

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を定期診査することにより歯科的治療指針の有効性を確認した。また低フォスファターゼ症のモデル動物である ALP ノックアウト (KO) マウスの下顎を調べたところ、ヒトと類似する所見を呈し、歯科的にもモデル動物としての可能性が示唆された。

A 研究目的

低フォスファターゼ症の特徴的な歯科所見である乳歯および永久歯の早期脱落は、セメント質の形成不全と、萌出した歯にかかる多大な咬合圧に起因すると考えられる。このセメント質の形成不全を予防する方法を確立するとともに、多大な咬合圧を軽減させる治療法を確立することが、本研究の目的である。

B. 研究方法

当科に来院する低フォスファターゼ症患者を定期診査し、萌出する永久歯への咬合圧を軽減させる義歯の装着時期を考察する。また、低フォスファターゼ症のモデル動物である KO マウスの歯を組織学的およびエックス線学的に診査し、野生株との比較の中で、モデル動物として有効であるかを明らかにする。

C. 研究結果

早期脱落した乳歯の隣在歯には多大な咬合圧がかかる。定期診査中の患者において動揺が進行している所見は認められず、乳臼歯が存在すれば、残存乳歯への咬合圧負担は病的所見を引き起こすほどではないと判断された。

9日齢の KO マウスでは、野生型に比べて、下顎骨自体が小さく、下顎切歯象牙質の厚みが薄い。マイクロ CT で下顎骨および切歯の骨密度を調べると、KO マウスでは野生型に比べて骨密度が低く、ヒトと一致する所見が示された。

D. 考察

KO マウスのモデル動物としての可能性が示唆されたが、まだ9日齢の KO, ホモおよび野生型マウス各1匹での結果であり、さらなる検討の必要がある。また、歯の早期脱落の原因となるセメント質の形成については、この日齢のマウスでは明瞭でなく、異なる観点からの検討が必要である。

E. 結論

永久歯の早期脱落を予防するためには、乳歯の早期脱落を予防することが最も有効であり、乳歯の早期脱落を予防する治療法の開発が必要である。

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

『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.

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

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遺伝子型・表現型に関する解析

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。しかしながら、著者らのこれまでの検討から、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いるが、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ことが明らかとなっている。今回、1996年から2010年の15年間に当研究室で*TNSALP*遺伝子解析を行った低フォスファターゼ症日本人症例40例について、遺伝子型と表現型との相関性に関し検討を進めた。

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、1996年から2010年の15

年間に当研究室で *TNSALP* 遺伝子解析を行った低フォスファターゼ症の日本人症例 40 例について、変異（遺伝子型）と臨床像（表現型）との相関性に関して検討した。

B. 研究方法

患者の臨床病型については、発症時期と重症度に基づいて分類したが、これまでの著者らの知見から、周産期(重症)型、乳児型、小児型、成人型、歯牙限局型に加え、周産期発症良性型を含む 6 病型に分類した。

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。

（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

検討した 40 例、80 アレルのうち、1559delT が 36 アレル（45%）と最も多く、次いで F310L が 8 アレル（10%）と 2 番目

に頻度が高かった。病型は、周産期重症型が 22 例（55%）、乳児型が 5 例（12.5%）、小児型が 3 例（7.5%）、歯牙限局型が 2 例（5%）であった。周産期一乳児期の発症にも関わらず、石灰化障害を殆ど認めない予後良好な周産期良性型は 8 例（20%）であった。成人型の症例は存在しなかった。

22 例の周産期重症型のうち、酵素活性をほぼ完全に消失している 1559delT のホモ接合体の症例が 7 症例であり、本変異を一方のアレルに有する症例は 13 症例、本変異を有さない症例は 2 症例であった。すなわち、周産期重症型の症例の 91% の症例では少なくとも一方のアレルに 1559delT が同定された。1559delT 変異はすべての病型で検出されたが、1559delT のホモ接合体症例は、全例、周産期重症型の臨床像を示した。1559delT のホモ接合体症例は、以前は乳児期早期に致死的な経過をとっていたが、最近は新生児医療の進歩によって、2 歳を超えて生存する症例が複数例認められている。

周産期一乳児期の発症にも関わらず良好な予後を示した 8 例の周産期良性型のうち 7 例においては一方のアレルで F310L 変異が同定され、残りの 1 例では F311L 変異が同定された。F310L アレルは 1559delT に次いで高頻度に同定されたが、F310L のホモ接合体の症例は認めなかった。F310L を有する症例の中には、骨石灰化障害は殆ど認めなかったが、四肢の長管骨の彎曲を示し、中には当初 camptomic dysplasia を疑われた症例

も存在した。興味深いことに、この症例においては経過とともに骨変形が自然に軽快したが、低身長が残存した。

診断時の血清 ALP 値(平均±標準偏差)を比較すると、周産期重症型では 12.8 ± 11.3 IU/L であるのに対して、周産期良性型では 120.5 ± 78.6 IU/L と有意差を認めた ($p < 0.0001$)。F310L は野性型 ALP のおよそ 70% 程度の残存活性を有しているため、周産期良性型において血清 ALP 値の低下が比較的軽度であったのは F310L の残存活性によるところが大きいと考えられる。乳児型では血清 ALP 値は 88.0 ± 77.0 IU/L、小児型では 99.7 ± 58.3 IU/L であった。歯牙限局型の 2 例の血清 ALP 値は 136 IU/L と 137 IU/L であり、周産期重症型では他のいずれの病型と比較しても血清 ALP 値が有意に低値を示した。

乳児型と診断された 5 症例における遺伝子型は 1559delT/L282P、1559delT/K207E、1559delT/Y419C、K207E/G409C、F310del/ であった。1559delT/L282P、1559delT/K207E の 2 例は呼吸障害のため乳児期に死亡したが、他の 3 例は長期生存が得られている。死亡した 2 例の診断時の血清 ALP 値が 29 IU/L、10 IU/L と著明な低値を示したのに対して、生存した 3 例では 140 IU/L、193 IU/L、68 IU/L と比較的保たれていた。再構成実験において、1559delT が殆ど完全に酵素活性を喪失していたのに対し、L282P、K207E、Y419C、G409C は残存活性を有していた。

歯牙限局型の 2 例における遺伝子型は 1559delT/E218V、1559delT/R119H であり、これらの症例の血清 ALP 値がある程度保持されていたのは E218V、R119H の残存活性によるものと考えられた。

今回検討した 40 症例のうち、周産期発症良性型の 1 例と歯牙限局型の 1 例については、低身長の精査を契機に血清 ALP 値の低下に気づかれ、本症の診断に至っていた。

D. 考察

今回得られた知見から、1559delT ホモ接合体症例は周産期重症型の経過をとること、また、F310L 変異は周産期発症であっても良好な予後を示す症例と関連しているということが確認された。重症例と予後良好例との間では、血清 ALP 値に有意な差が認められ、血清 ALP 値は予後の予測に有用な情報となることが明らかとなった。健常人においても血清 ALP 値は年齢とともに変動するが、今回検討した低フォスファターゼ症例の中に骨変形が自然軽快した症例が存在したことから、ALP の要求性には年齢依存性が存在すると考えられ、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る。従って、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され、これまで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。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。低身長を呈する小児の病因診断においては、血清 ALP 値を測定することが必須であると考えられる。

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。血清 ALP 値は予後を予測する上で有用な情報となり、責任変異を同定することでより正確な予後判定が可能となる。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

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):938-47, 2010

Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T. Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. *J Cell Biochem* 111(5):1210-21, 2010

Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem* 2010 Nov 12. [E-pub ahead of print]

2. 学会発表

河野智敬、会津克哉、立川加奈子、道上敏美、大藪恵一、望月弘。低フォスファターゼ症の一部は低身長の精査を契機に診断される。第 44 回日本小児内分泌学会学術集会。平成 22 年 10 月 7-9 日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録上場

該当なし。

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 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 193 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や各種栄養因子との関連を解析し、その結果から、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 と相関のある各種栄養因子の影響について解析中である。

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で頻度の高い 1559delT 変異や F310L 遺伝子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シング法により、遺伝子解析を行う。また、日本人健常若年成人において、採血後、DNA を抽出し、1559delT や F310L の遺伝子変異についての遺伝子解析を行い、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う。

さらに、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* の実験において、血中 BAP 活性と関係のある栄養因子の培地中の濃度を変化させて比較を行う。

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は、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ている)。

C. 研究結果

日本人健常若年成人 193 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、やはり、日本人に多い F310L 遺伝子変異については、現在、解析中である。また、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

ーカーや栄養因子との関係を解析し、その結果を参考に、マウス骨芽細胞様細胞である ST2 細胞を用いて、培地中の各種栄養因子が BAP 活性の発現へどのような影響を与えるかについて研究を進めている。

D. 考察

日本人健常若年成人 193 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、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る。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。

また、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 と相関のある各種栄養因子の影響について、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 193 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。さらに、各種栄養因子との関係について詳しい解析を進めている。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Goseki-Sone M. et al., Expression of intestinal-type alkaline phosphatase mRNA in liver of Akp3 knockout mice. J. Electrophoresis 54 : 27-32, 2010.

2. 学会発表

Goseki-Sone M. et al., Association between serum bone-specific alkaline phosphatase activity and biochemical markers, dietary nutrients, and functional polymorphism of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in healthy young adults. アメリカ骨代謝学会 ASBMR 2010 annual meeting, Oct. 18, in Toronto, Canada.

五関 - 曾根 正江 他「若年成人における栄養摂取状況と骨代謝マーカーおよび臓器非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子多型の関連」第 64 回 日本栄養・食糧学会 2010 年 5 月 23 日 (日本栄養・食糧学会講演要旨集 231 頁・3L - 10a)

五関 - 曾根 正江 他「若年成人における臓器非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子多型と骨代謝マーカーおよび栄養摂取状況の関連」第 57 回 日本栄養改善学会発表 2010 年 9 月 12 日 (栄養学会誌 第 68 巻第 5 号・303 頁・2010 年)

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 一覽表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kimata M, <u>Michigami T</u> , 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.	<i>Bone</i>	47(5)	938-947	2010
Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, <u>Michigami T</u> .	Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells.	<i>J Cell Biochem</i>	111(5)	1210-1221	2010
Seiko.Y, Hideo Orimo, Tae Matsumoto, Osamu Iijima, Sonoko Narisawa, Takahide Maeda, José Luis Millán, Takashi Shimada	Prolonged Survival and Phenotypic Correction of Akp2 ^{-/-} Hypophosphatasia Mice by Lentiviral Gene Therapy	<i>Journal of Bone and Mineral Research</i>	26	135-142	2011
Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T.	Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis.	<i>J Biol Chem</i>			in press
Keiichi Ozono, Toshimi Michigami.	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	<i>Journal of Human Genetics</i>			in press

IV. 業 績

大園恵一、道上敏美

1. Wnt signaling in bone metabolism. Kubota T, Michigami T, Ozono K J Bone Miner Metab, 27(3):265-271, 2009
2. Miyauchi Y, (他3名), Ozono K, Michigami T. Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function. J Cell Biochem. • 2009 • 106(6), 1090-1101
3. Ohata Y, (他3名), Michigami T, (他3名), Ozono K. Severe arterial hypertension: a possible complication of McCune-Albright syndrome. Eur J Pediatr. 168(7):871-876, 2009.
4. Miyoshi Y, (他6名), Ozono K. Endocrinological analysis of 122 Japanese childhood cancer survivors in a single hospital. Endocr J. in press
5. Fukumoto S, Namba N, Ozono K, Yamauchi M, Sugimoto T, Michigami T, (他5名). Causes and differential diagnosis of hypocalcemia - Recommendation proposed by Expert Panel Supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan -Endocr J. in press
6. Nakasaki T, (他11名), Ozono K, Aoki J, Miyasaka M. Involvement of the Lysophosphatidic Acid-Generating Enzyme Autotaxin in Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions. Am J Pathol. • 2008 • 173(5),(1566-76)
7. Yamagishi Y, (他5名), Ozono K, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread. J Virol. 2008,82(2),(795-804)
8. Miyoshi Y, (他12名), Ozono K, Severe mandibuloacral dysplasia caused by novel compound heterozygous ZMPSTE24 mutations in two Japanese siblings. Clin Genet. • 2008 • 73(6),(535-544)
9. Kubota T, Michigami T, (他7名) Ozono K. Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. J Bone Miner Res. • 2008 • 23(10),(1661-1671)
10. Gordillo M, (他21名), Ozono K, Inui K, Zou H, Jabs EW. The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. Hum Mol Genet. • 2008 • 17(14),(2172-2180)
11. OEndo I, Fukumoto S, Ozono K, (他6名), Michigami T, Matsumoto T., Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients Proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. Bone. • 2008 • 42(1235-1239)
12. OSuzuki A, Ozono K, (他3名), Michigami T. PTH/cAMP/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Via Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Osteoblastic saos-2 Cells. J Cell Biochem. • 2008 • 104(304-317)

13. Namba N, (他 10 名), Ozono K. Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Eur J Pediatr*. •2008• 167(7),(785-791)
14. Murakami M, (他 4 名), Ozono K. A case of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy successfully managed with subcutaneous octreotide injection and nocturnal intravenous glucose supply. *Clin Pediatr Endocrinol*. •2007• 16(3),(75-80)
15. OYamamoto T, Michigami T,(他 5 名), Ozono K. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a study for the phosphate transporter gene type IIc and osteoblastic function. *J Bone Miner Metab*. •2007• 25(6),(407-413)
16. Uchihashi T, (他 7 名), Ozono K, Michigami T. Involvement of nuclear factor I transcription/replication factor in the early stage of chondrocytic differentiation. *Bone*. •2007• 41(6),(1025-1035)
17. Kawai M, (他 5 名), Michigami T,Ozono K. Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha. *Biochem Biophys Res Commun*. •2007• 363(2),(276-282)
18. Kawai M, (他 5 名), Ozono K. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARg pathway. *J Mol Endocrinol*. •2007• 38(1),(19-34)
19. Tamura K, (他 6 名), Ozono K. Genetic association of a polymorphism of the cAMP-responsive element binding protein-binding protein with steroid-induced osteonecrosis after kidney transplantation. *J Bone Miner Metab*. •2007• 25(5),(320-325)
20. Sato T, (他 5 名), Ozono K, (他 4 名), Harada R, Harada A. The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*. •2007• 448(7151),(366-369)
21. O Arahori H, (他 5 名), Ozono K. Sonographic femur length to trunk cross area ratio: prediction of fetal outcome in 30 cases in which micromelia was suspected. *J Obstet Gynaecol Res*. •2007• 33(3),(248-253)
22. Kanekiyo T, (他 7 名), Ozono K, Taniike M, Goto Y, Urade Y., Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. •2007• 104(15),(6412-6417)

大嶋隆

1. Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Lapidattanakul J, Taniguchi N, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Protein antigen in serotype k *Streptococcus mutans* clinical isolates. *J. Dent. Res. (in press)*•2009•
2. Nakano K, Nemoto H, Momura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol. Immunol. (in press)*•2009•
3. Nakano, K., Lapidattanakul, J., Nomura, R., Nemoto, H. Alaluusua, S., Gronroos, L., Vaara, M.,

Hamada, S., Ooshima, T., Nakagawa, I. Streptococcus mutans exhibits clonal variation as revealed by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. •2007•45(2616–2625)

4. OHayashibara, T., Hiraga, T., Sugita, A., Wang, L., Hata, K., Ooshima, T., Yoneda, T. Regulation of osteoclast differentiation and function by phosphate: potential role of osteoclasts in the skeletal abnormalities in hypophosphatemic conditions. J. Bone Min. Res. •2007•22(1743–1751)
5. OMiyamoto E, Nakano K, Tamura K, Nomura R, Sasaki Y, Ooshima T. Clinical and microbiological evaluations of children with hypophosphatasia affected by periodontitis. Ped. Dent. J. •2007•17(84–92)

折茂英生、島田隆

1. OKang, H.-Y., Shyr, C.-R., Huang C.-K., Tsai, M.-Y., Orimo, H., Lin, P.-C., Chang, C., Huang, K.-E.: Altered TNSALP expression and phosphate regulation contribute to reduced mineralization in mice lacking androgen receptor. Mol. Cell. Biol. •2008•28(7354–7367)
2. OSogabe, N., Oda, K., Nakamura, H., Orimo, H., Watanabe, H., Hosoi, T., Goseki-Sone, M.: Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. Biomed. Res. •2008•29(213–219)
3. OOrimo, H., Shimada, T.: The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. Mol. Cell. Biochem. •2008•315(51–60)
4. OOrimo, H., Goseki-Sone, M., Hosoi, T., Shimada, T.: Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U₂OS osteoblast-like cells. Mol. Genet. Metab. •2008•94(375–381)
5. OWatanabe, A., Yamamasu, S., Shinagawa, T., Suzuki, Y., Miyake, H., Takeshita, T., Orimo, H., Shimada, T.: Prenatal genetic diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. J. Nippon Med. Sch. •2007•74(65–69)

織田公光

1. Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. J Cell Biol. •2009•184(4),(541–554)
2. OSogabe N, Oda K, Nakamura H, Orimo H, Watanabe H, Hosoi T, Goseki-Sone M. Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. Biomed. Res. •2008•29(4),(213–219)
3. ONuma N, Ishida Y, Nasu M, Sohda M, Misumi Y, Noda T, Oda K. Molecular basis of perinatal hypophosphatasia with tissue-nonspecific alkaline phosphatase bearing a conservative replacement of valine by alanine at position 406: Structural importance of the crown domain. FEBS J. •2008•275(11),(2727–2737)

4. Suzuki H, Amizuka N, Oda K, Noda M, Ohshima H, Maeda T. Histological and elemental analyses of impaired bone mineralization in klotho-deficient mice. *J Anat.* • 2008 • 212(3),(275-285)
5. Ohashi T, Sunaga M, Miura T, Sasagawa K, Sato Y, Ohashi W, Katagiri K, Katano Y, Kiyokawa I, Kojima R, Tomonaga T, Nomura F, Amizuka N, Oda K, Sato T, Katayama K. Generation of a Monoclonal Antibody Specific for Tissue- Nonspecific Alkaline Phosphatase and Its Use in a Clinical Diagnostic Study. *Hybridoma.* •2007•26(6),(401-406)
6. Ohashi K, Ohashi T., Miura T, Sasagawa K, Sato Y, Nomura F, Tomonaga T, Sunaga M, Kojima R, Katayama K, Kato T, Sato T, Komoda T, Oda K. Development of an ELISA method for detecting immune complexes between tissue-nonspecific alkaline phosphatase and immunoglobulin G. *J. Clin.Lab. Anal.*•2007•21(5),(322-329)

安井夏生

1. Abbaspour A, Takata S, Sairyo K, Katoh S, Yukata K, Yasui N: Continuous local infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment. *Bone.*•2008•42(98-106)
2. Yukata K, Katoh S, Sairyo K, Matsui Y, Hamada Y, Yasui N: Os odontoideum in achondroplasia: a case report. *J Pediatr Orthop B.*•2008•17(2),(103-105)
3. Yukata K, Matsui Y, Shukunami C, Takimoto A, Goto T, Nishizaki Y, Nakamichi Y, Kubo T, Sano T, Kato S, Hiraki Y, Yasui N: Altered fracture callus formation in chondromodulin-I deficient mice. *Bone*43. •2008•(1047-1056)
4. Sato R, Matsui Y, Yokoi H, Yukata K, Goto T, Kubo T, Katoh S, Yasui N: Chronic osteomyelitis of the tibia resembling benign bone tumors. *Pediatrics International.*•2007•49(1-5)
5. Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, Takata Y, Goto T, Egawa H, Yasuoka S, Furouchi H, Hirasaka K, Nikawa T, Yasui N: Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol.*•2007•26(1284-1292)
6. Takata Y, Hamada D, Miyatake K, Nakano S, Shinomiya F, Scafe CR, Reeve VM, Osabe D, Moritani M, Kunika K, Kamatani N, Inoue H, Yasui N, Itakura M: Genetic association between the PRKCH gene encoding protein kinase Ceta isozyme and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.*•2007•56(1),(30-42)
7. Sakamoto Y, Inoue H, Keshavarz P, Miyawaki K, Yamaguchi Y, Moritani M, Kunika K, Nakamura N, Yoshikawa T, Yasui N, Shiota H, Tanahashi T, Itakura M: SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population. *J Hum Genet.*•2007•52(10),(781-793)
8. Miyatake K, Inoue H, Hashimoto K, Takaku H, Takata Y, Nakano S, Yasui N, Itakura M: KC412 (CGP41251) modulates the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.*•2007•60(1),(15-21)

五関正江

1. O Sogabe N, Oda K, Nakamura H, Orimo H, Watanabe H, Hosoi H, Goseki-Sone M. Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. *Biomedical Res.* 29:213-219, 2008.
2. O Orimo H, Goseki-Sone M, Hosoi T, Shimada T. Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U₂OS osteoblast-like cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 94:375-381, 2008.
3. Goseki-Sone M, Maruyama R, Sogabe N, Hosoi T. Effects of Dietary Lactose on Long-term High-fat-diet-induced Obesity in Rats. *Obesity* 15:2605-2613, 2008.
4. O Sogabe N, Maruyama R, Goseki-Sone M. Influence of long-term lactose feeding on intestinal alkaline phosphatase in rats. *Journal of Home Economics of Japan* 58:255-260, 2007.

業績（低フォスファターゼ関連、研究の目的の文献番号はこの項目の番号に対応）

1. Nakamura-Utsunomiya A, (他8名), Michigami T, Ozono K, Kobayashi M. Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: a report of 6 cases. *Clin Pediatr Endocrinol*, in press
2. Kang, H.-Y., Shyr, C.-R., Huang C.-K., Tsai, M.-Y., Orimo, H., Lin, P.-C., Chang, C., Huang, K.-E. • Altered TNSALP expression and phosphate regulation contribute to reduced mineralization in mice lacking androgen receptor • *Mol. Cell. Biol.* • 2008 • 28 (7354-7367)
3. Sogabe, N., Oda, K., Nakamura, H., Orimo, H., Watanabe, H., Hosoi, T., Goseki-Sone, M. • Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. • *Biomed. Res.* • 2008 • 29 (213-219).
4. Orimo, H., Shimada, T.: The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. • *Mol. Cell. Biochem.* • 2008 • 315(51-60).
5. Orimo, H., Goseki-Sone, M., Hosoi, T., Shimada, T. • Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U₂OS osteoblast-like cells. • *Mol. Genet. Metab.* • 2008 • 94(375-381).
6. Numa N, Ishida Y, Nasu M, Sohda M, Misumi Y, Noda T, Oda K: • Molecular basis of perinatal hypophosphatasia with tissue-nonspecific alkaline phosphatase bearing a conservative replacement of valine by alanine at position 406: Structural importance of the crown domain. • *FEBS J.* • 2008 • 275(2727-2737)
7. Sogabe N, Oda K, Nakamura H, Orimo H, Watanabe H, Hosoi T & Goseki-Sone M: • Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. • *Biomed. Res.* • 2008 • 29(213-219)
8. Watanabe, A., Yamamasu, S., Shinagawa, T., Suzuki, Y., Miyake, H., Takeshita, T., Orimo, H., Shimada, T.: Prenatal genetic diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. • *J.*

Nippon Med. Sch. • 2007 • 74(65–69).

9. Nasu M, Ito M, Ishida Y, Numa N, Komaru K, Nomura S, Oda K: Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg433→Cys substitution associated with severe hypophosphatasia. • FEBS J. • 2006 • 273(4),(5612–5624).
10. Komaru K, Ishida Y, Amaya Y, Goseki-Sone M, Orimo H, Oda K. : Novel aggregate formation of a frame-shift mutant protein of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is ascribed to three cyteine residues in the C-terminal extension. Retarded secretion and proteasomal degradation. • FEBS J. • 2005 • 272(7),(1704–1717).
11. 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(5),(277–282).
12. Ishida Y, Komaru K, Ito M, Amaya Y, Kohno S, Oda K. • Tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Asp(289)→Val mutation fails to reach the cell surface and undergoes proteasome-mediated degradation. • J Biochem • 2003 • 134(1),(63–70).
13. Litmanovitz I, Reish O, Dolfin T, Arnon S, Regev R, Grinshpan G, Yamazaki M, Ozono K. • Glu274Lys/Gly309Arg mutation of the tissue-nonspecific alkaline phosphatasia associated with convulsions. • J Inherit Metab Dis • 2002 • 25(1),(35–40).
14. Ito M, Amizuka N, Ozawa H, Oda K. • Retention at the cis-Golgi and delayed degradation of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Asn153→Asp substitution, a cause of perinatal hypophosphatasia. • Biochem J • 2002 • 361(3),(473–480).
15. Orimo H, Girschick HJ, Goseki-Sone M, Ito M, Oda K, Shimada T.: Mutation analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia J. • Bone Miner Res. • 2001 • 16(2313–2319).
16. Müller HL, Yamazaki M, Michigami T, Kageyama T, Schönau E, Schneider P, Ozono K., Asp361Val mutant of alkaline phosphatase found in patients with dominantly inherited hypophosphatasia inhibits the activity of the wild-type enzyme. • J Clin Endocrinol Metab • 2002 • 85(743–747).
17. Mochizuki H, Saito M, Michigami T, Ohashi H, Koda N, Yamaguchi S, Ozono K., Severe hypercalcemia and respiratory insufficiency associated with infantile hypophosphatasia caused by two novel mutations of the TNSALP gene. • Eur J Pediatr • 2002 • 159(375–379)
18. Fukushi-irie M, Ito M, Amaya Y, Amizuka N, Ozawa H, Omura S, Ikehara Y, Oda K.: Possible interference between tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg54→Cys substitution and a counterpart with an Asp277→Ala substitution found in a compound heterozygote associated with severe hypophosphatasia. • Biochem. J • 2000 • 348(3),(633–642).
19. Cai G, Michigami T, Yamamoto T, Yasui N, Satomura K, Yamagata M, Shima M, Nakajima S, Mushiake S, Okada S, Ozono K., Analysis of localization of mutated tissue-nonspecific alkaline phosphatase proteins associated with neonatal hypophosphatasia using green

fluorescent protein chimeras. • J Clin Endocrinol Metab • 1998 • 83(3936–3942)

20. Shibata H, Fukushi M, Igarashi A, Misumi Y, Ikehara Y, Ohashi Y, Oda K.: Defective intracellular transport of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Ala162-Thr mutation associated with lethal hypophosphatasia. • J.Biochem • 1998 • 123(5),(968–977) .
21. Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida S.: Expression of the mutant (1735T-del) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. • J.Bone.Mineral.Res. • 1998 • 13(12),(1827–1834).
22. Fukushi M, Amizuka N, Hoshi K, Ozawa H, Kumagai H, Omura S, Misumi Y, Ikehara Y, Oda K. : Intracellular retention and degradation of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a Gly317-Asp substitution associated with lethal hypophosphatasia. • Biochem. Biophys. Res. Commun • 1998 • 246(3),(613–618).
23. Ozono K, Yamagata M, Michigami T, Nakajima S, Sakai N, Cai G, Satomura K, Yasui N, Okada S, Nakayama M., Identification of novel mutations (Phe310Leu and Gly439Arg) in a neonatal case of hypophosphatasia. • J Clin Endocrinol Metab • 1996 • 81(4458–4461)

特許

1) 特許権(発明者:折茂英生)

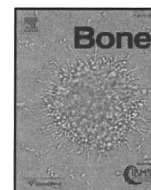
出願番号 特願 2004-248364 号

出願日 2004 年 8 月 27 日

発明の名称 「骨密度予測方法および遺伝子多型分析用試薬キット」

国際特許分類 C12N 15/00

V. 業績別刷



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

Masaaki Kimata^{a,b,c,1}, Toshimi Michigami^{a,b,*,1}, Kanako Tachikawa^a, Tomoko Okada^a, Takao Koshimizu^a, Miwa Yamazaki^a, Mikihiko Kogo^c, Keiichi Ozono^d

^a Department of Bone and Mineral Research, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka 594-1101, Japan

^b Department of Craniofacial Developmental Biology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^c Department of First Oral Surgery, Osaka University Graduate School of Dentistry, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^d Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2009

Revised 31 July 2010

Accepted 7 August 2010

Available online 13 August 2010

Edited by: M. Noda

Keywords:

Inorganic phosphate

Chondrocyte

Cyclin D1

Gene expression

Na⁺/Pi cotransporter

ABSTRACT

As chondrocytes mature, the concentration of inorganic phosphate (Pi) increases in the extracellular milieu. It was demonstrated that the progressive accumulation of Pi started from the proliferative zone and peaked in the hypertrophic zone of growth plate. Although extracellular Pi is reported to be involved in the apoptosis and mineralization of mature chondrocytes, its role in proliferating chondrocytes remains unclear. Here we investigated this role utilizing ATDC5, an established cell model of chondrocytic differentiation. In proliferating ATDC5 cells, we found that the expression of cyclin D1 was up-regulated, and that of alkaline phosphatase (ALP) was down-regulated in response to an increase in extracellular Pi within 24 h. Moreover, an increase in extracellular Pi-induced activation of the Raf/MEK/ERK pathway, and treatment with a MEK inhibitor PD98059 abolished the effects on the expression of cyclin D1 and ALP, indicating that extracellular Pi regulates the expression of these genes through the Raf/MEK/ERK pathway. Consistent with its up-regulation of cyclin D1 expression, the extracellular Pi facilitated the proliferation of ATDC5 cells. Treatment with phosphonoformic acid (PFA), an inhibitor of sodium/phosphate (Na⁺/Pi) cotransporters, abrogated the activation of the Raf/MEK/ERK pathway and gene expression induced by the increase in extracellular Pi. Knocking down of the type III Na⁺/Pi cotransporter Pit-1 diminished the responsiveness of ATDC5 cells to the increase in extracellular Pi. Interestingly, the increased extracellular Pi induced the phosphorylation of fibroblast growth factor receptor substrate 2 α (FRS2 α), which was also cancelled by knocking down of the expression of Pit-1. In primary chondrocytes isolated from mouse rib cages as well, increased extracellular Pi induced the phosphorylation of ERK1/2 and alterations in the expression of cyclin D1 and ALP, both of which were abolished by treatment with PFA. These results suggest that signaling by extracellular Pi is mediated by Pit-1 and FRS2 α , and leads to activation of the Raf/MEK/ERK pathway and increased expression of cyclin D1, which facilitates the proliferation of immature chondrocytes.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In vertebrates, long bones form through endochondral bone formation, a multistep process involving the mesenchymal condensation of undifferentiated cells, the proliferation of chondrocytes, and differentiation into hypertrophic chondrocytes, followed by mineralization [1]. As chondrocytes mature, they change morphologically and exhibit alterations in the production of extracellular matrix proteins.

Proliferating chondrocytes produce collagen types II and IX, while hypertrophic chondrocytes are characterized by a high level of alkaline phosphatase (ALP), diminished levels of collagen types II and IX, and the production of type X collagen, a hypertrophic chondrocyte-specific product. Evidence has suggested that terminally differentiated chondrocytes undergo programmed cell death in mammals. Various signaling molecules, including Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and fibroblast growth factors (FGFs), have been revealed to regulate the maturation of chondrocytes [2–8].

It is well established that inorganic phosphate (Pi) plays critical roles in the skeletal mineralization. The predominant mineral crystal phase present in bone extracellular matrix is hydroxyapatite, which contains calcium (Ca) and Pi ions and is deposited both within and

* Corresponding author. Department of Bone and Mineral Research, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Japan. Fax: +81 725 57 3021.

E-mail address: michigami@mch.pref.osaka.jp (T. Michigami).

¹ These authors contributed equally to this work.