

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ライソゾーム病(ファブリ病含む)に関する調査研究班
平成 25 年度総括・分担研究年度終了報告書

平成 26(2014)年 3 月

研究代表者

衛藤 義勝

目次

はしがき

研究組織

総括研究報告書

ライソゾーム病（ファブリー病を含む）に関する調査研究

主任研究者 衛藤義勝

付1 平成25年度班会議プログラム

分担研究報告書

I. 病態把握のための調査研究

- 1) ファブリー病の腎障害に対する酵素補充療法の検討
坪井 一哉（名古屋セントラル病院ライソゾーム病センター・血液内科）
- 2) ライソゾーム病におけるミトコンドリア障害
高柳 正樹（千葉県こども病院副院長）
- 3) 小児型 Pompe 病患者 3 名における酵素補充療法の長期経過
石垣 景子（東京女子医科大学医学部小児科講師）
- 4) ライソゾーム病の新生児スクリーニングの研究
奥山 虎之（国立成育医療研究センター臨床検査部）
- 5) ライソゾーム病スクリーニング法の基礎的検討
北川 照男（公益財団法人 東京都予防医学協会理事長）
- 6) ファブリー病・ポンペ病のスクリーニング研究
遠藤 文夫（熊本大学大学院医学薬学研究部小児科学分野教授）

II. 病態解析

- 1) GBA遺伝子とパーキンソン病との関連
辻 省次（東京大学神経内科 教授）
- 2) ALDの遺伝子表現型関連
辻 省次（東京大学神経内科 教授）
- 3) ライソゾーム病の iPS 細胞の作製と病態、治療への応用に関する研究
衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）
- 4) ゴーシェ病のバイオマーカーに関する研究
櫻庭 均（明治薬科大学臨床遺伝学教授）

- 5) ムコ多糖症 II 型の中樞神経症状の病態解明に関する研究
田中あけみ (大阪市立大学大学院医学研究科准教授)
- 6) スフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発に関する研究
松田 純子 (川崎医科大学 特任教授)
- 7) 疾患特異的二糖を指標としたムコ多糖症 II 型マウスに対する ex vivo 遺伝子治療の有効性の解析
大橋 十也 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究所遺伝子治療研究部教授)
- 8) MLPA 法を用いたファブリー病ヘテロ接合の遺伝子診断
大橋 十也 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究所遺伝子治療研究部教授)
- 9) ムコ多糖症 II 型の成長曲線作成
鈴木 康之 (岐阜大学医学教育開発研究センター)
- 10) ニーマンピック病の臨床および病態に関する研究
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)
- 11) 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
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)
- 12) 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
横山 和明 (帝京大学薬学部教授)
- 13) 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
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)
- 14) ALD におけるミスセンス ABCD1 をターゲットとした治療薬の開発ならびに新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の分子病態解析
今中 常雄 (富山大学大学院医学薬学研究部 教授)
- 15) 小児 ALD 脳波における突発性徐波 ~ 未発症例の超早期診断に向けて ~
加我 牧子 (国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所)

III. 治療法開発

- 1) 新しい治療法の開発 (ケミカルシャペロン療法) 神経型ゴーシェ病の治療マーカーとしての髄液グルコシルスフィンゴシン濃度と対光反射
成田 綾 (鳥取大学医学部脳神経小児科助教)
- 2) 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
難波 栄二 (鳥取大学生命機能研究支援センター教授)
- 3) レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の開発
小林 博司 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究所遺伝子治療研究部)
- 4) クラッペ病のシャペロン療法の開発
酒井 規夫 (大阪大学大学院医学系研究科小児科学講座)
- 5) ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み
渡邊 順子 (久留米大学准教授)

研究成果一覧

付 2 第 4 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムプログラム

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

ライソゾーム病(ファブリ病含む)に関する調査研究

研究代表者 衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）

A. 研究目的

本研究はライソゾーム蓄積症（LSD）、副腎白質ジストロフィー（ALD）などが含まれるペルオキシソーム病(PD)患者の現状並びに予後、日常生活動作（ADL）、生活の質（QOL）の改善を目指すため自然歴との比較、現在の治療特に酵素補充療法の長期効果、阻害因子を解明する。又LSD, PDの病態を、iPS細胞等を用いて明らかにし、早期診断の為に新しい診断法、治療法を検討する。濾紙血を用いての新生児、ハイリスクスクリーニングによる早期診断治療、シャペロン治療、基質合成抑制治療の効果判定、ウイルスベクターあるいはZnフィンガー法など相同組換えを用いた遺伝子治療・細胞治療に関わる新規治療法の開発を進める。

LSD, PDの多くは中枢神経障害を呈し、中枢神経障害に対する酵素髄注治療、遺伝子治療による治療効果を明らかにする。同時に我が国での遺伝子治療体制を整備する。

B. 研究方法

LSD, PD患者の臨床像の把握

1. QOL, ADLの全国調査&酵素治療効果の登録システムの導入（衛藤、大橋、坪井、高柳、高橋、奥山、下澤、加我）
2. バイオマーカーの開発（櫻庭、渡邊、衛藤）
3. 造血幹細胞移植の評価、ガイドライン作成（加藤、鈴木、横山）
4. 酵素補充療法の評価、ガイドライン作成（衛藤、大橋、田中、奥山、高柳）

LSD, PD (ALD) 患者スクリーニングの開発、実施（衛藤、北川、奥山、遠藤、下澤）

LSD, PD (ALD) 患者病態の解析

（辻、衛藤、酒井、高橋、今中、下澤、松田、辻、加我、田中）

新規治療法の開発

1. ケミカルシャペロン（難波、大野）
2. 造血幹細胞移植（衛藤、田中、鈴木）
3. 遺伝子・細胞治療（島田、大橋、小林、今中、下澤）
4. 基質合成抑制治療、イソフラボン治療（大野、鈴木）
5. iPS細胞治療（衛藤、奥山、大野、下澤）
6. 抗体治療（大橋、小林、田中）

遺伝病の遺伝子治療体制の整備

（衛藤、奥山、大橋、小林、島田、下澤）

（倫理面への配慮）

スクリーニング、アンケートを行なう際は事前に各施設の倫理委員会の承認を得た上で、研究計画説明書と同意書を用意し賛同を得てから実施する。実施に当たっては検体の匿名化を施行。また動物実験は各施設の倫理委員会、遺伝子組み換え委員会、動物実験委員会の承認を得た上で倫理指針に従うこととする。

C. 研究結果

1. QOL, ADLの全国調査&酵素治療効果
ライソゾーム病患者ではファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病、ムコ多糖症 I, II, III 型を中心に評価を行い、酵素補充療法が開発され治療されている患者では著しく臨床症状が改善している。患者の6分間歩行、QOLの上昇、心機能などの改善が示された（井田、高柳、坪井、大橋、田中、大澤、渡辺）。特にQOL, ADLなどの改善が著しい疾患はゴー

シェ病、ムコ多糖症 I,II 型である。ALD では症状が出る前の時期に造血幹細胞移植を施行すれば比較的 IQ 等を含め予後の改善が期待できる。より詳細な移植効果をムコ多糖症、ALD で明らかにする(田中、加我、横山、鈴木) これらの追跡調査をより簡便にかつ正確に把握するため、オンラインによる登録システムも開発中である。

2. バイオマーカー: 櫻庭らはゴーシェ病のバイオマーカー候補として、グルコシルスフィンゴシン(Lyso-GlcCer) とグルコシルセラミド(GlcCer)を考慮し、それらの血漿中濃度の測定法を確立した。横山らは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を試みた。具体的には LC-MS/MS 法を用いてペルオキシソーム病で増減のある血清中リン脂質の網羅的定量測定系の確立を試み、三連四重極型質量分析計で定量測定に適するとされる 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ことに成功した。

3. 造血幹細胞移植では先天代謝異常、特にムコ多糖症 型に対する効果が再確認され(田中ら)、ALD その他の疾患も含めたガイドライン作成が開始されている。

4. 酵素補充療法はファブリー病における両酵素アガルシダーゼベータとアルファの比較検討、また現在承認されている疾患であるポンペ病、ムコ多糖 I, II, VI 型、ファブリー病、ゴーシェ病などの臨床効果の検討(市販後調査)が進められている。

先天代謝異常疾患のスクリーニングは現行では従来のガスリー法からタンデムマスなどの質量分析機器を用いた方法に移行しつつあり、対象疾患も大幅に拡大したが、現在酵素補充療法などの保険適応になっている治療法の存在する疾患群においては整備が十分進んでいない。これらに対し濾紙血を使用するドライスポット法を中心に早期診断目的に実施に向けて検討が為されており、ポンペ病、

ファブリー病、ムコ多糖症などにおいて成果が報告されている。

病態解析としてはゴーシェ病の原因遺伝子である GBA 遺伝子変異のキャリアーがパーキンソン病の危険因子になるという関連解析が、日本人を含め様々な人種で報告され、パーキンソン病と共通する病理学的特徴(α-synuclein の蓄積・封入体)をもつ神経変性疾患である多系統萎縮症(MSA)について、GBA 遺伝子変異との関連を辻らが検討し、明らかに有意な相関は見られないが頻度が高い傾向にあるとされた。

また高村は神経セロイドリポフスチン症の 1 つである CLN1 におけるライソゾーム酵素 Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) 遺伝子欠発現を解析し、CLN1 患者由来の繊維芽細胞において変異型 PPT1 は翻訳後糖鎖修飾を受けるものの、細胞内局在に変化(細胞膜上の脂質ラフトで働く PPT1 の生理学的機能の異常)が見られ、オートファジーやミトコンドリア機能異常も示された。

田中らはムコ多糖症 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse(IDS-KO)の脳組織について形態学的検索を行った。その結果IDS-KOの神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、このことが神経細胞障害の主たる要因となっていると推測された。加我らは脳波の周波数解析がALDの早期診断と発症部位推定に役立つ可能性を示唆した。下澤らはALDなどのペルオキシソーム病のALDの大脳症状の発症因子の解明研究として、大脳型と非大脳型間の患者リソースを用いたDNA・RNA・細胞レベルでの検討に加え、遺伝子改変マウスを用いた中枢神経症状の発症実験を進めている。またペルオキシソーム形成異常症では患者線維芽細胞よりiPS細胞の樹立に加えて、モルフォリノおよびTALENを用いたペルオキシソーム欠損モデルフィッシュの作製による病態解明を進めている。北川らはガラクトシダーゼなどのライソゾーム病の

酵素活性を測定する場合の至適反応時間を再検討し、活性測定反応時間は37℃、2時間~4時間が最も良く、従来から行われている37℃、20時間の反応時間では正しい測定値が得られない結果であり、反応時間は2~4時間の反応が良いとした。

鈴木らはムコ多糖症 VII 型の成長曲線を作成し生後6か月から3歳にかけて多くの症例が過成長を示すこと、ヘルニア（鼠径、臍）の有無と組み合わせることで、早期診断に有用であることが明らかとした。

新規治療法の開発

1. ケミカルシャペロン 鈴木、難波らはガラクトシダーゼ欠損症であるG_{M1}ガングリオシドーシスにNOEV(*N*-octyl-4-*epi*-β-valienamine)が有効であることを証明し、治験段階まで進めた。酒井らはクラッペ病に対してもNOEVが有効であることを示している。

2. 遺伝子治療 島田らはAAV（アデノウイルス随伴ウイルス）ベクターを用いてMLD（異染性白質脳症）のモデルマウスに対する遺伝子治療（新生児への静脈注射、中枢神経系への直接注射）にて効果をあげている。小林らはクラッペ病、ムコ多糖症 VII 型マウスに対して主に第二世代レンチウイルスベクターを用いて新生児マウスへの静脈注射による遺伝子治療に取り組み、これらの疾患においてそれぞれ中枢神経系での発現、寿命の延長などが確認されている。クラッペ病では基質合成阻害剤、コドン最適化遺伝子の組み込みなどの併用により相乗効果が確認されている。更に Zinc Finger を用いてモデルマウス由来の細胞株において、相同組換えにより欠損酵素 GALC の有意な発現に成功している。ムコ多糖症 VII 型ではオートファジービルドアップの改善傾向も遺伝子治療の結果として見られている。また今中らとの共同研究でALDモデルマウスへのレンチウイルスベクターを用いた *exo-vivo* gene therapy も有効性を呈している。

3. iPS 細胞関連ではまだ治療に関連する段階には来ていないが、衛藤らはポンペ病、ムコ多糖症 VII 型、クラッペ病などのマウスおよび患者由来の iPS 細胞の作製に成功し、更にポンペ病において骨格筋への分化を成功させている。今後各疾患の主要臓器への分化を試み、これらに対する薬剤や遺伝子治療、シャペロン治療などの効果を探っていく。

4. 基質合成抑制治療、イソフラボン治療 鈴木らはイソフラボンの経口投与によるムコ多糖症における中枢神経系の効果を調査し、限定的ながら有効の可能性が示唆された。

5. 抗体治療 大橋らはファブリー病モデルマウスに対して CD3 などの抗体を経口投与することにより免疫寛容を促進し、酵素補充療法の効果を安定化させることに成功した。

6. 酵素髄腔内投与 衛藤らはムコ多糖症 VII 型モデルマウスに対し欠損酵素イズロン酸サルファターゼの髄腔内投与(脳室内)を調査し、神経病理上の改善を報告している。

遺伝病の遺伝子治療体制の整備

衛藤、奥山、大橋、小林、島田、下澤らは年に一回、国際遺伝病遺伝子治療フォーラムを主催し、遺伝子治療に関連する国内外の企業関係者や患者家族と情報交換および協力体制を築くことにより、日本国内での先天代謝異常や重症複合型免疫不全を含む遺伝病に対する臨床遺伝子治療の実現に向けて企業協力や法整備といった点で準備を進めている。昨年1月には港区において行われ、ALDの事例をはじめ多くの臨床研究報告などがなされ盛況のうちに閉幕した。

D. 考察

ADL, QOLの全国調査をすることにより、各疾患の実際の臨床像および現在の問題点が浮き彫りになってきたといえる。酵素補充療法が保険適応となりライソゾーム病も治療可能な疾患となりつつある現在、患者および家族のニーズも大幅に変化している。またバイオマーカーの検討は疾患の早期発見や治療効

果判定に役立つ重要な研究であるが、徐々に実際の成果は出つつある。造血幹細胞移植の効果も欧米では従来無効とされたムコ多糖症型においても証明されつつあり、ガイドラインの詳しい作成が進行中である。酵素補充療法の市販後調査も進んでおり、現時点でゴーシェ病、ムコ多糖症、型、ファブリー病、ポンペ病の各疾患において中枢病変、心臓、骨系統への効果は限定的であるがそれ以外の効果は明らかになりつつある。今後はアレルギー事例への対応や髄腔内投与の検討が課題となる。またスクリーニングはライソゾーム病では濾紙血を用いた方法での分析が主流となるが、カットオフ値の決定で問題となるのはpseudodeficiencyの存在である。これらのコンセンサスは今後重要な課題である。病態解析は今回も遺伝子解析だけでなく、多岐にわたる解析が進み、臨床応用に結びつく研究が数多くなされている。新規治療法の開発面では遺伝子治療においてマウスなどを用いた実験報告で中枢への効果を含めた効果の大幅な改善が認められている。さらにZinc Fingerなど相同組換えを用いた遺伝子編集といった新たな手法も開発が進んでいる。またシャペロン療法や基質合成阻害などの方法論にも進歩が見られている。特にシャペロンはわが国から世界へ発信する新しい治療法であり、今後の発展が期待される。また同じく日本発の話題として取り上げられるiPS細胞は今後ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病の領域でも新規治療開発、病態解明に有用な可能性を秘めており、疾患由来の細胞作製から標的臓器への分化が現在の課題である。

また遺伝病の臨床遺伝子治療への整備として毎年国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムが開催され整備は徐々に進んでいるといえる。

E. 結論

ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病に対する実態調査、病態解析、新規治療法開発といった柱となる各研究は着実に進んでおり、

今後の課題も明確になっている現状で増々の成果が期待される。

F. 健康保険情報

なし

G. 研究発表

各研究分担者の報告覧参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

各研究分担者の報告覧参照

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報年度終了報告書

ファブリー病の腎障害に対する酵素補充療法の検討

分担研究者：坪井 一哉(名古屋セントラル病院 ライソゾーム病センター・血液内科)

研究要旨

ファブリー病は、ライソゾーム病の一病型であり、細胞内のリソソーム加水分解酵素である galactosidase 活性の低下により、細胞内リソソームに globotriaosylceramide (GL-3: 別名 Gb-3, CTH)などの糖脂質の蓄積を来す先天性代謝異常症である。ファブリー病に対する酵素補充療法の治療薬は、agalsidase alfa と agalsidase beta の2つの製剤が認められ市販されている。本研究では、当院で治療を行った日本人ファブリー病37症例を対象とし、慢性腎臓病(CKD)の重症度分類に従い、A1, A2, A3の3群に分類し検討を行った。ARB(Angiotensin Receptor Blocker)の使用の有無についても検討を行った。

agalsidase alfa で治療開始後、尿蛋白/Cre 比の増加は抑えられ、症例によっては著明な減少が認められた。また、ARB を併用した症例を除外し再検討したが、同様に尿蛋白/Cre 比は減少傾向が認められた。agalsidase alfa による酵素補充療法は、ファブリー病の腎障害の改善もしくは進行を遅らせる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ファブリー病は、ライソゾーム病の一病型であり、細胞内のリソソーム加水分解酵素である galactosidase 活性の低下により、細胞内リソソームに globotriaosylceramide (GL-3: 別名 Gb-3, CTH)などの糖脂質の蓄積を来す先天性代謝異常症である。心筋肥大、心血管障害、腎障害に加え、疼痛、被角血管腫、角膜混濁などの多彩な症状が報告されている。ファブリー病に対する酵素補充療法の治療薬は、現在、agalsidase alfa と agalsidase beta の2つの製剤が認められ、共に欧州で10年前より市販されている。本研究では、当院で治療を行った日本人ファブリー病37症例を対象とし、慢性腎臓病(CKD)の重症度分類に従い、A1, A2, A3の3群に分類し検討を行った。また、ARB(Angiotensin Receptor Blocker)の使用の有無についても検討を行い、ファブリー病の腎障害に対する agalsidase alfa を使用した

場合の酵素補充療法の有効性に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

当院受診したファブリー病患者のうち agalsidase alfa で酵素補充療法を24ヶ月以上施行している37症例を対象とした。

2. 方法

慢性腎臓病(CKD)の重症度分類に従い、A1, A2, A3の3群に分類(A1: 25名, A2: 4名, A3: 8名)し、6か月毎に eGFR、尿蛋白/Cre 比を測定し評価を行った。また、ARB(Angiotensin Receptor Blocker)の使用の有無についても検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヘルシンキ宣言」および厚生労働

省の「臨床試験に関する倫理指針」に基づき、名古屋市立大学および名古屋セントラル病院の倫理委員会の承認を得て行った。また、解析にあたり個人が特定できるような情報は使用していない。

C. 研究結果

agalsidase alfa で治療開始後、eGFR および尿蛋白/Cre 比の増加は抑えられた。一部の症例では減少傾向が認められた。また、ARB を併用した症例を除外し再検討したが、同様に尿蛋白/Cre 比は、横ばい、または減少傾向が認められた。本研究では観察期間が短く(36 ヶ月)、症例数も限られていたため今後も慎重な検討が必要であるが、酵素補充療法により、病状の悪化は認められなかった。

D. 考察

ファブリー病は酵素活性の低下により、多くの組織に Gb-3 が蓄積し、特に、腎臓では糸球体や尿細管の障害などを高頻度に呈し、病状は進行性である。ファブリー病に対する酵素補充療法は、欧州で 2001 年に承認され、本邦においても、2004 年に承認された。治療の有効性に関しては、心筋生検、腎生検により組織中内の GL-3 の蓄積の減少が報告されているが、報告例が少なく、定期的に行うには極めて侵襲性が高い。

本研究では、agalsidase alfa で治療開始後、尿蛋白/Cre 比の増加は抑えられ、症例によっては著明な減少が認められた。また、ARB による効果の可能性も考慮し、ARB を併用した症例を除外し再検討したが、同様に尿蛋白/Cre 比は減少傾向が認められ、ファブリー病に対する agalsidase alfa を使用した酵素補充療法の有効性が示唆された。

今回、症例数が限られていたこと、調査期間が3年間であったことなどから、今後も慎重な解析が必要であるものの、血液検査や尿検査による定期的な eGFR の算出や尿蛋白/Cre 比の測定は、治

療効果を評価する上で有用である可能性が示唆された。

E. 結語

agalsidase alfa による酵素補充療法は、ファブリー病の腎障害の改善もしくは進行を遅らせる可能性が示唆され、酵素補充療法の有効性が示唆された。なお、検討した症例数および評価項目が少ないことから、今後、更なる検討が必要と考えられる。

今度の検討課題

現在、ファブリー病患者の予後因子として各種サイトカイン(ICAM-1, VEGF など)に加え、腎機能の評価として尿中アルブミン、心機能の評価として NT-Pro-BNP などに関しても解析中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 内富一仁, 村上敬之, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病の腎障害における agalsidase aifa の有効性. 第 67 回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 2) 内富一仁, 村上敬之, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病の腎障害における agalsidase aifa の有効性. 第 67 回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 3) 西山裕乃, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病における Lyso-Gb3 を用いた治療有効性の検討. 第 67 回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 4) Yamamoto H, Tsuboi K, Togawa T. Componential analysis of the cerumen in patients with Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease and The 55th Annual Meeting of

The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan

- 5) Yamamoto H, Goto H, Tsuboi K. Histopathological findings of the nasal mucosa in 2 cosanguineous patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain.
- 6) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Clinical course and safety in 13 Fabry Disease patients who switched from agalsidase-beta to agalsidase-alfa. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain
- 7) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Switch from agalsidase beta to agalsidase alfa in 13 Fabry disease (FD) patients: Clinical course and safety. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan
- 8) Tsuboi K. Wish with a silver wing. 15th Asia LSD Symposium; 2013 November 26th Chiba, Japan
- 9) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Abnormal heart rate variability and left ventricular hypertrophy in patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain
- 10) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Cardiac manifestations and enzyme replacement therapy of Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報年度終了報告書

ライソゾーム病におけるミトコンドリア障害

分担研究者：高柳 正樹（千葉県こども病院副病院長）

研究要旨

ライソゾーム病における、ミトコンドリア機能の研究も進み、呼吸鎖活性の異常も報告され始めている。当院で治療管理しているライソゾーム病症例におけるミトコンドリア呼吸鎖活性の検討をおこない、ライソゾーム病の病態解明を行う。

当院でライソゾーム病としてフォローしている症例、ゴーシェ病 3 例、テイザックス病 2 例、ハンター病 2 例、サンフィリップポウ病 1 例を対象に、臓器、培養細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖酵素解析等を行い、ミトコンドリア呼吸能を評価した。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白量の低下を認めた。突然死症例の肝臓、心筋を用いて Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下しており、Autophagy 障害の可能性が示唆された。

今後ゴーシェ病はもとより、ライソゾーム病全般においてミトコンドリア機能の検討を行っていくことは、ライソゾーム病の病態の解明に大きな寄与をすることと考えられる。

研究協力者氏名

村山 圭（千葉県こども病院 代謝科医長）

こない、ライソゾーム病の病態解明を行う。

A. 研究目的

最近、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の分子病理の解明が進んできており、従来から知られている MELAS や Leigh 脳症のみならず、多彩な病態・病型がある事が分かってきた。

他の先天代謝異常症（Wilson 病、メチルマロン酸血症、PDHC 欠損症など）やパーキンソン病などでも呼吸鎖の低下が起こることが分かっている。

ライソゾーム病における、ミトコンドリア機能の研究も進み、呼吸鎖活性の異常も報告され始めている。

当院で治療管理しているライソゾーム病症例におけるミトコンドリア呼吸鎖活性の検討をお

B. 研究方法

当院受診したファブリー病患者のうち当院でライソゾーム病としてフォローしている症例、ゴーシェ病 3 例、テイザックス病 2 例、ハンター病 2 例、サンフィリップポウ病 1 例を対象に、臓器、培養細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖酵素解析等を行い、ミトコンドリア呼吸能を評価した。

さらに死亡したゴーシェ病の心筋において Autopagic marker の検索をおこない、ミトコンドリア機能障害の成因の検討を行った。

（倫理面への配慮）

患者さま個人が特定されない方法で、研究報告など行う。

C. 研究結果

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白質量の低下を認めた。

肝臓・腎臓は Complex I 欠損が認められ、心筋は Complex I+IV の欠損が認められた。

残りの 7 症例のうち 6 例は線維芽細胞、1 例は肝臓の呼吸鎖活性を測定したが、活性は正常であった

突然死症例の肝臓、心筋を用いて Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下しており、Autophagy 障害の可能性が示唆された。

D. 考察

ゴーシェ病のモデルマウスにおいて、ミトコンドリアとその品質管理がパーキンソン病との関連において検討されている。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例における検討では、臓器においてミトコンドリア呼吸鎖活性の低下を示したのみならず、オートファジーの障害を示す証拠が認められた。このことから本症例においては、ミトコンドリアの品質管理に異常が生じ、その結果ミトコンドリア呼吸鎖活性の低下をもたらした可能性が高いのではと考えられる。

ゴーシェ病に限らず、ライソゾーム病においては機能障害を呈するライソゾームが、同じ細胞内小器官であるミトコンドリアに大きな影響を与えている可能性が考えられる。

今回線維芽細胞においてはミトコンドリア呼吸鎖活性の低下を見た症例はなかったが、障害臓器の直接的な呼吸鎖活性の測定がさらに必要であろうと考えられる。

E. 結論

8 例のライソゾーム病症例においてミトコンドリア呼吸能を評価した。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白質量の低下を認めた。さらに心筋で Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下していた。

今後ゴーシェ病はもとより、ライソゾーム病全般においてミトコンドリア機能の検討を行っていくことは、ライソゾーム病の病態の解明に大きな寄与をすることと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 井田 博幸, 衛藤 義勝, 田中 あけみ, 高柳 正樹, 酒井 規夫, 川合 基司, 田畑 恭裕. 薬剤の臨床 日本人 Gaucher 病(I 型、II 型および III 型)患者に対するセラザイムの 8 年間の製造販売後調査結果による有効性と安全性の検討. 小児科診療 76 : 1325-1334, 2013

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報年度終了報告書

小児型 Pompe 病患者 3 名における酵素補充療法の長期経過

分担研究者：石垣 景子（東京女子医科大学医学部小児科講師）

研究協力者氏名

大澤真木子（東京女子医科大学小児科名誉教授）

A. 研究目的

異なる治療反応性を示す小児型Pompe病患者 3名における酵素補充療法（Enzyme Replacement Therapy:ERT）の長期経過の比較を行い、治療反応性への予測因子を検討する。

B. 研究方法

酵素補充療法に対し、異なる反応性を示す 3 例の小児型 Pompe 病患者の発症時身体所見、骨格筋画像、発症から治療開始までの期間、経過中の抗体価、合併症等の比較検討を行った。（倫理面への配慮）個人が特定される情報は厳密に管理し、患者両親よりインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

患者 1 は 18 歳男性 .12 歳時に側弯が急激に進行し、13 歳時に感染に伴い、慢性呼吸不全が急性増悪した。確定診断と同時に ERT を開始し、18 歳現在は進行が停止した状態で安定している。患者 2 は 16 歳男子。幼児期より高 CK 血症、易転倒性、鼻咽頭閉鎖不全があった。5 歳時に確定診断されたが、ERT を開始したのは 10 歳時であった。一旦著明改善したが、1 年後に退行が始まり、現在呼吸機能障害、筋力低下共に進行している。患者 3 は 7 歳女兒。1 歳時に偶然高 CK 血症に気づかれ、2 歳 6 か月時に確定診断と同時に ERT 開始した。骨格筋症状はなく、肝脾腫が認められたが、治療開始 1 か月で改善した。7 歳現在、筋力低下はない。3 例の治療反応性は患者 1

が良好、2 が不良、3 が非常に良好と分類できる。患者 3 では抗体価産生を認めなかったが、患者 1、2 では同程度に認めず、抗体価だけでは治療決定因子とならなかった。

治療開始時の骨格筋画像では、患者 2 では不可逆的な局所的高吸収を認めたが、患者 1、2 とも全体的な高吸収値のみだった。患者 1、3 は骨格筋症状発現も遅く、治療開始は診断直後であったのに対し、患者 2 は幼児期発症と早期であり、治療開始までも時間を要した。

D. 考察

無症候期の治療開始、または、発症から治療開始までの期間が短いほど、ERT 効果は高い。経過良好な早期治療開始例は、開始時に骨格筋全体の軽度 CT 値上昇を認めるのみで、局所的吸収異常を認めなかった。抗体非産生例は ERT 効果が維持された。経過中、抗体産生時期と一致して、ERT 効果を失った例もあったが、影響を受けない例もあり、絶対的な効果決定因子ではない。遺伝子型の関与は今回の検討では十分できなかった。長期経過に伴う合併症に注意が必要。

E. 結論

治療開始まで短期間、骨格筋画像で局所的高吸収域なし、抗体産生なしが治療反応性良好の予測因子にはなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 石垣景子ら。小児の呼吸管理 9 「神経・筋疾患」。小児科。2013;54(2):213-221

2. 学会発表

- 1) 石垣 景子：小児型 Pompe 病の診断と治療」
第 30 回小児神経筋疾患懇話会 於東京国際
フォーラム，東京 2013 年 8 月 24 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ライソゾーム病の新生児スクリーニングの研究

分担研究者 奥山 虎之（国立成育医療研究センター臨床検査部）

研究要旨

ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、新生児マススクリーニングが注目されている。我々は、治療可能なライソゾーム病 5 疾患を対象にした血液ろ紙検体による簡便かつ迅速なスクリーニング法の開発を目標とした。健康対照者 284 検体およびハーラー症候群、ハンター症候群、ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病患者 70 検体を対象として、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer によるライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定を行った。その結果、すべてのライソゾーム酵素活性測定において健康対照者と患者を鑑別することが可能であった。またファブリー病の女性保因者では、活性値が正常コントロールの活性値内に留まる症例が見られ、本法のみではスクリーニングが困難であることが示唆された。

A．研究目的

ライソゾーム病に対する酵素補充療法は、症状が進行する以前に開始することにより最大の治療効果が得られるため、ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、新生児マススクリーニングの開発が注目されている

我々は、すでにライソゾーム病のひとつであるポンペ病の酵素活性測定をろ紙微量血液検体を用いて可能とし、新生児マススクリーニングを開始した。本研究では、現在、我が国で酵素補充療法による治療が可能であるライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素をろ紙微量血液検体を用いて同時測定することにより新生児マススクリーニングを可能とする系の確立を目標とした。

B．研究方法

ろ紙微量血液検体を用いて、 α -L-イズロニダーゼ（ハーラー症候群）、イズロネート酸-2-スルファターゼ（ハンター症候群）、 α -グルコセレブロシダーゼ（ゴーシェ病）、酸性 β -グルコシダーゼ（ポンペ病）、 β -ガラクトシダーゼ（ファブリー病）の各ライソゾーム酵素を Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer（Advanced Liquid Logic 社、米国）による 4 MU 法により同時測定を行った。検体は本研究に同意が得られた 284 名の健康新生児からなる正常対照群と 70 名の患者群（ハーラー症候群 4 名、ハンター症候群 15 名、ゴーシェ病 2 名、ポンペ病 31 名、男性ファブリー病 18 名）と女性ファブリー病 17 名から得られたろ紙検体を対象とした。

（「ライソゾーム病の新生児スクリーニング検

査」、独立行政法人国立成育医療研究センター倫理委員会承認、平成 22 年 11 月 30 日、受付番号 443）

C．研究結果

対照群と患者群のそれぞれのライソゾーム酵素活性平均値は、 α -L-イズロニダーゼ（ハーラー症候群）23.6 (9.3-41.9) および 2.1 (1.4-2.6) $\mu\text{mol/L/h}$ 、イズロネート酸-2-スルファターゼ（ハンター症候群）27.7 (15.2-51.3) および 8.3 (3.9-12.1) $\mu\text{mol/L/h}$ 、酸性 β -グルコシダーゼ 22.3 (9.4-46.6) と 4.9 (2.3-8.3) および 5.7 (2.6-15.5, pseudodeficiency 群) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 α -グルコセレブロシダーゼ（ゴーシェ病）10 (4.7-22.1) と 1.93 (1.6-2.2) $\mu\text{mol/L}$ 、ファブリー病) β -ガラクトシダーゼ 値は、正常群では平均 32.5 (最小値 11.3-最大値 90.5)、男性患者平均値 4.6 (最小値 1.9-最大値 8.9)であった。さらに女性ファブリー病患者の β -ガラクトシダーゼは平均 7.4、(最小値 2.7、最大値 19.2) $\mu\text{mol/L/h}$ であった。

D．考察

本研究では、ライソゾーム病 5 疾患の対照群と患者群のライソゾーム酵素活性平均値は明らかに違いがみられ、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer によるライソゾーム病スクリーニングが可能であることが示唆された。しかしポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の酵素活性値は一部が患者群あるいは対照群の結果とオーバーラップする結果もみられた。ポンペ病の pseudodeficiency

は多型解析による判別が可能であるが、ファブリー病の女性保因者については GLA 遺伝子解析や血漿中の蓄積物質の解析が必要であり、スクリーニングを実施するにあたり、これらの問題点を克服する必要がある。

E . 結論

284 名の正常対照群と 70 名のライソゾーム患者群のろ紙微量血液検体を用いたライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素活性同時測定により正常対照群とライソゾーム患者群の鑑別が可能であった。ポンベ病の pseudodeficiency(偽陰性)とファブリー病の女性保因者の酵素活性値は一部が患者群あるいは対照群の結果とオーバーラップする結果もみられた。

F . 発表業績 :

1 . 論文発表

- 1) Tajima G, Sakura N, Kosuga M et al. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 2013;108:172-7.

2 . 学会発表

- 1) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September.4.2013.
- 2) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之:5 つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第 116 回 日本小児科学会学術集会学会、広島、2013.4.19.
- 3) 奥山虎之:ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題(シンポジウム).第 40 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013.8.24.

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

ライソゾーム病(ファブリー病、糖原病Ⅱ型、ムコ多糖Ⅰ型・Ⅱ型)スクリーニング法の基礎的検討
特に酵素活性測定の実験時間について

分担研究者：北川照男（公益財団法人 東京都予防医学協会理事長）

研究要旨

ファブリー病（FD）、糖原病Ⅱ型（GSDⅡ）、ムコ多糖Ⅰ・Ⅱ型（MPSⅠ・MPSⅡ）などのライソゾーム病の一部の酵素補充療法が開発され、治療によって各疾患の予後の改善が得られるようになって、早期診断法の開発が進められるようになった。その一つとして蛍光基質を用いた酵素活性測定が N. Chamoles ら¹⁾、C. J. Deanra ら²⁾、K. Umaphysivam ら³⁾によって報告されているが、その酵素活性測定の実験時間はいずれも 37、20 時間以上であり、incubation 中に酵素の劣化や菌の繁殖などによる測定系への影響が考えられた。今回、我々は、それぞれの方法について time course による酵素活性測定の実験時間および防腐剤の影響などを検討したので報告する。

研究協力者：

鈴木 健（財）東京都予防医学協会
藤川研人（財）東京都予防医学協会
石毛信之（財）東京都予防医学協会
穴澤 昭（財）東京都予防医学協会
大和田操（財）東京都予防医学協会
大橋十也 東京慈恵会医科大学小児科
井田博幸 東京慈恵会医科大学小児科
衛藤義勝 東京慈恵会医科大学小児科
田中あけみ 大阪市立大医学部小児科

A. 研究目的

高感度の人工基質である 4-MU 誘導体を用い、濾紙血液のライソゾーム酵素活性を測定して種々の疾患を発見する方法が報告され、スクリーニングに使用されている。しかし、これらの方法はどれも実験時間が 37、20 時間またはそれ以上と実験時間が長いために酵素の劣化や細菌の増殖が危惧される。そこで、濾紙血液を用いたライソゾーム病の酵素診断の至適条件の検討を目的として、類似酵素阻害法、および酵素免疫捕捉

法における、1．至適基質濃度、2．酵素免疫捕捉法の測定効率、3．至適実験時間、4．防腐剤の影響等について検討した。

B. 研究対象

大阪市大小児科を受診した新生児 36 名の濾紙血液、健常成人 12 名の血漿、白血球を対象に本研究を行った。

C. 研究方法

ファブリー病、MPSⅠは類似酵素を競合不活化し、目的酵素に 4-MU 蛍光基質を作用させて、活性を測定する類似酵素阻害法、N. Chamoles らの方法¹⁾を用いて検討した。GSDⅡ(ポンペ病)、MPSⅡはマイクロプレートに各疾患酵素に対するポリクローナル抗体を固相化して目的酵素を捕捉した後、4-MU 蛍光基質を作用させ活性を測定する酵素免疫捕捉法、MPSⅡは C.J. Dean らの方法²⁾、GSDⅡは K. Umaphysivam の方法³⁾を用いた。

表 1 に類似酵素阻害法の類似酵素、その酵素活

性を阻害するための阻害剤を示し、表 2 に酵素免疫捕捉法における酵素を捕捉するために固相化した抗体を示した。

検討方法は、各々の方法における酵素活性測定時間の time course (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 20 時間) を作製し、時間毎の活性値、およびこれに酵素補充療法剤を添加した回収値について検討した。また、防腐剤として 0.02% チメロサルを添加して、防腐剤の効果・影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学医学部倫理委員会、(財)東京都予防医学協会倫理委員会の承認を得て、本研究のライゾーム病患者と新生児正常対照者、および大阪市大で出生した新生児対象者の濾紙血液は、その用途、研究目的を事前に文章にて説明した後、承諾書に署名を得てから採取し、これらの検体を使用して本研究を行った。

D. 研究結果

1. 至適基質濃度

図 1 に、基質濃度による β -galactosidase 活性の変化をミカエリス定数 K_m 値によって示した。正常対照および一定濃度の酵素補充療法剤ファブラザイムの K_m 値は 1.18 から 1.60 の範囲にあった。

2. 酵素免疫捕捉法の測定効率

図 2 に反応液の残液から算出した固相化抗体の酵素捕捉率、および捕捉された酵素の 4-MU に対する作用率を示した。本法の抗体捕捉率は平均 74.5% であったが、Umapathysivam らの方法では平均約 95% であり、我々の方法よりも高い捕捉率であった。一方、固相化抗体に捕捉された酵素の 4-MU に対する作用効率は、競合阻害法を 100% として比較すると、Umapathysivam らの方法は平均 29% であるのに対して、本法では約 63% であり、Umapathysivam らの方法よりも 4-MU に対する作用効率は良好であった。

3. 至適反応時間

図 3 に競合阻害法におけるファブリー病

β -galactosidase 比活性値の推移を示した。図左側は血漿、図右側は濾紙血液の β -galactosidase 活性を示し、それぞれに酵素補充療法剤ファブラザイムを一定量加えた場合の比活性値をも示し、その添加回収率は 72%~96% の範囲にあった。血漿の場合は、ファブラザイムを加えた場合と加えない場合でほぼ同じパターンで、反応後 1 時間で最大値を示し、時間の経過と共に減少し、20 時間を経過すると 1 時間値の約 1/3~1/4 まで減少した。この傾向は白血球の場合でもほぼ同様な結果であった。一方、濾紙血液の場合はファブラザイムを加えた場合と加えない場合では若干パターンが異なり、加えた場合では 1~4 時間値で最大ピークを示し、20 時間を超えると約 1/5 まで減少した。他方、加えない場合では 2 時間で最大値を示し、20 時間以上の場合には約 1/4 まで減少した。

図 4 に、免疫捕捉法におけるムコ多糖症 II 型 iduronate-2-sulfatase の比活性値の推移について示した。図左側に酵素補充療法剤エラブレース、図右側に濾紙血液 iduronate-2-sulfatase の比活性値の推移を示したが、何れも 2 時間で最大値となり、20 時間では 2 時間値の 1/3~1/4 まで減少した。

4. 防腐剤の影響

菌の増殖が測定系へ与える影響について、防腐剤を加えた場合と加えない場合とで比較検討した結果、防腐剤としてチメロサルを添加した場合としない場合とで血漿、濾紙血液、何れの場合もほとんど差がなく、また 37 °C で 20 時間 incubation し、添加した場合としない場合の反応液を血液寒天培地・普通寒天培地で培養しても菌の増殖はみられなかった(図 5)。

E. 考察

1. 基質濃度による β -galactosidase 活性の変化を示すミカエリス定数 K_m 値は、正常対照の濾紙血液および酵素補充療法剤ファブラザイム、何れの場合も 1.18 から 1.60 の範囲にあり、本法で

使用している基質濃度は適切であることが証明された。

2. 酵素活性反応時間での蛍光度は、いずれの方法においても2~3時間で最大のピークを示し、その後は平衡を示すか、減少した。従って、時間当たりで算出される測定値は2~3時間を最大として、時間が経過すればするほど減少し、20時間を経過した場合は2時間値の約1/2~1/5に減少した。

F. 結論

今回の結果から、各々のライソゾーム病の酵素活性を測定する場合、活性測定反応時間は37、2時間~4時間が最も良く、従来から行われている37、20時間の反応時間では正しい測定値が得られない結果であり、反応時間は2~4時間の反応が良いと考えられた。

G. 研究発表

- 1) 北川照男、大和田操、他. 新生児マス・スクリーニングの今後の飛躍を期待して. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P175, 2013.
- 2) 鈴木 健、北川照男、他. ライソゾーム病(ファブリー病、糖原病II型、ムコ多糖症I型・II型)スクリーニング法の基礎的検討 酵素活性測定の反応時間について. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P213, 2013.

【参考文献】

- 1) Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C: Glycogen storage disease type : enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta. 347: 97-102, 2004.
- 2) Dean CJ, Bockmann MR, Hopwood JJ, Brooks DA, Meikle PJ: Detection of Mucopolysaccharidosis type by measurement

of iduronate-2-sulfatase in dried blood spots and plasma samples. Clin Chem. 52: 643-649, 2006.

- 3) Umaphysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ: Determination of acid α -glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem. 47: 1378-1383, 2001.

H. 知的財産の出願・登録状況
特になし

表 1 . 類似酵素の活性を阻害するための阻害剤

疾患名	類似酵素	阻害剤
ファブリー病 (β -galactosidase 欠損症)	N-acetylgalactosaminidase	N-acetylgalactosamine
糖原病 II 型 (β -glucosidase 欠損症)	Maltose-glucoamylase	acarbose
ムコ多糖症 I 型 (Iduronidase 欠損症)	β -glucuronidase	saccharolactone

表 2 . 免疫酵素捕捉法における酵素を捕捉するために固相化する抗体

疾患名	固相化抗体
糖原病 II 型 (β -glucosidase 欠損症)	抗ヒト β -glucosidase ポリクローナル抗体
ムコ多糖症 II 型 (Iduronate-2-sulfatase 欠損症)	抗ヒト Iduronate-2-sulfatase ポリクローナル抗体

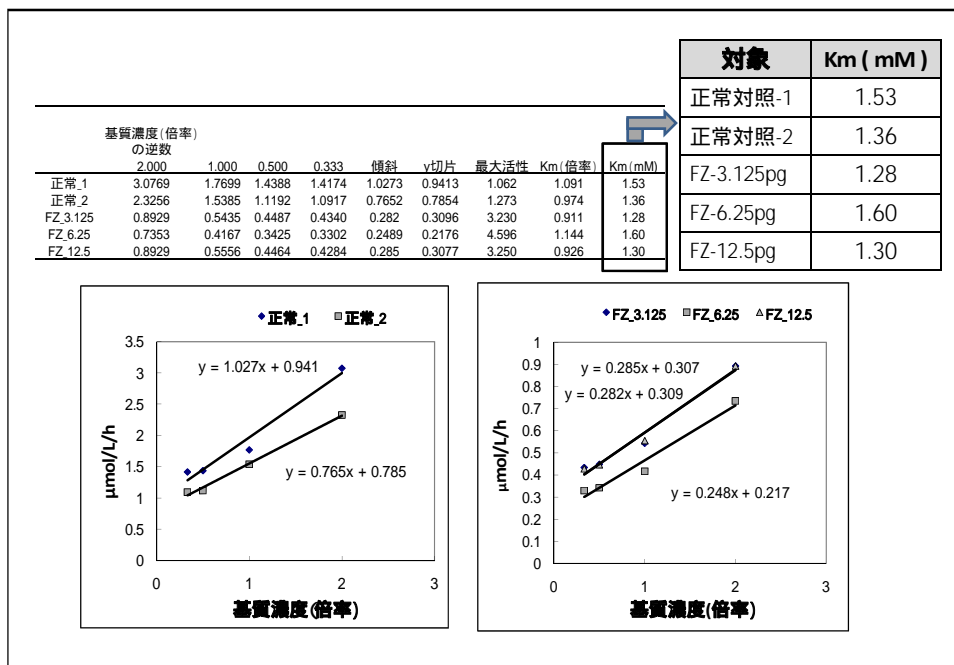


図 1. 基質濃度による β -galactosidase 活性の変化 (ミカエリス定数 Km)

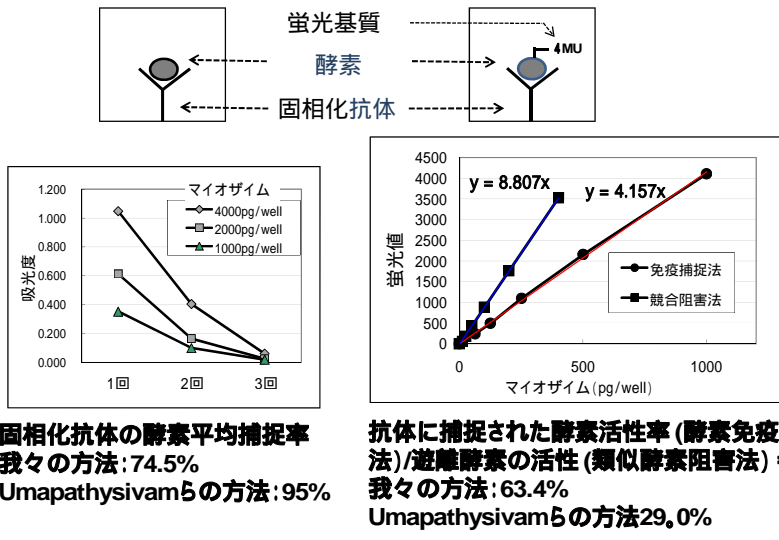


図2. 酵素免疫捕捉法の測定効率

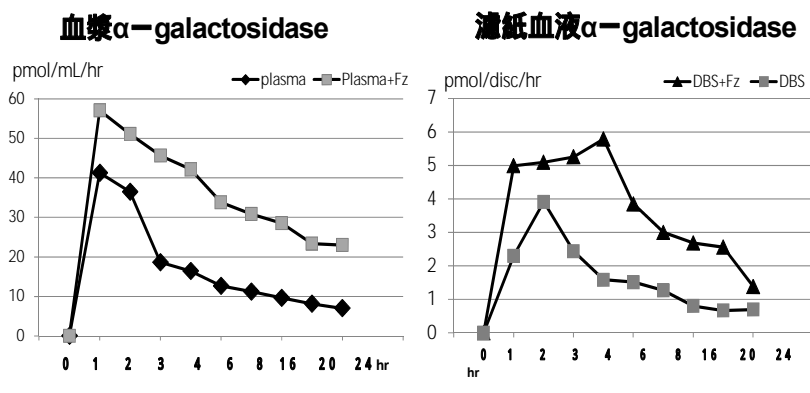


図3. 反応時間による α-galactosidase比活性の推移
 - Chamolesらの方 (類似酵素阻害法) -

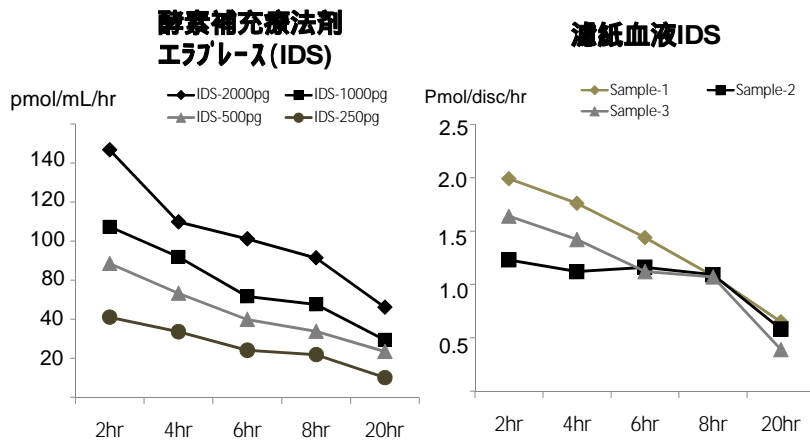


図4. 反応時間によるIduronate-2-sulfatase比活性の推移
-Deanらの方法(酵素免疫捕捉法) -

20時間反応させた測定反応液を一昼夜培養した血液寒天培地と普通寒天培地

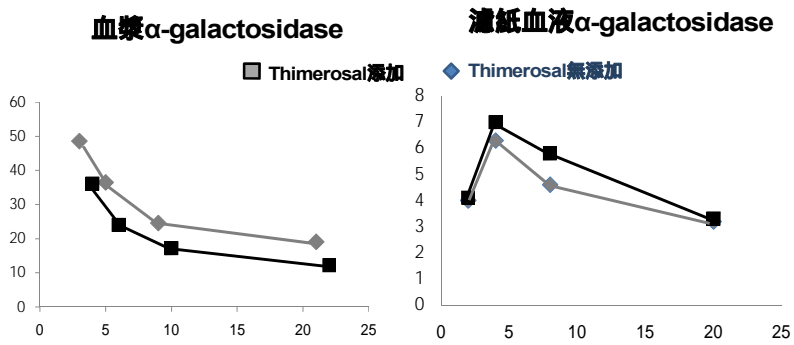
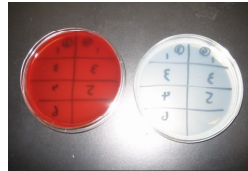


図5. -galactosidase活性に対する防腐剤の影響
-thimerosal-

ファブリー病・ポンペ病のスクリーニング研究

分担研究者：遠藤 文夫（熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野 教授）

研究要旨

ファブリー病とポンペ病はそれぞれ α -ガラクトシダーゼと酸性 α -グルコシダーゼの欠損によって発症する先天代謝異常症である。われわれは、酵素活性のろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたスクリーニングのパイロットスタディを行った。

A. 研究目的

ファブリー病はライソゾーム酵素である α -ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。また、ポンペ病は酸性 α -グルコシダーゼの欠損によって発症する。近年これらの疾患に対して酵素補充療法が導入され、患者の治療が可能になった。そのため、ファブリー病とポンペ病の早期発見と早期治療が重要となってきた。しかし、ファブリー病の症状は多様であるため、早期の診断は困難であることも少なくない。また、乳児型ポンペ病は乳児期早期に治療を開始しなければ予後が不良であると考えられている。我々は、新生児におけるろ紙血検体を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

ファブリー病とポンペ病のスクリーニングにおいて、Xηαμολεσらの方法を改変し、ろ紙血検体の α -ガラクトシダーゼ酵素活性と酸性 α -グルコシダーゼ酵素活性とを測定した。平成18年8月から現行の新生児マススクリーニングに加えて、説明と同意に基づいたファブリー病のマススクリーニングを開始した。また、平成25年4月からはポン

ペ病のマススクリーニングも追加した。ファブリー病では、スクリーニング陽性者とその家族に遺伝カウンセリングをおこなったうえで、ダイレクトシーケンシング法を用いた α -ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。また、ポンペ病においてはBa/Zv法を用いた酵素活性の測定と、皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性の測定によって解析を行った。

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と、保護者への説明と同意に基づいて行った。活性低値の新生児に対して、説明と遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

熊本県ならびに協力自治体において、現行の新生児マススクリーニングに加えて、ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行った。ろ紙血を用いた α -ガラクトシダーゼ活性と酸性 α -グルコシダーゼ活性の測定法を用いて、説明と同意に基づいた新生児スクリーニングを行った。

ファブリー病のスクリーニングでは、遺伝子解析を含めた精密検査を行った。本研究では約

387,000名中82名の酵素活性の異常低値者が明らかになった。活性低値の新生児と家族に対して、遺伝カウンセリングを行い、ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。その中で古典型ファブリー病に認められる変異は、5名の男児に認められた。また、ファブリー病を発症しうると考えられる変異は23名の男児に認められた。これらのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約8,400名に1名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約39,000名に1名であると推定された。

また、平成24-25年度において、ポンペ病のスクリーニングでは、約7,500検体中に1名の遅発型のポンペ病患者を認めた。ポンペ病の pseudo deficiency と考えられるスクリーニング陽性者は11名であった。Ba/Zn法を用いることにより、pseudo deficiency による偽陽性者を著しく減らすことができた。

さらに、平成24-25年度において、成人のファブリー病患者においてDS3スコアリングを用いたファブリー病スクリーニングによって発見された患者の予後の検討をおこなった。すると、酵素補充治療前にスコア15点以上の患者では、治療開始後もスコアの平均点は約5点悪化していた。一方、酵素補充治療前のスコア15点未満の患者では、スコアの平均点が約1点改善しており、少なくとも臨床症状の悪化を防ぐことができていることがわかった。すなわち、スクリーニングによる早期発見は、臨床症状が軽度なうちに行う必要があることが明らかになった。

D. 考察

このスクリーニングによってわが国におけるファブリー病の頻度を推定することができた。また、簡便で安価な酵素測定法を用いることで、ファブ

リー病の発症前の診断も容易となった。また、ポンペ病においてもBa/Zn法を用いることにより新生児スクリーニングを効率的に行うことが可能になった。

ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングは臨床的にも研究対象として有用であるため、今後もパイロットスタディを継続する予定である。さらに、成人のファブリー病のハイリスク者とされる心疾患・腎疾患・脳血管障害患者における本法を用いたファブリー病のスクリーニングは、早期発見と治療に有用と考えられる。ポンペ病の遅発型の成人期におけるスクリーニングも同様に可能であり、ポンペ病のスクリーニングを行うことにより、発症早期に酵素補充などの治療が可能になると考えられた。

E. 結論

ろ紙血を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングは、簡便で安価な検査法として有用であると考えられた。さらにファブリー病とポンペ病の安価で簡便な診断法の開発とわが国における疾患頻度の推定を行った。また、本疾患を疑ったときに簡便に試みることができる検査法としても利用されている。このスクリーニング検査は、ファブリー病とポンペ病の症状が軽度なうちにおこない、早期発見されると、酵素補充治療の効果も期待できた。一方、ファブリー病とポンペ病のスクリーニングや遺伝カウンセリングにおいて配慮すべき点も少なくない。スクリーニング検査を慎重に行うことによってファブリー病とポンペ病患者の予後を改善できると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S,

- Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J. Hum. Genet.* 58, 285-292 (2013)
- Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *Plos One* 8, e56387 (2013)
- Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection. *Pediatr Int.* 55, 775–778 (2013)
- Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. *Eur J Neurol* (2013 in press)
- Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn screening for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
- Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. *Springerplus.* (2013 in press)
- Fujisawa D, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Clinical features and management of organic acidemias in Japan. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
- Kido J, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Takayanagi M, Matsuo M, Yoshino M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Long-term outcome and intervention of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis.* 35, 777–785 (2012).
- Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34, 566-570 (2012)
- Katsuren K, Nakamura K, Ohta T Effect of body mass index-z score on adverse levels of cardiovascular disease risk factors. *Pediatr Int.* 54, 200-204 (2012)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

GBA 遺伝子とパーキンソン病との関連

分担研究者：辻 省次（東京大学神経内科 教授）

研究要旨

Glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異は多系統萎縮症患者と関連するかどうか検討した。

分担研究者：

松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生
三井 純 東京大学神経内科 特任助教
後藤 順 東京大学神経内科 准教授
辻 省次 東京大学神経内科 教授

A. 研究目的

1. ゴーシェ病の原因遺伝子である GBA 遺伝子変異のキャリアーがパーキンソン病の危険因子になるという関連解析が、日本人を含め様々な人種で報告されている。パーキンソン病と共通する病理学的特徴（ α -synuclein の蓄積・封入体）をもつ神経変性疾患である多系統萎縮症 (MSA) について、GBA 遺伝子変異との関連を検討する。

2. GBA 遺伝子は相同性が極めて高い偽遺伝子が存在し、変異の多くは偽遺伝子の配列由来である。特異的 PCR とサンガー法による GBA 遺伝子全エクソン配列解析と並行して、exome 解析 (SureSelect/Hiseq) を行い、ショートリードシーケンサーによる GBA 遺伝子変異の検出程度について検証する。

B. 研究方法

MSA患者346例、健常者618例を対象にした。特異的PCRとサンガー法によるGBA遺伝子全エクソン配列解析とexome解析 (SureSelect/Hiseq) を同時に行った。

Exome解析の方法：SureSelect v4+UTR (Agilent) を用いてゲノムDNAを濃縮した。Hiseq2000にて100塩基ペア・エンドで配列解析し、bwaにて参照配列 (hg19) へのアライメントを行い、samtoolsにて変異の検出を行った。

(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

1. MSA患者346例中4例 (1.6%)、健常者618例中3例 (0.49%) に病原性変異をヘテロ接合性に認めた。MSA患者群に多い傾向はあったが、P値は0.26と有意差は得られなかった。

2. サンガー法による解析で同定された R120W, F213I, D409H, L444P 変異のうち、当該領域に濃縮プローブがデザインされていた F213I, D409H は exome 解析においても検出できた。一方、エクソン 5 の R120W, エクソン 10 の L444P は偽遺伝子との相同性が高く、濃縮プローブがデザインされていなかったことから、exome 解析では検出できなかった。

D. 考察

1. 今回の検討規模では、MSAとGBA遺伝子

変異の関連について結論は得られなかったが、MSAに頻度が高い傾向がみられた。

2.現在のショートリードを用いた解析では、GBA遺伝子のように相同性の高い配列がゲノム上にある遺伝子の場合、変異の検出が難しい領域がある。

E. 結論

MSA と GBA 遺伝子変異の関連を検証するにはさらに大規模な解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ALD の遺伝子表現型連関

分担研究者：辻 省次（東京大学神経内科 教授）

研究要旨

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、*ABCD1* を原因遺伝子とし、多彩な表現型を認めるが、遺伝子表現型連関は明らかではない。表現型修飾因子同定のため、ペルオキシソームで機能する遺伝子群を表現型修飾因子の候補遺伝子と考え、Exome 解析を行った。コントロール 369 例での解析が終了し、今後 ALD 症例の解析も行う予定。

分担研究者：

- ・松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生
- ・三井 純 東京大学神経内科 特任助教
- ・石浦 浩之 東京大学神経内科 助教
- ・Budrul Ahsan 東京大学神経内科
特任研究員
- ・吉村 淳 東京大学大学院新領域創成科学
研究科 特任助教
- ・土井 晃一郎 東京大学大学院新領域創
成科学研究科・特任講師
- ・後藤 順 東京大学神経内科 准教授
- ・鈴木 康之 岐阜大学医学教育開発センター
教授
- ・下澤 伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援
センター 教授
- ・小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学
リソース研究センター 教授
- ・西澤 正豊新潟大学脳研究所神経内科 教授
- ・森下 真一 東京大学大学院新領域創成科学
研究科・教授

A . 研究目的

ALD は多彩な臨床病型を呈するが、遺伝子表現型連関は明らかではない。予後不良な大脳型 ALD

に対しては、早期の造血幹細胞移植が有効である可能性があり、大脳型を発症しやすい背景因子を同定すれば、臨床上有用である。多彩な臨床病型を規定する遺伝的修飾因子の探索を行うことが目的である。

B . 研究方法

ABCD1 の発現産物である

adrenoleukodystrophy protein (ALDP)は、ペルオキシソームで機能することから、他のペルオキシソームで機能する遺伝子群を、臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え、これらの候補遺伝子内の variants について、表現型毎の出現頻度に有意な差のある場合、修飾因子としての可能性が指示されると考え、表現型との関連を検討した。

対象者のエキソーム解析を行い、候補遺伝子内の variants を選択。新規 variants については直接塩基配列法で確認を行った。

対象者は、ALD 患者 67 例（小児大脳型 13 例、思春期大脳型 6 例、成人大脳型 10 例、大脳型への移行例 12 例、小脳脳幹型 3 例、AMN19 例、Addison 病 1 例、未発症 2 例）、日本人コントロール 369 例とした。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い,所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施をした。検体は全て書面による同意を得ており,匿名化の上,解析された。

C . 研究結果

コントロール 369 例の解析が完了。

ペルオキシソームで機能する遺伝子群で検出された variants の中で, 既知の病因変異, Nonsense, frameshift, splice sites

mutations, 新規 non-synonymous variants

(SNV)を有する検体は,コントロール 369 例中, 194 例(52.5%)であった。

新規 SNV の中で,Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP の 5 つの SNV 機能予想アルゴリズムの合計点が 4 点以上(5 点が最も機能変化が大きい)の SNV (deleterious SNV)に絞った場合は, コントロール 369 例中, 133 例(36.0%)が有していた。

D . 考察

ペルオキシソームで機能する遺伝子群において, アミノ酸置換を伴う新規の non-synonymous variants は, 多数同定され, coding region の non-synonymous variants は未知のものが依然として存在すると考えられ, 網羅的な塩基配列解析は重要と考える。

E . 結論

今後 ALD 症例における解析も進め,検出された variants における ALD の各表現型及び Control における頻度の比較 (関連解析)を行う予定である。併せて, ALD 症例 DNA 検体のさらなる集積を行う。

F . 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ライソゾーム病の iPS 細胞の作成と病態、治療への応用に関する研究

研究代表者：衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）

研究要旨

ライソゾーム病、特にヒトファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病患者皮膚繊維芽細胞よりレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いて山中 3 因子或いは 4 因子を導入し、iPS 細胞を作成し、生化学的並びに電顕による超微形態分析並びにポンペ病に対する酵素補充療法による病態解析を行った。

共同研究者：

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

研究協力者：

高村歩美⁴⁾、藤崎美和⁴⁾、大樂武範⁴⁾、岩本武夫⁵⁾

1. 東京慈恵会医科大学遺伝子治療部
2. 東京慈恵会医科大学皮膚科学講座
3. 東京慈恵会医科大学小児科学講座
4. 財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究センター
5. 東京慈恵会医科大学共用研究施設

A) センダイウイルス或いはレトロウイルスベクターを用いたヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病由来 iPS 様細胞の樹立

Generation of iPS like cells from human Pompe, Gaucher, Fabry disease, using Sendai virus or retrovirus vectors.

【目的】ライソゾーム病の内ヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病の患者皮膚繊維芽細胞を用いて山中 3 又は 4 因子をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターに組み込み高橋、或いは西村らの方法に従い各々 iPS 細胞を作成、これらの iPS 細胞が ES 細胞の 15 因子を発現し且つ iPS 細胞に SASP など特有の発現を認め、iPS 細胞を確認し又各疾患特有の性質、酵素欠損、蓄積物質が確認されている。

センダイウイルスはゲノムに組み込まれず理論的に遺伝的毒性がないため感染細胞内で初期化因子を安定的に発現させる事が出来るという特徴を持つ。そのため、レトロウイルスベクターを用いて作成した iPS 細胞と比べてセンダイウイルスベクターでは高品質の iPS 細胞を作成でき、iPS 様細胞を心筋細胞に分化誘導させ、ファブリ病心筋細胞の病態解析を更に進めていく。

B) ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立

Patients-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Lysosomal Storage Diseases

【目的】ゴーシェ並びにポンペ病はライソゾームの代表的疾患であり、細胞内にグルコセレブロシド或いはグリコーゲンが大量に蓄積する。細胞内でのこれら蓄積物質の蓄積による病態の機序並びに治療の効果を検討するために iPS 細胞は患者皮膚細胞などの体細胞を初期化することによって樹立できる iPS 細胞は、遺伝的背景が同じ幹細胞を樹立できる。これまでに当講座では各種のライソゾーム病モデルマウス由来 iPS 細胞を樹立し、そのライソゾーム病の病態解析を行ってきた。我々は今回ヒトライソゾーム病、特にポンペ病とゴーシェ病の病態解析並びに治療効果の解

析を目指し患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 iPS をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いての iPS 細胞樹立を試みた。

【方法】ヒト初期化因子 (*SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, *c-MYC*) を組み込んだ pMXs レトロウイルスベクターを皮膚細胞に感染させることによって iPS 様細胞を樹立した。又ポンペ病患者皮膚線維芽細胞からはセンダイウイルスベクターを用いて西村らの方法に従い作成した。iPS 様細胞は透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいて細胞の内部構造を解析した。

【結果】ゴーシェ病では II 型 (神経型) の iPS 様細胞は樹立できたが、I 型 (非神経型) の iPS 様細胞は作成出来なかった。ポンペ病では乳児型 (心臓型) も遅発型 (筋肉型) も iPS 様細胞が樹立した。ポンペ病 iPS 細胞ではマイオザイムを 10-1000ug/ml medium の濃度で加え細胞内ライソゾームに蓄積している封入体の減少程度を電子顕微鏡下で観察した。電顕上は乳児型ポンペ病で遅発型に比較してかなり多く蓄積し、マイオザイム 1000ug/ml をメジウム内に投与して完全に蓄積物質の消失が見られた。ゴーシェ病 II 型 iPS 様細胞の細胞質には大きな空胞が確認でき又蓄積物質であるサイコシンが tandem MS で正常の 5 倍程度増加していた。

【考察】ゴーシェ病 II 型の iPS 様細胞は、幹細胞の段階から多量の脂質の蓄積物が電顕上細胞質内に蓄積していた。又ゴーシェ病 iPS 細胞からの神経細胞への分化効率を対象と比較して効率が悪く、セルソーターによる分離でも病的細胞での分化効率の低さを示し、蓄積物の影響と考えられた。又ポンペ病 iPS 細胞への酵素補充療法はマイオザイムの酵素量が多ければ完全に細胞を正常化できることを証明した。

【研究発表】

1. 原著論文

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.* 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.

2) Takenori D, Takeo I, Minami M, Masahiro E, Toya O, Yoshikatu E. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab.* Available online 16 November 2013

3) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab.* 2013 Aug;109(4):386-9.

4) Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood.* 2013;121(16):3267-73.

5) Y. Sato, M. Fujiwara, H. Kobayashi, H. Ida: Massive Accumulation of Glycosaminoglycans in the Aortic Valve of a Patient With Hunter Syndrome During Enzyme Replacement Therapy. *Pediatric Cardiology* 2013;DOI10.1007/s00246-013-0653-0

6) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. *Mol Genet Metab.* 2013 in press

7) J. Ito, T. Saito, C. Numakura, A. Iwaba, S.

Sugahara, R. Ishii, C. Sato, H. Haga, K. Okumoto, Y. Nishise, H. Watanabe, H. Ida, K. Hayasaka, H. Togashi, S. Kawata, Y. Ueno: A Case of Adult Type1 Gaucher Disease Complicated by Temporal Intestinal Hemorrhage. Case Rep Gastroenterol 2013;7:340-346

2. 和論文・総説・書籍

- 1) 衛藤義勝：ライソゾーム病最近の進歩，内分泌・糖尿病・代謝内科 502-511，科学評論社，2013.

【学会発表】

- 1) M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MP) in dried Blood Spots on Filter Paper
The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th
- 2) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS I A) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th
- 3) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto :
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, Japan, 2013 November 27th – 29th
- 4) Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi, Yoshikatsu Eto Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neural Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) and the 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), November 27-29, 2013, Chiba, Japan
- 5) 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, 2013 年
- 6) Ayumi Takamura, Norio Sakai, Michiko Shinpo, Masanari Yamamoto, Aya Narita, Kosaku Ohno, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto. : The Useful Preliminary Diagnosis of Niemann-Pick Disease type C by Filipin Test in Blood Smear 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM), September 3-6, 2013, Barcelona, Spain
- 7) 高村歩美, 酒井規夫, 新寶理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕作, 井田博幸, 衛藤義勝 The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick disease type C - Filipin test in blood smear - ニーマン・ピック病 C 型シンポジウム - 診断と治療 -, 2013 年 4 月 27 日, 東京
- 8) 高村歩美, 衛藤義勝, 藤崎美和, 若林太一, 井田博幸, 萩野谷和裕, 山本真也, 成田綾, 大野耕作 若年型ニーマン・ピック病 C 型 (NPC1) 3 例に対する Miglustat の治療効果. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会, 2012 年 11 月

15-17 日, 岐阜

- 9) 衛藤義勝：ファブリ病の最近の進歩、ファブリ病患者会、大阪 2013, 2,18
- 10) 衛藤義勝、Niemann-Pick C 病の診断、治療に関して、NPC 病シンポジウム、東京、2013.4.27
- 11) 衛藤義勝：ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 日本小児科学会講演, 広島 2013. 4.18
- 12) 衛藤義勝：Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10
- 13) 衛藤義勝：ニーマン・ピック C 病の診断と治療に関して、第 55 回日本小児神経学会 大分 2013.5.31
- 14) 衛藤義勝：Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD、International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
- 15) 衛藤義勝：ファブリ病最新の進歩、ファブリ病研究会、札幌, 2013.10.5
- 16) 衛藤義勝；先天性ムコ多糖症の進歩、久留米小児科医会、2013.10.11
- 17) 衛藤義勝：ゴーシェ病最近の進歩、中国小児内分泌代謝学会アモイ市、福建省 2013.10.23-24
- 18) 衛藤義勝：Lysosomal acid lipase deficiency, アジア小児肝臓消化器学会一ツ橋会館, 東京, 2013.11.1
- 19) 衛藤義勝：ファブリ病 UpDate, 東北ファブリ病患者会 仙台, 2013.11.3
- 20) 衛藤義勝、Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 韓国, 2013, 11,14-16
- 21) 衛藤義勝：New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov.26, 2013
- 22) 衛藤義勝：Future of clinical and research

prospects in inborn error of metabolism, 第 3 回アジア先天代謝学会、舞浜、東京、2013.11.27-29

【知的財産権の出願・登録状況】

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ゴーシェ病のバイオマーカーに関する研究

研究分担者：櫻庭 均（明治薬科大学臨床遺伝学 教授）

研究要旨

ゴーシェ病のバイオマーカー候補として、グルコシルスフィンゴシン(Lyso-GlcCer) とグルコシルセラミド(GlcCer)を考慮し、それらの血漿中濃度の測定法を確立した。前者は、血中糖脂質を抽出して、それに含まれる Lyso-GlcCer をフタルアルデヒド誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。後者は、血中糖脂質に含まれる GlcCer を酵素で脱アシル化した後に、フタルアルデヒド誘導体化して、HPLCで測定した。どちらの場合も、HPLC クロマトグラム上、目的物質に該当する特異的なピークが検出された。本法で、型、型および型のゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度を測定した所、いずれの症例においても、その濃度は対照に比べて高値を示した。特に Lyso-GlcCer に関しては、対照の値が検出限界以下であるのに対して、ゴーシェ病患者では、明らかな高値を示すことから、本症のバイオマーカーとして有用と考えられた。

研究協力者：

兎川忠靖（明治薬科大学生体機能分析学 教授）
月村考宏（明治薬科大学生体機能分析学 助教）

A. 研究目的

ゴーシェ病 (Gaucher disease) は、グルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase) の活性低下により、グルコセレブロシド (glucocerebroside、GlcCer) などの糖脂質が細胞内のライソゾームに蓄積し、肝脾腫、貧血、血小板減少や骨障害などの症状を来す常染色体劣性遺伝病である。本症は、臨床的に、神経症状の有無や発症年齢の違いにより、型（成人型、慢性非神経型）、型（乳児型、急性神経型）および型（若年型、亜急性神経型）に分類される。本症に対しては、哺乳類由来の培養細胞で生産した組換えグルコセレブロシダーゼを用いた酵素補充療法が有効である。そのため、本症の早期診断や治療評価に役立つバイオマーカーが求められている。これまで、ゴーシェ病のバイオマーカー候補として、酸性ホスファターゼ、アンギオテンシン変換酵素やキトトリオシダーゼなどが知られているが、最近、本

症の病態形成に関係すると考えられるGlcCerやそのリゾ体であるグルコシルスフィンゴシン (glucosylsphingosine, Lyso-GlcCer) が注目されている。本研究では、GlcCer および Lyso-GlcCer測定法を確立し、ゴーシェ病患者由来の血漿を試料として、その濃度を測定し、これらがゴーシェ病のバイオマーカーとなり得るかを検討した。

B. 研究方法

1) 試料

型、型および型のゴーシェ病患者と健康者（対照）から採取した血漿を測定試料とした。（倫理面への配慮）

本研究は、明治薬科大学倫理委員会の承認を得て、その規則を遵守して行われた。

2) 血漿中 Lyso-GlcCer の測定

試験管に、血漿 50 μ l と 150 μ l の 1% Triton X-100/CH₃CN 液とを加えて振盪した後、14,000 \times g で5分間の遠心分離を行った。遠心分離により得られた上清画分に 25 μ l の o-フタルアルデヒド試薬 (pH 9.5) を加えて 15 分間反応させた後、

フタルアルデヒド誘導体化された Lyso-GlcCer を高速液体クロマトグラフィー（HPLC, Union UK-C18 カラム, 75mm × 46mm）で分離し、測定した。血漿中の Lyso-GlcCer の定量に際しては、健康者由来の血漿に一定量の Lyso-GlcCer を添加したものを標準として用いた。

3) 血漿中 GlcCer の測定

試験管に、CHCl₃/MeOH(v/v, 1:2)液 450 μl と水 55 μl とを加えた後に、血漿 20 μl を加えて激しく振盪し、14,000 × g で 10 分間の遠心分離を行った。遠心分離により得られた上清画分を別の試験管に移し、CHCl₃ 150 μl と水 225 μl とを加えて 40 回激しく振盪した後、2,000 × g で 5 分間の遠心分離を行った。分離後に上層画分を除き、下層画分に MeOH/水(v/v, 1:1)600 μl を加えて、40 回激しく振盪した後、9,000 × g で 5 分間の遠心分離を行った。分離後に下層画分を分取し、スフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ（Sphingolipid ceramide N-deacylase）を加えて脱アシル化反応を行った。反応終了後に、当該反応液を乾固し、NaOH 200 μl を加えて超音波で溶解させた。そのうちの 50 μl を別の試験管に移し、25 μl の o-フタルアルデヒド試薬（pH 9.5）を加えて 15 分間反応させた後、HPLC で解析した。定量に際しては、健康者由来の血漿に一定量の GlcCer を添加したものを標準として用いた。

C. 研究結果

1) 血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム

健康対照者およびゴーシェ病患者由来の血漿中 Lyso-GlcCer を解析した HPLC クロマトグラムを、それぞれ図 1a および図 1b に示した。対照においては、Lyso-GlcCer を示すピークが見られなかったが、ゴーシェ病患者では明瞭なピークが認められた。

図 1a 健康対照者の血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム

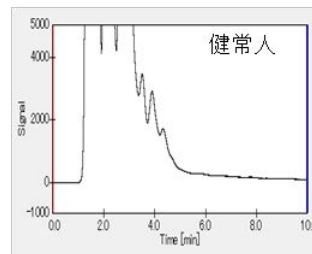
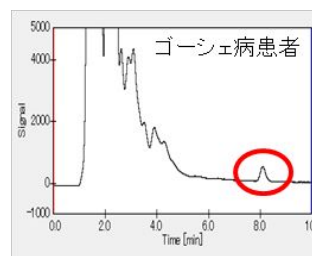


図 1b ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム



2) 血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム

健康対照者およびゴーシェ病患者由来の血漿中 GlcCer を解析した HPLC クロマトグラムを、それぞれ図 2a および図 2b に示した。対照およびゴーシェ病患者ともに、GlcCer を示すピークが認められたが、そのピーク面積は明らかに後者で大きかった。

図 2a 健康対照者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム

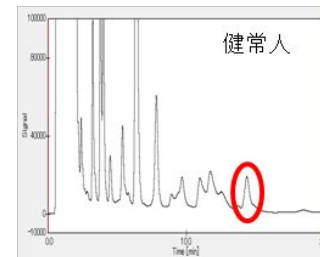
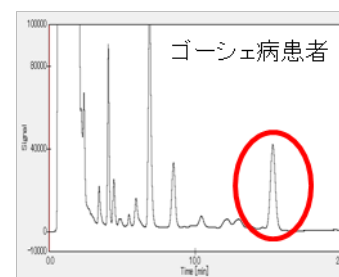


図 2b ゴーシェ病患者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム



3) ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度

Ⅰ型、Ⅱ型およびⅢ型のゴーシェ病患者由来の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度の測定結果を表にまとめた。いずれの臨床型を持つゴーシェ病患者においても、対照に比べて、Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度の増加が認められた。

表 ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度

症例	年齢	性	表現型	Lyso-GlcCer (μmol/l)	GlcCer (μmol/l)
1	33y	男	Ⅰ型	0.19	18.1
2	6m	女	Ⅱ型	0.16	25.3
3	1y10m	女	Ⅲ型	0.16	31.8
対照 (n=10)	21-52 y	男・女	健常	< 0.01	7.9 ± 3.0*

*平均値 ± 標準偏差

D. 考察

本法を用いた解析では、HPLC クロマトグラムで血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer を示す明瞭なピークが観察され、本法は、両者の特異的定量法として有用であると考えられた。ゴーシェ病患者においては、その全ての症例で血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度が対照に比べて高値を示した。血漿中 Lyso-GlcCer 濃度は、GlcCer のそれに比べて低いが、本法で測定した健常者の Lyso-GlcCer 測定値が、すべて測定限界以下(0.01 μmol/l 未満)であるのに対して、ゴーシェ病患者では、その年齢や臨床表現型の違いに拘わらず、明らかな増加を示しており、バイオマーカーとして有用であると考えられた。

E. 結論

Lyso-GlcCer および GlcCer はゴーシェ病のバイオマーカーとして有望であり、特に前者は対照との差が明らかなことから有用と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, et al : Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α-galactosidase A protein levels in serum and plasma. PLoS ONE 8: e78588, 2013
- 2) Saito S, Ohno K, Maita N, et al : Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α-L-iduronidase : Insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I. Mol Genet Metab, in press.
- 3) Saito S, Ohno K, Sakuraba H : Comparative study of structural changes caused by different substitutions at the same residue on α-galactosidase A. PLoS ONE, in press.

2. 学会発表

- 1) Sakuraba H : High risk screening for Fabry disease. Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, Kumamoto, Japan, May. 2013
- 2) Sakuraba H : E66Q: Biochemical, pathological and structural studies. 3rd Update on Fabry Nephropathy: Biomarkers, Progression and Treatment Opportunities, Hong Kong, China, Jun. 2013
- 3) Sakuraba H : Genotype/Phenotype correlation in Fabry disease. The 15th Annual Asia LSD Symposium, Chiba, Japan, Nov. 2013
- 4) Kawashima I, Mitobe S, Kodama T, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Development of enzyme replacement therapy with a modified enzyme and an activator for Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013

- 5) Shibasaki F, Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H.: Development of a highly sensitive immuno-PCR measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 6) Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Futoshi S.: Rapid Immunochromatographic measurement of anti- α -galactosidase A antibodies in Fabry patients Treated with enzyme replacement therapy. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 7) Togawa T, Tsukimura T, Katayama M, Mitobe S, Sakuraba H.: Fabry patients exhibiting no elevation in plasma globotriaosylsphingosine level. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 8) Tsukimura T, Takada M, Aizawa Y, Suzuki T, Katayama M, Sakuraba H, Togawa T.: Comparative study on the content of mannose 6-phosphate residues of recombinant lysosomal enzymes. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 9) Itoh K, Tsuji D, Namba K, Yamaguchi S, Imataki I, Ishimaru N, Sakuraba H.: Establishment of human neural cell culture systems induced from ips cells derived from Tay-Sachs disease patient for drug discovery. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 10) Kitakaze K, Kawano K, Tsuji D, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Sakuraba H, Itoh K.: Imaging of enzyme replacement with a novel fluorescent probe and purified lysosomal β -hexosaminidase carrying M6P-type glycans. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 11) 櫻庭 均：ファブリー病を疑うとき 診断・治療について, ファブリー病セミナー in 新潟, 新潟, 2013. 5
- 12) 櫻庭 均：ファブリー病の治療戦略. 熊本ファブリー病フォーラム, 熊本, 2013. 5
- 13) 櫻庭 均：ファブリー病の新しい治療薬開発に向かって. ふくろうの会 東京シンポジウム 2013, 東京, 2013. 6
- 14) 櫻庭 均：よくわかるシリーズ ファブリー病：ファブリー病の診断法, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013. 6
- 15) 櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. ファブリー病セミナー 腎臓 Special Lecture, 福岡, 2013. 6
- 16) 櫻庭 均：心疾患の中に潜在するファブリー病 ファブリー病の病態・診断について. 第 23 回 Educational Seminar in Cardiology, 東京, 2013. 7
- 17) 櫻庭 均：日常診療に潜在するファブリー病：病態・診断・治療. 福井ファブリー病セミナー, 福井, 2013. 7

- 18) 櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. 川口ファブリー病セミナー, 川口 2013. 7
- 19) 櫻庭 均：ファブリー病の診断方法と最近の話題. 秋田ファブリー病セミナー, 秋田, 2013. 8
- 20) 櫻庭 均：ファブリー病へのアプローチ 診断・治療可能な希少疾患を見逃さないために. 西湘ファブリー病セミナー, 神奈川, 2013. 10
- 21) 櫻庭 均：ファブリー病を知ろう 病態・診断・治療. 函館ファブリー病セミナー, 函館, 2013. 10
- 22) 櫻庭 均：ファブリー病 その診断, 治療の核心に迫る. 弘前ファブリー病セミナー, 青森, 2013. 10
- 23) 櫻庭 均：治療可能な希少疾病ファブリー病～酵素補充療法の実際～. 第 40 回 日本小児臨床薬理学会 学術集会, 横浜, 2013. 11
- 24) 北風圭介, 辻 大輔, 浅沼大祐, 神谷真子, 浦野泰照, 櫻庭 均, 伊藤孝司：酵素の分子構造改変に基づく Tay-Sachs 病治療薬の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 25) 水戸部さゆり, 兎川忠靖, 月村考宏, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 櫻庭 均：血漿中 Lyso-Gb3 濃度の増加を伴わない特異なファブリー病患者群に関する研究. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 26) 月村考宏, 高澤かおり, 山下翔悟, 水戸部さゆり, 鈴木俊宏, 片山昌勅, 兎川忠靖, 櫻庭 均：グロボトリアオシルセラミドの新規測定法の開発: ファブリー病バイオマーカーへの応用. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 27) 高田 大, 相澤良明, 月村考宏, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 櫻庭 均：リソソーム酵素中のマンノース-6-リン酸残基の測定. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 28) 月村考宏, 高田 大, 相澤良明, 鈴木俊宏, 片山昌勅, 櫻庭 均, 兎川忠靖：マンノース-6-

リン酸残基の新規定量法の開発：組換えヒトリソソーム酵素解析への応用. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9

- 29) 北風圭介, 河野加菜子, 田島陽一, 櫻庭 均, 伊藤孝司：テイ サックス病の新規治療薬開発を目指した機能改変型ヒト α -ヘキソサミニダーゼ B の精製および評価. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9

- 30) 田島陽一, 芝崎 太, 櫻庭 均：ポンペマウス骨格筋における p62 と Parkin の蓄積. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013. 12

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度報告書

ムコ多糖症 II 型の中樞神経症状の病態解明に関する研究

分担研究者：田中 あけみ（大阪市立大学大学院医学研究科・准教授）

研究要旨

ムコ多糖症 II 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse (IDS-KO) の脳組織について形態学的検索を行った。20 週齢および 25 週齢の IDS-KO の脳組織の電子顕微鏡による観察より、IDS-KO の脳ではミクログリアの空胞化病変が最初に認められ、その後に神経細胞に異常な封入体が現れることが分かった。しかし、SCMAS (Subunit C of Mitochondrial ATP Synthetase) の免疫染色では、早期より神経細胞に強い染色性を認めた。このことから、IDS-KO の神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、このことが神経細胞障害の主たる要因となっていると推測された。

研究協力者

前田光代（大阪歯科大学・助教）
門野千穂・坂口知子・工藤聡志
（大阪市立大学大学院医学研究科・技術職員）
森本秀人（JCR ファーマ研究所）
濱崎考史（大阪市立大学大学院医学研究科・講師）

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型は、iduronate 2-sulfatase の活性低下によっておこるライソゾーム病のひとつである。X-連鎖性劣性遺伝形式を示し、日本人においてはムコ多糖症全体の約 60% を占める。ムコ多糖症 II 型は、軽症型においては知的障害が認められないが重症型においては認められ、ムコ多糖症 II 型の 70% が重症型である。重症型の神経症状は、初期は発達の遅れとして認められるが、次第に不穏、興奮の状態が起こり、末期には寝たきりとなる。ムコ多糖症 II 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse (IDS-KO) の脳組織について形態学的検索を行った。

B. 研究方法

Iduronate 2-sulfatase knock-out mouse は 5 か月頃から頭蓋顔面骨をはじめ全身の骨変形が明らかになり、動きも鈍くなっていく。寿命は、12 か月程度である。

20 週齢および 25 週齢の IDS-KO の脳組織につき電子顕微鏡による形態学的検索を行った。さらに、オートファジーを形態学的に検索するため SCMAS (Subunit C of Mitochondrial ATP Synthetase) の抗体による免疫染色を行った。

C. 研究結果

20 週齢の脳は、細胞質内に多くの空胞を有したミクログリアが灰白質を中心に多数存在した。空胞の内容は、微細顆粒状であった。これに対し神経細胞には変化が無く、正常の形態所見を呈していた。神経細胞の変化は 25 週齢のマウスにおいてようやく認められ、神経細胞の細胞質内に淡い層をなす渦巻き状の封入体が多数存在した（図 1）。他方、ミクログリアの空胞は大きさを増していた。

SCMAS 染色では、神経細胞は早期に強く染色された（図 2）のに対し、ミクログリアはごく淡く染色されるのみであった。正常コントロールマウスの脳組織ではいずれも染色されなかった（図 3）。また、肝臓においては、IDS-KO および正常コントロールマウスともに染色されなかった。

D. 考察

IDS-KO の脳組織の電子顕微鏡所見において、ミクログリアの空胞化病変が最初に認められ、その後に神経細胞に異常な封入体が現れた。しかし、SCMAS 染色では、早期より神経細胞に強い染色性を認めた。SCMAS はミトコンドリアがオートファジーなどで破壊された状態になると染色される。従って、IDS-KO の神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、障害の主たる要因となっていると推測された。

E. 研究発表

学会発表

1) Tanaka A, Maeda M, Kadono C, Morimoto H, Efficacy of oral administration of

chloroquine on the neuronal cells of
iduronate 2-sulfatase gene knock-out
mouse 第 55 回日本先天代謝異常学会 2013
年 11 月 27 - 29 日 千葉

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

図 1、IDS-KO 神経細胞の電子顕微鏡

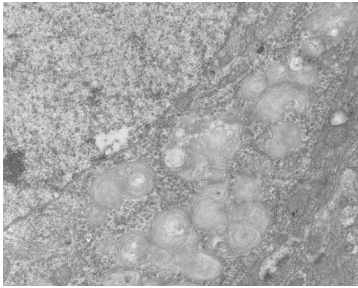


図 2、IDS-KO 脳の SCMAS 免疫染色

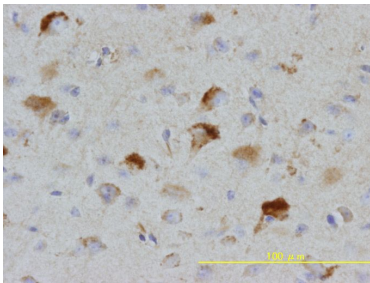
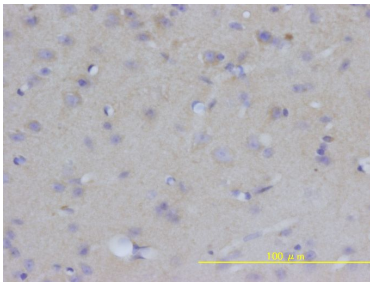


図 3、正常マウス脳の SCMAS 免疫染色



スフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発に関する研究

分担研究者：松田 純子（川崎医科大学 特任教授）

研究要旨

スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解にはライソゾーム酵素に加えてサポシンと呼ばれる糖タンパク質が必要である。プロサポシンは4種類のサポシン A、B、C、D の前駆体タンパク質であるとともに細胞外にも分泌されることから独自の生物機能が示唆されている。我々はプロサポシンの新規機能を探索する目的でプロサポシン強発現マウス (PSAP-Tg) の表現型解析を行った。PSAP-Tg マウスは正常に出生し寿命は1年以上であったが、組織病理学的解析の結果、PSAP-Tg マウスの網膜では視細胞が生後3週齢ころから脱落し、生後5週齢には完全に消失することが明らかになった。網膜におけるプロサポシン/サポシンの発現をイムノプロットと免疫組織染色で検討したところ、プロサポシン/サポシンは網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強い発現が認められた。一方、プロサポシンノックアウトマウスおよびサポシン A、C、D の各欠損マウスには網膜変性の所見を認めなかった。神経セロイドリポフスチノーシスのモデル動物であるカテプシン D 欠損マウスも PSAP-Tg マウスに類似した網膜変性を呈することから、PSAP-Tg マウスは神経セロイドリポフスチノーシスおよび網膜色素変性症の病態解析において有用なモデル動物となることが期待される。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は哺乳動物の生体膜を構成する重要な脂質成分である。スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解には疎水性のスフィンゴ糖脂質と親水性の加水分解酵素を相互作用させるためにサポシン (SAPs) と呼ばれる疎水性の糖タンパク質が必要である。SAP-A、-B、-C、-D は前駆体タンパク質であるプロサポシン (PSAP) がライソゾームに運ばれ、プロテアーゼによる分解を受けて生成される。一方、PSAP は脳脊髄液や母乳、精液などの体液中に豊富に存在し、細胞外に分泌されることから、SAPs の前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能を有することが示唆されている (Sandhoff K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 554-582, 2012.) (図 1)。

ヒト PSAP 欠損症はこれまでに世界で 4 家系

の報告があるが、いずれの報告例も重篤な神経症状と著明な肝脾腫を呈し、新生児早期に死亡している。1996 年に藤田らによって作製されたプロサポシンノックアウトマウス (Psap-KO) は全 SAPs の欠損により全身組織に多彩なスフィンゴ糖脂質が蓄積し、重篤な神経症状を呈して生後 30 日前後で死亡する (Fujita N. et al. *Hum. Mol. Genet.* 5, 711-725, 1996.)。

我々は、これまでの研究で SAP-A, SAP-C, SAP-D の特異的欠損マウスを世界に先駆けて作製し、スフィンゴ脂質蓄積症 (スフィンゴリピドーシス) の病態解明に取り組んできた。本研究では、いまだ不明な点が多い PSAP の新規機能を探索する目的で PSAP トランスジェニックマウス (PSAP-Tg) の表現型解析を行った。

B. 研究方法と結果

1) PSAP トランスジェニックマウスの作製

東海大学医学部分子生命科学の吉村真一博士らとの共同研究によって、マウス ROSA26 遺伝子座位に CAG-ヒト PSAP cDNA-PolyA カセットを挿入し、プロサポシントランスジェニックマウス (PSAP-Tg) を製作した (Otsuka M. et al. *Nucleic Acids Res.*38 (22) e198, 2010.) (図 2)。出生した PSAP-Tg マウスから各臓器を採取し、抗ヒト SAP-B 抗体を用いたイムノプロット解析を行った結果、脳を含む全身組織で PSAP を強く発現していることが確認できた。また、*Psap* KO マウスとの交配実験の結果、トランスジーンを持つ *Psap* KO マウスでは *Psap* KO マウスの致死性やスフィンゴ脂質の蓄積がレスキューされ、トランスジーン由来のヒト PSAP はマウス体内において正常に機能することが確認できた (図 2)。これらの結果から、PSAP-Tg マウスは PSAP を全身で安定的に過剰発現するマウスであることがわかった。

2) PSAP-Tg マウスの表現型解析

PSAP-Tg マウスは正常に出生し、寿命は 1 年以上であった。組織病理学的解析の結果、5 週齢の PSAP-Tg マウスでは網膜の視細胞が完全に消失することが明らかになった。そこで、PSAP-Tg マウスの網膜変性が、いつ、どこで始まるのかを明らかにする目的で、日齢 5 から 5 日間隔で経時的に網膜の組織標本作製し、組織学的解析 (一般組織染色、免疫組織化学染色並びに電子顕微鏡による超微形態観察) を行った。その結果、PSAP-Tg マウスの網膜は正常に形成され、2 週齢頃までは野生型マウスと差異を認めないが、3 週齢頃から視細胞の変性が始まり、5 週齢ではほぼ完全に視細胞が脱落することがわかった (図 3)。アストログリアのマーカ

る GFAP (Glia Fibrillary Acidic Protein) とマイクログリア・マクロファージのマーカである Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) で免疫組織染色を行ったところ、PSAP-Tg マウスの網膜では視細胞の変性・脱落に伴って、著明なグリオシスとマイクログリア・マクロファージ様細胞の浸潤が認められた。また、PSAP-Tg マウスの網膜には視細胞層を中心に自己蛍光物質が認められた。

次に網膜組織の電顕観察を行ったところ、日齢 30 の PSAP-Tg マウスの網膜では、視細胞の外節が変性し、内節部分には膜様封入体を含むファゴゾーム様構造が観察された。視細胞の核からなる外顆粒層には、核質が濃縮した核が多数認められ、視細胞が細胞死に陥っていることが推定された。日齢 44 では視細胞が完全に消失し、多数のファゴゾーム様構造を含むマイクログリア・マクロファージ様細胞が浸潤していた。網膜色素上皮細胞には、ファゴゾーム様構造の増加は認められなかったが、電子密度の高い一層の膜に囲まれたライソゾーム様構造物が増加傾向にあった。

一方、*Psap*-KO マウスおよび *Sap*-A、C、D の各欠損マウスには病末期においても網膜変性の所見を認めなかった。これらの結果から、PSAP-Tg マウスにおける網膜変性は PSAP の過剰発現によって引き起こされていると推測された。

3) 網膜における PSAP、SAPs の発現解析

眼球における PSAP/SAPs の発現をイムノプロットで、検討したところ、マウス PSAP、ヒト PSAP とともに強く発現していた。次に網膜の免疫組織染色で局在を検討したところ、野生型マウス、PSAP-Tg マウスともに PSAP/ SAPs は網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強く発現していた。PSAP-Tg マウスでは活性化アストログリアにも強い発現が認められた。

C. 考察と展望

PSAP には SAPs の前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が示唆されているがいまだ不明な点が多い。本研究によって PSAP-Tg マウスの網膜では網膜色素上皮細胞に隣接する錐体、桿体からなる視細胞層が 3 週齢頃から進行性に変性・脱落することが明らかになった。

これまでに PSAP の SAPs への分解にかかわるカテプシン D の欠損マウスが網膜変性を呈することが報告されている (Koike M. et al. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 146-161, 2003.)。カテプシン D は神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs) の原因遺伝子の一つである。NCLs は網膜病変による視力障害、てんかん、精神退行を特徴とする進行性神経変性疾患で、現在 14 の原因遺伝子 (CLN1 - CLN14) が知られており、カテプシン D 欠損症を含むいくつかの病型では SAP-A および D の細胞内蓄積を認める。

一方、セマフォリン研究を行っている豊福らは、網膜色素変性症の原因遺伝子の一つであるセマフォリン 4A (Sema4A) のノックアウトマウス (Sema4A-KO) が網膜視細胞の変性を呈することを見出し、その分子メカニズム解析から、網膜色素上皮細胞に発現する Sema4A は PSAP と相互作用し、細胞外への PSAP のエキソサイトーシスに必須であることを発見した (Toyofuku T. et al. *Genes Dev.* 26, 816 -829, 2012.)。豊福らは、培養網膜色素上皮細胞が酸化ストレス下で細胞外に PSAP を分泌すること、Sema4A-KO マウスではそれが阻害されていることを示し、PSAP の視細胞保護作用が欠失するために視細胞が脱落すると推論している。しかし、我々の解析では、*Psap*-KO マウスは病末期においても網膜変性を呈さないことから Sema4 欠損による視細胞脱落の原因は、PSAP が網膜色素上皮細胞内にとどまることが原因であると考えられる。

PSAP-Tg マウスの解析結果に加え、上述の報告は PSAP/SAPs の細胞内蓄積と網膜変性の関連を示唆している。今後はその分子メカニズムを明らかにする必要がある。そのため、我々は、網膜色素上皮細胞あるいは視細胞において PSAP と相互作用する分子の同定を試みている。PSAP は脂質結合能をもつ疎水性タンパク質であることから、レチノイドやレチノイド関連タンパク質と相互作用する可能性がある。視細胞では、外節部の細胞膜に存在するオプシンが 11-cis-retinal と結合してロドプシンを構成し、光刺激による 11-cis-retinal から all-trans-retinal への異性化で膜電位変化が起こり視覚が形成される。All-trans-retinal は網膜色素上皮細胞へ輸送され、visual cycle により再生されて、再び視細胞へ供給される。一方、網膜色素上皮細胞は視細胞の外節をファゴサイトーシスにより取り込み、ライソゾームで分解してレチノイドとして再利用している。PSAP-Tg マウスの網膜におけるレチノイド代謝産物量の測定や色素上皮細胞におけるオートファジーフラックスの解析によって、PSAP-Tg マウスの網膜における病態機構の一端が明らかにできるだろう。

網膜色素変性症は失明の主要原因であり、神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs)をはじめ多くのライソゾーム病では網膜色素変性症を合併する。PSAP-Tg マウスの解析により、網膜における PSAP の機能と視細胞変性の分子メカニズムを明らかにすることは、ライソゾーム病態解明に加え、網膜色素変性症の病態メカニズムの解明、予防や治療方法の開発にもつながることが期待される。

D. 結論

PSAP-Tg マウスの網膜では色素上皮細胞に隣接する視細胞層が進行性に変性・脱落することを発見した。プロサポシンにはサポシンの前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が

示唆されていたが不明な点が多かった。今回の研究によって網膜におけるプロサポシンの新たな機能が示された。これが契機となりプロサポシン、サポシン研究の新しい展開がなされると予想される。

PSAP-Tg マウスを用いた動物実験計画書は東海大学の「遺伝子組換え実験安全委員会」および「動物実験委員会」、川崎医科大学の「組換え DNA 実験安全委員会」および「動物実験委員会」から承認を得て施行された。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Murakami, I, Mitsutake, S, Kobayashi, N, Matsuda, J, Suzuki, A, Shigyo, T, Igarashi, Y.: Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 194-197. 2013.
- 2) 松田純子：シアリドーシス．先天代謝異常ハンドブック．中山書店．p.212-213, 2013.

2. 学会発表

- 1) Matsuda J, Ono K, Muto M, Yoneshige A, Yoshimura S.: Overexpression of prosaposin causes severe retinal degeneration in mouse. 第 55 回日本先天代謝異常学会 2013 年 11 月 27-29 日 舞浜 .
- 2) 久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川誠、内田俊也、松田純子、戸田年総、岡崎具樹 . : Saposin D 欠損マウスの 2D-DIGE タンパク質発現解析 - 炭酸脱水酵素(CA2)との関連. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11-13 日 横浜 .

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図1 プロサポシンとサポシンの構造

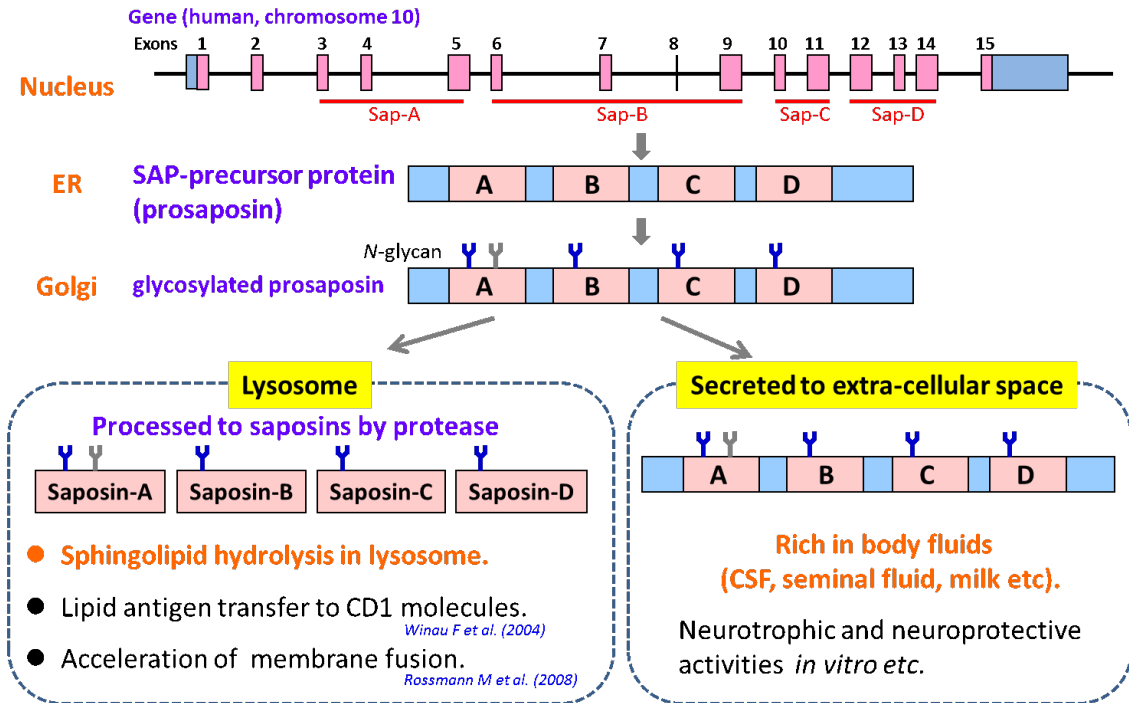
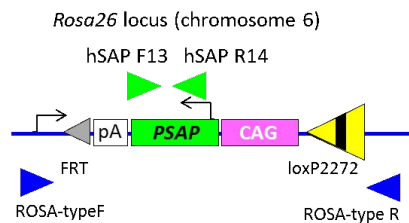


図2 プロサポシントランスジェニックマウスの作製

Targeted insertion of human *PSAP* cDNA into *Rosa26* locus

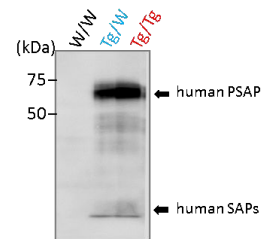
Reference: Ohtsuka M et al., *Nucleic Acids Res* (2010).



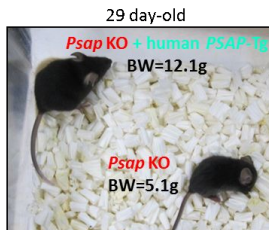
Western blot of human PSAP

anti-human SAP-B antibody

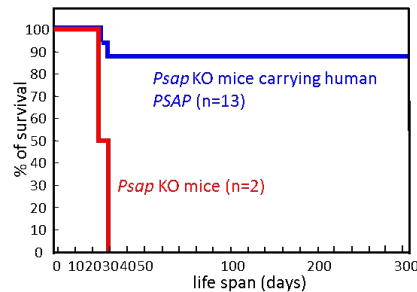
Brain tissue



Lethal phenotypes of *Psap* KO mice were rescued by the expression of human PSAP



Kaplan-Meier survival plots of *Psap* KO mice carrying human *PSAP*



No accumulation of GSLs in the tissues of *Psap* KO mice carrying human *PSAP*

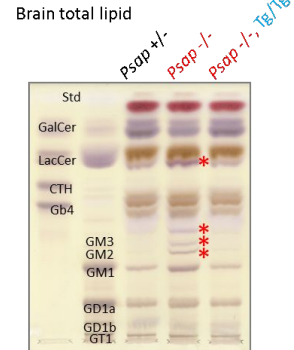
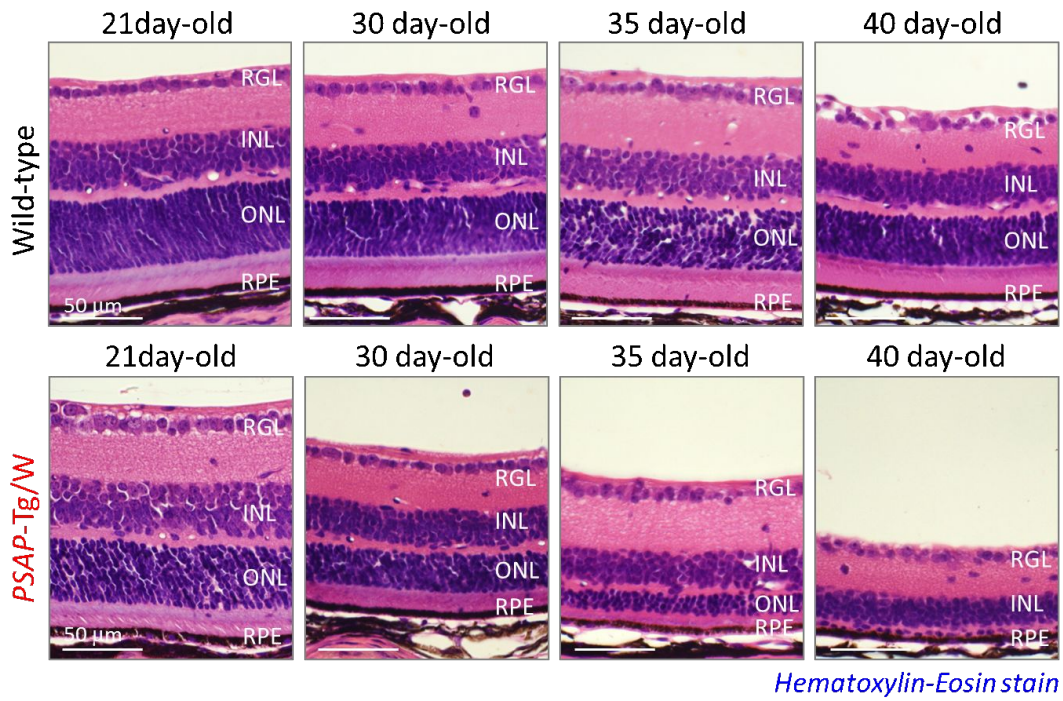


図3 プロサボシントランスジェニックマウスの網膜組織所見



Hematoxylin-Eosin stain

RGL: retinal ganglion layer	INL: inner nuclear layer
ONL: outer nuclear layer	RPE: retinal pigment epithelium

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

疾患特異的二糖を指標としたムコ多糖症 II 型マウスに対する
ex vivo 遺伝子治療の有効性の解析

分担研究者：大橋 十也（東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部教授）

研究要旨

本研究は、グリコサミノグリカン（GAG）を構成する二糖単位に着目し、疾患特異的に蓄積する二糖を指標として、ムコ多糖症 II 型（MPSII）マウスに対する ex vivo 遺伝子治療の有効性を明らかにすることを目的とする。今年度は、MPSII マウスに蓄積する GAG の 1 つであるヘパラン硫酸由来二糖の測定系確立を試み、ヘパリナーゼを用いたヘパラン硫酸の二糖単位への効率的消化条件を決定した。

研究協力者

嶋田 洋太

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
遺伝子治療研究部 助教

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型（MPSII）は、イズロン酸-2-スルファターゼの異常により生じる X 連鎖性劣性遺伝形式のライソゾーム病であり、酵素欠損に伴うグリコサミノグリカン（GAG）の蓄積を特徴とする。本疾患に対する治療法として酵素補充療法及び骨髄移植療法が存在しているが、主要な病変部位の 1 つである中枢神経に対しては両者とも効果は認められず、新たな治療法が求められている。そこで我々は、造血幹細胞に欠損酵素を遺伝子導入し移植するという ex vivo 遺伝子治療法を着想した。

従来、MPSII に対する治療効果の判定には欠損酵素の基質である GAG の定量が有効であり、主として GAG の総量の測定が行われている。しかし最近、従来の測定法では、疾患モデルマウスの中枢神経への GAG の蓄積を詳細に評価することが困難であることが明らかとなり、ex vivo 遺伝子治療法の有効性を評価するためには、より疾患特異的な GAG の測定法の開発が急務である。そこで我々は、GAG を構

成する二糖単位のうち、欠損酵素の基質であるイズロン酸-2-硫酸を含む二糖の測定に着目した。

以上より本研究では、MPSII モデルマウスを用いて ex vivo 遺伝子治療の有効性を解明することを目標とし、本年度はその解析に必要な疾患特異的 GAG 由来二糖の測定系構築を試みた。

B. 研究方法

MPSII で蓄積する GAG の 1 つであるヘパラン硫酸を Sigma 社より購入し、3.3 mM 酢酸カルシウム含有 40mM 酢酸アンモニウム緩衝液にて溶解した各種濃度のヘパリナーゼ II（5, 10, 15, 250 mU）を添加した後に、37 で 16 時間酵素消化を行った。その後、各試料をポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、Tris(bipyridine)ruthenium(II) により染色することでヘパラン硫酸の消化条件を決定した。

消化条件の決定後、その条件に従い作成したヘパラン硫酸由来二糖についてアニリン標識を行い、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）へ展開し、消化産物のピークパターンの検出を行った。

(倫理面への配慮)
倫理的問題はない。

C. 研究結果

ヘパラン硫酸 50 μg について各種濃度のヘパリナーゼ II (5, 10, 15, 50, 250mU) を用いて酵素消化を行ったところ、酵素量依存的な染色強度の低下が認められた (図 1)。この結果は、ヘパラン硫酸がヘパリナーゼ II の濃度依存的に分解されていることを示す。その一方で、高分子領域に検出される長鎖ヘパラン硫酸が 250mU においても認められたことから、これらの条件では酵素消化は未だ不十分であることが示唆された。

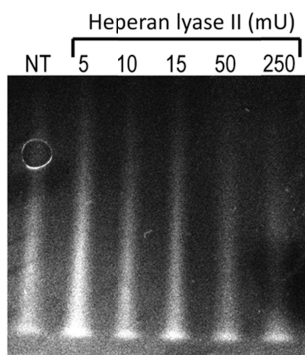


図 1 . ヘパランリナーゼ II による各種濃度のヘパラン硫酸の消化

そこで、より適切な消化条件を決定するために、ヘパラン硫酸 25 μg および 12.5 μg に対して 250mU のヘパリナーゼ II による消化を行った。その結果、25 μg 及び 12.5 μg とともに高分子領域に広がる長鎖のヘパラン硫酸が消失し、短鎖化成分のみとなることが確認された (図 2)。この際、25 μg 及び 12.5 μg とともに消化像に差は認められず、250mU の酵素を使用した場合は 25 μg 以下のヘパラン硫酸を十分に消化し得る事が示唆された。

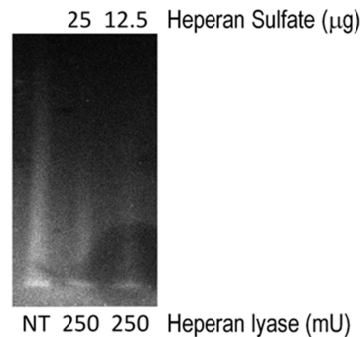


図 2 . ヘパランリナーゼによるヘパラン硫酸の消化条件の決定

さらに、ヘパラン硫酸の消化産物にアニリン標識を施し、逆相 HPLC へ展開したところ、主要なピークが複数認められた (図 3)。

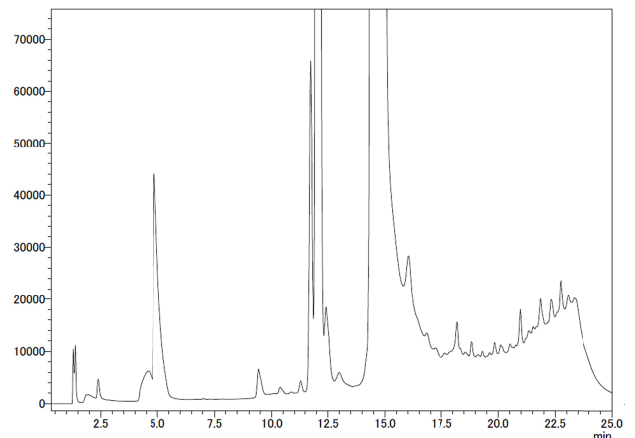


図 3 . ヘパラン硫酸消化産物のクロマトグラフ

以上の結果より、ヘパラン硫酸の消化により複数種の二糖が切り出されていることが示唆された。

D. 考察

ヘパラン硫酸は、イズロン酸と硫酸基に富んだ高硫酸化クラスター領域と、グルクロン酸ならびに N アセチルグルコサミンからなるほとんど硫酸基を含まないドメインから構成されており、多様な糖鎖構造を有することが知られる。そのため、ヘパラン硫酸を二糖単位で消化した場合、その構造多様性に伴って様々な二糖が生成される。本研究で得られたクロマトグラ

フでは複数のピークが確認されたが、これらはヘパラン硫酸の構造多様性を反映していると考えられ、ヘパリナーゼ II を用いた限定分解が成功していることを示唆する。

本研究の最終目的は、疾患特異的 GAG 由来二糖を解析することで MPSII マウスに対する *ex vivo* 遺伝子治療の有効性を解明することである。具体的には、蓄積するヘパラン硫酸の非還元末端に存在する二糖であり、病態を強く反映すると考えられるイズロン酸-2-硫酸, N-硫酸化グルコサミン-6-硫酸 (I2S6) を指標とする。今年度の解析より、クロマトグラフ上で複数のピークが得られたことから、これらを質量解析することで I2S6 を同定することが可能だと考えられる。

今後は、今回決定した消化条件に基づいて調製したヘパラン硫酸消化産物の質量解析を進めると共に *ex vivo* 遺伝子治療を施したモデルマウス由来試料についても同様の操作を進め、その効果の解析を行う予定である。

E. 結論

ex vivo 遺伝子治療の効果解析を行う上で必要となる疾患特異的 GAG 由来二糖の高率的作成条件が決定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

MLPA 法を用いたファブリー病ヘテロ接合の遺伝子診断

分担研究者：大橋 十也（東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部教授）

研究要旨

ファブリー病(FD)は X 染色体連鎖性のライソゾーム病でありその原因遺伝子は ガラク トシダーゼ(GLA)である。よって正常アレルを一つ持つ女性ヘテロ接合患者では PCR 法を 用いた GLA 遺伝子解析は難解となる。今回 GLA 遺伝子に大きな欠損を持つ FD 家系の遺 伝子解析を MLPA 法を用いて行なった所、女性ヘテロ接合の確定診断に至った。MLPA 法 は GLA 遺伝子に欠損を持つヘテロ接合の診断に有用である。

研究協力者

樋口 孝

東京慈恵会医科大学 助教

群と同様のシグナルであった。FD 男性患者 gDNA を用いた GLS 遺伝子解析の結果、 exon2-5 の欠損変異を有していた。

A. 研究目的

GLA 遺伝子は X 染色体上に存在する正常アレルを一つ持つ女性ヘテロ接合の PCR 法を用いた遺伝子解析は困難である。そこで GLA 遺伝子の exon に欠損を持つ FD 家系の女性ヘテロ接合の遺伝子解析を MLPA 法を用いて行った。

B. 研究方法

FD 家系の gDNA を採取した後、MLPA 法による遺伝子解析を行った。患者検体:FD 男性患者 1 名、症候性女性ヘテロ接合 1 名、無症状未診断女性 3 名、男性及び女性対照群各 3 名（倫理面への配慮）

患者検体の採取・解析は慈恵大学の倫理委員会で審査・承認された後行った。

C. 研究結果

MLPA 法による解析の結果、FD 男性患者では GLA 遺伝子 exon2-5 のシグナルが検出できなかった。症候性女性ヘテロ接合では exon2-5 のピーク面積が対症女性群の半分であった。無症状未診断女性の内、2 名は症候性女性ヘテロ接合と同様のシグナルであり、1 名は対象女性

D. 考察

MLPA 法を用いた解析結果により、FD 男性患者は exon2-5 の欠損変異を持つ事が疑われた為、本患者の gDNA を用いて GLA 遺伝子解析を行った所 intron1 途中-exon5 途中までの約 5.5Kb.p.の大きな欠損変異が見つかった。症候性女性ヘテロ接合では exon2-5 のピーク面積が対症女性群の半分になっていた事から、変異 GLA 遺伝子のヘテロ接合という診断に至った。更に無症状女性患者の内、2 名は同 exon に変異を持つヘテロ接合、1 名は遺伝子変異無し診断となった。

E. 結論

MLPA 法は欠損変異を持つ FD 病女性ヘテロ接合の診断に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) ポスター発表・MLPA method is useful tool for genetic diagnosis of female

Fabry disease with deletion mutation(第
3 回アジア先天代謝異常学会/2013 年 11
月/舞浜/P86)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ムコ多糖症 II 型の成長曲線作成

研究分担者：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 II 型（Hunter 病）患者 65 名（男性、治療前）の成長曲線を作成した。
生後 6 か月から 3 歳にかけて多くの症例が過成長を示すこと、ヘルニア（鼠径、臍）の有無と組み合わせることで、早期診断に有用であることが明らかとなった。

研究協力者：

折居忠夫（折居クリニック）

折居建治（岐阜大学小児病態学）

戸松俊治（デュポン小児病院、米国）

Montaño AM（セントルイス大学、米国）

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型（Hunter 病）は骨変形、関節拘縮、肝脾腫、聴力障害、閉塞性呼吸障害、中枢神経障害、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸の蓄積を特徴とする X 連鎖劣性遺伝病であり、造血幹細胞移植や酵素補充療法による治療が行われているが、乳幼児期の成長に関する基礎データは不十分である。今回、Hunter 病患者の成長曲線を作成したので報告する。

B. 研究方法

Hunter 病患者家族の協力を得て、患者 65 名の母子手帳記録に基づき、乳幼児期の成長曲線を解析した。
倫理面への配慮：連結不可能匿名化したデータで解析した。

C. 研究結果及び考察

1) Hunter 病患者の標準身長，標準体重：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）。

2) Hunter 病患者の成長曲線の作成： Hunter 病に特有の成長パターンを明らかにした（図 1、図 2）。

3) 成長パターンと臨床所見（ヘルニア）の組み合わせによるムコ多糖症各病型の早期診断の可能性について明らかにした（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）

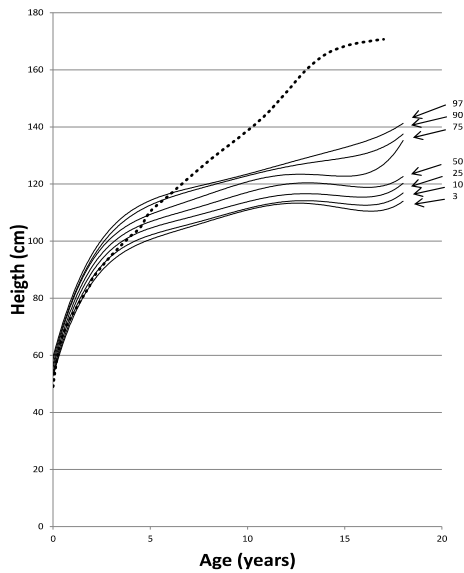


図2 Hunter 病患者の成長曲線（体重）

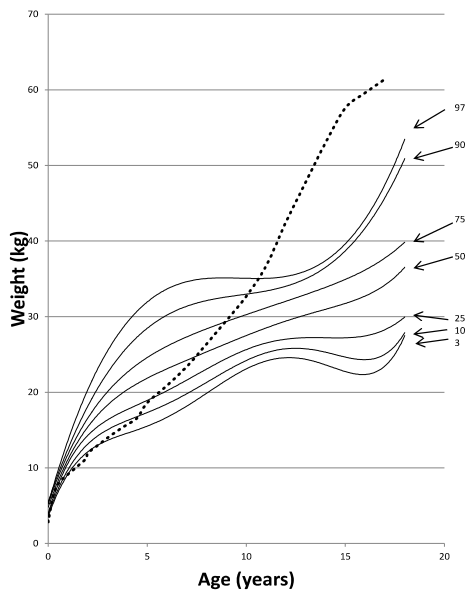


表2 成長と臨床所見（ヘルニア）の組み合わせによる早期診断

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

D. 考察

ムコ多糖症は以前から乳幼児期の過成長が言われてきたが、正確な計測に基づいたデータは存在しなかった。今回、母子手帳の記録を集計し、Hunter 病患者の成長パターンを明らかにすることができた。また過成長と乳児期のヘルニアを組み合わせることで Hunter 病の9割が陽性となることを明らかにした。その他の病型でも同様の傾向を示した。

E. 結論

Hunter 病患者の成長曲線を作成した。過成長と乳児期のヘルニアを組み合わせることで高率にムコ多糖症を臨床的に検出できることを明らかにした。このデータは Hunter 病の早期診断と治療成績の解析に役立つと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Pravin Patel, Yasuyuki Suzuki², Miho Maeda, Eriko Yasuda, Tsutomu Shimada, Kenji E. Orii, Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Growth charts for patients with Hunter Syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism* (in press)

2. 学会発表

1) Yasuyuki Suzuki, Kenji Orii, Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Overgrowth in infants with Hunter disease: Implication for the early clinical detection. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Nov 27-29, 2013, Maihama, Chiba, Japan

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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 NPC1 あるいは NPC2 (C 型) の異常でスフィンゴミエリンあるいはコレステロールがライソゾームに蓄積し、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。脂質蓄積減少をもたらす新たな薬物療法の開発が期待されている。最近、Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の C 型細胞への蓄積脂質減少効果が示された。変異 NPC1 蛋白量の発現量増強による効果とされているが、C 型細胞の二次的 ASM 欠損に対する改善効果も考慮され、本研究ではコレステロール輸送への ASM の関与に関して検討した。

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。

最近、ニーマンピック病 C 型細胞の脂質蓄積に対して Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の効果が報告された。変異 NPC1 蛋白の発現量増強による効果とされている。しかし、HDAC Inhibitor は ASM 活性上昇作用もあり、C 型細胞に伴う二次的 ASM 欠損に対する酵素活性上昇効果もある。本研究では、コレステロール輸送についての ASM の関与に関して検討した。

B. 研究方法

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 (2 μ M)、vorinostat (10 μ M)、panobinostat (75 μ M) を加えコレステロール蓄積を Filipin 染色および Amplex Red cholesterol quantification (Fluoroscan Asent system) にて評価した。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 μ M) を追加で加え検討した。

C. 研究結果

研究結果は以下の通りであった。

1) 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、valproic acid、vorinostat、panobinostat により filipin 染色で明らかに減少することが観察された。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、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が分かった。

2) C 型皮膚線維芽細胞に vorinostat および panobinostat を加えて、さらに追加として

desipramine を加えてその前後で細胞内コレステロール量を Amplex Red cholesterol quantification (Fluorocan Asent system)で定量した。その結果 desipramine 追加した細胞では優位に細胞内コレステロール量の増加を認めた。

D. 考察

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、消失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關与する NPC1 および NPC2 の作用には ASM 活性の存在が大きいことが分かった。

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 が關与する。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 が關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。

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

<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 (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.

<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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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。

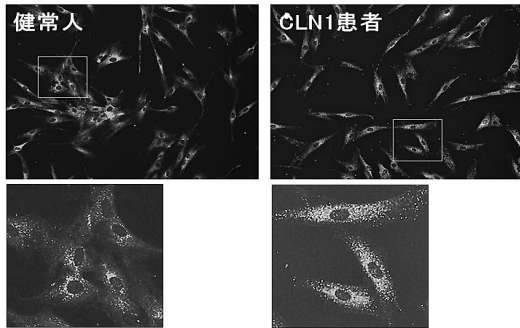


図1 変異型PPT1の細胞内局在

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)。

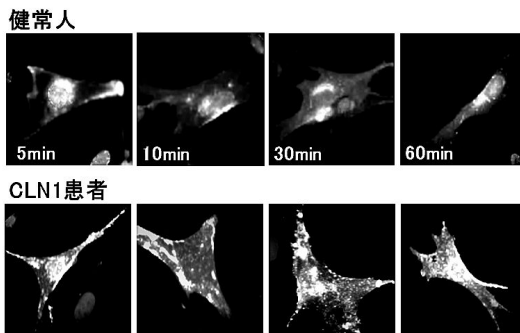


図2 エンドサイトーシス(CTBの取込み)の亢進

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 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 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, 新竈理子, 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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

LC-MS/MS 法を用いてペルオキシソーム病で増減のある血清中リン脂質の網羅的定量測定系の確立を試みた。三連四重極型質量分析計で定量測定に適するとされる 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ことに成功した。血清脂質を用いたところ、実際に患者血清で極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質の増加が確認された。

研究協力者

下澤伸行（岐阜大学生命科学総合研究支援センター・ゲノム分野 教授）
今中常雄（富山大学大学院医学薬学研究部教授）

（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。

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

ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析法は数種類のモードがあるが、親イオンを選択して解裂を行い、分子構造に伴う特異的フラグメントイオンを測定する MRM 法が最も感度がよい。通常は数種類の対象物質について測定するのが通例であるが、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。

次にペルオキシソーム病患者の血清中の脂質を Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出し、この測定系に供した。

C. 研究結果

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

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。さらに昨年度までの研究で用いていた皮膚繊維芽細胞よりはるかに微量な血清でも、測定可能であることがわかった。ホスファチジルセリンについてはさらに例数を増やして検討する必要がある。

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

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)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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 25 年 1 月から 11 月までの国内ペルオキシソーム病診断実績として、Zellweger 症候群 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 5 例、思春期大脳型 1 例、成人大脳型 2 例、AMN 3 例、小脳脳幹型 1 例、アジソン病 1 例、女性保因者 11 例、発症前患者 3 例を診断した。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、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。病態解明・治療法開発研究では ALD の大脳症状の発症因子の解明研究として、大脳型と非大脳型間の患者リソースを用いた DNA・RNA・細胞レベルでの検討に加え、遺伝子改変マウスを用いた中枢神経症状の発症実験を進めている。またペルオキシソーム形成異常症では患者線維芽細胞より iPS 細胞の樹立に加えて、モルフォリノおよび TALEN を用いたペルオキシソーム欠損モデルフィッシュの作製による病態解明を進めている。

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：

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、発生異常の病態を解明する。

3. 疾患モデル生物による検討：

・ALD では遺伝子異常による基本病態は脊髄病変で、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いる。従ってモデルマウスに薬剤などの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。

・ゼブラフィッシュを用いてモルフォリノ、

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 25 年 11 月までの国内診断実績として、Zellweger 症候群 1 例、乳児型 Refsum 病 1 例、ALD では小児大脳型 5 例、思春期大脳型 1 例、成人大脳型 2 例、AMN 3 例、小脳脳幹型 1 例、アジソン病 1 例、女性保因者 11 例、発症前患者 3 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。

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。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の発表等を通じて、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、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 アゴニスト等を投与し、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。

・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、現在引き続き、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構築した複数の共同研究グループにより、病型規定因子の解明から難病克服に繋がるのが期待される。ALD 遺伝子改変マウスを用いた生化学的レベルでの病態解明、治療法の開発、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 細胞樹立による病態解明、ペルオキシソーム欠損モデルフィッシュ作製による病態解明も作成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。

ペルオキシソーム代謝系は発展途上であり、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

原著論文

- 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.

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

- 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

学会発表

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

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

ALD におけるミスセンス ABCD1 をターゲットとした治療薬の開発ならびに新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の分子病態解析

分担研究者：今中 常雄（富山大学大学院医学薬学研究部 教授）

研究要旨

副腎白質ジストロフィー（ALD）は、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異により起こる X 連鎖劣性遺伝子疾患である。ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA のペルオキシソームへの輸送に関与し、その異常による極長鎖脂肪酸蓄積は、ALD の原因となると考えられている。また ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 のうち、約 70% が細胞内で分解される。そこで本研究では、ABCD1 の機能改善を目指した創薬研究のため、まず ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA 輸送の分子機構を解析した。また変異 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞を用いたスクリーニングにより、変異型 ABCD1 を安定化する数種の有効化合物を見出した。さらに、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療のための予備実験を行った。一方、*ABCD4* と *LMBRD1* 遺伝子異常による新規ビタミン B₁₂ 欠乏症（ビタミン B₁₂ のライソゾーム蓄積症）に関しては、*LMBRD1* 遺伝子にコードされる LMBD1 が ABCD4 と複合体を形成し、ABCD4 を小胞体からライソゾームへ輸送するキャリアタンパク質として機能することを見出した。よって ABCD4 もしくは LMBD1 の変異により共通したフェノタイプが起こる理由が明らかになった。

研究協力者氏名

守田雅志：富山大学大学院医学薬学研究部・
准教授

川口甲介：富山大学大学院医学薬学研究部・
助教

A．研究目的

ABCD1 の機能解析

ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与すると考えられているが、その輸送機構の詳細は不明である。ABCD1 の基質輸送機構を理解

することは、ABCD1 の機能を改善する治療薬開発のために重要である。最近、植物ペルオキシソーム膜に局在する ABCD1 ホモログ CTS が極長鎖脂肪酸 CoA を加水分解し、遊離した極長鎖脂肪酸を輸送する可能性が示唆された。そこで本研究では、ヒト ABCD1 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に安定発現させ、ABCD1 の基質輸送機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

副腎白質ジストロフィー（ALD）患者で見出されているミスセンス変異 ABCD1 の約 70%が細胞内で分解される。Zhang らは、ALD 患者由来線維芽細胞を 30 で培養することにより、いくつかの変異型 ABCD1 で機能が回復することを報告している。よって、ミスセンス変異 ABCD1 タンパク質を安定化し、正常にペルオキシソームに局在化する化合物は治療薬候補として有用である。そこで、昨年度までに構築した変異型 ABCD1-GFP 発現 CHO 細胞を用い、ミスセンス変異 ABCD1 の機能を回復させる化合物を探索することを目的とした。さらに、ALD では発病前（発病初期）での骨髄移植が神経症状の抑制に効果があることが、そのメカニズムは分かっていない。そこで、組換えレンチウイルスベクターを作製し、マウス造血幹細胞への感染、及び骨髄移植について検討することにより、造血幹細胞移植による遺伝子治療の有効性明らかにすることを目的とした。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の解析

ビタミン B₁₂ はエンドサイトーシスによってライソゾームに取り込まれた後、細胞質中へと排出され、補酵素型に変換され機能している。最近、ABC トランスポーター ABCD4 とライソゾーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子変異により、ライソゾームから細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送が障害されることが報告された。本研究では、ライソゾームからのビタミン B₁₂ 輸送異常の分子機構を理解するため、ABCD4 のライソゾームへの局在化における LMBD1 の協調的な役割を明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

ABCD1 の機能解析

メタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用い、ABCD1 の N 末端に His タグ付加した融合タンパク質をメタノールで強力に誘導されるアルコールオキシダーゼプロモーター支配下で発現する株を作製した。ABCD1 の細胞内局在性は、ナイコデント密度勾配遠心法により解析した。ATPase 活性はリン酸モリブデン法、acyl-CoA thioesterase 活性はエルマン法を用いて測定した。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 (R518Q、A616T など) の C 末端に GFP を融合した変異 ABCD1-GFP を安定発現する CHO 細胞を 96 well プレートで培養した。そこに既存薬 1948 種類、天然化合物 341 種類、脂質 62 種類（東京大学創薬オープンイノベーションセンターより供与）を最終濃度 20 μM になるように加えた。2 日間培養後、細胞の蛍光強度を測定した。変異 ABCD1-GFP の発現及び細胞内局在性は、イムノプロット法及び蛍光抗体法により確認した。

骨髄移植に関しては、野生型マウスの頸骨から骨髄細胞を採取し、9Gy の放射線照射で骨髄破壊したレシピエントの ABCD1 欠損マウスの眼窩静脈叢に注入した。5 ヶ月後、脳における ABCD1 タンパク質の発現や遺伝子発現をイムノプロット法や RT-PCR 法により解析した。造血幹細胞（lineage 陰性, c-kit 陽性）は、マウス骨髄細胞を MACS で未分化細胞を分離した後、FACS を用いて調製した。調製し

た造血幹細胞に ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させた後、放射線照射処置を施したマウスの眼窩静脈叢に注入することで移植した。レンチウイルスベクターは東京慈恵会医科大学の小林博士より供与して頂いたものを使用した。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 と LMBD1 の C 末端に HA タグ、GFP をそれぞれ付加した融合タンパク質 ABCD4-HA、LMBD1-GFP の発現ベクターを作製した。ABCD4-HA 発現ベクターをヒト肝癌 HuH7 細胞にトランスフェクトし、ABCD4-HA の安定発現細胞を取得した。発現した ABCD4-HA、LMBD1-GFP の細胞内局在性は免疫染色法で解析した。さらに LMBD1-GFP ならびに ABCD4 の各種変異体発現ベクターを作製した。LMBD1 の ABCD4 の局在化への影響は、野生型 ABCD4 と変異型 LMBD1 を共発現させることにより解析した。ABCD4 と LMBD1 の相互作用は抗 HA 抗体を用いた pull down 法で解析した。

(倫理面での配慮)

ALD 患者線維芽細胞は、提供者が子供のため、両親の同意を得て採取したものを使用した。

C . 研究結果

ABCD1 の機能解析

His 抗体を用いたウエスタン解析、蛍光顕微鏡観察、細胞分画により、*P. pastoris* において全長 ABCD1 が発現し、ペルオキシソームに局在化していることが示された。His-ABCD1 発現株のペルオキシソーム画分では、非発現株

と比較し有意な ATPase 活性の増加が認められた。ATPase 活性は脂肪酸ならびに脂肪酸 CoA 添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大した。His-

ABCD1 を発現したペルオキシソーム画分に palmitoyl CoA を加えると、遊離した SH 基を検出できたことから、ABCD1 が ATPase 活性に加え acyl-CoA thioesterase 活性を有することが示された。また、acyl-CoA thioesterase 活性は高濃度の ATP により抑制された。さらに、149 番目のセリンをアラニンに置換した変異型 ABCD1 は、活性を失うことを明らかにした。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞ではプロテアソーム阻害剤(MG132)処理や 30 °C での培養により、ABCD1-GFP の回復が認められた。また同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞でも低温培養により内因性 ABCD1 の回復が認められた。そこで、変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞を用いて蛍光強度の増加を指標した化合物スクリーニングを行った。その結果、野生型 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞に比べて 50%以上の蛍光強度を示す 22 種類の化合物を見出した。次にこれらの化合物について蛍光抗体法により解析を行った結果、既存薬ではアントラサイクリン系抗生物質とボルテゾミブを含む 5 種類の化合物で、天然化合物では 3 種類の化合物で、変異 ABCD1-GFP の回復とペルオキシソームへの局在化が確認された。さらに同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞において、内因性の変異 ABCD1 タンパク質の回復を蛍光抗体法で解

析した結果、既存薬で 2 種類 (ボルテゾミブを含む)、天然化合物で 2 種類の有効化合物を見出した。

造血幹細胞移植実験では、野生型マウスの骨髓細胞を放射線照射した ABCD1 欠損マウスに移植した。5 ヶ月後、脳からペルオキシソーム画分を調製し、ABCD1 タンパク質の発現解析を行った結果、ABCD1 欠損マウスの脳に ABCD1 が発現していることが確認された。一方、ABCD1 欠損マウスの骨髓細胞から、FACS により造血幹細胞を高い純度で回収することができた。この造血幹細胞にヒト ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ、ABCD1 の発現を確認した。現在、ABCD1 発現造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植し、飼育している。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

一過性に発現させた ABCD4-HA は小胞体に、LMBD1-GFP はリソソームに局在していた。一方、ABCD4-HA を安定過剰発現させた HuH7 細胞に LMBD1-GFP を共発現させたところ、ABCD4-HA の局在は小胞体からライソゾームへと変化し、LMBD1-GFP と共局在していた。また、両タンパク質が複合体を形成することも確認した。

ABCD4 の 6 個の膜貫通領域のうち、N 末端側の 2 個の膜貫通領域を欠損した変異型 ABCD4-HA は、LMBD1-GFP と共発現させてもライソゾームには移行しなかった。一方、LMBD1 の 11 個の膜貫通領域のうちの 6 番目以降を欠損した変異型 LMBD1-GFP を ABCD4 と共発現させると、ABCD4 と変異型

LMBD1-GFP は共局在していたが、ライソゾーム上には局在しなかった。

D . 考察

ABCD1 の機能解析

P. pastoris に ABCD1 を活性型酵素として発現させることに成功した。ABCD1 の ATPase 活性は脂肪酸添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大したことから、より長鎖の脂肪酸に高い親和性を持つことが示唆された。さらに、CoA 体への親和性の方が高いと示唆された。ABCD1 のもつ acyl-CoA thioesterase 活性は、149 番目の Ser を Ala にさせることにより失活した。ALD 患者においても同様の変異が報告されているので、ABCD1 の acyl-CoA thioesterase 活性は、基質輸送に必須と考えられる。ABCD1 は極長鎖脂肪酸を認識し、CoA を加水分解により分離し、極長鎖脂肪酸を輸送している可能性が高い。また acyl-CoA thioesterase 活性と ATP 加水分解が協調して極長鎖脂肪酸を輸送していると推測される。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

今回見出した既存薬ボルテゾミブは、多発性骨髓腫の治療薬として認可されている。今後、機能回復に必要な濃度と細胞毒性について検討する予定である。もう一つの既存薬は細胞毒性が低く、脳代謝改善薬として用いられていた薬物であり、血液脳関門を通過する。これらの既存薬は、ALD の候補治療薬になる可能性が考えられる。一方、天然化合物で効果のあった 2 種類は類似構造をもっており、治療薬のシーズ化合物になると考えられる。今後さらに多く

の天然化合物をスクリーニングすることにより、リード化合物を見出す予定である。

骨髄移植により骨髄由来の細胞が脳や脊髄に生着していることが確認された。また、組換えレンチウイルスベクターにより造血幹細胞にヒト ABCD1 を発現させ ABCD1 欠損マウスに移植することができた。現在、順調に飼育されている。今後、移植 5~6 ヶ月後の組織を調製し、生着細胞とその分布について組織化学染色により検討する予定である。本疾患に対する造血幹細胞移植の神経症状抑制のメカニズム解明は、発症機構及び治療戦略を考える上で重要である。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 は単独で過剰発現させると、小胞体に局在したが、LMBD1 との共発現でライソゾームへ移行した。LMBD1 は単独でもライソゾームに局在することから、LMBD1 は ABCD4 をライソゾームへと移行させるキャリアタンパク質としての機能を持つことが示唆された。変異体を用いた解析から、両者の複合体形成には、ABCD4 の N 末端側の 2 つの膜貫通領域、LMBD1 の N 末端側の 5 つの膜貫通領域に重要な部位が存在する可能性が示唆された。さらに、LMBD1 の 6 番目の膜貫通領域以降にライソゾームへの移行シグナルが含まれていることも示唆された。今回、それぞれの変異により同様のフェノタイプが現れる理由が理解できた。今後、我が国においても重篤なビタミン B₁₂ 欠乏症患者から、患者を同定し治療法を確立する必要がある。

E . 結論

ABCD1 の機能解析

ヒト ABCD1 が ATPase 活性とともに acyl-CoA thioesterase 活性を有していることを明らかにした。また、acyl-CoA thioesterase 活性には 149 番目の Ser が活性中心であることも明らかにした。ABCD1 の基質輸送における thioesterase 活性の意義とともに、基質輸送メカニズムを解明することが可能になった。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1 の安定化に有効な既存薬 2 種類及び天然化合物 2 種類を見いだした。既存薬については今後、治療薬としての有効性を検証する。天然化合物については、さらに多くの化合物をスクリーニングし、治療薬のリード化合物を見出す。一方、ヒト ABCD1 を発現した造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植した。今後、脳や脊髄での ABCD1 タンパク質の分布や脂肪酸含量への効果について検討する予定である。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 は単独ではライソゾームへと局在しないことから、ABCD4 がビタミン B₁₂ の輸送体として機能し、LMBD1 が ABCD4 のライソゾームへの移行を補助するキャリアタンパク質として機能すると考えられる。我々は、メタノール資化性酵母を用いたヒト ABCD4 の発現と精製に成功しているため、今後、リポソームに精製 ABCD4 を組み込んだプロテオリポソームを構築することにより、ABCD4 のビタミン B₁₂ 輸送機能が明らかになると考えて

いる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita M, Kobayashi J, Yamazaki K, *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 Inherit Metab Dis Rep** 10: 95-102, 2013
- 2) Hama K, Nagai T, Nishizawa C, *et al.*: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. **Lipids** 48: 1253-1267, 2013

2. 学会発表

- 1) 有村洸平, 守田雅志, Kostsin DG, 山崎こず枝, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーの治療薬開発: ABCD1 タンパク質の安定化を指標としたスクリーニング系の構築患. 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 東京, 2013. 6
- 2) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 3) Kostsin DG, Morita M, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Establishment and application of fluorescence-based assay for screening of chemical compounds that stabilize

mutant ABCD1 protein responsible for adrenoleukodystrophy. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9

- 4) 池島俊季*, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現と機能解析. 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2013. 9
- 5) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 6) 松本隼, 守田雅志, 渡邊康春, 長井良憲, 小林博司, 高津聖志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 7) 高崎満喜子, 渡邊雄一, 深澤力也, 川口甲介, 守田雅志, 大熊芳明, 今中常雄: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013.11
- 8) 兵藤沙織, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: リソソーム膜タンパク質 LMBD1 の異種発現系の構築. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 9) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化における LMBD1 の役割. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 東京, 2013. 11

- 10) Morita M, Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimosawa N, Imanaka T: Screening of chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 11) Yokoyama K, Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Nakanishi, H, Imanaka, T, Shimosawa N, Taguchi R, and Inoue K, Inoue K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013.
- 12) Okamoto T, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T: Subcellular localization of ABC transporter ABCD4 is regulated by LMBD1. 第 36 回日本分子生物学会年会 . 神戸 , 2013, 12

G . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許登録
- 2 . 実用新案登録
- 3 . その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

小児 ALD 脳波における突発性徐波
～ 未発症例の超早期診断に向けて～

分担研究者：加我 牧子（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）

研究要旨

小児副腎白質ジストロフィー症 ALD の前頭型 6 例、後頭型 15 例、未発症型 11 例につき安静覚醒時に前頭、中心、頭頂、後頭の 4 電極から記録されたデジタル脳波の \sim 周波数帯域毎にフーリエ解析を行い、特に α 波含有量について脳表電極の前後に分けて検討した。発症例の α 波含有量は前頭型では前方、後頭型では後方に多く、未発症型では 3 例が前頭型、5 例が後頭型に類似した型を示した。臨床的に前頭型に類似していた 2 例で、治療後は前方の α 波含有量の減少が認められ、後頭型に類似していた 1 例でも、治療後に後方の α 波含有量の減少が認められた。未発症型で徐波分布が後頭型に類似した型を示した 5 例中 3 例ではすでに報告した未発症例の特徴である視覚誘発電位 VEP の高振幅も認められた。脳波の周波数解析が ALD の早期診断と発症部位推定に役立つ可能性を示唆した。今後症例を重ねての検討が必要である。

研究協力者氏名

崎原ことえ、軍司敦子、中村雅子、稲垣真澄
国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部

役だつのではないかと考え検討してきた。今年度は昨年度よりも症例数と検討回数を増やして局財政徐波の存在の有用性について検討することを目的とした。

A. 研究目的

小児副腎白質ジストロフィー症（ALD）特に大脳型の自然歴では発症後数年以内に死に至ることが知られ、発症早期の幹細胞移植のみが現実的には唯一の治療法となっている。大部分が伴性劣性遺伝で、発端者親族では新生児期からの ALD と診断される症例も現実のものとなっている。この間の班研究の中で、MRI 病変が確認される前に神経心理学的検査に異常を生じる症例の存在を明らかにし、発症前の視覚誘発電位 VEP の高振幅も指摘してきた。しかし発症をより早期に、より簡便に診断できる方法を確認することは喫緊の課題である。これまでの研究の一環として聴覚事象関連電位を記録中に突発的な徐波の存在が確認してきており、これが発症の超早期の診断に

B. 研究方法

2005 年 1 月から 2013 年 9 月までの間に幹細胞移植治療前後の評価のため当院に紹介された 20 歳以下の小児 33 例（のべ評価回数 71 回）を対象として解析を行うことにした。このうち 24 症例は治療前に受診された。これらの症例のうち後頭型は 16 例（10 例）、前頭型は 6 例（5 例）、未発症型 11 例（9 例）であった（括弧内は治療前受診例）。解析対象とした脳波は本研究班における検査の一環である聴覚性事象関連電位検査（頭頂部緩反応とミスマッチネガティビティを純音および言語音を課題として記録するため合計計 4 種類）に際して 4 か所の電極（前頭部 Fz、中心部 Cz、頭頂部 Pz、後頭部 Oz）において記録されたデジタル脳波について、 α （2-45Hz）の周

波数帯域毎にフーリエ解析を行った。特に 波含有量は電極の脳表前半 (Fz と Cz) と後半 (Pz と Oz) に分けて分析した。眼球運動や体動などアーチファクトが混入している脳波は除外した。

(倫理面への配慮)

紹介もと病院での主治医の説明に加えて、当院来院時に患児および保護者に、上記検査について説明し、同意を得たうえで検査を実施した。

C . 研究結果

発症例の 波含有量は、前頭型 6 例中 4 例では Fz、Cz により多く、後頭型の発症例 16 例中 11 例で Pz、Oz により多く認められた。前頭型の 6 例中 2 例は例外的に 波含有量が Pz、Oz に多く認められた。この 2 症例は視知覚の異常や VEP の高振幅が見られるなどの後頭葉発症を示唆する非典型的な所見を示していた。後頭型で Fz、Cz の 波の方が多かった症例はなかった。このように 波の含有量分布は例外があるものの発症型に一致し、同一児では課題間の再現性が認められた。また 波含有量には個人差が大きいという特徴がみられた。未発症型では前頭型類似パターンを示した者が 3 例、後頭型に似たパターンを示した者が 5 例あった。前頭型に似たパターンを示した未発症型の 2 例と後頭型に似たパターンを示した未発症の 1 例は、臨床的にも MRI の変化も認められない状態で幹細胞移植治療を受け、治療後にはいずれも 波含有量が減少していることが確認された。未発症型の後頭型に類似した型を示した 5 例中 3 例では、閃光刺激による VEP の高振幅も認められた。

D . 考察

脳波上の 波含有量と局在は ALD の早期診断と局在部位の推定に役立つ可能性がある。今後、症例を重ね、治療前後の脳波の徐波含有量変化を検討し、早期診断の真の指標として確立しうるかどうか検討する必要がある。

E . 結論

小児 ALD において脳波の局在性徐波化が、早期診断に際して発症と発症部位の推定に役立つ可能性を指摘した。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasumira A, Kokubo N, Kaga M, et al : Neurobehavioral and hemodynamic evaluation of Stroop and reverse Stroop interference in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. Brain & Development. (in press).
- 2) Tsujimoto S, Yasumura A, Kaga M et al. Increased prefrontal oxygenation related to distractor-resistant working memory. Child Psychiatry Hum Development 44:678-688, 2013.
- 3) Inoue Y, Ito K, Kaga M, et al, Psychometric properties of Japanese version of the Swanson, Nolan, and Pelham, version-IV Scale-Teacher Form: A study of school children in community samples. Brain & Development. (in press)

2. 学会発表

- 1) 加我牧子, 軍司敦子, 中村雅子, 崎原ことえ, 稲垣真澄: 聴覚失認の神経生理学. 第 43 回日本臨床神経生理学会学術大会. 高知, 2013. 11

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

新しい治療法の開発（ケミカルシャペロン療法）
神経型ゴーシェ病の治療マーカーとしての
髄液グルコシルスフィンゴシン濃度と対光反射

分担研究者：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。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ている。この臨床研究を行うに当たり、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の重要性を認識し、本年度はその探索を行った。

まず、生化学的指標として、神経型ゴーシェ病の神経変性の病態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髄液中濃度をLC-ESI-MS/MSを用いて測定した。神経型ゴーシェ病患者13例と正常コントロール26例で比較したところ、神経型ゴーシェ病患者は正常の29倍と著明な増加を認めた。そして、アンブロキシソールによるシャペロン療法を施行した6例において治療前後で比較したところ、全例で低下を認めた。

次に、生理学的指標として、ゴーシェ病における中枢神経系の症状として対光反射の異常の有無を、赤外線電子瞳孔計を用いて定量的に評価した。ゴーシェ病患者15例（非神経型2例、神経型13例）と正常コントロール33例で比較したところ、神経型ゴーシェ病患者において、著明な潜時の遅延ならびに縮瞳率の低下を認めた。非神経型ゴーシェ病患者では異常を認めなかった。シャペロン療法を施行した6例のうち、評価が可能であった4例に関して全例で潜時ならびに縮瞳率の改善を認めた。

これらより、髄液グルコシルスフィンゴシン濃度と対光反射の異常は、神経型ゴーシェ病の疾患マーカーとなり、また治療効果判定指標としても有用である事が示唆された。

研究協力者

大野耕策・山陰労災病院・病院長

鳥取大学医学部脳神経小児科・名誉教授

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グルコセレブロシダーゼの欠損により、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型と、神経症状を呈する型および型に分類される。

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。

そこで我々はゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発を行ってきた。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2010年より鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得た後、患者家族の同意を得て神経型ゴーシェ病患者に対して、アンブロキシール投与を行い、シャペロン療法の安全性を評価しており、高い忍容性を確認している。

有効性の評価には、従来の痙攣発作頻度の観察や電気生理検査、頭部MRI、末梢血リンパ球のグルコセレブロシダーゼ活性測定を行った。酵素活性は全ての患者において評価が可能であったが、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った。また、通常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った。

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を検討した。

B. 研究方法

(1) 髄液グルコシルスフィンゴシン

対象：

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者ならびに正常コントロール群

方法：

グルコシルスフィンゴシンと内部標準(リゾラクトシルセラミド)は購入した(MATREYA LLC (PA, USA))。QTRAP 5500 triple quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX, MA, USA)を用いて precursor-product ionを検出し、それによって抽出されたサンプルをLC-ESI-MS/MS(Shimadzu Nexera UHPLC、京都、日本)にて測定した。統計解析はMann Whitney検定ならびにpaired t検定を用いた。

(2) 対光反射

対象：酵素補充療法を施行中のゴーシェ病患者(神経型ならびに非神経型)ならびに正常コントロール群

方法：10分間の暗順応の後、赤外線電子瞳孔計(イリスコーダデュアルC10641、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。

(3) シャペロン療法の効果

対象：神経型ゴーシェ病患者

方法：上記(1)(2)に関して、ベースラインの評価を行ったのち、アンブロキシール25mg/kg/日を酵素補充療法に併用し、経口・経管投与を開始し、治療後の効果評価した。

本研究は鳥取大学倫理委員会の承認を得て、本人ならびに保護者の同意を得て行った。また、(3)に関しては、UMIN-CTRにも登録済である(UMIN000009392)。

C. 結果

(1) 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(型6例、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)にて測定

を行った。

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が確認された（図 1）。

型と型の比較では、統計学的有意差は認めなかったが、乳児期発症急性進行性の型（中央値 237.45 pg/ml）が慢性進行性である型（中央値 83.95pg/ml）より高値であった。

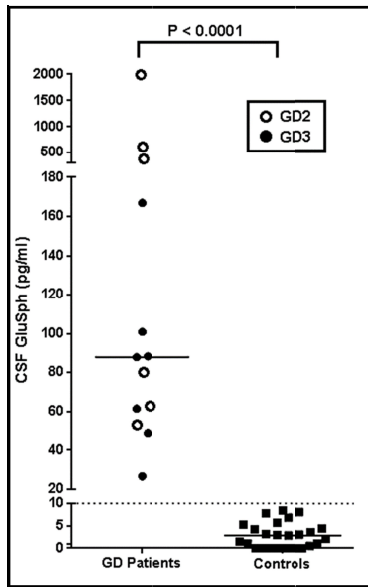


図 1 髄液グルコシルスフィンゴシン

アンブロキソールによるシャペロン療法（25mg/kg/日）をベースラインの評価後に開始し、髄液グルコシルスフィンゴシン（6 例）ならびに対光反射（4 例）の測定を 12 ヶ月後に施行した。

髄液グルコシルスフィンゴシンは全例で治療開始 12 ヶ月後にベースラインより低下を認めた（図 2）。

対光反射に関しても、評価が可能であった 4 例に関して、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 3）。

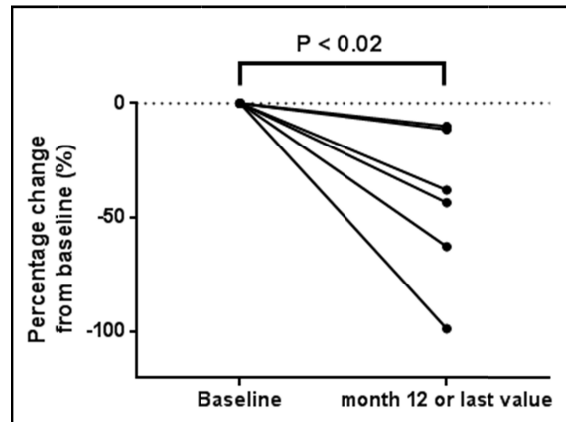


図 2 髄液グルコシルスフィンゴシンの変化

（2）対光反射

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者 15 例（型 2 例、型 6 例、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）にて測定を行った。

神経型（型および型）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た。非神経型（型）の 2 例にはいずれの異常も認めなかった。

（3）シャペロン療法の効果

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者 6 例（型 2 例、型 4 例）に対して

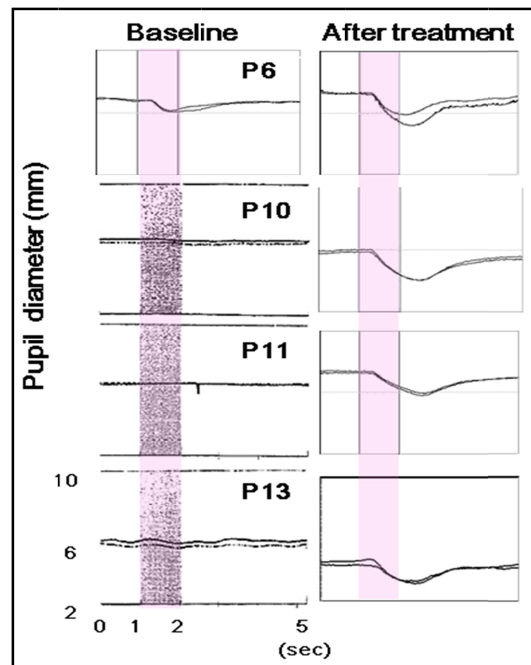


図 3 対光反射の変化

D. 考察

本研究では、LC-ESI-MS/MS を用いて髄液グルコシルスフィンゴシンの安定した測定系を構築した。LC-ESI-MS/MS による髄液グルコシルスフィンゴシンの測定は初の報告となる。

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、神経型の中樞神経に過剰蓄積し、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、中樞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られたことは、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。

また、神経ゴーシェ病では対光反射の異常が生じる事も、電子瞳孔計による客観的評価系を用いる事ではじめて明らかにした。ゴーシェ病で対光反射の生じる機序は明確ではないが、網膜～視神経～中脳～動眼神経に至る対光反射経路のいずれかの神経機能不全がゴーシェ病では生じており、基質の減少に伴って、神経回路の機能不全が改善する結果、消失していた対光反射が再出現するものと考えられる。今回の症例では視神経や動眼神経に明らかな障害を認めなかったこと、またムコ多糖症などの他のライソゾーム病では網膜のグリア細胞に基質が蓄積する事が知られてい

ることなどから、ゴーシェ病でも網膜や脳幹のグリア細胞の機能不全によるがあるも推測され、今後更なる研究を進めていくこととしている。

E. 結論

神経型ゴーシェ病では髄液グルコシルスフィンゴシンが増加し、対光反射の異常を呈する事が明らかになった。また、シャペロン療法を行う事で、両パラメーターの改善を確認する事が出来た。

これらより髄液グルコシルスフィンゴシンならびに対光反射測定は、神経型ゴーシェ病の早期診断とシャペロン療法による中樞神経治療に対する客観的評価法として有効であることが示唆された。

今後は症例数を増やし、非神経型の評価も加え、より神経型の指標としての特異性を検討するとともに、シャペロン療法の効果判定法としての有効性を更に検証していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

2. 学会発表

- 1) Aya Narita, Kousaku Ohno, et al. Chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 13th Lysosomal Disease Network World Symposium .Orlando, Feb. 2013
- 2) 成田綾、板村真司、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するアンプロキソ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
- 3) 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

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 4 検体（GM1-ガングリオシドーシス 2 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 の残存酵素活性に対する上昇効果を検討した。

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い、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の有無を判定し、変異型との相関を明らかにすることで、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 2 検体について遺伝子変異解析を行い、M1C/R49G および R59H/R59H 変異を同定した。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。

GM1-ガングリオシドーシス患者（R59H/R59H）由来培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討の結果、NOEV と 6S-NBI-DGJ いずれも有効性を示さなかった。

D. 考察

今回同定した変異のうち、GM1-ガングリオシドーシス 2 検体で同定された R59H は Inf GM1 の変異として既に報告された変異であったが、M1C と R49G 変異は報告のない変異型であった。また、モルキオ B 病 2 検体においては、R482H と T500A はモルキオ B 病の変異として報告のある変異で、R68Q は Inf GM1 の変異として報告されている。モルキオ B と GM1 の変異をヘテロで持つ患者においては、骨格異常と中枢神経症状を示す症例の報告もあるが、今回の R68Q/T500A 変異の症例では、現時点で中枢症状は示しておらず、今後の経

過観察が必要と考えられる。

シャペロン化合物 NOEV, 6S-NBI-DGJ とともに R59H 変異細胞に対する有効性を認めなかったが、これは以前の我々の変異 cDNA 発現細胞系の結果と一致する。今後はこのような既存の化合物が有効性を示さない変異型に有効な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。患者由来皮膚線維芽細胞に対する 2 つのシャペロン化合物の有効性を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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. 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
- 2) 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. β -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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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総合医科学研究所遺伝子治療研究部）

研究要旨

ムコ多糖症 VII 型(MPSVII、スライ病)、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。我々は組換えレンチウイルスベクターを用いて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 を組込んだレンチウイルスを作成し、新生児モデル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、オートファジー活性の変化も得られた。次にクラッペ病の欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスも開発し、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ケンスを改変した codon optimization GALC を組み込み、同様に効果を検討した。

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℃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ケンスを改変した 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 LC3 I/II といったオートファジー活性を示すマーカー蛋白質をウエスタンブロットで検討したところオートファジービルドアップが無治療群に比べて遺伝子治療群では抑制されていたが、7 週令に比べて 31 週令ではややその効果が減弱していた。更に生命予後も有意差を持って改善していた(p<0.01)。

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 またはオリゴデンドロサイト細胞株：下図 1）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 が見られたが、in vivo でも体重増加などでやや優位性が見られた。

図1 ヒトオリゴデンドロサイト細胞株へのレンチウイルスベクターによるGFP遺伝子導入

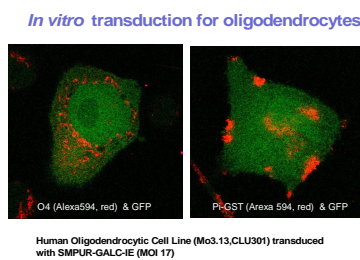
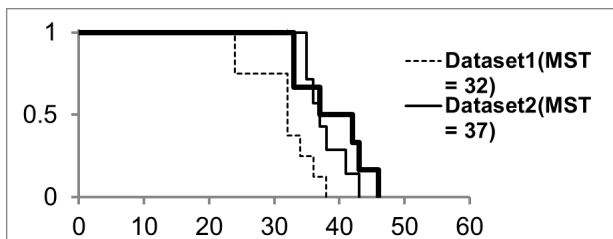


図2 Krabbe 病モデルマウスの生存曲線



点線：無治療群

実線：遺伝子治療群 (p=0.03)

太線：遺伝子治療・基質阻害剤併用群 (p=0.013)

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・症状発現遅延効果が得られ、基質合成阻害剤や codon optimization GALC を用いることで更に相乗効果が期待された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) Gene Therapy for KrabbeDisease. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Takeo Iwamoto, Tkakahiro 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

クラッペ病のシャペロン療法の開発

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

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、遺伝性白質ジストロフィーとして治療法は早期の造血細胞移植しかなく、現実には治療の適応がない症例も多い。我々はクラッペ病の病態解明を行なってきており、その分子生物学的解析を応用して、シャペロン療法の有効性について解析したので報告する。

A. 研究目的

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、進行性の脱髄疾患である。唯一の治療法が遅発型に対する造血幹細胞移植であるが、治療のリスクもあり、神経症状のごく早期に施行しないと有効性は少なく、多くの患者さんに適応できないものである。我々は同じ ガラクトシダーゼ欠損症である GM1 ガングリオシドーシスに有効であることが証明された NOEV(N-octyl-4-epi-β-valienamine) の有効性を解析し、シャペロン療法の可能性をさぐることを目的とした。

B. 研究方法

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；正常酵素の発現系における酵素溶液に対する NOEV の濃度依存性の効果をしらべた。

2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；一過性発現系を pSVL に組み込んだ正常と各種変異酵素 cDNA の発現ベクターを構成し、COSI 細胞に発現させた。その酵素を含む細胞抽出液を用いて、48 度の熱処理を 0-15 分行ない、NOEV の濃度をふ

ってその酵素活性に与える影響を調べた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用いた *in vivo* での NOEV の効果；正常と各種変異の発現ベクターを COSI 細胞に導入し、その後培養液に 0-20 μM の NOEV を添加して、5 日後の酵素活性を解析した。そして、それぞれのサンプルの Western blot を行ない、ガラクトセレブロシダーゼの解析を行ない、前駆体と成熟蛋白の量を解析した。

C. 研究結果

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白の酵素を阻害し、有効な酵素阻害剤であることが証明された。

2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白も変異タンパク質も濃度依存性に熱安定性を向上させた。その効果は正常蛋白に最も強く、次に遅発型の変異、乳児型変異にはやや弱い効果が得られた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用

いた *in vivo* での NOEV の効果；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 4 つに対してはいずれも有効性が見られ、2 μ M で最大の効果を認めた。(図 1)

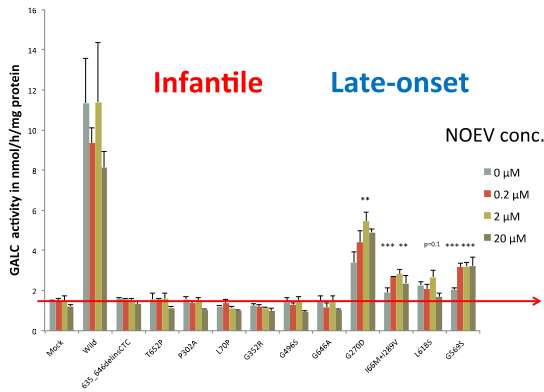


図 1

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。(図 2)

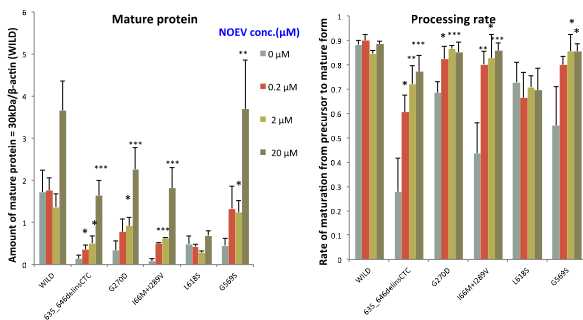


図 2 n

00

D. 考察

G_{M1} ガングリオシドーシスに有効性の証明さ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。

そして、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

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。今後、モデル動物においてその有効性を確認したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M., An adult patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism., **Brain Dev.** 35(5):462-5, 2013
- 2) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shirota 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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.
- 6) 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:pil: S0378-1119(13)01515-1. 10.1016/j.gene.2013.11.003.
- 2 . 学会発表
- 1) 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 5 5 回日本小児神経学会学術集会、2013.5
- 2) 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
- 3) 新寶 理子、青天目 信、近藤 秀仁、 Mohammad Arif Hossain、濱田 悠介、酒井 規夫、大園 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 酒井規夫、ムコ多糖症と遺伝カウンセリング、第 1 回ムコ多糖症フォーラム、2013.7
- 8) Hossain MA¹, Higaki K², Nanba E², Suzuki Y³, Ozono K¹, Sakai N、CHAPERONE THERAPY FOR KRABBE DISEASE; JAPANESE LATE-ONSET MUTATIONS CAN BE TREATED EFFECTIVELY BY NOEV、ICIEM2013.9
- 9) Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo¹, Mohammad Arif Hossain¹, Yusuke Hamada¹, Norio Sakai¹, Yoshihiro Asano², Takeshi Masaki², Tadayasu Togawa³, Keichi Ozono, A case report of Fabry disease with chronic heart failure treated with amiodarone, ACIMD2013.11
- 10) Mohammad Arif Hossain¹, Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹ , NOEV treatment option for Japanese Krabbe disease, ACIMD2013.11
- 11) Mohammad Arif Hossain¹, Michiko Shinpo¹ Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio

Sakai¹ , NOEV can stabilize β -galactosidase in galactosialidosis patients' skin fibroblasts effectively and cause normalization of its activity, ACIMD2013.11

- 12) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Kouji Tominaga, Shin Nabatame, Takeshi Okinaga, Yoshiko Hashii, Norio Sakai, Keichi Ozono, Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for three patients with metachromatic leukodystrophy , ACIMD2013.11
- 13) Yusuke Hamada¹, Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo ¹, Yoshiro Wada² , Norio Sakai¹, Yutaka Sumida², Kiichi Ozono¹, Different clinical course of propionic acidemia in two siblings, ACIMD2013.11
- 14) Motohiro Akagi^{1, 2}, Mohammad Arif Hossain¹, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, Yoshinori Okumura³, Clinicogenetical features of a Japanese patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA), ACIMD2013.11
- 15) N. Sakai¹, X.F. Gu², H. Ida³ on behalf of the EDGE investigators, O. Kawaguchi⁴, Y. Xue⁵, A phase 3 study evaluating once versus twice daily dosing of eliglustat in patients with Gaucher disease type 1 (GD1): Interim results from the lead in period, ACIMD2013.11
- 16) Akemi Tanaka¹, Takashi Hamazaki¹, Motomichi Kosuga². Torayuki Okuyama², Yasuyuki Suzuki³, Norio Sakai⁴, Tomo Sawada¹, Hiromasa Yabe⁵, Mika Ishige⁶, Hideo Mugishima⁶, Shunichi Kato⁵, Efficacy of hematopoietic stem cell

transplantation versus enzyme replacement therapy on intelligence in the patients with Mucopolysaccharidosis type II, ACIMD2013.11

G . 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

特願 2011-101560 (発明の名称 : リソソーム病治療用医薬組成物) として 2011 年 4 月 28 日に出願

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度研究報告書

ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み

研究分担者：渡邊 順子（久留米大学 准教授）

研究要旨

同種骨髄移植後のゴーシェ病 III 型患者に対しムコソルバン療法を開始するにあたって、治療前判定を行なった。神経症状の進行は思春期半ばまで抑制されており、BMT が臨床症状の進行緩和効果がある可能性が示唆された。ムコソルバン添加時の患者皮膚線維芽細胞では GBA 酵素活性が上昇しており、眼球運動やミオクローヌスの改善を指標に、ムコソルバン療法を導入し、効果判定を行なっていく。

研究協力者：

芳野 信 久留米大学・客員教授
弓削健太郎 久留米大学・助教
大野耕策 山陰労災病院・院長
成田 綾 鳥取大学・大学院

A. 研究目的

ゴーシェ病の治療としては、現在、骨髄移植、酵素補充療法が行われているが、いずれの治療法も神経症状の改善には効果が乏しいと考えられる。III 型の骨髄移植症例に対してムコソルバン療法の効果に期待している。今回、ムコソルバン療法導入にあたり、治療前判定を試みた。

B. 研究方法

対象は、4 歳時に実兄をドナーとして骨髄移植が行われた 25 歳のゴーシェ病 III 型の女性。

C. 研究成果

【症例の概要】

9 ヶ月時、喉頭痙攣で発症。3 歳 7 ヶ月時、酵素診断（ α -グルコシダーゼ活性低下）および遺伝子解析（D409H/IVS10-1）の結果、Gaucher 病 III 型と確定。4 歳 0 ヶ月時に脾臓摘出後に同種骨髄移植を施行されている。移植後 13 年 6 ヶ月

経過時には、ドナー細胞（野生型ホモ）が 100% であり、酵素活性はドナーと同レベルであり、ドナー細胞の持続的生着が確認された。15 歳前後から歩行障害が出現し、18 歳以降は筋緊張が強くなり、その後も意識消失や全身性の強直発作を時に認めた。20 歳から 1 年 5 ヶ月間、酵素補充療法を行ったが神経症状は不変であったことから中止した。現在は、不随意運動、強直発作のため座位保持が不可能で、主に腹臥位の状態で生活している。

リンパ球酵素活性測定

GBA 酵素活性は 4.72nmol/mg protein/h (ref.4.69 \pm 1.06) であり、同時に測定した β -gal 活性は 229.7(ref.127.8 \pm 33.6)、 β -Hex 活性は 2081.6(ref.1679 \pm 578) であった。開始前のリンパ球 GBA 酵素活性は正常であり、ムコソルバン添加時の培養皮膚線維芽細胞における GBA 酵素活性は約 1.5 倍に増加した。上記より in vivo では、本症例でのムコソルバンの有効性が示唆された。

眼球運動・対光反射

追視はゆっくりであれば左右はほぼ制限なく可能、速い動きは特に右方で追視不可。下方は動

かすことができるが、上方は動かせない。眼振なし。対光反射は左でやや緩慢であったが、有意な左右差なし。赤色刺激の潜時(T1)は2.0~2.3SDと極々軽度遅延していたが、縮瞳率はコントロールに比し有意差なく、青色刺激への反応は正常であった。

認知機能評価

WAIS-Ⅲ:言語性IQ:55、動作性IQ:算出不可、全IQ:算出不可(言語理解:54、知覚統合:54、作動記憶:54、処理速度:算出不可)

神経学的所見

眼球運動:追視はゆっくりであれば左右はほぼ制限なく可能、速い動きは特に右方で追視不可。下方は動かすことができるが、上方は動かせない(供覧)。眼振なし。対光反射はやや左が緩慢。顔面筋麻痺なし、表情は乏しい。顔面知覚の異常なし。僧帽筋・胸鎖乳突筋:自動運動は不可。嚥下障害あり、ストローで飲むことは不可。口の開閉、舌突出は可能だが不完全。舌偏倚なし、舌萎縮なし、線維束性収縮あり。

D. 考察

幼児期に同種骨髄移植を行なったが15歳前後から神経症状の進行、増悪を認めている症例である。ドナー細胞の持続的生着があるにもかかわらずADLの低下を認めており、神経系へのBMTの効果が限定的であることが示唆された。一方で対光反射の異常はごく軽度であり、肝脾腫は無く、臓器によるBMTの効果に差があると考えられた。患者皮膚線維芽細胞ではムコソルバンの対する酵素活性の上昇が確認されており、神経症状への効果を期待しうると考えられた。赤色刺激を用いた対光反射の潜時が改善してくれば治療のマーカーとしては有用と考えられる。

E. 結論

Gaucher病型の臨床像はかなり多様性に富むためBMTの効果を評価するのは困難であるが、本患者は型の既報例と比較して、思春期中盤以

降の神経症状の進行は相対的に遅いと考えられる。BMTは一定の効果を得られたと考えられるが、眼球運動やミオクロームの改善を指標に、本症例に対してムコソルバンの効果を検証していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ihara K, Yoshino M, Watanabe Y, et al.: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: a previously unrecognized complication. *Pediatrics*. 2013 Jan;131(1):e327-30.
- 2) Okano Y, Yoshino M, Watanabe Y, et al.: Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage. *Mol Genet Metab*. 2013 May;109(1):9-13.
- 3) Hara M, Matsuishi T, Yoshino M, et al.: An adult patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. *Brain Dev*. 2013 May;35(5):462-5.

2. 学会発表

- 1) 古賀木綿子、原田なをみ、松石豊次郎、猪口隆洋、芳野 信、松石豊次郎、渡邊順子. オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症(OTCD)のat risk新生児における迅速診断の有用性 第473回日本小児科学会福岡地方会 2013.2.9(福岡市)
- 2) Yano S, Miyake N, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Goto Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N: Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II defects may affect multiple metabolic pathways. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism 2013.9.3-9.6 (Barcelona)

- 3) Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T: Intragenic deletion in ornithine transcarbamylase gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism 2013.9.3-9.6 (Barcelona)
- 4) Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizuochi T, Iwamoto J, Yoshino M, Inokuchi T, Yano S, Watanabe S, Yoshiura K, Matsuishi T: An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. Annual Symposium of the American Society of Human Genetics 2013.10.22-26 (Boston)
- 5) Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Application of SNP-based haplotype analysis to prenatal monitoring in a pregnancy at risk for ornithine transcarbamylase deficiency. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 6) Harada N, Yoshida M, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Intragenic deletion in OTC gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 7) Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizuochi T, Takeuchi T, Iwamoto J, Yoshino M, Watanabe S, Inokuchi T, Yano S, Yoshiura K, Matsuishi T. : An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Chiba)
- 8) Okano Y, Kobayashi K, Ihara K, Ito T, Yoshino M, Watanabe Y, Kaji S, Ohura T, Nagao M, Noguchi A, Mushiaki S, Hohashi N, Hashimoto-Tamaoki T. : Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 9) 弓削康太郎、芳野 信、渡邊順子 : ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業班会議 2013.9.26 (東京)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
無し
 2. 実用新案登録
無し
 3. その他
無し

衛藤義勝、井田博幸、大橋十也、小林博司

[論文発表]

- 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.* 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.
- 2) Takenori D, Takeo I, Minami M, Masahiro E, Toya O, Yoshikatu E.: A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab.* Available online 16 November 2013
- 3) Sato Y, Fujiwara M, Kobayashi H, Ida H. Massive accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with hunter syndrome during enzyme replacement therapy. *Pediatr Cardiol.* 2013 Dec;34(8):2077-9.
- 4) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab.* 2013 Sep 21.
- 5) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab.* 2013 Aug;109(4):386-9.
- 6) Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood.* 2013 Apr 18;121(16):3267-73.
- 7) J. Ito, T. Saito, C. Numakura, A. Iwaba, S. Sugahara, R. Ishii, C. Sato, H. Haga, K. Okumoto, Y. Nishise, H. Watanabe, H. Ida, K. Hayasaka, H. Togashi, S. Kawata, Y. Ueno: A Case of Adult Type1 Gaucher Disease Complicated by Temporal Intestinal Hemorrhage. *Case Rep Gastroenterol* 2013;7:340-346

[学会発表]

- 1) M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MP) in dried Blood Spots on Filter Paper, The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th
- 2) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS I A) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th
- 3) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis A (MPS I A) in Japanese The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Chiba, Japan, 2013 November 27th – 29th
- 4) Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi, Yoshikatsu Eto Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neural Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) and the 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), November 27-29, 2013, Chiba, Japan

- 5) Ayumi Takamura, Norio Sakai, Michiko Shinpo, Masanari Yamamoto, Aya Narita, Kosaku Ohno, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto: The Useful Preliminary Diagnosis of Niemann-Pick Disease type C by Filipin Test in Blood Smear 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM), September 3-6, 2013, Barcelona, Spain
- 6) Eto Y: Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10
- 7) Eto Y: Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD, International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
- 8) Eto Y: Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 2013, 11, 14-16
- 9) Eto Y: New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov. 26, 2013
- 10) Eto Y: Future of clinical and research prospects in inborn error of metabolism, 第3回アジア先天代謝学会、舞浜、東京 2013.11.27-29

田中あけみ

【学会発表】

- 1) Tanaka A, Maeda M, Kadono C, Morimoto H, Efficacy of oral administration of chloroquine on the neuronal cells of iduronate 2-sulfatase gene knock-out mouse 第55回日本先天代謝異常学会 2013年11月27-29日 千葉

酒井 規夫

【論文発表】

- 1) 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
- 2) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shirota 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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.

- 6) 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.

【学会発表】

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 新竇 理子、青天目 信、近藤 秀仁、Mohammad Arif Hossain、濱田 悠介、酒井 規夫、大園 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 酒井規夫、ムコ多糖症と遺伝カウンセリング、第 1 回ムコ多糖症フォーラム、2013.7
- 8) Hossain MA¹, Higaki K², Nanba E², Suzuki Y³, Ozono K¹, Sakai N, CHAPERONE THERAPY FOR KRABBE DISEASE; JAPANESE LATE-ONSET MUTATIONS CAN BE TREATED EFFECTIVELY BY NOEV, ICIEM2013.9
- 9) Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo¹, Mohammad Arif Hossain¹, Yusuke Hamada¹, Norio Sakai¹, Yoshihiro Asano², Takeshi Masaki², Tadayasu Togawa³, Keichi Ozono, A case report of Fabry disease with chronic heart failure treated with amiodarone, ACIMD2013.11
- 10) Mohammad Arif Hossain¹, Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, NOEV treatment option for Japanese Krabbe disease, ACIMD2013.11
- 11) Mohammad Arif Hossain¹, Michiko Shinpo¹, Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, NOEV can stabilize β -galactosidase in galactosialidosis patients' skin fibroblasts effectively and cause normalization of its activity, ACIMD2013.11
- 12) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Kouji Tominaga, Shin Nabatame, Takeshi Okinaga, Yoshiko Hashii, Norio Sakai, Keichi Ozono, Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for three patients with metachromatic leukodystrophy, ACIMD2013.11
- 13) Yusuke Hamada¹, Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo¹, Yoshiro Wada², Norio Sakai¹, Yutaka Sumida², Keiichi Ozono¹, Different clinical course of propionic acidemia in two siblings, ACIMD2013.11
- 14) Motohiro Akagi^{1, 2}, Mohammad Arif Hossain¹, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, Yoshinori Okumura³, Clinicogenetical features of a Japanese patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA), ACIMD2013.11
- 15) N. Sakai¹, X.F. Gu², H. Ida³ on behalf of the EDGE investigators, O. Kawaguchi⁴, Y. Xue⁵, A phase 3 study evaluating once versus twice daily dosing of eliglustat in patients with Gaucher disease type 1 (GD1): Interim

results from the lead in period, ACIMD2013.11

- 16) Akemi Tanaka¹, Takashi Hamazaki¹, Motomichi Kosuga², Torayuki Okuyama², Yasuyuki Suzuki³, Norio Sakai⁴, Tomo Sawada¹, Hiromasa Yabe⁵, Mika Ishige⁶, Hideo Mugishima⁶, Shunichi Kato⁵, Efficacy of hematopoietic stem cell transplantation versus enzyme replacement therapy on intelligence in the patients with Mucopolysaccharidosis type II, ACIMD2013.11

高橋 勉

【論文発表】

- 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

【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 (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。

【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.

高柳 正樹

【論文発表】

- 1) 井田 博幸, 衛藤 義勝, 田中 あけみ, 高柳 正樹, 酒井 規夫, 川合 基司, 田畑 恭裕。薬剤の臨床日本人 Gaucher 病(I 型、II 型および III 型)患者に対するセラザイムの 8 年間の製造販売後調査結果による有効性と安全性の検討。小児科診療 76: 1325-1334、2013

難波 栄二

【論文発表】

- 1) X 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.
2) 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 1 Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis. *Mol Ther*, 2013 21: 526-532.
3) 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.

【学会発表】

- 1) 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

- 2) 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. □-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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

鈴木 康之

【論文発表】

- 1) Pravin Patel, Yasuyuki Suzuki², Miho Maeda, Eriko Yasuda, Tsutomu Shimada, Kenji E. Orii , Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Growth charts for patients with Hunter Syndrome. Molecular Genetics and Metabolism (in press)

【学会発表】

- 1) Yasuyuki Suzuki, Kenji Orii, Tadao Orii, Shunji Tomatsu. Overgrowth in infants with Hunter disease: Implication for the early clinical detection. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Interited Metabolic Diseases (JSIMD). Nov 27-29, 2013, Maihama, Chiba, Japan

櫻庭 均

【論文発表】

- 1) Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, et al : Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. PLoS ONE 8: e78588, 2013
- 2) Saito S, Ohno K, Maita N, et al : Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α -L-iduronidase : Insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I. Mol Genet Metab, in press.
- 3) Saito S, Ohno K, Sakuraba H : Comparative study of structural changes caused by different substitutions at the same residue on α -galactosidase A. PLoS ONE, in press.

【学会発表】

- 1) Sakuraba H : High risk screening for Fabry disease. Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, Kumamoto, Japan, May. 2013

- 2) Sakuraba H : E66Q: Biochemical, pathological and structural studies. 3rd Update on Fabry Nephropathy: Biomarkers, Progression and Treatment Opportunities, Hong Kong, China, Jun. 2013
- 3) Sakuraba H : Genotype/Phenotype correlation in Fabry disease. The 15th Annual Asia LSD Symposium, Chiba, Japan, Nov. 2013
- 4) Kawashima I, Mitobe S, Kodama T, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Development of enzyme replacement therapy with a modified enzyme and an activator for Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 5) Shibasaki F, Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H.: Development of a highly sensitive immuno-PCR measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 6) Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Futoshi S.: Rapid Immunochromatographic measurement of anti- α -galactosidase A antibodies in Fabry patients Treated with enzyme replacement therapy. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 7) Togawa T, Tsukimura T, Katayama M, Mitobe S, Sakuraba H.: Fabry patients exhibiting no elevation in plasma globotriaosylsphingosine level. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 8) Tsukimura T, Takada M, Aizawa Y, Suzuki T, Katayama M, Sakuraba H, Togawa T.: Comparative study on the content of mannose 6-phosphate residues of recombinant lysosomal enzymes. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 9) Itoh K, Tsuji D, Namba K, Yamaguchi S, Imataki I, Ishimaru N, Sakuraba H.: Establishment of human neural cell culture systems induced from ips cells derived from Tay-Sachs disease patient for drug discovery. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 10) Kitakaze K, Kawano K, Tsuji D, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Sakuraba H, Itoh K.: Imaging of enzyme replacement with a novel fluorescent probe and purified lysosomal β -hexosaminidase carrying M6P-type glycans. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 11) 櫻庭 均 : ファブリー病を疑うとき 診断・治療について, ファブリー病セミナー in 新潟, 新潟, 2013. 5
- 12) 櫻庭 均 : ファブリー病の治療戦略. 熊本ファブリー病フォーラム, 熊本, 2013. 5

- 13) 櫻庭 均：ファブリー病の新しい治療薬開発に向かって. ふくろうの会 東京シンポジウム 2013, 東京, 2013. 6
- 14) 櫻庭 均：よくわかるシリーズ ファブリー病：ファブリー病の診断法, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013. 6
- 15) 櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. ファブリー病セミナー 腎臓 Special Lecture, 福岡, 2013. 6
- 16) 櫻庭 均：心疾患の中に潜在するファブリー病 ファブリー病の病態・診断について. 第 23 回 Educational Seminar in Cardiology, 東京, 2013. 7
- 17) 櫻庭 均：日常診療に潜在するファブリー病：病態・診断・治療. 福井ファブリー病セミナー, 福井, 2013. 7
- 18) 櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. 川口ファブリー病セミナー, 川口 2013. 7
- 19) 櫻庭 均：ファブリー病の診断方法と最近の話題. 秋田ファブリー病セミナー, 秋田, 2013. 8
- 20) 櫻庭 均：ファブリー病へのアプローチ 診断・治療可能な希少疾患を見逃さないために. 西湘ファブリー病セミナー, 神奈川, 2013. 10
- 21) 櫻庭 均：ファブリー病を知ろう 病態・診断・治療. 函館ファブリー病セミナー, 函館, 2013. 10
- 22) 櫻庭 均： ファブリー病 その診断, 治療の核心に迫る. 弘前ファブリー病セミナー, 青森, 2013. 10
- 23) 櫻庭 均：治療可能な希少疾病ファブリー病～酵素補充療法の実際～. 第 40 回 日本小児臨床薬理学会 学術集会, 横浜, 2013. 11
- 24) 北風圭介, 辻 大輔, 浅沼大祐, 神谷真子, 浦野泰照, 櫻庭 均, 伊藤孝司：酵素の分子構造改変に基づく Tay-Sachs 病治療薬の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 25) 水戸部さゆり, 兎川忠靖, 月村考宏, 齋藤静司, 鈴木俊宏, 櫻庭 均：血漿中 Lyso-Gb3 濃度の増加を伴わない特異なファブリー病患者群に関する研究. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 26) 月村考宏, 高澤かおり, 山下翔悟, 水戸部さゆり, 鈴木俊宏, 片山昌勅, 兎川忠靖, 櫻庭 均：グロボトリアオシルセラミドの新規測定法の開発: ファブリー病バイオマーカーへの応用. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 27) 高田 大, 相澤良明, 月村考宏, 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 櫻庭 均：リソソーム酵素中のマンノース-6-リン酸残基の測定. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 28) 月村考宏, 高田 大, 相澤良明, 鈴木俊宏, 片山昌勅, 櫻庭 均, 兎川忠靖：マンノース-6-リン酸残基の新規定量法の開発：組換えヒトリソソーム酵素解析への応用. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 29) 北風圭介, 河野加菜子, 田島陽一, 櫻庭 均, 伊藤孝司：テイ サックス病の新規治療薬開発を目指した機能改変型ヒト α -ヘキササミニダーゼ B の精製および評価. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 30) 田島陽一, 芝崎 太, 櫻庭 均：ポンペマウス骨格筋における p62 と Parkin の蓄積. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013. 12

北川 照男

【論文発表】

- 1) 北川照男、大和田操、他. 新生児マス・スクリーニングの今後の飛躍を期待して. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P175,2013.
- 2) 鈴木 健、北川照男、他. ライソゾーム病(ファブリー病、糖原病II型、ムコ多糖症I型・II型)スクリーニング法の基礎的検討 酵素活性測定反応時間について. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P213,2013.

奥山 虎之

【論文発表】

- 1) T Tajima G, Sakura N, Kosuga M et al. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 2013;108:172-7.

【学会発表】

- 1) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September.4.2013.
- 2) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之:5つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第116回日本小児科学会学術集会学会、広島、2013.4.19.
- 3) 奥山虎之:ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題(シンポジウム).第40回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013.8.24.

坪井 一哉

【学会発表】

- 1) 内富一仁, 村上敬之, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病の腎障害における agalsidase aifa の有効性. 第67回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 2) 内富一仁, 村上敬之, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病の腎障害における agalsidase aifa の有効性. 第67回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 3) 西山裕乃, 坪井一哉, 山本浩志. ファブリー病における Lyso-Gb3 を用いた治療有効性の検討. 第67回日交通医学会総会; 2013 June 8-9; 広島
- 4) Yamamoto H, Tsuboi K, Togawa T. Componential analysis of the cerumen in patients with Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan
- 5) Yamamoto H, Goto H, Tsuboi K. Histopathological findings of the nasal mucosa in 2 cosanguineous patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain.
- 6) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Clinical course and safety in 13 Fabry Disease patients who switched from agalsidase-beta to agalsidase-aifa. 12th International Congress of Inborn

Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain

- 7) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Switch from agalsidase beta to agalsidase alfa in 13 Fabry disease (FD) patients: Clinical course and safety. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan
- 8) Tsuboi K. Wish with a silver wing. 15th Asia LSD Symposium; 2013 November 26th Chiba, Japan
- 9) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Abnormal heart rate variability and left ventricular hypertrophy in patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain
- 10) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Cardiac manifestations and enzyme replacement therapy of Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain

松田 純子

【論文発表】

- 1) Murakami, I, Mitsutake, S, Kobayashi, N, Matsuda, J, Suzuki, A, Shigyo, T, Igarashi, Y.: Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 194-197. 2013.

【著書】

- 1) 松田純子：シアリドーシス．先天代謝異常ハンドブック．中山書店．p.212-213, 2013.

【学会発表】

- 1) Matsuda J, Ono K, Muto M, Yoneshige A, Yoshimura S.: Overexpression of prosaposin causes severe retinal degeneration in mouse. 第55回日本先天代謝異常学会 2013年11月27-29日 舞浜 .
- 2) 久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川誠、内田俊也、松田純子、戸田年総、岡崎具樹 .: Saposin D 欠損マウスの2D-DIGE タンパク質発現解析 - 炭酸脱水酵素(CA2)との関連. 第86回日本生化学会大会. 2013年9月11-13日 横浜 .

遠藤 文夫

【論文発表】

- 1) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J. Hum. Genet.* 58, 285-292 (2013)
- 2) Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *Plos One* 8, e56387 (2013)
- 3) Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF,

- but died suddenly of an RSV infection. *Pediatr Int.* 55, 775–778 (2013)
- 4) Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. *Eur J Neurol* (2013 in press)
 - 5) Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn screening for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
 - 6) Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. Springerplus. (2013 in press)
 - 7) Fujisawa D, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Clinical features and management of organic acidemias in Japan. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
 - 8) Kido J, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Takayanagi M, Matsuo M, Yoshino M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Long-term outcome and intervention of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis.* 35, 777–785 (2012).
 - 9) Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34, 566-570 (2012)
 - 10) Katsuren K, Nakamura K, Ohta T Effect of body mass index-z score on adverse levels of cardiovascular disease risk factors. *Pediatr Int.* 54, 200-204 (2012)

下澤 伸行

[論文発表]

- 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.

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「ライソソーム病(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

- 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
[学会発表]
- 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) Shimozawa N: Peroxisomal disorder 12th Asian and Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh. September 2013.
- 3) Shimozawa N: Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases 3rd ACIMD & 55th JSIMD. Maihama. November 2013.

今中 常雄

[論文発表]

- 1) Morita M, Kobayashi J, Yamazaki K, 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
- 2) Hama K, Nagai T, Nishizawa C, et al.: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. **Lipids** 48: 1253-1267, 2013

【学会発表】

- 有村 洸平, 守田 雅志, Kostsin DG, 山崎 こそ枝, 下澤 伸行, 今中 常雄: 副腎白質ジストロフィーの治療薬開発: ABCD1 タンパク質の安定化を指標としたスクリーニング系の構築. 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 東京, 2013. 6
- 2) 池島 俊季, 川口 甲介, 守田 雅志, 今中 常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 1) Kostsin DG, Morita M, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Establishment and application of fluorescence-based assay for screening of chemical compounds that stabilize mutant ABCD1 protein responsible for adrenoleukodystrophy. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 2) 池島 俊季*, 川口 甲介, 守田 雅志, 今中 常雄: メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の 発現と機能解析. 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2013. 9
- 3) 岡元 拓海, 川口 甲介, 金林 峰, 守田 雅志, 今中 常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 4) 松本 隼, 守田 雅志, 渡邊 康春, 長井 良憲, 小林 博司, 高津 聖志, 今中 常雄: 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 5) 高崎 満喜子, 渡邊 雄一, 深澤 力也, 川口 甲介, 守田 雅志, 大熊 芳明, 今中 常雄: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013.11
- 6) 兵藤 沙織, 川口 甲介, 守田 雅志, 今中 常雄: リソソーム膜タンパク質 LMBD1 の異種発現系の構築. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 7) 岡元 拓海, 川口 甲介, 金林 峰, 守田 雅志, 今中 常雄: ABC トランスポーター ABCD 4 のリソソームへの局在化における LMBD1 の役割. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 東京, 2013. 11
- 8) Morita M, Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Screening of chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 9) Yokoyama K, Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Nakanishi, H, Imanaka, T, Shimozawa N, Taguchi R, and Inoue K, Inoue K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013.
- 10) Okamoto T, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T: Subcellular localization of ABC transporter ABCD4 is regulated by LMBD1. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013, 12

加我 牧子

【論文発表】

- 1) Yasumira A, Kokubo N, Kaga M, et al : Neurobehavioral and hemodynamic evaluation of

Stroop and reverse Stroop interference in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain & Development*. (in press).

- 2) Tsujimoto S, Yasumura A, Kaga M et al. Increased prefrontal oxygenation related to distractor-resistant working memory. *Child Psychiatry Hum Development* 44:678-688, 2013.
- 3) Inoue Y, Ito K, Kaga M, et al, Psychometric properties of Japanese version of the Swanson, Nolan, and Pelham, version-IV Scale-Teacher Form: A study of school children in community samples. *Brain & Development*. (in press)

【学会発表】

- 1) 加我牧子, 軍司敦子, 中村雅子, 崎原ことえ, 稲垣真澄: 聴覚失認の神経生理学. 第43回日本臨床神経生理学会学術大会. 高知, 2013. 11

横山 和明

【論文発表】

- 1) Kotaro Hama, Toru Nagai, Chiho Nishizawa, Kazutaka Ikeda, Masashi Morita, Noriko Satoh, Hiroki Nakanishi, Tsuneo Imanaka, Nobuyuki Shimozawa, 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

【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)

渡邊 順子

【論文発表】

- 1) Ihara K, Yoshino M, Watanabe Y, et al. : Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: a previously unrecognized complication. *Pediatrics*. 2013 Jan;131(1):e327-30.
- 2) Okano Y, Yoshino M, Watanabe Y, et al. : Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage. *Mol Genet Metab*. 2013 May;109(1):9-13.
- 3) Hara M, Matsuishi T, Yoshino M, et al.: An adult patient with mucopolidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. *Brain Dev*. 2013 May;35(5):462-5.

【学会発表】

- 1) 古賀木綿子、原田なをみ、松石豊次郎、猪口隆洋、芳野 信、松石豊次郎、渡邊順子. オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTCD) の at risk 新生児における迅速診断の有用性 第473回日本小児科学会福岡地方会 2013.2.9 (福岡市)
- 2) Yano S, Miyake N, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Goto Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N: Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II defects may affect multiple metabolic pathways. 12th International Congress of Inborn Errors of

Metabolism 2013.9.3-9.6 (Barcelona)

- 3) Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T: Intragenic deletion in ornithine transcarbamylase gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism 2013.9.3-9.6 (Barcelona)
- 4) Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizuochi T, Iwamoto J, Yoshino M, Inokuchi T, Yano S, Watanabe S, Yoshiura K, Matsuishi T: An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. Annual Symposium of the American Society of Human Genetics 2013.10.22-26 (Boston)
- 5) Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Application of SNP-based haplotype analysis to prenatal monitoring in a pregnancy at risk for ornithine transcarbamylase deficiency. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 6) Harada N, Yoshida M, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Intragenic deletion in OTC gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 7) Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizuochi T, Takeuchi T, Iwamoto J, Yoshino M, Watanabe S, Inokuchi T, Yano S, Yoshiura K, Matsuishi T. : An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Chiba)
- 8) Okano Y, Kobayashi K, Ihara K, Ito T, Yoshino M, Watanabe Y, Kaji S, Ohura T, Nagao M, Noguchi A, Mushiaki S, Hohashi N, Hashimoto-Tamaoki T. : Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage. The 55th Annual Meeting of Jte Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD), The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)
- 9) 弓削康太郎、芳野 信、渡邊順子 : ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業班会議 2013.9.26 (東京)

石垣 景子

【論文発表】

- 1) 石垣景子ら . 小児の呼吸管理 9 「神経・筋疾患」. 小児科 . 2013:54(2):213-221

【学会発表】

- 1) 石垣 景子 : 小児型 Pompe 病の診断と治療」第 30 回小児神経筋疾患懇話会 於東京国際フォーラム, 東京 2013 年 8 月 24 日