

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

ライソゾーム病(ファブリ病含む)に関する調査研究

研究代表者 衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）

A. 研究目的

本研究はライソゾーム蓄積症（LSD），副腎白質ジストロフィー（ALD）などが含まれるペルオキシソーム病(PD)患者の現状並びに予後、日常生活動作（ADL）,生活の質（QOL）の改善を目指すため自然歴との比較、現在の治療特に酵素補充療法の長期効果、阻害因子を解明する。又LSD, PDの病態を、iPS細胞等を用いて明らかにし、早期診断の為に新しい診断法、治療法を検討する。濾紙血を用いての新生児、ハイリスクスクリーニングによる早期診断治療、シャペロン治療、基質合成抑制治療の効果判定、ウイルスベクターあるいはZnフィンガー法など相同組換えを用いた遺伝子治療・細胞治療に関わる新規治療法の開発を進める。

LSD, PDの多くは中枢神経障害を呈し、中枢神経障害に対する酵素髄注治療、遺伝子治療による治療効果を明らかにする。同時に我が国での遺伝子治療体制を整備する。

B. 研究方法

LSD, PD患者の臨床像の把握

1. QOL, ADLの全国調査&酵素治療効果の登録システムの導入（衛藤、大橋、坪井、高柳、高橋、奥山、下澤、加我）
2. バイオマーカーの開発（櫻庭、渡邊、衛藤）
3. 造血幹細胞移植の評価、ガイドライン作成（加藤、鈴木、横山）
4. 酵素補充療法の評価、ガイドライン作成（衛藤、大橋、田中、奥山、高柳）

LSD, PD (ALD) 患者スクリーニングの開発、実施（衛藤、北川、奥山、遠藤、下澤）

LSD, PD (ALD) 患者病態の解析

（辻、衛藤、酒井、高橋、今中、下澤、松田、辻、加我、田中）

新規治療法の開発

1. ケミカルシャペロン（難波、大野）
2. 造血幹細胞移植（衛藤、田中、鈴木）
3. 遺伝子・細胞治療（島田、大橋、小林、今中、下澤）
4. 基質合成抑制治療、イソフラボン治療（大野、鈴木）
5. iPS細胞治療（衛藤、奥山、大野、下澤）
6. 抗体治療（大橋、小林、田中）

遺伝病の遺伝子治療体制の整備

（衛藤、奥山、大橋、小林、島田、下澤）

（倫理面への配慮）

スクリーニング、アンケートを行なう際は事前に各施設の倫理委員会の承認を得た上で、研究計画説明書と同意書を用意し賛同を得てから実施する。実施に当たっては検体の匿名化を施行。また動物実験は各施設の倫理委員会、遺伝子組み換え委員会、動物実験委員会の承認を得た上で倫理指針に従うこととする。

C. 研究結果

1. QOL, ADL の全国調査&酵素治療効果
ライソゾーム病患者ではファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病、ムコ多糖症 I, II, III 型を中心に評価を行い、酵素補充療法が開発され治療されている患者では著しく臨床症状が改善している。患者の6分間歩行、QOLの上昇、心機能などの改善が示された（井田、高柳、坪井、大橋、田中、大澤、渡辺）。特にQOL, ADLなどの改善が著しい疾患はゴー

シェ病、ムコ多糖症 I,II 型である。ALD では症状が出る前の時期に造血幹細胞移植を施行すれば比較的 IQ 等を含め予後の改善が期待できる。より詳細な移植効果をムコ多糖症、ALD で明らかにする(田中、加我、横山、鈴木) これらの追跡調査をより簡便にかつ正確に把握するため、オンラインによる登録システムも開発中である。

2. バイオマーカー：櫻庭らはゴーシェ病のバイオマーカー候補として、グルコシルスフィンゴシン(Lyso-GlcCer) とグルコシルセラミド(GlcCer)を考慮し、それらの血漿中濃度の測定法を確立した。横山らは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を試みた。具体的には 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、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。

3. 造血幹細胞移植では先天代謝異常、特にムコ多糖症 型に対する効果が再確認され(田中ら)、ALD その他の疾患も含めたガイドライン作成が開始されている。

4. 酵素補充療法はファブリー病における両酵素アガルシダーゼベータとアルファの比較検討、また現在承認されている疾患であるポンペ病、ムコ多糖 I, II, VI 型、ファブリー病、ゴーシェ病などの臨床効果の検討(市販後調査)が進められている。

先天代謝異常疾患のスクリーニングは現行では従来のガスリー法からタンデムマスなどの質量分析機器を用いた方法に移行しつつあり、対象疾患も大幅に拡大したが、現在酵素補充療法などの保険適応になっている治療法の存在する疾患群においては整備が十分進んでいない。これらに対し濾紙血を使用するドライスポット法を中心に早期診断目的に実施に向けて検討が為されており、ポンペ病、

ファブリー病、ムコ多糖症などにおいて成果が報告されている。

病態解析としてはゴーシェ病の原因遺伝子である GBA 遺伝子変異のキャリアーがパーキンソン病の危険因子になるという関連解析が、日本人を含め様々な人種で報告され、パーキンソン病と共通する病理学的特徴(α-synuclein の蓄積・封入体)をもつ神経変性疾患である多系統萎縮症(MSA)について、GBA 遺伝子変異との関連を辻らが検討し、明らかに有意な相関は見られないが頻度が高い傾向にあるとされた。

また高村は神経セロイドリポフスチン症の 1 つである CLN1 におけるライソゾーム酵素 Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) 遺伝子欠発現を解析し、CLN1 患者由来の繊維芽細胞において変異型 PPT1 は翻訳後糖鎖修飾を受けるものの、細胞内局在に変化(細胞膜上の脂質ラフトで働く PPT1 の生理学的機能の異常)が見られ、オートファジーやミトコンドリア機能異常も示された。

田中らはムコ多糖症 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse(IDS-KO)の脳組織について形態学的検索を行った。その結果IDS-KOの神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、このことが神経細胞障害の主たる要因となっていると推測された。加我らは脳波の周波数解析がALDの早期診断と発症部位推定に役立つ可能性を示唆した。下澤らはALDなどのペルオキシソーム病の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。北川らはガラクトシダーゼなどのライソゾーム病の

酵素活性を測定する場合の至適反応時間を再検討し、活性測定反応時間は37℃、2時間~4時間が最も良く、従来から行われている37℃、20時間の反応時間では正しい測定値が得られない結果であり、反応時間は2~4時間の反応が良いとした。

鈴木らはムコ多糖症 VII 型の成長曲線を作成し生後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した。

新規治療法の開発

1. ケミカルシャペロン 鈴木、難波らはガラクトシダーゼ欠損症であるG_{M1}ガングリオシドーシスにNOEV(*N*-octyl-4-*epi*-β-valienamine)が有効であることを証明し、治験段階まで進めた。酒井らはクラッペ病に対してもNOEVが有効であることを示している。

2. 遺伝子治療 島田らはAAV（アデノウイルス随伴ウイルス）ベクターを用いてMLD（異染性白質脳症）のモデルマウスに対する遺伝子治療（新生児への静脈注射、中枢神経系への直接注射）にて効果をあげている。小林らはクラッペ病、ムコ多糖症 VII 型マウスに対して主に第二世代レンチウイルスベクターを用いて新生児マウスへの静脈注射による遺伝子治療に取り組み、これらの疾患においてそれぞれ中枢神経系での発現、寿命の延長などが確認されている。クラッペ病では基質合成阻害剤、コドン最適化遺伝子の組み込みなどの併用により相乗効果が確認されている。更に Zinc Finger を用いてモデルマウス由来の細胞株において、相同組換えにより欠損酵素 GALC の有意な発現に成功している。ムコ多糖症 VII 型ではオートファジービルドアップの改善傾向も遺伝子治療の結果として見られている。また今中らとの共同研究でALDモデルマウスへのレンチウイルスベクターを用いた *exo-vivo* gene therapy も有効性を呈している。

3. iPS 細胞関連ではまだ治療に関連する段階には来ていないが、衛藤らはポンペ病、ムコ多糖症 VII 型、クラッペ病などのマウスおよび患者由来の iPS 細胞の作製に成功し、更にポンペ病において骨格筋への分化を成功させている。今後各疾患の主要臓器への分化を試み、これらに対する薬剤や遺伝子治療、シャペロン治療などの効果を探っていく。

4. 基質合成抑制治療、イソフラボン治療 鈴木らはイソフラボンの経口投与によるムコ多糖症における中枢神経系の効果を調査し、限定的ながら有効の可能性が示唆された。

5. 抗体治療 大橋らはファブリー病モデルマウスに対して CD3 などの抗体を経口投与することにより免疫寛容を促進し、酵素補充療法の効果を安定化させることに成功した。

6. 酵素髄腔内投与 衛藤らはムコ多糖症 VII 型モデルマウスに対し欠損酵素イズロン酸サルファターゼの髄腔内投与(脳室内)を調査し、神経病理上の改善を報告している。

遺伝病の遺伝子治療体制の整備

衛藤、奥山、大橋、小林、島田、下澤らは年に一回、国際遺伝病遺伝子治療フォーラムを主催し、遺伝子治療に関連する国内外の企業関係者や患者家族と情報交換および協力体制を築くことにより、日本国内での先天代謝異常や重症複合型免疫不全を含む遺伝病に対する臨床遺伝子治療の実現に向けて企業協力や法整備といった点で準備を進めている。昨年1月には港区において行われ、ALDの事例をはじめ多くの臨床研究報告などがなされ盛況のうちに閉幕した。

D. 考察

ADL, QOLの全国調査をすることにより、各疾患の実際の臨床像および現在の問題点が浮き彫りになってきたといえる。酵素補充療法が保険適応となりライソゾーム病も治療可能な疾患となりつつある現在、患者および家族のニーズも大幅に変化している。またバイオマーカーの検討は疾患の早期発見や治療効

果判定に役立つ重要な研究であるが、徐々に実際の成果は出つつある。造血幹細胞移植の効果も欧米では従来無効とされたムコ多糖症型においても証明されつつあり、ガイドラインの詳しい作成が進行中である。酵素補充療法の市販後調査も進んでおり、現時点でゴーシェ病、ムコ多糖症、型、ファブリー病、ポンペ病の各疾患において中枢病変、心臓、骨系統への効果は限定的であるがそれ以外の効果は明らかになりつつある。今後はアレルギー事例への対応や髄腔内投与の検討が課題となる。またスクリーニングはライソゾーム病では濾紙血を用いた方法での分析が主流となるが、カットオフ値の決定で問題となるのはpseudodeficiencyの存在である。これらのコンセンサスは今後重要な課題である。病態解析は今回も遺伝子解析だけでなく、多岐にわたる解析が進み、臨床応用に結びつく研究が数多くなされている。新規治療法の開発面では遺伝子治療においてマウスなどを用いた実験報告で中枢への効果を含めた効果の大幅な改善が認められている。さらにZinc Fingerなど相同組換えを用いた遺伝子編集といった新たな手法も開発が進んでいる。またシャペロン療法や基質合成阻害などの方法論にも進歩が見られている。特にシャペロンはわが国から世界へ発信する新しい治療法であり、今後の発展が期待される。また同じく日本発の話題として取り上げられるiPS細胞は今後ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病の領域でも新規治療開発、病態解明に有用な可能性を秘めており、疾患由来の細胞作製から標的臓器への分化が現在の課題である。

また遺伝病の臨床遺伝子治療への整備として毎年国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムが開催され整備は徐々に進んでいるといえる。

E. 結論

ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病に対する実態調査、病態解析、新規治療法開発といった柱となる各研究は着実に進んでおり、

今後の課題も明確になっている現状で増々の成果が期待される。

F. 健康保険情報

なし

G. 研究発表

各研究分担者の報告覧参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

各研究分担者の報告覧参照