

図2：症例1：2才時の下腿正面と側面。 骨硬化は改善しているが腓骨の骨棘が目立つ。

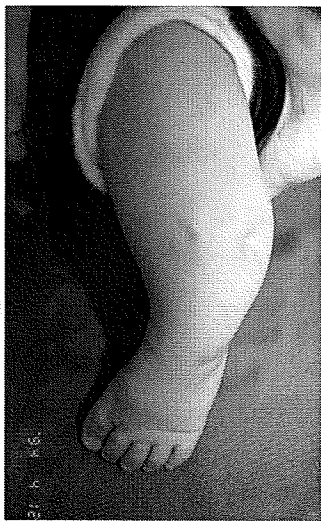


図3：症例1：下腿の皮膚陥凹

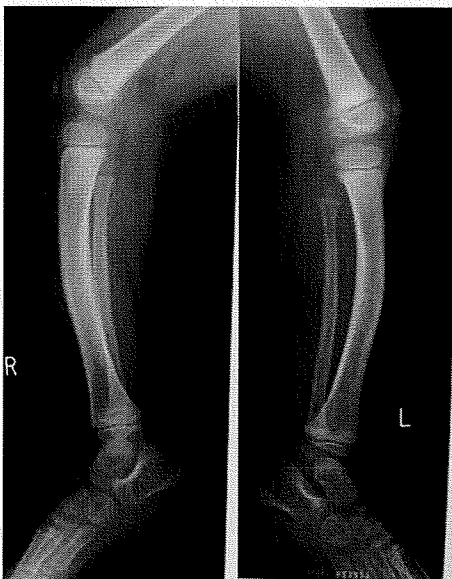


図4：症例1：4歳時 下腿側面 下腿彎曲は改善している

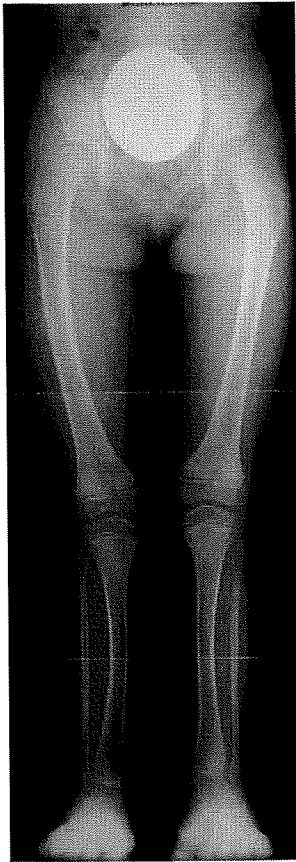


図5：症例1：8歳時 下肢全長

症例2：初診時3歳7ヶ月の女子

初診時にALP 4.3 IU/Lと低値を示し低フォスファターゼ症と診断される。遺伝子検査は行っていない。5才時に両先天性内反足の手術をうけている。その時に撮影した膝のX線像で骨端線にわずかの不整を認めるが(図6)、明らかな石灰化障害は認めない。13才時には身長130.8cm(正常身長:154.6±5.3cm)と-3SDの低身長を認めた。このとき血清ALP値は110 IU/Lまで改善していたが同年令の基準値には到達していない。15才時の下腿のX線像に

て腓骨骨幹部中央に骨棘の遺残を思わせる骨肥厚を認めた。20才時の血清ALP値は38 IU/Lと、やはり成人の基準値(110-220 IU/L)より明らかに低値を示した。この患者は16歳のときに他医により両下腿骨延長術をうけているが骨形成には問題がなかったとのことである。

本例はたまたま周産期に診断されているが、臨床病型としては小児型に属すると考えられる。

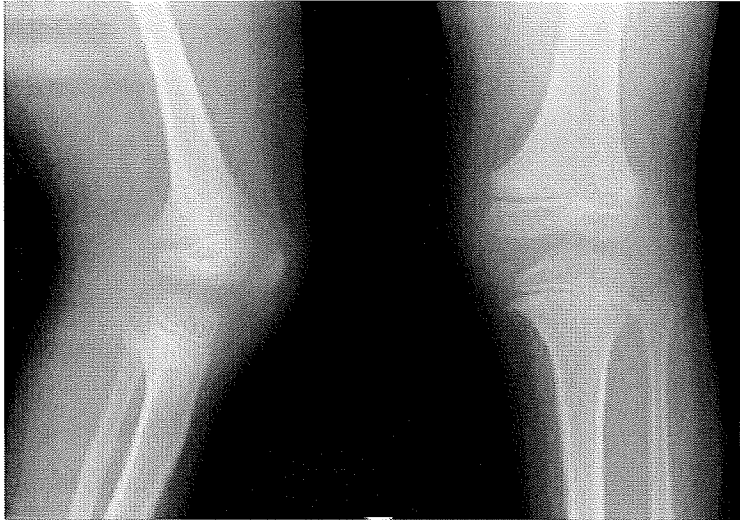


図6：症例：5才時の両膝正面像

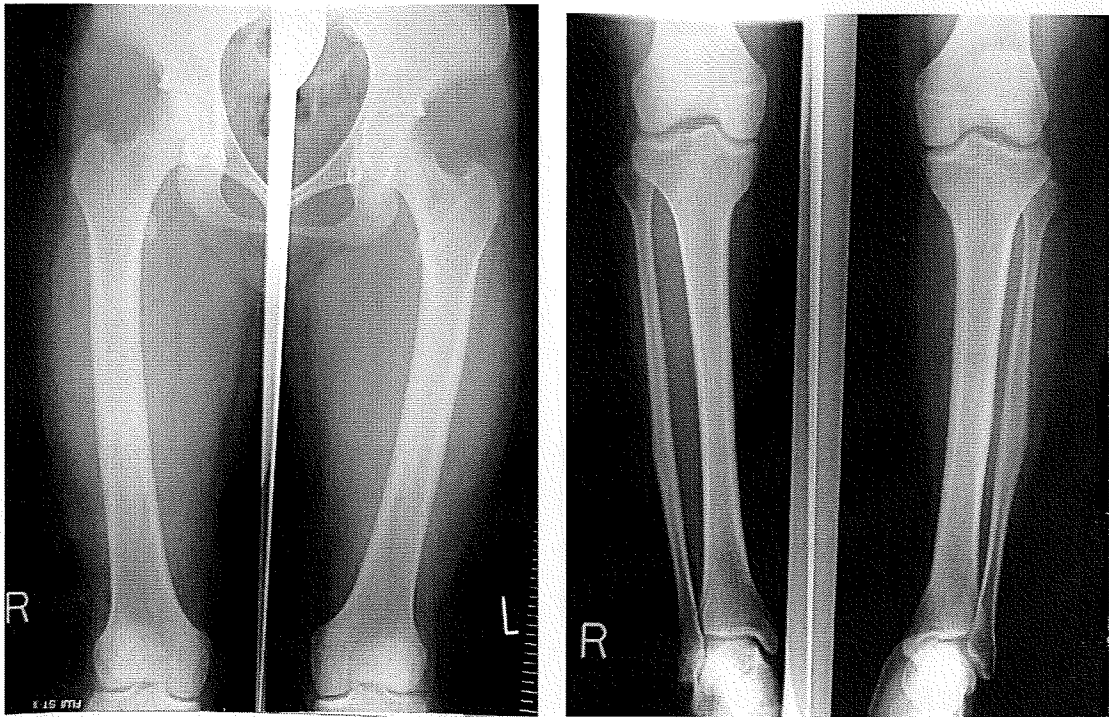


図7：症例2：15才時の両大腿正面像と両下腿正面像

症例3：0歳男子

出生直後の全身骨のX線像で両大腿骨の前方凸変形を認めたが、頭蓋骨に明らかな石灰化障害は認めなかった(図8)。血清アルカリフォスファターゼが59 IU/L(正常値は115-359 IU/L)

と低く、フォスホエタノールアミンは320 $\mu\text{mol/day}$ (正常値 $\leq 44 \mu\text{mol/day}$)と高値を認め、低フォスファターゼ症と診断された。本例はまだ慎重に経過観察中である。本例は臨床病系としては周産期生存型に属すると思われる。



図8：症例3 出生時全身X線



図9：症例3。出生直後の頭蓋側面

D. 考察

血清 ALP 値は小児では成人の 2-3 倍もの高値をとる。成長とともに血清 ALP 値は徐々に低下し、成長終了後には新生時期の 3 分の 1 以下の値に落ち着く。TNSALP が生体内でどのような役割を果たしているかは未だ不明であるが、石灰化前線において基質小胞の ATP を分解し、カルシウムと結合するリン酸の提供に役立っているのではないかと考えられている。とすれば TNSALP の欠損または低下症で石灰化障害がおこるのは理解しやすい。

我々が経験した 3 例の低フォスファターゼ症では X 線上明らかな石灰化障害は認められず、むしろ症例 1 では新生児期に骨硬化像が観察された。TNSALP の低下がどのようにして骨硬化を招くのか、また成長とともに血清 ALP 値が徐々に改善し、骨硬化も消失する機序は不明である。正常の小児の骨は常にリモデリングをうけ、長管骨の骨幹部の変形は成長とともに自然矯正されることがよく知られている。低フォスファターゼ症でも大腿骨や脛骨の骨変形は自然矯正されていくことがわかった。

症例 1 では同年令の正常者と比べれば血清

ALP 値は低かったが、正常の保因者である両親よりは高値を示した。このことは新生児期ほど TNSALP の果たす役割が大きく、成長とともにその役割は軽減していくことを示唆している。

E. 結論

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。周産期死亡型（常染色体劣性遺伝）と思える家系でも、正常保因者である両親が TNSALP に異なる遺伝子異常を持つ場合があり、患者は複合ヘテロ接合体である可能性がある。また、低フォスファターゼ症の小児期に見られる骨変形は手術的な矯正を行わなくても、経過観察すれば成長とともに自然矯正される可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表

なし

H. 知的財産権

なし

低フォスファターゼ症の遺伝子型・表現型相関に関する解析

研究分担者 道上 敏美 地方独立行政法人 大阪府立病院機構
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

研究要旨

低フォスファターゼ症は組織非特異型アルカリフォスファターゼ(*TNSALP*)遺伝子の変異にもとづく遺伝性骨疾患であり、通常、発症時期及び重症度により周産期型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型の5病型に分類される。従来、周産期発症型は致命的な経過をとると考えられてきた。日本人患者においては、1559delTとF310Lという2つの変異の頻度が高く、1559delTは周産期致死型や乳児型等の予後不良な症例に関連しており、一方、F310Lは周産期発症にも関わらず予後良好な症例に関連している。今回、骨石灰化障害がなく、新生児期から乳児期早期には認められた骨変形が経過とともに自然に改善した本症症例の分子診断を行い、F310L/G322Rの複合ヘテロ接合体であることを明らかにした。本症例の良好な経過は、F310L変異型ALPの残存活性によるものと考えられた。また、これまで、乳児期早期に致命的な経過をとるとされてきた1559delTホモ接合体症例において、積極的な呼吸管理などにより、骨症状の改善、より長期の生存が期待できることを示した。これらの結果から、ALPの要求性には年齢依存性があり、周産期および乳児期を生存し得た症例では長期生存が得られる可能性があることが示唆された。従って、本症の管理においては、分子診断による正確な予後判定、遺伝カウンセリングが重要であると考えられ、本症の、特に重症型の取り扱いについてのガイドラインの策定が急務である。

A. 研究目的

低フォスファターゼ症は組織非特異型アルカリフォスファターゼ(*TNSALP*)遺伝子の変異に基づき、骨石灰化障害や成長障害を来す遺伝性疾患である。通常、発症時期および重症度にもとづき、周産期型、乳児型、小児型、成人型、歯牙限局型の5病型に分類される。一般には、発症時期が早いほど重症であるとされており、従来、周産期発症例は致命的であると考えられてきたが、筆者らはこれまでの検討から、日本人の本症患者の中には、周産期発症にも関わらず、石灰化障害が軽度で予後良好な症例が存在することを見いだした(Ozono, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1996)。さらに、日本人患者においては、F310Lと1559delTという2つの変異の頻度が高く、

前者は周産期発症にも関わらず予後良好な症例に関連しており、後者は周産期致死型や乳児型等の予後不良な症例に関連していることを報告した(Michigami, et al. *Eur J Pediatr*, 2005)。これらの結果は、本症の日本人症例において、遺伝子型と表現型の間にある程度の相関関係が存在する可能性を示唆する。本症における変異には人種差がみとめられ、日本人に多い変異は海外ではほとんど報告がない。日本人に多い変異が本症の表現型や重症度にどのように関連しているのかについて詳細に解析することは、本症の秘本人症例に対する遺伝カウンセリングや治療法の選択に有用な情報を提供すると考えられる。そこで、本課題においては、日本人症例で同定された変異型ALP蛋白質の機能解

析を行い、病態との関連性を明らかにすることを目的として研究を行った。また、本症においては低身長が高頻度に認められることから、その発症メカニズムについても解析した。

B. 研究方法

TNSALP 遺伝子解析については、患者あるいは代諾者に説明を行い、文書での同意を得た後に行った。末梢血単核球より抽出したゲノム DNA を鋳型として *TNSALP* 遺伝子の蛋白コード領域のすべてのエクソンを PCR にて増幅し、直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

また、野生型あるいは変異型 ALP をコードする発現プラスミドを構築し、COS7 細胞に遺伝子導入し、発現および酵素活性を評価した。

さらに、本症においては低身長が高頻度に認められるが、このことは、*TNSALP* の機能の異常が骨の石灰化のみならず、軟骨の成長にも影響を及ぼす可能性を示唆する。*TNSALP* はフォスファターゼとして骨や軟骨の局所で無機リン酸を産生する酵素であるところから、軟骨局所における無機リン酸の不足が、本症の低身長の病態に関与しているとの仮説のもとに、軟骨細胞に対する細胞外無機リン酸の作用について、マウス軟骨細胞株 ATDC5 をモデルとして用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

TNSALP 遺伝子解析については、倫理委員会の承認のもとに、患者あるいは代諾者に説明を行い、文書での同意を得た後に施行した。

C. 研究結果

生後まもなくより認められた骨変形が自然に改善した、特異な経過を示した本症症例の分子診断を行った。本症例は、出生時より

認められた四肢の骨変形により当初整形外科にて *Camptomelic Dysplasia* を疑われたが、*SOX9* 遺伝子の検索により否定された。3歳時に低身長の精査目的にて小児科を受診した際に血清 ALP 値の低下に気づかれ、低フォスファターゼ症の診断に至った、興味深い症例である。本症例においては、3歳時の小児科受診時には骨変形はほぼ消失しており、明らかな骨異常を認めなかった。本症例の *TNSALP* 遺伝子解析の結果、F310L と G322R という2つのミスセンス変異のヘテロ接合体であることが判明した。これらの変異型 *TNSALP* の発現プラスミドを構築し、培養細胞に遺伝子導入して ALP 酵素活性を評価したところ、G322R 変異体が活性をほぼ完全に消失していたのに対して、F310L は野生型 ALP の半分程度の残存活性を有していた。このことから、本症例で認められた骨変形の自然改善は、F310L の残存活性によるものであることが推察された(投稿準備中)。さらに、筆者らのこれまでの検討では、1559delT のホモ接合体の症例は周産期に発症し、乳児期早期に致死的な経過をとっていたが、人工呼吸器による積極的な管理により、次第に全身状態が改善し、2歳を超えて生存している症例を経験し、報告した(Nakamura-Utsunomiya, et al. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2010)。

前述の F310L 変異を有する症例においては、レントゲン上、骨の異常がほとんど認められなくなった時点においても-3.0 SD という明らかな低身長が認められた。また、筆者らがこれまでに遺伝子解析を行った F310L を有する症例の多くが、整形外科的に骨変形を矯正した後においても明らかな低身長を呈していた。このことは、*TNSALP* の機能の異常が骨の石灰化のみならず、軟骨の成長にも影響を及ぼす可能性を示唆する。*TNSALP* はフォスファターゼとして骨や軟骨の局所で無機リン酸を産生する酵素であるところから、軟骨局所における無機リン酸の不足が

本症の低身長有病態に關与しているとの仮説のもとに、軟骨細胞に対する細胞外無機リン酸の作用について解析を行った。軟骨細胞分化のモデルとして広く用いられているマウス間葉系細胞株 ATDC5 を用いて、培養液中の無機リン酸濃度が及ぼす影響を検討した。その結果、細胞外無機リン酸濃度の上昇は Raf/MEK/ERK 経路の活性化をもたらし、細胞周期に關連する cyclin D1 遺伝子の発現を誘導することにより、軟骨細胞の増殖を促進することを見いだした (論文投稿中)。

D. 考察

今回得られた知見から、日本人の本症患者のなかには周産期発症であっても良好な経過をとる症例が存在し、F310L 変異と關連しているというこれまでの筆者らの知見が確認された。また、ALP の要求性には年齢依存性が存在し、周産期および乳児期の ALP の要求性の高い時期を超えて生存し得た症例では、骨症状の改善や、より長期の生存が望める可能性が示唆され、本症における遺伝子診断や遺伝カウンセリングの重要性が再認識し、しばしば人工中絶が行われてきた本症の周産期発症症例の取り扱いについて、より積極的な治療を含めた見直しおよびガイドラインの策定が急務であると考えられる。現在、北米においては、本症に対して、骨親和性の高い組み換え ALP を用いた酵素補充療法の治験が行われている。今回の我々の研究結果からは、周産期、乳児期の ALP 要求性の高い時期に酵素補充療法を行うことで、症状や予後の大幅な改善が期待できると考えられる。

また、今回の検討から、低身長が低フォスファターゼ症の重要な症状であり、ALP の異常が骨の石灰化のみならず、軟骨の成長にも影響を及ぼす可能性が示唆された。培養軟骨細胞を用いた検討から、低フォスファターゼ症における低身長の分子機序として、軟骨に

おける細胞外無機リン酸の不足が關与している可能性が示された。

E. 結論

日本人の低フォスファターゼ症症例のなかには、周産期発症であっても予後良好な症例が存在し、注意を要する。ALP の要求性には年齢依存性があり、重症型であっても周産期および乳児期を生存し得た症例では長期生存が得られる可能性がある。従って、本症の管理においては、分子診断による正確な予後判定、遺伝カウンセリングが重要であると考えられ、本症の、特に重症型の取り扱いについてのガイドラインの策定が急務である。

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

Matsui Y, Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawabata H, Nishimura G. Czeck dysplasia occurring in a Japanese family. *Am J Med Genet A*, 149A(10): 2285-9, 2009

H. 知的財産権の出願・登録上場

該当なし。

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
分担研究報告書

研究分担者 五関 正江 日本女子大学 教授

研究要旨 遺伝子診断グループの班員として、低フォスファターゼ症の遺伝子診断方法の確立を行なった。また、日本人健常若年成人 175 名において、日本人の特有の遺伝子変異である 1559delT について遺伝子診断を実施した結果、この遺伝子変異は見いだされなかった。さらに、日本人健常若年成人 193 名 (男性 97 名、女性 96 名) において、血清中の BAP 活性との各種骨代謝マーカー等との相関関係について解析したところ、男性では、血中オステオカルシン (OC)、 $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ との関連が認められ、女性では、FGF23 との関連が認められ、男女差があることが明らかになった。また、3 日間の食事調査の結果、各種栄養因子について骨型 ALP 活性との相関は女性では特に認められなかったが、男性でカルシウム摂取量との相関が認められた。

A. 研究目的

遺伝子診断グループの班員として、低フォスファターゼ症の遺伝子診断および遺伝子頻度調査を行い、臨床症状との相関性を検討する。すなわち、低フォスファターゼ症において日本人に最も頻度の高い 1559delT 変異の保有率を健常人で検討し、ホモ接合体として発症する率を推定する。さらに、骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性に影響を及ぼす骨代謝マーカーおよび食事性因子等について明らかにし、臨床症状との相関性や食事療法に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

低フォスファターゼ症の遺伝子診断のため、遺伝子プライマー情報に基づいて、プライマーを合成し、ダイレクトシーケンス法による遺伝子変異解析法を確立した。さらに、日本人健常若年成人において、採血後、DNA を抽出し、日本人の特有の遺伝子変異である 1559delT について解析を行った。また、血液生化学的データの解析および 3 日間の食事調査などを行った。なお、ヒトを対象とした疫学研究においては、臨床症状と関連付けた検討について、個人を特定できないよ

うにサンプルを匿名化した上で解析を行い、倫理指針を遵守した (2009 年 8 月 31 日に日本女子大学倫理委員会において、本研究計画の承認を得た)。

C. 研究結果

日本人健常若年成人 175 名において、日本人の特有の遺伝子変異である 1559delT について遺伝子診断を実施した結果、この遺伝子変異は見いだされなかった。一方、日本人健常若年成人 193 名 (男性 97 名、女性 96 名) において、血清中の BAP 活性との各種骨代謝マーカー等との相関関係について解析したところ、男性では、血中オステオカルシン (OC)、 $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ との関連が認められ、女性では、FGF23 との関連が認められ、男女差があることが明らかになった。また、3 日間の食事調査の結果、各種栄養因子について、骨型 ALP 活性との相関は女性では特に認められなかったが、男性でカルシウム摂取量との相関が認められた。

D. 考察

日本人健常若年成人 175 名において、低フォスファターゼ症の 1559delT の遺伝子変異は見いだされなかったが、今後、

さらに日本人に多い F310L 遺伝子変異についても遺伝子診断を行い、骨代謝マーカー、栄養因子等との関連解析を進めていきたい。また、対象者数を増やして、血中 BAP 活性調節に関連の深い骨代謝マーカーや栄養因子等を明らかにすることにより、低フォスファターゼ症における食事療法の開発に役立つ有用な情報が得られることが期待される。

さらに、1559delT、A115V、F310L、V365I、Y246H などの変異型アルカリホスファターゼ発現ベクターを用いた *in vitro* 実験において、血中 BAP と関連のある各種栄養因子の影響などについて、詳細かつ多面的な機能解析を進め、本症の治療・管理ガイドラインの策定の基礎データとして、役立てたいと考えている。

E. 結論

日本人健常若年成人 175 名において、低フォスファターゼ症の 1559delT の遺伝子変異は見いだされなかったが、血中 BAP と各種骨代謝マーカー、栄養因子等との関連解析について、貴重な基礎資料を得ることができた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

五関 - 曾根 正江 他 「若年成人におけるカルシウム摂取状況と骨型アルカリホスファターゼとの関連について」第 13 回 日本病態栄養学会学術集会発表 2010 年 1 月 10 日 (日本病態栄養学会誌 第 12 巻第 5 号・188 頁・2009 年 11 月発行)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する 一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
道上敏美	リン恒常性維持の分子機構	御手洗哲也、東原英二、秋澤忠男、五十嵐隆、金井好克	Annual Review 2010 腎臓	中外医学社	東京	2010	251-258

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura-Utunomiya A, (他 8 名), <u>Michigami T</u> , Ozono K, Kobayashi M.	Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: A report of 6 cases.	<i>Clin Pediatr Endocrinol</i>			in press
Matsui Y, <u>Michigami T</u> , Tachikawa K, Yamazaki M, Kawabata H, Nishimura G.	Czech dysplasia occurring in a Japanese family.	<i>Am J Med Genet A</i>	49A(10)	2285-2289	2009
Kubota T, <u>Michigami T</u> , Ozono K.	Wnt signaling in bone metabolism.	<i>J Bone Miner Metab</i>	27(3)	265-271	2009
Miyauchi Y, Sakaguchi N, Okada T, Makishima M, Ozono K, <u>Michigami T</u> .	Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function.	<i>J Cell Biochem</i>	168(7)	1090-1101	2009

IV. 業 績

Original Article

Clinical Characteristics of Perinatal Lethal Hypophosphatasia: A Report of 6 Cases

Akari Nakamura-Utsunomiya¹, Satoshi Okada¹, Keiichi Hara¹, Shinichiro Miyagawa¹, Kanae Takeda², Rie Fukuhara³, Yusei Nakata⁴, Michiko Hayashidani⁴, Kanako Tachikawa⁵, Toshimi Michigami⁵, Keiichi Ozono⁶, and Masao Kobayashi¹

¹Department of Pediatrics, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan

²Department of Pediatrics, Kure Mutual Hospital, Hiroshima, Japan

³Department of Neonatology, Hiroshima Prefectural Hospital, Hiroshima, Japan

⁴Department of Neonatology, Hiroshima City Hospital, Hiroshima, Japan

⁵Department of Bone and Mineral Research, Osaka Medical Centre and Research Institute for Maternal and Child Health, Osaka, Japan

⁶Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Abstract. Hypophosphatasia is a rare inherited disorder caused by deficient tissue-nonspecific alkaline phosphatase activity. It is classified into 6 subtypes, and the perinatal lethal form of hypophosphatasia is the most severe. Patients with this form suffer from various symptoms, including respiratory failure, premature craniosynostosis, rachitic changes in the metaphyses, convulsions and hypercalcemia. This report presents 6 cases of the perinatal lethal form of hypophosphatasia. All of the patients showed shortening of the long bones in *utero* in ultrasonographic examinations. Two of the six patients died at birth because they could not establish spontaneous breathing. Three of the remaining four patients also died before 1 yr of age. The major cause of death was respiratory failure due to hypoplastic lung. All of the patients, except for the two who died at birth, experienced convulsions in their clinical courses. Vitamin B6 therapy effectively reduced the frequency and severity of convulsions. However, it could not always make the patients convulsion free. Three patients underwent a genetic analysis. The 1559delT mutation, which abolishes Alkaline Phosphatase (ALP) activity, was a hot spot. A homozygous 1559delT mutation was observed in two patients. However, they differed in severity of symptoms. Although a good genotype-phenotype correlation has been reported in hypophosphatasia, the genotype alone does not always predict the life span of the patients. These cases therefore suggested the importance of genetic counseling.

Key words: Hypophosphatasia, perinatal lethal form, alkaline phosphatase, ALP, *ALPL*

Received: June 16, 2009

Accepted: September 17, 2009

Correspondence: Dr. Satoshi Okada, Department of Pediatrics, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

E-mail: s-okada@pg8.so-net.ne.jp

Introduction

Hypophosphatasia is caused by deficient tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) activity, thus resulting in hypomineralization of

bone. The prevalence of severe forms is estimated at 1/100,000 (1). It has been classified into five subtypes based on the age of onset and the severity as follows: perinatal, infantile, childhood, adult and odontohypophosphatasia. Recently, the perinatal type was divided into lethal and benign types (2). Patients affected with the perinatal lethal form of hypophosphatasia tend to die around the time of birth due to impaired development of the lung and severe hypomineralization of their bones. On the other hand, patients with the perinatal benign form have a spontaneous improvement of skeletal defects despite the prenatal symptoms (3, 4).

Patients with the perinatal form of hypophosphatasia suffer from various symptoms, including respiratory failure associated with a narrow chest, premature craniosynostosis, rachitic changes in the metaphyses, uncontrollable convulsions and hypercalcemia. X-ray examination reveals shortening of the long bones, osteochondral spurs protruding from the forearms or legs and rachitic deformities of the chest (5). Laboratory examination shows markedly reduced serum alkaline phosphatase (ALP) activity as a characteristic finding. Furthermore, an increased urine phosphoethanolamine (PEA) levels are also a supportive finding.

Hypophosphatasia is caused by mutations in the *ALPL* gene, which encodes the TNSALP. More than 100 mutations have been reported in *ALPL* (1). Although some patients with the mild phenotype present autosomal dominant inheritance, the severe type of hypophosphatasia, including the perinatal lethal form, presents autosomal recessive inheritance (2).

This report presents 6 cases with the perinatal lethal form of hypophosphatasia.

Patient Reports

The characteristics of the 6 patients with the perinatal lethal form of hypophosphatasia are summarized in Table 1. None of the patients had an obvious family history suggesting

hypophosphatasia, except for mildly low levels of serum ALP activity. After obtaining written informed consent during genetic counseling, a genomic analysis was performed in 3 patients. Genetic analysis was not performed in patient 1, 2 and 5 because we could not obtain approval for genetic analysis from their parents.

Shortening of the long bones and hydramnion was detected in Patient 1 in *utero* at 28 wk of gestation in an ultrasonographic examination. Aspiration of the amniotic fluid was performed at 36 wk of gestation. He was delivered by natural childbirth method at 37 wk of gestation. He presented bowing of the limbs, a narrow chest and hydrocele testis at birth. He could not establish spontaneous breathing and died within several hours. His serum ALP was 2 IU/l (normal range: 419–1,110). Severe hypomineralization of his bones was detected by X-ray and CT examination at birth.

Patient 2 manifested limb shortening, an enlarged biparietal diameter and hydramnion in *utero* at 29 wk of gestation in an ultrasonographic examination. She was born at 38 wk of gestation by Cesarean section. She presented bowing of the limbs and a narrow chest at birth. Her serum ALP was 7 IU/l. Her mother's ALP was 175 IU/l. She could not establish spontaneous breathing and died within several hours.

Patient 3 had shortening of the long bones, which was detected in *utero* at 19 wk of gestation in an ultrasonographic examination. She was born at 38 wk of gestation by natural childbirth. She presented with bowed limbs, a narrow chest, an enlarged anterior fontanelle and a short right fourth finger at birth. Skeletal radiographs showed a narrow chest, undermineralized bones and fraying metaphyses. Her serum ALP was 10 IU/l on day 0. Her urine PEA was 10,174 nmol/mg creatinine (normal range: 80–220 nmol/mg creatinine). Artificial respiration was needed from birth to treat respiratory failure. She presented with sunset phenomenon and generalized seizures on day 1 and was treated with phenobarbital (PB). Vitamin B6 therapy

Table 1 Summary of the patients

	Patients					
	1	2	3	4	5	6
Sex	Male	Female	Female	Male	Male	Female
Gestational age	37 wk 0 d	38 wk 3 d	38 wk 6 d	38 wk 5 d	40 wk 5 d	38 wk 4 d
BW at birth	2,560 g -1 SD	3,060 g 0 SD	2,808 g -0.5 SD	2,384 g -1.8 SD	2,384 g -1.8 SD	2,434 g -1.5 SD
BH at birth	48 cm -0.47 SD	ND	43 cm -2.6 SD	43 cm -2.9 SD	45.5 cm -1.7 SD	44.5 cm -1.9 SD
Apgar Score	3/1	1/1	5/5	9/10	6/8	9/9
ALP (IU/L)	2	7	10	27	3	34
Age at diagnosis	Day 0	Day 0	Day 0	Day 100	Day 0	Day 0
Urine PEA (Normal range: 80–220 nmol/mg creatinine)	ND	ND	10,175	7,760	10,510	8,975
Symptoms at birth						
Short limbs	+	+	+	+	+	+
Narrow chest	+	+	+	-	+	-
Other findings	Hydrocele testis		Hypoplastic fourth finger			
Hypercalcemia	ND	ND	+	+	+	+
Serum calcium level (Normal range)			5.7 (4.3–5.2)	5.2 (4.3–5.1)	12.7 (8.6–10.4)	6.2 (4.3–5.2)
Convulsion type			Tonic seizure	Setting sun sign	-	Absence attack
Onset of convulsion			Setting sun sign Day 1	Day 25	Day 11	8 mo
Anticonvulsant drug			PB, DZP	PB, VPA	PB, DZP	-
Beginning days of vitamin B6			Day 13		Day 19	Day 21
Effectiveness of vitamin B6			Partially effective		Partially effective	Not evaluable
Prognosis	Day 0	Day 0	Day 117	Day 131	Day 383	Day 826
ALPL			G456D 1559delT	1559delT	ND	1559delT

PB: Phenobarbital. VPA: valproic acid. DZP: diazepam.

(20 mg/kg/d) was started at 13 d of age. The vitamin B6 therapy was effective in reducing the frequency and severity of convulsion. She underwent a tracheotomy at 62 d of age. Despite the intensive treatment, she developed a pulmonary hemorrhage on day 102 and died from respiratory failure at 117 d of age. Sequence analyses revealed that the patient had compound heterozygous mutations, a single base pair

substitution, G to A, at nucleotide 1418, 1418G>A (G456D) and a single base pair deletion at nucleotide 1559, 1559delT, in *ALPL*. And, her parents were heterozygous carrier.

Patient 4 was found to have short limbs in *utero* in an ultrasonographic examination. He was born at 38 wk of gestation. He presented with shortening of the limbs and was suspected to have osteogenesis imperfecta (OI). His first

convulsion was observed on day 25. Artificial respiration was started at that time. Although multiple antiepileptic drugs, including valproic acid (VPA), PB, lidocaine and clonazepam were administered, they could not sufficiently suppress the convulsions. A low level of serum ALP (27 IU/l) was noted on day 100. Unfortunately, this was the first sampling of the serum ALP level. This data led to diagnosis of hypophosphatasia. His urine PEA level (7,760 nmol/mg creatinine) was elevated, and he and his parents were subjected to genetic testing. A sequence analysis revealed that the patient had homozygous 1559delT mutations in *ALPL*, and his parents were heterozygous carrier. In spite of the treatment, he died from respiratory failure at 131 d.

Patient 5 had short-limbs, which were detected in *utero* at 28 wk of gestation in an ultrasonographic examination. He was born at 40 wk of gestation by Cesarean section. He could not establish spontaneous breathing and was resuscitated by intubation. He presented a narrow chest and bowing of the limbs at birth. His serum ALP was 3 IU/l day 0, and his urine PEA level (10,510 nmol/mg creatinine) was elevated. The serum ALP level of the mother was 53 IU/l. His first convulsion was observed on day 11. Although multiple antiepileptic drugs, including VPA, PB and diazepam, were administered, none could sufficiently suppress his convulsions. Thereafter, vitamin B6 therapy was started on day 19. The vitamin B6 therapy was able to effectively reduce the frequency and severity of convulsion. He underwent a tracheotomy at 62 d of age. He died from respiratory failure at 383 d of age.

Patient 6 had short limbs and intra-uterine growth retardation, which were detected in *utero* at 32 wk gestation in an ultrasonographic examination. She was born at 38 wk of gestation by Cesarean section. Bowing of the long bones and rachitic changes in the metaphysis were detected by X-ray examination on day 1. She presented with short-limb syndrome and an

enlarged anterior frontalle at birth. She had low levels of serum ALP (34 IU/l) and an elevated level of urine PEA (8,975 nmol/mg creatinine). Vitamin B6 therapy was started on day 21 to prevent convulsions. On day 87, she fractured a right rib. Subsequently, her respiratory distress progressed, and artificial ventilation was started on day 121. She received a tracheotomy on day 131. Her first convulsion was observed on day 144. The dose of vitamin B6 was increased from 10 mg/kg/d to 20 mg/kg/d. Thereafter, her convulsions were controlled. At 4 mo of age, she developed an enlarged liver and exhibited a deterioration of hepatic function. A prolonged prothrombin time and low level in the hepaplastin test were observed at 6 mo of age. Very low levels of clotting factor activity in V, VII, IX, XI and XII were observed. Vitamin K did not improve the low clotting activity. The laboratory findings for the levels of cholinesterase, fibrinogen, serum albumin and total bilirubin did not reflect severe cirrhosis of the liver, except for a relatively low platelet count (around 100,000 / μ l). Therefore, the cause of the low clotting activity was unclear. In spite of these laboratory data, her general conditions gradually became stable at around 1 yr of age. She was able to eat food and hold toys with her hands at 2 yr of age. Digitate impressions were observed by cranial X-ray examinations at 2 yr old. A head CT scan revealed that she had a narrow cerebral ventricle and a brain fissure. Bulging of the anterior fontanelle was also observed. These findings suggested that the patient had developed craniostenosis. On day 822, she began to vomit and had a poor appetite without fever. She subsequently experienced intractable convulsions. A CT image taken after this convulsion episode did not show any remarkable changes from the previous study. In addition, an electroencephalogram study showed hypsarrhythmia. Therefore, it was not clear that the convulsions originated from either an elevation of the intracranial pressure or complications due to the primary disease. She died on day 826 due to respiratory failure

associated with convulsions and a lung hemorrhage. A necropsy was not performed because consent could not be obtained from her parents. Sequence analyses revealed that the patient had homozygous deletions of 1559delT in *ALPL*. And, her parents were heterozygous carrier.

Discussion

This manuscript summarized 6 cases presenting with the perinatal lethal form of hypophosphatasia. All of the patients demonstrated findings such as shortening of the long bones, and 2 patients had hydramnion in *utero* according to ultrasonographic examinations. Zanki *et al.* noted that osseous spurs, a patchy ossification pattern, undermineralization of the thoracic spine and cupped metaphyses are specific ultrasonographic features of this condition (6). Patient 5 was suspected to have OI at birth. Unfortunately, the serum ALP level was not measured in this patient until day 100. Therefore, the diagnosis of hypophosphatasia was late. OI, rickets, achondrogenesis and hypochondrogenesis are thought to be among the major differential diagnoses of hypophosphatasia (2, 6). The lower levels of serum ALP are a helpful indicator to identify hypophosphatasia. Therefore, measurement of serum ALP activity is very important when ultrasonography reveals shortening of the long bones in *utero*.

The characteristic symptoms of the perinatal lethal form are respiratory failure, hypercalcemia and uncontrollable convulsion. Two of the six patients died at birth because they could not establish spontaneous breathing. The other 4 patients also needed artificial ventilation during their clinical courses. In spite of intensive care, including artificial ventilation, 3 of the remaining 4 patients died before one year of age. The major cause of death was respiratory failure. Hypercalcemia was observed in all of the patients except for the patients that died at birth. The

use of low-calcium milk was effective in improving hypercalcemia. No other treatments of hypercalcemia, e.g., calcitonin and diuretic drugs, were needed to control hypercalcemia in the current study.

Three of the four patients, patients 3, 4 and 5, demonstrated refractory convulsions in their clinical courses. Such symptoms are thought to be a severe and frequent complication in patients with the perinatal lethal form of hypophosphatasia. Vitamin B6 therapy was selected for patients 3, 5 and 6. In order to control the convulsions, patients 3 and 5 were administered vitamin B6 in addition to other anticonvulsants. The vitamin B6 therapy effectively reduced the frequency and severity of their convulsions, but it could not always achieve complete resolution of the convulsions. Vitamin B6 was also administered to patient 6 to prevent convulsions. This patient experienced her first convulsions at day 144. The convulsions were suppressed by an increased dose of vitamin B6. Her first convulsions occurred later than those of the other 3 patients. However, considering the comparatively mild clinical course of this patient, it was not possible to verify whether the vitamin B6 therapy effectively prevented convulsions. Litmanovitz *et al.* reported a case of the perinatal lethal form that was effectively treated with vitamin B6 (7). The convulsions of the patient were immediately suppressed, and the vitamin B6 therapy resulted in her electroencephalogram to normal. The mechanisms of vitamin B6 action have not yet been fully elucidated; however, TNSALP is known to play a role in vitamin B6 metabolism (7, 8). Vitamin B6 therapy should therefore be considered one of the alternative treatments against uncontrollable convulsions associated with hypophosphatasia.

Craniostenosis is thought to be the one of major complications, and it was observed in one patient. Kozłowski *et al.* conducted a radiographic analysis of 24 cases of hypophosphatasia and suggested that decreased growth of the skull, a tense fontanelle and a palpable sutural ridge

should be regarded as signs of craniostenosis, whatever the radiographic findings (9). They suggested a craniectomy before craniostenosis. Although the sudden exacerbation of the general condition of patient 6 was not suspected to be related to the uncontrollable elevated intracranial pressure based on a CT study, she may have benefitted from an early craniectomy.

We performed a genomic analysis for three patients, and all three of them had biallelic mutations in *ALPL*. Two of the patients had homozygous mutations of 1559delT, and one patient had compound heterozygous mutations of G456D/1559delT. These results suggest that the 1559delT mutation is a hot spot among Japanese patients with the perinatal lethal form of hypophosphatasia. Michigami *et al.* reported that the F310L and 1559delT mutations are hot spots in hypophosphatasia in Japan (1). In that study, three patients were identified with homozygous 1559delT mutations, and all three died shortly after birth. Their ALP enzymatic activity *in vitro* proved that the 1559delT mutation completely eliminated the activity of this enzyme (1). Previous reports have indicated a good correlation between the severity and *in vitro* enzymatic activity of the mutant protein (2). However, in the current study, homozygous 1559delT mutations were also identified in patient 6, who presented with a relatively mild phenotype of the perinatal lethal form of hypophosphatasia. The clinical course of patient 6 indicated that the prognosis could not always be predicted based on the results of a genetic analysis alone. In addition, similar phenomena have also been reported in previous studies. Ozono *et al.* reported sibling cases carrying the same *ALPL* compound heterozygous mutations, but who demonstrated different clinical courses from each other (10). Brun-Heath *et al.* reported the 1133A>T mutation in *ALPL* to be associated with an increase in the level of *ALPL* mRNA (11). Based on these data, an mRNA analysis, e.g., quantification of mRNA, should therefore be considered when the nature of a mutation

cannot be fully explained the phenotype. Furthermore, Fauvert *et al.* reported that a particular haplotype, which derived from a sequence variation of the *ALPL* gene, could play a role as an aggravating factor (12). These results suggest that an additional genetic modifier and/or an environmental factor may therefore influence the severity in patients. Therefore, genetic counseling for hypophosphatasia should be carefully carried out.

This manuscript detailed 6 cases of the perinatal lethal form of hypophosphatasia. All of the cases exhibited shortening of the long bones and hydramnion *in utero* in ultrasonographic examinations. Measurement of serum ALP was a helpful indicator for diagnosis of hypophosphatasia. Although there is no curative treatment for hypophosphatasia, some treatments are useful for treating its symptoms. Recently, other challenging effective treatments, e.g., enzyme replacement therapy, transplantation therapy using bone fragments and cultured osteoblasts, have been reported (2, 13). Further study is needed to improve the prognosis and quality of life of patients with hypophosphatasia.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (to K.O.).

References

1. Michigami T, Uchihashi T, Suzuki A, Tachikawa K, Nakajima S, Ozono K. Common mutations F310L and T1559del in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene are related to distinct phenotypes in Japanese patients with hypophosphatasia. *Eur J Pediatr* 2005;164:277-82.
2. Mornet E. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:40.
3. Moore CA, Curry CJ, Henthorn PS, Smith JA, Smith JC, O'Lague P, *et al.* Mild autosomal dominant hypophosphatasia: *in utero*

- presentation in two families. *Am J Med Genet* 1999;86:410–5.
- Pauli RM, Modaff P, Sipes SL, Whyte MP. Mild hypophosphatasia mimicking severe osteogenesis imperfecta in utero: bent but not broken. *Am J Med Genet* 1999;86:434–8.
 - Shohat M, Rimoin DL, Gruber HE, Lachman RS. Perinatal lethal hypophosphatasia: clinical, radiologic and morphologic findings. *Pediatr Radiol* 1991;21:421–7.
 - Zankl A, Mornet E, Wong S. Specific ultrasonographic features of perinatal lethal hypophosphatasia. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1200–4.
 - Litmanovitz I, Reish O, Dolfin T, Arnon S, Regev R, Grinshpan G, *et al.* Glu274Lys/Gly309Arg mutation of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in neonatal hypophosphatasia associated with convulsions. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:35–40.
 - Whyte MP, Mahuren JD, Fedde KN, Cole FS, McCabe ER, Coburn SP. Perinatal hypophosphatasia: tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Clin Invest* 1988;81:1234–9.
 - Kozłowski K, Sutcliffe J, Barylak A, Harrington G, Kemperdick H, Nolte K, *et al.* Hypophosphatasia. Review of 24 cases. *Pediatr Radiol* 1976;5:103–17.
 - Ozono K, Yamagata M, Michigami T, Nakajima S, Sakai N, Cai G, *et al.* Identification of novel missense mutations (Phe310Leu and Gly439Arg) in a neonatal case of hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4458–61.
 - Brun-Heath I, Chabrol E, Fox M, Drexler K, Petit C, Taillandier A, *et al.* A case of lethal hypophosphatasia providing new insights into the perinatal benign form of hypophosphatasia and expression of the ALPL gene. *Clin Genet* 2008;73:245–50.
 - Fauvert D, Brun-Heath I, Lia-Baldini A-S, Bellazi L, Taillandier A, Serre J-L, *et al.* Mild forms of hypophosphatasia mostly result from dominant negative effect of severe alleles or from compound heterozygosity for severe and moderate alleles. *BMC Medical Genetics* 2009;10:51.
 - Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn SP, *et al.* Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 2003;18:624–36.