



Title	ファバー病(酸性セラミダーゼ欠損症)の病態における分子生物学的研究
Author(s)	村松, 岳
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42559
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	むら まつ たかし 村 松 岳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	ファーバー病（酸性セラミダーゼ欠損症）の病態における分子生物学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 内山 安男 教 授 佐古田三郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ファーバー病 (MIM228000) はリソゾーム酵素であるヒト酸性セラミダーゼ (以下 AC と記す) の欠損により全身の臓器にセラミドが蓄積する常染色体劣性遺伝の先天代謝異常症である。臨床的には、関節の疼痛性の腫脹、皮下結節、嘔声などの症状とともに精神運動発達の退行、痩せが徐々に進行し乳児期に死亡するタイプが多い。Farber によって最初に報告されてから50年を経て、これまで世界で約50例の報告があるが非常にまれな疾患である。1995年に AC 酵素が精製され、1996年に cDNA、1999年にゲノム遺伝子の配列が報告された。本研究では、第1に日本人ファーバー病2例における遺伝子変異を明らかにし、その遺伝子発現量、酵素活性、セラミドの蓄積率を解析した。第2にセラミド蓄積と痩せや皮下結節形成の関係を明らかにするために、患者の皮下結節と培養皮膚線維芽細胞 (以下SFと記す) における発現遺伝子を検索した。またマクロファージ様細胞株に細胞透過性セラミドを負荷し発現量の変化する遺伝子を検討した。

【方法ならびに成績】

(1)直接シーケンス

SF から抽出した全 RNA をもとに AC 遺伝子の RT-PCR 産物を得て、直接シーケンス法にて解析した。同様の方法でゲノム DNA の PCR 産物を解析し同定した変異を確認した。V97E、G235R (複合ヘテロ接合) の2種の変異とΔV96 (ホモ接合) の1種の欠失を同定した。

(2)ノーザンブロットィング

SF からの全 RNA10μg を1%アガロースで電気泳動し、³²Pラベルの AC-cDNA プローブでハイブリダイズしたが、正常と患者に発現量に差を認めなかった。

(3)遺伝子発現

正常と変異の AC-cDNA をリポフェクション法で COS-1 細胞に導入し強制発現させた。変異での酵素活性は正常の2~33%に低下していた。

(4)セリン負荷によるセラミド蓄積率測定

¹⁴CラベルのセリンをSFに負荷することにより合成されたセラミドを、TLC (薄層クロマトグラフィー) を用いて分離しその蓄積率を測定した。患者では正常の約10倍のセラミド蓄積を認めた。

(5)皮下結節における発現遺伝子の RT-PCR による検索

疼痛軽減のため切除した患者皮下結節と正常、患者の SF を対象にサイトカイン、細胞内シグナルに関する約50種のプライマーセットを用いて RT-PCR を行った。結節と SF では発現遺伝子の傾向が異なったが、正常と患者の SF では明らかな差を認めなかった。結節組織内へのマクロファージ集積を裏付けるように結節内でマクロファージ遊走因子である MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein 1) の発現を認めた。

(6)細胞透過性 C₂-セラミドによる反応遺伝子の検索

THP-1、HL-60を TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13acetate) にてマクロファージ様に分化させた後、細胞透過性 C₂-セラミドを負荷した細胞から RT-PCR を行った。内因性コントロール遺伝子との比較により目的遺伝子の発現量を半定量し、結節で認めた MCP-1 発現の増強を確認した。

【総括】

日本人ファバー病患者の遺伝子変異を報告した。AC 変異遺伝子 mRNA の発現量低下は認めなかったが、酵素活性低下、セラミド蓄積率増加を認めた。AC 発現実験における酵素活性の低下は、病気レベルとしてはやや高値のものがあり、今後産生酵素の局在などを調べる必要があると思われた。今回検討したファバー病の2例は臨床的に2型(軽症型)と5型(神経症状進行型)に分類されるが、セラミド代謝に関する検討ではその差異を認めず、より多くの症例検討とともに AC やセラミドの細胞内局在など別の観点からの解析も必要であった。リソゾーム蓄積症の中でファバー病に特異的な皮下結節形成は、患者結節における発現遺伝子とマクロファージ様細胞のセラミドに対する反応から MCP-1 が病態形成に関与していると示唆された。また痩せに関しては、最近 NF- κ B による MyoD 発現の抑制が筋再生を阻害するとの報告があった。マクロファージ様細胞において、p65 (NF- κ B のサブユニット) の発現がセラミド負荷に対し反応性に増加したことは、本症における痩せの原因とも推察された。

論文審査の結果の要旨

ファバー病(酸性セラミダーゼ欠損症)2例における遺伝子変異を同定するとともに酵素欠損とセラミド蓄積の異常を明らかにした日本人における初めての報告であった。また皮下結節にはマクロファージの集積があり MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) mRNA の発現が認められた。結節形成はリソゾーム病の中でファバー病に特異的であり、本研究における C₂-ceramide 負荷による MCP-1 の発現増加は新しい知見と考えられた。以上より学位の授与に値すると考えられる。