

201024150A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大 菌 恵 一

平成23年(2011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2年目にあたる平成22年度の研究成果をまとめたものである。

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2年目を迎えたが、報告書を見ると分かっていたように、発症頻度の推定やモデルマウスに対する遺伝子治療など順調に成果がでてきている。また、ホームページや総説等で低フォスファターゼ症の診断指針の普及を目指している。

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。

大藺恵一

研究班の構成

	氏名	所属等	職名	役割分担
研究代表者	大藪 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	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	-----5
2. 分担研究者	折茂英生	-----10
3. 分担研究者	織田公光	-----12
4. 分担研究者	大嶋隆	-----15
5. 分担研究者	道上敏美	-----17
6. 分担研究者	五関正江	-----21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----23
IV. 業績		-----24
V. 業績別刷		-----31

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

主任 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

分担研究者 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

分担研究者により、健常と思われる集団での、本症の原因となる変異遺伝子の頻度を検討した結果、最も頻度の高い変異である c.1559delT は 480 分の 1 の頻度で見られ、ホモ接合体となって発症する確率は 1/920000 であると計算された。主任研究者らの経験では、c.1559delT のホモ接合体の割合は本症の 17% であるので、本症は 153000 人に一人程度の発症となり、日本において年間 7 人程度の患者が生まれる事になると推定された。作成した本症の診断指針の普及を目的に、ホームページを作成し、さらに総説等に掲載した。遺伝子治療や遺伝子修復などの先進治療において動物レベル、細胞レベルで一定の成果を得た。

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、組織非特異型アルカリフォスファターゼ (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. C. 研究方法、および研究結果

1. 本症診断指針の作成、広報活動、疫学調査

昨年度、低フォスファターゼ症の診断指針（報告書内に別途掲載）を作成したので、当班研究のホームページを構築し([http:// www.bone.med.osaka-u.ac.jp/](http://www.bone.med.osaka-u.ac.jp/))、その中で公開した。ホームページとしては、海外にも情報発信するため英語バージョンも用意した。また、

患者会のホームページ(<http://hypophosphatasia.life.coocan.jp>)にも本ホームページにリンクができるようになっている。同診断指針は、本症の最新の日本語の総説（業績6）の中でも記載した。また、英語原著に対するコメントの中でも診断基準について記載した（業績5）。

北米での酵素補充療法の治験責任医師である M. Whyte 先生を平成 23 年 7 月大阪で行う、主任研究者が会長となる第 29 回日本骨代謝学会に招聘することを決定した。特別講演として、酵素補充療法の効果と問題点について、学会参加者のみならず、患者会メンバーも聴衆として加わった会場で、発表していただく予定である。

分担研究者により、健常と思われる集団での、本症の原因となる変異遺伝子の頻度を検討した。その結果、最も頻度の高い変異である c.1559delT は 480 分の 1 の頻度で見られ、ホモ接合体となって発症する確率は 1/920000 であると計算された。我々の 42 人の本症の遺伝子検索の経験では、c.1559delT のホモ接合体の割合は 17% であり、c.1559delT のホモ接合体の約 6 倍の患者が存在する事になる。従って、153000 人に一人程度の発症となり、日本の出生数から推定すると年間 7 人程度の患者が生まれる事になる（業績 5）。この成果により、患者発生数の推定が可能となったが、今後は救命率を考えた患者数の推定を行う必要がある。

2. 遺伝子型-表現型の関連の検討

継続して、TNSALP 遺伝子診断を直接シーケンス法で行う。小児科・産科のみならず、整形外科および海外からの依頼もあり、遺伝子解析担当の共同研究者が対応している。日本人に特有の F310L 変異を有し、骨変形を主症状とする比較的軽症の本症が存在する。整形外科を受診している可能性が高いので、整形外科医への呼びかけも行う。

当科で経過観察している低フォスファターゼ症の患者で、痙攣と脳症様エピソードを呈した症例がある。痙攣に対するビタミン B6 補充療法が無効で、ミトコンドリア病など他の疾患の合併の可能性もあるが、本症の新しい合併症である可能性もあり、注意深く診断および治療を行う予定である。

従来 of 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、外来で治療法などの相談を行っている。一部の症例については論文発表を行った（昨年の業績に記載、実際の発行は 2010 年）。

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した。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

歯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した。永久歯についてはあまり問題を呈する症例を経験していない。乳歯の早期脱落に対しては、一つは歯が抜けた顔つきという見た目の問題があり、本人および周囲の人が気にして QOL を損なう可能性があること、噛む際に残存する歯に力が過剰にかかる事により、乳歯の脱落を促進する可能性があることから、インプラントで対応する必要がある。

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 の測定法を確立したので、診断指針に明記し、測定例を増やしていく。Pyrophosphate 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ようにセットアップを行う。

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。すなわち、pMXs-Oct4/ -Sox2/ -Klf4/ -cMyc の4つのファクターを導入する事でリプログラミングを行った。複数の疾患の患者より繊維芽細胞を採取し、そのiPS細胞化に成功した。これらのファクターを導入するシステムとして Sendai virus による方法にも着手した。

今後は、遺伝性疾患の変異遺伝子の修復が必要となるので、Zinc Finger Nuclease 方式による修復を試みている。Zinc Finger Nuclease の十分な発現を得るためのプロモーターの選択を行っている。また Zinc Finger Nuclease のターゲット配列を確実に認識するための工夫や組み換え体の選別を行っている。

D. 考察

疫学的検討を加え、また、広報活動も行い、低フォスファターゼ症の診断、治療に貢献していると考えられる。3年目はさらに、診断管理指針の妥当性について検討し、普及を図る。遺伝子治療などの基礎研究も発展させていく必要がある。

E. 結論

1. 本症の年間患者数の発生頻度を遺伝子変異の検討から約 150000 出生にひとりとして推定した。
2. 作成した本症の診断指針の普及を目的に、ホームページを作成し、また、総説等に掲載した。
3. 遺伝子治療や遺伝子修復などの先進治療において動物レベル、細胞レベルで一定の成果を得た。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt Signaling in Bone. Clin Pediatr Endocrinol, 19(3):49-56,2010. review
 - 2) Yoshida H, Hashii Y, Okuda T, Kusuki S, Sato E, Inoue A, Kawakami C, Yabe M, Ohta H, Ozono K. A case of congenital

- bone marrow failure with radio-ulnar synostosis. *Int J Hematol*, 91(2):331-332, 2010.
- 3) Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 398(3):513-518, 2010.
- 4) Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, Okada T, Koshimizu T, Yamazaki M, Kogo M, Ozono K. Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na^+ /Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone*. 47(5):938-947, 2010
- 5) ○ Ozono K, Michigami T. Hypophosphatasia now draws more attention of both clinicians and researchers: A Commentary on prevalence of c. 1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasias in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers. *J Hum Genet*. In press. Commentary
- 6) ○大藪恵一. 低ホスファターゼ症の病態と新規治療法 CLINICAL CALCIUM, 医薬ジャーナル社, 20 (8) : 72(1220)-79(1227), 2010.
- 7) ○大藪恵一. 低フォスファターゼ症 国分正一, 岩谷 力, 落合直之, 沸淵孝夫 編, 今日の整形外科治療指針 第6版, 医学書院, 266, 2010.
- 大藪恵一. よくある子どもの骨の病気 -O脚, X脚はどうしてなるか- 藤実彰一, 田中美紗子, 寺町多恵子 編, チャイルドヘルス-21世紀の子どもの保健と育児を支援する雑誌- 2月号, 診断と治療社, 14(2) :16(1008)-20(1012), 2011.
2. 学会発表
- 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。我々は既に、酵素補充療法の臨床試験で使われている 10 分子のアスパラギン酸を付加した骨親和性 TNALP（TNALP-D10）を発現するレンチウイルスベクターによる遺伝子治療の有効性を報告している。本研究では現在多くの遺伝子治療臨床研究で使われているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの有用性を検討した。更に、野生型（TNALP-N）とアスパラギン酸ペプチドを持たない可溶性（TNALP-F）の TNALP の治療効果を比較した。AAV-TNALP-D10 を新生児 HPP マウスの経静脈から投与した結果、血中の ALP 活性は高値を維持し、痙攣は抑制され、著明な延命効果が認められた（5/6）。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。AAV-TNALP-F 投与群においても高い血中 ALP 値が維持され、延命効果が認められた（7/9）。一方、AAV-TNALP-N 投与群では軽度の ALP 上昇が認められ、延命効果も限定的であった（5/17）。これらの結果は AAV ベクターを使った遺伝子治療により、高い血中 ALP 値を持続できる場合には骨親和性を持たない TNALP でも HPP の治療が可能であることを示している。

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 10 分子のアスパラギン酸ペプチドを付加した組換え TNALP (TNALP-D10) 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試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、大量の酵素を生体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。

前年度の研究では TNALP-D10 を発現するレンチウイルスベクターを新生

児期の HPP マウスに静脈投与することで著明な延命を含む治療効果が得られることを報告した。本年度は、遺伝子治療を実際に患者に行う前段階として、ベクターの種類、TNALP の構造の検討を行った。

B. 研究方法

TNALP の C 末端に 10 分子のアスパラギン酸を付加した骨親和性 TNALP-D10 の cDNA を構築した。又、比較のため GPI により細胞膜に結合する野生型 TNALP (TNALP-N)、Flag タグをもつ可溶性 TNALP (TNALP-F) の cDNA を構築した。これらの TNALP 配列を 8 型 AAV ベクタープラスミドに組み込んだ。AAV ベクターはベクタープラスミド、パッケージプラスミド、ヘルパープラスミドのトリプルトランフェクション法により作製し、Iodixanol の密度勾配遠心により精製した。

新生児 HPP マウス (1 日齢) の経静脈から AAV ベクターを投与し、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

(1) AAV-TNALP-D10 による遺伝子治療
生後 1 日未満の新生児 HPP マウス

(TNALP-/-) に AAV-TNALP-D10 を静脈注射したところ高い血中 ALP 値が持続し、痙攣は完全に抑制され、外見や運動機能もコントロールマウスと差を認めなかった。寿命は少なくとも 9 ヶ月以上延長した。

qPCR によりベクターの臓器分布を調べたところ心臓、筋肉で最も高い値が得られた。肝臓や骨組織では低い値しか得られなかった。

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。

(2) TNALP の構造の違い

AAV-TNALP-D10、AAV-TNALP-F、AAV-TNALP-N を新生児 HPP マウスに注射し治療効果を観察した。AAV-TNALP-D10 及び AAV-TNALP-F の投与群はいずれも高い血中 ALP 値を持続し (1.20 ± 0.70 ; 5.70 ± 2.57 U/ml)、前者では 6/7 のマウスが、後者では 7/9 のマウスが少なくとも 56 日まで生存した。一方、AAV-TNALP-N 投与群では ALP 値は低値で (0.14 ± 0.02 U/ml)、5/17 のマウスのみが 56 日以上生存した。

骨組織の ALP 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、AAV-TNALP-D10 により治療したマウスでは骨梁周囲に ALP 活

性が認められた。AAV-TNALP-F 及び AAV-TNALP-N により治療されたマウスでは骨梁の ALP 活性は認められなかった。

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 の持続的酵素補充により痙攣は完全に抑制され、延命効果が得られ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。これまでヒトで試みられた可溶性 ALP を使った酵素補充療法は効果がなかった。その主な理由は、投与された ALP の量が不十分で、実際に機能すべき骨組織で十分な活性がなかったためと考えられている。酸性アミノ酸を付加した TNALP が骨組織に親和性をもつことが *in vitro* 及び *in vivo* の実験で報告されている。我々の遺伝子治療の実験からも TNALP-D10 の骨組織親和性は明らかである。TNALP-D10 を使った酵素補充療法や遺伝子治療は HPP の骨症状の有効な治療法として期待される。現在、骨親和性 TNALP を使った酵素補充療法の治験が開始されている。

今回の遺伝子治療により明らかになったのは、TNALP-D10 だけでなく可溶性の TNALP-F の発現によっても HPP マウスに対する治療効果が得られた点である。野生型 TNALP は GPI アンカーにより細胞膜表面に結合しているが、一部が切断され可溶性 TNALP として血中に放出されている。遺伝子治療により持続的に高値の ALP 活性を血中で持続できれば、自然界には存在しない TNALP-D10 を使わなくとも、可溶性 TNALP で十分治療できることが示された。今後、TNALP-D10 と TNALP-F の至適治療濃度の検討を進めていきたい。

様々なウイルスベクターが開発されているが、長期発現が可能で *in vivo* 投与できるベクターとしてはレンチウイルスベクターと AAV ベクターが有力候補となっている。レンチウイルスベクターは染色体に組み込まれるため長期に安定した発現が期待できるが、挿入変異による発癌性が危惧されている。一方、AAV ベクターは病原性がなく非分裂組織での長期発現が可能のため、多くの遺伝子治療プロトコールで使われている。両ベクター共に、マウスの治療実験では有用性が示されたが、レンチウイルスベクターのヒトへの全身投与は行われていない。ヒトでの治療を考えた場合、AAV ベクターによる遺伝子治療は非常に実現性の高い方法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に対する、AAV ベクターを使った遺伝子治療の有用性を示した。又、AAV ベクターを使った遺伝子治療では現在治験が行われている骨親和性 TNALP-D10 だけでなく可溶性 TNALP でも HPP マウスに対する治療効果があることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Iijima, O., Narisawa, S., Maeda, T., Millán, J., Shimada, T. (2011) Prolonged survival and phenotypic correction of *Akp2*^{-/-} hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. *J. Bone Miner. Res. in press*
- Watanabe A, Karasugi T, Sawai H, Banyar Tang Naing, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T. (2011) Prevalence of c.1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers. *J. Hum. Genet. in press*

2. 学会発表

- Watanabe A, Naing BT, Sawai H,

Karasugi T, Kondo H, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T. Genotype frequency of 1559T deletion (1559delT) in the TNSALP gene and clinical significance of hypophosphatasia in Japan. 2010 ACMG Annual Clinical Genetics Meeting. 2010. 3. Albuquerque, NM 112)

Matsumoto T, Yamamoto S, Orimo H, Miyake K, Miyake N, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T. AAV Vector Mediated Enzyme Replacement Therapy of Hypophosphatasia (HPP) Model Mice. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2010.5 Washington, DC

大森意索、高野由紀子、清水光政、渡辺とよ子、渡辺 淳、菅野華子、島田隆：TNSALP 変異が同定された周産期型低フォスファターゼ症の1例、第33回日本小児遺伝学会学術集会、2010, 4、盛岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
低フォ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）

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

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。日本人に多い F327 変異の石灰化アッセイのため、変異型プラスミドを作製した。また、前年度に確立した non RI 法によるピロリン酸定量法の健常人での測定を検討している。

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 U_2OS 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。

(倫理面への配慮) 健常ヒト血清の採取は日本医科大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

①1年目の研究で *in vitro* の石灰化と

症状の相関が認められたため、日本人に多い変異であるが解析されていない

F327 をもつ変異型プラスミドを作製した。今後解析を進めていく。②1年目で非 RI 法によりラット血清 PPi が測定できたので、健常人における正常値確定のため、血清サンプルの採取を進めている。

D. 考察

①活性と石灰化の関連性に基づき、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非 RI 法による PPi の測定は一般の測定室にて短時間で行える利点がある。

E. 結論

予後と治療効果判定のための方法を新規変異に応用するとともに、ヒトにおける血清 PPi 値測定の準備を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Iijima, O., Narisawa, S., Maeda, T., Millán, J.L., Shimada, T.: Prolonged survival and phenotypic correction of *Akp2*^{-/-} hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. J. Bone Miner. Res., 26:135-142 (2011)

2. 学会発表

1) Watanabe, A, Banyar Than Naing, Sawai, H., Karasugi, T., Kondo, H., Ikegawa, S., Orimo, H., Shimada, T.: Genotype frequency of 1559T deletion (1559delT) in the *TNSALP* gene and clinical significance of hypophosphatasia in Japan. 17th ACMG Annual Clinical Genetics Meeting, 2010 (3. Albuquerque, New Mexico).

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

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教授

研究要旨

軽症例の低フォスファターゼ症は劣性または優性遺伝することが知られている。本研究では、優性遺伝する患者で報告された組織非特異型アルカリフォスファターゼ（TNSALP）遺伝子の突然変異 [A166T（標準命名法）、別名 A99T] に着目し、発症機序を解明する目的で変異型酵素をホ乳類細胞に発現することにより野生型酵素との詳細な比較研究を行った。また同じく優性遺伝する変異型酵素（P108L）に関する解析も開始し、A116T に近い性質を示す事が明らかになった。

A. 研究の目的

低フォスファターゼ症は TNSALP 遺伝子上のミスセンス突然変異に起因する先天性の骨代謝異常疾患であり、これまでに全世界で220例以上の変異が報告されている。一般に重症型と軽症型に大別されるが、変異の種類によってその症状は子宮内での死産から乳歯の早期脱落まで広範囲にわたることが知られており、発症の分子機序の解明は治療の検討する上で重要である。分担者の研究室ではこれまで重症型で報告された劣性遺伝する変異を中心に解析を行って来たが、世界的に見ても優性遺伝する変異の研究に関する研究は初歩的な段階に留まっている。そこで、本研究では優性遺伝形式で遺伝することが確立している

TNSALP（A116T）と同じく優性遺伝す

る可能性が高い TNSALP（P108L）についてアミノ酸の置換が本酵素に及ぼす影響を細胞レベルで解析した。

B. 研究の方法

野生型酵素をコードする遺伝子を鋳型にして部位特異的突然変異法を用いて点突然変異を導入し、変異の導入を確認するために全翻訳領域に対応する塩基配列を解析した。次に、野生型および変異型酵素を COS-1 細胞に一過性に発現して比較検討を行った。また、必要に応じて野生型と TNSALP（A116T）をそれぞれ発現する Tet-On CHO K1 細胞を樹立し解析を行った。

C. 研究結果

1. TNSALP (A116T)

発現細胞について蛍光抗体法を用いて観察した結果、TNSALP (A116T)は野生型酵素と同じく細胞表面に局在することがわかり両者で差は認められなかった。しかし、野生型と著しく対照的に本変異酵素は全く活性を失っていた。イムノブロッキングで両者の分子サイズを比較したところ、いずれも 66KDa の未成熟型の分子種と 80KDa の成熟型の分子種が確認でき、さらにホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC消化やビオチン標識法により後者の分子種が細胞表面に発現している事も明らかになった。ただし、変異酵素にはジスルフィド結合を介してランダムに共有結合した高分子量の凝集物が細胞表面に存在することがわかった。そこでショ糖密度勾配遠心法を用いて両酵素の会合状態を解析したところ、野生型は2量体を形成しているのに対し、変異酵素は2量体を形成できずに単量体もしくはジスルフィド結合した異常な凝集物を形成しており、そのために活性を失っていると推測された。また、異なるタグ配列(His6 または FLAG)をC末端に持つ野生型酵素と変異酵素を同時に細胞に発現し、ニッケルカラムと抗 FLAG 抗体での検討の結果、本変異酵素のサブユニットは野生型のそれ

と会合することを見出したが、このことは本変異酵素が優性遺伝することを分子的に説明するものである。

2. TNSALP (P108L)

現在までのところ、本変異酵素はTNSALP (A116T)に比べると優性遺伝するという証拠に乏しいが、これまでの一過性の発現系での解析結果はTNSALP (A116T)にその分子的な性質がよく似ており、今後さらに詳細な解析を企画している。

D. 考察

優性遺伝する低フォスファターゼ症に関しては、変異酵素は野生型と2量体を形成する結果野生型酵素の活性を抑制すると単純に考えられていたが、TNSALP (A116T)は高分子量の凝集物を形成し、しかも野生型酵素のサブユニットの一部は其中に捕捉されており、当初の予測よりの複雑であった。

E. 結論

変異型アルカリフォスファターゼTNSALP (A116T)の細胞生物学的な解析により、優性遺伝する低フォスファターゼ症の発症機序の一端が明らかになった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishida Y., Komaru K., Oda K:
Molecular characteri-zation of
tissue-nonspecific alkaline
phosphatase with an Ala to Thr
substitution at position 116
associated with dominantly
inherited hypophosphatasia.
Biochim. Biophys. Acta 1812(3),
326-332, 2011

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