

察することでグリコーゲンの蓄積などの病理学的特徴に関して評価を行い、検証する。

心筋細胞の分化誘導に関しては、従来用いられてきた胚葉体を経由して分化誘導する方法は、効率が低く、未熟型の心筋細胞しか誘導できないことが問題とされていた。近年注目されている Wnt 阻害薬を使用したプロトコルを用いて、Robust な分化誘導を行い、効率よく、成熟型の心筋細胞の誘導を試みる。

また、欠損遺伝子の GAA を発現するような第 3 世代レンチウイルスベクターをクローニングする。また、蛍光蛋白である Venus を発現するベクターを同時に作成する。HEK293A 細胞や健康人由来 iPS 細胞に感染させて、GAA の酵素活性および Venus の陽性率を測定することで、遺伝子の導入効率と治療効果の最適化を行う。

最終的に、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子修復を行ったポンペ病 iPS 細胞を作成する。さらに、遺伝子修復した iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導することで、治療効果に関して生化学的・病理学的に判定する。

### C. 研究結果

ポンペ病 iPS 細胞の characterization に関しては、いずれのクローンにおいても ALP だけでなく、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81 などの未分化マーカーが陽性であることから、iPS 細胞であることが確認された。

電子顕微鏡で iPS 細胞を観察したところ、いずれの細胞もライソゾームにグリコーゲンの蓄積が確認された。しかし、明らかなクローン間での表現型の違いは見られなかった。

ポンペ病 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞にはグリコーゲンの蓄積やライソゾームの腫大などのポンペ病に特徴的な病理学的変化が観察

された。アクチンやミオシンなどのサルコメアレベルでの明らかな構造異常は認められなかった。

レンチウイルスベクターを HEK293A 細胞、ならびに健康人由来 iPS 細胞に感染させたところ、容量依存性に GAA および Venus が発現することが確認された。

現在、ポンペ病 iPS 細胞に対しても同様のプロトコルで遺伝子導入を行うことを予定している。ポンペ病 iPS 細胞において GAA の発現が確認できた場合には、心筋細胞に分化させることで治療効果の検討を行う予定となっている。

(倫理面への配慮)

東京慈恵会医科大学倫理委員会から承認を得ている

### D. 考察

本研究に使用した遅発型ポンペ病 iPS 細胞は未分化マーカー陽性であり、iPS 細胞としての性質を持っていることが確認された。

疾患特異的 iPS 細胞の研究においては、クローン間での表現型の違いがしばしば問題になることがあるが、本研究で使用した iPS 細胞に関しては、3 クローンのうち明らかな表現型の違いは見られなかった。

すでに乳児型ポンペ病では、iPS 細胞から心筋細胞に分化させた場合に、グリコーゲンの蓄積やライソゾームの腫大が見られると報告されている。遅発型ポンペ病でも乳児型に比較してより軽症ではあることが多いが、一部の患者では心肥大などの心合併症がみられることが報告されている。

われわれは遅発型ポンペ病 iPS 細胞から心筋細胞を分化させた場合でも、同様の病理学的変化が見られることを見出した。

また、家族性肥大型心筋症の原因となる、サルコメア蛋白異常症などで見られるような、錯綜配列などのサルコメアの構造異常は見られないことから、ポンペ病の心肥大のメカニズムとして、細胞質でのライソゾームの腫大による細胞肥大が影響している可能性が示唆された。

今後研究を進めるにあたり、乳児型ポンペ病との病態比較や、骨格筋や肝細胞などの他の標的臓器の細胞への分化誘導を試みる予定となっている。

## E. 結論

遅発型ポンペ病から誘導した心筋細胞でも、グリコーゲンの蓄積とライソゾームの腫大が見られた。遅発型ポンペ病で見られる心筋病変の病態再現に成功し、メカニズムの一部を解明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Y.Sato, T Higuchi, H Kobayashi et al.

“Cardiomyocyte differentiation of Pompe disease specific iPSC following lentiviral gene therapy” The 7<sup>th</sup> TAKAO International Symposium

2) Y.Sato, H Kobayashi, T Higuchi et al.

“Cardiomyocyte differentiation of Pompe disease specific iPSC following lentiviral gene therapy” 3rdACIMD/55thJSIMD

## 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

## ムコ多糖症および副腎白質ジストロフィーの早期診断治療

分担研究者：鈴木康之 岐阜大学医学教育開発研究センター

### 研究要旨

ムコ多糖症および副腎白質ジストロフィーの早期診断治療に関する各種検討を行った。ムコ多糖症に関しては標準成長曲線を作成し臨床的な早期診断画可能であることを明らかにした。イソフラボンの有効性については、明らかな所見は得られなかった。副腎白質ジストロフィーに関しては造血幹細胞移植の有効性を明らかにし、発症早期の受療行動が治療成績に影響していることを明らかにした。

### 研究協力者

折居忠夫（折居クリニック）  
折居建治、下澤伸行、小関道夫（岐阜大学）  
戸松俊治（デュポン小児病院）  
Montaño AM（セントルイス大学）  
奥山虎之（国立成育医療センター）  
田中あけみ（大阪市立大学）  
知念安紹（琉球大学）  
Wegrzyn G（グダニスク大学、ポーランド）  
矢部普正、加藤俊一、高倉広充（東海大学）  
加藤剛二（名古屋第一赤十字病院）  
辻 省次（東京大学）  
加我牧子（国立精神・神経医療研究センター）  
酒井規夫、大田秀明（大阪大学）  
小林博司、西山由梨佳（東京慈恵会医科大学）  
小田慈（岡山大学）  
足立壮一、加藤竹雄（京都大学）  
平山雅浩（三重大学）  
藤田直人（広島赤十字・原爆病院）  
新妻秀剛（東北大学）

### 研究成果 1) ムコ多糖症に対するイソフラボンの有効性の検討

ムコ多糖症 III 型 17 名に対し、イソフラボン（Genistein）5mg/kg を 1 年間投与し、身体所見、行動異常、睡眠障害、言語能力、理解力、運動

能力、日常生活動作の変化を観察し、尿中 GAG・血中 Genistein 濃度・毛髪形態との比較を試みた。尿中 GAG 排泄量 (mg/g creat) は 4 例で GAG の減少を認めたが、6 例は増加した。また 5 例で血中 Genistein の増加を認めた。毛髪形態は 6 例で改善、2 例で悪化を認めた。尿中 GAG レベル、Genistein レベルは、臨床症状・ADL・毛髪形態との緩やかな相関があると推測されたが、明らかな相関は証明できなかった。

イソフラボン (genistein) は、ヘパラン硫酸の合成を抑制し、ムコ多糖症の症状を緩和することが期待されている。特に Sanfilippo 症候群は現時点で有効な治療法がなく、イソフラボンに対する期待は大きい。今回の検討で、Genistein は一部の患者で症状の緩和、ADL の改善、毛髪形態の改善を認めたが、一方で進行悪化する例もあり、明らかな有効性を証明できなかった。今後、症例を蓄積し、Genistein 服用量を再検討する必要がある。

### 研究成果 2) ムコ多糖症の成長曲線作成と早期臨床診断

Hunter 病患者の標準身長、標準体重を明らかにした。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）。この結果に基づき Hunter 病

患者の成長曲線を作成した（図 1、図 2）。成長パターンと臨床所見（ヘルニア）の組み合わせにより、ムコ多糖症各病型の早期診断が可能となることを明らかにした（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
Birth	50.1	1.6	49.0	3.3	0.4	3.0
3 m	65.9	2.7	62.0	7.8	1.1	6.6
6 m	71.9	2.3	67.9	9.3	1.1	8.0
9 m	76.2	3.0	71.8	10.6	1.4	8.7
1 y	78.9	2.6	74.8	11.6	1.6	9.2
1.5 y	84.6	3.3	80.6	13.4	2.2	10.4
2 y	88.8	3.3	85.1	15.5	2.9	11.3
3 y	96.9	4.0	93.3	18.0	4.0	13.9
4 y	102.0	3.8	101.8	19.7	3.5	15.7
5 y	106.7	4.2	107.0	22.0	5.1	17.5
6 y	110.5	4.4	114.9	23.3	3.2	19.9
8 y	117.0	5.6	125.3	30.3	9.3	26.6
10 y	115.0	5.9	136.4	26.7	6.2	33.5
12 y	118.6	3.9	149.1	28.3	3.4	43.5
14 y	118.0	6.4	162.8	30.2	6.3	53.4
16 y	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）

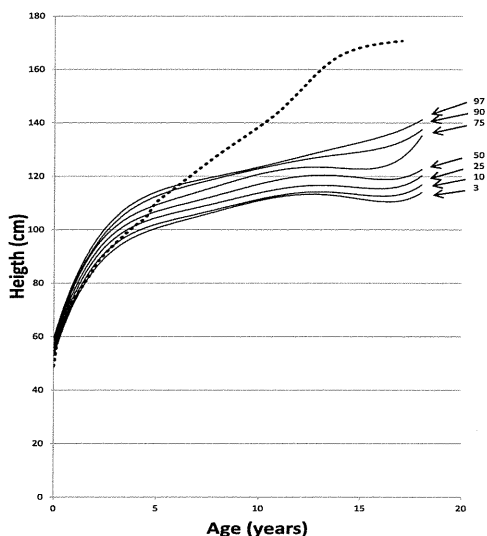


図 2 Hunter 病患者の成長曲線（体重）

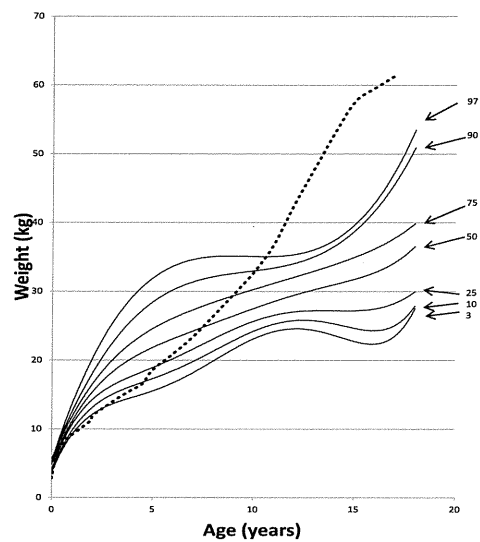


表 2 成長と臨床所見（ヘルニア）の組み合わせによる早期診断

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

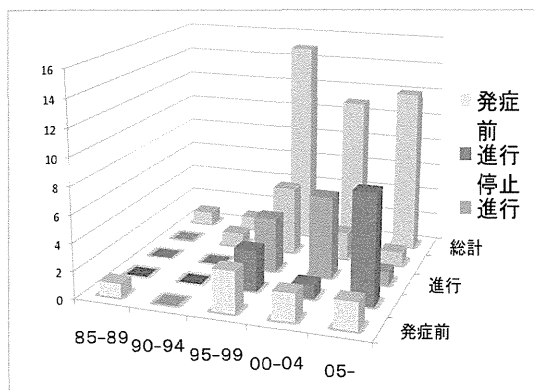
### 研究成果 3) 副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の有効性

47 例の小児・思春期大脳型 ALD 患者の造血幹細胞移植の効果について検討した。移植時平均年齢 8.6 歳、診断～移植の期間 6.7 か月、移植年（1993-2004 年 28 例、2005-2011 年 19 例）、脱髄部位（前頭葉型 9 例、後頭頭頂葉型 28 例）、ドナー（同胞骨髄 20 例、非血縁骨髄 11 例、臍帯血 15

例)、HLA (完全一致 26 例、不完全一致 17 例)、前処置 (BU/CY 18 例、Mel/ATG/TAI 12 例、Flu/Mel 14 例、その他 2 例)、Loes score (10 未満 19 例、10 以上 11 例)、ALD-DRS (0:9 例、I:14 例、II:13 例、III:9 例、IV:1 例)。

47 例中、進行停止は 13 例、進行 13 例、死亡 8 例、発症前移植 7 例 (無症状)、拒絶 6 例で、移植後の生存率は約 80%であった。①2005 年以降の移植例は生存率が向上する傾向を認めた ( $p=0.063$ ) (図 3)。進行停止した 13 例中 9 例が 2005 年以降の症例であり、2005 年以降、移植の有効性が向上していると考えられた。②診断～移植期間が 6 か月未満では生存率が向上する傾向を認めた ( $p=0.09$ )。③移植前処置に Busulfan(BU)を使用すると有意に生存率が低下した ( $p=0.05$ )。Flu/Mel 主体の前処置で進行停止例が多い傾向を示した。④Loes score 10 以上で有意に生存率が低下したが ( $p<0.01$ )、効果には差を認めなかった。⑤後頭頭頂葉型で生存率の低下傾向を示した ( $p=0.11$ )。前頭葉型では死亡例がなかった。⑥ALD-DRS がゼロの症例では死亡例がなかった。⑦PIQ>80 の症例は生存率が高い傾向を示した ( $p=0.058$ )。

図 3 年度別の副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植成績



#### 研究成果 4) 副腎白質ジストロフィー患者の受療行動と診断遅延

小児・思春期大脳型 22 名の初期症状は、以下のとおりであった。

学業不振・記憶障害	14 名
不器用・動作緩慢	12
転倒	12
視力低下	11
性格変化・対人関係の悪化	7
易疲労性	3
てんかん発作	3

不器用・動作緩慢は従来あまり強調されてこなかった初期症状である。初期症状の発見者は母 22 名、教員・保育士 7 名、父 3 名、友人 2 名で、教員・保育士の観察は重要である。診断までに 3 機関以上を受診した例が 12 名おり、2 名は 5 機関以上を受診していた。また診断まで 3 か月以上を要した例が 13 名おり、4 名は 1 年以上を要していた。診断までの受療行動については、家族、医療機関、教育機関それぞれに問題点があり、一層の啓発が必要と思われた。

#### 研究論文発表

- Tomatsu S, Montañó AM, Suzuki Y, et al. Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inher Metab Dis.* 2010; 33:141-150
- Tomatsu S, Montañó AM, Suzuki Y, et al. Validation of disaccharide composition derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* 2010;99:124-131
- Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, et al. Japan Elaprased Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab* 2010;99:18-25

4. Tomatsu S, Montañó AM, Suzuki Y, et al. Validation of keratan sulfate level in Mucopolysaccharidosis IVA by liquid tandem mass spectrometry method. *J Inherit Metab Dis* Epub 2010, DOI 10.1007/s10545-009-9013-x.
5. Shimozawa N, Honda A, Suzuki Y, et al. Diagnostic and follow-up system of patients with X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Genet* 2011;56:106-109
6. Morita M, Suzuki Y, Imanaka T, et al. ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr Drug Targets*. 2011;12:694-706.
7. Tomatsu S, Montañó AM, Suzuki Y, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:931-45.
8. Hintze JP, Tomatsu S, Suzuki Y, et al. Comparison of liquid chromatography -tandem mass spectrometry and sandwich ELISA for determination of keratan sulfate in plasma and urine. *Biomark Insights*. 2011;6:69-78.
9. Muenzer J, Beck M, Suzuki Y, et al. Idursulfase treatment of Hunter syndrome in children younger than 6 years: results from the Hunter Outcome Survey. *Genet Med*. 2011;13:102-9.
10. Matsukawa T, Suzuki Y, Tsuji S 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*. 2011;12:41-50
11. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, et al. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012;107:513–520
12. Yasuda E, Suzuki Y, Tomatsu S et al. Pathogenesis of Morquio A syndrome: an autopsied case reveals systemic storage disorder. *Mol Genet Metab*. 2013 ;109:301-11
13. Tomatsu S, Suzuki Y, Orii T, et al. Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab* 110:42-53, 2013.
14. Tomatsu S, Suzuki Y, Orii T, et al. Therapies of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome). *Expert Opinion on Orphan Drugs* 1:805-818, 2013
15. Dũng VC, Tomatsu S, Suzuki Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Correlation between genotype, phenotype and keratin sulfate levels. *Mol Genet Metab* 110:129-138, 2013.

## 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）あるいは膜蛋白の異常 NPC1 あるいは NPC2（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。脂質の蓄積減少を起こす薬物療法の開発が期待されている。本研究では C 型細胞に対して蓄積脂質減少をもたらす酪酸（butyrate）および Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の効果に関してスフィンゴミエリン分解酵素 ASM の発現量の観点から分析し、C 型細胞への蓄積脂質減少効果に二次的 ASM 欠損の改善が重要であることを示した。

### 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。

ASM 酵素の酵素活性刺激薬として酪酸（butyrate）が知られている。そこでまず、C 型細胞に酪酸を投与して本細胞に観察される二次的 ASM 欠損に対する効果を詳細に分析した。

次に、C 型細胞に対して報告された Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の蓄積脂質減少効果に関して検討した。この効果に関しては変異 NPC1 蛋白の発現量を増加させる効果から生じる可能性が示され、軽症 C 型細胞だけへの効果である点が報告されている。しかし、我々が見出した酪酸（butyrate）の C 型細胞に対する

蓄積脂質減少効果も酪酸が HDAC Inhibitor の 1 つであることから減少効果に ASM 活性が関与している可能性を想定し検討した。

### B. 研究方法

#### I. 酪酸（butyrate）と ASM

正常培養リンパ芽球および C 型培養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、4）C 型皮膚線維芽細胞および 5）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。

#### II. HDAC inhibitor の効果と ASM

6）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（2μM）、vorinostat（10μM）、panobinostat（75μM）を加えコレステロール蓄積の程度を Filipin 染色および Amplex Red cholesterol

quantification (Fluoroscan Asent system)にて評価した。7) 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 $\mu$ M) を追加で加えその蓄積脂質に関して調べた。

## C. 研究結果

研究結果は以下の通りであった。

### I. 酪酸 (butyrate) と ASM

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。

### II. HDAC inhibitor の効果と ASM の

6) 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 valpronic acid、yoinostat、panobinostat により減少した。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、7) 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を示していた。

## 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 C 型細胞の基本病態であるが、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。

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、減少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 が大きく関与していることを示している。

## 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。

ニーマンピック病 C 型の原因である NPC1 および NPC2 のコレステロール輸送には ASM が関与している可能性がある

## 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
- 2) Oyama C, Hirayama M, Noguchi A, Arai H, Takahashi T : Butyrate reduces free cholesterol accumulation in Niemann-Pick disease type 1 cells (Nova Scotia form) through the induction of acid sphingomyelinase. Akita J. Med 38: 111-119, 2011.

### <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—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.
- 3) 野口篤子、高橋 勉 : Niemann-Pick 病 C 型、先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance, 診断

と治療社, 東京, 28-31、2011.

- 4) 高橋 勉 : ニーマンピック病 A、B 型, ライソゾーム病—最新の病態、診断、治療の進歩— (初版), 診断と治療社, 東京, 154-158, 2011.
- 5) 高橋 勉 : ライソゾームの生成と膜代謝, ライソゾーム病—最新の病態、診断、治療の進歩— (初版), 診断と治療社, 東京, 10-13、2011.
- 6) 高橋 勉 : Niemann-Pick 病. 小児科臨床ピクシス 23, 中山書店, 東京、235-237, 2010.
- 7) 高橋 勉 : Niemann-Pick 病, 小児疾患診療のための病態生理, 小児内科 vol.41 増刊号, pp.462-465、2009.

### <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。

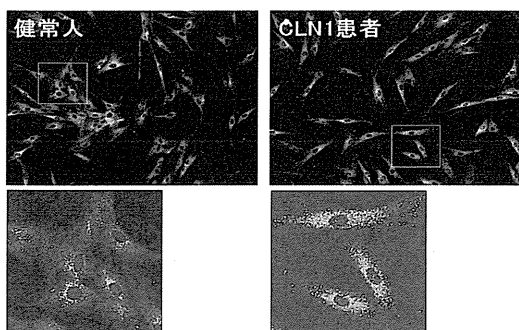


図1 変異型PPT1の細胞内局在

### 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)。

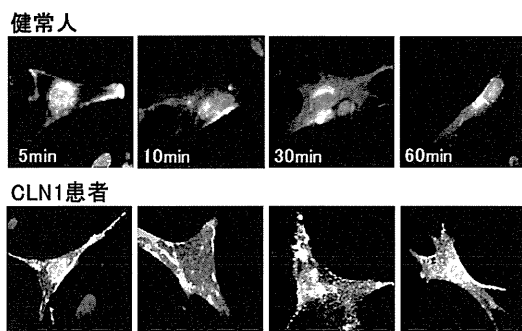


図2 エンドサイトーシス(CTBの取込み)の亢進

### 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, 新寶理子, 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

Zellweger 症候群患者由来繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸含有脂質の構造を解析したところ、従来指標である C26:0 以外の多数の極長鎖脂肪酸の存在が確認された。極長鎖脂肪酸含有するホスファチジルコリンの構造を解析したところ、グリセロール 1 位に含まれるものが多かった。これら分子種は患者間で個体差を認めた。

次に臨床応用を念頭に置き、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網羅的定量測定系の確立することに成功した。

研究協力者氏名：

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）

### 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

ペルオキシソーム病患者の皮膚生検により得られた繊維芽細胞を、大量に培養し、回収して Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出した。これを ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析に供し、極長鎖脂肪酸を含む分子種の構造を明らかにした。

さらに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。

（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

### C. 研究結果

（平成 23 年度）ZS と ALD の検体を ESI-LC-MS 法で解析したところ、両者ともリン脂質画分で通常では検出されない大きな分子量で疎水性の高いスポットが多数検出された。特に ZS で著しく、ZS を優先して行うこととした。次に、各スポットの MS/MS 解析を行うことにより、リン脂質の分子種、すなわち極性部と脂肪酸の構成を調べたところ、ホスファチジルコリン(PC)には、臨床指標として通常用いられている C26:0 以外の、多様な極長鎖脂肪酸が含まれていることが明らかとなった。炭素数としては 32 個までのものが

あり、加えて二重結合 6 個までの高度不飽和のものも検出された。

(平成 24 年度)ホスファチジルコリン(PC)の MS/MS フラグメントイオン解析を行った。各ピークとも極長鎖脂肪酸のシグナルと通常の脂肪酸を 1 本ずつ含んでいた。さらにこの解析ではグリセロール 2 位の脂肪酸のシグナルが強くなるが、ほとんどの分子種で極長鎖脂肪酸ではないシグナルの方が強かった。この結果から極長鎖脂肪酸を含有する PC の大部分の分子種では、極長鎖脂肪酸 1 本をグリセロール 1 位に結合することがわかった (表 1)。さらに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にも極長鎖脂肪酸が含まれることが明らかとなった。異なる患者由来のサンプルを比較したところ、意外にも共通するシグナルは半数以下であり、共通する分子種よりも異なる分子種が多いことがわかった (表 1)。

(平成 25 年度)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

ZS 繊維芽細胞では多様な極長鎖脂肪酸が存在することから、臨床指標について再検討の余地があるものと考えられた。ただし個体差にも十分留意する必要があることがわかった。

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。さらに微量な血清でも、測定可能であることがわかった。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

ペルオキシソーム病のうち少なくとも ZS 患者繊維芽細胞では、これまでに臨床指標に用いられている C26:0 以外の極長鎖脂肪酸が多数存在し、PC に含まれていることが明らかとなった。これら PC の分子種の構造を特定したところ、患者間で個体差があった。

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)
- 3) 極長鎖脂肪酸含有脂質の定量解析による2つのペルオキシソーム病の比較、西澤千穂、濱弘太郎、永井徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明、第133回日本薬学会、ファルマシア49巻号、2013年3月
- 4) ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質定量の試み、西澤千穂、永井徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明、第84回日本生化学会、京都、生化学、83巻8号、158項及びCD、2011年

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種

炭素数32の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
Signals	M/Z	<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	Molecular Species	Zellweger 1	Zellweger 2
C50:7-PC	1030	<b>C32:6</b>	C18:1	C32:6-C18:1-PC	+	
C50:6-PC	1032	<b>C32:5</b>	C18:1	C32:5-C18:1-PC	+	+
C48:3-PC	1010	<b>C32:3</b>	C16:0	C32:3-C16:0-PC	+	
C48:2-PC	1012	<b>C32:2</b>	C16:0	C32:2-C16:0-PC		+
C48:2-PC	1012	<b>C32:1</b>	C16:1	C32:1-C16:1-PC	+	
C48:1-PC	1014	<b>C32:1</b>	C16:0	C32:1-C16:0-PC		+
C48:0-PC	1016	<b>C32:0</b>	C16:0	C32:0-C16:0-PC		+
炭素数30の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C50:7-PC	1030	<b>C30:3</b>	C20:4	C30:3-C20:4-PC	+	
C46:3-PC	982	<b>C30:3</b>	C16:0	C30:3-C16:0-PC	+	+
C50:6-PC	1032	<b>C30:2</b>	C20:4	C30:2-C20:4-PC	+	+
C48:3-PC	1010	<b>C30:2</b>	C18:1	C30:2-C18:1-PC	+	+
C46:2-PC	984	<b>C30:2</b>	C16:0	C30:2-C16:0-PC	+	
C48:3-PC	1010	<b>C30:1</b>	C18:2	C30:1-C18:2-PC		+
C48:2-PC	1012	<b>C30:1</b>	C18:1	C30:1-C18:1-PC	+	+
C48:1-PC	1014	C18:0	<b>C30:1</b>	C18:0-C30:1-PC		+
C46:1-PC	986	<b>C30:1</b>	C16:0	C30:1-C16:0-PC		+
C48:1-PC	1014	<b>C30:0</b>	C18:1	C30:0-C18:1-PC		+
C48:0-PC	1016	C18:0	<b>C30:0</b>	C18:0-C30:0-PC		+
C46:0-PC	988	<b>C30:0</b>	C16:0	C30:0-C16:0-PC		+
炭素数28の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C46:6-PC	976	<b>C28:5</b>	C18:1	C28:5-C18:1-PC		+
C44:6-PC	948	<b>C28:5</b>	C16:1	C28:5-C16:1-PC	+	
C44:5-PC	950	<b>C28:5</b>	C16:0	C28:5-C16:0-PC	+	
C48:8-PC	1000	<b>C28:4</b>	C20:4	C28:4-C20:4-PC		+
C46:5-PC	978	<b>C28:4</b>	C18:1	C28:4-C18:1-PC	+	
C48:7-PC	1002	<b>C28:3</b>	C20:4	C28:3-C20:4-PC		+
C46:4-PC	980	<b>C28:3</b>	C18:1	C28:3-C18:1-PC	+	
C48:6-PC	1004	<b>C28:2</b>	C20:4	C28:2-C20:4-PC		+
C46:3-PC	982	<b>C28:2</b>	C18:1	C28:2-C18:1-PC	+	+
C44:2-PC	956	<b>C28:2</b>	C16:0	C28:2-C16:0-PC	+	
C50:6-PC	1032	<b>C28:1</b>	C22:5	C28:1-C22:5-PC	+	
C50:6-PC	1032	C22:5	<b>C28:1</b>	C22:5-C28:1-PC		+
C48:5-PC	1006	<b>C28:1</b>	C20:4	C28:1-C20:4-PC	+	
C46:2-PC	984	<b>C28:1</b>	C18:1	C28:1-C18:1-PC	+	
C46:1-PC	986	C18:0	<b>C28:1</b>	C18:0-C28:1-PC		+
C44:2-PC	956	C16:1	<b>C28:1</b>	C16:1-C28:1-PC		+
C44:1-PC	958	<b>C28:1</b>	C16:0	C28:1-C16:0-PC	+	+
C48:4-PC	1008	<b>C28:0</b>	C20:4	C28:0-C20:4-PC	+	
C46:1-PC	986	<b>C28:0</b>	C18:1	C28:0-C18:1-PC		+
C46:0-PC	988	C18:0	<b>C28:0</b>	C18:0-C28:0-PC		+
C44:1-PC	958	<b>C28:0</b>	C16:1	C28:0-C16:1-PC		+
C44:0-PC	960	<b>C28:0</b>	C16:0	C28:0-C16:0-PC		+
C42:0-PC	932	C14:0	<b>C28:0</b>	C14:0-C28:0-PC	+	



表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種 (続き)

炭素数26の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C44:6-PC	948	C18:0	<b>C26:6</b>	C18:0-C26:6-PC	+	
C42:7-PC	918	<b>C26:6</b>	C16:1	C26:6-C16:1-PC		+
C46:9-PC	970	<b>C26:5</b>	C20:4	C26:5-C20:4-PC		+
C44:7-PC	946	<b>C26:5</b>	C18:2	C26:5-C18:2-PC		+
C44:6-PC	948	<b>C26:5</b>	C18:1	C26:5-C18:1-PC	+	
C42:6-PC	920	<b>C26:5</b>	C16:1	C26:5-C16:1-PC		+
C42:5-PC	922	<b>C26:5</b>	C16:0	C26:5-C16:0-PC		+
C48:8-PC	1000	<b>C26:4</b>	C22:4	C26:4-C22:4-PC		+
C46:8-PC	972	<b>C26:4</b>	C20:4	C26:4-C20:4-PC	+	
C44:6-PC	948	<b>C26:4</b>	C18:2	C26:4-C18:2-PC	+	
C44:5-PC	950	<b>C26:4</b>	C18:1	C26:4-C18:1-PC	+	
C42:5-PC	922	<b>C26:4</b>	C16:1	C26:4-C16:1-PC		+
C42:4-PC	924	<b>C26:4</b>	C16:0	C26:4-C16:0-PC		+
C46:7-PC	974	<b>C26:3</b>	C20:4	C26:3-C20:4-PC	+	
C44:4-PC	952	<b>C26:3</b>	C18:1	C26:3-C18:1-PC	+	
C42:3-PC	926	<b>C26:3</b>	C16:0	C26:3-C16:0-PC	+	+
C40:3-PC	898	C14:0	<b>C26:3</b>	C14:0-C26:3-PC	+	
C46:6-PC	976	<b>C26:2</b>	C20:4	C26:2-C20:4-PC		+
C44:3-PC	954	<b>C26:2</b>	C18:1	C26:2-C18:1-PC	+	+
C42:3-PC	927	<b>C26:2</b>	C16:1	C26:2-C16:1-PC		+
C42:2-PC	928	<b>C26:2</b>	C16:0	C26:2-C16:0-PC	+	+
C40:2-PC	900	C14:0	<b>C26:2</b>	C14:0-C26:2-PC	+	
C48:6-PC	1004	<b>C26:1</b>	C22:5	C26:1-C22:5-PC		+
C46:5-PC	978	<b>C26:1</b>	C20:4	C26:1-C20:4-PC	+	
C46:3-PC	982	<b>C26:1</b>	C20:2	C26:1-C20:2-PC		+
C44:3-PC	954	<b>C26:1</b>	C18:2	C26:1-C18:2-PC	+	+
C44:2-PC	956	<b>C26:1</b>	C18:1	C26:1-C18:1-PC	+	+
C44:1-PC	958	C18:0	<b>C26:1</b>	C18:0-C26:1-PC		+
C42:2-PC	928	<b>C26:1</b>	C16:1	C26:1-C16:1-PC		+
C42:1-PC	930	<b>C26:1</b>	C16:0	C26:1-C16:0-PC	+	+
C40:1-PC	902	C14:0	<b>C26:1</b>	C14:0-C26:1-PC	+	+
C46:4-PC	980	<b>C26:0</b>	C20:4	C26:0-C20:4-PC	+	
C44:1-PC	958	<b>C26:0</b>	C18:1	C26:0-C18:1-PC	+	+
C44:0-PC	960	C18:0	<b>C26:0</b>	C18:0-C26:0-PC		+
C42:0-PC	932	<b>C26:0</b>	C16:0	C26:0-C16:0-PC	+	+
C40:0-PC	904	C14:0	<b>C26:0</b>	C14:0-C26:0-PC	+	
C24:1-PC	930	<b>C26:0</b>	C16:1	C26:0-C16:1-PC		+

表1 Zellweger 症候群患者繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸分子種 (続き)

炭素数24の極長鎖脂肪酸を含有するPC分子種						
C42:7-PC	918	<b>C24:6</b>	C18:1	C24:6-C18:1-PC		+
C44:9-PC	942	<b>C24:5</b>	C20:4	C24:5-C20:4-PC		+
C42:6-PC	920	<b>C24:5</b>	C18:1	C24:5-C18:1-PC		+
C42:5-PC	922	C18:0	<b>C24:5</b>	C18:0-C24:5-PC		+
C40:6-PC	892	<b>C24:5</b>	C16:1	C24:5-C16:1-PC	+	
C40:5-PC	894	<b>C24:5</b>	C16:0	C24:5-C16:0-PC	+	
C46:9-PC	970	<b>C24:4</b>	C22:5	C24:4-C22:5-PC		+
C44:8-PC	944	<b>C24:4</b>	C20:4	C24:4-C20:4-PC		+
C44:7-PC	946	<b>C24:4</b>	C20:3	C24:4-C20:3-PC		+
C44:6-PC	948	C20:2	<b>C24:4</b>	C20:2-C24:4-PC	+	
C44:5-PC	950	C20:1	<b>C24:4</b>	C20:1-C24:4-PC	+	
C42:6-PC	920	<b>C24:4</b>	C18:2	C24:4-C18:2-PC		+
C42:5-PC	922	<b>C24:4</b>	C18:1	C24:4-C18:1-PC		+
C42:4-PC	924	C18:0	<b>C24:4</b>	C18:0-C24:4-PC		+
C40:4-PC	896	<b>C24:4</b>	C16:0	C24:4-C16:0-PC	+	
C44:7-PC	946	<b>C24:3</b>	C20:4	C24:3-C20:4-PC		+
C42:4-PC	924	<b>C24:3</b>	C18:1	C24:3-C18:1-PC		+
C42:3-PC	926	C18:0	<b>C24:3</b>	C18:0-C24:3-PC		+
C40:3-PC	898	<b>C24:3</b>	C16:0	C24:3-C16:0-PC	+	+
C44:6-PC	948	<b>C24:2</b>	C20:4	C24:2-C20:4-PC	+	
C42:3-PC	926	<b>C24:2</b>	C18:1	C24:2-C18:1-PC	+	+
C40:2-PC	900	<b>C24:2</b>	C16:0	C24:2-C16:0-PC	+	+
C42:2-PC	928	<b>C24:1</b>	C18:1	C24:1-C18:1-PC	+	+
C40:1-PC	902	<b>C24:1</b>	C16:0	C24:1-C16:0-PC	+	+
C42:1-PC	930	<b>C24:0</b>	C18:1	C24:0-C18:1-PC	+	+
C42:0-PC	932	C18:0	<b>C24:0</b>	C18:0-C24:0-PC	+	+
C40:0-PC	904	<b>C24:0</b>	C16:0	C24:0-C16:0-PC	+	
極長鎖脂肪酸を含有するPE分子種						
C44:5-PE	848	<b>C26:5</b>	C18:0	C26:5-C18:0-PE		+
C44:4-PE	850	C18:0	<b>C26:4</b>	C18:0-C26:4-PE		+
C44:3-PE	852	<b>C26:2</b>	C18:1	C26:2-C18:1-PE		+
C42:3-PE	824	<b>C26:2</b>	C16:1	C26:2-C16:1-PE	+	
C44:2-PE	854	<b>C26:1</b>	C18:1	C26:1-C18:1-PE	+	
C42:2-PE	826	<b>C26:1</b>	C16:1	C26:1-C16:1-PE	+	
C44:1-PE	856	<b>C26:0</b>	C18:1	C26:0-C18:1-PE	+	
C42:4-PE	822	C18:0	<b>C24:4</b>	C18:0-C24:4-PE		+
C42:3-PE	824	C18:0	<b>C24:3</b>	C18:0-C24:3-PE	+	+
C42:3-PE	824	<b>C24:2</b>	C18:1	C24:2-C18:1-PE	+	
C42:2-PE	826	<b>C24:1</b>	C18:1	C24:1-C18:1-PE	+	
C44:3-PE	852	C20:3	<b>C24:0</b>	C20:3-C24:0-PE		+
C42:1-PE	828	<b>C24:0</b>	C18:1	C24:0-C18:1-PE	+	
極長鎖脂肪酸を含有するPS分子種						
C42:2-PS	870	<b>C24:1</b>	C18:1	C24:1-C18:1-PS	+	

## 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22年からの4年間に国内ペルオキシソーム病診断実績として、Zellweger症候群9例、新生児型副腎白質ジストロフィー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30例、思春期大脳型4例、成人大脳型6例、adrenomyeloneuropathy (AMN) 9例、小脳脳幹型1例、アジソン型2例、発症前10例、女性保因者54例を診断した。また国外のペルオキシソーム病患者診断については、継続中のサウジアラビアでは新たに11例（計22例）、新規のベトナムでは20例、マレーシアでは4例を4年間に診断した。さらに2つの疾患ハンドブックを編集し、医療関係者や患者会等に配布して国内における難病の啓蒙、診療情報の普及、診療の向上に努めた。また2例の国内初のペルオキシソーム病患者を診断し、その成果を国際誌に報告した。

病態解明研究では、ペルオキシソーム形成異常症に関しては患者線維芽細胞から樹立したiPS細胞とペルオキシソーム欠損モデルフィッシュ作成により、病態解明を進めている。またALDの大脳症状の発症因子の解明に関しては本研究班内に共同研究プロジェクトを立ち上げ、患者リソースを用いた脂質生化学的検討、分子生物学的検討に加えて、モデルマウスを用いた病態解明と中枢神経症状の発症実験を進めている。

### 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：

当研究室において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、発生異常の病態を細胞レベル

で形態や生理機能、分子生物学的手法を用いて解明する。

### 3. 疾患モデル生物による検討：

ALD では病因である ABC トランスポータータンパクの異常による病態は脊髄病変が中心で、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おり、基本的な病態はモデルマウスの脂質生化学、分子病態学的手法により解明するとともに、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。

一方、ペルオキシソーム形成異常症の病態解明については、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形態、脂質生化学、分子生物学的手法により解明する。

## C. 研究結果

### 1. ペルオキシソーム病患者診断の成果：

平成 22 年からの 4 年間に国内ペルオキシソーム病診断実績として、Zellweger 症候群 9 例、新生児型副腎白質ジストロフィー 1 例、乳児型 Refsum 病 1 例、ALD のうち、小児大脳型 30 例、思春期大脳型 4 例、成人大脳型 6 例、adrenomyeloneuropathy (AMN) 9 例、小脳脳幹型 1 例、アジソン型 2 例、発症前 10 例、女性保因者 54 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。また国外のペルオキシソーム病患者診断については、継続しているサウジアラビアでは新たに 11 例のペルオキシソーム形成異常症または  $\beta$  酸化系酵素欠損症患者を（計 22 例）、新たに共同研究を始めたベトナムでは 20 例の副腎白質ジストロフィー患者を、マレーシアでも 4 例を 4 年間に診断し、その間にサウジアラビアとベトナムの診断例では論文発表も行った。

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。ま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、セミナーを通じて、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た。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、アルキル化剤等を投与し、臨床型を観察するとともに、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。

また 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、受傷後モデルマウスの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複数の共同研究グループを構築した。今後、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