

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04875

研究課題名(和文)患者リソースと疾患モデルを融合した副腎白質ジストロフィー病型診断・治療法の創出

研究課題名(英文)Development of phenotype predictive diagnosis method and treatment in adrenoleukodystrophy by the methods combines patient resource and disease model

研究代表者

下澤 伸行 (SHIMOZAWA, Nobuyuki)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・教授

研究者番号：00240797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：アカデミアによる迅速診断システムの実績：3年間に計77例の副腎白質ジストロフィー患者を最短2日で診断、最新の診療情報を提供し、早期移植から患者予後改善に繋げた。大脳型発症関連因子の検討では大脳型患者の移植前後のマイクロアレイ解析から神経細胞接着因子が候補として抽出された。症例数を増やした遺伝子発現解析でも変動が検証された。一方で、大脳型と非大脳型の患者試料間では、移植前後を反映する結果は得られなかった。また創薬開発研究ではALD患者の極長鎖脂肪酸値を低下させるロレンツォオイルをマウスに投与して肝臓の遺伝子発現解析を行なった結果、ペルオキシソーム二頭酵素の発現増加が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Achievement of early diagnosis system by academia: 77 cases of ALD patients were diagnosed and the latest medical information was provided. Among them, cerebral type patients as transplant indication were provided in the shortest 2 days, leading to improvement of patient prognosis from early transplantation. Neuronal cell adhesion factor was specified as cerebral-type related candidate genes by microarray analysis of RNA samples from the patients between before and after transplantation. Even in gene expression analysis with further cases, variation of the factor was verified. Meanwhile, there was no clear difference of the factor between patient samples from cerebral type and those from non-cerebral type AMN. As a result of gene expression analysis of the liver by administering Lorenzo's Oil to mice, it became clear that gene expression of peroxisomal D-bifunctional protein (DBP) was increased. We will also conduct research on the clinical application to DBP deficient patients.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：副腎白質ジストロフィー 脱髄 造血幹細胞移植 早期診断 病型規定因子 神経接着因子 マイクロアレイ解析 二頭酵素欠損症

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィー (ALD) は最も頻度の高い白質変性症で、病因遺伝子 *ABCD1* は同定されたものの、その機能不全による病態、特に脱髄の発症や多彩な病型を規定する因子は遺伝要因か環境要因かも含めて全く不明である。大脳型の唯一の治療法である発症早期の造血幹細胞移植も、発症後診断例ではできるだけ迅速に診断する体制を構築するとともに、発症前にリスク患者を発見し、早期介入により移植から発症阻止に繋げることが望まれている。一方で、発症前診断例でも予後の予測が困難なことから移植のリスクより、基本的には発症後に施行されているのが現状であるため、よりリスクの低い移植法の開発と、大脳型発症因子の探索から予後予測法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本課題では、上記の背景をもとに、アカデミアによる ALD 国内診断拠点として個々の患者状況を把握した上での迅速診断体制の維持と、集積した患者データとバイオリソース (血漿、細胞、髄液等の生体試料) に、遺伝子欠損マウス、iPS 細胞を用いて分子レベルから細胞レベル、さらには個体レベルでの解析を通じて各病型の機序を解明し、疾患モデルの検証を経て、全ての ALD 患者における早期診断から病態解明、病型診断バイオマーカーの同定、戦略的創薬をめざす。

3. 研究の方法

(1) アカデミアによる早期診断・解析システムの開発: ALD の診断は従来、GC/MS を用いた患者血清または血漿の極長鎖脂肪酸分析により行っているが、UPLC/MS を用いて少量の血液による迅速な診断法及び、髄液、細胞を用いた脂肪酸分析法を開発する。さらに ALD 患者由来の培養皮膚線維芽細胞と対照細胞を比較した LC/MS/MS による脂質メタボローム解析により、*ABCD1* 機能不全による分子病態に関連する極長鎖脂肪酸以外の脂質バイオマーカーを検索する。

(2) 大脳型移植前後の試料を用いた大脳型発症関連因子の検討: ALD 患者で大脳型発症前後の比較検討は、発症前に診断してもいつ発症するか不明なため、試料の収集が難しい状況にある。そこで、発症後診断例で移植後に炎症性脱髄が抑制された症例に対して移植前後の試料を比較検討することにより、大脳型発症因子を探索する。具体的には移植前と移植後血液 (ドナー由来) より RNA を抽出し、多数例のアレイ解析により比較検討し、パスウェイ解析等を用いて大脳型発症に関連する遺伝子群を抽出する。得られた遺伝子群はさらに多くの試料でリアルタイム定量 PCR や該当するタンパクの ELISA 法により検証し、大脳型発症関連因子の特定から診断法を開発する。

(3) 創薬開発研究: ALD 大脳型発症後の治療

効果は認めないものの、血中極長鎖脂肪酸値を低下させるロレンツォオイルの薬理作用を再評価するために、ALD の病因遺伝子である *ABCD1* 欠損マウスと野生型マウスにロレンツォオイルを投与し、血清、脳、肝臓の脂肪酸ならびにペルオキシソーム関連遺伝子発現を GC-MS とリアルタイム PCR にて検討した。

4. 研究成果

(1) アカデミアによる早期診断システムの実績: 平成 27 - 29 年の 3 年間に迅速診断システムにより小児大脳型 6 例、思春期大脳型 4 例、成人大脳型 7 例、AMN12 例、小脳脳幹型 3 例、アジソン型 5 例、発症前 9 例の男性患者 46 例と、女性保因者 31 例の計 77 例の副腎白質ジストロフィー患者を生化学・遺伝子診断し、最新の診療情報とともに提供した。そのうち大脳型移植適応患者に対しては最短 2 日で生化学・遺伝子診断結果を提供し、早期移植から患者予後改善に繋げている。国内受託検査機関では生化学的診断は 3、4 週間、遺伝子解析は受託しておらず、アカデミアによる稀少疾患診断実績として社会に貢献した。

(2) 大脳型移植前後の試料を用いた大脳型発症関連因子の検討: 小児並びに思春期大脳型患者の移植前後の白血球からのマイクロアレイ解析にて抽出した複数の変動遺伝子から、症例数を増やした遺伝子発現比較解析にて神経細胞接着因子が大脳型発症関連候補として特定された。一方で、大脳型と非大脳型である AMN の患者試料間では、移植前後の変動を反映する結果は得られなかった。今後、発症前診断患者の長期フォローアップ追跡により、発症前、発症後、移植後の経過により変動する候補遺伝子を発現比較解析にて抽出し、大脳型発症関連因子の特定に繋げる。

(3) 創薬開発研究: ALD 患者の極長鎖脂肪酸値を低下させるロレンツォオイルを野生型及び *ABCD1* 遺伝子欠損マウスに投与して肝臓の遺伝子発現解析を行なった結果、いずれもペルオキシソーム二頭酵素の発現を増加させることが明らかとなった (Morita et al)。引き続き、二頭酵素欠損症患者への臨床応用も視野に研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

Hama K, Shimozawa N et al (11 人中 9 番目) Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of *Abcd1*-Deficient Mice. *Lipids* 査読あり 53: 85-102, 2018.

下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 新生児マススクリーニングの意義と課題: 日本マススクリーニング学会誌 2017 年; 27(3): 239 - 242.

Tsuboi T, Shimozawa N et al (6 人中 5 番目) Highly asymmetric and subacutely progressive motor weakness with

unilateral T2-weighted high intensities along the pyramidal tract in the brainstem in adrenomyeloneuropathy. J Neurol Sci 査読あり 381: 107-109, 2017.

Morita M, Shimozawa N et al (9人中8番目) T. Effect of Lorenzo's Oil on Hepatic Gene Expression and the Serum Fatty Acid Level in abcd1-Deficient Mice. JIMD Rep 査読あり 2017 May 31.

Horikawa Y, Shimozawa N et al (7人中2番目) A first case of adrenomyeloneuropathy with mutation Y174S of the adrenoleukodystrophy gene. Neuro Endocrinol Lett 査読あり 38: 13-18, 2017.

Yamashita T, Shimozawa N et al (16人中3番目) Ataxic form of autosomal recessive PEX10-related peroxisome biogenesis disorders with a novel compound heterozygous gene mutation and characteristic clinical phenotype. J Neurological Sciences 査読あり 375: 424-429, 2017.

Shigeo Takashima, Nobuyuki Shimozawa et al (9人中9番目) Detection of unusual very-long-chain fatty acid and ether lipid derivatives in the fibroblasts and plasma of patients with peroxisomal diseases using liquid chromatography-mass spectrometry. Molecular Genetics and Metabolism 査読あり S1096-7192: 30180-9, 2017.

下澤伸行. ペルオキシソーム病: 小児内科 48 増刊号, 小児疾患診療のための病態生理 3, 2016年: 139 - 148.

下澤伸行. ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィー). 小児内科 特集 慢性疾患児の一生を診る 2016年; 48: 1431 - 1434.

下澤伸行. ペルオキシソーム病 診断と治療の最前線 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー - : 日本小児科学会雑誌 2016年; 120: 1308 - 1319.

下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー: 小児科診療 特集 先天代謝異常症-エキスパートによる最新情報- 2016年; 79: 825 - 831.

Motobayashi M, Shimozawa N et al (7人中6番目) Serial Monitoring of Plasma Levetiracetam Levels in a Child With Epilepsy Undergoing Cord Blood Transplantation. Pediatric Neurology 査読あり 64: e5-6, 2016.

Masashi Morita, Nobuyuki Shimozawa et al (10人中9番目) A novel method for determining peroxisomal fatty acid -oxidation. J Inherit Metab Dis 査読あり 39: 725-31, 2016.

Matsunami M, Shimozawa N et al (7人中2番目) Living-donor liver transplantation from a heterozygous parent for infantile Refsum disease. Pediatrics 査読あり 137: e20153102, 2016.

下澤伸行. 特集・第 56 回日本小児神経学会学術集会 シンポジウム 5: 見逃してはならない治療法のある, あるいは今後期待できる小児神経疾患: 診断と治療の最前線 副腎白質ジストロフィー, 脳と発達 2015年; 47巻: 117 - 121.

下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー: 成瀬 光栄, 平田結喜緒, 田辺晶代編. 内分泌シリーズ 難治性内分泌代謝疾患 Update, 東京: 診断と治療社; 2015年: 78 - 80.

Komatsuzaki S, Shimozawa N et al (8人中2番目) First Japanese case of Zellweger syndrome with a mutation in PEX14. Pediatr Int 査読あり 57:1189-1192, 2015.

〔学会発表〕(計 10 件)

下澤伸行: 第 271 回 日本小児科学会東海地方会.平成 29 年 10 月, 岐阜, 小児で鑑別すべき重要な代謝性神経疾患 - 副腎白質ジストロフィーとペルオキシソーム病 -

下澤伸行: 第 44 回日本マススクリーニング学会.平成 29 年 8 月, 秋田, 副腎白質ジストロフィー(ALD)新生児マススクリーニングの意義と課題, 教育セッション「新分野のマススクリーニング」

下澤伸行: 第 20 回広島先天代謝異常研究会.平成 29 年 2 月, 広島, ペルオキシソーム病 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー -

下澤伸行: 第 21 回日本ライソソーム病研究会.平成 28 年 10 月, 東京, 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン作成に向けて

下澤伸行: 第 13 回九州先天代謝異常研究会.平成 28 年 7 月, 福岡, ペルオキシソーム病 - 拡大する疾患概念と副腎白質ジストロフィー -

下澤伸行: 第 119 回日本小児科学会学術集会.平成 28 年 5 月, 札幌, 分野別シンポジウム「先天代謝異常症の早期診断・治療に向けた診療ネットワーク」ペルオキシソーム病の診療ネットワーク.

Shimozawa N: The 1st International Plasmalogen Symposium. 2016 Nov, Fukuoka. Diagnosis and treatment of Peroxisomal diseases in Japan.

下澤伸行: 第 57 回日本先天代謝異常学会・第 13 回アジア先天代謝異常症シンポジウム.平成 27 年 11 月, 大阪, シンポジウム「脳を標的とした先天代謝異常症の治療戦略」副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植療法の現状と問題点

下澤伸行: 日本薬学会第 135 年会.平成 27 年 3 月, 神戸, シンポジウム「ペルオキシソームと難治性疾患」ペルオキシソーム機能・代謝異常と疾患

下澤伸行: ライソソーム病に関する調査研究班 市民フォーラム 2015. 平成 27 年 1 月, 東京, 「ALD & ペルオキシソーム病の診断ガ

イドラインから早期診断，治療に向けて」

〔図書〕(計 8 件)

厚生労働省難治性疾患等政策研究事業「ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班」監修. 副腎白質ジストロフィー(ALD)診療ガイドライン 2017. 東京: 日本臨床社; 2017 年.

下澤伸行. ペルオキシソーム病: 別冊日本臨床. 新領域別症候群シリーズ 37 精神医学症候群(第2版) 東京: 日本臨床社; 2017 年: 190 - 195.

下澤伸行. ペルオキシソーム病(副腎白質ジストロフィーを中心に): 奥山虎之, 山本俊至編. 遺伝学的検査・診断・遺伝カウンセリングの上手な進めかた, 東京: 診断と治療社; 2016 年: 69 - 73.

下澤伸行. ペルオキシソーム病: 尾崎承一編. 難病辞典, 東京: 学研メディカル秀潤社; 2015 年: 490 - 492.

下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー: 尾崎承一編. 難病辞典, 東京: 学研メディカル秀潤社; 2015 年: 485 - 489.

厚生労働省難治性疾患等政策研究事業「ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班」編. ライソゾーム病・ペルオキシソーム病 診断の手引き. 診断と治療社, 東京: 2015 年.

下澤伸行. 副腎白質ジストロフィー. こどもの病気 遺伝について聞かれたら, 東京: 診断と治療社; 2015 年: 137 - 139.

下澤伸行. ペルオキシソーム病(ペルオキシソーム形成異常症). こどもの病気 遺伝について聞かれたら, 東京: 診断と治療社; 2015 年: 68 - 73.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~lsrc/dgr/shimozawa-hp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下澤 伸行 (SHIMOZAWA Nobuyuki)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・教授

研究者番号: 00240797

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高島 茂雄 (TAKASHIMA Shigeo)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号: 50537610