

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合分担研究報告書

ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究

分担研究者：下澤伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野・教授

研究要旨

平成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）

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

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。

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 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

マウスを用いた生化学レベルでの病態解明、治療法の開発、並びに中枢神経症状発症による大脳型モデルの開発に関しても現在、本研究班内の共同研究グループにより解析を進めている。

ペルオキシソーム形成異常症患者におけるiPS細胞樹立とペルオキシソーム欠損モデルフィッシュによる病態解明も作成作業はほぼ終了段階にあり、現在、検証作業から解析を進めている。

患者会と協力した難病克服への取組みについては勉強会、ニュースレターの配布、情報交換から岐阜大学小児科外来でのセカンドオピニオン、遺伝カウンセリングに繋げている。

ペルオキシソームは発達途上のオルガネラであり、本研究班による単一遺伝子病の解明を通してペルオキシソーム機能を網羅的に明らかにして、生活習慣病や神経疾患も対象にした広い意味での代謝病におけるペルオキシソームの関わりを明らかにしていきたいと考えている。

## E. 結論

国内唯一のペルオキシソーム病の総合診断施設として、国内外のペルオキシソーム病患者を診断して最新の医療情報を提供するとともに、早期治療が不可欠な大脳型ALDに対しては出来るだけ迅速な診断を可能にして早期移植に繋げている。さらに倫理面に配慮した患者リソースに、疾患モデル生物も取り入れて、遺伝性ペルオキシソーム病の診断・病態解明・治療法の開発を進めた。

## F. 研究発表

診療ハンドブックの編集、配布

・「副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック」  
1000部

本研究班班員、日本先天代謝異常学会・日本小児神経学会評議員、小児内分泌、血液等関連学会、患者会、主治医等へ配布

・「ペルオキシソーム病ハンドブック」800部

本研究班班員、日本先天代謝異常学会セミナー（400部）、関連学会、主治医等へ配布  
施策への反映:24年度保険収載改訂にて先天代謝異常学会を通じ、脂肪酸分析の保険収載に寄与した。

副腎白質ジストロフィー患者会(ALDの未来を考える会)への貢献:  
勉強会講師、患者相談、ニュースレター作成、ハンドブックの配布

ペルオキシソーム病の国内患者遺伝子診断数  
(平成22年~25年11月)

ペルオキシソーム形成異常症患者 : 11例

副腎白質ジストロフィー男性患者 : 62例

女性保因者 : 54例

ペルオキシソーム病の国外患者診断数

(平成22年~25年11月)

サウジアラビア : 11例 (総数22例)

ベトナム : 20例

マレーシア : 4例

## 原著論文(英文)

- 1) Vu Chi Dung, Nobuyuki Shimozawa, Nguyen Ngoc Khanh, et al. Mutations of ABCD1 gene and phenotype of Vietnamese patients with X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD). International Journal of Pediatric Endocrinology Suppl 1: 127, 2013.
- 2) Ohba C, Osaka H, Shimozawa N, et al. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. Neurogenetics 14: 225-32, 2013.
- 3) Hama K, Nagai T, Shimozawa N, et al. Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome. Lipids 48: 1253-1267, 2013.
- 4) Shuji Matsui, Masuko Funahashia,

- Nobuyuki Shimozawa, et al. Newly identified milder phenotype of peroxisome biogenesis disorder caused by mutated PEX3 gene. *Brain Dev*; 35: 842-8, 2013.
- 5) Yumi Mizuno, Yuichi Ninomiya, Nobuyuki Shimozawa, et al. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLOS Genetics* 9 :e1003286, 2013.
- 6) Masashi Morita, Junpei Kobayashi, Nobuyuki Shimozawa, et al. A novel double mutation in the ABCD1 gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J Inher Metab Dis*, Rep 10: 95-102, 2013.
- 7) Iwasa M, Yamagata T, Shimozawa N et al. Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: Report of an autopsy case. *Neuropathology* 33: 292-8, 2013.
- 8) Noriyuki Kanzawa, Nobuyuki Shimozawa, Ronald J.A. Wanders, et al. Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Lipid Res* 53: 653-63, 2012
- 9) Mizumoto H, Akashi R, Shimozawa N, et al. Mild case of D-bifunctional protein deficiency associated with novel gene mutations. *Pediatr Int* 54: 303-4, 2012.
- 10) Nobuyuki Shimozawa, Ayako Honda, Naomi Kajiwara, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: Diagnostic and follow-up system in Japan *J Hum Genet* 56: 106-109, 2011.
- 11) Nobuyuki Shimozawa. Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases *Brain Dev* 33: 770-776, 2011.
- 12) Kozawa S, Honda A, Shimozawa N, et al. Induction of peroxisomal lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *Mol Med Report* 4: 1157-1162, 2011.
- 13) Shaheen R, Al-Dirbashi OY, Shimozawa N, et al. Clinical, biochemical and molecular characterization of peroxisomal diseases in Arabs. *Clin Genet* 79: 60-70, 2011
- 14) Matsukawa T, Asheuer M, Shimozawa N, 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.
- 15) Masashi Morita, Nobuyuki Shimozawa, Yoshinori Kashiwayama, et al. BC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy *Current Drug Targets* 12: 694-706, 2011.
- 16) Miyoshi Y, Sakai N, Shimozawa N, et al. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocr J*.57: 965-972, 2010.

#### 診療ハンドブック

- 1) 下澤伸行：ペルオキシソーム病ハンドブック 2013 -全てのペルオキシソーム病患者の診断治療を目指して- 日本臨床社 大阪 2013年6月
- 2) 下澤伸行：監修、副腎白質ジストロフィー診療ハンドブック 2013 作成委員会：編集 副腎白

質ジストロフィー診療ハンドブック 2013 -  
ALD 患者を支えている関係者の皆様へ  
協力：日本先天代謝異常学会  
厚生労働省難治性疾患克服事業「ライソ  
ゾーム病(ファブリ病を含む)に関する  
調査研究」  
西濃印刷 岐阜 2013年9月

その他の論文(和文)

- 1) 下澤伸行 Zellweger spectrum 先天代謝異常ハンドブック pp248-249. 中山書店. 東京. 2013年
- 2) 下澤伸行 rhizomelic chondrodysplasia punctate (RCDP) type 1 先天代謝異常ハンドブック pp250-251. 中山書店. 東京. 2013年
- 3) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 先天代謝異常ハンドブック pp252-253. 中山書店. 東京. 2013年
- 4) 下澤伸行 ペルオキシソーム 酸化酵素欠損症 先天代謝異常ハンドブック pp254-256. 中山書店. 東京. 2013年
- 5) 下澤伸行 Refsum 病、rhizomelic chondrodysplasia punctate (RCDP) type 2・3 先天代謝異常ハンドブック pp257-259. 中山書店. 東京. 2013年
- 6) 塩田睦記、舟塚 真、下澤伸行、他 極長鎖脂肪酸の反復検査で診断し得た D-bifunctional protein 欠損症の1例 東京女子医科大学雑誌 83: E103-106, 2013年
- 7) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 小児科診療 76(1) 35-43. 2013年
- 8) 下澤伸行 ペルオキシソーム代謝異常症 内分泌・糖尿病・代謝内科 34(3) 198-203. 2012年
- 9) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 Brain Medical 24(3) 261-270. 2012年
- 10) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィーの診療アップデート 小児内科 44 (10) 1667-1672.

2012年

- 11) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 (Zellweger 症候群, 原発性高シュウ酸尿症1型)別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No17 腎臓症候群(第2版)369-373. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 12) 鈴木康之、下澤伸行 副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植法 Annual Review 神経 2012. 241-245. 中外医学社. 東京. 2012年
- 13) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 今日の小児治療指針 第15版 大関武彦、古川 漸、横田俊一郎、水口 雅編. pp212-213 医学書院、東京、2012年
- 14) 下澤伸行 ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー) 最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針 pp299-302. 中山書店、東京、2012年
- 15) 下澤伸行 ペルオキシソーム病:概論 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp389-397. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 16) 下澤伸行 ツェルウェガー (Zellweger) 症候群 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp398-404. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 17) 下澤伸行 新生児型副腎白質ジストロフィー 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp405-408. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 18) 下澤伸行 乳児型レフサム病 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp409-413. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 19) 下澤伸行 Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) type 1 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp414-417. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 20) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 別冊日本

- 臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp418-427. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 21) 下澤伸行 アシル CoA オキシダーゼ (AOX) 欠損症 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp428-432. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 22) 下澤伸行 二頭酵素 (D-bifunctional protein: DBP) 欠損症 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp433-438. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 23) 下澤伸行 Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) type 2, RCDP type 3 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp439-442. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 24) 下澤伸行 レフサム病 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp443-446. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 25) 下澤伸行 アカタラセミア 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp447-449. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 26) 下澤伸行 新たに分類されたペルオキシソーム病 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No20 先天代謝異常症候群(第2版)下 pp454-455. 日本臨床社. 東京. 2012年
- 27) 下澤伸行 脳肝腎症候群 (ツェルウェーガー症候群) 症候群ハンドブック pp126-127 中山書店. 東京. 2011年
- 28) 下澤伸行 Zellweger 症候群 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編. Pp146-148. 診断と治療社. 東京. 2011年
- 29) 鈴木康之、小関道夫、下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編. Pp149-151. 診断と治療社. 東京. 2011年
- 30) 下澤伸行 RCDP type1 先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance 日本先天代謝異常学会編. Pp152-153. 診断と治療社. 東京. 2011年
- 31) 三善陽子、酒井規夫、池田佳世、長谷川泰浩、橘真紀子、清原由起、山田寛之、近藤宏樹、濱田悠介、木村志保子、里 龍晴、峰 淳史、神尾範子。鈴木保宏、塩見正司、太田秀明、下澤伸行、大園恵一 副腎白質ジストロフィーの日本人男児 11 例に置ける副腎機能解析 日本内分泌学会雑誌 87 suppl 83-85. 2011年
- 32) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 (副腎白質ジストロフィー、Zellweger 症候群) 小児科診療 2010 増刊号、小児の治療指針 515-517, 2010年
- 33) 下澤伸行 ペルオキシソーム病を見逃していませんか? 小児内科 42 (7) 1167-1173, 2010年
- 34) 鈴木康之、下澤伸行 日本先天代謝異常学会学会賞受賞論文「ペルオキシソーム病との 30年:二人三脚の旅」日本先天代謝異常学会雑誌 26 (1) 2-12, 2010年
- 35) 下澤伸行 ペルオキシソーム形成異常症 - Zellweger 症候群- 別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ No13 肝・胆道系症候群(第2版) 515-518. 日本臨床社. 東京. 2010年
- 36) 下澤伸行 極長鎖脂肪酸測定 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常 pp112-115 中山書店. 東京. 2010年
- 37) 下澤伸行 ペルオキシソーム病 小児科臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常 pp214-217 中山書店. 東京. 2010年
- 学会発表 (招待、シンポジウム)  
国内学会シンポジウム、セミナー等
- 1) 下澤伸行: 「これだけは伝えたい診断法 ペルオキシソーム病」第9回先天代謝異常学会セミナー、品川、7月2013

- 2) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植療法の現状と問題点 シンポジウム「副腎白質ジストロフィー診療の現状と提案—診療ガイドラインの作成に向けて」第 54 回日本先天代謝異常学会、第 11 回アジア先天代謝異常学会、岐阜、11 月 2012
- 3) 下澤伸行：「ペルオキシソーム代謝異常症」第 42 回小児神経学セミナー、葉山、10 月 2012
- 4) 下澤伸行：「ペルオキシソーム病代謝異常症—ALD の克服を目指して—」第 10 回東北先天代謝異常症治療研究会、仙台、6 月 2012
- 5) 下澤伸行 副腎白質ジストロフィー 診断・治療の update シンポジウム「神経障害をきたす先天代謝異常症 診断・治療の update」第 54 回日本小児神経学会、札幌、5 月 2012
- 6) 下澤伸行：「ペルオキシソーム病の診断 ABC」第 7 回先天代謝異常学会セミナー、横浜、7 月 2011

#### 国際学会招待講演

1. Shimozawa N: Peroxisomal disorder 12th Asian and Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh. September 2013.
- 2) Shimozawa N: Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases 3rd ACIMD & 55<sup>th</sup> JSIMD. Maihama. November 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

