

フでは複数のピークが確認されたが、これらはヘパラン硫酸の構造多様性を反映していると考えられ、ヘパリナーゼ II を用いた限定分解が成功していることを示唆する。

本研究の最終目的は、疾患特異的 GAG 由来二糖を解析することで MPSII マウスに対する *ex vivo* 遺伝子治療の有効性を解明することである。具体的には、蓄積するヘパラン硫酸の非還元末端に存在する二糖であり、病態を強く反映すると考えられるイズロン酸-2-硫酸, N-硫酸化グルコサミン-6-硫酸 (I2S6) を指標とする。今年度の解析より、クロマトグラフ上で複数のピークが得られたことから、これらを質量解析することで I2S6 を同定することが可能だと考えられる。

今後は、今回決定した消化条件に基づいて調製したヘパラン硫酸消化産物の質量解析を進めると共に *ex vivo* 遺伝子治療を施したモデルマウス由来試料についても同様の操作を進め、その効果の解析を行う予定である。

## E. 結論

*ex vivo* 遺伝子治療の効果解析を行う上で必要となる疾患特異的 GAG 由来二糖の高率的作成条件が決定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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

## MLPA 法を用いたファブリー病ヘテロ接合の遺伝子診断

分担研究者：大橋 十也（東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部教授）

### 研究要旨

ファブリー病(FD)は X 染色体連鎖性のライソゾーム病でありその原因遺伝子は $\alpha$ ガラクトシダーゼ(GLA)である。よって正常アレルを一つ持つ女性ヘテロ接合患者では PCR 法を用いた GLA 遺伝子解析は難解となる。今回 GLA 遺伝子に大きな欠損を持つ FD 家系の遺伝子解析を MLPA 法を用いて行なった所、女性ヘテロ接合の確定診断に至った。MLPA 法は GLA 遺伝子に欠損を持つヘテロ接合の診断に有用である。

### 研究協力者

樋口 孝

東京慈恵会医科大学 助教

群と同様のシグナルであった。FD 男性患者 gDNA を用いた GLS 遺伝子解析の結果、exon2-5 の欠損変異を有していた。

### A. 研究目的

GLA 遺伝子は X 染色体上に存在する正常アレルを一つ持つ女性ヘテロ接合の PCR 法を用いた遺伝子解析は困難である。そこで GLA 遺伝子の exon に欠損を持つ FD 家系の女性ヘテロ接合の遺伝子解析を MLPA 法を用いて行った。

### B. 研究方法

FD 家系の gDNA を採取した後、MLPA 法による遺伝子解析を行った。患者検体:FD 男性患者 1 名、症候性女性ヘテロ接合 1 名、無症状未診断女性 3 名、男性及び女性対照群各 3 名

(倫理面への配慮)

患者検体の採取・解析は慈恵大学の倫理委員会で審査・承認された後行った。

### C. 研究結果

MLPA 法による解析の結果、FD 男性患者では GLA 遺伝子 exon2-5 のシグナルが検出できなかった。症候性女性ヘテロ接合では exon2-5 のピーク面積が対症女性群の半分であった。無症状未診断女性の内、2 名は症候性女性ヘテロ接合同様のシグナルであり、1 名は対象女性

### D. 考察

MLPA 法を用いた解析結果により、FD 男性患者は exon2-5 の欠損変異を持つ事が疑われた為、本患者の gDNA を用いて GLA 遺伝子解析を行った所 intron1 途中・exon5 途中までの約 5.5Kb.p.の大きな欠損変異が見つかった。症候性女性ヘテロ接合では exon2-5 のピーク面積が対症女性群の半分になっていた事から、変異 GLA 遺伝子のヘテロ接合という診断に至った。更に無症状女性患者の内、2 名は同 exon に変異を持つヘテロ接合、1 名は遺伝子変異無し診断となった。

### E. 結論

MLPA 法は欠損変異を持つ FD 病女性ヘテロ接合の診断に有用である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) ポスター発表・MLPA method is useful tool for genetic diagnosis of female

Fabry disease with deletion mutation(第  
3 回アジア先天代謝異常学会/2013 年 11  
月/舞浜/P86)

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

## ムコ多糖症 II 型の成長曲線作成

研究分担者：鈴木康之（岐阜大学医学教育開発研究センター）

### 研究要旨

ムコ多糖症 II 型（Hunter 病）患者 65 名（男性、治療前）の成長曲線を作成した。生後 6 か月から 3 歳にかけて多くの症例が過成長を示すこと、ヘルニア（鼠径、臍）の有無と組み合わせることで、早期診断に有用であることが明らかとなった。

### 研究協力者：

折居忠夫（折居クリニック）

折居建治（岐阜大学小児病態学）

戸松俊治（デュポン小児病院、米国）

Montaño AM（セントルイス大学、米国）

### A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型（Hunter 病）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、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸の蓄積を特徴とする X 連鎖劣性遺伝病であり、造血幹細胞移植や酵素補充療法による治療が行われているが、乳幼児期の成長に関する基礎データは不十分である。今回、Hunter 病患者の成長曲線を作成したので報告する。

### B. 研究方法

Hunter 病患者家族の協力を得て、患者 65 名の母子手帳記録に基づき、乳幼児期の成長曲線を解析した。

倫理面への配慮：連結不可能匿名化したデータで解析した。

### C. 研究結果及び考察

1) Hunter 病患者の標準身長，標準体重：身長は生後 3 か月から 3 歳にかけて高身長を示し、体重は生後 6 か月から 5 歳にかけて過体重を示した（表 1）。

2) Hunter 病患者の成長曲線の作成：Hunter 病に特有の成長パターンを明らかにした（図 1、図 2）。

3) 成長パターンと臨床所見（ヘルニア）の組み合わせによるムコ多糖症各病型の早期診断の可能性について明らかにした（表 2）。

表 1 Hunter 病患者の標準身長，標準体重

	Height		Weight			
	MPS-II		control	MPS-II		control
	mean	SD	mean	mean	SD	mean
<b>Birth</b>	50.1	1.6	49.0	3.3	0.4	3.0
<b>3 m</b>	65.9	2.7	62.0	7.8	1.1	6.6
<b>6 m</b>	71.9	2.3	67.9	9.3	1.1	8.0
<b>9 m</b>	76.2	3.0	71.8	10.6	1.4	8.7
<b>1 y</b>	78.9	2.6	74.8	11.6	1.6	9.2
<b>1.5 y</b>	84.6	3.3	80.6	13.4	2.2	10.4
<b>2 y</b>	88.8	3.3	85.1	15.5	2.9	11.3
<b>3 y</b>	96.9	4.0	93.3	18.0	4.0	13.9
<b>4 y</b>	102.0	3.8	101.8	19.7	3.5	15.7
<b>5 y</b>	106.7	4.2	107.0	22.0	5.1	17.5
<b>6 y</b>	110.5	4.4	114.9	23.3	3.2	19.9
<b>8 y</b>	117.0	5.6	125.3	30.3	9.3	26.6
<b>10 y</b>	115.0	5.9	136.4	26.7	6.2	33.5
<b>12 y</b>	118.6	3.9	149.1	28.3	3.4	43.5
<b>14 y</b>	118.0	6.4	162.8	30.2	6.3	53.4
<b>16 y</b>	121.8	10.3	169.4	31.8	6.0	60.5

図1 Hunter 病患者の成長曲線（身長）

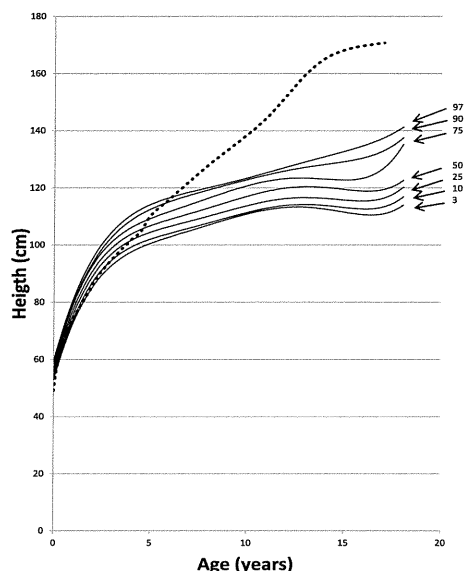


図2 Hunter 病患者の成長曲線（体重）

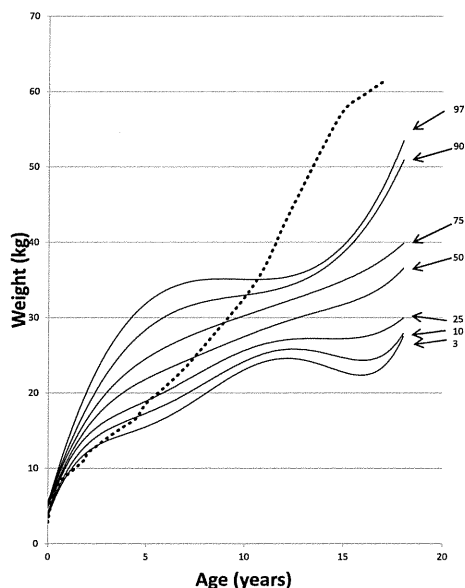


表2 成長と臨床所見（ヘルニア）の組み合わせによる早期診断

病型	患者数	生後18か月前の過成長 (A)	乳児期のヘルニア (B)	A or B
I	5	5	3	5
II	65	58	31	61
III	13	11	4	12
IV	7	4	1	5
VI	2	2	0	2

#### D. 考察

ムコ多糖症は以前から乳幼児期の過成長が言われてきたが、正確な計測に基づいたデータは存在しなかった。今回、母子手帳の記録を集計し、Hunter病患者の成長パターンを明らかにすることができた。また過成長と乳児期のヘルニアを組み合わせることでHunter病の9割が陽性となることを明らかにした。その他の病型でも同様の傾向を示した。

#### E. 結論

Hunter 病患者の成長曲線を作成した。過成長と乳児期のヘルニアを組み合わせることで高率にムコ多糖症を臨床的に検出できることを明らかにした。このデータは Hunter 病の早期診断と治療成績の解析に役立つと期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Pravin Patel, Yasuyuki Suzuki<sup>2</sup>, Miho Maeda, Eriko Yasuda, Tsutomu Shimada, Kenji E. Orii, Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Growth charts for patients with Hunter Syndrome. Molecular Genetics and Metabolism (in press)

##### 2. 学会発表

1) Yasuyuki Suzuki, Kenji Orii, Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Overgrowth in infants with Hunter disease: Implication for the early clinical detection. 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Interited Metabolic Diseases (JSIMD). Nov 27-29, 2013, Maihama, Chiba, Japan

#### H. 知的所有権の取得状況

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 ASM (A/B 型) あるいは膜蛋白 NPC1 あるいは NPC2 (C 型) 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ライソゾームに蓄積し、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。脂質蓄積減少をもたらす新たな薬物療法の開発が期待されている。最近、Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の C 型細胞への蓄積脂質減少効果が示された。変異 NPC1 蛋白量の発現量増強による効果とされているが、C 型細胞の二次的 ASM 欠損に対する改善効果も考慮され、本研究ではコレステロール輸送への ASM の関与に関して検討した。

### 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。

最近、ニーマンピック病 C 型細胞の脂質蓄積に対して Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の効果が報告された。変異 NPC1 蛋白の発現量増強による効果とされている。しかし、HDAC Inhibitor は ASM 活性上昇作用もあり、C 型細胞に伴う二次的 ASM 欠損に対する酵素活性上昇効果もある。本研究では、コレステロール輸送についての ASM の関与に関して検討した。

### B. 研究方法

正常皮膚線維芽細胞および C 型皮膚線維芽細胞に対して、HDAC Inhibitor として valproic acid ( $2\mu\text{M}$ )、vorinostat ( $10\mu\text{M}$ )、panobinostat ( $75\mu\text{M}$ ) を加えコレステロール蓄積を Filipin 染色および Amplex Red cholesterol quantification (Fluorocan Asent system)にて評価した。ASM のコレステロール輸送への関与を調べるために ASM Inhibitor として desipramine ( $50\mu\text{M}$ ) を追加で加え検討した。

### C. 研究結果

研究結果は以下の通りであった。

1) C 型培養皮膚線維芽細胞に観察される遊離コレステロール蓄積は、valproic acid、vorinostat、panobinostat により filipin 染色で明らかに減少することが観察された。しかし、desipramine を加えることでコレステロール蓄積が再び観察された。この結果は、HDAC Inhibitor による細胞内コレステロール輸送の改善には、ASM 活性の存在が重要であることが分かった。

2) C 型皮膚線維芽細胞に vorinostat および panobinostat を加えて、さらに追加として

desipramine を加えてその前後で細胞内コレステロール量を Amplex Red cholesterol quantification (Fluorocan Asent system) で定量した。その結果 desipramine 追加した細胞では優位に細胞内コレステロール量の増加を認められた。

#### D. 考察

C 型細胞の蓄積脂質に対する HDAC inhibitor の減少作用は ASM 抑制剤である desipramine により軽減され、消失した脂質が再び増加した。その結果は細胞内でコレステロール輸送に関与する NPC1 および NPC2 の作用には ASM 活性の存在が大きいことが分かった。

#### E. 結論

細胞外由来の LDL コレステロールは LDL 受容体からライソゾームに至り酸性リパーゼにより遊離コレステロールとなる。その後のライソゾームから細胞質への輸送に C 型ニーマンピック病の原因である NPC1 および NPC2 が関与する。本研究によりこの輸送には A/B 型ニーマンピック病の欠損酵素である ASM が関与している可能性がある。従って、C 型ニーマンピック病の細胞内脂質蓄積の改善には、二次的 ASM 欠損を改善する必要がある。

#### F. 研究発表

<論文>

- 1) Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y: The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. Mol Genet metab 111: 401-404, 2013

<著書>

- 1) 高橋 勉: Niemann-Pick 病、新領域別症候群シリーズ No.23、血液症候群Ⅲ (第 2 版) — その他の血液疾患を含めて—、日本臨床、日本臨床社、491-75、2013.
- 2) 小山千嘉子、高橋 勉: ニーマンピック病 A, B 型、新領域別症候群シリーズ No.20、先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下一病因・病態研究、診断治療の進歩—、日本臨床、日本臨床社、472-75、2012.

<学会発表>

- 1) Hirayama, M., Oyama, C., Noguchi, A., Takahashi, T. Histone deacetylase inhibitors need acid sphingomyelinase to reduce the abnormal storage of cholesterol in Niemann-Pick C1 cells. The 3rd Asian congress for inherited metabolic diseases, Chiba, Japan, Nov. 2013.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明

分担研究者：高村 歩美（財）脳神経疾患研究所先端医療研究センター 主任研究員

### 研究要旨

神経セロイドリポフスチン症の1つである CLN1 は、ライソゾーム酵素 Palmitoyl Protein Thioesterase1 (PPT1) 遺伝子欠損により発症し、進行性の視力障害、てんかん、運動退行、知的障害を伴う常染色体劣性遺伝病である。発症機構や臨床症状と遺伝子変異との関連性は明らかになっていない。そこで本研究は、CLN1 と診断された日本人 2 例の皮膚繊維芽細胞を用いた病態解析を目的とした。変異型 PPT1 の細胞内局在の変化や、オートファジーやミトコンドリア機能異常による細胞障害が明らかとなり、今後の更なる詳細な病態解析と、これらの病態を標的とする新しい治療法に関する研究が必要であると考えられた。

### 研究協力者

大樂武則（財）脳神経疾患研究所 研究員

藤崎美和（財）脳神経疾患研究所 嘱託研究員

### A. 研究目的

ライソゾーム病である神経セロイドリポフスチン症（CLN）は、進行性の視力障害、てんかん、運動退行、知的障害を呈する疾患群である。原因遺伝子 CLN1-8,10-14 が同定されており、神経細胞変性と細胞内リポフスチン蓄積が共通所見であるが同じ遺伝子型でも発症年齢により異なる臨床経過を示す場合もあり、各遺伝子型による発症機構の解明は困難である。根本的治療法はなく病態解明が期待されている。

PPT1 遺伝子変異により発症した若年型 CLN1、日本人 2 例について分子生物学的手法による病態解析を行い、PPT1 遺伝子変異が引き起こす直接的な細胞障害のメカニズム解明を目的とした。

### B. 研究方法

若年型 CLN1 の確定診断は、乾燥濾紙血並びに白血球中の PPT1 活性測定と PPT1 遺伝子変異解

析により実施した。患者の皮膚繊維芽細胞の変異型 PPT1 のプロセッシングや細胞内局在の変化を検討した。

また、PPT1 の生理学的機能の観点から、PPT1 欠損による細胞障害メカニズムについて PPT1 関連タンパク質や種々の細胞内現象を解析した。

### （倫理面への配慮）

本研究は、（財）脳神経疾患研究所の倫理委員会の承認を得て実施した。対象者の血液、皮膚繊維芽細胞は、文書を用いた説明の後、署名による同意を得た。

### C. 研究結果

#### 1. CLN1 患者の確定診断

日本人患者 2 例の乾燥濾紙血並びに、白血球の PPT1 活性は顕著に低下しており、新規 1 か所を含む遺伝子変異が 2 か所同定され確定診断に至った。

#### 2. 変異型 CLN1 の細胞内発現と局在変化

本症例の変異型 PPT1 は、発現しているものの



異所性の局在を示した (図1)。また、これらの変異型 PPT1 は Triton X-100 不溶性分画に増加していた。

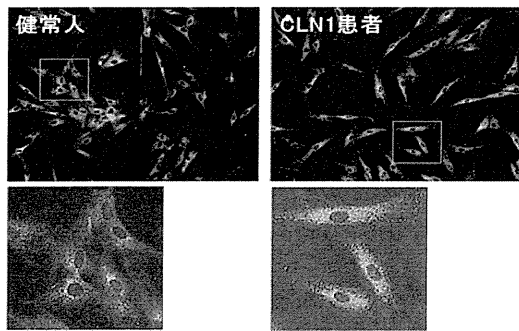


図1 変異型PPT1の細胞内局在

### 3. CLN1 細胞における脂質ラフトを介したエンドサイトーシスの亢進

変異型 PPT1 は、主に脂質ラフト (Triton X-100 不溶性分画) に集積していたことから、脂質ラフトを介したエンドサイトーシスのプローブである蛍光標識 cholera toxin b subunit (CTB) の取込み実験を行った。患者細胞では細胞膜や細胞内に取り込まれる CTB 量が増加しており、エンドサイトーシスの亢進が示された (図2)。

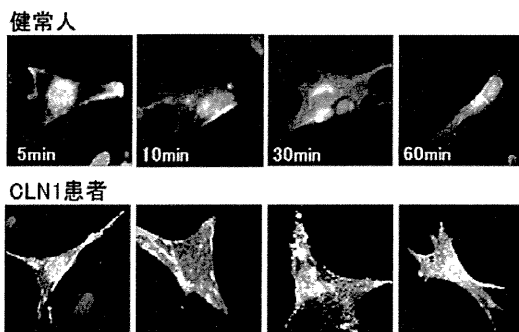


図2 エンドサイトーシス (CTB の取込み) の亢進

### 4. オートファジーの異常

患者細胞では、飢餓条件下におけるオートファゴソームのマーカーである LC3 II の発現が上昇していた。興味深いことに、通常培養条件下において、すでに細胞質型である LC3 I の発現量が顕著に増加しており、適切なタイミングでオートファジーが誘導されていない事が示された。

### 5. ミトコンドリアの機能障害

ミトコンドリア膜電位の蛍光プローブである JC-1 を用いて患者細胞を観察した結果、膜電位の消失が見られた。PPT1 遺伝子変異による細胞障害の下流には、ミトコンドリア機能異常が関与していることが示された。

### D. 考察

PPT1 の生理的機能は、脱パルミトイル化酵素であり、パルミトイル化により細胞膜に繋ぎ止められている種々のタンパク質 (受容体、イオンチャネル、細胞接着因子など) を膜から解放する役割を担っている。脂質ラフト分画の変異型 PPT1 の集積により、パルミトイル化を受ける種々のタンパク質の膜から細胞質への過剰な取込みを引き起こし、細胞障害を誘導している事が考えられた。

### E. 結論

2 例の PPT1 活性は低下しており、新規 1 か所を含む遺伝子変異が 2 か所同定された。変異型 PPT1 は翻訳後糖鎖修飾を受けるものの、細胞内局在に変化が見られた。特に Triton X-100 不溶性分画への局在が増加しており、細胞膜上の脂質ラフトで働く PPT1 の生理学的機能の異常が示唆された。オートファジーやミトコンドリア機能異常も示された。今後は、変異型 PPT1 が直接作用するパルミトイル化タンパク質の同定をはじめ、CLN1 の新しい治療標的を視野に入れた更なる詳細な病態解析を行う必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ohba C, Osaka H, Takamura A et al: Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. Neurogenetics. 2013 Nov;14(3-4):225-32
- 2) Takamura A, Sakai N, Eto Y et al: The useful preliminary diagnosis of

Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. Mol Genet Metab. 2013 Nov;110(3):401-4.

## 2. 学会発表

- 1) Takamura A, Fujisaki M, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, Nov. 2013
- 2) Fujisaki M, Takamura A, Diraku T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, Nov. 2013
- 3) 高村歩美, 藤崎美和, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝. PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明. 日本人類遺伝学会 第58回大会. 宮城, 2013.11
- 4) Takamura A, Sakai N, Shinpo M, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. THE USEFUL PRELIMINARY DIAGNOSIS OF NIEMANN-PICK DISEASE TYPE C BY FILIPIN TEST IN BLOOD SMEAR. The12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM). Spain, Sep. 2013
- 5) Fujisaki M, Takamura A, Diraku T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. ENZYMATIC SCREENING IN DRIED BLOOD SPOTS AND GENE

ANALYSIS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA (MPS IVA) IN JAPANESE. The12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM). Spain, Sep. 2013

- 6) 高村歩美, 酒井規夫, 新實理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕策, 井田博幸, 衛藤義勝. The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick type C - Filipin test in blood smear. ニーマンピック病C型シンポジウム 東京-診断と治療-. 東京, 2013.4

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## メタボローム解析による ALD 等ペルオキシソーム病の発症前診断マーカーの探索

分担研究者：横山 和明（帝京大学薬学部教授）

### 研究要旨

LC-MS/MS 法を用いてペルオキシソーム病で増減のある血清中リン脂質の網羅的定量測定系の確立を試みた。三連四重極型質量分析計で定量測定に適するとされる MRM (multiple reaction monitoring) 条件を多段同時実施し、代表的な脂質クラスについて網羅的に定量することに成功した。血清脂質を用いたところ、実際に患者血清で極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質の増加が確認された。

### 研究協力者

下澤伸行（岐阜大学生命科学総合研究支援センター・ゲノム分野 教授）  
今中常雄（富山大学大学院医学薬学研究部教授）

（倫理面への配慮）

各所属機関における倫理委員会の審査を受け、承認を受けたうえで実施した。

### A. 研究目的

Zellweger 症候群(ZS)や副腎白質ジストロフィー(ALD)などのペルオキシソーム病において、増加あるいは減少している脂質をメタボローム解析の手法によって定量的に測定し、その構造を決定する。これにより ALD 発症診断マーカーを見いだすことを目的とする。

### B. 研究方法

ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析法は数種類のモードがあるが、親イオンを選択して解裂を行い、分子構造に伴う特異的フラグメントイオンを測定する MRM 法が最も感度がよい。通常は数種類の対象物質について測定するのが通例であるが、脂質分子種を網羅的に定量するため、一度の測定で装置の上限に近い 70-80 通りの定量条件を設定し検討した。

次にペルオキシソーム病患者の血清中の脂質を Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出し、この測定系に供した。

### C. 研究結果

血清中のリン脂質としてはリポタンパク構成成分のホスファチジルコリンが主要成分とされる。これに加えて、一般の細胞の膜脂質として主要なホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンを今回の解析対象とした。血清脂質は微量であるが、検出可能であった。この中でホスファチジルコリンとスフィンゴミエリンについては極長鎖脂肪酸を含有すると思われる高分子量のピークのシグナル強度が高いことが確認された。さらに予備的測定により、高分子量ではない通常の脂肪酸から構成されるホスファチジルセリンが患者血清で高値である傾向が観察された。

### D. 考察

多段同時 MRM 法がリン脂質分子種の網羅的定量に有効であることがわかった。さらに昨年度までの研究で用いていた皮膚繊維芽細胞よりはるかに微量な血清でも、測定可能であることがわかった。ホスファチジルセリンについてはさらに例数を増やして検討する必要がある。

ALD 発症診断マーカーを見いだすために、今後本法で患者血清を用いて検討を重ねていく必要がある。

## E. 結論

多段同時 MRM 法がリン脂質分子種の網羅的定量に有効であること、微量な血清でも、測定可能であることがわかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kotaro Hama, Toru Nagai, Chiho Nishizawa, Kazutaka Ikeda, Masashi Morita, Noriko Satoh, Hiroki Nakanishi, Tsuneo Imanaka, Nobuyuki Shimosawa, Ryo Taguchi, Keizo Inoue, **Kazuaki Yokoyama**. *Lipids* 48, 1253-1267 (2013)  
Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome

### 2. 学会発表

- 1) 第 55 回日本先天性代謝異常学会、  
Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome、  
Kazuaki Yokoyama 他、日本先天性代謝異常学会誌、29, 193 (2013)

## 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

## 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 25 年 1 月から 11 月までの国内ペルオキシソーム病診断実績として、Zellweger 症候群 1 例、乳児型 Refsum 病 1 例、副腎白質ジストロフィー(ALD) のうち、小児大脳型 5 例、思春期大脳型 1 例、成人大脳型 2 例、AMN 3 例、小脳脳幹型 1 例、アジソン病 1 例、女性保因者 11 例、発症前患者 3 例を診断した。さらに診療情報周知活動として「副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック」と「ペルオキシソーム病ハンドブック」を編集し、各専門学会の評議員や患者会等に配布し、国内における難病の啓蒙に努めた。病態解明・治療法開発研究では ALD の大脳症状の発症因子の解明研究として、大脳型と非大脳型間の患者リソースを用いた DNA・RNA・細胞レベルでの検討に加え、遺伝子改変マウスを用いた中枢神経症状の発症実験を進めている。またペルオキシソーム形成異常症では患者線維芽細胞より iPS 細胞の樹立に加えて、モルフォリノおよび TALEN を用いたペルオキシソーム欠損モデルフィッシュの作製による病態解明を進めている。

### 研究協力者

高島 茂雄（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）  
豊吉佳代子（岐阜大学ゲノム研究分野・  
技術補佐員）  
大場亜希子（岐阜大学ゲノム研究分野・  
技術補佐員）

### A. 研究目的

稀少難病であるペルオキシソーム病を国内に周知し、診断システムを確立して早期診断、早期介入に繋げるとともに新たな疾患単位を発見する。さらに集積した患者リソースや iPS 細胞に、疾患モデル生物を用いて本症の病態解明から治療法の開発を進める。

### B. 研究方法

#### 1. ペルオキシソーム病診断システム：

ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS)

および液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いて患者血液よりペルオキシソーム代謝産物を測定し、細胞、タンパク、遺伝子レベルでの解析にて、確定診断を行う。

#### 2. ペルオキシソーム病患者の iPS 細胞樹立及び神経系細胞への分化：

同意が得られたペルオキシソーム形成異常症患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を作成し、クローンごとに CGH アレイによる iPS 化前後のゲノム比較解析、SCID マウスへの移植によるテラトーマの作成を確認後、神経系の細胞に分化させ、発生異常の病態を解明する。

#### 3. 疾患モデル生物による検討：

・ALD では遺伝子異常による基本病態は脊髄病変で、何らかの因子が加わることにより、大脳型を発症すると考えられている。従ってモデルマウスに薬剤などの外的要因を負荷することにより、大脳型 ALD モデルを作製し、発症機序の解明、治療法の開発に繋げる。

・ゼブラフィッシュを用いてモルフォリノ、

TALENにより PEX 遺伝子をノックダウンしたペルオキシソーム欠損モデルフィッシュを作製し、発生過程における病態を解明する。

## C. 研究結果

### 1. ペルオキシソーム病患者診断の成果：

平成 25 年 11 月までの国内診断実績として、Zellweger 症候群 1 例、乳児型 Refsum 病 1 例、ALD では小児大脳型 5 例、思春期大脳型 1 例、成人大脳型 2 例、AMN 3 例、小脳脳幹型 1 例、アジソン病 1 例、女性保因者 11 例、発症前患者 3 例を診断し、適切な診療情報を提供して早期治療に繋がった。

さらに診療情報周知活動として「副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック」と「ペルオキシソーム病ハンドブック」を編集し(資料参照)、各専門学会の評議員や患者会等に配布し、国内における難病の啓蒙に努めた。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も行っている。

### 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より iPS 細胞を樹立し、複数のクローンにおいて CGH アレイで iPS 化前後でのゲノム構造の不変と SCID マウスへの移植によるテラトーマ作成を確認し、現在、神経系の細胞(ニューロン、グリア細胞)への分化を進めている。

### 3. 疾患モデル生物による検討：

- ・ALD モデルマウスにロレンツォ油、PPAR $\alpha$  アゴニスト等を投与し、血中の極長鎖脂肪酸をはじめとしたペルオキシソーム代謝産物にペルオキシソーム代謝系遺伝子発現の変動を検討した。

- ・ALD モデルマウスによる大脳型作成実験では再現性のある頭部外傷モデルの作成系を確立し、現在引き続き、長期予後を観察中である。

- ・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ペルオ

キシソーム欠損ゼブラフィッシュを作成し、現在、表現型、ペルオキシソーム代謝機能、遺伝子発現を対照と比較検討中である。

## D. 考察

本分担研究の成果として、①国内外のペルオキシソーム病患者の診断率の向上、早期診断の取組みについては、診断システムの機能を向上させるとともに、ハンドブックの作成・配布による疾患の啓蒙活動等により達成している。②ALD 患者リソースを用いた発症機序の解明に関しては本研究班内に構築した複数の共同研究グループにより、病型規定因子の解明から難病克服に繋がることが期待される。ALD 遺伝子改変マウスを用いた③生化学的レベルでの病態解明、治療法の開発、④中枢神経症状発症による大脳型モデルの開発に関しても現在、本研究班内の共同研究により解析を進めている。ペルオキシソーム形成異常症患者における、⑤iPS 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も作成はほぼ終了段階にあり、現在、検証作業から解析を進めている。⑦患者会と協力した難病克服への取組みについては勉強会、ニュースレターの配布、情報交換から岐阜大学小児科外来でのセカンドオピニオン、遺伝カウンセリングに繋がっている。

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て、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、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がって

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た。

## F. 研究発表

### 原著論文

- 1) Vu Chi Dung, Nobuyuki Shimozawa, Nguyen Ngoc Khanh, et al. Mutations of ABCD1 gene and phenotype of Vietnamese patients with X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD). **International Journal of Pediatric Endocrinology Suppl** 1: 127, 2013.
- 2) Ohba C, Osaka H, Shimozawa N, et al. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. **Neurogenetics** 14: 225-32, 2013.
- 3) Hama K, Nagai T, Shimozawa N, et al. Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome. **Lipids** 48: 1253-1267, 2013.
- 4) Shuji Matsui, Masuko Funahashia, Nobuyuki Shimozawa, et al. Newly identified milder phenotype of peroxisome biogenesis disorder caused by mutated PEX3 gene. **Brain Dev**; 35: 842-8, 2013.
- 5) Yumi Mizuno, Yuichi Ninomiya, Nobuyuki Shimozawa, et al. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. **PLOS Genetics** 9 :e1003286, 2013.
- 6) Masashi Morita, Junpei Kobayashi, Nobuyuki Shimozawa, et al. 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**, Rep 10: 95-102, 2013.
- 7) Iwasa M, Yamagata T, Shimozawa N et al. Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case. **Neuropathology** 33: 292-8, 2013.

### 診療ハンドブック

- 1) 下澤伸行 ペルオキシソーム病ハンドブック 2013 -全てのペルオキシソーム病患者の診断治療を目指して- 日本臨床社 大阪 2013年6月
- 2) 下澤伸行: 監修、副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック 2013 作成委員会: 編集 副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック 2013 -ALD患者を支えている関係者の皆様へ- 協力: 日本先天代謝異常学会 厚生労働省難治性疾患克服事業「ライソゾーム病(ファブリ病を含む)に関する調査研究」西濃印刷 岐阜 2013年9月

### その他の論文

- 1) 下澤伸行 Zellweger spectrum 先天代謝異常ハンドブック pp248-249. 中山書店. 東京. 2013年
- 2) 下澤伸行 rhizomelic chondrodysplasia punctate (RCDP) type 1 先天代謝異常ハンドブック pp250-251. 中山書店. 東京. 2013年
- 3) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 先天代謝異常ハンドブック pp252-253. 中山書店. 東京. 2013年
- 4) 下澤伸行 ペルオキシソームβ酸化酵素欠損症 先天代謝異常ハンドブック pp254-256. 中山書店. 東京. 2013年
- 5) 下澤伸行 Refsum病、rhizomelic chondrodysplasia punctate (RCDP) type 2・3 先天代謝異常ハンドブック pp257-259. 中山

書店. 東京. 2013 年

- 6) 塩田睦記、舟塚 真、下澤伸行、他 極長鎖脂脂肪酸の反復検査で診断し得た D-bifunctional protein 欠損症の 1 例 東京女子医科大学雑誌 83: E103-106, 2013 年
- 7) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 小児科診療 76(1) 35-43. 2013 年

#### 学会発表

- 1) 下澤伸行: 「これだけは伝えたい診断法 ペルオキシソーム病」第 9 回先天代謝異常学会セミナー、品川、7 月 2013
- 2) Shimozawa N: Peroxisomal disorder 12th Asian and Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh. September 2013.
- 3) Shimozawa N: Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases 3rd ACIMD & 55<sup>th</sup> JSIMD. Maihama. November 2013.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## ALDにおけるミスセンス ABCD1 をターゲットとした治療薬の開発ならびに新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の分子病態解析

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 ABC 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。ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA のペルオキシソームへの輸送に関与し、その異常による極長鎖脂肪酸蓄積は、ALD の原因となると考えられている。また ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 のうち、約 70% が細胞内で分解される。そこで本研究では、ABCD1 の機能改善を目指した創薬研究のため、まず ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA 輸送の分子機構を解析した。また変異 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞を用いたスクリーニングにより、変異型 ABCD1 を安定化する数種の有効化合物を見出した。さらに、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療のための予備実験を行った。一方、*ABCD4* と *LMBRD1* 遺伝子異常による新規ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症（ビタミン B<sub>12</sub> のライソゾーム蓄積症）に関しては、*LMBRD1* 遺伝子にコードされる LMBD1 が ABCD4 と複合体を形成し、ABCD4 を小胞体からライソゾームへ輸送するキャリアタンパク質として機能することを見出した。よって ABCD4 もしくは LMBD1 の変異により共通したフェノタイプが起こる理由が明らかになった。

### 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

#### ABCD1 の機能解析

ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与すると考えられているが、その輸送機構の詳細は不明である。ABCD1 の基質輸送機構を理解

することは、ABCD1 の機能を改善する治療薬開発のために重要である。最近、植物ペルオキシソーム膜に局在する ABCD1 ホモログ CTS が極長鎖脂肪酸 CoA を加水分解し、遊離した極長鎖脂肪酸を輸送する可能性が示唆された。そこで本研究では、ヒト ABCD1 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に安定発現させ、ABCD1 の基質輸送機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

#### 変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

副腎白質ジストロフィー (ALD) 患者で見出されているミスセンス変異 ABCD1 の約 70%が細胞内で分解される。Zhang らは、ALD 患者由来線維芽細胞を 30°C で培養することにより、いくつかの変異型 ABCD1 で機能が回復することを報告している。よって、ミスセンス変異 ABCD1 タンパク質を安定化し、正常にペルオキシソームに局在化する化合物は治療薬候補として有用である。そこで、昨年度までに構築した変異型 ABCD1-GFP 発現 CHO 細胞を用い、ミスセンス変異 ABCD1 の機能を回復させる化合物を探索することを目的とした。さらに、ALD では発病前 (発病初期) での骨髄移植が神経症状の抑制に効果があることが、そのメカニズムは分かっていない。そこで、組換えレンチウイルスベクターを作製し、マウス造血幹細胞への感染、及び骨髄移植について検討することにより、造血幹細胞移植による遺伝子治療の有効性明らかにすることを目的とした。

#### 新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

ビタミン B<sub>12</sub> はエンドサイトーシスによってライソゾームに取り込まれた後、細胞質中へと排出され、補酵素型に変換され機能している。最近、ABC トランスポーター ABCD4 とライソゾーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子変異により、ライソゾームから細胞質へのビタミン B<sub>12</sub> 輸送が障害されることが報告された。本研究では、ライソゾームからのビタミン B<sub>12</sub> 輸送異常の分子機構を理解するため、ABCD4 のライソゾームへの局在化における LMBD1 の協調的な役割を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### ABCD1 の機能解析

メタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用い、ABCD1 の N 末端に His タグ付加した融合タンパク質をメタノールで強力に誘導されるアルコールオキシダーゼプロモーター支配下で発現する株を作製した。ABCD1 の細胞内局在性は、ナイコデント密度勾配遠心法により解析した。ATPase 活性はリン酸モリブデン法、acyl-CoA thioesterase 活性はエルマン法を用いて測定した。

### 変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 (R518Q、A616T など) の C 末端に GFP を融合した変異 ABCD1-GFP を安定発現する CHO 細胞を 96 well プレートで培養した。そこに既存薬 1948 種類、天然化合物 341 種類、脂質 62 種類 (東京大学創薬オープンイノベーションセンターより供与) を最終濃度 20  $\mu$ M になるように加えた。2 日間培養後、細胞の蛍光強度を測定した。変異 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。

骨髄移植に関しては、野生型マウスの頸骨から骨髄細胞を採取し、9Gy の放射線照射で骨髄破壊したレシピエントの ABCD1 欠損マウスの眼窩静脈叢に注入した。5 ヶ月後、脳における ABCD1 タンパク質の発現や遺伝子発現をイムノブロット法や RT-PCR 法により解析した。造血幹細胞 (lineage 陰性, c-kit 陽性) は、マウス骨髄細胞を MACS で未分化細胞を分離した後、FACS を用いて調製した。調製し

た造血幹細胞に ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させた後、放射線照射処置を施したマウスの眼窩静脈叢に注入することで移植した。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。

### 新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

ABCD4 と LMBD1 の C 末端に HA タグ、GFP をそれぞれ付加した融合タンパク質 ABCD4-HA、LMBD1-GFP の発現ベクターを作製した。ABCD4-HA 発現ベクターをヒト肝癌 HuH7 細胞にトランスフェクトし、ABCD4-HA の安定発現細胞を取得した。発現した ABCD4-HA、LMBD1-GFP の細胞内局在性は免疫染色法で解析した。さらに LMBD1-GFP ならびに ABCD4 の各種変異体発現ベクターを作製した。LMBD1 の ABCD4 の局在化への影響は、野生型 ABCD4 と変異型 LMBD1 を共発現させることにより解析した。ABCD4 と LMBD1 の相互作用は抗 HA 抗体を用いた pull down 法で解析した。

(倫理面での配慮)

ALD 患者線維芽細胞は、提供者が子供のため、両親の同意を得て採取したものを使用した。

## C. 研究結果

### ABCD1 の機能解析

His 抗体を用いたウエスタン解析、蛍光顕微鏡観察、細胞分画により、*P. pastoris* において全長 ABCD1 が発現し、ペルオキシソームに局在化していることが示された。His-ABCD1 発現株のペルオキシソーム画分では、非発現株

と比較し有意な ATPase 活性の増加が認められた。ATPase 活性は脂肪酸ならびに脂肪酸 CoA 添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大した。His-

ABCD1 を発現したペルオキシソーム画分に palmitoyl CoA を加えると、遊離した SH 基を検出できたことから、ABCD1 が ATPase 活性に加え acyl-CoA thioesterase 活性を有することが示された。また、acyl-CoA thioesterase 活性は高濃度の ATP により抑制された。さらに、149 番目のセリンをアラニンに置換した変異型 ABCD1 は、活性を失うことを明らかにした。

### 変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞ではプロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理や 30°C での培養により、ABCD1-GFP の回復が認められた。また同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞でも低温培養により内因性 ABCD1 の回復が認められた。そこで、変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞を用いて蛍光強度の増加を指標した化合物スクリーニングを行った。その結果、野生型 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞に比べて 50% 以上の蛍光強度を示す 22 種類の化合物を見出した。次にこれらの化合物について蛍光抗体法により解析を行った結果、既存薬ではアントラサイクリン系抗生物質とボルテゾミブを含む 5 種類の化合物で、天然化合物では 3 種類の化合物で、変異 ABCD1-GFP の回復とペルオキシソームへの局在化が確認された。さらに同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞において、内因性の変異 ABCD1 タンパク質の回復を蛍光抗体法で解

析した結果、既存薬で 2 種類（ボルテゾミブを含む）、天然化合物で 2 種類の有効化合物を見出した。

造血幹細胞移植実験では、野生型マウスの骨髓細胞を放射線照射した ABCD1 欠損マウスに移植した。5 ヶ月後、脳からペルオキシソーム画分を調製し、ABCD1 タンパク質の発現解析を行った結果、ABCD1 欠損マウスの脳に ABCD1 が発現していることが確認された。一方、ABCD1 欠損マウスの骨髓細胞から、FACS により造血幹細胞を高い純度で回収することができた。この造血幹細胞にヒト ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ、ABCD1 の発現を確認した。現在、ABCD1 発現造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植し、飼育している。

#### 新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の解析

一過性に発現させた ABCD4-HA は小胞体に、LMBD1-GFP はリソゾームに局在していた。一方、ABCD4-HA を安定過剰発現させた HuH7 細胞に LMBD1-GFP を共発現させたところ、ABCD4-HA の局在は小胞体からライソゾームへと変化し、LMBD1-GFP と共局在していた。また、両タンパク質が複合体を形成することも確認した。

ABCD4 の 6 個の膜貫通領域のうち、N 末端側の 2 個の膜貫通領域を欠損した変異型 ABCD4-HA は、LMBD1-GFP と共発現させてもライソゾームには移行しなかった。一方、LMBD1 の 11 個の膜貫通領域のうちの 6 番目以降を欠損した変異型 LMBD1-GFP を ABCD4 と共発現させると、ABCD4 と変異型

LMBD1-GFP は共局在していたが、ライソゾーム上には局在しなかった。

#### D. 考察

##### ABCD1 の機能解析

*P. pastoris* に ABCD1 を活性型酵素として発現させることに成功した。ABCD1 の ATPase 活性は脂肪酸添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大したことから、より長鎖の脂肪酸に高い親和性を持つことが示唆された。さらに、CoA 体への親和性の方が高いと示唆された。ABCD1 のもつ acyl-CoA thioesterase 活性は、149 番目の Ser を Ala にさせることにより失活した。ALD 患者においても同様の変異が報告されているので、ABCD1 の acyl-CoA thioesterase 活性は、基質輸送に必須と考えられる。ABCD1 は極長鎖脂肪酸を認識し、CoA を加水分解により分離し、極長鎖脂肪酸を輸送している可能性が高い。また acyl-CoA thioesterase 活性と ATP 加水分解が協調して極長鎖脂肪酸を輸送していると推測される。

##### 変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

今回見出した既存薬ボルテゾミブは、多発性骨髓腫の治療薬として認可されている。今後、機能回復に必要な濃度と細胞毒性について検討する予定である。もう一つの既存薬は細胞毒性が低く、脳代謝改善薬として用いられていた薬物であり、血液脳関門を通過する。これらの既存薬は、ALD の候補治療薬になる可能性が考えられる。一方、天然化合物で効果のあった 2 種類は類似構造をもっており、治療薬のシーズ化合物になると考えられる。今後さらに多く