

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げた。

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 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、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。ALD 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のが期待される。ALD 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、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、iPS 細胞樹立による病態解明、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。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げている。

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 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 & 55th JSIMD. Maihama. November 2013.

G . 知的財産権の出願・登録状況
特になし

