

200936209A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた
基礎的・臨床的検討に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大 菌 恵 一

平成22年(2010年)3月

はじめに

本報告書は、厚生労働省難治性疾患克服事業より研究助成を受けた「低フォスファターゼ症の個別最適化治療に向けた基礎的・臨床的検討」という班研究の平成21年度の研究成果をまとめたものである。本研究班は本年度に新たに組織されたものである。主任研究者および分担研究者は以前より、低フォスファターゼ症の臨床および研究に携わっていたが、本研究助成を受けて、共同研究組織として低フォスファターゼ症の臨床および研究の推進が可能となったことは、望ましい状況であり、研究の推進に全力を挙げたいと考えている。

低フォスファターゼ症は先天性骨疾患であり、組織非特異型アルカリフォスファターゼ(ALP)遺伝子の異常により引き起こされる。一般的に、発症時期が早いほど重症で致命的となるが、胎内発症の症例でも長期生存可能な病型が存在する。また、乳児型では呼吸障害により、50%程度が死に至ると考えられており、予後の改善が望まれる。乳歯の早期脱落は、栄養摂取や生活面で問題となり、歯科的対応が必要である。このように本症は臨床像が多様である。また、本症に対する対症的な治療法として、痙攣に対するビタミンB6投与、乳児型の高カルシウム血症に対する低カルシウムミルクの使用などがある。2009年、ALP酵素補充療法の治験が北米で開始され、今後、日本においても酵素補充療法が導入される可能性がある。本症の表現型は上述のように多様で、さらに人種差が存在するため、当該研究では、自然歴をふまえて酵素補充療法の適応症例の明確化をめざす。また、効果判定の適切な指標を開発する。最近発足した本症の患者会とも連携し、実態把握を行う。また、酵素補充療法は高額であるため、次世代治療法として、ALP高発現細胞を用いた遺伝子治療法やiPS細胞を用いた遺伝子修復療法の開発をめざす。このような内容を目的とし、研究をスタートさせたが、報告書をみると分かっていただけに、早くも成果がでてきている。特に、低フォスファターゼ症の診断指針を作成したので、今後、その妥当性について検証して行く予定である。

本報告書の発行にあたり、当該研究の背景を述べるとともに、研究分担者ならびに本研究助成事業に感謝して、ご挨拶の言葉といたします。

大園 恵一

研究班の構成

	氏 名	所 属 等	職 名	役割分担
研究代表者	大菌 恵一	大阪大学大学院医学系 研究科小児科学	教 授	総括、iPS細胞治療の開発 患者会支援
分担研究者	島田 隆	日本医科大学大学院 分子遺伝医学分野	教 授	HPPマウスを用いた遺 伝子治療の有効性と安全 性の評価
	折茂 英生	日本医科大学大学院 医科生物化学分野	教 授	石灰化アッセイの開発 血清中の基質の測定法
	織田 公光	新潟大学大学院 口腔生化学	教 授	変異ALPの細胞生物学 的検討
	大嶋 隆	大阪大学大学院歯学部	病院長兼教授	Hypophosphatasia における歯科所見
	安井 夏生	徳島大学大学院 感覚運動系病態医学 運動機能外科学	教 授	F310L/G439Rの症例のそ の後と整形外科的治療
	道上 敏美	大阪府立母子保健 総合医療センター 研究所環境影響部門	部 長	変異型ALPの 多面的機能解析
	五関 正江	日本女子大学家政学部 食物学科栄養学	教 授	変異型ALPの 多面的機能解析

目 次

I. 総括研究報告		
研究代表者	大藺恵一	-----1
II. 分担研究報告		
1. 分担研究者	島田隆	-----4
2. 分担研究者	折茂英生	-----8
3. 分担研究者	織田公光	-----10
4. 分担研究者	大嶋隆	-----11
5. 分担研究者	安井夏生	-----13
6. 分担研究者	道上敏美	-----20
7. 分担研究者	五関正江	-----23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----25
IV. 業績		-----33
V. 診断指針		-----51
VI. 関連アンケート（平成21年度実施分）		-----52
VII. 事後評価に係る報告		-----62

I . 總括研究報告

低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた基礎的・臨床的検討

代表研究者 大藪恵一 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学小児科学講座教授

研究要旨

遺伝子検査の依頼のあった、小児科医・産科医にアンケート調査を行い、合計24名の患者の存在が確認された。胎児期発症した例が15名と過半数を占めた。従来の致死型に相当すると考えられる重度の骨変形・低石灰化例でも、呼吸管理の進歩により長期生存している例があることが判明した。全国28歯科大学および歯学部小児歯科に対する調査で本症の16名が登録された。本症の診断指針を策定した。山中法でiPS細胞を作製することに成功した。

A. 研究目的

低フォスファターゼ症は先天性骨疾患であり、TNS-ALPの欠損により引き起こされる。正確な頻度は不明であり、人種差が大きい。一般的に、発症時期が早いほど重症であるが、胎内発症の症例でも長期生存可能な病型が存在する。また、乳児型では呼吸障害により、50%程度が死に至ると考えられているが、致死率は不明である。乳歯の早期脱落は、栄養摂取や生活面で問題となる。現在、確立された治療法はないが、申請者らは、痙攣におけるビタミンB6の有効性を報告し、乳児型の高カルシウム血症に低カルシウムミルクの使用を推奨してきた。最近、ALP酵素補充療法の治験が北米で開始され、今後、日本においても導入される可能性がある。本症の表現型は多様かつ人種差が存在するため、当該研究では、自然歴をふまえて酵素補充療法の適応症例の明確化をめざす。また、効果判定の適切な指標を開発する。最近発足した本症の患者会とも連携し、実態把握を計る。症状が多彩であること、新規治療法が開発されつつある事より、現時点で正確な病型分類を行い、個別の治療・管理指針を確立する

必要がある。また、酵素補充療法は高額であるため、次世代治療法として、ALP高発現細胞を用いた細胞療法やiPS細胞を用いた遺伝子修復療法の開発をめざす。

B. 研究方法

1. 患者実態把握のためのアンケート調査、広報活動

本症の経験の有無について、産科、小児科、整形外科、歯科を対象にアンケート調査を行う（資料1、2）。その際、遺伝子診断を行えること、患者会が設立されていること等を広報する。患者会のホームページ(<http://hypophosphatasia.life.cocacn.jp>)上でも、実態調査協力を呼びかける。

2. 遺伝子型-表現型の相関の検討

TNSALP 遺伝子診断を直接シーケンス法で行う手技には習熟しており、迅速、かつ確実な診断ができる。また、変異型ALPの多面的な機能解析を行う。従来、個人情報保護の観点から、遺伝情報のみを管理しているが、本研究では倫理委員会に申請後、

遺伝カウンセリング資格を持つ適切な個人情報管理者をおき、匿名化の上臨床情報との相関性を検討する。特に、重症型である周産期型、乳児型数の把握を行い、予後調査を行う。これらの事により、臨床病型の確定と治療・管理の現状を把握し、より適切な本症の治療・管理ガイドラインの策定を行う。

3. 乳歯早期脱落に対する調査

外力によらない乳歯早期脱落の経験についてアンケート調査を行い、基礎疾患としての低フォスファターゼ症の可能性を検討する。また、処置として乳歯早期脱落后義歯となった例について調査する。実際に3例の菌限局型の診療を行っているので、骨の表現型について検討する。

4. 治療効果の判定

血清 ALP 値の変化を検討し、ALP の基質である phosphoethanolamine, pyrophosphate, PLP の測定を行う。Pyrophosphate の測定は臨床検査レベルでは行われないので、本研究班において実験室レベルで測定する。

5. 次世代治療法の開発

ヒト iPS 細胞の作成；

ヒト iPS 細胞の作成は京都大学山中研究室にて樹立されたレンチウイルスおよびレトロウイルスをもちいた方法によって行った。レンチウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターはいずれも Addgene より得た。まず 293FT 細胞へ pLenti6-mSic7a1 を遺伝子導入し、その上清中のレンチウイルスを感染させることでヒト皮膚線維芽細胞へのマウスエクトロピックウイルスレセプターを発現を行った。次に pMXs-Oct4/ -Sox2/ -Klf4/

-cMyc の4つのファクターをコードするレトロウイルスを Plat-E 細胞を用いて作成し、レンチウイルス感染5日後のヒト皮膚線維芽細胞に感染させた。レトロウイルス感染5日後にフィーダー細胞上に再播種し、その翌日よりヒト ES 細胞維持培地上にて約4週間の培養を行った。

C. 研究結果

1. 患者実態把握のためのアンケート調査、広報活動

以前、遺伝子検査の依頼のあった、小児科医・産科医にアンケート調査を行い、合計24名の患者の存在が確認された。胎児期発症した例が15名と過半数を占めた。論文発表した胎児・新生児期発症良性型以外に、従来の致死型に相当すると考えられる重度の骨変形・低石灰化例でも、呼吸管理の進歩により、長期生存している例があることが判明した。

2. 遺伝子型-表現型の相関の検討

TNSALP 遺伝子診断を直接シーケンス法で行う手技には習熟しており、迅速、かつ確実な診断ができる。また、変異型 ALP の多面的な機能解析を行本症の治療・管理ガイドラインの策定を行った(資料3)。

3. 乳歯早期脱落に対する調査

全国28歯科大学および歯学部小児歯科に対して、本症患者の有無を問い合わせた。20施設から回答があり、そのうち6大学で9名の患者の報告を得た。分担研究者の7名とあわせて16名が登録された。乳歯早期脱落は呈するが、永久歯の早期脱落は認められていない。実際に3例の菌限局型の診療を行っ

ているので、骨の表現型について今後検討する。

4. 治療効果の判定

Pyrophosphate の測定法を確立したので、診断指針に明記し、は臨床検査レベルでは行われないので、本研究班において実験室レベルで測定する。

5. 次世代治療法の開発

ヒト iPS 細胞の作成；

1×10^5 個のヒト皮膚線維芽細胞より通常 10-20 個程度の iPS 細胞コロニーが得られた。またレトロウイルス感染 21 日をこえてから現れるコロニーの方が iPS 化される傾向が強かった。

D. 考察

歯の症状を取り入れた診断管理指針（案）を作成し、初年度の目標を達成した。2 年目は本指針案の妥当性について検討し、その後、普及を図る。

E. 結論

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura-Utsunomiya A, Okada S, Hara K, Miyagawa S, Takeda K, Fukuhara R, Nakata Y, Hayashidani M, Tachikawa K, Michigami T, Ozono K, Kobayashi M. Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: a report of 6 cases. *Clin Pediatr Endocrinol*, 19(1): 7-14, 2010

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. その他当初の研究計画に照らした本研究事業の進捗状況 予定通り順調に進捗している

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた基礎的・臨床的検討

分担研究報告書

低フォスファターゼ症に対する遺伝子治療法の開発

研究分担者 島田隆 日本医科大学大学院（分子遺伝医学分野）教授

研究要旨

重篤な乳児型低フォスファターゼ症(HPP)のモデルと考えられている TNALP（組織非特異型アルカリフォスファターゼ）ノックアウトマウス(HPP マウス)に対する遺伝子治療の可能性を検討した。骨親和性 TNALP を発現するレンチウイルスベクターを作製し、新生児 HPP マウス（1-3 日齢）の経静脈から投与した。未治療の HPP マウスは、成長障害、骨化遅延、痙攣を繰り返し約 2 週間で死亡するが、治療マウスでは、血中の ALP 活性は高値を維持し、痙攣は抑制され、寿命は少なくとも 10 ヶ月以上延長した。骨化は改善し、外見や運動機能も野生型マウスと差を認めなかった。一回のウイルスベクターの投与で、HPP モデルマウスが遺伝子治療できることが明らかになった。

A. 研究目的

重篤な乳児型低フォスファターゼ症(HPP)のモデルと考えられている TNALP（組織非特異型アルカリフォスファターゼ）ノックアウトマウス(HPP マウス)に対する遺伝子治療の有効性と安全性を検討した。

HPP は TNALP の欠損により骨形成障害を呈する遺伝性骨系統疾患で、胎児期から新生児期に死亡する重篤な周産期型から、症状が歯のみに限局した軽症のオドント型など様々な病型が知られている。TNALP は GPI アンカーにより細胞膜外側に結合している。TNALP の骨形成における機能としては、骨芽細胞、軟骨細胞、matrix vesicle（基質小胞）周囲で骨化反応を阻害するピロリン酸(PPi)を加水分解し、骨化反応を促

進することにあると考えられている。HPP の治療として、ヒト血清やヒト組織から抽出した ALP を使った酵素補充療法や骨髄移植などが試みられたが、有効性は確認できていない。これまでの方法では骨組織に十分な TNALP を集積することが難しいと考えられている。

HPP マウスは、成長障害、骨化遅延、pyridoxine 代謝異常による痙攣を繰り返し約 2 週間で死亡する重篤な乳児型 HPP のモデル動物と考えられている。最近、Millan らは、骨組織への親和性を持つと考えられている酸性アミノ酸ペプチドを付加した組換え TNALP を連日大量に皮下投与することで、HPP マウスの延命と骨化の改善を報告している。この実験結果に基づいて現在ヒトに対する新しい酵素補充療法の臨床治

験が開始されている。

酵素補充療法は、酵素製剤が生体内で直ぐに分解されてしまうため、大量の酵素を生涯に渡り繰り返し投与しなくてはならない。従って、医療費は極めて高額となり、患者の精神的、肉体的負担も大きい。我々は、これらの問題を解決する方法として HPP の遺伝子治療の可能性を様々なアプローチで検討している。今回、レンチウイルスベクターの新生児 HPP マウスの治療実験を行った。

B. 研究方法

骨親和性 TNALP を発現するため、TNALP の C 末端に 10 分子のアスパラギン酸を付加した TNALP-D10 の cDNA を構築し、レンチウイルスベクタープラスミドに組み込んだ。レンチウイルスベクター (SIN-HIV-TNALP-D10) は 293T 細胞への transient transfection 法によりパッケージングし、陰イオン交換 Q カラム、及びショ糖密度遠心法により精製、濃縮した。

新生児 HPP マウス (1-3 日齢) の経静脈からレンチウイルスを投与し、血中 ALP 濃度測定、体重測定、レントゲンでの骨化評価を経時的に行った。ベクターの体内分布は qPCR で、ALP の骨内分布は活性染色で調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果及び考察

未治療の HPP マウス (TNALP^{-/-}) は出生後、体重が増加せず痙攣を繰り返すよう

になり平均 18 日で死亡した。一方、遺伝子治療を行った HPP マウスは野生型 (WT) マウス (TNALP^{+/+}) やヘテロマウス (TNALP^{+/-}) とほぼ同じ体重増加を示し、外見や運動機能でも差を認めなかった。痙攣は完全に抑制され、寿命は少なくとも 10 ヶ月以上延長した。

出生後 10 日での血中 ALP 濃度は WT マウスでは 0.25 ± 0.07 U/ml、HPP マウスでは 0.1U/ml 以下であった。一方、遺伝子治療を受けた HPP マウスでは 2.67U/ml と極めて高い血中濃度であった。qPCR によりベクターの臓器分布を調べたところ肝臓で最も高率に発現していることが示された。

レントゲンによる骨化の評価では、WT マウスに比較して未治療の HPP マウスでは中手骨や指骨の短縮や二次骨化中心の欠損などが認められたが、治療後のマウスにおいては明らかな骨化の改善が認められた。遺伝子治療により長期生存したマウスはレントゲン写真上 WT マウスとの差は認められなかった。骨組織の活性染色において未治療の HPP マウスでは全く活性が認められなかったが、遺伝子治療後のマウス骨梁周囲に ALP 活性が認められた。

D. 考察

HPP マウスの主要な死因は痙攣重積による呼吸不全であると考えられている。これは ALP の重要な基質である PLP (pyridoxal phosphate) の分解ができないため、神経細胞内での神経伝達物質の代謝障害が起きるためと考えられている。ビタミン B6 の投与で痙攣を部分的に抑制できることが報告されているが、遺伝子治療による TNALP の酵素補充により痙攣を完全

に抑制できることが明らかになった。

ヒトでも重症例で痙攣が認められるケースがあるが、HPPの主要な症状は骨化不全である。これまで試みられた酵素補充療法では、投与されたALPの量が限られており、実際に機能すべき骨組織で十分な活性がなかったと考えられている。今回、遺伝子治療で使用したTNALPは骨親和性を高めるために酸性アミノ酸を付加している。このようなハイブリッド分子が骨組織に親和性を持つことは*in vitro*の実験では示されているが、生体内での有用性については明確なデータはない。現在、カナダで行われている骨親和性TNALPを使った酵素補充療法治験のデータの開示が待たれる。

レンチウイルスは染色体に組み込まれるため長期の遺伝子発現が可能である。今回の実験条件では正常マウスの10倍以上の高いALP値を示し、十分な治療効果を得ることができた。一方で、特別な副作用は認められなかった。しかし、高ALP血症では異所性の骨化が起こることが報告されており、今後、更に投与量を検討し、最適な条件を決める必要があると考えられた。

これは世界最初のHPPに対する遺伝子治療実験の成功例であり、是非、臨床応用にまで発展させていきたい。現在カナダで進められている酵素補充療法に世界中のHPP患者が注目している。しかし、この治療法は大量の精製酵素を一週間に3回皮下注射するもので、有効性が今後明らかになったとしても、世界中の患者に長期に渡り酵素を供給することは難しいと考えられている。遺伝子治療はタンパク質を使う古典的酵素補充療法の問題点を解決する革新的な方法であり、早期に実用化し酵素補充療

法に取って代わることが患者にとっても、医療行政にとっても重要な方向性であると考えられる。

E. 結論

重篤な乳児型低フォスファターゼ症(HPP)のモデルと考えられているTNALP(組織非特異型アルカリフォスファターゼ)ノックアウトマウスの遺伝子治療に成功した。レンチウイルスベクターの新生児期一回投与により、TNALPの長期発現、発達の正常化、骨化の改善、痙攣の阻止が認められ、少なくとも10ヶ月の延命効果が確認できた。遺伝子治療はHPPの重要な治療法として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山本晴子、折茂英生、塙 秀樹、松本多絵、成澤園子、J.L. Millán、島田 隆：低フォスファターゼ症のレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療。第53回日本人類遺伝学会、2008, 9, 横浜。

折茂英生、五関 曾根正江、細井孝之、島田 隆：骨芽細胞様細胞株U₂OSを用いた変異組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子の機能解析。第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、2008, 12, 神戸。

山本晴子、折茂英生、塙 秀樹、松本多絵、S. Narisawa、J.L. Millán、島田 隆：

- 低ホスファターゼ症のモデルマウスを用いた遺伝子治療. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008, 12, 神戸.
- Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, JL., Shimada, T. Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 第 8 回 ALPS meeting、2009. 7 新潟
- 松本多絵、山本晴子、三宅弘一、三宅紀子、小田垣祐子、折茂英生、島田隆：AAV ベクターによる低ホスファターゼ症の遺伝子治療. 第 54 回人類遺伝学会、2009, 9, 東京
- 渡邊淳、澤井英明、近藤仁美、Than Naing Banyar、菅野華子、唐杉樹、池川志郎、折茂英生、島田隆：周産期型定ホスファターゼ症の課題－変異スクリーニング法の開発と TNSALP1559Tdel 保因者頻度の同定. 第 54 回人類遺伝学会、2009, 9, 東京
- Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millan, JL., Shimada, T. Long term phenotypic correction of severe infantile hypophosphatasia in a mouse model by neonatal injection of lentiviral vector. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2009. 5. San Diego
- Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millan, JL., Shimada, T. Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 11th International Congress of Inborn Error of Metabolism. 2009. 9. San Diego
- Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Shimada, T. Adeno-associated virus (AAV) type-8 mediated systemic neonatal gene therapy for Hypophosphatasia. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2009. 10. Honolulu
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 低ホスファターゼ症の診断方法 渡邊淳、島田隆、折茂英生（申請中）

低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた基礎的・臨床的検討

研究分担者：折茂英生 日本医科大学大学院教授

研究要旨：治療効果判定グループとして、予後と治療効果判定のため、*in vitro* 石灰化アッセイと、アルカリフォスファターゼの自然基質のうちピロリン酸の定量法の確立を試みた。活性が野生型の35%以上では*in vitro*での石灰化を認め、*in vivo*表現型との相関を認めた。また、non RI法によるピロリン酸を定量し、ノックアウトマウスで高値を確認した。

A. 研究目的

治療効果判定グループとして、予後と治療効果判定のため、*in vitro* 石灰化アッセイと、アルカリフォスファターゼ（ALP）の自然基質の定量法を確立する。

B. 研究方法

①石灰化アッセイ：変異ALP発現プラスミドをU₂OS細胞に導入後、石灰化の程度を定量し、予後判定の指標となるかを検討する。②ALPの自然基質のうちピロリン酸（PPi）、pyridoxal 5'-phosphate（PLP）を実験室レベルで測定する。

C. 研究結果

①活性が野生型の35%以上では*in vitro*での石灰化が認められ、*in vivo*の症状と相関していた。②野生型およびノックアウトマウスの血清PPiを定量し、ノックアウトマウスでの高値を認めた。

D. 考察

①活性と石灰化の関連性が認められ、遺伝子型から表現型の予測が可能となれば、質的診断に資することができる。②今回の方

法はRIを使用しないため、一般の測定室にて短時間で行える利点があるが、現在のところ患者血清とコントロール血清が入手できないため、ヒトにおける有効性の検証ができていない。

E. 結論

予後と治療効果判定のための方法の確立を行い、マウス血清の測定に応用できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hager, S., Lampert, F. M., Orimo, H., Stark, G. B., Finkenzeller, G.: Up-regulation of alkaline phosphatase expression in human primary osteoblasts by cocultivation with primary endothelial cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mRNA stabilization. *Tissue Eng.* 15: 3437-3447, 2009.

2) Orimo, H.: The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* 77: 4-12, 2010.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J.L., Shimada, T.: Long term phenotypic correction of severe infantile hypophosphatasia in a mouse model by neonatal injection of lentiviral vector. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2009.5. (San Diego, CA).
- 2) Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Shimada, T.: Adeno-associated virus (AAV) type-8 mediated systemic neonatal gene therapy for hypophosphatasia. 第15回日本遺伝子治療学会、2009.7.
- 3) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J. L., Shimada, T.: Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 第8回ALPS研究会、2009.7.
- 4) Watanabe, A., Orimo, H., Shimada, T.: Genotype frequency and clinical significance of 1559T deletion in the *TNSALP* gene in Japan. 第8回ALPS研究会、2009.7.
- 5) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J.L., Shimada, T.: Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2009. 8. (San Diego, CA).
- 6) 折茂英生: 硬い組織はどうしてできるのか?—石灰化のメカニズムとアルカリホスファターゼ. 第77回日本医科大学医学学会総会、2009.9.
- 7) 松本多絵、山本晴子、三宅弘一、三宅紀子、小田垣祐子、折茂英生、島田 隆: AAVベクターによる低ホスファターゼ血症の遺伝子治療. 第54回日本人類遺伝学会大会、2009.9.
- 8) 渡邊 淳、澤井英明、近藤仁美、Banyar Than Naing、菅野華子、唐杉 樹、池川志郎、折茂英生、島田 隆: 周産期型低ホスファターゼ症の課題—変異スクリーニング法の開発とTNSALP 1559T del保因者頻度の同定—. 第54回日本人類遺伝学会大会、2009.9.
- 9) Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Odagaki, Y., Orimo, H., Shimada, T.: Adeno-associated virus (AAV) type8 mediated systemic neonatal gene therapy for hypophosphatasia. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2009.10. (Honolulu, Hawaii).

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許出願

発明の名称「低ホスファターゼ症の診断方法」

発明者 渡邊 淳、折茂英生、島田 隆

特許出願人 学校法人 日本医科大学

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた基礎的・臨床的検討に関する研究

研究分担者 織田公光 新潟大学大学院医歯総合研究科

研究要旨

低フォスファターゼ症患者で報告された組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子の突然変異（1559delT, A99T）に関する研究

A. 研究目的

1. A99Tの変異を有する組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNSALP)の細胞物学的な解析。
2. 1559delTフレームシフト変異を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とそれに基づいたアッセイキットの開発。

B. 研究方法

1. TNSALP(A99T)を哺乳類動物細胞に発現させて、酵素化学的、生化学的そして形態学的な方面からその解析を行なう。
2. TNSALP(1559delT)を発現する細胞の培地を大量に集め、そこから本変異酵素を精製して抗原とし、モノクローナル抗体を得る。

(倫理面への配慮)

本実験では個人のサンプル（遺伝子、血液、組織）は一切用いていない。

C. 研究結果

1. 野生型酵素との比較検討によりA99T酵素の異常な性質が明らかになった。活性を全く発現できないことが判明しその原因が本来非共有結合で2量体を形成するはずの酵素が、ジスルフィド結合による凝集物を形成しておりしかも細胞表面に発現していた。また、野生型酵素のサブユニットと会合する結果も得ており、本変異が優性遺伝する事実とも一致した。
2. 培養液上清から抗アルカリホスファターゼ抗体アフィニティーカラムによる精製を行なっている。

E. 結論

本年度の研究の2つの目標のうち、1)に関してはほぼその解析を終え、論文を投稿する準備段階にある。一方、2)については当初の見込み程精製が簡単でないことがわかり、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

厚生労働科学研究補助金

分担研究報告書

低フォスファターゼ症の個別最適治療に向けた基礎的、臨床的検討

研究分担者 大嶋 隆 大阪大学大学院歯学研究科教授

研究要旨

低フォスファターゼ症患者における歯科的治療指針を確立する目的で、全国歯科大学小児歯科に対して本患者に関する問い合わせを実施したところ16名が確認され、歯科的には歯限局型で重度であることが明らかになるとともに、永久歯早期脱落の予防法を考察した。

A 研究目的

低フォスファターゼ症の特徴的な歯科所見として乳歯の早期脱落がある。この早期脱落は永久歯でも起こる事が報告されており、保護者にとっては最も必要な関心事となっている。この現象は、歯と歯槽骨を結合させる歯根膜線維の歯根側結合部であるセメント質の形成不全と、萌出した乳歯にかかる多大な咬合圧によってもたらされると考えられる。永久歯における例は極めて少ないものの、その可能性について明確に説明できる根拠は未だ示されていない。この研究の目的は、低フォスファターゼ症患者における歯科的治療指針を確立することである。

B. 研究方法

全国28歯科大学小児歯科に対して、低フォスファターゼ症患者の有無

を問い合わせ、その病態、早期脱落乳歯の有無、その脱落時期、早期脱落永久歯の有無とその時期についてを、患者様が特定できない形体で問い合わせた。また、低フォスファターゼ症に関する症例報告における病態、早期脱落乳歯の有無、その脱落時期、早期脱落永久歯の有無とその時期について調べた。

C. 研究結果

全国の20の小児歯科から回答があり、そのうち6大学で9名の患者の報告を得た。大阪大学においては7名の患者を診ており、全国の大学病院小児歯科においては、16名が登録された。その医科的病態と歯科症状とを調べてみると、骨症状の見られない歯限局型で歯科的には重度の症状が見られた。しかし永久歯の早期脱落は認められなかった。

D. 考察

これまで永久歯の早期脱落を報告した症例では、乳臼歯の早期脱落が認められている。このことは、永久歯萌出時期に口腔内の存在する乳歯の数が少なく、乳歯の早期脱落の場合と同じように、萌出する永久歯に過剰な咬合圧がかかっていた可能性が高い。永久歯の早期脱落を予防するためには、萌出する永久歯に対する咬合圧を軽減するために小児義歯の装着が薦められる。

E. 結論

永久歯の早期脱落を予防するためには、喪失した乳歯部に小児義歯を装着する事が薦められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

『低フォスファターゼ症罹患患児における歯科的所見』、大川玲奈、仲野和

彦、鎌倉尚文、松本道代、大嶋隆、第48回日本小児歯科学会、名古屋、

5, 19, 2010 (発表予定)

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

研究要旨

低フォスファターゼ症には発症時期に基づく6つの臨床病型があるが、この病型に分類しきれないものがあることがわかった。3例の自験例につき遺伝形式と臨床経過を解析した結果、周産期死亡型（常染色体劣性遺伝）と思われた家系でも、複合ヘテロ接合体であることがわかり、患者は長期生存した。また小児期に見られた骨変形は成長とともに自然矯正され、手術的な矯正を行う必要がなかった。

A. 研究目的

低フォスファターゼ症は組織非特異的アルカリフォスファターゼ（TNSALP）遺伝子の異常が原因の先天性骨系統疾患であり、全身の骨や歯の石灰化障害を特徴とする。血清および骨のアルカリフォスファターゼ活性の低下がみられるが、その程度は様々で臨床像も症例により大きく異なる。一般に発症時期が早いほど重症と考えられ、最重症型は呼吸不全のため周産期に死亡する。一方軽症型の中には成人期まで病気に気づかず、病的骨折を起こして始めて低フォスファターゼ症と診断されるものもある。現在

までに6つの臨床病型が知られている（表1）。多くの酵素欠損症にみられるように重症型は常染色体劣性遺伝、軽症型は常染色体優勢遺伝を呈することが多いが、この分類に当てはまらないものもあり、遺伝子型と表現型の両面から本疾患を見直す必要がある。

本研究の目的は整形外科の立場から低フォスファターゼ症の臨床病型を見直し、その整形外科的治療法を検討することである。

臨床病型	遺伝形式	臨床所見
周産期致死型	AR	石灰化障害、骨軟骨棘
周産期生存型	AD	長管骨彎曲、生命予後良好
乳児型	AR	頭蓋縫合閉鎖、石灰化障害、くる病様肋骨、高Ca血症
小児型	AR/AD	低身長、骨変形、骨痛、骨折
成人型	AD	疲労骨折、軟骨石灰化症
歯限局型	AD	歯槽骨萎縮、歯の脱落

B. 研究方法

低フォスファターゼ症の自験例につき遺伝形式と臨床経過から上記臨床病型のいずれに当てはまるかを分類する。遺伝子診断

の結果から遺伝形式について考察し、臨床病計を見直す。血清ALP値の経年齢的变化を調べる。また成長とともに変化するX線像を解析し、低フォスファターゼ症の骨の成長、変形、アライメントについて考察する。

C. 研究結果

症例 1 : 初診時 0 歳の女子、

新生児期に臨床症状と血液検査で低フォスファターゼ症と診断される。両親は正常で血族結婚はない。二人の姉のうちひとり

が周産期致死型の低フォスファターゼ症であったが、もう一人は健常者として生存している。本人および家族の血清 ALP 値を表 2 に示す。

表 2

	年齢 (才)	ALP 値 (IU/L)	正常値 (IU/L)
発端者	出生時	86	490±215
	1	115	471±145
	2	113	478±153
母親	3 5	62	161±60
父親	3 6	67	145±32
姉 1	出生時	18	490±215
姉 2	4	185	442±116

末梢白血球からの遺伝子解析の結果、本人の TNSALP 遺伝子には片方の対立遺伝子に Phe310Leu 変異が、他方の対立遺伝子に Gly439Arg 変異が認められた。Phe310Leu 変異は父親由来であり、Gly439Arg 変異は母親由来であった。すなわち両親はヘテロ接合体の保因者であり、本人は複合ヘテロ接合体の低フォスファターゼ症であった。

本例は現在知られている 6 つの臨床病型のどれにも該当せず、独特の経過をたどった。出生時の X 線像を見ると大腿骨および下腿骨に骨幹部彎曲変形を認め、腓骨の中央には骨棘が認められた。骨の石灰化障害はなく、むしろ全身骨

は骨硬化の様相を呈した (図 1)。成長とともに骨硬化は改善し、石灰化障害も認めなかったが骨棘が目立つようになり (図 2, 3)、2 才時に骨棘の切除と皮膚形成術を施行した。脛骨の前方凸変形があったため、矯正骨切り手術の適応も考慮したが、自然経過を見るうちに変形は徐々に改善し (図 4)、8 才時にはほとんど問題となくなった。大腿骨にわずかに内反変形を残したが手術により矯正を必要とするほどではなくなった (図 5)。



図 1 : 症例 1 : 新生時期 骨硬化と彎曲を認める