki M: Reduced prefrontal hemodynamic response in children with AD/HD during the Go/NoGo task: A NIRS study.

Neuroreport 23: 55-60, 2012.

- 3) ○加我牧子: 副腎白質ジストロフィー. 技術情報協会編: 希少疾患/難病の診断・治療と製品開発. (株)技術情報協会, pp. 953-959, 2012.
- 4) Yatabe K, Goto T, Watanabe K, Kaga M, Inagaki M: Reading and Writing Achievement Tests for Assessing Orthographical and Phonological Impairments of Japanese Children with Developmental Disorders. In W. Sittiprapaporn (Ed.), Learning Disabilities. Rijeka, Croatia: InTech Publishing. ISBN 978-953-51-0269-4. pp. 69-86, 2012.
- 5) Kita Y, Gunji A, Inoue Y, Goto T, Sakihara K, Kaga M, Inagaki M, Hosokawa T: Self-face recognition in children with autism spectrum disorders: A near-infrared spectroscopy study. Brain Dev. 33: 494-503, 2011.
- 6) ○加我牧子: 脳のレベルの聴覚障害. チャイルドヘルス 15: 741-744, 2012.

2. 学会発表

- 1) Kaga M: Verbal sound discrimination in Landau-Kleffner syndrome: a neurophysiological study. 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, May 30, 2012

G. 特許取得等

なし

ニーマンピック病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

ニーマンピック病は、ライソゾームにおける水解酵素（A/B型）あるいは膜蛋白の異常（C型）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C型細胞で観察される二次的に低下する酸性スフィンゴミエリナーゼ（Acid sphingomyelinase: ASM）酵素が、細胞内コレステロール蓄積惹起に関与しており、ASM活性上昇薬（酪酸）がC型細胞でコレステロール蓄積の減少作用を持つことを示した。

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に遊離コレステロールが蓄積する。

ニーマンピック病C型細胞では二次的にASM活性低下とスフィンゴミエリン蓄積が観察される。本研究ではニーマンピック病C型細胞の脂質蓄積に伴うASM活性低下に対してASM酵素上昇薬（酪酸 butyrate）を投与してコレステロール蓄積量に関して解析した。

B. 研究方法

正常培養リンパ芽球およびC型リンパ芽球に対して、ASM活性上昇作用を持つ酪酸（butyrate）を添加（10mM）し、各細胞の、1)ASM活性、2)ASM mRNAレベル、3)細胞内コレステロール含量、を調べた。次に、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（ $p < 0.01$ ）。

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)NPC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酪酸添加により有意に低下した（ $p < 0.05$ ）。

4)NPC1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。

5) 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 活性上昇作用を持つ酪酸 (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 活性を上昇させた。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 活性を正常化することで細胞内蓄積遊離コレステロールを減少させた。この酪酸の作用は ASM 欠損コレステロール蓄積細胞では観察されなかった。

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 型で観察される二次的 ASM 低下はコレステロール蓄積の増悪因子となっている可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文

1) Noguchi, A., Nakagomi, T., Kimura, S., Takahashi, Y., Matsuno, K., Koizumi, H., Watanabe, A., Noguchi, H., Ito, T., Ohtsuka, M., Uemura, N., Takeda, O., Komatsu, A., Kikuchi, W., Komatsu, M., Fukaya, H., Miura, S., Toda,

H., Nakagomi, O., Takahashi, T. Incidence of intussusception as studied from a hospital-based retrospective survey over a 10-year period (2001-2010) in Akita prefecture, Japan (2012). *Jpn J Infect Dis.* 65: 301-5.

2) Oyamada, J., Toyono, M., Shimada, S., Aoki-Okazaki, M., Takahashi, T. Altered central aortic elastic properties in Kawasaki disease are related to changes in left ventricular geometry and coronary artery aneurysm formation (2012) *J Am Soc Echocardiogr*, Apr 10.

3) Toyono, M., Shimada, S., Aoki-Okazaki, M., Kubota, H., Oyamada, J., Tamura, M., Takahashi, T. Expanding coronary aneurysm in the late phase of Kawasaki disease (2012). *Pediatr Int*,

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ライソゾーム病における酵素補充量療法の問題点

研究分担者：高柳 正樹（千葉県こども病院副院長）

研究要旨

ライソゾーム病酵素補充療法の問題点として以下の3点があげられる。

1. 酵素補充療法における中枢神経系への効果の問題点
2. 酵素補充療法におけるコンプライアンス（アドヒアランス）上の問題点
3. 酵素補充療法における死亡症例の問題点

研究協力者

村山 圭 千葉県こども病院代謝科

A. 研究目的

ライソゾーム病に対する酵素補充療法が開始されてからすでに17年経過している。酵素補充量の実施における問題点を検討したので報告する。

B. 研究方法

当院においてこれまでゴーシェ病6例、ハーラー病1例、ハンター病3例、ファブリー病2例の計12症例で酵素補充療法を行っている。1. これら患者のうち中枢神経症状を示す患者への酵素補充療法の効果の評価を行った。2. 酵素補充療法におけるコンプライアンス（アドヒアランス）の問題を、患者ごとに検討しその原因や対策策について評価した。3. また酵素補充療法中に死亡した3症例のうち2例の autopsy 検体（肝臓、心臓、筋肉など）のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性を測定した。

C. 研究結果と D. 考案

中枢神経系への効果の問題点：中枢神経系の障害に対する酵素補充量の効果は極めて弱い。

現在2例のゴーシェ病患者にシャペロン療法を施行し中枢神経系への効果を検討している。

コンプライアンス（アドヒアランス）：学校に在籍している時も頻回な通院にはかなり困難が伴う。しかし就業した後の定期的な通院にはさらなる困難が伴う。全く症状のない時期からの酵素補充療法の継続には、患者の疾患に対する十分な理解と、受診の容易さを担保する方策が必要である。患者の生活環境が患者ごとに大きく異なるので、患者毎にコンプライアンス（アドヒアランス）が向上する方法を患者と医療従事者との間で、十分に考えて調整することが必要である。

死亡症例のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性：ハンター病1例の肝臓のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性は正常であった。ゴーシェ病では心筋の呼吸鎖複合体Iの活性が著名に低下していた。本症例はパーキンソン様の症状を呈していたことより、より詳しい病態の検討を行っている。

E. 結論

酵素補充療法は十分に完成された治療法ではないと考えられる。コンプライアンス（アドヒアランス）の改善は患者のQOLの上昇に必須

なので十分な検討が必要である。新しい酵素製剤、シャペロン療法、基質合成抑制剤などの開発が必要である。

原著論文

- 1) Wakiya T, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Yamada N, Okada N, Ushijima K, Otomo S, Sakamoto K, Murayama K, Takayanagi M, Hakamada K, Yasuda Y, Mizuta K. Impact of enzyme activity assay on indication in liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Mar;105(3):404-7. Epub 2012 Jan 4
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S. Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem.* 2012

特許権等知的財産権の取得及び申請状況

とくになし

研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

ペルオキシソーム・ライソゾーム病ならびに副腎白質ジストロフィー(ALD)の 分子病態解析と治療薬開発

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

副腎白質ジストロフィー（ALD）は、ペルオキシソーム膜タンパク質 ABCD1 をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異により起こる X 連鎖劣性遺伝子疾患である。ALD 患者で見出されている遺伝子変異の約 60%はミスセンス変異で、その約 70%で ABCD1 タンパク質が細胞内で分解され検出されない。本研究では、ミスセンス変異 ABCD1 タンパク質の分解を抑制し、正常にペルオキシソームに局在化させる低分子化合物の探索を計画した。患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 タンパク質の C 末端に GFP を付加した融合タンパク質（変異 ABCD1-GFP）を安定発現する CHO 細胞を作製した。この細胞は、通常の培養条件下では変異 ABCD1-GFP が分解され蛍光を示さないが、プロテアソーム阻害剤処理や低温培養により回復し蛍光を示した。この細胞の蛍光を指標にしたハイスループットアッセイ系を構築し、1099 種類の既存薬ライブラリーの中からヒット化合物（ドキシソルビシン）を見出した。一方、本疾患に対するレンチウイルスを用いた遺伝子治療のための予備実験を行った。また新たに見出されたビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）について、原因遺伝子産物 ABCD4、LMBD1 の分子病態解析を進めた。

研究協力者氏名

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

現在、副腎白質ジストロフィー（ALD）に対する有効な治療法はなく、早急な治療薬の

開発が望まれている。ALD 患者で見出されている遺伝子変異の約 60%はミスセンス変異であり、その約 70%で ABCD1 タンパク質が細胞内で分解され検出されない。これらの変異 ABCD1 タンパク質のいくつかは、分解を回避し正常にペルオキシソームに局在化させることで、ある程度機能を回復することが報告されている。本研究では、ミスセンス変異 ABCD1 タンパク質の分解を抑制し、正

常にペルオキシソームに局在化して機能を回復させる化合物のハイスループットスクリーニング系を構築し、ALD 治療に有効な既存薬を探索することを目的とする。

一方、発病前か発病初期での骨髄移植は、神経症状の抑制に効果があることが報告されているが、そのメカニズムは分かっていない。本研究では骨髄移植による治療効果の解明と、レンチウイルスを用いた遺伝子治療の基礎実験を目的として、ABCD1 欠損マウスを用いて検討を行った。さらにシアノコバラミンがライソゾームに蓄積する新規ビタミン B₁₂ 代謝異常症に関連して、その原因タンパク質 ABCD4 ならびに LMBD1 の機能解析系を構築する。

B. 研究方法

ALD 患者で報告されているミスセンス変異 *ABCD1* 遺伝子 (c.1850G>A, c.284C>A/c.290A>T, c.1553G>A, c.1858T>C, c.1846G>A) を pEGFP ベクターに導入した 5 種類のコンストラクトを作製した。これらを、CHO 細胞にトランスフェクションし安定発現細胞を作製した。ABCD1-GFP の発現及び細胞内局在性は、イムノブロット法及び蛍光抗体法により確認した。また 96 穴プレートで培養した細胞の蛍光強度は蛍光光度計 (FilterMax F5) で測定した。既存薬ライブラリー (1099 種) は東京大学オープンイノベーションセンターより供与されたものを使用した。

一方、ABCD1 欠損マウスの脳や脊髄の組織切片を調製し、抗 MBP、抗 GFP、抗 Iba1 抗体などを用いた蛍光抗体法による染色を

行った。ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターは東京慈恵会医科大学の小林博士より供与して頂いたものを使用した。

ABCD4 ならびに LMBD1 の機能解析に関しては、野生型ならびに変異型タンパク質を安定発現する CHO 細胞の作製を試みた。

(倫理面での配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) ミスセンス変異 ABCD1-GFP の安定化を指標にしたスクリーニング

各変異 ABCD1-GFP (R617H, A95D/H97L, R518Q, Y620H, A616T) を発現した CHO 細胞では GFP の蛍光は認められなかったが、プロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理や 30°C の低温培養により、GFP の蛍光が認められた。GFP の蛍光はペルオキシソームに局在しており、またイムノブロット法により変異 ABCD1-GFP タンパク質の存在を確認した。

変異型 ABCD1-GFP (R518Q) を発現した CHO 細胞に MG132 を処理すると蛍光強度の顕著な増加が認められた。そこで 96 穴プレートに培養した細胞の蛍光強度の増加を指標にして、変異 ABCD1 タンパク質の安定化を示す既存薬のスクリーニングを行った。その結果、1099 種類の既存薬から一つのヒット化合物 (ドキシソルビシン) を見いだした。ドキシソルビシンは R518Q 以外の変異でも効果を示し、また変異 ABCD1-GFP を正常にペルオキシソームへ局在化した。

2) ABCD1 欠損マウスを用いた造血幹細胞移植及び遺伝子治療の予備実験

ABCD1 欠損マウスの脳や脊髄では極長鎖脂肪酸含量の増加が認められた。組織染色の結果、ミエリンの形態に若干の異常が観察されたが、アストロサイトやミクログリアの活性化は認められなかった。一方、*ABCD1* 遺伝子を組み込んだレンチウイルスを患者由来線維芽細胞にトランスダクションすると、発現した ABCD1 タンパク質は正常にペルオキシソームに局在化し、極長鎖脂肪酸 β 酸化活性が回復した。

3) ABCD4 ならびに LMBD1 の機能解析系の構築

ヒト野生型ならびに変異型 ABCD4 を安定過剰発現する CHO 細胞を用い、ABCD4 の発現増加をイムノブロット法で確認した。現在、LMBD1 を共発現する CHO 細胞を作製中である。

D. 考察

1) CHO 細胞に発現したミスセンス変異 ABCD1-GFP タンパク質 (R617H, A95D/H97L, R518Q, Y620H, A616T) は翻訳後に細胞内プロテアソーム分解系で分解されていると考えられた。この CHO 細胞の蛍光強度の増加を指標にしたハイスループットアッセイ系で見いだした抗生物質ドキソルビシンは、変異 ABCD1 タンパク質の分解を抑制し、正常にペルオキシソームに局在化させることを確認した。現在、ALD 患者由来線維芽細胞を用いて、内因性の変異 ABCD1 タンパク質の安定性や機能回復について検討中である。

本化合物より毒性が低く効果の高い構造類似既存薬は本疾患の治療薬となることが期待される。

2) ABCD1 欠損マウスを用いてレンチウイルスを利用した造血幹細胞移植の効果を検討するための準備ができた。今後、ABCD1 欠損マウス由来骨髄細胞にレンチウイルスを感染し、分離した造血幹細胞をマウスに移植する予定である。本疾患に対する造血幹細胞移植の神経症状抑制のメカニズム解明は、発症機構及び治療戦略を考える上で重要である。

3) ABCD4 もしくは LMBD1 の欠損によりシアノコバラミンがライゾソームに蓄積する病態が観察される。両者が複合体を形成して機能している可能性が推測される。両者によるシアノコバラミン輸送機構と障害の分子機構を明らかにしていく予定である。

E. 結論

変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞の蛍光強度を基に、ミスセンス変異 ABCD1 の安定化を指標にしたハイスループットスクリーニング系を構築した。実際に、このアッセイ系を使用してヒット既存薬 (ドキソルビシン) を見いだした。今後、この化合物およびその誘導体の治療薬としての有効性を検証する。また、今後さらに多くの化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行うことが可能となった。一方、レンチウイルスを感染した造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植を行い、脳や脊髄での

ABCD1 タンパク質の分布や代謝への効果について検討することが可能となった。また新たなライゾーム蓄積症患者の発見と病態解明が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita M., Imanaka T.: Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochem. Biophys. Acta* 1822, 1387-1396, 2012. (review)
- 2) Morita M., Kobayashi J., Yamazaki K., Kawaguchi K., Honda A., Sugai K., Shimozawa N., Koide R., Imanaka T.: A novel double mutation in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J. Inherit. Metab. Dis. Reports* in press
- 3) Morita M., Shinbo S., Asahi A., Imanaka T.: Very long chain fatty acid β -oxidation in astrocytes: Contribution of the ABCD1-dependent and -independent pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1972-1979, 2012.
- 4) 川口甲介, 今中常雄: ペルオキシソームの多様性と動態からみた微生物の生存戦略. *生化学* 84, 21-25, 2012. (review)

2. 学会発表

- 1) Kostsin D. G., Lee A., Yamazaki K., Kawaguchi K., Morita M., and Imanaka T. Establishment of screening system to discover candidates of chemical chaperone that stabilize mutant ABCD1 responsible for adrenoleukodystrophy. The 4th EMBO Meeting. 2012, 9, 22-25, Nice, France.
- 2) 池島俊季, 赤池宗輔, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄. メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 日本生化学会北陸支部第 30 回大会. 2011, 5, 26, 金沢.
- 3) 山崎こず枝, 守田雅志, 小出玲爾, 下澤伸行, 今中常雄. 副腎白質ジストロフィー患者の新規 ABCD1 遺伝子変異 -二カ所にミスセンス変異をもつ ABCD1 タンパク質の発現解析-. 第 13 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム. 2012, 6, 15-16, 東京.
- 4) 池島俊季, 川口甲介, 赤池宗輔, 守田雅志, 今中常雄. メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた ABC タンパク質サブファミリー D の発現系構築. 第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム. 2012, 9, 15-16, 福岡.
- 5) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の構造と機能. 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2012, 11, 15-16, 京都.
- 6) Morita M., Kostsin D.G., Yamazaki K., Arimura K., Shimozawa N., and Imanaka T. A screening system to discover chemical compounds that stabilize missense mutant ABCD1 protein. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会・第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2012, 11, 15-18, 岐阜.

- 7) 李朝香, 朝日彰子, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄. ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在性-ヒトと線虫での共通性-. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012, 11, 18, 富山.
- 8) 野村芽衣子, 友廣岳則, 池島俊季, 今中常雄, 畑中保丸. 光反応性脂肪酸プローブによる脂肪酸結合タンパク質のラベル化. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012, 11, 18, 富山.
- 9) Morita M., Yamazaki K., Kawaguchi K., Shimozawa N., Koide R., and Imanaka T. A novel double mutation in *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012, 12, 11-14, 福岡.
- 10) Morita M., Kostsin, D. G., Yamazaki K., Shimozawa N., and Imanaka T. A Screening system to discover chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012, 12, 11-14, 福岡.
- 11) 池島俊季, 川口甲介, 赤池宗輔, 守田雅志, 今中常雄. メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現系構築. 第 85 回日本生化学会大会. 2012, 12, 14-16, 福岡.

社ツムラ. 発明者: 今中常雄, 林 利光, 守田雅志. 登録日: 平成 24 年 7 月 27 日

2. 実用新案登録

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 特許第 5049329 号. 発明名称: ペルオキシソーム脂肪酸 β 酸化系活性化物質の検出方法. 特許権者: 今中常雄, 株式会

日本人ムコリピドーシス II/III の病態解析と日本人クラッベ病の病態解析

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

ライソゾ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。また同じくライソゾーム病のクラッベ病について、日本人固有の分子病態の解明を行なった。これにより、シャペロン法など今後の治療法の検索に有用な知見を得た。

A. 研究目的

- 1) 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、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影響を解明する。また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。
- 2) クラッベ病の分子病態を日本人において検索し、高頻度変異の病態を発現実験によって解明する。

B. 研究方法

- 1) MLII/III の病態解明 ; A) 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。B) 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

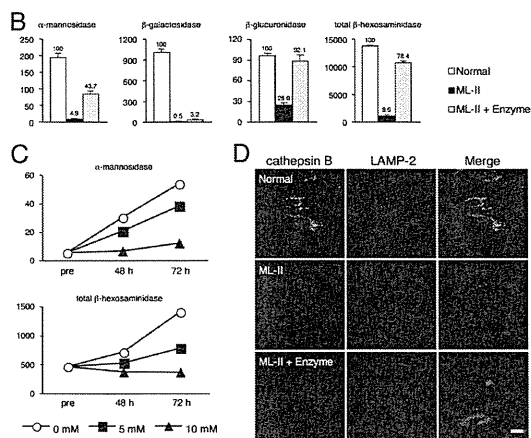
た。C) ライソゾームの基質として Phospholipid と Cholesterol を例にとりその量を正常と比較し、治療効果を調べた。D) ライソゾームの数（量）を LysoTracker と DAPI との蛍光量を用いて測定し、正常細胞との差を調べ、治療による効果を解析した。D) BODIPY-Cer を培養細胞に負荷し、その取り込みを最上細胞と比較し、治療効果を解析した。E) BODIPY-Cer を培養細胞に負荷し、その取り込みを最上細胞と比較し、治療効果を解析した。F) オートファジーの状態を LC3 の Western を用いて正常と比較し、酵素治療での反応を見る。またミトコンドリアの形態変化についても観察した。G) 電子顕微鏡で Inclusion body の様子を酵素治療の前後で観察した。

- 2) クラッベ病の病態解明 ; A) 日本人クラッベ病患者 49 名の遺伝子解析を行ない、表現型と遺伝子型について知見を得た。B) 高頻度変異について発現実験を行ない、酵素活性にみならず Western blot によって、強発

現蛋白の発現量を解析し、precursor と成熟蛋白量を解析し、特に乳児型変異においてその processing に異常が大きいことを観察した。

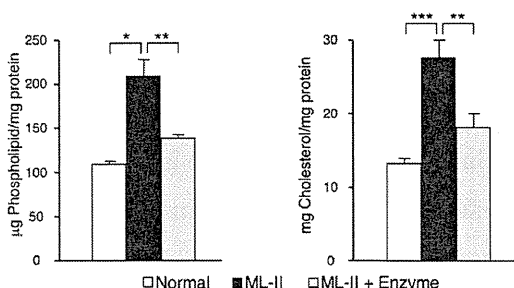
C. 研究結果

1) MLII/III の病態解明 ; A) ライソゾーム酵素混合液の作成 ; 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。



B) 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。

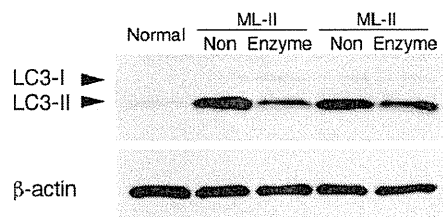
C) ライソゾームの基質は正常に比し疾患細胞で増加していたが、これは酵素治療に反応して回復した。



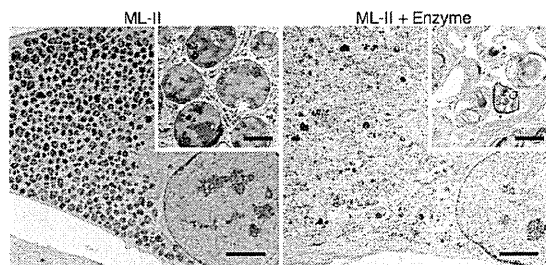
D) ライソゾームの DAPI 染色に対する比としての量は正常で 0.4 であったが疾患細胞で 1.2 と増加し、治療によって 0.8 と低下した。E) エンドサイトーシスの

状態を BODIPY-Cer の取り込みでみると、MLII 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。

F) 正常細胞に比し MLII 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 MLII では fragmentation が多いのが治療により改善がみられた。



G) 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。



2) クラッベ病の病態解明 ; A) 日本人 49 名の解析により、今まで言われていたようにクラッベ病患者の 90% が乳児型ではなく、日本人においては乳児型は 43% に限られていることが判明し、高頻度変異の中で L270D, L618S, I66M+I289V が若年発症に関与していることが明らかとなった。B) 発現実験により、正常に比べて多くの変異蛋白は precursor から成熟蛋白への processing の効率が低いことが示された。特に乳児型でその傾向が顕著であった。

D. 考察

1) MLII/III の病態解明 ; ムコリポ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。

2) クラッペ病の病態解明；クラッペ病においては変異蛋白質の活性低下のみならず、precursor が ER で合成された後、ライソゾームに標的されて processing されるどこかの段階に病因があることが示唆された。

E. 結果

1) 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。

2) クラッペ病の病院として変異蛋白の比活性のみならず、翻訳後のプロセッシングにも問題があることが示唆され、今後の治療法の開発にも意義のある所見と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akagi M, Mohri I, Iwatani Y, Kagitani-Shimono K, Okinaga T, Sakai N, Ozono K, Taniike M., Clinicogenetical features of a Japanese patient with giant axonal neuropathy., *Brain Dev.* 34(2): 156-62, 2012
- 2) Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N., Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolipidosis II skin fibroblasts., *Mol Genet Metab.* 105(2): 266-9, 2012
- 3) Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M., An adult

patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism., *Brain Dev.* 2012 Aug 17. [Epub ahead of print]

- 4) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shirota Y, Hanajima R, Terao Y, Matsumoto H, Hossain MA, Sakai N, Shiio Y., Isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease with novel mutations in the GALC gene., *Brain Dev.* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
 - 5) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S., Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan., *Mol Genet Metab.* 2012 Sep 7. [Epub ahead of print]
 - 6) Lee T, Takeshima Y, Okizuka Y, Hamahira K, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Sakai N, Matsuo M, Iijima K., A Japanese child with geleophysic dysplasia caused by a novel mutation of FBN1. *Gene.* 2012 Nov 2. pii: S0378-1119(12)01341-8. [Epub ahead of print]
- ### 2. 学会発表
- 1) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Hossain Mohammad Arif, Norio Sakai, Clinical course of four Niemann-Pick type C patients and initiation of miglustat therapy, 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 2012.10
 - 2) Yusuke Hamada, Michiko Shinpo, Mohammad Arif Hossain, Norio Sakai, Keiichi Ozono, Observation of lysosomes in lysosomal storage disorders with superresolution structured

illumination microscopy, 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 2012.10

- 3) MOHAMMAD ARIF HOSSAIN, Takanobu Otomo, Yusuke Hamada, Michiko Shinpo, Motohiro Akagi, Keiichi Ozono, Norio Sakai, The late-onset mutant protein of GALC shows effective processing, 第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 4) 新寶理子、GM2 ガングリオシドーシス ～当科での診断症例の検討～、第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 5) 濱田悠介、The efficacy of sodium pyruvate therapy and breath gas test for PDH E1-alpha deficiency、第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 6) 酒井規夫、造血幹細胞移植（代謝専門医の立場から）、第1回 先天代謝異常症患者会フォーラム、2012.8
- 7) 米衛ちひろ、豊島光雄、濱田悠介、酒井規夫、河野嘉文. 進行性骨溶解を認めたセラミダーゼ欠損症の一例. 第54回日本小児神経学会総会 札幌 2012.05
- 8) 中野さやか、新寶理子、東 純史、濱田悠介、岩谷祥子、富永康仁、木村志保子、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、永井利三郎、大藪恵一、Cataplexy が診断の契機となった Niemann-Pick 病 C 型の 2 症例、第54回日本小児神経学会総会 札幌 2012.05
- 9) 酒井規夫、ファブリー病と遺伝カウンセリング-遺伝カウンセリングとライフプラン、日本遺伝カウンセリング学会、2012.5

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

スフィンゴリピドーシスの神経病態解明と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

ライソゾームでのスフィンゴ糖脂質の分解に酵素と共に必要であるサポシンの機能解析を行った。成果は以下の3つである。①サポシンCはGM1- β -ガラクトシダーゼ (Bgal) によるラクシルセラミド (LacCer) の分解に必須で、LacCerの蓄積はクラッベ病の神経病態を増悪させることを明らかにした。この成果はクラッベ病の神経病態とその治療法を考える上で重要である。②サポシン (SAPs) および前駆体プロサポシン (PSAP) はマウス胚組織である脱落膜、栄養膜細胞、卵黄嚢細胞に強く発現し、マウスの胚発生に必須であることを明らかにした。③均一な糖鎖を持つ化学合成サポシンCがゴーシェ病の欠損酵素：グルコシルセラミド- β -グルコシダーゼ (GCase) の活性を上げ、安定化し、プロテアーゼによるGCaseの分解を抑制することを明らかにした。この成果はゴーシェ病を含むスフィンゴリピドーシスに対するサポシン補充の有用性を示す。これらの成果からスフィンゴリピドーシスの病態と治療法開発におけるサポシンの重要性が示された。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質 (GSL) は哺乳動物の生体膜を構成する脂質成分の一つである。ライソゾームにおける GSL の分解異常症であるスフィンゴリピドーシスは多くが重篤な神経病変を呈する。GSL のライソゾームにおける分解には疎水性の GSL と親水性の加水分解酵素を相互作用させるために、サポシンと呼ばれる疎水性の糖タンパク質が必要である。前駆体タンパク質であるプロサポシンがライソゾーム内でプロテアーゼ分解を受けサポシン A、B、C、D が生成され、その構造は極めて相同性が高いが、生体内においてそれぞれ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。しかし、活性化の分子メカニズムは十分には解明されていない。また、近年、サポシンには脂質抗原提示などの新機能が示唆されている。我々はフィンゴリピドーシスの神経病態の解明と治療法開発を目指しサポシンの機能解析を行った。

B. 研究方法

1) ガラクトシルセラミド (GalCer)- β -ガラクトシダーゼ (GalC) の遺伝的欠損マウスでクラッベ病のモデルマウスである *Twitche*rマウス (*GalC*^{-/-}) とグルコシルセラミド (GlcCer)- β -グルコシダーゼ (GCase) の活性化タンパク質である

サポシンCの欠損マウス (*Sap-C^{-/-}*) を交配し、*Galc*とサポシンCの両欠損マウス (*Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}*) を作成し、その神経病態を*Twitcher*マウスと比較検討した。

2) 野生型マウス胚におけるプロサポシン(PSAP)およびサポシン(SAPs)の時空間的な発現解析とプロサポシン欠損マウス (*Psap^{-/-}*) 胚の表現型解析を行った。

3) サポシン C はゴーシェ病の欠損酵素: GCCase の活性化タンパク質である。均一なアスパラギン結合型糖鎖をもつ化学合成サポシン C (糖鎖なし、1糖付、9糖付) を用いて、サポシン C による GCCase の活性化能、プロテアーゼ保護能、活性安定化能を検討した。

C. 研究成果

1) *Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}*は *Galc^{-/-}*より寿命が短く、*Galc^{-/-}*には認められない領域特異的な神経細胞死が、海馬 CA2 錐体細胞、嗅内皮質、線条体、嗅索、視床、小脳顆粒細胞層で認められた。これらの領域ではアストログリアの活性化が顕著で、特に海馬体では嗅内皮質から CA2 へ投射する貫通線維の走行に一致した領域に観察された。*Galc^{-/-}, Sap-C^{-/-}*の脳組織の脂質分析では、*Galc^{-/-}*に比してラクトシルセラミド (LacCer) の蓄積が優位に高かった。

2) 野生型マウス胚におけるPSAP/SAPsの時空間的な発現変化をイムノプロットと免疫組織染色により解析した。PSAP/SAPsは胎生初期の胎齢7.5日 (E7.5) 頃から母体由来組織である脱落膜、胎仔由来の細胞である栄養膜巨細胞、臍側卵黄嚢に強く発現した。胎生中期から後期にかけては胎盤の母体由来である脱落膜と、胎

仔由来である栄養膜巨細胞と海綿状栄養膜細胞に発現し、羊水中には胎仔由来の分泌型PSAPが存在した。*Psap^{-/-}*胚の組織病理学的解析の結果、*Psap^{-/-}*胚にはE7.5頃から栄養膜巨細胞および臍側卵黄嚢に存在するライソゾームの形態異常を呈して胎生致死となるものと、この時期を乗り越えて胎生中期以降に胎盤の低形成と胎仔の発育遅滞を呈するが出生に至るものの主に2つの表現型が認められた。

3) GCCase の活性化能を、セレザイム®を酵素源、4MU-Glc を基質として、界面活性剤非存在、ホスファチジルセリン存在下のアッセイ系で検討したところ、いずれの化学合成サポシン C も GCCase の酵素活性を濃度依存的に上昇させ、2・Mのサポシン C 存在下で約 30 倍の活性上昇が得られた。GCCase のプロテアーゼによる分解の抑制能を GCCase のイムノプロットで検討した結果、化学合成サポシン C の添加によってカテプシンDによるセレザイム®の分解が有意に抑制されることがわかった。次に低濃度下のセレザイム®の安定性に対するサポシン C の影響を検討した。セレザイム®を 20nM に溶解すると 37°Cで 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るが、化学合成サポシン C と BSA を 0~1.5 μM の濃度で添加し、37°Cで 2 時間後のセレザイム®活性を比較したところ、化学合成サポシン C がより低濃度で GCCase 活性の低下を抑制した。

D. 考察

1) LacCer の分解には *Galc* と GM1-β-ガラクトシダーゼ (Bgal) の 2 つのβ-ガラクトシダーゼが関与するとされている。本