

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号： 14401

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009 ~ 2011

課題番号： 21591322

研究課題名（和文） ムコリピドーシスの病態解明と治療法の開発

研究課題名（英文） Mucopolipidosis; Pathological analysis and development of therapy

## 研究代表者

酒井 規夫 (SAKAI NORIO )

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号： 30314313

## 研究成果の概要（和文）：

ムコリピドーシスはライソゾーム病の中にあつて、大半の酵素がライソゾーム内に欠乏するという疾患であり、その病態はまだ十分わかっていない。他のライソゾーム病のような酵素補充療法も開発されていないため、本研究では患者皮膚線維芽細胞を用いて今までに解析されていない病理を明らかにした。また正常細胞内のライソゾーム酵素の混合液を抽出する方法により、酵素液を患者細胞に投与することにより、多くの患者細胞における病理の改善を見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

Mucopolipidosis is one of the lysosomal storage diseases that the transport of most of the lysosomal enzymes to the lysosome is affected, however the cellular pathology of the disease is not elucidated. And the treatment such as enzyme replacement therapy for some lysosomal diseases is not established. On this research we aimed to clarify the cellular pathology in the patient skin fibroblasts and found new pathology. We also analyzed the cellular effect of the mixed lysosomal enzymes which are extracted from the normal cells with NH<sub>4</sub>Cl, and the many cellular effects were proved.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 小児科学

科研費の分科・細目： 小児代謝・栄養学

キーワード： ムコリピドーシス、I-cell 病、GlcNAc-transphosphatase、リソゾーム病、病態解析、治療実験

## 1. 研究開始当初の背景

我々はライソゾーム研究を続ける中で多くのムコリピドーシス患者の診断、診療に

携わってきており、酵素診断のために血清中での酵素活性測定以外に皮膚生検で皮膚線維芽細胞における酵素診断を続けてきた。ま

た遺伝子診断を行なうことにより、分子生物学的な解析を行なってきており、患者診断について、分子生物学的病態を含めた情報の蓄積がある。ただし、本疾患の細胞学的な病態についてはまだ不明なことが多く、治療法に関してもまだ有効なもの知られていない。

## 2. 研究の目的

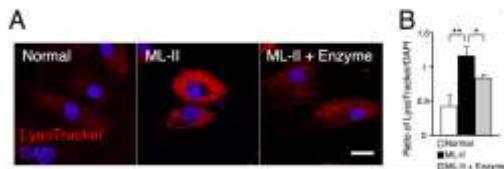
このような状況のもとで、まず患者細胞を用いて、さまざまな細胞学的病態について解析し、どのような特徴があるのか明らかにし、それによって治療法への知見とするためにこの研究を行なった。

## 3. 研究の方法

我々はムコリピドーシスとしての診断された患者細胞を用い、(1)ライソゾーム pH の測定、(2) コレステロールなどの基質の蓄積、(3) ライソゾームの量 (数) の増減、(4) エンドサイトーシスの異常、(5) オートファジーの解析、(6) 電子顕微鏡による形態観察、などを行った。また、塩化アンモニウム溶液の負荷により正常細胞から抽出したライソゾーム酵素の混合液を濃縮し、患者細胞に投与し、上記の病態がどのように変化するか観察した。

## 4. 研究成果

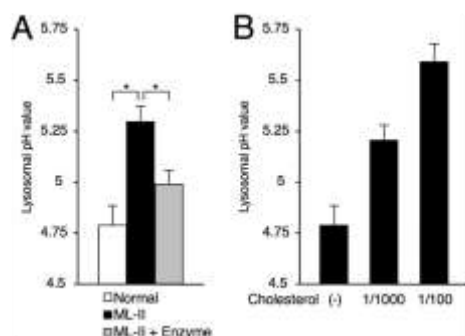
これにより、(1) ライソゾーム pH が正常より中性に変移していることを初めて



示し、これが酵素混合液の投与で改善することを示した。

(2) コレステロールなどの基質が異常蓄積していることを示し、酵素混合液の投与で改善することを示した。

(3) ライソゾームの量 (数) が著明に増



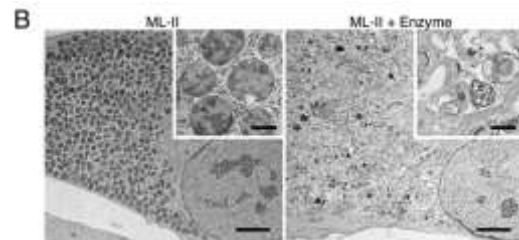
大していることを定量化し、これが酵素混合液による治療で著明に減少することを示した。

(4) エンドサイトーシスの異常により細胞外から取り込まれたあとゴルジなどに停滞していることを示し、酵素混合液の投与で、正常化することを示した。

(5) オートファジーの亢進が見られることを、LC3 のウエスタンで示し、酵素混合液の投与で改善することを示した。

(6) 電子顕微鏡により、Inclusion body と呼ばれる高輝度の小胞が多数見られることを確認した。そして、ライソゾーム酵素混合液の投与により、比較的早期に正常化していることを確認した。

ムコリピドーシスは他のライソゾーム病に近年可能となっている酵素補充療法も困難と考えられている疾患であるが、今回の研究により、その多くの病態が、ライソ



ゾーム混合液の投与により培養細胞においてではあるが正常化することが確認され、今後モデル動物などでこれが確認されれば今後の治療開発の出発点となると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- (1) Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N. Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 105(2):266-269, 2012 (査読有り)
- (2) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286(40):35283-35290, 2011 (査読有り)
- (3) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R. Retrospective review of Japanese sudden unexpected

death in infancy: the importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. *Mol Genet Metab*, 102(4):399-406, 2011 (査読有り)

- (4) Kobayashi H, Takahashi-Fujigasaki J, Fukuda T, Sakurai K, Shimada Y, Nomura K, Ariga M, Ohashi T, Eto Y, Otomo T, Sakai N, Ida H. Pathology of the first autopsy case diagnosed as mucopolipidosis type III  $\alpha / \beta$  suggesting autophagic dysfunction. *Mol Genet Metab*, 102(2):170-5, 2011 (査読有り)
- (5) Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Kotobuki Y, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Yutsudo M, Ozono K, Katayama I. Cutaneous symptoms in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts. *Br J Dermatol*, 163(4):881-884, 2010 (査読有り)
- (6) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolipidosis II and III skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 98(4):485-487, 2009 (査読有り)
- (7) Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okamoto N, Inui K, Ozono K, Sakai N. Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet*, 54(3):145-151, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 37 件)

- (1) Norio Sakai, Respiratory impairment and NPPV treatment in patients with late-onset Pompe disease receiving enzyme replacement therapy, 5th European Symposium on Steps Forward in Pompe Disease, Hungary, 2011.12.2
- (2) 濱田悠介、中野さやか、新寶理子、東純史、大友孝信、富永康仁、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大藪恵一、非常に緩徐な神経学的進行を呈した副腎白質ジストロフィーの一症例、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.25

- (3) 濱田悠介、林真貴子、豊田健太郎、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大藪恵一、松下賢治、阿部暁子、早坂清、多彩な症状を呈した OPA1 異常症の兄妹例、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.25
- (4) ホセインモハンマドアリフ、大友孝信、濱田悠介、赤木幹弘、大藪恵一、酒井規夫、In vitro transient experiment for the common mutations of Krabbe disease in Japan、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.24
- (5) 濱田悠介、中野さやか、新寶理子、東純史、大友孝信、富永康仁、下野九理子、沖永剛志、酒井規夫、大藪恵一、ムコ多糖症 II 型の発達と発育に対する酵素補充療法の効果、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.24
- (6) 大友孝信、大藪恵一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型 (I-cell disease) 細胞におけるゲニステインの効果について、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.24
- (7) 大友孝信、檜垣克美、難波栄二、大藪恵一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型・III 型に対する新しい治療法の開発 (2) 酵素補充療法による治療効果、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.24
- (8) 大友孝信、檜垣克美、難波栄二、大藪恵一、酒井規夫、ムコリピドーシス II 型・III 型に対する新しい治療法の開発 (1) 全ライソゾーム酵素補充法の確立、第 53 回日本先天代謝異常学会学術集会、千葉、2011.11.24
- (9) 大友孝信、Mucopolipidosis II: Pathophysiology to Therapy (ムコリピドーシス II 型の病態解明と治療法の開発)、第

- 16 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9.30
- (10) 酒井規夫、濱田悠介、大友孝信、乾 幸治、大藪恵一、ゴーシェ病 I 型に対する酵素補充療法の長期経過について、第 16 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9.29
- (11) 酒井規夫、濱田悠介、Mohammad Arif Hossain、大友孝信、大藪恵一、後期乳児型異染性白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の効果について、第 16 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2011.9.29
- (12) Mohammad Arif Hossain, Takanobu Otomo, Yusuke Hamada, Motohiro Akagi, Keiichi Ozono, Norio Sakai, Screening of seven common mutations is effective to predict the phenotypes of Krabbe disease patients in Japan、ライソゾーム病スクリーニング東京会議 2011、東京、2011.8.5
- (13) 佐藤友紀、酒井規夫、金川武司、大友孝信、濱田悠介、國府力、小巻正泰、吉津紀久子、西田千夏子、市村沙希、松村泰志、野口眞三郎、大阪大学病院における電子カルテによる遺伝子情報管理の取り組み、遺伝医学合同学術集会 2011、京都、2011.6.18
- (14) 小巻正泰、酒井規夫、金川武司、大友孝信、濱田悠介、國府力、佐藤友紀、吉津紀久子、西田千夏子、市村沙希、野口眞三郎、全国遺伝子医療部門におけるホームページに関する実態調査報告、遺伝医学合同学術集会 2011、京都、2011.6.17
- (15) 酒井規夫、ミニレクチャー「ライソゾーム病の遺伝カウンセリング」、第 7 回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6.4
- (16) 濱田悠介、東純史、Mohammad Arif Hossain、正畠和典、大友孝信、曹秀樹、酒井規夫、大藪恵一、胆のう乳頭腫を呈した異染性白質ジストロフィーの 2 症例、第 7 回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6.4
- (17) 濱田悠介、大友孝信、酒井規夫、大藪恵一、田中雅嗣、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対する呼気ガス試験による診断の試み、第 7 回近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2011.6.4
- (18) N Sakai, A Hossain, T Otomo, Y Hamada, T Okinaga, H Ohta, K Ozono, Patients with Krabbe disease in Japan: phenotype and treatment, 10th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Spain, 2011.4.1
- (19) 渡邊順子、大平智子、加藤俊一、矢部普正、酒井規夫、大友孝信、芳野 信: 骨髄移植を受けた I-cell 病患者の長期予後 第 15 回日本ライソゾーム病研究会、東京 2010.12.10
- (20) 酒井規夫、日本人クラッペ病の表現型の分布と新生児マススクリーニングを含めた診断/治療ガイドライン、第 15 回日本ライソゾーム病研究会、東京 2010.12.10
- (21) 酒井 規夫、シンポジウム 2; 先天性代謝異常症マス・スクリーニングのこれから、マス・スクリーニングにおける遺伝カウンセリング、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10.23
- (22) 濱田 悠介、大友 孝信、酒井 規夫、田中 雅嗣、大藪 恵一、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者に対するピルビン酸療法開始前後での呼気ガス試験による評価、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10.22

- (23) ホセイン モハンマト アリフ、大友 孝信、濱田 悠介、赤木 幹弘、大藪 恵一、酒井 規夫、Distribution of the Clinical Phenotype of Krabbe Disease in Japan、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010. 10. 22
- (24) 長谷川 泰浩、池田 佳世、橘 真紀子、山田 寛之、清原 由起、近藤 宏樹、三善 陽子、酒井 規夫、大藪 恵一、小児期発症 Wilson 病 13 例における酢酸亜鉛製剤の有用性について、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010. 10. 21
- (25) 赤木 幹弘、豊島 光雄、山村 なつみ、鈴木 保宏、Hossain Arif、濱田 悠介、大友 孝信、酒井 規夫、大藪 恵一、日本人 PKAN 症例の遺伝子解析、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010. 10. 21
- (26) 大友 孝信、檜垣 克美、難波 栄二、大藪 恵一、酒井 規夫、ムコリピドーシス II 型の皮膚線維芽細胞ではライソゾームの成熟異常と pH 上昇を来している、第 5 2 回日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010. 10. 21
- (27) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N, AUTOPHAGIC IMPAIRMENT IN MUCOLIPIDOSIS II AND III SKIN FIBROBLASTS, SSIEM, Turkey 2010. 9. 1
- (28) 田中あけみ、酒井規夫、奥山虎之、鈴木康之、澤田智、大橋十也、大浦敏博、麦島秀雄、田中藤樹、大友孝信、ムコ多糖症 II 型における造血幹細胞移植の中樞神経系への効果について(多施設共同研究)、第 5 2 回日本小児神経学会総会、横浜、2010. 5. 20
- (29) 高倉広充、矢部普正、麦島秀雄、加藤剛二、鈴木信寛、足立壮一、小林良二、大浦敏博、田中あけみ、奥山虎之、田中藤樹、鈴木康之、酒井規夫、大橋十也、加藤俊一、ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果に関する多施設共同調査研究 ムコ多糖症 II 型造血細胞移植研究グループ、Efficacy of Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) on the Patients with Mucopolysaccharidosis Type II: Multicenter Study, Study Group of HSCT for MPS II、第 3 2 回日本造血細胞移植学会総会、浜松、2010. 2. 20
- (30) 山崎早苗、甲斐明彦、高尾大士、井石倫弘、笹野衣里、木下大介、西川嘉英、隅清彰、酒井規夫；胎児期より多発奇形を指摘されていたピルビン酸脱水素酵素欠損症の 1 例、第 5 1 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009. 11. 7
- (31) 新谷研、酒井規夫、毛利育子、下野九理子、沖永剛史、橋井佳子、太田秀明、谷池雅子、大藪恵一；臍帯血幹細胞移植を施行した Hunter 症候群の中樞神経系における組織学的検討、第 5 1 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009. 11. 6
- (32) 酒井 規夫、シンポジウム；先天性代謝異常症の遺伝カウンセリング、「副腎白質ジストロフィーの遺伝カウンセリング」、第 5 1 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009. 11. 6
- (33) 大友孝信、檜垣克美、難波栄二、大藪恵一、酒井規夫；ムコリピドーシス II 型／III 型の皮膚線維芽細胞におけるオートファジーの解析、第 5 1 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009. 11. 5
- (34) 酒井規夫；リソゾーム病の診断と治療法の最前線—蓄積病を疑うべきとき—、小児成長研究会、東京、2009. 7. 25
- (35) 酒井規夫、濱田悠介、富永康仁、沖永剛史、大藪恵一；ハンター病 5 例の酵素補

充療法の経験、第五回 近畿先天代謝異常症研究会、大阪、2009.6.6

(36) 新谷研, 森田祥子, 北井征宏, 富永康仁, 下野九理子, 沖永剛志, 毛利育子, 酒井規夫, 谷池雅子, 大藪恵一; 乳児期早期の Sturge Weber 症候群における患側大脳白質の髄鞘化促進の可能性: 画像的及び病理学的検討、第 51 回日本小児神経学会総会、米子、2009.5.29

(37) 折居恒治, 酒井規夫, 大友孝信, 折居忠夫, 三浦良介, 寺澤厚志, 岩井明日香, 伊藤玲子, 今村淳; 頭蓋骨早期癒合症を合併した Mucopolysaccharidosis III 型の 1 例、第 51 回日本小児神経学会総会、米子、2009.5.29

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リソソーム病治療用医薬組成物  
発明者: 大藪恵一, 酒井規夫, 大友孝信  
権利者: 大阪大学  
種類: 特願  
番号: 2011-101560  
出願年月日: 2011年4月28日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 規夫 (SAKAI NORIO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 30314313

### (2) 研究分担者

谷池 雅子 (TANIIKE MASAKO)  
大阪大学・連合小児発達学研究科・教授  
研究者番号: 30263289

### (3) 連携研究者