

新しい治療法の開発（ケミカルシャペロン療法） 神経型ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法

分担研究者：H22-H24 大野耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科・教授

H25-H26 成田綾 鳥取大学医学部脳神経小児科・助教

研究要旨

ゴーシェ病に対する酵素補充療法は臓器腫大や血液学的所見を改善させる。しかし、酵素製剤は脳血液関門を通過出来ない為、本邦のゴーシェ病患者の過半数を占める神経型の治療として、酵素補充療法の効果は乏しく、中枢神経系を標的とした新規治療法の開発が望まれている。本研究にて我々は2010年より鳥取大学倫理委員会の承認を受け、神経型ゴーシェ病患者に対し、アンブロキシソールによるケミカルシャペロン療法を開始した。また、ゴーシェ病の中枢神経症状の早期発見ならびに治療効果を判定する客観的指標（LC-ESI-MS/MSによる髄液グルコシルスフィンゴシン測定、赤外線電子瞳孔計による対光反射測定）の開発と臨床応用を行い、シャペロン療法による神経学的所見ならびに客観的指標の改善を認め、中枢神経系への有効性が示唆された。

A. 研究目的

ゴーシェ病はライソゾーム酵素の一つであるβグルコセレブロシダーゼ（GBA）の欠損により、その基質であるグルコセレブロシドが肝、脾、骨髄、神経系等に蓄積することで発症する遺伝性疾患で、臨床的には神経症状を呈さないⅠ型と、神経症状を呈するⅡ型およびⅢ型に分類される。

現在、酵素補充療法が開発され、治療により肝脾腫、貧血などの身体症状は改善するが、酵素製剤は血液脳関門を通過しないため、神経症状に対する効果は認められていない。

そこで我々は神経型ゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発を行ってきた。我々はゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発をめざし、変異酵素を活性化する薬理的シャペロンの開発を行い、N-オクチルバリエナミン（NOV）がⅢ型の原因変異であるF213I、N188S、G202Rの残存酵素活性を上昇させることを見いだした。またスペインとの共同研究でSP2アザ糖が新しいシャペロンとし

て働くことを見いだした。

一方で2009年にナダのグループがFDA承認薬をスクリーニングし、市販薬であるアンブロキシソール（ムコサル、ムコソルバン）が、非神経型の原因変異であるN370S変異の酵素活性をあげることを見いだした。アンブロキシソールは低分子化合物である為、血液脳関門を通過し、神経症状への効果が期待できる。また、去痰剤として汎用されている薬剤であり、安全性や薬物動態が比較的明らかにされている事から、より早期の臨床応用が期待できると考えた。

そこで我々は神経型ゴーシェ病患者由来培養線維芽細胞（N188S/G193W、F213I/L444P、R120W/L444P）を用いてアンブロキシソールのシャペロン効果を確認した。次に正常マウスに対してアンブロキシソール投与を行い、中枢神経系での変異グルコセレブロシダーゼ活性の上昇を確認した。これらの結果より、アンブロキシソールは神経型ゴーシェ病に対しても有効なシャペ

ロン化合物であり、中枢神経系に移行し、効果を発揮する事が期待できるとし、2010年より鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認後、患者家族の同意を得て神経型ゴーシェ病患者に対して、酵素補充療法に併せてアンブロキシソール投与を行い、シャペロン療法の安全性を有効性の評価を開始した。

また、臨床症状は患者毎に多様であることから、臨床症状の観察に加え、客観的な有効性の評価法を構築する必要があると考え、生化学的指標として髄液グルコシルスフィンゴシン濃度を、生理学的指標として対光反射を正常コントロールと比較し、神経型ゴーシェ病の診断と治療の評価法として有用であるかを検討した。

B. 研究方法

【患者】

スクリーニング時に以下の選択基準をすべて満たす患者を対象とした。

- 1) リンパ球又は培養皮膚線維芽細胞 β グルコセレブロシダーゼ (GBA) 活性の低下、及び遺伝学的 (GBA 遺伝子診断) にゴーシェ病と確定診断された患者。
- 2) 上記 1) にてゴーシェ病と診断され、神経症状を*有する患者。
* 異常眼球運動、呼吸障害、嚥下障害、構音障害、けいれん発作、ミオクローヌス・筋緊張の異常 (ジストニア、低緊張、後弓反張、痙性)・失調による運動能力の退行、知的能力の退行など。
- 3) 患者由来培養皮膚線維芽細胞にてアンブロキシソールによるシャペロン効果が確認された患者。
- 4) ゴーシェ病の治療として、酵素補充療法を実施している患者。
- 5) 本研究の参加にあたり、十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人あるいは保護者の自由意思による文書同意が得られた患者。

【治療薬の調整】

アンブロキシソール塩酸塩製剤 (以下、アンブロキシソール、商品名ムコソルバン) は帝人ファーマ株式会社から購入した。

【治療薬の投与方法】

簡易懸濁法にて溶解したアンブロキシソールを分3投与した。アンブロキシソールは 3mg/kg/日から開始し、最終投与量を 25mg/kg/日まで増量した。

【治療効果の判定】

血液 (血算、一般生化学検査、リンパ球 GBA 酵素活性、アンブロキシソール血中/髄液中濃度)、尿検査、腹部エコー、腹部 CT、脳 MRI、MRS、脳波、電気生理検査 (聴性脳幹反応、短潜時 SEP、視覚誘発電位、Blink reflex、眼電位図) を治療開始前後に行った。

また、リンパ球 GBA 酵素活性は全ての患者において評価が可能であるが、臨床症状は多様であることから、臨床症状を一律に同一評価方法で行う事は困難である。また、通常の MRI や MRS、電気生理検査所見も患者毎に様々であることから、中枢神経系に特異的で、どの患者にも適応できる客観的な評価方法の開発が必要であると考えた。

そこで本研究では、生化学的指標として髄液グルコシルスフィンゴシン濃度を、生理学的指標として対光反射を正常コントロールと比較し、評価法として有用であるかも併せて検討した。

C. 結果

【対象】

2013年10月31日の時点で、計17名の患者に投与を行った。1年以上の投与を終了した6例 [2013年10月31日の時点で、治療期間中央値: 1年11ヵ月 (1年~3年7ヵ月)] について、安全性、有効性及び薬物動態の解析を行った (後述

の結果は投稿準備中である)。

【治療経過による有害事象】

安全性に関しては、投与を行ったすべての患者について集計し、1例に皮疹、2例に低尿酸血症を認めたと、いずれも軽度であり、投薬継続で自然軽快した。中止例は3例であり、1例はリンパ球G B A酵素活性の上昇が得られず、無効と判断し、中止となった。2例目は原疾患の進行に関連するイレウス(上腸間膜動脈症候群)にて一旦中止としている。3例目は薬剤アレルギー(ムコソルバンによるDLST陽性)にて使用21日で中止となった。

これら3例を除いた14例は現在も治療を継続しており、有害事象は報告されていない。

【有効性】

以下の有効性に関する項目は、1年以上の投与を終了した6例[2013年10月31日の時点で、治療期間中央値:1年11ヵ月(1年~3年7ヵ月)]について解析を行った。

(1) リンパ球G B A酵素活性

リンパ球G B A活性は、アンブロキシソール塩酸塩を25 mg/kg/日投与することにより、治療前のコントロールの14.3% (n=6、5.5-30.9%) から、治療後には48.3% (n=6、42.2-54.6%) まで有意に上昇した。

(2) 臨床症状(痙攣、ミオクローヌス)

薬剤抵抗性のミオクローヌス並びに痙攣発作を有した5例において、発作頻度並びに発作持続時間の改善を認めた(表1、図1)。治療前には歩行や独座が不能であった2症例では、再度歩行が可能となるなど粗大運動機能スコア(GMFM)(図2)ならびに日常生活動作(ADL)の改善(図3)を得た。開始時に既に寝たきりとなっており、ADLの評価不能であった2症例に関しても、痙攣やミオクローヌスの軽減によって全身状態の

安定化や介護者の負担軽減が得られた。

(3) 電気生理検査

治療効果判定の生理学的指標として、脳波、電気生理検査(聴性脳幹反応、短潜時SEP、視覚誘発電位、Blink reflex、眼電位図)を施行した。治療1年目の評価で聴性脳幹反応、短潜時SEP、視覚誘発電位、Blink reflexに関しては、一定の傾向は得られなかった。診察指示に応じる事が可能な2例で眼電位図による水平性衝動性眼球運動の潜時を測定し、治療後に潜時の改善を認めた。その他、脳波で1例にspike indexの低下を認めた。

(4) 画像検査

頭部MR I、MR S検査を施行し、1例に軽度の萎縮の進行を認めた。その他5例では著変は認めなかった。MR Sにて共通する特記所見は得られなかった。

(5) 髄液グルコシルスフィンゴシン

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者13例(Ⅱ型6例、Ⅲ型7例、中央値2.2歳、6ヶ月~49歳)ならびに正常コントロール26例(中央値2.5歳、3ヶ月~18歳)の髄液グルコシルスフィンゴシンをLC-ESI-MS/MSを用いて測定し、神経型ゴーシェ病では平均29倍(中央値88.0 pg/ml、26.6-2000 pg/ml)とコントロール群(中央値2.81 pg/ml、0-8.49 pg/ml)に比して有意に上昇していることを確認した。

また、6例全例で治療開始12ヶ月後にベースラインより有意な低下を認めた(図4)。

(6) 電子瞳孔計による対光反射計測

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者15例(Ⅰ型2例、Ⅱ型6例、Ⅲ型7例)ならびに正常コントロール33例(コントロール1:n=30、平均年齢23歳、22~37歳、コントロール2:n=3、平均年齢4.7歳、4~6歳)におい

赤外線電子瞳孔計（イリスコーダデュアルC 10641、浜松ホトニクス、浜松、日本）を用いて両眼の対光反射の潜時と縮瞳率を計測した。

神経型（Ⅱ型およびⅢ型）ゴーシェ病では12/13例（92.3%）に潜時の遅延や縮瞳率の低下を認め、非神経型（Ⅰ型）の2例にはいずれの異常も認めなかった。

治療12ヶ月後に評価が可能であった4例に関して再度測定を行い、ベースライン時には反応が消失していた3例で波形の再出現を認めた。残り1例も縮瞳率および潜時の改善を認めた（図5）。

D. 考察

本研究において、17例中1例の薬剤アレルギーによる因果関係が否定できない中止を認めたが、その他の重篤な副作用は認めず、安全性・忍容性に優れた治療であることが示唆された。

臨床症状の改善に関しては、治療抵抗性の痙攣発作やミオクローヌスに対しても、評価症例全例においてミオクローヌス及び痙攣の軽減を認め、それに伴うADLの改善が得られた。また、眼球運動の潜時や対光反射などの生理学的指標においても中枢神経における改善が確認できた。

病状の重症度や治療法に影響を受けにくい客観的な評価法として、髄液グルコシルスフィンゴシンの定量を行い、その評価系を構築した。この測定系を用いると、神経型ゴーシェ病では年齢や神経学的重症度、先行する酵素補充療法等の患者背景に影響を受けず、髄液グルコシルスフィンゴシンの有意な上昇を認めた。グルコシルスフィンゴシンはゴーシェ病の蓄積基質であるグルコセレブロシドが脱アシル化されて合成されるリゾ体で、神経型の中枢神経に過剰蓄積し、神経変性に関与すると考えられている。グルコシルスフィンゴシンの主な供給源はスフィンゴ脂質が過剰に蓄積したゴーシェ細胞と考えられているため、血清中でも検出可能だが、酵素補充療法にて低下するため、先行する酵素補充療法の時期や投与量が均一でない患者群での評価は困難である。一方

で髄液では酵素補充療法が移行しないため、先行治療歴に関わらず評価が可能であり、中枢神経系の評価として特異性が高いと考える。

加えて、全例でシャペロン療法後に低下を認めたことは、シャペロンによる変異酵素の安定化が促進された結果、グルコセレブロシドやグルコシルスフィンゴシンの分解と蓄積の抑制が得られた事を示唆するものであり、治療効果の客観的指標として有用であると考えられた。

E. 結論

神経型ゴーシェ病患者へのアンブロキシソールの大量長期経口投与は、有害事象を伴わず、患者の残存酵素活性を上昇させた。また、進行例であってもミオクローヌスや対光反射の改善等の神経症状に対する改善効果を有する可能性が示唆された。

加えて本研究で開発した髄液グルコシルスフィンゴシン測定と電子瞳孔計を用いた対光反射測定は、指示に応じる事が困難な年少児や重症例においても施行可能な客観的評価方法であり、効果判定の有用な指標となり得る事が示唆された。

今後は症例数を増やし、安全性・忍容性に加え、中枢神経治療薬としての有効性を更に検討していく。

図表

表1. 臨床症状の経過

患者	年齢	病型	発作様式	発作頻度（前）	発作頻度（治療後）
①	33	Ⅲ	ミオクローヌス（安静時）	顔面、四肢に 10回>10秒	
②	3	Ⅱ	強直痙攣	8回/28日	4回未満/28日
③	22	Ⅲ	強直痙攣 ミオクローヌス	強直痙攣： 4.3回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒	強直痙攣： 4.6回/28日 ミオクローヌス：
④	17	Ⅲ	強直間代痙攣 ミオクローヌス	強直間代痙攣： 26回/28日 ミオクローヌス： 10回>10秒	強直間代痙攣： 12.3回/28日 ミオクローヌス：
⑤	4	Ⅱ	強直間代痙攣 ミオクローヌス	痙攣重積：3回/年 ミオクローヌス： 7.2回/10秒	痙攣重積：1回/年 ミオクローヌス： 3.4回/10秒

図1. ミオクローヌス評価 (UMRS)

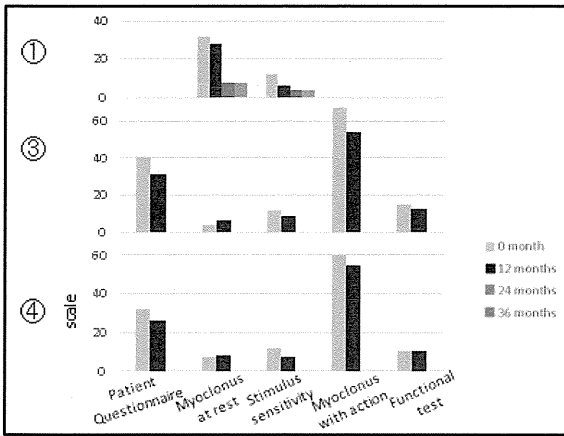


図4. 髄液グルコシルスフィンゴシン

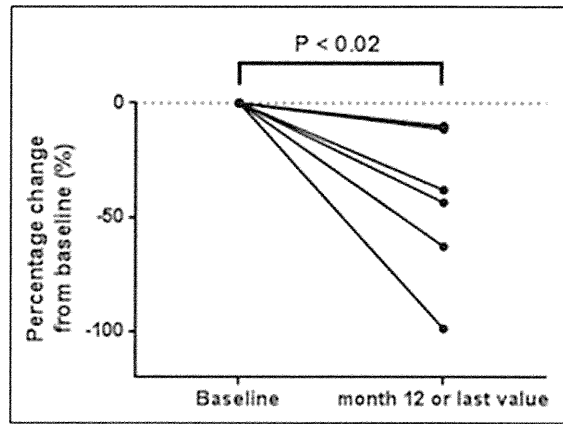


図2. 粗大運動評価 (GMFM)

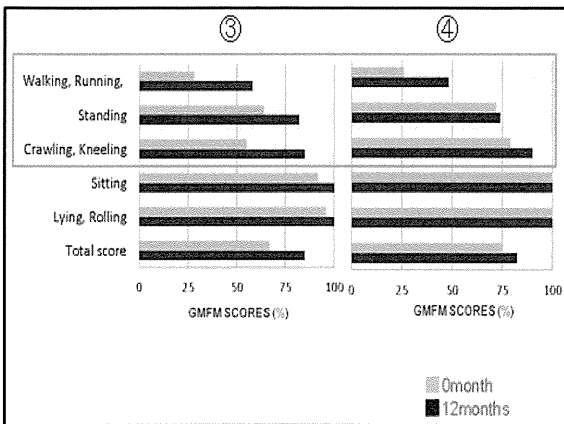


図5. 対光反射

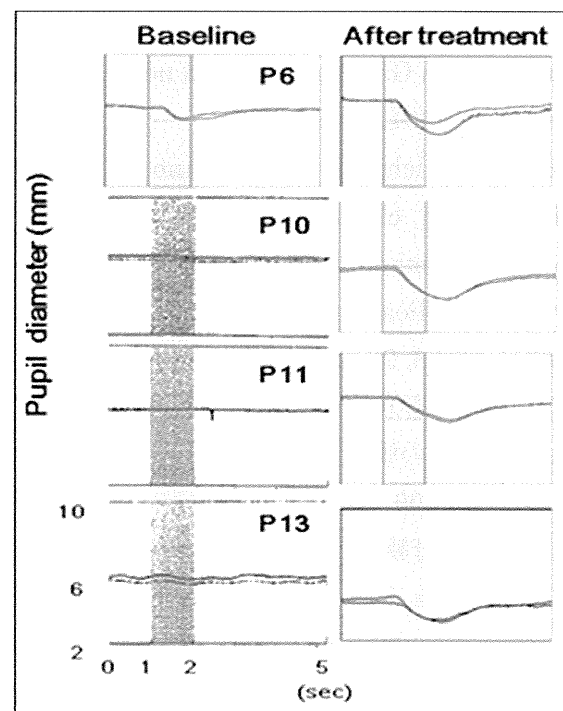
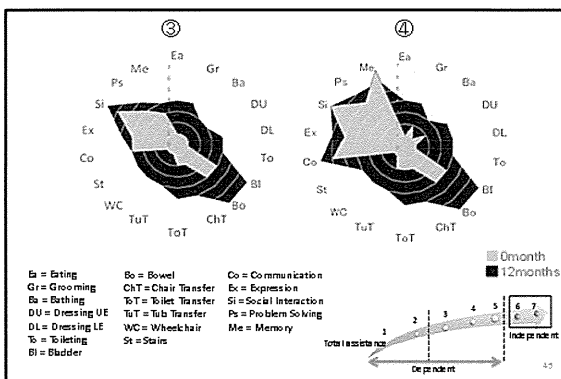


図3. 日常生活動作評価 (FIM)



1. 論文発表

- 1) Li, L., K. Higaki, et al. Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of beta-galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101(4): 364-369, 2010
- 2) Luan, Z., K. Higaki, et al. A Fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBiochem* 11(17): 2453-2464, 2010

- 3) Katsumi Higaki , Linjing Li , Kousaku Ohno, et al. Chemical Chaperone Therapy: Chaperone Effect on Mutant Enzyme and Pathophysiology in β -Galactosidase Deficiency. Hum Mutat 32: 843-852, 2011.
- 4) Ayumi Takamura, Katsumi Higaki, Kousaku Ohno, et al. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J.Neurochem.118, 399-406, 2011
- 5) Luan Z, Linjing Li , Higaki K ,Ohno K, et al. The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. Brain Dev. 2012 Jun 7
- 6) Suzuki Y, Ichinomiya S, Ohno K, et al. Therapeutic chaperone effect of N-octyl 4-epi- β -valienamine on murine G(M1)-gangliosidosis. Mol Genet Metab. 106(1), 92-98, 2012
- 7) 成田綾、大野耕策：先天代謝異常症と眼； Gaucher 病の眼科所見と治療。神経眼科 29 (3)：303-309、2012
- 8) 成田綾、大野耕策：ミオクローヌス—What's myoclonus ? ライソゾーム病。Clinical Neuroscience 30(7):822-825, 2012
- 第 54 回日本先天代謝異常学会
- 4) Aya Narita, Kousaku Ohno, et al. Chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 13th Lysosomal Disease Network World Symposium .Orlando, Feb. 2013
- 5) 成田綾、板村真司、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するアンブロキシロールを用いたケミカルシャペロン療法 第 55 回日本小児神経学会学術集会.大分, 2013.5
- 6) Aya Narita, saori Kosugi, Kosaku Ohno, et al. Elevated CSF Glucosylsphingosine in neuronopathic Gaucher disease : relation to phenotype and therapeutic response with chaperone therapy. The 55th Annual meeting of JSIMD/The 3rd ACIMD, maihama, Nov.2013
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) 成田綾、前垣義弘、大野耕策。Gaucher 病 3 型患者に対するケミカルシャペロン療法の効果。第 53 回日本小児神経学会総会。横浜、2011.5
- 2) Aya Narita, Luan Zhuo, Kousaku Ohno, et al. Chemical chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 12th International Child Neurology Congress 2012
- 3) 成田綾、白井謙太朗、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するケミカルシャペロン療法

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析に関する研究

分担研究者：難波 栄二（鳥取大学生命機能研究支援センター教授）

研究要旨

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者 8 検体（GM1-ガングリオシドーシス 6 検体、モルキオ B 病 2 検体）について遺伝子変異解析を行った。患者由来の皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン化合物 NOEV と 6S-NBI-DGJ の効果を検討し、シャペロン効果の変異型特異性を明らかにした。

A. 研究目的

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行った。β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロンの効果を検討し、新規シャペロン療法開発のための基礎的な知見を得る目的で研究を行った。

B. 研究方法

1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシーケンス解析を行った。

2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2 μM の NOEV

(N-octyl-4-epi-β-valienamine) または 20, 80 μM の 6S-NBI-DGJ を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 6 検体について遺伝子変異解析を行い、Y333C/Y333C、H102D/L499Q、L162S/R590C、D640Y/?、M1C / R49G、R59H / R59H を同定した。モルキオ B 病 2 検体においては、R482H / T500A、R68Q / T500A 変異をそれぞれ同定した。

また、9 人の GM1-ガングリオシドーシス患者由来皮膚線維芽細胞について NOEV と 6S-NBI-DGJ のシャペロン効果を検討した結果、NOEV は 5 細胞に対し、6S-NBI-DGJ は 6 細胞に対し有意なシャペロン効果を認めた（図 1）。

D. 考察

今回同定した変異のうち、M1C、R49G、H102D、L499Q および D640Y 変異は報告のない変異型であった。このうち H102D と L499Q は変異 cDNA 発現細胞系において活性低下をみとめたので、新規変異の可能性が高い。また、M1C と R49G は機能予測ソフト Polyphen2 において、共に機能欠損の可能性を示し、責任変異である可能性を示唆した。

#	Mutation	Phenotype	Ethnic Origin	NOEV	MTD118
1	p.L162S/p.R590C	G _{M1}	Caucasian	Positive	Positive
2	p.I51T/?	G _{M1}	Japanese	Positive	Positive
3	p.Y270D/p.Y270D	G _{M1}	UK	Negative	Negative
4	p.R208C/IVS10,+1 G>A	Inf G _{M11} 1	Japanese	Negative	Positive
5	p.R201C/?	Juv G _{M1}	Japanese	Positive	Positive
6	p.Y333C/p.Y333C	G _{M1}	UK	Positive	Positive
7	p.S54N/p.D640Y	Inf G _{M1}	Russian	Negative	Negative
8	p.K578R/?	G _{M1}	UK	Positive	Positive
9	p.R59H/p.R59H	Inf G _{M1}	Japanese	Negative	Negative

図1 GM1-ガングリオシドーシス皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果

シャペロン活性について、新規シャペロン化合物 6S-NBI-DGJ は NOEV が効果を示さない I51T などの変異に対し有効性を示す (Higaki et al, 2011; Takai et al, 2013)。今回の培養線維芽細胞に対する検討においても、6S-NBI-DGJ は R208C に有効性を示したことから、NOEV とは異なる変異型に有効性を示す可能性がある。今後はこれらの化合物が有効でない変異型に対する新規化合物の探索が必要と考える。

E. 結論

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。2つのシャペロン化合物が異なる変異型に対する有効性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E. Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of β-galactosidase

mutations. *Mol Genet Metab*, 101, 354-369, 2010

2) Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem*, 11, 2453-2463, 2010

3) ○Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β-galactosidase deficiency. *Hum Mutat*, 32, 843-852, 2011

- 4) ○ Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem*, 118, 399-406, 2011
- 5) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286, 35283-35290, 2011
- 6) Xiong H, Higaki K, Wei C, Bao CW, Zhanf YH, Fu N, Qui J, Adachi K, Kumura Y, Ninomiya H, Nanba E, Wu XR. Genotype/phenotype of 6 Chinese cases with Niemann-Pick disease type C. *Gene*, 498, 332-335, 2012
- 7) ○ Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic chaperone effect of *N*-octyl 4-epi- β -valienamine on murine GM1-gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 106: 92-8, 2012.
- 8) ○ Aguilar-Moncayo M, Takai T, Higaki K, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Li L, Yu Y, Ninomiya H, García-Moreno I, Ishii S, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1 gangliosidosis, *Chem Commun* 48: 6514-6, 2012.
- 9) Castilla J, Riquez R. Cruz D, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Carcia Fernandez JM, Castillon S: Conformationally-locked N-glycosides with selective β -glucosidase inhibitory activity: Identification of a new non-iminosugar-type pharmacological chaperone for Gaucher disease. *J Med Chem* 55:6857-65, 2012.
- 10) Luan Z, Li L, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on GD cells and normal mice. *Brain Dev*, 2013 35: 317-322.
- 11) ○ Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM1 gangliosidosis. *Mol Ther*, 2013 21: 526-532.
- 12) ○ Higaki K, Ninomiya H, Suzuki Y, Nanba E. Two candidate molecules for chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Future Med Chem*. 2013 5(13): 1551-1558.
2. 学会発表
- 1) 難波栄二、檜垣克美 : GM1-ガングリオシドーシス脳神経細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積. 第 52 回 日本小児神経学会総会、福岡、2010.5
- 2) 難波栄二 : ケミカルシャペロン療法. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 3) 高井知子、檜垣克美、李林静、飯田真己、大野耕策、鈴木義之、難波栄二 : ベータガラクトシダーゼに対するシャペロン活性測定のため

- めの新規細胞系の構築. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 4) 高井知子、檜垣克美、李林静、榊原康文、鈴木義之、難波栄二：ヒト変異 β -ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果. 第 83 回 日本生化学会大会、神戸、2010.12
- 5) 檜垣克美、栞卓、李林静、難波栄二、大野耕策、Carmen Ortiz Mellet、José M. García Fernández、鈴木義之：ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理的シャペロンの効果に関する検討. 第 15 回日本ライソゾーム病シンポジウム、東京、2010. 12
- 6) Nanba E. Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
- 7) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
- 8) 高井知子、檜垣克美、鈴木義之、難波栄二：ヒト変異 α -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物. 第 84 回 日本生化学会大会、京都、2011.9
- 9) 三浦弘子、檜垣克美、山内裕子、高井知子、難波栄二：ライソゾーム病神経変性とミトコンドリア異常. 第 84 回 日本生化学会大会、京都、2011.9
- 10) 檜垣克美、高村歩美、大野耕策、鈴木義之、難波栄二：GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第 16 回日本ライソゾーム病シンポジウム、東京、2010. 9
- 11) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy for β -galactosidase deficiency. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011,10
- 12) 高井知子、檜垣克美、Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策、鈴木義之、難波栄二：ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会、千葉、2011.11
- 13) Yi Y, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二：ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会、千葉、2011.11
- 14) Takai T, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. A novel chaperone compound for GM1-gangliosidosis. 第 17 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.
- 15) Yu Y, Higaki K, Takai T, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1-gangliosidosis. 第 17 回ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.
- 16) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, Yu Yi, 大野耕策, 鈴木義之：ファブリー病ならびに GM1-ガングリオシドーシスに対する新しいシャペロン治療薬の開発. 第 57 回日本人類遺伝学会、

- 東京、2012.10.24-27.
- 17) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト I51T 変異 β -ガラクトシダーゼに有効な新規ケミカルシャペロン化合物の解析. 第 54 回日本先天代謝異常学会、岐阜、2012.11.15-17.
- 18) 難波栄二. ライソゾーム病に対するシャペロン療法. 第 2 回先天代謝異常症患者会フォーラム. 東京, 2013. 8
- 19) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, 由良敬, 榊原康文, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之. α -ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン治療薬の開発. 第 58 回日本人類遺伝学会. 仙台, 2013. 11
- 20) Nanba E. Chaperone therapy for lysosomal storage diseases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 21) Takai T, Higaki K, Suzuki Y, Nanba E. Comparison of two Chaperone candidates for treatment of GM1-gangliosidosis. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 22) Hossain MA, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N. NOEV treatment option for Japanese late-onset Krabbe disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- Nanba E, Higaki K, Suzuki Y: Utilizacion de derivados biciclicos de 1-deoxygalactonojirimycina en la preparacion de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas cn beta-enzimas galactosidasas lisosomicas mutantes humanas (Use of bicyclic derivatives of 1-deoxygalactonojirimycin for the formulation of drugs against lysosomal storage disorders associated to mutations on the acid β -galactosidase), ES P201232024 (December 26, 2012)

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発

分担研究者：小林博司（東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部）

研究要旨

ムコ多糖症 VII 型(MPSVII)、およびクラッペ病は、ライソゾーム性分解酵素欠損による常染色体劣性遺伝病である。我々はレンチウイルスを用いたこの二疾患に対する遺伝子治療の検討を進めた。まず MPSVII の欠損酵素 HBG (human β -glucuronidase) を組込んだレンチウイルスを作成し、細胞への導入で有意な活性上昇を見た。更に新生児マウスへの静脈注射により、生命予後の改善、中枢神経系への長期遺伝子発現、オートファジービルドアップ抑制効果も得られた。またクラッペ病の欠損酵素 GALC (β -galactocerebrosidase) を組込んだレンチウイルスも開発し、細胞株 (293A、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株) およびマウス新生児での肝臓での酵素発現上昇、脳でのサイコシン蓄積の減少が見られた。更に基質合成阻害薬を併用することで相乗効果的な生命予後の改善が見られた。またタンパク質のミスフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組込む遺伝子のシークエンスを改変した codon optimization GALC を組み込み、同様に効果を検討し体重増加などで有効性が見られた。

これらの研究から効果に疾患ごとの差異は当然あるものの、レンチウイルスベクターによる新生児遺伝子治療はライソゾーム病の表現型の改善に有効と考えられた。

研究協力者：有賀賢典 東京慈恵会医科大学助教

A. 研究目的

ムコ多糖症およびクラッペ病の根本的治療としての有効な遺伝子治療の開発

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルス

HIV 由来であり NEF,VIF などの副蛋白を除去し、IRES 配列を介してレポーター遺伝子として GFP を組込んだレンチウイルスベクターに MPSVII の欠損酵素 HBG、さらに Krabbe 病の欠損酵素 GALC をクローニングし、2種類の組換えレンチウイルスを作成した。

2. 細胞培養

実験に使用する 293A 細胞は 10%ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた DMEM(D-10)培地を用いて、5%二酸化炭素の環境下において、37°Cで培養した。これに対し組換えウイルスを希釈を系列を作って感染させ、GFP および欠損酵素の力価を計測した。

3. 新生児マウスへの投与：

日令 0-2 の新生児マウスの顔静脈へ作成した組換えウイルスを静脈注射し、5 週間で臨床所見、病理、脳、肝臓などでの欠損酵素およびレポーター遺伝子発現を評価した。MPSVII ではグリコサミノグリカン、クラッペ病ではサイコシンといった蓄積物質の評価も行った。更にクラッ

ペ病では基質合成阻害剤 L-シクロセリンを遺伝子治療を行ったマウス群で日齢 5 から隔日で皮下注射し効果を検討した。

またタンパク質のフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組み込む遺伝子のシークエンスを改変した codon optimization GALC を (Gen Script 社に依頼合成) 組み込み、同様に新生児注射による効果を検討した。

C. 研究結果

1. MPSVII の欠損酵素 HBG を組み込んだウイルスを感染させた細胞株 (293A) は HBG と GFP 両方の発現が容量依存性に見られ、FITC フィルタを用いた蛍光顕微鏡では GFP 発現細胞を数多く確認できている。新生児モデルマウスへの遺伝子導入では 30 週齢を超えても中枢神経系への遺伝子発現が realtime PCR により確認され、更に主要臓器での蓄積物質の減少も見られた。また脳組織でのオートファジービルドアップの抑制効果が遺伝子治療群で見られ、これは時間経過につれて小さくなることが確認された。また生命予後は遺伝子治療群で有意に改善が見られた。

2. Krabbe 病の欠損酵素 GALC を組み込んだウイルスを感染させた細胞株 (293A) では GALC、GFP 両方の発現が見られ、モデルマウスへの新生

児注射では1週間後の肝において正常の10%の酵素活性が得られた。更に5週齢の脳ではサイコシンの減少が有意に見られた。また基質合成阻害剤L-シクロセリン併用群では生命予後、症状発現遅延効果において有意な所見が得られた。codon optimization GALCを組込んだレンチウイルスベクターによる新生児遺伝子治療では細胞株において十分なover expressionが見られ、in vivoでも体重増加にやや優位性が見られた。

D. 考察

MPSVIIに関しては生命予後の改善、導入遺伝子の長期発現が証明され遺伝子治療のin vivoでの有用性が示唆された。クラッペ病でも有意な生命・症状発現遅延効果は得られ、基質合成阻害、codon optimizationなどで更に相乗効果が期待された。これら二つの基質の異なるライソゾーム蓄積症において効果に差はあったがレンチウイルスベクターを用いた新生児遺伝子治療は有効であったと考えられた。

E. 健康危険情報なし

F. 研究発表

- 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、ほか: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) Kobayashi H., Ariga M., Shimada Y., Izuka S., Yokoi T., Iwamoto T. et al. Neonatal Gene Therapy for the mouse model of Krabbe Disease. Japanese Society of Gene and Cell Therapy. Utsunomiya, Tochigi., Japan. July. 2010.
- 3) Kobayashi H., Izuka S., Ariga M, et al. Lentivirus mediated neonatal gene therapy for Krabbe disease. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) 2011.May Seattle, WA.
- 4) 小林博司、飯塚佐代子ほか レンチウイルスベクターを用いたクラッペ病に対する遺伝子治療 第17回日本遺伝子治療学会 福岡、2011年7月
- 5) 有賀賢典、小林博司ほか レンチウイルスベクターを用いたムコ多糖症VII型に対する遺伝子治療 第53回日本先天代謝異常学会 千葉 2011年11月

- 6) Lentiviral Vector Mediated Neonatal Gene Therapy of Krabbe Disease Model Mice. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Sayoko Izuka, Takashi Higuchi, Masamichi Ariga, Takeo Iwamoto, Takahiro Fukuda, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. (O-18) The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2012. April, Soul.
- 7) Lentivirus Mediated Gene Therapy For Krabbe Disease. Hiroshi Kobayashi, Sayoko Izuka, Takahiro Fukuda, Takeo Iwamoto, Asako Morita, Masamichi Ariga, Yota Shimada, Takayuki Yokoi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. 第18回日本遺伝子治療学会 JSGCT 2012年6月、熊本
- 8) レンチウイルスベクター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 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
- 9) Kobayashi H., Izuka S., Ariga M, et al. Gene therapy for mouse model of Krabbe disease. 16th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) 2013.May Saltlakecity, UT.
- 10) 小林博司、飯塚佐代子ほか レンチウイルスベクターを用いたクラッペ病に対する遺伝子治療 第19回日本遺伝子治療学会 岡山、2013年7月
- 11) Gene Therapy for Krabbe Disease. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Takeo Iwamoto, Takahiro Fukuda, Masamichi Ariga, Yohei Sato, Taichi Wakabayashi, Sayoko Izuka, Yoshikatsu Eto, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi. (P-101) The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease (ACIMD) and The 55th Annual Meeting for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) joint meeting 2013. Nov., Chiba, Japan.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

ムコリピドーシス II/III とクラッペ病の病態解明と治療法の開発

分担研究者：酒井規夫 大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座

研究要旨

リソソーム病の一つであり、著明な骨病変、心弁膜症、神経症状を来すムコリピドーシスの培養皮膚線維芽細胞を用いて、この疾患の病態解明とライソゾーム酵素の補充による治療法の開発を行なった。またもう一つのライソゾーム病であるクラッペ病についても変異解析と、その変異蛋白の発現実験系を用いてシャペロン療法の可能性について解析を行なったので報告する。

A. 研究目的

ムコリピドーシス II/III (MLII/III)の患者の培養皮膚線維芽細胞においてライソゾーム酵素の糖鎖のリン酸化が障害されることにより、様々な基質が蓄積することが基本病態と考えられるが、それ以外にライソゾームの pH、オートファジー、膜のエンドサイトーシスなどにおける病態を解明する。また正常細胞内のライソゾーム酵素を塩化アンモニウム処理することによって培養液中に放出する現象を用いて、ライソゾーム酵素の混合液を作成し、治療薬の開発を目的とした。

また、クラッペ病の日本人の病型をまとめ、変異解析を行なうことで遺伝子型-表現型相関を解析し、変異蛋白の一過性発現系を構築して、βガラクトシダーゼのシャペロン NOEV の有効性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

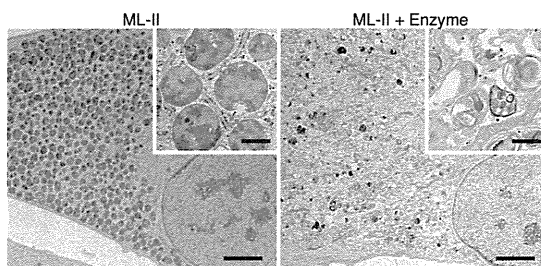
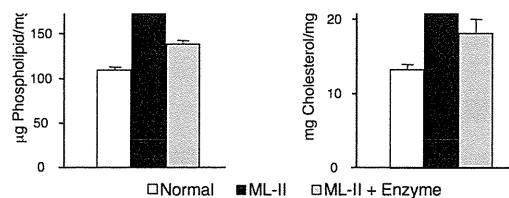
- 1) ライソゾーム酵素混合液の作成；正常細胞に塩化アンモニウムを負荷し、培養液中に出てきた酵素を濃縮して作成した。
- 2) ムコリピドーシスの患者細胞におけるライソゾームの変化の解析と前記酵素混合液の治療

- 効果の解析；LysoSensor を用いて細胞を染色し、ライソゾームの pH を測定し、正常との差を調べ、治療によってどうなるかを解析した。ライソゾームの基質として Phospholipid と Cholesterol を例にとりその量を正常と比較し、治療効果を調べた。ライソゾームの数（量）を LysoTracker と DAPI との蛍光量を用いて測定し、正常細胞との差を調べ、治療による効果を解析した。BODIPY-Cer を培養細胞に負荷し、その取り込みを最上細胞と比較し、治療効果を解析した。オートファジーの状態を LC3 の Western を用いて正常と比較し、酵素治療での反応を見る。またミトコンドリアの形態変化についても観察した。電子顕微鏡で Inclusion body の様子を酵素治療の前後で観察した。
- 3) クラッペ病の日本人症例の解析；5 1 例について、その臨床病型と遺伝子変異について解析した。高頻度変異について発現ベクターを作成し、その酵素活性と前駆体からの成熟について解析した。
 - 4) クラッペ病の変異蛋白に対する NOEV のシャペロン効果；変異蛋白の発現系を用いて、シャペロン物質 NOEV の効果について解析した。

C. 研究結果

5) ライソゾーム酵素混合液の作成；ライソゾーム混合液の酵素活性を、正常細胞の培養液上清と比較すると、 β -hexosaminidaseA の 20 倍を最高に上昇しており、そのパターンは、MLII 細胞の上清における漏れ出た酵素活性の比と類似していた。これを疾患細胞に負荷したあと細胞内の酵素活性は負荷前より上昇し、これは M-6-P の濃度依存性に阻害された。

6) ムコリピドーシスの患者細胞におけるライソゾームの変化の解析と前記酵素混合液の治療効果の解析；ライソゾームの pH は正常で 4.8 なのに対し、5.3 と上昇し、酵素治療に反応して 5.0 程度に回復した。ライソゾームの基質は正常に比し疾患細胞で増加していたが、これは酵素治療に反応して回復した。ライソゾームの DAPI 染色に対する比としての量は正常で 0.4 であったが疾患細胞で 1.2 と増加し、治療によって 0.8 と低下した。エンドサイトーシスの状態を BODIPY-Cer の取り込みでみると、MLII ではゴルジ領域に停滞していた流れが、酵素治療後は正常化していた。正常細胞に比し MLII 細胞では LC3 の発現が上昇しているが、これも治療により改善が Western でみられた。またミトコンドリアの形態も MLII では fragmentation が多いのが治療により改善がみられた。顕微鏡で見る Inclusion body は酵素治療後に明らかに減少していることが観察された。



7) クラッペ病の日本人症例の解析；日本人 51 人のクラッペ病患者の臨床病型をまとめ、乳児型は全体の 41% と半分以下であることを明らかにした。そして後期乳児型 20%、若年型 10%、成人型 29% と、成人型もかなり多いことが判明しており、日本人の特徴と考えられる。また、変異解析のまとめから、高頻度変異 7 つで日本人のクラッペ病の 6 割が同定できること、また遺伝子型／表現型相関の解析から、乳児型変異 4 つ、遅発型変異 3 つを見つけており、今後診断時に遺伝子診断から臨床病型の類推に重要な情報となった。また、変異の重症度と western blot で確認した蛋白のプロセッシングの効率が、乳児型で悪く、若年型変異で高いことも確認した。

8) クラッペ病の変異蛋白に対する NOEV のシャペロン効果；酵素活性に対する効果としては乳児型の変異に対してはその有効性は明らかでなかったが、遅発型の変異 3 つに対してはいずれも有効性が見られ、 $2 \mu\text{M}$ で最大の効果を認めた。また、Western blot からは前駆体の量は変異にあまり関係ないが、ライソゾームに運搬されたあとにプロセスされて成熟すると言われている成熟タンパク質の量は、正常蛋白、遅発型変異に多く、乳児型蛋白は成熟蛋白をほ

とんど認めないことが判明した。

D. 考察

ムコリピドーシスの繊維芽細胞ではライソゾーム酵素の運搬障害により、ライソゾーム内の酵素が減少し、その分解基質が蓄積するのみならず、pH 上昇、エンドサイトーシスの異常、オートファジー亢進、ミトコンドリアの形態異常など様々な細胞機能に異常を来していることが解明された。またこれがライソゾーム酵素の調整混合液を用いた治療により、多くの細胞機能がかなり改善することが認められ、今後 *in vivo* での効果を試す意義があると考えられる。

ケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの阻害効果も認め、その熱安定性を増大させることがわかった。*in vivo* で変異酵素の酵素活性の増大は、遅発型の変異で明らかであり、重症な乳児型には効果は弱いと考えられた。活性の上昇する変異は成熟蛋白の増加が認められており、NOEVによりERからライソゾームへの運搬が高率良く行なわれていることが判明した。

E. 結論

ムコリピドーシスは大半のライソゾーム酵素の減少をともなうことにより、基質の蓄積以上に細胞内の様々な機能異常を来しているが、ライソゾーム酵素の混合液の治療により、有効に細胞内に取り込まれることが明らかになり、今後の治療開発の将来性を示すものと考えられた。

ケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの高頻度の遅発型変異4つに対し、そのライソゾームへの運搬効率を上昇し、成熟タンパク量を増やすことによって治療効果が想定される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyoshi Y, Sakai N, Hamada Y, Tachibana M, Hasegawa Y, Kiyohara Y, Yamada H, Murakami M, Kondou H, Kimura-Ohba S, Mine J, Sato T, Kamio N, Ueda H, Suzuki Y, Shiomi M, Ohta H, Shimozawa N, Ozono K., Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy., *Endocr J.* 57(11): 965-72, 2010
- 2) Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Kotobuki Y, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Yutsudo M, Ozono K, Katayama I., Cutaneous symptoms in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts., *Br J Dermatol.* 163(4):881-4, 2010
- 3) Kobayashi H, Takahashi-Fujigasaki J, Fukuda T, Sakurai 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 mucopolipidosis type III α/β suggesting autophagic dysfunction., *Mol Genet Metab.* 102(2):170-5, 2011
- 4) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R., Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening., *Mol Genet Metab.* 102(4): 399-406, 2011
- 5) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N., Lysosomal storage causes cellular dysfunction In mucopolipidosis II skin

- fibroblasts., *J Biol Chem.* 286(40): 35283-90, 2011
- 6) Hashimoto N, Kagitani-Shimono K, Sakai N, Otomo T, Tominaga K, Nabatame S, Mogami Y, Takahashi Y, Imai K, Yanagihara K, Okinaga T, Nagai T, Taniike M and Ozono K, SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome, *J Hum Genet.* 56(12): 846-51, 2011
- 7) Akagi M, Mohri I, Iwatani Y, Kagitani-Shimono K, Okinaga T, Sakai N, Ozono K, Taniike M., Clinicogenetical features of a Japanese patient with giant axonal neuropathy., *Brain Dev.* 34(2):156-62, 2012
- 8) Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N., Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolidosis II skin fibroblasts., *Mol Genet Metab.* 105(2):266-9, 2012
- 9) Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K, Michigami T., Vinculin functions as regulator of chondrogenesis., *J Biol Chem.* 287(19):15760-75, 2012
- 10) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S., Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan., *Mol Genet Metab.* 107(3):513-20, 2012
- 11) Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, Kubota T, Hirai H, Higuchi C, Tsumaki N, Yoshikawa H, Sakai N, Michigami T, Ozono K., An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene., *PLoS One.* 7(8):e42180, 2012
- 12) Lee T, Takeshima Y, Okizuka Y, Hamahira K, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Sakai N, Matsuo M, Iijima K., A Japanese child with geoleophysic dysplasia caused by a novel mutation of FBN1. *Gene.* 512(2):456-9, 2012
- 13) Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M., An adult patient with mucopolidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism., *Brain Dev.* 35(5):462-5, 2013
- 14) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shiota Y, Hanajima R, Terao Y, Matsumoto H, Hossain MA, Sakai N, Shiio Y., Isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease with novel mutations in the GALC gene., *Brain Dev.* 35(6):579-81, 2013
- 15) Chang B, Gorbea C, Lezin G, Li L, Shan L, Sakai N, Kogaki S, Otomo T, Okinaga T, Hamaoka A, Yu X, Hata Y, Nishida N, Yost HJ, Bowles NE, Brunelli L, Ichida F., 14-3-3ε Gene variants in a Japanese patient with left ventricular noncompaction and hypoplasia of the corpus callosum., *Gene.* 515(1):173-80, 2013
- 16) Kardas F, Uzak AS, Hossain A, Sakai N, Canpolat M, Yikilmaz A., A novel homozygous GALC mutation: Very early onset and rapidly progressive Krabbe disease., *Gene.* 517(1):125-7, 2013

- 17) Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, Shinpo M, Azuma J, Tominaga K, Shimojima K, Ozono K, Osawa M, Yamamoto T., Microdeletions of 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement., *Am J Med Genet A*. 2013 Dec;161(12):3049-56.
- 18) Hossain MA, Otomo T, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Hamada Y, Ozono K, Sakai N, Late-onset Krabbe disease is predominant in Japan and its mutant precursor protein undergoes more effective processing than the infantile-onset form., *Gene*. 2013 Nov 16. doi:pii: S0378-1119(13)01515-1. 10.1016/j.gene.2013.11.003.
- ## 2. 学会発表
- 1) 田中あけみ, 酒井規夫, 奥山虎之, 鈴木康之, 澤田智, 大橋十也, 大浦敏博, 麦島秀雄, 田中藤樹, 大友孝信、ムコ多糖症 II 型における造血幹細胞移植の中樞神経系への効果について(多施設共同研究)、第 52 回日本小児神経学会総会、横浜、2010.5
- 2) 大友 孝信、檜垣 克美、難波 栄二、大藪 恵一、酒井 規夫、ムコリピドーシス II 型の皮膚線維芽細胞ではライソゾームの成熟異常と pH 上昇を来している、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 3) 赤木 幹弘、豊島 光雄、山村 なつみ、鈴木 保宏、Hossain Arif、濱田 悠介、大友 孝信、酒井 規夫、大藪 恵一、日本人 PKAN 症例の遺伝子解析、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 4) 長谷川 泰浩、池田 佳世、橘 真紀子、山田 寛之、清原 由起、近藤 宏樹、三善 陽子、酒井 規夫、大藪 恵一、小児期発症 Wilson 病 13 例における酢酸亜鉛製剤の有用性について、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 5) ホセイン モハンマト アリフ、大友 孝信、濱田 悠介、赤木 幹弘、大藪 恵一、酒井 規夫、Distribution of the Clinical Phenotype of Krabbe Disease in Japan、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 6) 濱田 悠介、大友 孝信、酒井 規夫、田中 雅嗣、大藪 恵一、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対するピルビン酸療法開始前後での呼気ガス試験による評価、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 7) 酒井 規夫、シンポジウム2；先天性代謝異常症マス・スクリーニングのこれから、マス・スクリーニングにおける遺伝カウンセリング、第52回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10
- 8) 酒井規夫、日本人クラッベ病の表現型の分布と新生児マススクリーニングを含めた診断／治療ガイドライン、第15回日本ライソゾーム病研究会2010.12
- 9) 渡邊順子、大平智子、加藤俊一、矢部普正、酒井規夫、大友孝信、芳野 信:骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後 第 15 回日本ライソゾーム病研究会 2010.12
- 10) N Sakai, A Hossain, T Otomo, Y Hamada, T Okinaga, H Ohta, K Ozono、Patients with Krabbe disease in Japan: phenotype and treatment、10th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases、Spain、2011.4
- 11) 濱田悠介、大友孝信、酒井規夫、大藪恵一、田中雅嗣、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対する呼気ガス試験による診断の試み、第 7 回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6
- 12) 濱田悠介、東純史、Mohammad Arif Hossain、正嶋和典、大友孝信、曹秀樹、酒井規夫、大

- 菌患一、胆のう乳頭腫を呈した異染性白質ジストロフィーの2症例、第7回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6
- 13) 酒井規夫、ミニレクチャー「ライソゾーム病の遺伝カウンセリング」、第7回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6
- 14) 佐藤友紀、酒井規夫、金川武司、大友孝信、濱田悠介、國府力、小巻正泰、吉津紀久子、西田千夏子、市村沙希、松村泰志、野口眞三郎、大阪大学病院における電子カルテによる遺伝子情報管理の取り組み、遺伝医学合同学術集会 2011、京都、2011.6
- 15) 小巻正泰、酒井規夫、金川武司、大友孝信、濱田悠介、國府力、佐藤友紀、吉津紀久子、西田千夏子、市村沙希、野口眞三郎、全国遺伝子医療部門におけるホームページに関する実態調査報告、遺伝医学合同学術集会 2011、京都、2011.6
- 16) Mohammad Arif Hossain, Takanobu Otomo, Yusuke Hamada, Motohiro Akagi, Keiichi Ozono, Norio Sakai, Screening of seven common mutations is effective to predict the phenotypes of Krabbe disease patients in Japan、ライソゾーム病スクリーニング東京会議 2011、東京、2011.8
- 17) 酒井規夫、濱田悠介、Mohammad Arif Hossain、大友孝信、大菌患一、後期乳児型異染性白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の効果について、第16回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9
- 18) 酒井規夫、濱田悠介、大友孝信、乾 幸治、大菌患一、ゴーシェ病 I 型に対する酵素補充療法の長期経過について、第16回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9
- 19) 大友 孝 信 、 Mucopolidosis II: Pathophysiology to Therapy (ムコリピドーシス II 型の病態解明と治療法の開発)、第16回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9
- 20) 大友孝信、檜垣克美、難波栄二、大菌患一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型・III 型に対する新しい治療法の開発 (1) 全ライソゾーム酵素補充法の確立、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 21) 大友孝信、檜垣克美、難波栄二、大菌患一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型・III 型に対する新しい治療法の開発 (2) 酵素補充療法による治療効果、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 22) 大友孝信、大菌患一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型 (I-cell disease) 細胞におけるゲニステインの効果について、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 23) 濱田悠介、中野さやか、新寶理子、東純史、大友孝信、富永康仁、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大菌患一、ムコ多糖症□型の発達と発育に対する酵素補充療法の効果、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 24) 濱田悠介、林真貴子、豊田健太郎、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大菌患一、松下賢治、阿部暁子、早坂清、多彩な症状を呈した OPA1 異常症の兄妹例、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 25) 濱田悠介、中野さやか、新寶理子、東純史、大友孝信、富永康仁、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大菌患一、非常に緩徐な神経学的進行を呈した副腎白質ジストロフィーの一症例、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11
- 26) ホセインモハンマドアリフ、大友孝信、濱田悠介、赤木幹弘、大菌患一、酒井規夫、In vitro transient experiment for the common mutations of Krabbe disease in Japan、第53回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11

- 27) Norio Sakai, Respiratory impairment and NPPV treatment in patients with late-onset Pompe disease receiving enzyme replacement therapy, 5th European Symposium on Steps Forward in Pompe Disease, Hungary, 2011.12
- 28) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Hossain Mohammad Arif, Norio Sakai, Clinical course of four Niemann-Pick type C patients and initiation of miglustat therapy, 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 2012.10
- 29) Yusuke Hamada, Michiko Shinpo, Mohammad Arif Hossain, Norio Sakai, Keiichi Ozono, Observation of lysosomes in lysosomal storage disorders with superresolution structured illumination microscopy, 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 2012.10
- 30) MOHAMMAD ARIF HOSSAIN, Takanobu Otomo, Yusuke Hamada, Michiko Shinpo, Motohiro Akagi, Keiichi Ozono, Norio Sakai, The late-onset mutant protein of GALC shows effective processing, 第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 31) 新寶理子、GM2 ガングリオシドーシス ～当科での診断症例の検討～、第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 32) 濱田悠介、The efficacy of sodium pyruvate therapy and breath gas test for PDH E1-alpha deficiency、第54回日本先天代謝異常学会、2012.11
- 33) 酒井規夫、造血幹細胞移植（代謝専門医の立場から）、第1回 先天代謝異常症患者会フォーラム、2012.8
- 34) 米衛ちひろ、豊島光雄、濱田悠介、酒井規夫、河野嘉文. 進行性骨溶解を認めたセラミダーゼ欠損症の一例. 第54回日本小児神経学会総会 札幌 2012.05
- 35) 中野さやか,新寶理子,東 純史,濱田悠介,岩谷祥子,富永康仁,木村志保子,下野九理子,沖永剛志,酒井規夫,永井利三郎,大菌恵一、Cataplexy が診断の契機となった Niemann-Pick 病 C 型の 2 症例、第54回日本小児神経学会総会 札幌 2012.05
- 36) 酒井規夫、ファブリー病と遺伝カウンセリング-遺伝カウンセリングとライフプラン、日本遺伝カウンセリング学会、2012.5
- 37) 酒井規夫、神経遺伝病治療戦略セミナー、ニーマン・ピック病 C 型の診断と治療、第55回日本小児神経学会学術集会、2013.5
- 38) Norio Sakai, Potential effects and obstacles for NBS of metabolic leukodystrophy, including adrenoleukodystrophy, Krabbe and metachromatic leukodystrophy, Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, 2013.5
- 39) 新寶理子、青天目 信、近藤 秀仁、 Mohammad Arif Hossain、濱田 悠介、酒井規夫、大菌 恵一、当科で診断した GM2 ガングリオシドーシス症例の検討、第9回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
- 40) Mohammad Arif Hossain, Michiko Shinpo, Keiichi Ozono, Norio Sakai, Molecular and biochemical diagnosis for three Japanese patients of galactosialidosis, 第9回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
- 41) 佐藤友紀、金川武司、酒井規夫、望月秀樹、大阪大学医学部附属病院における羊水染色体検査の現状報告、第37回日本遺伝カウンセリング学会、2013.6
- 42) 酒井規夫、ファブリー病の診療；今患者がもとめるもの、神奈川酵素補充療法研究会、2013.7