

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2. 学会発表

1) T. Matsukawa, Y. Takahashi¹, J. Goto¹, Y. Suzuki, N. Shimoszwa, H. Takano, O. Onodera, M. Nishizawa, S. Tsuji. omprehensive resequencing of PEX5 gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and association studies with the phenotypes of ALD. American Society of Human Genetics, Washington, DC, 2010. 11

2) 松川 敬志, 高橋祐二, 後藤順, 鈴木康之, 下澤伸行, 高野弘基, 小野寺理, 西澤正豊, 辻省次. 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

3) T. Matsukawa, Y. Takahashi¹, J. Goto¹, Y. Suzuki, N. Shimoszawa, H. Takano, O. Onodera, M. Nishizawa, S. Tsuji. omprehensive resequencing of PEX5, PEX13 and PEX14 gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and association studies with the phenotypes of ALD. International Congress of Human Genetics, Montreal, 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

GBA 遺伝子とパーキンソン病との関連

分担研究者 辻 省次 東京大学神経内科 教授

研究要旨

Glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異はパーキンソン病患者と関連する。

分担研究者氏名：

松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生

三井 純 東京大学神経内科 特任助教

後藤 順 東京大学神経内科 准教授

辻 省次 東京大学神経内科 教授

戸田 達史 神戸大学神経内科 教授

Ellen Sidransky. Senior Investigator. Section on Molecular Neurogenetics, Medical Genetics Branch, NHGRI, National Institutes of Health.

石田 直理雄 独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 上席研究員

A. 研究目的

Gaucher 病の原因遺伝子である GBA 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異とパーキンソン病 (PD) の関連について主に遺伝学的に検討する。

B. 研究方法

1. PD患者534例, 健常者544例を対象にGBA 遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界域のresequencingを行った。

2. 海外との多施設共同によるGBA遺伝子の関連解析を行った。合計でPD 5,691例, 健常者 4,898例の規模で, GBAの病原性変異の頻度について検討した。

3. ターゲット領域に対する大規模関連解析を可能にするため, DNAサンプルを6サンプル分プールしたうえでGBA遺伝子領域 (6.5 kb) をPCRして, 次世代シーケンサー (SOLiDシステム) で配列解析を行った。データの特徴を分析し, 偽陽性を軽減するための方法を検討した。

4. PD患者96例において, 他のライソゾーム病遺伝子の病原性変異がないかスクリーニングしたところ, GLA遺伝子のE66Q変異のみが検出された。そこでPD患者260アレル, 健常者399アレルに規模を拡大して関連を検討した。

5. ヒトの変異型GBA遺伝子を過剰発現するショウジョウバエを作成し, 表現型などの分析を行った。

(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

1. PD患者534例中50例 (9.4%), 健常者544例中2例 (0.37%) に病原性変異をヘテロ接合性に認めた。オッズ比は28倍で統計学的に有意であった。PD患者における病原性変異のキャリアー群は非キャリアー群と比べて発症年齢

が有意に若年であった。

2. 人種を問わず、GBA 病原性変異は PD 発症のリスクになることが確認された。PD 患者における病原性変異のキャリアー群は非キャリアー群と比べて発症年齢が有意に若年であった。

3. 6 サンプル分の DNA プーリングにおいて全ての変異（12 アレル分の 1 以上の変異）を検出するように変異コール条件を設定すると、真の変異 99 個に対して、偽陽性変異 503 個が検出された、

サイクル数依存性エラー、配列依存的エラー、アレルバイアスなどについて検討し、偽陽性を軽減するためのパラメーターを再設定したところ、真の変異 99 個に対して、偽陽性変異 27 個まで軽減することができた。

4. PD 患者 260 アレル中 4 アレル (1.5%)、健常者 399 アレル中 2 アレル (0.5%) に GLA, E66Q 変異を認めた。頻度が低いため、 $p=0.25$ と有意差は得られなかったが、患者群に多い傾向を認めた。

5. ヒトの変異型 GBA 遺伝子を過剰発現するショウジョウバエは、眼に形態異常が出現した。小胞体ストレスマーカーが上昇した。変異型 GBA に対してシャペロン作用を持つ Ambroxol を投与したところ、ショウジョウバエの眼における形態異常が軽減し、小胞体ストレスマーカーが軽減した。

D. 考察

Gaucher病の原因遺伝子であるGBA遺伝子が神経変性疾患PDと関連することが示されたことは、両者の病因を解明する上で非常に重要な手がかりになると期待される。

遺伝学的には、従来の多型によるゲノムワイ

ド関連解析では検出することが難しかった common disease - multiple rare variantsモデルの実例となった。

E. 結論

PD発症の遺伝的病因の一つがGBA遺伝子のヘテロ接合性病原性変異であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2009;66:571-6.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009;361:1651-61.
- Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, et al. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing using next-generation sequencer. *J Hum Genet* 2010;55:448-55.
- Suzuki T, Shimoda M, Ito K, et al. Expression of human Gaucher disease gene GBA generates neurodevelopmental defects and ER stress in Drosophila eye. *PLoS One* 2013;8:e69147.

2. 学会発表

- 三井 純, 高橋 祐二, 伊達 英俊, 岩田 淳,

- 後藤 順, 辻 省次. パーキンソニズムを呈する疾患患者における Glucocerebrosidase (GBA)遺伝子の解析. 第 48 回神経学会総会, 名古屋, 2007 年 5 月.
- 三井 純, 高橋 祐二, 水田 依久子, 富山 弘幸, 吉野 浩代, 後藤 順, 服部 信孝, 戸田 達史, 辻 省次. パーキンソン病の遺伝子解析. 第 9 回大阪神経治療研究会, 大阪, 2008 年 4 月.
 - 三井 純, 水田 依久子, 豊田 敦, 高橋 祐二, 後藤 順, 福田 陽子, 伊達 英俊, 岩田 淳, 戸田 達史, 辻 省次. Gaucher 病の原因変異は Parkinson 病の遺伝的危険因子である. 第 13 回ライソゾーム病研究会, 東京, 2008 年 11 月.
 - 三井 純. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. 東京大学グローバル COE「疾患のケミカルバイオロジー教育研究拠点」第 1 回リトリート及び第 1 回国際シンポジウム, 千葉, 2009 年 2 月.
 - 三井 純, 東 きょう, 戸崎 浩和, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 辻 省次. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA of barcode-indexed DNAs. 第 8 回国際ゲノム会議, 東京, 2009 年 6 月.
 - 三井 純, 辻 省次. Common disease-multiple rare variant 仮説に基づく疾患関連遺伝子研究の成果と課題. 第 54 回人類遺伝学会, ランチョンセミナー, 東京, 2009 年 9 月.
 - 三井 純, 福田 陽子, 東 きょう, 戸崎 浩和, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 辻 省次. Pooled DNA を用いたバーコードによる multiplexed resequencing の試み. 第 54 回人類遺伝学会, 東京, 2009 年 9 月.
 - 三井 純, 福田 陽子, 東 きょう, 戸崎 浩和, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 辻 省次. Pooled DNA を用いたバーコードによる multiplexed resequencing. 第 4 回バイオインフォマティクス研究者と医学研究者の交流会, 柏, 2009 年 11 月.
 - 三井 純. 孤発性パーキンソン病の遺伝子: common disease-multiple rare variants. 第 51 回日本神経学会総会, シンポジウム. 東京, 2010 年 5 月.
 - 三井 純. 孤発性疾患の研究 ~パーキンソン病~. 第 52 回日本神経学会総会, シンポジウム. 名古屋, 2011 年 5 月.
 - 三井 純, 土井 晃一郎, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 森下 真一, 辻 省次. 疾患と関連する稀で多様な変異の検出を目的とした pooled DNA 解析. 第 52 回神経学会総会, 名古屋, 2011 年 5 月.
 - 三井 純. パーキンソン病の遺伝因子について. 第 16 回パーキンソン病フォーラム. 京都, 2011 年 7 月.
 - 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 年 7 月.
 - 三井 純. ファブリー病の診断における問題点~E66Qに関連して~. 第 8 回日本ファブリー病フォーラム, 東京, 2012 年 7 月 22 日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

ライソゾーム病の病態・治療に関する基礎的研究—特に 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名誉教授）

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。中枢神経障害の病態を明らかにする為に iPS 細胞を用いての基礎研究を行うと同時に、中枢神経障害の治療として酵素を直接ムコ多糖症 I I 型のマウス脳室内に投与することにより中枢神経系への治療効果を明らかにした。又ポンペ病は酸性 α -グルコシダーゼの酵素欠損により発症し、心筋、骨格筋を障害するが、今回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。又ヒトのファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病患者よりレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いて山中3因子或いは4因子を導入し、iPS 細胞を作成し、生化学的並びに形態的な手法により病態解析を行った。ポンペ病の iPS 細胞は、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。又治療研究ではポンペ病 iPS 細胞を作成し、生化学的並びに電顕による超微形態分析並びにポンペ病に対する酵素補充療法による病態解析を行った。ヒトファブリ病 iPS 細胞においても同様にすでに iPS 細胞で著明な脂質の蓄積が認められた。

共同研究者：

樋口 孝¹⁾、河越しほ¹⁾、小林博司^{2,3)}、井田博幸³⁾、大橋十也^{2,3)}

研究協力者：

高村歩美⁴⁾、藤崎美和⁴⁾、大樂武範⁴⁾、岩本武夫⁵⁾

1. 東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座
2. 東京慈恵会医科大学遺伝子治療部
3. 東京慈恵会医科大学小児科講座
4. 脳神経疾患研究所先端医療研究センター
5. 東京慈恵会医科大学共用研究施設

A. 研究目的

(1) ムコ多糖症 I I 型の中枢神経障害を酵素を髄注して治療効果を検討する。iduronate 2-sulfatase ノックアウト MPSII 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を検討した。

(2) ヒト並びにマウスポンペ、ファブリ病、ゴーシェ病から iPS 細胞を作成し、病態を明らかにする。

A. ポンペ病よりの iPS 細胞の樹立と骨格筋細胞への分化:形態的变化:Pompe 病モデルマウスから iPS 細胞を樹立し、骨格筋細胞への分化を試みたので報告する。iPS 細胞、分化した骨格筋細胞の形態的变化を検討した。

(B) ゴーシェ病及 Patients-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Lysosomal Storage Diseases

ゴーシェ病はライソゾームの代表的疾患であり、細胞内にグルコセレブロシドが大量に蓄積する。細胞内でのこれら蓄積物質の蓄積による病態の機序並びに治療の効果を検討するために、ゴーシェ病の病態解析並びに治療効果の解析を目指し患者皮膚線維

芽細胞由来 iPS 細胞 iPS をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いての iPS 細胞樹立を試みた。

(C)ファブリー病は α -galactosidase 遺伝子の欠損によりその基質である GL-3 が皮膚、腎臓、心臓などの全身の細胞に蓄積する。主な症状として腎障害や四肢末端痛などがあり、特に心臓に蓄積すると不整脈、心肥大などを呈する。iPS 細胞は皮膚細胞などに初期化因子を導入することにより樹立された、人工多能性幹細胞である。我々はファブリー病の心筋病態を解析することを目的として、センダイウイルスベクターを用いてファブリー病患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 様細胞を樹立した。

B. 研究方法

(1) ムコ多糖症 I I 型の中樞神経障害を酵素を髄注して治療効果に関する研究

ムコ多糖症 II 型 (MPSII) ハンター症候群は、先天性代謝異常症の一つで iduronate 2-sulfatase

(IDS) の機能異常により引き起こされる X 染色体連鎖劣性遺伝のライソゾーム病ある。IDS の活性低下によりその基質である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、中枢神経障害などである。治療法は IDS 酵素補充療法 (ERT) や造血幹細胞移植 (HSCT) がある。一般的に血液中に投与された酵素製剤は、血液脳関門 (BBB) によりその脳内移行が妨げられる。よって 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 BBB を介さず脳内に酵素を取り込ませることにより中枢神経障害の治療が可能性を検討した。

雄 IDS-KO mice を用いた。IDS 酵素には、CHO 細胞で発現・精製された遺伝子組換えヒト iduronate 2-sulfatase を用いた。マウスの表現系の解析は実験動物用 X 線 CT 撮影装置を用いて骨格異常を解析した。ヒト MPSII 型ハンター症

候群患者由来皮膚線維芽細胞を用いて細胞への取り込み実験を行った。21 週齢 IDS-KO mice 右脳室内に 20・g の IDS を 3 週間おきに 4 回連続投与し脳室内酵素補充療法の有効性を生化学的、病理組織学的に検討した

(2) ヒト iPS 細胞の作成はヒト初期化因子 (SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC) を組み込んだ pMXs レトロウイルスベクターを皮膚細胞に感染させることによって iPS 様細胞を樹立した。iPS 様細胞は透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいて細胞の内部構造を解析した。又サイコシンなどの糖脂質の解析は MS 分析で行った。

。

【結果&考察】

1) 骨症状の検討：iduronate 2-sulfatase ノックアウト MPSII 型モデルマウス (IDS-KO mice) は鼻が低い独特の顔貌をしていた。X 線 CT 撮影の結果、鼻部や眼球周囲の骨形成異常等が特徴的であり、臨床的な鑑別に有効である。2) IDS の細胞内取り込みに関して：時間依存的にヒト MPSII 細胞において IDS が効率良く取り込まれたことから、細胞内への酵素補充が可能と考えられた。3) 脳室内酵素補充療法に関して：マウス大脳組織内 IDS 酵素活性が正常 control マウス群と比較して数倍、IDS-KO mice 生食投与群と比較して数百〜一千倍上昇した。小脳の IDS 酵素活性は正常 control マウスと同程度まで上昇した。IDS 酵素活性は 3 週間毎の投与により脳組織でその活性を高く維持出来るものと考えられた。GAGs の脳組織蓄積程度、Lapm2 タンパク質などのライソゾームの種々のマーカー分子を含めた脳細胞内動態に関して生化学的、組織学的な検討を加えた。

(2) ヒト、マウスポンペ病よりの iPS 細胞の樹立と骨格筋細胞への分化

(1) Pompe 病は糖原病 II 型とも呼ばれるライソゾーム病のひとつであり、酸性 α -グルコシダーゼ (acid- α -glucosidase: GAA) の活性が低下することにより、グリコーゲンが全身に蓄積

して様々な症状を引き起こす。、線維芽細胞などの体細胞に初期化因子を導入することで作成可能な多能性幹細胞である iPS 細胞に着目し、iPS 細胞から分化誘導した筋肉系細胞を用いた細胞移植療法の開発を目指し、骨格筋細胞や心筋細胞への分化に関する基礎的研究を行っている。今回は Pompe 病モデルマウスから iPS 細胞を樹立し、骨格筋細胞への分化を試みた。ポンペ病では乳児型(心臓型)も遅発型(筋肉型)も iPS 様細胞が樹立した。ポンペ病 iPS 細胞ではマイオザイムを 10-1000ug/ml medium の濃度で加え細胞内ライゾームに蓄積している封入体の減少程度を電子顕微鏡下で観察した。電顕上は乳児型ポンペ病で遅発型に比較して可なり多く蓄積し、マイオザイム 1000ug/ml をメジウム内に投与して完全に蓄積物質の消失が見られた。ゴーシェ病 II 型 iPS 様細胞の細胞質には大きな空胞が確認でき又蓄積物質であるサイコシンが tandem MS で正常の5倍程度増加していた。ので報告する。

(2)ゴーシェ病ではII型(神経型)のiPS様細胞は樹立できたが、I型(非神経型)のiPS様細胞は作成出来なかった。ゴーシェ病II型iPS様細胞の細胞質には大きな空胞が確認でき又蓄積物質であるサイコシンが tandem MS で正常の5倍程度増加していた。ので報告する。TEM 解析により、ゴーシェ病II型iPS様細胞の細胞質には大きな空胞が確認できた。

(3)ヒトファブリ病 iPS 細胞では既に電顕上特有の封入体が認められ、ファブリ病に特異的であつた。

【方法・結果】

10 週齢の Pompe 病モデルマウスの尾から線維芽細胞を採取し、初期化因子である Klf4、Oct3/4、Sox2 の 3 因子を導入し、約 1 ヶ月培養することで iPS 様細胞コロニーが得られた。それらの細胞を、RT-PCR 法にて解析したところ、未分化マーカー分子の発現が認められた。また、未分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性染色、及び胎児性抗原である SSEA-1 について免疫染色を行ったところ、いずれも陽性細胞が

確認できた。樹立した Pompe 病由来 iPS 細胞を用いて作成したテラトーマを 3 胚葉由来のマーカー分子の発現について免疫染色で解析したところ、陽性領域が認められた。また、この Pompe-iPS 細胞で GAA 活性の顕著な低下が認められ、酸性ホスファターゼ活性染色についても陽性細胞が確認できた。次に、樹立した Pompe-iPS 細胞から骨格筋様細胞への分化誘導を行った。iPS 細胞から Embryoid Body (EB) を形成させ、その EB をマトリゲルでコーティングしたプレートにて培養を行った結果、紡錘状の細胞が認められ、更に培養を続けると自発的収縮が確認できた。また、骨格筋のマーカータンパク質であるミオシン重鎖について免疫染色を行ったところ、陽性細胞が認められた。

C. 考察・展望

これらの結果より、Pompe 病モデルマウスの線維芽細胞に 3 つの初期化因子を導入することで、Pompe 病の疾患の特徴を維持した Pompe-iPS 細胞が樹立できた。また、マトリゲルを用いた分化誘導法で得られた細胞は、形態的特徴やマーカー分子の発現から骨格筋細胞であると考えられる。今後はこの分化誘導法で得られる骨格筋様細胞の更なる特徴づけを進めると同時に、移植に利用する骨格筋前駆細胞の単離を試みる予定である。又ポンペ病細胞へのマイオザイムによる治療研究でも高濃度の酵素補充が必要であることが証明された。

ゴーシェ病、ファブリ病iPS細胞では特異的な電顕上特異的封入体を認め、又ゴーシェ病ではサイコシンの蓄積を認め、治療研究に応用できることを証明した。今後ライゾーム病に対するiPS細胞での研究は種々の細胞に分化し、治療効果を明らかにする意味で重要である。

健康危険情報
該当なし

D. 研究発表

1) 論文

1. Eto Y. : Single gene disorder: recent advances of

- research. *Nippon Rinsho*. 2010 Aug; 68 Suppl 8:117-28. Japanese.
2. Meng XL, Shen JS, Kawagoe S, Ohashi T, Brady RO, Eto Y. : Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7886-91.
 3. Kobayashi H, Shimada Y, Ikegami M, Kawai T, Sakurai K, Urashima T, Ijima M, Fujiwara M, Kaneshiro E, Ohashi T, Eto Y, Ishigaki K, Osawa M, Kyosen SO, Ida H. : Prognostic factors for the late onset Pompe disease with enzyme replacement therapy: from our experience of 4 cases including an autopsy case. *Mol Genet Metab*. 2010 May;100(1):14-9. Epub 2010 Feb 4.
 4. Kyosen SO, Iizuka S, Kobayashi H, Kimura T, Fukuda T, Shen J, Shimada Y, Ida H, Eto Y, Ohashi T. : Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long-term expression and glycogen reduction. *Gene Ther*. 2010 Apr;17(4):521-30. Epub 2009 Dec 24.
 5. Sakurai Y, Suzuki R, Yoshida R, Kojima H, Watanabe M, Manome Y, Ohashi T, Eto Y, Moriyama H. : Inner ear pathology of alpha-galactosidase A deficient mice, a model of Fabry disease. *Auris Nasus Larynx*. 2010 Jun;37(3):274-80. Epub 2009 Nov 8.
 6. Kobayashi H, Takahashi-Fujigasaki J, Fukuda T, Saurai K, Shimada Y, Nomura K, Ariga M, Ohashi T, Eto Y, Otomo T, Sakai N, Ida H: Pathology of the first autopsy case diagnosed as mucopolysaccharidosis type III alpha/beta suggesting autophagocytic dysfunction. *Mol Genet Metab*. 102 (2011) 170-175
 7. Meng XL, Shen JS, Kawagoe S, Ohashi T, Brady RO, Eto Y : Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Apr 27;107(17):7886-91. Epub 2010 Apr 12.
 8. Iida T, Shiba H, Misawa T, Ohashi T, Eto Y, Yanaga K : Immunogene therapy against colon cancer metastasis using an adenovirus vector expressing CD40 ligand. *Surgery*. 2010 Nov; 148(5): 925-35. Epub 2010 Apr 7.
 9. Nagashima T, Kobayashi M, Teramoto S, Okano E, Yokoi T, Eto Y : Extremely low-birthweight neonate with prenatal *Campylobacter* infection. *Pediatr Int*. 2009 Oct; 51(5):746-8.
 10. Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T : Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab*. 2010 Jan; 99(1):18-25. Epub .
 11. Kawagoe S, Higuchi T, Meng XL, Shimada Y, Shimizu H, Hirayama R, Fukuda T, Chang H, Nakahata T, Fukada S, Ida H, Kobayashi H, Ohashi T, Eto Y : Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol Genet Metab*. 2011 Sep-Oct; 104(123-8). Epub 2011 Jun 2.
 12. Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T : Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 2011 May;13(5):262-8
 13. Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Eto Y, Ida H, Hachimura S, Kobayashi H : Oral administration of recombinant human acid α -glucosidase reduces specific antibody formation against enzyme in mouse. *Mol Genet Metab*. 2011 May; 103(1):98-100. Epub 2011 Jan 27.
 14. Shimada Y, Nishida H, Nishiyama Y,

- Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Proteasome inhibitors improve the function of mutant lysosomal α -glucosidase in fibroblasts from Pompe disease patient carrying c.546G>T mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
15. Shimada Y, Kobayashi H, Kawagoe S, Aoki K, Kaneshiro E, Shimizu H, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38 MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546G>T mutation. *Mol Genet Metab*. 2011 Sep 14. [Epub ahead of print]
 16. Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H, Hirato T, Nishino K, Eto Y : Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab*. 2012
 17. Kobayashi M, Ohashi T, Fukuda T, Yanagisawa T, Inomata T, Nagaoka T, et al. No accumulation of globotriaosylceramide in the heart of a patient with the E66Q mutation in the α -Galactosidase A gene. *Mol Genet Metab*. 2012 ; 107 : 711-715.
 18. Sato Y, Fujiwara M, Kobayashi H, Ida H. Massive Accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with Hunter syndrome during enzyme replacement therapy. *Pediatric Cardiology* (in press)
 19. Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H, et al. Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of α -glucosidase in mice. *Mol Ther* 2012;20:1924-1931.
 20. Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, (Ohashi T) et al. Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2012;107:490-495.1)
 21. 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*. 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.
 22. Takenori D, Takeo I, Minami M, Masahiro E, Toya O, Yoshikatu E. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab*. Available online 16 November 2013
 23. ○ Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab*. 2013 Aug;109(4):386-9.
 24. ○Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood*. 2013;121(16):3267-73.

25. ○Y. Sato, M. Fujiwara, H. Kobayashi, H. Ida: Massive Accumulation of Glycosaminoglycans in the Aortic Valve of a Patient With Hunter Syndrome During Enzyme Replacement Therapy. *Pediatric Cardiology* 2013;DOI10.1007/s00246-013-0653-0
26. ○Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. *Mol Genet Metab.* 2013 in press
27. ○J. Ito, T. Saito, C. Numakura, A. Iwaba, S. Sugahara, R. Ishii, C. Sato, H. Haga, K. Okumoto, Y. Nishise, H. Watanabe, H. Ida, K. Hayasaka, H. Togashi, S. Kawata, Y. Ueno: A Case of Adult Type1 Gaucher Disease Complicated by Temporal Intestinal Hemorrhage. *Case Rep Gastroenterol* 2013;7:340-346
- 2) 総説・著書
1. 衛藤義勝:ライソゾーム病の歴史、ライソゾーム病の機能と取り組み機序『ライソゾーム病－最新の病態, 診断, 治療の進歩－』2-9, 診断と治療社, 2011.
 2. 衛藤義勝:治療の概説『ライソゾーム病－最新の病態, 診断, 治療の進歩－』83-84, 診断と治療社, 2011.
 3. 衛藤義勝:ポンペ病『ライソゾーム病－最新の病態, 診断, 治療の進歩－』239-249, 診断と治療社, 2011.
 4. 衛藤義勝:最先端医療の進歩－臓器移植・再生医療・遺伝子治療, 小児科診療. 診断と治療社, 2012(75)1, p.9
 5. 衛藤義勝:拡大する酵素補充療法の適応疾患, 日本医師会雑誌第 140 巻第 6 号 1272-1274, 2011. 9.
 6. 衛藤義勝:先天代謝異常症における iPS 細胞技術の応用, 医学のあゆみ, 2011(239)14, 1359-1363.
7. 衛藤義勝:マルチプルスルファターゼ欠損症, ムコ多糖症 UPDATE, E・N MEDIX, 154-158, 2011.
 8. 所謂ムコリポドーシスの鑑別, ムコ多糖症 UPDATE, E・N MEDIX, 182-183, 2011.
 9. 衛藤義勝:最先端医療の進歩－臓器移植・再生医療・遺伝子治療, 小児科診療. 診断と治療社, 2012(75)1, p.9
- 2) 学会発表
1. 小林 博司、飯塚 佐代子、有賀 賢典、島田 洋太、井田 博幸、衛藤 義勝、大橋 十也: レンチウイルスベクターシステムを用いたクラッペ病の遺伝子治療 (ポスター) 日本小児科学会 2010. 4. 盛岡
 2. 樋口 孝、清水 寛美、河越 しほ、福田 隆浩、小林 博司、井田 博幸、大橋 十也、平戸 徹、西野 勝哉、衛藤 義勝:MPSII 型 Knockout マウスでの脳室内酵素治療に関する研究 日本先天代謝異常学会総会 2010. 10 大阪
 3. 有賀 賢典、小林 博司、飯塚 佐代子、金城 栄子、清水 寛美、衛藤 義勝、大橋 十也、井田 博幸:新生児 MPS VII マウスへの遺伝子治療におけるレンチウイルスベクターの長期発現 日本先天代謝異常学会総会 2010. 10 大阪
 4. 大橋 十也、飯塚 佐代子、衛藤 義勝、嶋田 洋太、井田 博幸、小林 博司: 抗 CD3 抗体によるポンペ病酵素補充療法での酵素製剤に対する免疫寛容導入 日本先天代謝異常学会総会 2010. 10 大阪
 5. 嶋田 洋太、西山 由梨佳、小林 博司、衛藤 義勝、井田 博幸、大橋 十也: ポンペ病細胞におけるオートファジー活性化の分子機序 日本先天代謝異常学会総会 2010. 10 大阪
 6. 河越 しほ、孟 興麗、嶋田 洋太、樋口 孝、清水 寛美、福田 隆浩、井田 博幸、小林

- 博司、大橋 十也、衛藤 義勝：Pompe 病モデルマウスからの iPS 細胞の樹立と骨格筋細胞への分化誘導 日本先天代謝異常学会総会 2010.10 大阪
7. 小林 正久、大橋 十也、井田 博幸、衛藤 義勝：日本人 Fabry 病家系の遺伝子変異についての研究 遺伝子変異と臨床病型について 日本先天代謝異常学会総会 2010.10 大阪
 8. 横井 貴之、小林 博司、衛藤 義勝、石毛 信之、北川 照男、大津 真、中内 啓光、大橋 十也、井田 博幸：ファブリー病モデルマウスに対する骨髄移植におけるキメリズムの決定 日本先天代謝異常学会総会 2010.10 大阪
 9. 小林 博司、飯塚 佐代子、福田 隆裕、岩本 武夫、有賀 賢典、嶋田 洋太、衛藤 義勝、井田 博幸、大橋 十也：レンチウイルスシステムを用いたクラッペ病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療 日本先天代謝異常学会総会 2010.10 大阪
 10. 清水 寛美、嶋田 洋太、若林 太一、小林 博司、大橋 十也、井田 博幸、川井 充、衛藤 義勝：濾紙血を用いた Pompe 病スクリーニング法の有用性と問題点 日本先天代謝異常学会総会 2010.10 大阪
 11. 河越 しほ、樋口 孝、河合 利尚、孟 興麗、嶋田 洋太、清水 寛美、福田 隆浩、張 璽、中畑 龍俊、深田 宗一郎、小林 博司、井田 博幸、大橋 十也、衛藤 義勝：Pompe病モデルマウス由来iPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞の形態学的解析，第16回日本ライソゾーム病研究会，2011.9.30，東京
 12. 樋口 孝、清水 寛美、福田 隆浩、河越 しほ、松本 朱里、小林 博司、井田 博幸、大橋 十也、衛藤 義勝：ハンター病モデルマウスにおける脳室内酵素補充療法の治療研究，第16回日本ライソゾーム病研究会，2011.9.30，東京
 13. 河越 しほ、樋口 孝、河合 利尚、孟 興麗、嶋田 洋太、清水 寛美、福田 隆浩、張 璽、中畑 龍俊、深田 宗一郎、小林 博司、井田 博幸、大橋 十也、衛藤 義勝：Pompe病モデルマウス由来iPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞の形態学的解析，第16回日本ライソゾーム病研究会，2011.9.30，東京
 14. 樋口 孝、清水 寛美、福田 隆浩、河越 しほ、松本 朱里、小林 博司、井田 博幸、大橋 十也、衛藤 義勝：ハンター病モデルマウスにおける脳室内酵素補充療法の治療研究，第16回日本ライソゾーム病研究会，2011.9.30，東京
 15. Eto Y：Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage Diseases. International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs, 2012. 2.5, 東京
 16. Eto Y：Japanese Experiences in the Enzyme Replacement Therapy with, Leplagal for Fabry Disease , Russian Pediatric Society, Moscow, 2012.2.25, ロシア
 17. Eto Y: Novel Strategies of the Treatment for Genetic Diseases, Asian society of LSD & Asian Inherited Metabolic disease, 2012.4.3, 韓国
 18. Eto Y: Novel Strategies of the Treatment for Genetic Diseases, Asian society of pediatric research, 2012.5.18-20, 韓国
 19. Eto Y: Mucopolysaccharidosis a diagnostic challenge to pediatricians? The Center of Excellence Program for Mucopolysaccharidoses. 2012,6. 台湾
 20. 衛藤 義勝：Approach to the child with suspected inborn error of metabolism, Asian-Pacific Congress of Pediatric, 2012.9.10-13, マレーシア
 21. Eto Y：Novel strategies of treatment of lysosomal storage diseases, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム，2012.10.4，東京
 22. Ariga M, Kobayahi H, Shimada Y, Fukuda

- T, Iizuka S, Kaneshiro E, Ida H, Eto Y, Ohashi T : Neonatal gene therapy of MPS VII mice by lentiviral vector, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.5, 東京
- 23.Sato Y, Saito R, Kobayashi H, Fujiwara M, Ohashi T, Ida H, Eto Y : Massive accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with Hunter syndrome during enzyme replacement therapy, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.6, 東京
- 24.Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Fujikawa K, Ohashi T, Eto Y:CKD severity staging in Fabry patients detected by high risk screening, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.6, 東京
25. Eto Y: Clinical Application of iPS technology for LSD research, European Society of Gene Therapy, Versailles, 2012.10.27-31, フランス
- 26.衛藤義勝: 遺伝病治療最近の進歩-特に中枢神経系の治療を目指して、久留米大学小児科芳野教授退任記念講演、2012.3.24, 福岡
- 27.Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi: The fabry Outcome Survey (FOS): Overview of the current status and future developments, 第54回日本先天代謝異常学会, 2012.11.15, 岐阜
- 28.衛藤義勝、大樂武範、若林太一、井田博幸、萩野谷和裕、山本真也、成田 綾、大野耕策: 若手型ニーマンピックC病 (NPC1) 3 例に対する Miglustat の治療効果, 第54回日本先天代謝異常学会, 2012.11.16, 岐阜
- 29.樋口 孝、河越しほ、大津 真、加藤総夫、单沢 享、松本朱里、井田博幸、大橋十也、中内啓光、衛藤義勝: ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立, 2012.11.16, 岐阜
- 30.河越しほ、樋口 孝、大高真奈美、嶋田洋太、小林博司、井田博幸、大橋十也、岡野ジェイムス洋尚、中西真人、衛藤義勝: センダイウイルスを用いたヒトファブリー病由来 iPS 様細胞の樹立, 2012.11.16, 岐阜
- 31.藤崎美和、松本朱里、高村歩美、樋口 孝、古城真秀子、河越しほ、小林博司、嶋田洋太、大橋十也、大樂武範、衛藤義勝: 乾燥濾紙血を用いたマルトー・ラミー症候群 (MPSVI) の診断法の検討, 2012.11.16, 岐阜
- 32.大樂武範、ハミルトン ジョン、マーチン ダナ、衛藤義勝: 濾紙血を用いたリソゾーム酸性リパーゼ欠損症 (LAL) の診断法の検討, 2012.11.16, 岐阜
- 33.小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸: 日本人 Fabry 病家系の遺伝子変異についての研究—特に de novo 変異の発症率について. 第57回日本人類遺伝学会. 東京. 2012.10.24-27
- 34.小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸: 日本人 Fabry 病家系の de novo 変異の発症率および臨床病型と遺伝子変異の相関についての研究. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 35.佐藤洋平、小林博司、大橋十也、井田博幸: Muclipidosis II 型剖検例におけるオートファジー機能不全との関連性. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 36.小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸: Fabry 病の遺伝子解析—そのピットフォール. 第26回日本小児脂質研究会. 川越. 2012.11.30-12.1
- 37.櫻井 謙、池本 智、齋藤亮太、安藤達也、富田和江、齋藤義弘、井田博幸: 多形紅斑に心筋症を併発し、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症が疑われている5歳例, 第115回日本小児科学会学術集会. 福岡. 2012.4.20-22
- 38.横井貴之、横井健太郎、秋山和政、樋口 孝、嶋田洋太、小林博司、佐藤 卓、大津 真、中内啓光、西川伸一、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也: ACK2(抗 c-kit 抗体)を用いたハンター病に対する細胞治療 / 遺伝子治療における前処置の開発. 第57回日本人類遺伝学会. 東京. 2012.10.24-27
- 39.横井貴之、樋口 孝、嶋田洋太、小林博司、大津真、中内啓光、西川伸一、衛藤義勝、井田博幸、

- 大橋十也:ACK(抗 c-kit 抗体)を用いたハンター病に対する細胞治療 / 遺伝子治療における前処置の開発. 第 54 回日本先天代謝異常学会, 岐阜. 2012.11.15-17
40. 西山由梨佳, 嶋田洋太, 小林博司, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也:インスリンを用いたポンペ病細胞における酵素補充療法抵抗性改善の試み. 第 54 回日本先天代謝異常学会, 岐阜. 2012.11.15-17
41. 秋山和政, 飯塚佐代子, 嶋田洋太, 樋口 孝, 福田隆浩, 小林博司, 井田博幸, 衛藤義勝, 大橋十也:ムコ多糖症Ⅱ型(MPSⅡ)マウスにおける酵素補充療法と骨髄移植療法の比較検討. 第 54 回日本先天代謝異常学会, 岐阜. 2012.11.15-17
42. 嶋田洋太, 西山由梨佳, 小林博司, 樋口 孝, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也:ポンペ病におけるプロテアソーム阻害剤応答性酸性 α グルコシダーゼ変異の探索:第 54 回日本先天代謝異常学会, 岐阜. 2012.11.15-17
43. Hiroshi Kobayashi, Sayoko Izuka, Takahiro Fukuda, Takeo Iwamoto, Asako Morita, Masamichi Ariga, Yota Shimada, Takayuki Yokoi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. Lentivirus Mediated Gene Therapy For Krabbe Disease. 第 18 回 日本遺伝子治療学会 JSGCT 2012 年 6 月, 熊本
57. レンチウイルスベクターを用いたクラッベ病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療 小林博司, 有賀賢典, 飯塚佐代子, 岩本武夫, 嶋田洋太, 福田隆浩, 衛藤義勝, 大橋十也. 第 57 回日本人類遺伝学会 2012 年 10 月, 東京
58. M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MPVI) in dried Blood Spots on Filter Paper The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th
59. M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IIVA) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th
60. M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IV A (MPS IIVA) 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, Japan, 2013 November 27th – 29th 3-6, 2013, Barcelona, Spain
61. 衛藤義勝:ファブリ病の最近の進歩、ファブリ病患者会、大阪 2013, 2,18
62. 衛藤義勝、Niemann-Pick C 病の診断、治療に関して、NPC 病シンポジウム、東京、2013.4.27
63. 衛藤義勝:ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 日本小児科学会講演、広島 2013. 4.18
64. 衛藤義勝: Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10706. 衛藤義勝:ニーマンピツク C 病の診断と治療に関して、第 55 回日本小児神経学会 大分 2013.5.31
65. 衛藤義勝: Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD、International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
66. 衛藤義勝 ファブリ病最新の進歩、ファブリ病研究会、札幌、2013.10.5
67. 衛藤義勝; 先天性ムコ多糖症の進歩、久留米小児科医会、2013.1011
68. 衛藤義勝:ゴーシェ病最新の進歩、中国小児内

分泌代謝学会アモイ市、福建省 2013.10.23-24

69.衛藤義勝:Lysosomal acid lipase deficiency, アジア小児肝臓消化器学会一ツ橋会館,東京, 2013.11.1

70.衛藤義勝:ファブリ病 UpDate, 東北ファブリ病患者会 仙台, 2013.11.3

71.衛藤義勝、Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 韓国, 2013, 11,14-16

72.衛藤義勝:New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov.26, 2013

73.衛藤義勝: Future of clinical and research prospects in inborn error of metabolism, 第3回アジア先天代謝学会、舞浜、東京, 2013.11.27-29

G. 知的財産権の出願・登録状況

ムコ多糖 I I 型への髄注

ライソゾーム病バイオマーカーとしての リゾ-スフィンゴ糖脂質に関する研究

分担研究者：櫻庭 均（明治薬科大学臨床遺伝学 教授）

研究要旨

血漿中のリゾ-スフィンゴ糖脂質を、高速液体クロマトグラフィーで測定する方法を確立した。本法で、ファブリー病、GM2 ガングリオシドーシスおよびゴーシェ病患者由来の血漿中リゾ-スフィンゴ糖脂質を測定した所、いずれも対照よりも高値を示した。リゾ-スフィンゴ糖脂質は、これらのライソゾーム病のバイオマーカーになると期待される。

研究協力者氏名：

兎川忠靖(明治薬科大学生体機能分析学教授)
月村考宏(明治薬科大学生体機能分析学助教)
児玉 敬(明治薬科大学生体機能分析学研究生)

A. 研究目的

ライソゾーム病は、ライソゾームに存在する酵素の活性低下により、多彩な臨床症状を呈する疾患群である。幾つかのライソゾーム病に対して、当該酵素を血管内投与する酵素補充療法が開発され、効果を上げている。それに伴い、これらの疾患を早期に発見し、治療効果を適切に評価するためのバイオマーカーが求められている。本研究では、リゾ-スフィンゴ糖脂質の測定法を確立して、ライソゾーム病の中の糖脂質蓄積症であるファブリー病、GM2 ガングリオシドーシスおよびゴーシェ病の患者血漿中のリゾ-スフィンゴ糖脂質の測定を行い、リゾ-スフィンゴ糖脂質がこれらの疾患のバイオマーカーと成り得るか否かを検討した。

B. 研究方法

1)試料

ファブリー病患者 51 名（古典型男性患者 21 名、遅発型男性患者 6 名および女性患者 24 名）、GM2 ガングリオシドーシス患者 8 名（テイ-サツ

クス病患者 6 名、乳児型ザンドホッフ病患者 1 名および成人型ザンドホッフ病患者 1 名）、ゴーシェ病患者 3 名（I 型患者 1 名、II 型患者 1 名および III 型患者 1 名）および健常対照者から血漿を採取し、測定試料とした。

（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て、その規則を遵守して行われた。

2)血漿中のグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) の測定

血漿を試料として、クロロホルム/メタノール、クロロホルム/水、メタノール/水および水飽和 L-ブタノールによる糖脂質抽出操作を順次行い、得られた Lyso-Gb3 を含む糖脂質画分を用いて、o-フタルアルデヒド試薬 (pH 11) と反応させた。その後、フタルアルデヒド誘導体化された Lyso-Gb3 を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離し、定量した。定量に際しては、既知の量の Lyso-Gb3 を健常者由来の血漿に加えたものを、標準として用いた。

3)血漿中のリゾ-GM2 ガングリオシド (Lyso-GM2) の測定

血漿を試料として、クロロホルム/メタノール、クロロホルム/水、メタノール/水および水飽和 L-ブタノールによる糖脂質抽出操作を順次行い、得られた Lyso-GM2 を含む糖脂質画分を用いて、

o-フタルアルデヒド試薬(pH 11)と反応させた。その後、フタルアルデヒド誘導体化されたLyso-GM2をHPLCで分離し、定量した。定量に際しては、既知の量のLyso-GM2を健常者由来の血漿に加えたものを、標準として用いた。

4) 血漿中のグルコシルスフィンゴシン (Lyso-GlcCer) の測定

血漿を試料として、トライトン X-100/シアニ化メタノール処理を行い、得られたLyso-GlcCerを含む糖脂質画分を用いて、o-フタルアルデヒド試薬(pH 9.5)と反応させた。その後、フタルアルデヒド誘導体化されたLyso-GlcCerをHPLCで分離し、定量した。定量に際しては、既知の量のLyso-GlcCerを健常者由来の血漿に加えたものを、標準として用いた。

C. 研究結果

1) ファブリー病患者における血漿中Lyso-Gb3濃度

ファブリー病患者の血漿中Lyso-Gb3測定結果を表1に示した。ファブリー病男性患者では、古典型および遅発型ともに血漿中Lyso-Gb3濃度は高値を示したが、その平均値は古典型の方が遅発型よりも高かった。また、ファブリー病女性患者においてもLyso-Gb3濃度は増加していたが、男性患者の場合に比べて、その平均値は低かった。

表1 ファブリー病患者の血漿中Lyso-Gb3濃度

症 例	Lyso-Gb3 (nmol/l)
ファブリー病	
古典型 男性患者	75±37 [21]*
遅発型 男性患者	26±20 [6]*
女性患者	11±7 [24]*
対照	<2 [20]

*平均値±標準偏差 [試料数]

2) GM2ガングリオシドーシス患者における血漿中Lyso-GM2濃度

GM2ガングリオシドーシス患者の血漿中Lyso-GM2測定結果を表2に示した。テイ-サックス病およびザンドホッフ病患者ともに血漿中Lyso-GM2濃度の増加が認められたが、その値は、テイ-サックス病患者の方がザンドホッフ病患者よりも高かった。また、ザンドホッフ病の乳児型患者と成人型患者とを比べると、乳児型患者の方が高い値を示した。

表2 GM2ガングリオシドーシス患者の血漿中Lyso-GM2濃度

症 例	Lyso-GM2 (nmol/l)
GM2ガングリオシドーシス	
テイ-サックス病患者	32±5 [6]*
乳児型 ザンドホッフ病患者	13
成人型 ザンドホッフ病患者	3
対照	<2 [48]

*平均値±標準偏差 [試料数]

3) ゴーシェ病患者における血漿中Lyso-GlcCer濃度

ゴーシェ病患者の血漿中Lyso-GlcCer測定結果を表3に示した。I、IIおよびIII型のゴーシェ病患者では、いずれの場合も、対照に比べて、明らかなLyso-GlcCer濃度の増加が認められた。

表 3 ゴーシェ病患者病者の血漿中 Lyso-GlcCer 濃度

症 例	Lyso-GlcCer (μ mol/l)
ゴーシェ病 I 型 患者	0.19
患者 II 型	0.16
患者 III 型	0.16
対照	< 0.01 [n=10]

D. 考察

スフィンゴ糖脂質が蓄積するライソゾーム病において、そのリゾ体は機能や毒性を持つことから、体内への過剰蓄積はいろいろな細胞障害を来たして、ライソゾーム病の病態形成に関与する可能性が示唆されている。今回の研究により、ライソゾーム病の代表的疾患であるファブリー病、GM2ガングリオシドーシスやゴーシェ病において、血漿中の当該リゾ-スフィンゴ糖脂質の濃度が増加していることが示された。このことから、血漿中リゾ-スフィンゴ糖脂質が、これらの疾患の診断や治療評価時におけるバイオマーカーとして役立つと期待される。

E. 結論

血漿中リゾ-スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ糖脂質が蓄積するライソゾーム病のよいバイオマーカーになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Togawa T, Kawashima I, Kodama T, et al : Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 399 : 716-720, 2010
- 2) Ohno K, Saito S, Sugawara K, et al: Structural basis of neuronal ceroid lipofuscinosis I. *Brain Dev* 32 : 524-530, 2010
- 3) Saito S, Ohno K, Sese J, et al : Prediction of the clinical phenotype of Fabry disease based on protein sequential and structural information. *J Hum Genet* 55 : 175-178, 2010
- 4) Togawa T, Kodama T, Suzuki T, et al : Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol Genet Metab* 100 : 257-261, 2010
- 5) 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
- 6) Tajima Y, Saito S, Ohno K, et al : Biochemical and structural study on a S529V mutant acid alpha-glucosidase responsive to pharmacological chaperones. *J Hum Genet* 56 : 440-446, 2011
- 7) Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, et al: Lyso-GM2 ganglioside: A possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. *PLoS ONE* 6 : e29074, 2011
- 8) 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* 18 : 76-82, 2012
- 9) 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
- 10) 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* 57 : 280-282, 2012

- 11) 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* 105 : 615-620, 2012
 - 12) Mitobe S, Togawa T, Tsukimura T, et al : Mutant α -galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma globotriaosylsphingosine level. *Mol Genet Metab* 107 : 623-626 , 2012
 - 13) Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, et al : Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. *PLoS ONE* 8 : e78588, 2013
 - 14) Saito S, Ohno K, Maita N, et al : Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α -L-iduronidase : Insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I. *Mol Genet Metab*, in press.
 - 15) Saito S, Ohno K, Sakuraba H : Comparative study of structural changes caused by different substitutions at the same residue on α -galactosidase A. *PLoS ONE*, in press.
2. 学会発表
- 1) Sakuraba H : Biomarkers. The 11th European Round Table on Fabry Disease, Istanbul, Turkey, Oct. 2010
 - 2) Sakuraba H : Development of diagnosis and therapy for lysosomal diseases. The 1st Medicinal Chemistry Seminar 2010 of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Quezon City, Philippines, Jan. 2011
 - 3) Sakuraba H : High-risk screening, database and biomarkers of Fabry disease. The 13th Annual Asia LSD Symposium, Hong Kong, China, Apr. 2011
 - 4) Sakuraba H : New treatment of Fabry disease. Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) Satellite Symposium 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening, Tokyo, Japan. Aug. 2011
 - 5) Sakuraba H : Development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease based on molecular designing. The 31st Naito Conference, Glycan Expression and Regulation [II]: Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond, Sapporo, Japan. Sep. 2011
 - 6) Sakuraba H : Cardiac diagnosis and care. The 12th European Round Table on Fabry Disease, Fabry Expert Lounge 2011, Budapest, Hungary. Oct. 2011
 - 7) Sakuraba H : Lyso-glycosphingolipids as biomarkers of sphingolipidoses. The 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders & The 17th Japanese Society for Lysosomal Disorders, Tokyo, Japan. Oct. 2012
 - 8) Sakuraba H : Unraveling Fabry disease, improving care. The 2nd European Fabry Expert Lounge 2012, Munich, Germany, Oct. 2012
 - 9) Sakuraba H : Construction of a database and development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science

- Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 10) Sakuraba H : High Risk Screening for Fabry Disease. Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, Kumamoto, Japan, May. 2013
 - 11) Sakuraba H : E66Q: Biochemical, pathological and structural studies. 3rd Update on Fabry Nephropathy: Biomarkers, Progression and Treatment Opportunities, Hong Kong, China, Jun. 2013
 - 12) Sakuraba H : Genotype/Phenotype correlation in Fabry disease. The 15th Annual Asia LSD Symposium, Chiba, Japan, Nov. 2013
 - 13) Togawa T, Kodama T, Suzuki T, Sakuraba H: Globotriaosylsphingosine as a new biomarker of Fabry disease. The 1st Medicinal Chemistry Seminar 2010 of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Quezon City, Philippines, Jan. 2011
 - 14) Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: High-risk screening for Fabry disease in Japan. The 1st Medicinal Chemistry Seminar 2010 of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Quezon City, Philippines, Jan. 2011
 - 15) Togawa T, Kodama T, Tsukimura T, Suzuki T, Sakuraba H: Globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. The 10th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Madrid, Spain, Apr. 2011
 - 16) Tsukimura T, Kawashima I, Togawa T, Suzuki T, Chiba Y, Sakuraba H: Recombinant α -galactosidase A produced in a mutant yeast is well incorporated into the kidneys of Fabry mice. The 13th Annual Asia LSD Symposium, Hong Kong, China, Apr. 2011
 - 17) Tsukimura T, Tanaka T, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H: High-risk screening for male patients with Fabry disease in Japan. The Second Medicinal Chemistry Seminar of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, New Delhi, India, Oct. 2011
 - 18) Togawa T, Kodama T, Tsukimura T, Suzuki T, Sakuraba H: Evaluation of globotriaosylsphingosine as a new biomarker of Fabry disease. The Second Medicinal Chemistry Seminar of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, New Delhi, India, Oct. 2011
 - 19) Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Ishida Y, Suzuki T, Sakuraba H: Lyso-GM2 ganglioside: A new biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. The Second Medicinal Chemistry Seminar of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, New Delhi, India, Oct. 2011
 - 20) Shibasaki F, Nakano S, Sakuraba H: Diagnostic values of modified immuno-PCR method (MUSTag) to detect α -galactosidase A proteins in Fabry disease. The 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders & The 17th Japanese Society for Lysosomal Disorders, Tokyo, Japan, Oct. 2012
 - 21) Tsukimura T, Mitobe S, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H: Construction of a high-throughput screening system for male patients with Fabry disease. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012)

- of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 22) Mitobe S, Togawa T, Tsukimura T, Kodama T, Tanaka T, Otsuka T, Suzuki T, Sakuraba H: Mutant α -galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma globotriaosylsphingosine level. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 23) Aizawa Y, Takada M, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H: An improved method for determination of mannose 6-phosphate residues in acid α -glucosidase by means of HPLC. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 24) Ishibashi Y, Nakajima Y, Takatsuji Y, Suzuki T, Sakuraba H: SPR analysis on molecular interaction between GLA/modified NAGA and antibodies against them. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 25) Fukano K, Ono Y, Kamikura A, Suzuki T, Sakuraba H: Ultrasensitive assay method for measurement of α -galactosidase A protein in blood from Fabry patients. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 26) Takasawa K, Yamashita S, Mitobe S, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H: New method for determination of globotriaosylceramide in plasma and urine from Fabry patients. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, Tokyo, Japan, Dec. 2012
- 27) Kawashima I, Mitobe S, Kodama T, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Development of enzyme replacement therapy with a modified enzyme and an activator for Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 28) Shibasaki F, Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H: Development of a highly sensitive immuno-PCR measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 29) Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Futoshi S: Rapid Immunochromatographic measurement of anti- α -galactosidase A antibodies in Fabry patients Treated with enzyme replacement therapy. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 30) Togawa T, Tsukimura T, Katayama M, Mitobe S, Sakuraba H: Fabry patients exhibiting no elevation in plasma globotriaosylsphingosine level. The 3rd