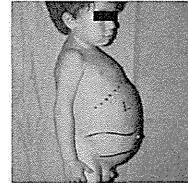
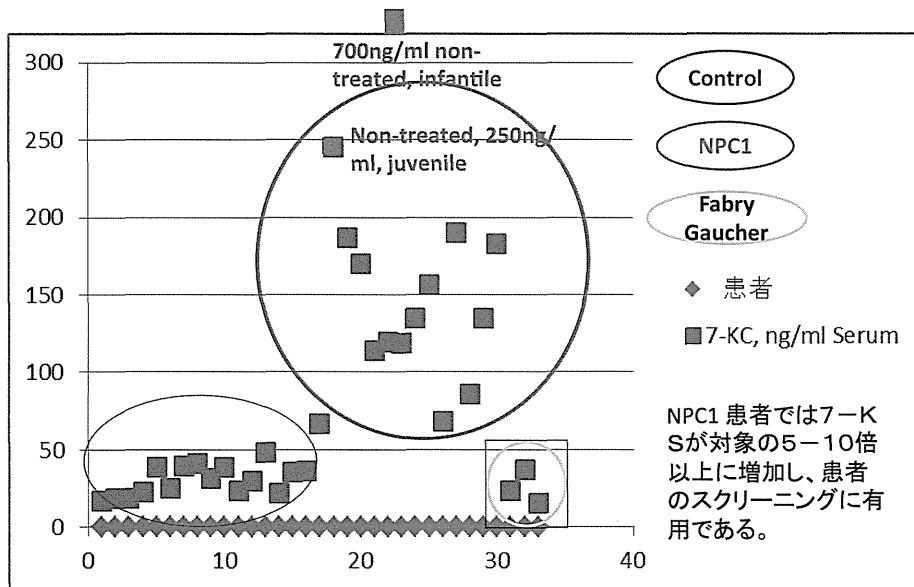


ニーマン・ピック病C型の概要

- リソソーム、後期エンドソームにコレステロールおよびスフィンゴ糖脂質（主に G_{M2} ・ G_{M3} ガングリオシド）が蓄積する非常に稀な疾患
 - 細胞内の脂質輸送異常を特徴とする
 - *NPC1*または*NPC2*遺伝子の変異による細胞内脂質の転送異常症
 - 臨床症状の多様性（胎児型→成人型）
肝脾腫、失調、構音障害、ジストニア、嚥下障害
眼球運動障害、カタプレキシー
- 診断：血清オキシステロールの測定は有用—Non Invasive
（TOF—MSにより測定する）



7-Ketocholesterol in Plasma of Patients with NPC1 (7-KS ng/ml serum)



iPS細胞を用いたライソゾーム病遺伝子治療に向けての研究 (Late onset Pompe-iPSCs)

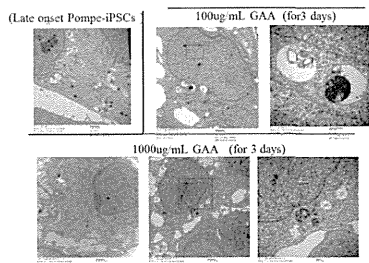
1. iPS細胞より心筋、神経細胞への分化—Pompe病、Fabry病Tay—Sacks病

2. 分化した心筋、神経細胞を用いて遺伝子治療—標的遺伝子治療

1) ベクターによる細胞別治療効率—神経細胞、心筋細胞

2) 標的遺伝子治療の手法による治療効果の検討

iPS Cells from Late Onset Type of Pompe Disease and
Treatment by Myozyme



ポンペ病iPS細胞をマイオザイムによる酵素治療した例：治療により、蓄積しているグリコーゲンは著明に減少。今後標的遺伝子治療に向けて研究を続ける。

単球/マクロファージに NADPH oxidase 活性を有した X-CGD症例

大倉有加¹⁾ 山田雅文¹⁾
小林一郎¹⁾ 栗林 太²⁾ 有賀 正¹⁾

¹⁾ 北海道大学大学院医学研究科医学部 小児科

²⁾ 川崎医科大学 生化学

要約

NADPH oxidase活性が好中球では欠損しているが特異的に単球・マクロファージに活性が残存し、非典型的経過を呈したX-CGD症例を検出した。

本症例に特異的に認められた単球・マクロファージのgp91^{phox}発現の機序は、モザイクによる可能性は否定的であり、mRNAの安定性も好中球と単球で差が認められなかった。

X-CGDにおける単球・マクロファージのNADPH oxidase残存活性の有無は、患者予後を推測する上での有用な指標となる。遺伝子治療の効果判定においても単球の評価は重要と考えられる。

マクロファージにのみgp91^{phox}発現が欠損する症例

Bustamante et al, Nat Immunol, 2011.

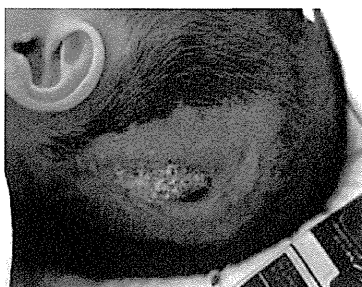
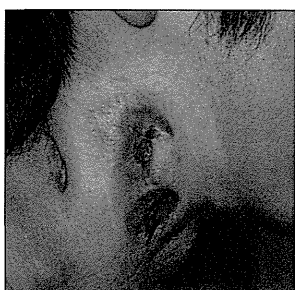
CYBB mutation	細胞	gp91 ^{phox} 発現	ROI産生	症状	機序
p.Q231P	好中球、 単球	正常	正常	細胞内寄生菌 に易感染性	Mφに局限した gp65→gp91 ^{phox} への成熟障害？
p.T178P	Mφ	欠損	欠損		

本症例：単球、マクロファージにgp91^{phox}が発現

CYBB mutation	細胞	gp91 ^{phox} 発現	ROI産生	症状	機序
p.P339H	好中球	欠損	欠損	乳児期以降 重症感染症なし 真菌感染症なし 過炎症症状なし	不明
	単球、 Mφ	正常	正常		

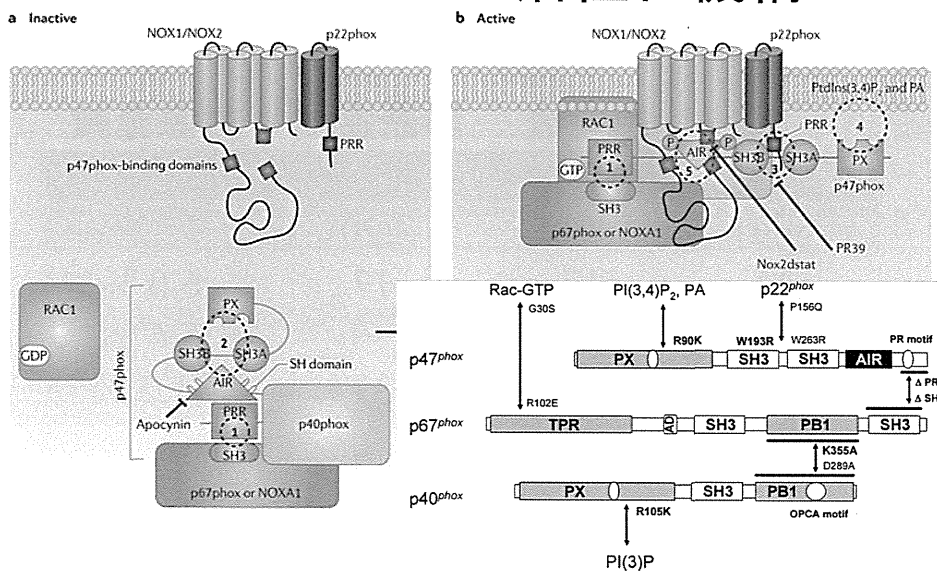
CGDの遺伝子解析について —p47phox欠損症のまとめ—

西村豊樹、布井博幸 宮崎大学小児科、
水上智之、国立熊本医療センター



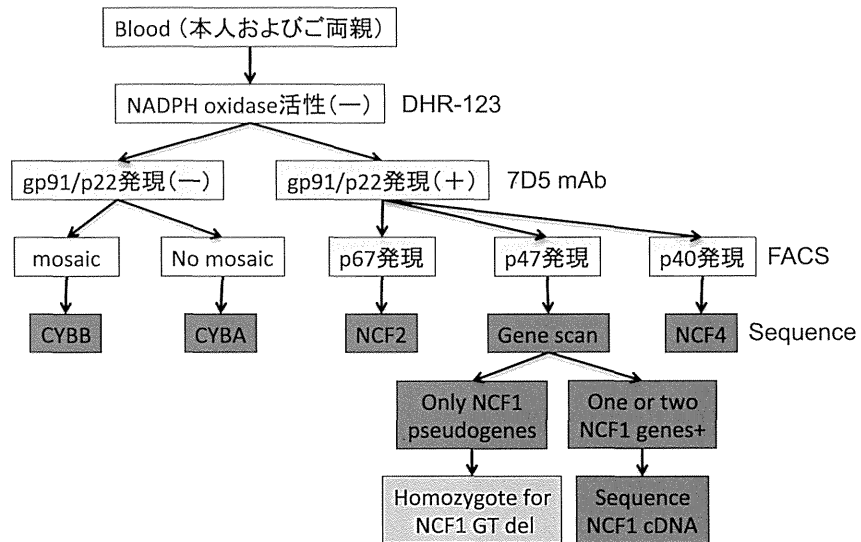
1

NADPH oxidase 活性化機構



Nature Reviews | Drug Discovery 2

CGDの遺伝子診断手順



3

H26年日本のCGD病型分類 (364名)

CGD亜型	患者数	診断症例	対象全数
gp91-	220	220	77.2%
p22-	17	17	6.0%
p47-	16	16	5.6%
p67-	32	<u>32</u>	11.2%
不明	79		

4

欧米との病型分類比較

	患者数 NIH 1)	%	患者数 日本 2)	%
gp91-	196	70.2%	220	77.2%
p22-	8	4.5%	17	6.0%
p47-	71	24.7%	16	5.6%
p67-	13	2.8%	32	11.2%
total	288		285	

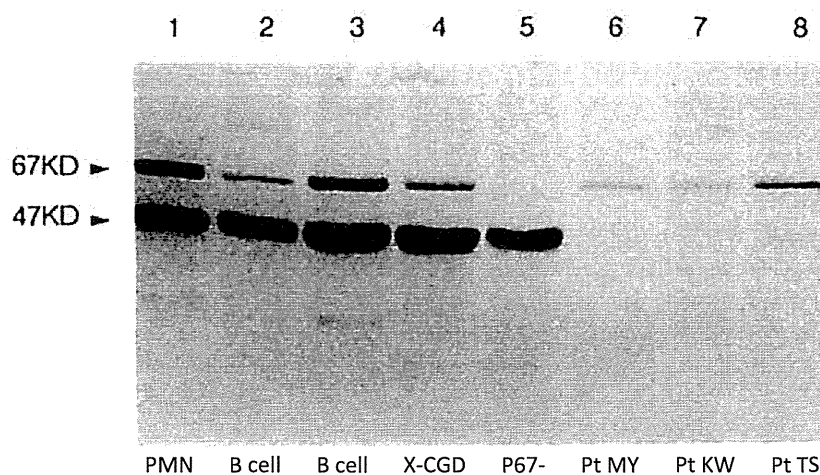
1) NIH: National Institutes of Health
N Engl J Med 363(27):2600-2610,2010

2) H26年 本邦

5

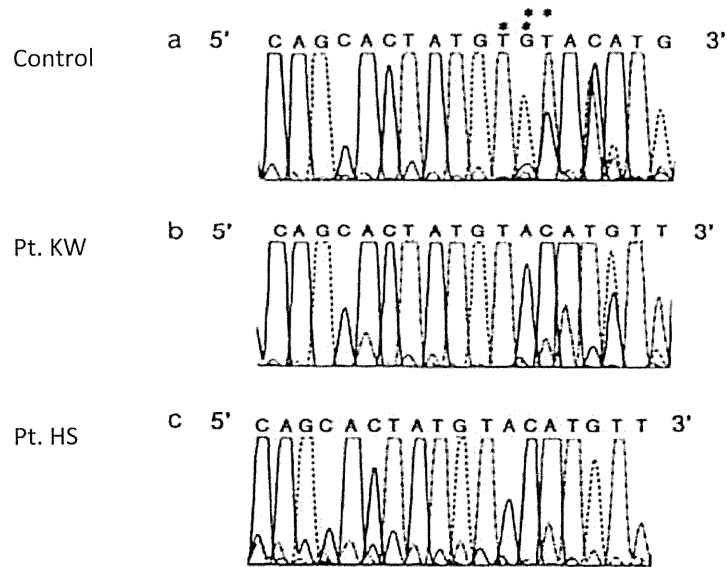
1994年に発表したp47欠損型CGD症例

HOMOLOGOUS DINUCLEOTIDE (GTORTO) DELETION IN JAPANESE PATIENTS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE WITH p47-PHOX DEFICIENCY. BBRC 199(3),1372-1377,1994



6

Sequence analysis of the p47-phox cDNA



7

PIDJ患者でDNAsequenceで決まった症例

NCF2 sequence (正常)

NCF2 - neutrophil cytosolic factor 2

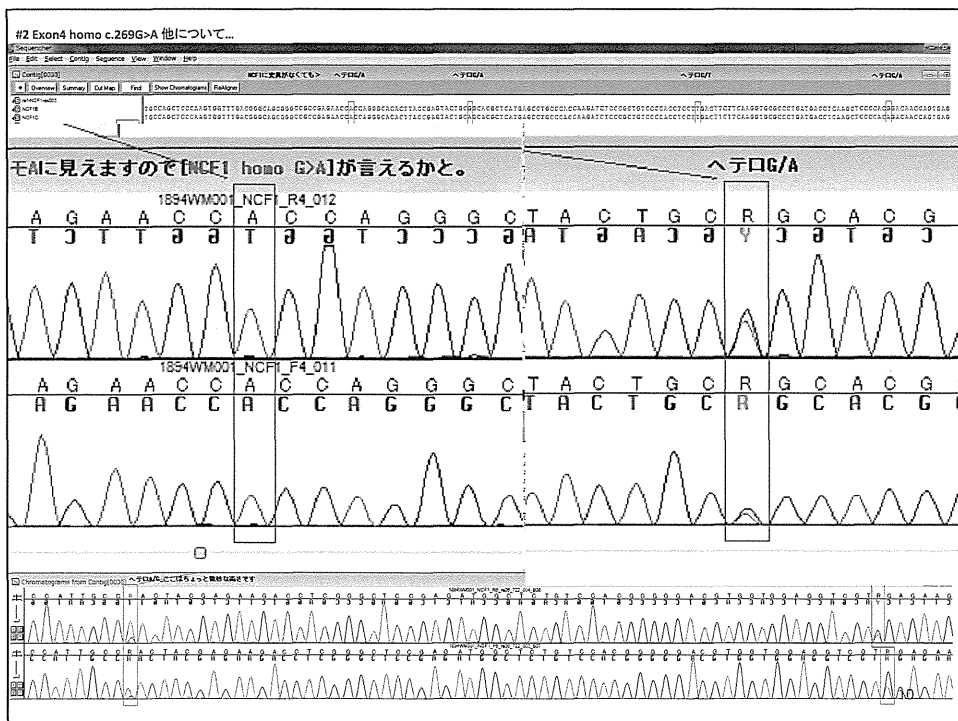
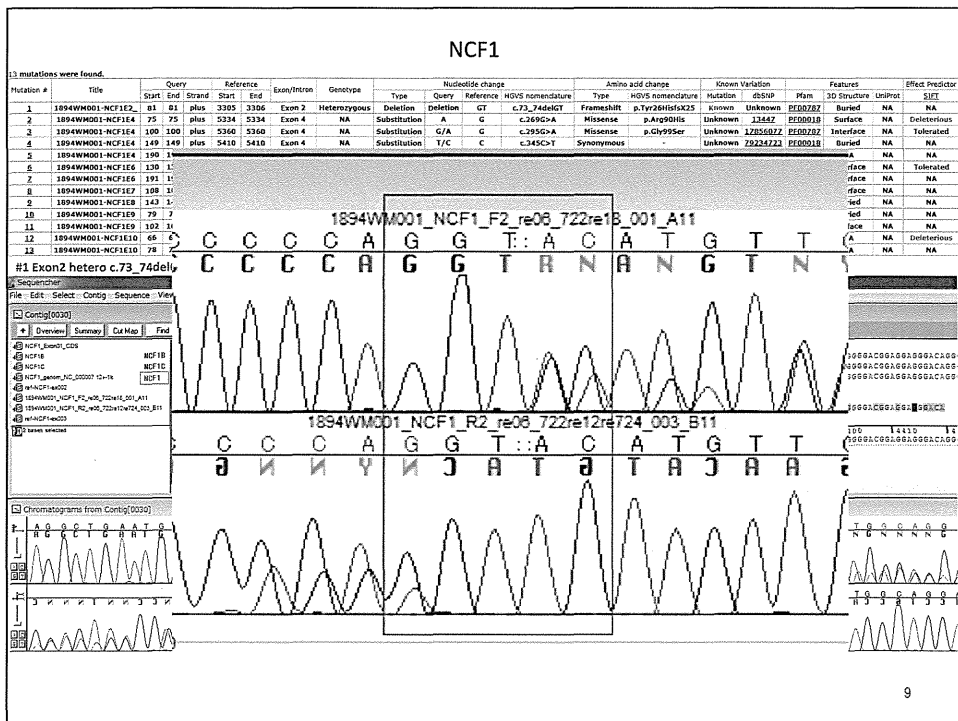
13 sequence(s) found in your query.

Sequence Mapping Status

Sequence #	Sequence Title	Sequence Type	Query Length	Mapped Region	Containing Unread Nucleotide	Mapping Status	# of Mutations Found
01	1894WM001-NCF2E2	Gene	298	1-298	0	OK	0
02	1894WM001-NCF2E3	Gene	245	1-245	0	OK	0
03	1894WM001-NCF2E4	Gene	257	1-257	0	OK	0
04	1894WM001-NCF2E5	Gene	322	1-322	0	OK	0
05	1894WM001-NCF2E6	Gene	254	1-254	0	OK	1
06	1894WM001-NCF2E7	Gene	225	1-225	0	OK	0
07	1894WM001-NCF2E8	Gene	187	1-187	0	OK	0
08	1894WM001-NCF2E9-10	Gene	560	1-560	0	OK	0
09	1894WM001-NCF2E11	Gene	237	1-237	0	OK	1
10	1894WM001-NCF2E12	Gene	150	1-150	0	OK	0
11	1894WM001-NCF2E13-14	Gene	531	1-531	0	OK	0
12	1894WM001-NCF2E15	Gene	330	1-330	0	OK	0
13	1894WM001-NCF2E16a	Gene	245	1-245	0	OK	0

[Browse with Known Mutations](#) | [Data Download](#)

on/Intron	Genotype	Nucleotide change				Amino acid change		Known Variation		Features			Effect Predictor
		Type	Query	Reference	HCVS nomenclature	Type	HCVS nomenclature	Mutation	dbSNP	Pfam	3D Structure	UniProt	
Exon 5	NA	Substitution	G/A	A	c.542A>G	Missense	p.Lys181Arg	Unknown	2274064	NA	Surface	NA	Tolerated
Intron	NA	Substitution	G/A	G	c.925-21G>A	-	-	Unknown	2296164	NA	NA	NA	NA

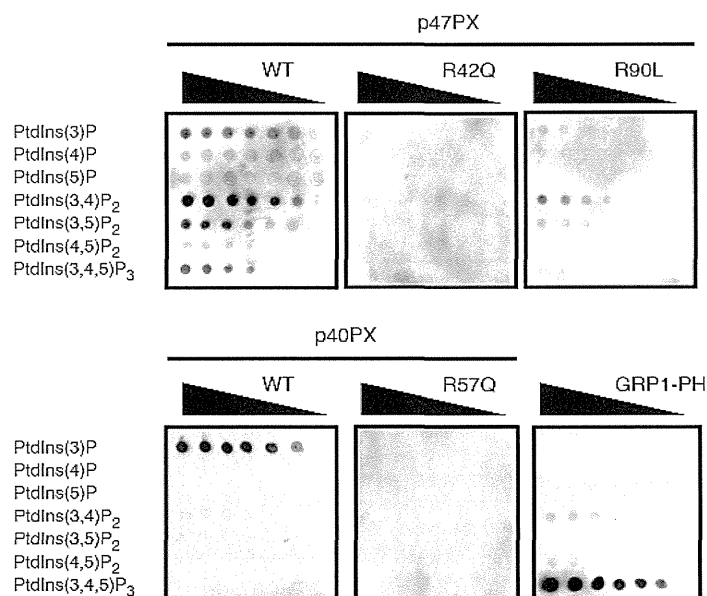


日本のNCF1欠損疑い症例の遺伝子解析結果

	7374del IGT	230-236 C>A	269 G>A	295 G>A	345 C>T	387 G>A	496 A>G	558 A>G	621 G>A	765 C>A	825 G>T	849 A>G	923 C>T	936 G>T	
	Tyr26 Hisfs	-	Arg90 His	Gly99 Ser	Leu115 =	Thr129 =	Asn166 Asp	Val186 =	Ala207 =	Val255 =	Phe275 =	Ser283 =	pAla308 Val	His312 =	
Mutation type	Deletion	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	
Alleles	GGT/G	A/C	G/A	G/A	T/C	G/A	G/A	G/A	G/A	A/C	T/C	G/A	T/C	C/T	
GMAF	---	-99	-99	-99	---	---	---	---	---	-99	---	---	---	---	
1894WM001	301	GGT/G	C	A/A	G/A	C	G/A	A/G	A/G	G/A	A/C	T/C	A	T/C	C/T
2009OY001	288	GGT/G	C	G/A	G/A	C/T	G/A	A	A/G	G/A	A/C	T/C	A/G	T/C	C/T
2013IH003	358	GGT/G	A/C	A/A	G/A	C/T	G/A	A	A/G	G/A	A/C	T/C	A/G	T/C	C/T
2009KN001	pp91-	GGT/G	C	G/A	G/A	C/T	G/A	A/G	A/G	G/A	C	T/C	A/G	T/C	C/T
2010OK002	298	GGT/G	C	G/A	G/A	C/T	G/A	A/G	A/G	G/A	C	T/C	A/G	C	C/T
2010IR001	288	GGT/G	C	G/A	A	C/T	G	A/G	A/G	G/A	C	T/C	A/G	C	C/T
1996UT001	p67-	GGT/G	C	G/A	G/A	C/T	G/A	A/G	A/G	G/A	C	T/C	A/G	C	C/T
2008TM002	p67-	GGT/G	C	G/A	G/A	C/T		A/G		G/A		T/C	A/G		C/T
ref. (NCF1)		GT		G	G	C	G	A	A						
Pseudo (NCF1B)		---		A	G	T	G	A	G						
Pseudo (NCF1C)		---		A	A	T	A	G	G						

11

Phosphoinositide-binding properties of PX domains



12

Lipid-binding sites in the p47phox PX domain

Sumimoto H., FEBS Journal 275 (2008) 3249–3277.

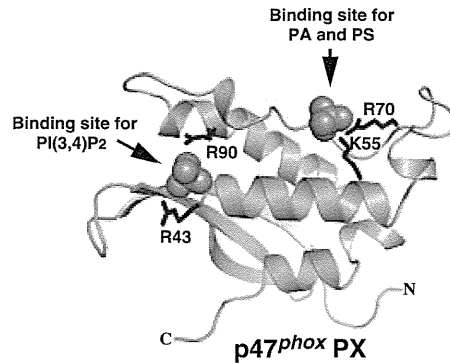


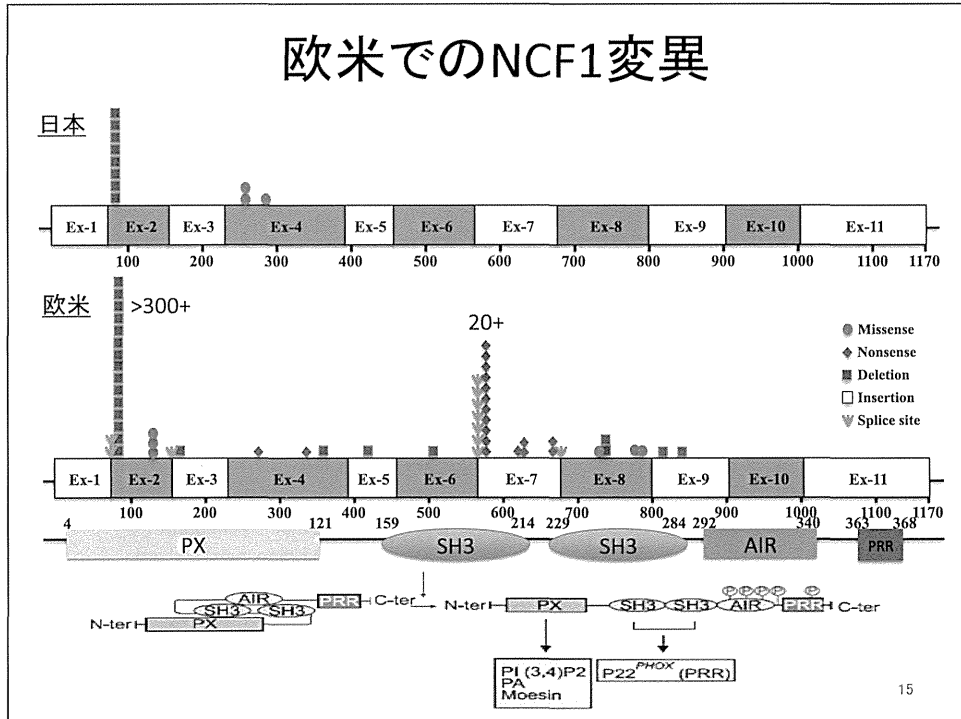
Fig. 12. Lipid-binding sites in the p47^{phox} PX domain. Residues in the phosphoinositide-binding and second anion-binding pockets are shown in blue. The sulfates bound in the two pockets (in a crystal of the p47^{phox} PX domain [145]) are colored magenta. The figure was drawn using PYMOL software (<http://www.pymol.org>) and the Protein Data Bank coordinates 1O7K.

13

日本のp47 def.患者のNCF1変異まとめ

Pt. #	66G>C	73G>A	73_74del GT	230-23 6C>A	269G>A	295G> A	345C>T	387G>A	468C>T	496A>G	558A>G	621G>A	785C>A	825C>T	849A>G	923C>T	936C>T
	Glu22His	Val25Met	Tyr28His	-	Arg90His	Gly99	Leu115	Thr129	Ile150I	Asn116	Val186=	Ala207=	Val255=	=	=	pAla30	His312=
	sub.	sub.	Deletion	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	sub.	sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.	Sub.
	G/C	G/A	GGT/G	A/C	G/A	G/A	T/C	G/A	C/T	G/A	G/A	G/A	A/C	T/C	G/A	T/C	T/C
65																	
66				G/G													
79				G/G													
95				G/G													
106				G/G													
126																	
146																	
181				G/G													
188																	
208																	
218																	
325																	
305				delGT-williams													
301				G/G													
301	X	X	GGT/G	X	A/A	G/A	X	G/A	X	G/A	G/A	G/A	A/G	T/C	X	T/C	T/C
358	X	X	GGT/G	A/C	A/A	G/A	T/C	G/A	X	X	G/A	G/A	A/C	T/C	G/A	T/C	T/C
288	X	X	GGT/G	X	G/A	A/A	T/C	X	X	G/A	G/A	G/A	X	T/C	G/A	X	T/C
NCF1			GT		G	G	C	G		A	A			T		C	
NCF1B			—		A	G	T	G		A	G			T		C	
NCF1C			—		A	A	T	A		G	G			T		C	

欧米でのNCF1変異



欧米との病型分類比較

	患者数 NIH 1)	%	患者数 日本 2)	%
gp91-	196	70.2%	220	77.2%
p22-	8	4.5%	17	6.0%
p47-	71	24.7%	16	5.6%
p67-	13	2.8%	32	11.2%
total	288		285	

1) NIH: National Institutes of Health
N Engl J Med 363(27):2600-2610,2010

2) H26年 本邦

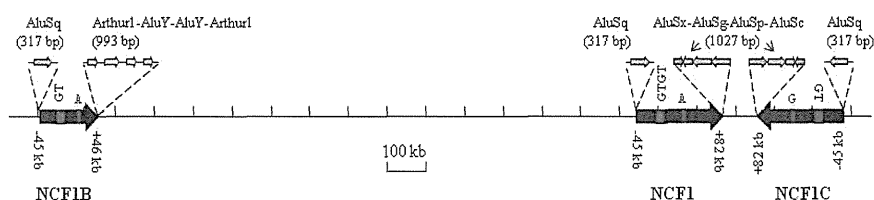
16

考察

1. 日本における16名のp47-phox欠損型慢性肉芽腫症患者の遺伝子解析について検討した。
2. Del GT変異が7名と、William Sで片アレルが欠失しGGT/G欠失があった症例が1例であった。
3. Missense変異では269G>A、Arg90Hisが2名と295G>A、Gly99Serが1名だった。
4. まだ変異の同定ができていない症例が5名であった。
5. 日本ではp47-CGD患者が欧米に比べて約1/4であり、遺伝的な背景をはっきりさせるためにも、より詳細な遺伝子検索が必要である。
6. NCF1にはmRNAに読まれていたり、Pseudogeneが2個あり、true geneとの変異がexonでは3箇所しか無く、変異の同定が難しく、Gene scanやMLPA法によるpseudogeneとのcross overの確認などが必要である。

17

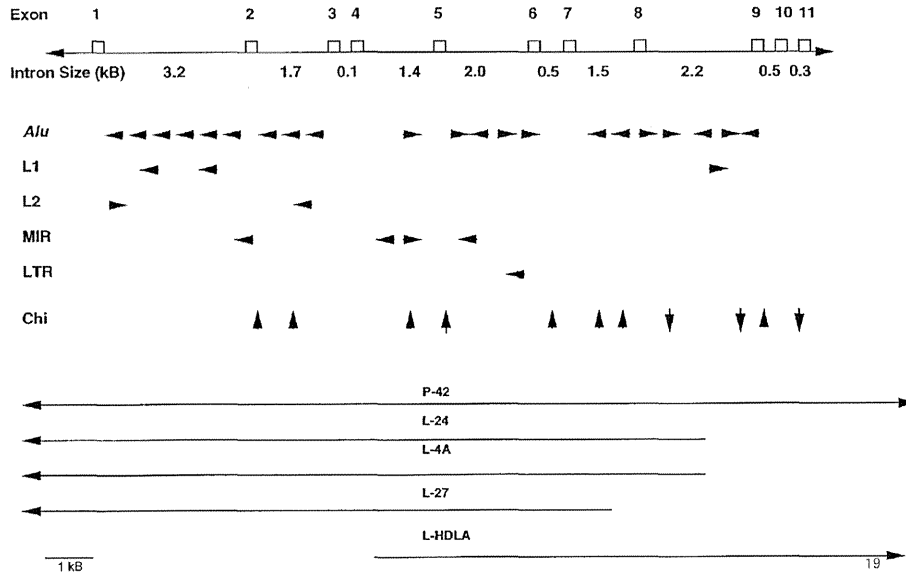
Genomic organization of the NCF1 gene locus at 7q11.23 in the human genome.



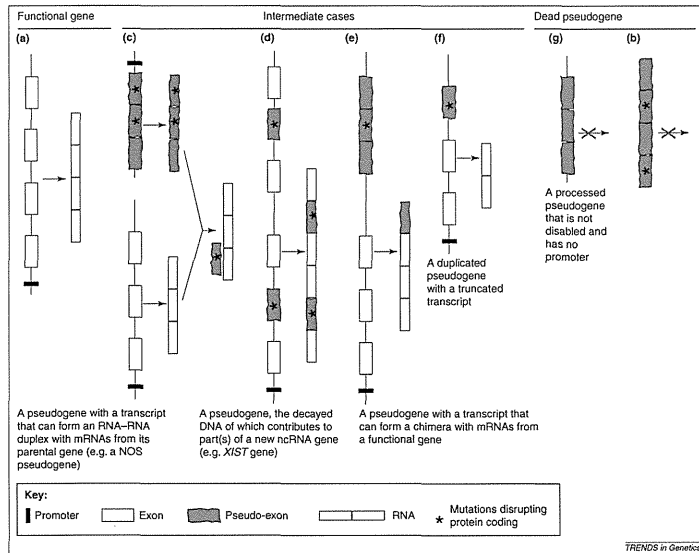
These duplicons share a 106-kb sequence with >99.5% similarities spanning from -45 kb at 5'-end to +46 kb at 3'-end regarding the NCF1/NCF1Ψ coding region. NCF1 and NCF1B duplicons share an additional 3'-flanking sequence until +82 kb. The transposons at the boundaries of these duplicons are indicated

Brunson et al. BMC Genetics 2010, 11:13
<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/13>

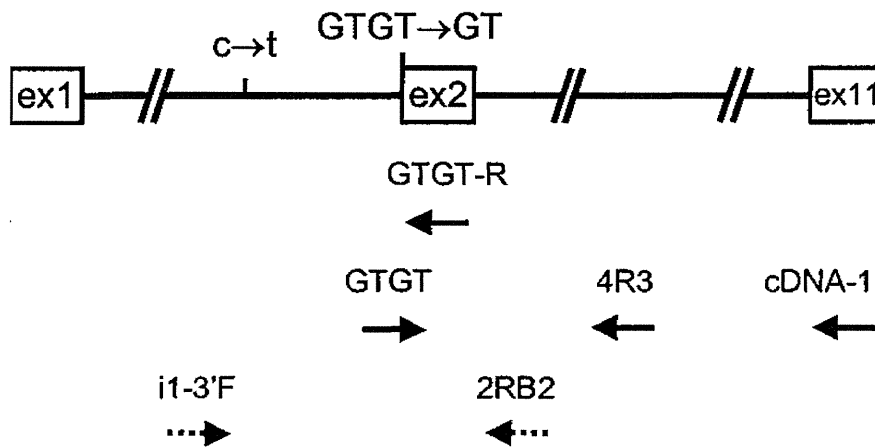
P47phox gene structure



PseudogenはNCVが起こり、その生物学的な意味がどうなるかの過程である

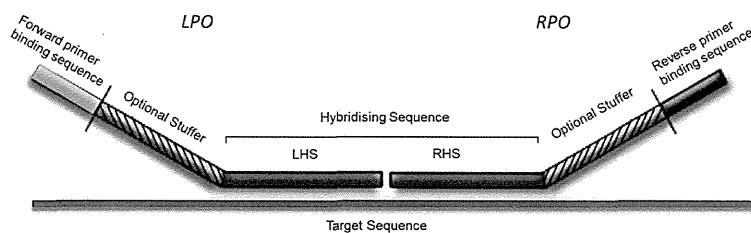


Location of oligonucleotide primers used for allele-specific amplification of NCF-1.



Blood. 2001;97:305-311)

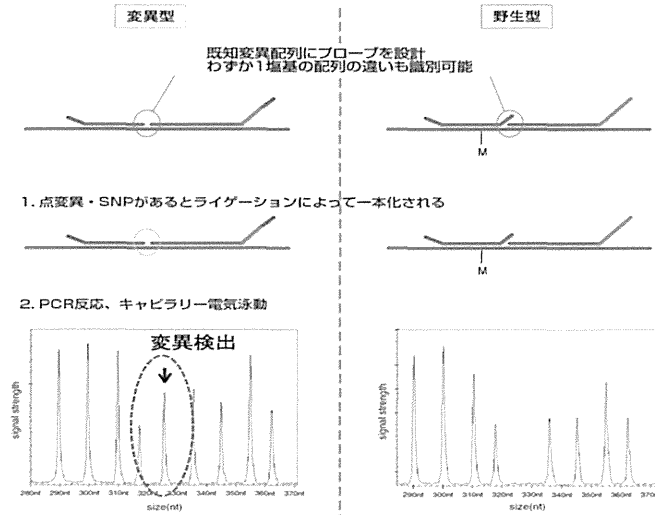
MLPAプローブの構造



- Left Probe Oligonucleotide(LPO)とRight Probe Oligonucleotide (RPO)で構成される。
- Stuffer sequence: 長さ調節用のヒト以外の配列。ただし、カスタムプローブでは必ずしも必要ではない。
- Left Hybridizing Sequence (LHS) :LPOのターゲット配列認識配列。
- Right Hybridizing Sequence (RHS) :RPOのターゲット配列認識配列。
- Forward PCR primer(GGGTTCCTAAGGGTTGGA): LPOの5'末端
- Reverse PCR Primer (TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC): RPOの3'末端

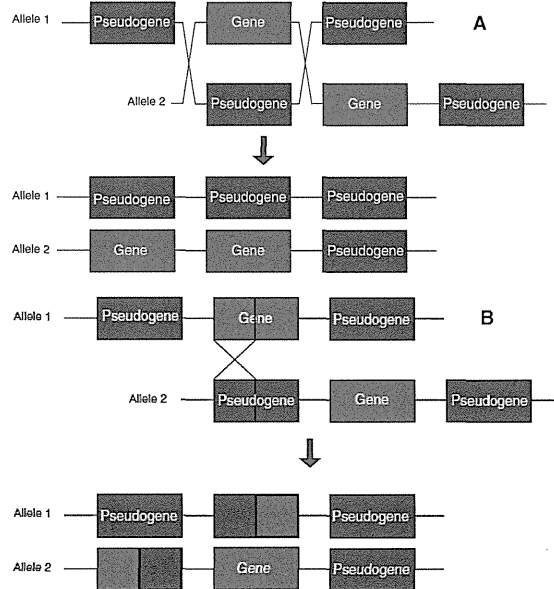
22

既知の変異・SNPsの検出



MLPA法によるNCF1解析

Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013) 1662–1672



MLPA results for healthy donors.

Control number	DNA number	Intron 1	Exon 2	Exon 4	Exon 6	Exon 7	Intron 10
1	255	0.71	1.18	1.08	0.99	1.00	1.04
2	1133	1.02	0.99	1.75	1.02	0.99	1.07
3	2403	1.01	1.00	0.99	0.97	0.99	0.98
4	2421	1.01	1.30	1.28	0.98	0.94	0.94
5	2551	0.99	0.93	1.08	1.23	1.08	1.08
6	2622	1.00	0.96	0.90	1.00	0.92	0.91
7	2622	1.05	1.01	0.96	0.98	0.97	0.93
8	2637	1.00	1.02	0.98	0.97	0.98	1.01
9	2997	0.98	0.97	1.00	0.99	1.00	1.06
10	3075	0.99	0.96	1.01	0.95	0.97	0.98
11	3107	1.08	1.01	0.96	0.98	0.97	0.99
12	3193	0.97	0.95	0.52	0.97	0.99	0.93
13	3407	1.00	0.97	0.50	1.04	0.98	0.99
14	3682	0.98	1.08	1.00	1.00	1.05	0.98
15	3734	0.99	1.10	1.07	1.00	1.21	1.13
16	4007	1.16	0.94	1.01	1.09	0.98	0.96
17	4472	0.96	0.98	0.66	1.23	1.10	1.08
18	4664	0.76	1.02	0.96	0.96	0.98	1.02
19	4893	0.98	1.02	1.27	1.43	1.35	1.12
20	4902	1.00	1.01	1.04	1.05	1.03	0.55
21	5116	0.99	0.97	0.99	0.97	0.93	0.94
22	5304	0.86	1.09	1.02	1.07	1.08	1.03
23	5335	1.03	1.00	1.00	0.99	0.98	0.97
24	5456	0.73	0.89	0.74	1.27	1.17	0.94
25	5498	1.03	0.99	0.95	0.98	0.98	0.98
26	5717	0.98	1.03	1.03	1.24	1.06	1.01
27	5822	1.01	1.00	1.00	1.04	0.99	0.99
28	5911	0.98	0.94	0.89	0.97	0.97	0.93
29	6828	1.01	0.98	0.97	1.05	1.03	0.93
30	7027	0.96	1.00	0.96	1.03	0.99	0.99
31	7069	0.88	0.91	0.94	0.95	0.96	0.99
32	7273	0.98	1.11	0.96	0.95	1.00	0.99
33	7367	1.00	0.93	0.57	1.00	1.06	1.05
34	7711	1.00	0.95	0.98	1.04	0.98	0.56
35	7903	1.50	1.47	1.46	0.88	0.94	0.87
36	8019	1.42	1.55	1.09	0.98	0.91	0.91
37	8033	0.97	0.89	0.96	0.97	0.99	0.98
38	8082	1.01	0.93	0.97	0.97	0.90	1.03
39	8118	1.08	1.00	1.00	1.07	1.02	1.04
40	8121	1.01	0.90	0.98	0.95	0.95	0.92
41	8289	1.05	0.96	0.98	0.96	0.97	0.96
42	8480	0.84	1.05	0.99	1.02	0.98	1.01
43	8498	1.00	0.97	1.39	0.98	1.07	0.99
44	8578	0.97	0.94	1.02	1.05	0.93	0.95
45	8692	1.42	1.30	1.41	1.00	0.99	0.96
46	8757	1.01	1.01	0.92	0.99	0.93	1.21
47	8769	0.97	1.01	0.95	0.96	0.95	0.96
48	9428	1.03	0.92	0.80	0.92	0.89	0.98
49	9498	1.05	0.98	0.99	1.07	1.04	1.02

25

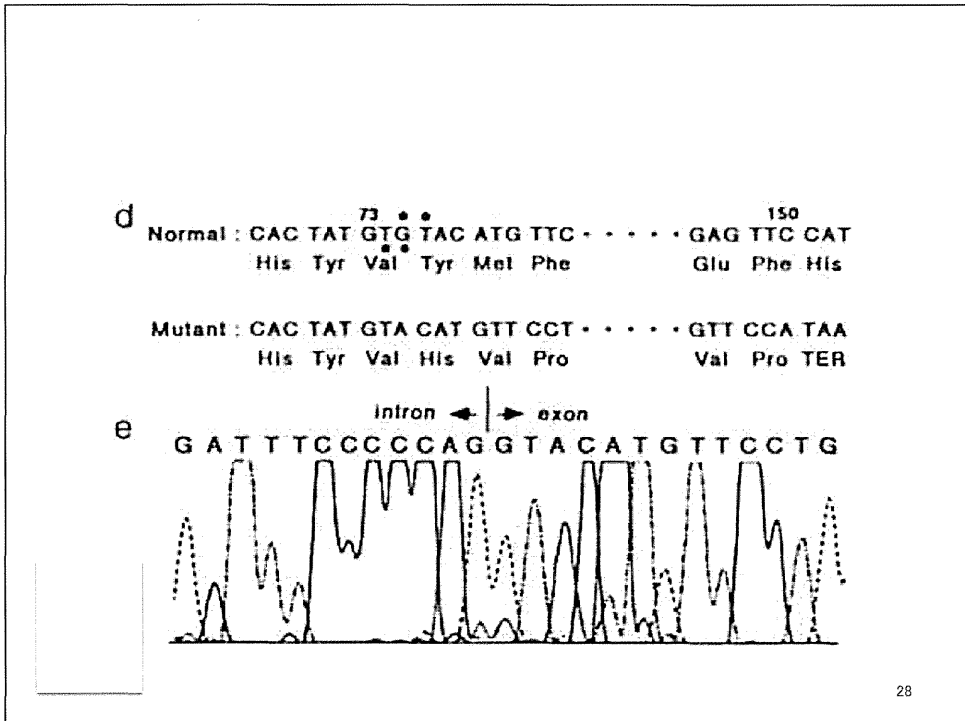
Crossover types in all studied CGD-NCF1 patients with homozygous ΔGT mutation (patients 1-53) and compound heterozygous ΔGT mutations (patients 54-61).

Patient number	Family number	DNA number	Intron 1	Exon 2	Exon 4	Exon 6	Exon 7	Intron 10
1	1	361	0.00	0.00	0.00	0.08	0.06	0.00
2	2	2165	0.00	0.23	0.00	0.00	0.06	0.00
3	3	1462	0.00	0.08	0.00	0.07	0.08	0.00
4	4	497	0.00	0.00	0.06	0.06	0.09	0.00
5	5	494	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	6	880	0.00	0.00	0.00	0.08	0.07	0.00
7	7	1941	0.00	0.00	0.11	0.09	0.09	0.00
8	8	2333	0.00	0.22	0.10	0.09	0.08	0.00
9	9	1626	0.00	0.00	0.00	0.15	0.11	0.00
10	10	2162	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	10	2167	0.00	0.00	0.14	0.11	0.15	0.00
12	11	91	0.00	0.00	0.14	0.12	0.08	0.00
13	12	498	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00
14	12	131	0.00	0.00	0.12	0.10	0.14	0.00
15	13	289	0.00	0.00	0.19	0.08	0.09	0.00
16	13	101	0.00	0.00	0.00	0.09	0.07	0.00
17	14	140	0.00	0.00	0.00	0.11	0.08	0.00
18	14	19	0.00	0.00	0.00	0.12	0.10	0.00
19	15	2016	0.00	0.16	0.10	0.00	0.00	0.00
20	15	2015	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00
21	16	1482	0.00	0.00	0.08	0.09	0.11	0.00
22	17	2364	0.10	0.18	0.08	0.05	0.04	0.00
23	17	2631	0.00	0.20	0.00	0.14	0.18	0.00
24	17	2663	0.00	0.12	0.10	0.16	0.11	0.00
25	18	1434	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00
26	19	2335	0.00	0.00	0.10	0.09	0.06	0.00
27	19	2336	0.14	0.00	0.00	0.14	0.07	0.00
28	20	2430	0.17	0.00	0.15	0.19	0.14	0.00
29	20	2431	0.13	0.23	0.00	0.21	0.14	0.00
30	21	1611	0.00	0.15	0.00	0.05	0.09	0.58
31	22	1348	0.00	0.00	0.00	0.12	0.08	0.53
32	22	986	0.00	0.00	0.00	0.19	0.14	0.68
33	23	1615	0.00	0.00	0.00	0.97	1.04	0.98
34	23	1570	0.00	0.16	0.00	1.05	0.98	1.04
35	24	2405	0.00	0.00	0.00	1.35	0.96	1.06
36	25	2283	0.00	0.24	0.00	0.96	1.00	0.95
37	26	2025	1.08	0.00	0.00	0.98	0.97	0.92
38	27	788	0.00	0.17	0.00	1.16	1.17	1.13
39	28	141	0.00	0.00	0.00	0.40	0.47	0.48
40	29	1018	0.00	0.00	0.00	1.10	1.08	0.00
41	30	1507	0.00	0.00	0.00	0.50	0.56	2.05
42	30	1642	0.00	0.00	0.00	0.50	0.64	1.22

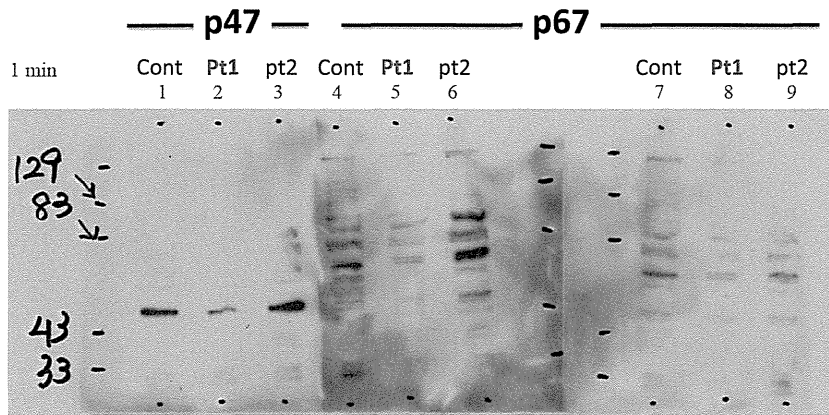
Crossover types in all studied CGD-NCF patients with homozygous Δ GT mutation (patients 1-53) and compound heterozygous Δ GT mutations (patients 54-61).

Patient number	Family number	DNA number	Intron 1	Exon 2	Exon 4	Exon 6	Exon 7	Intron 10
42	30	1642	0.00	0.00	0.00	0.50	0.64	1.22
43	31	1560	0.00	0.18	0.93	1.18	0.87	0.95
44	31	1555	0.00	0.00	1.18	1.10	1.03	1.15
45	32	2166	0.00	0.00	0.66	0.56	0.65	0.66
46	32	2199	0.00	0.00	0.62	0.53	0.59	0.55
47	33	1653	0.00	0.00	0.64	0.57	0.59	0.00
48	34	2075	0.00	0.00	1.68	0.08	0.06	0.00
49	34	2078	0.00	0.00	1.79	0.15	0.13	0.16
50	35	499	0.00	0.00	1.66	0.00	0.00	0.00
51	36	133	0.00	0.00	1.05	0.17	1.10	0.00
52	36	114	0.00	0.00	1.71	0.27	1.91	0.00
53	37	1868	0.00	0.00	1.05	0.64	0.63	0.61
54	38	100	0.87	0.69	0.73	0.69	0.78	0.78
55	39	1004	0.56	0.54	0.50	0.50	0.51	0.91
56	39	1363	0.69	0.58	0.70	0.57	0.58	0.93
57	39	585	0.59	0.57	0.55	0.59	0.62	1.01
58	40	1476	0.63	0.61	0.50	0.58	0.53	0.58
59	40	1475	0.68	0.51	0.59	0.71	0.69	0.65
60	41	1907	0.56	0.57	0.60	0.67	0.66	0.65
61	42	881	0.56	0.57	0.61	0.60	0.70	0.69
62	43	1622	0.56	0.72	0.19	0.53	0.52	0.00

27



2010IR001 vs 2008TH002
p47,p67 western(両蛋白low)



千葉 弘前
p47- p67-

2011/03/24

「国際共同治験に基づく小児希少難病に対する遺伝子・
細胞治療の実施とその支援体制の整備」研究班 班会議
平成26年1月19日
国立成育医療研究センター研究所

遺伝子治療におけるICH-GCP に 準拠したデータ管理

国立成育医療研究センター研究所
社会・臨床研究センター
瀧本 哲也

標準業務手順書(SOP)作成計画

1. 総論
 - ①SOPの作成/管理
 - ②多施設共同臨床研究支援における患者情報保護に関するガイドライン
 - ③多施設共同臨床研究支援における情報セキュリティガイドライン
 - ④データマネージメント用語集
2. データ管理
 - ①多施設共同臨床研究の症例登録に関するSOP
 - ②データ管理に関するSOP
 - ③多施設共同臨床研究のDMマニュアル
 - ④データおよび記録文書の保存、アーカイビング
3. SDVによるモニタリング
 - ①多施設共同臨床試験のモニタリングに関するSOP
 - ②多施設共同臨床試験の施設訪問モニタリング実施マニュアル
 - ③多施設共同臨床試験のモニター認定ガイドライン
4. EDC
 - ①電子的臨床情報収集システム活用に関するSOP
 - ②電子的臨床情報収集システムの運用と安全管理に関するSOP
5. 有害事象の収集と報告
 - ①遺伝子治療における有害事象報告手順
6. 監査

(Boldは作成済)