

201128056A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大藪恵一

平成24年(2012年)3月

平成 23 年度研究成果報告書

はじめに

本報告書は、厚生労働省難治性疾患克服事業「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」研究班の平成 23 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遺伝性骨疾患である。臨床像が多岐にわたるところから、確定診断に至っていない症例も少なくない。本研究班においては初年度にあたる平成 21 年度、乳歯早期脱落を含む患者実態把握のためのアンケート調査より患者実態把握につとめ、本症の診断基準を策定した。策定した診断基準については、平成 22 年度に開設した研究班ホームページの公開に加え、総説や学会発表などを活用してその普及に努めた。さらに、遺伝子解析による確定診断を推進するため、研究班ホームページに依頼窓口を設けた。その結果、平成 23 年度には主治医から本研究班への相談件数が増加し、症例の把握および確定診断に有用であった。このことから、本研究班の目的の一つである、主治医と研究班班員との間の本症の診療ネットワークの基盤が構築できたと考えている。

本研究班の学術的な成果としては、まず、実態把握調査の結果から、呼吸管理を要する重症型において長期生存例が認められる事、周産期発症であっても予後良好な病型が存在する事、乳歯早期脱落は障害の程度が大きく、患者の QOL 上重大な問題となっている事が判明した。今後は、これらの知見を本症の治療指針策定に盛り込む必要がある。また、他研究分野との連携により、最も頻度の高い c.1559delT 変異アレル保因率を解析した結果、日本人における本症の発症頻度を約 150000 人に 1 人程度であると推定した。さらに、遺伝子型-表現型の相関解析より、周産期発症にもかかわらず予後良好な病型が F310L 変異と関係していることを明確化したが、従来の病型分類には入っていなかった本病型の存在が国際的にも認められるようになり、本年、一流専門学術誌に発表された総説においても認知された。また、新規治療の開発については、平成 22 年度に本症のモデルである ALP ノックアウトマウスを用いて新生児期での遺伝子治療の効果を報告したが、今年度は AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターを用いた胎児腹腔内への遺伝子導入により致死性 HPP モデルマウスの治療に成功した。この成果は低フォスファターゼのみならず、他の重症骨系統疾患に対する

重要な治療法の選択肢を提供すると期待される。

主任研究者が主催した第29回日本骨代謝学会には本症の世界的な研究者である M. Whyte 先生を招聘し、患者会会員の参加のもとで講演していただき、さらに患者会会員の個別の質問に答えていただく機会を設けた。改めて、本症の研究及び治療の伸展に対する患者さんご家族の強い期待を感じる場となった。

最後に、本研究事業の遂行に御協力頂いた分担研究者各位ならびに暖かいご指導、ご支援を頂いた厚生労働省健康局疾病対策課に深謝申し上げるとともに、本報告書が今後の低フォスファターゼ症研究の発展に貢献することを祈念する。

主任研究者 大藪恵一

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	----- 6
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	----- 16
5. 分担研究者	安井夏生	----- 18
6. 分担研究者	道上敏美	----- 23
7. 分担研究者	五関正江	----- 26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 28
IV. 疾患概要		----- 30
V. 診断指針		----- 31
VI. 業績		----- 32
VII. 業績別刷		----- 36

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

主任研究者 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

平成 21 年度に策定した低フォスファターゼ症診断指針については、当研究班ホームページでの公開に加え、本症に関する総説などにおいても記載し、周知に努めた。その結果、主治医から本研究班にコンサルトされて遺伝子解析が行われ、確定診断に至る症例が増加してきた。このことから、策定した診断指針及び研究班ホームページの有用性が示唆された。また、脳症を合併した稀な症例を経験したので、学会発表を行った。さらに、第 29 回日本骨代謝学会に本症の研究における世界的第一人者である M. Whyte 先生を招聘し、患者会参加型の講演会を行った。当研究班の目的の一つである本症研究者と患者会との相互ネットワークの構築に寄与したと考えている。また、これまで提唱してきた周産期発症であっても良好な予後を示す病型（新生児良性型）の存在が徐々に国際的にも認められるようになり、本年、一流専門学術誌に発表された総説においても認知された。

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 (TN-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. 診断基準の策定とその普及、疫学調査

平成 21 年度に策定した本症診断指針については、研究班ホームページや総説などを活用して周知に努めた。また、ホームページに主治医からの相談（遺伝子解析を含む）を受け付ける窓口を開設した。

第 29 回日本骨代謝学会に本症の研究における世界的第一人者である M. Whyte 先生を招聘し、患者会参加型の講演会を行った。

また、新規治療開発のための iPS 作製や治療効果評価のための pyrophosphate 測定法の確立を試みた。

本症診断指針の作成、広報活動、疫学調査平成 21 年度の調査結果を踏まえて低フォスファターゼ症の診断指針（報告書内に別途掲載）を策定し、22 年度に開設した当研究班のホームページ(<http://www.bone.med.osaka-u.ac.jp/>)中で公開した。診断指針については、主任研究者が執筆した総説の中でも掲載し、周知に努めた。また、研究班ホームページには遺伝子解析を含めた相談を受け付ける窓口を開設した。その結果、本ホームページを介して主治医からの症例の相談および遺伝子検査が依頼され、新たな症例の確定診断に有用であった。また、本ホームページは患者会ホームページ(<http://hypophosphatasia.life.coocan.jp>)ともリンクしており、患者を含め、広く一般に本症に関する情報を発信した。

また、北米での酵素補充療法の治験責任医師である M. Whyte 先生を第 29 回日本骨代謝学会に招聘し、患者会会員も聴衆として参加した講演会を開催した。Whyte 先生には、講演後、患者会からの個別質問にも対応していただいた。

最も頻度の高い c.1559delT 変異の一般集団における頻度を調査した。その結果、本症の年間患者数の発生頻度を約 150000 出生にひとりとして推定した。

2. 遺伝子型-表現型の関連の検討

継続して *TNSALP* 遺伝子診断を行い、遺伝子解析担当の分担研究者が対応した。症例の蓄積にともない、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ことが明確化した。本病型の症例は整形外科を受診している可能性が高いところから、学会等を通じて整形外科領域における本症の認知度を挙げる努力を行ったところ、実際に症例の相談があり、F310L 変異が同定された。

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、外来で治療法などの相談に対応した。一部の症例については論文発表を行った。

興味深い経過を示した症例を経験したので記述する。症例は乳児型低フォスファターゼ症と診断され経過観察中であった 4 歳の女兒、感冒症状ののち、活気低下、独歩不能となりずり這いでの移動や難聴が疑われる行動を認めた。感冒症状が出現して 10 日後に全身強直間代性けいれんの重積を認め、急性脳症の診断で、midazolam の持続点滴、ステロイドパルス療法が施行された。また寡動性、感情平坦、発語低下、ずり這い移動などの症状が数週間持続した。頭部 MRI ではび慢性の脳萎縮を認め、ミトコンドリア病の合併が疑われたが確定診断にはいたらなかった。*TNSALP* 遺伝子変異 Met226Ile/L520RfsX86 であった。

3. 乳歯早期脱落への対応

本症における乳歯の早期脱落は、顔貌への影響があり、患者のQOLを損なう可能性がある。また、残存する歯に過剰な咬合圧がかかる事により、乳歯の脱落を促進する可能性があることから、本症に対してインプラント治療を行っており、有効性をみとめている。

4. 治療効果の判定

現在導入されつつある酵素補充療法をはじめとして、治療の効果を判定するための指標が必要である。アルカリフォスファターゼの内在性基質のひとつである pyrophosphate の測定法は *in vitro* では有用性が確認されたが、実際の血清サンプルを用いた場合での評価は難しく、改良の余地がある。

5. 次世代治療法の開発

本症に対する次世代治療法の開発につながる技術として、疾患特異的 iPS の作製を試みている。

ヒト iPS 細胞の作製に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を用いた。すなわち、線維芽細胞に pMXs-Oct4/ -Sox2/ -Klf4/ -cMyc の 4 因子を導入する事によりリプログラミングを行った。複数の疾患の患者より線維芽細胞を採取し、iPS 作製に成功した。これらの因子を導入するシステムとして Sendai virus を用いる方法にも着手した。変異遺伝子に対して Zinc Finger Nuclease 方式による修復を試みている。

TNSALP ノックアウトマウスに TNALP-D 発現 AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターを

妊娠 15 日目のマウス胎児に注射したところ、出生後の同マウスで瘻癰は完全に抑制され、骨の形成、体重増加も改善し著明な延命効果が確認できた。本症の胎児遺伝子治療の可能性を示すものと考えられた。

D. 考察

低フォスファターゼ症の診断指針の策定および研究班ホームページ等を活用した広報活動により、本症の遺伝子診断依頼件数が増加した。このことから、本研究班の活動により、本症の認知度が高まり、これまで未診断であった症例が確定診断に至ったことが推察され、本診断指針及び研究班ホームページの有用性が示された。今回の研究成果を踏まえて、ひき続き本症に関する情報の発信及び主治医や患者を対象とするコンサルテーション業務を継続的に行うための基盤構築が必須であると考える。

症例の蓄積に伴い、日本人の本症において周産期発症ながら予後良好で、骨変形を主たる症状とする病型が存在し、F310L 変異と関連していることが明確化した。同病型についての遺伝子解析依頼が今後増加すると考えられる。また、我々が提唱してきた、このような周産期発症良性型の存在が広く海外でも認知されるに至った。このことも、本研究班の研究成果と考えており、今後、本症の予後判定及び治療選択を考える上でも、本病型を含めた新たな病型分類を用いるべきである。

本症の神経系の合併症としてはビタミン

B6 依存性けいれんが知られるが、今回、脳症を伴った興味深い症例を経験した。同様の症例を蓄積し、脳症と低フォスファターゼ症との関連性を明らかにする必要がある。

E. 結論

1. 研究班ホームページや総説を活用して、本症診断指針の普及に努めた。
2. 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出生にひとりと推定した。
3. 周産期発症予後良好型が国際的に認知されるに至った。
4. 本症に脳症を合併した稀な症例を経験した。本症との因果関係について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

i) Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating Levels of Soluble α -Klotho Are Markedly Elevated in Human Umbilical Cord Blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(6):E943-E947

ii) Miura K, Umegaki N, Kitaoka T, Kubota T, Namba N, Etani Y, Hirai H, Kogaki S, Nakajima S, Takahashi Y, Tamai K, Katayama I, Ozono K. A Male Patient with Humoral Hypercalcemia of Ma-

lignancy (HHM) with Leukocytosis Caused by Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Resulting from Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2011, 20(3), 65-71

iii) Kitaoka T, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Hirai H, Yamamoto T, Ozono K. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab*, 2011, 29(5):598-605

iv) Otomo T, Yamamoto T, Fujikawa Y, Shimotsuji T, Ozono K. Elevated Bone Turnover in an Infantile Patient with Mucopolysaccharidosis II; No Association with Hyperparathyroidism. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2011, 20(1)7-13

v) 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 hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers. *J Hum Genet*. 2011, 56(3)174-176 (Commentary)

vi) Ishida H, Kogaki S, Narita J, Ichimori H, Nawa N, Okada Y, Takahashi K, Ozono K. LEOPARD-type SHP2 mutant Gln510Glu attenuates cardiomyocyte differentiation and promotes cardiac hypertrophy via dysregulation of Akt/GSK3 β /

β -catenin signaling. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(4), H1531-1539

vii) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolysaccharidosis I skin fibroblasts. J Biol Chem, 2011, 286(40) 35283-35290

viii) 大藪恵一. 主要な生体調節臓器としての骨. 生産と技術, 2011, 63(3):77-82.

ix) 大藪恵一. 小児とビタミンD. THE BONE, 2011, 25(3):105-110.

x) 大藪恵一. 低フォスファターゼ症. 今日の整形外科治療指針 第6版. 国分正一, 岩谷力, 落合直之, 沸淵孝夫 編. 医学書院, 2010, 266.

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

2. 学会発表

i) ミトコンドリア病の合併が疑われた低フォスファターゼ症の1例 東純史, 沖永剛志, 酒井規夫, 北岡太一, 難波範行, 大藪恵一. 第9回ALPS研究会:2011.07.30, 大阪.

ii) 偶然の契機でみつかった乳児型低フォスファターゼ症の一例 入月浩美, 篠原健, 新井啓, 田中岳, 松尾真意, 長谷川聡, 松永雅道, 塚野真也, 田口哲夫, 長崎啓祐, 立川加奈子, 道上敏美, 大藪恵一. 第29回小児代謝性骨疾患研究会:2011.12.03, 東京

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

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

平成 23 年度分担研究報告書

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ている。我々は、これまでにヒドロキシアパタイトに親和性をもつ酸性アミノ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或いはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを新生児期の HPP マウスに静注することで、救命できることを報告している。日本では胎内或いは出生直後に死亡する致死的な周産期型 HPP が外国に比べ多いことが知られている。本研究では周産期型 HPP の治療法としての胎児遺伝子治療の有効性と安全性を検討した。TNALP-D10 発現 AAV ベクターを妊娠 15 日目のマウス胎児に注射した。胎児治療後、自然分娩で娩出した HPP マウスでは痙攣は完全に抑制され、骨の形成、体重増加も改善し著明な延命効果が確認できた。血中 ALP 活性は持続的に高値であった。ベクター分布の解析では軟骨細胞への遺伝子導入も確認できた。胎児遺伝子治療は致死的な周産期型 HPP の重要な治療法の選択肢になると考えられる。

A. 研究目的

HPP マウス（TNALP ノックアウト）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。

これまでの研究では TNALP-D10 を発現するレンチウイルスベクター或いはア

デノ随伴ウイルス(AAV)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。本研究で日本では諸外国に比べ多いと考えられている、致死的な周産期型 HPP の唯一の治療の選択肢となる胎児遺伝子治療の有効性と安全性を検討した。

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 9 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。

胎児遺伝子治療としては、妊娠マウスを開腹し、妊娠 15 日目のマウス胎児の腹腔内に子宮外からウイルスベクターを注射した。その後、自然分娩で娩出した新生児について解析を行った。

(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

妊娠 15 日目のマウス胎児の腹腔に AAV-TNALP-D10 を投与後、HPP マウスでは痙攣は完全に抑制され、生後 8 週までの観察期間中、野生群とほぼ同等の発育を認めた。また、治療後 HPP マウスの血漿 ALP 活性は無治療 HPP マウスと比較して有意に上昇し、X 線撮影では骨の

成長および骨密度の増加を肉眼的に確認できた。組織学的な解析（前脛骨の ALP 活性染色）では、骨・軟骨組織で ALP 活性が陽性となっていることを確認した。

胎児期治療後の体内でのベクター分布を定量 PCR で解析したところ、心臓、肝臓、骨格筋、腹壁、骨・軟骨、脳でベクターのコピー数上昇を認めた。

D. 考察

出生前診断が技術的に可能になった現在、胎児期から病態が進行するある種の遺伝病に対しては胎児期の治療が重要な選択肢となる。米国組換え DNA 委員会 (RAC) は「胎児遺伝子治療の科学、医学、倫理に関するレポート」で、将来の胎児遺伝子治療の重要性を提言している。胎児期遺伝子治療は早期の治療開始により症状の進行を最小限に抑え、さらに胎児は免疫能が未熟であることからウイルスベクターに対する免疫寛容が得られる可能性がある。また、未熟な血液脳関門を通過し中枢神経系 (CNS) への治療効果も期待できる。一方で、発達過程にある胎児期の組織臓器に対する遺伝子導入の影響は未知の部分も多く、安全性や倫理性について慎重な検討が必要である。今後、ヒトでの胎児遺伝子治療の Risk/Benefit の評価を行うために、動物実験系における研究データの蓄積が不可欠である。

今回の実験で、胎児期に AAV ベクターを投与すると軟骨細胞への遺伝子導入が可能であることが示された。出生後のマウスへの AAV ベクターを投与した場合には主に筋肉系組織への遺伝子導入が起き

ることが知られている。胎児期に軟骨細胞への遺伝子導入が可能であった理由として、胎児の体内には幹細胞が豊富に存在することや、成長に伴い胎児血流が変化する中で、今回の研究を行った時期（妊娠15日目）は軟骨細胞のベクターに対する感受性が高い時期であった可能性などを考えている。胎児期の遺伝子導入は、HPPのみならず、他の遺伝性骨系統疾患に対する治療の選択肢となりうる可能性が考えられる。

E. 結論

AAVベクターを用いた胎児腹腔内への遺伝子導入手法により致死性HPPモデルマウスの治療に成功した。現在、HPPの治療としては酵素補充療法と間葉系幹細胞移植の治療が開始されているが、胎児期治療は行われていない。近年の周産期医療の飛躍的な発展にともない、出生前に診断されるHPPの数は増加することが予測される。胎児遺伝子治療は出生前に遺伝子診断されたHPPのみならず、今後は遺伝性骨系統疾患に対する重要な治療法の選択肢になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugano, H., Matsumoto, T., Miyake, K., Watanabe, A., Iijima, O., Migita, M., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. (2011) Successful gene therapy *in utero* for lethal murine hypophosphatasia. Hum.

Gene Ther. In press

Matsumoto, T., Miyake, K., Yamamoto, S., Orimo, H., Miyake, N., Odagaki, Y., Adachi, K., Iijima, O., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. (2011) Rescue of Severe Infantile Hypophosphatasia Mice by AAV Mediated Sustained Expression of Soluble Alkaline Phosphatase. Hum. Gene Ther. 22:1355-1364

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. 26:135-142

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. 56:166-168

2. 学会発表

Matsumoto, T., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. Successful Treatment of Hypophosphatasia Model Mice by a Single Intramuscular Injection of

- AAV Type 8 Vector Expressing Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2011.May18-21 Seattle, WA
- Sugano, H., Matsumoto, T., Miyake, K., Watanabe, A., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. Fetal Gene Therapy for Lethal Murine Hypophosphatasia. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2011.May18-21 Seattle, WA
- Iijima, O., Sugano, H., Miyake, K., Shimada, T. Successful treatment of severe infantile hypophosphatasia by ex vivo gene therapy using bone marrow cells expressing bone targeted TNALP. 第17回日本遺伝子治療学会 2011.7 福岡
- 菅野 華子、飯島 修、渡邊 淳、福永 慶隆、島田 隆：低フォスファターゼ症モデルマウスの胎児期遺伝子治療. 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.大阪
- 飯島 修、菅野 華子、渡邊 淳、島田 隆：骨髄細胞移植による低フォスファターゼ症の遺伝子治療. 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.大阪
- 渡邊 淳、菅野 華子、飯島 修、折茂英生、島田 隆：日本における周産期型低フォスファターゼ症 高頻度変異部位 1559delT と周産期時期からの follow up の重要性. 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011.7. 大阪
- 菅野 華子、飯島 修、渡邊 淳、福永 慶隆、島田 隆：低フォスファターゼ症モデルマウスの胎児期遺伝子治療. 第53回日本先天代謝異常学会総会 2011.11. 幕張
- 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* 石灰化アッセイ法の確立を試みてきた。今年度は、日本人に多い p. F327del 変異の石灰化アッセイを初めて行った。このアッセイ法ではほとんど石灰化がみられず、表現型と一致することを確認した。

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方法を確立する。今年度は *in vitro* 石灰化アッセイ法にて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。

B. 研究方法

変異アルカリフォスファターゼ（ALP）発現プラスミドを、ALP をほとんど発現しない骨芽細胞様細胞株 U₂OS 細胞にリポフェクション法により導入後、石灰化導入培地にて 5 日間培養し、Alizarin Red R 染色と pyridinium chloride による可溶化後、570 nm の吸光度の測定により石灰化を定量し、同時に並行して培養した細胞の蛋白量当たりの石灰化の程度として表示する。

C. 研究結果

今までの研究で *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、今まで解析されていない p. F327del 変異の解析を行った。この変異をもつ発現プラスミドを細胞に導入

後 48 時間後の ALP 活性は 3.1 ± 0.9 nmol/min/mg protein であり、野生型の 3.4 %であった。同時に行った代表的な severe allele である c. 1559delT では 3.2 ± 0.7 nmol/min/mg protein（野生型の 3.6 %）であり、上記の方法で石灰化アッセイを行うとほとんど石灰化がみられないことを明らかにした。この変異をもつ患者は重症型であり、本解析法の有用性を示した。

D. 考察

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考えられ、本法が質的診断に資することができることが示された。

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し、有用性を証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, A., Karasugi, T., Sawai, H., Banyar Than Naing, Ikegawa, S.,

Orimo, H., Shimada, T.: 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. Human Genet.*, 56, 166-168 (2011).

2) Matsumoto, T., Miyake, K., Yamamoto, S., Orimo, H., Miyake, N., Odagiri, Y., Adachi, K., Narisawa, S., Millán, J. L., Fukunaga, Y., Shimada, T.: Rescue of severe infantile hypophosphatasia mice by AAV-mediated sustained expression of soluble alkaline phosphatase. *Hum. Gene Ther.*, 22, 1355-1364 (2011).

2. 学会発表

1) Matsumoto, T., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Narisawa, S., Millán, J. L., Fukunaga, Y., Shimada, T.: Successful treatment of hypophosphatasia model mice by a single intramuscular injection of AAV type 8 vector expressing tissue-nonspecific alkaline phosphatase. 14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, 2011 (5. Seattle, WA).

2) 渡邊 淳、菅野華子、飯島 修、折茂英生、島田 隆：日本における周産期型低フォスファターゼ症 高頻度変異部位 1559delT と周産期時期からの follow up の重要性. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011.7.

3) Orimo, H., Kiyama, A., Matsumura, T.: Characteristics of a deletion of Phe327 (p.F327del) in tissue-nonsp

ecific alkaline phosphatase from a hypophosphatasia patient. 第 9 回 ALPS 研究会、2011.7.

4) Shimada, T., Yamamoto, S., Matsumoto, T., Sugano, H., Iijima, O., Orimo, H.: Gene therapy for murine hypophosphatasia. 第 9 回 ALPS 研究会、2011.7.

5) Watanabe, A., Sawai, H., Banyar Thang Naing, Orimo, H., Shimada, T.: Genotype frequency of 1559T deletion in the *ALPL* gene and clinical significance of hypophosphatasia in Japan. 第 9 回 ALPS 研究会、2011.7.

6) 藤田京志、佐藤秀平、Banyar Thang Naing、折茂英生、島田 隆、渡邊 淳：父性片親性ダイソミーにより発症した周産期型低ホスファターゼ症の一例. 第 56 回日本人類遺伝学会大会、2011.11.

G. 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（平成 23 年度）

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

- ・ 発症メカニズムを知る目的のため周産期型低フォスファターゼ症で報告されたミスセンス突然変異[TNSALP (C184Y)と TNSALP (C472S)]について分子レベルでの解析を行なった。哺乳動物細胞にそれぞれの変異酵素を発現させて解析したところ、いずれの活性も野性型に比べて著しく低下しており、しかも大部分の酵素は未成熟型 (66kDa) の分子種として小胞体内に蓄積し、さらにユビキチン化を受けた後プロテアソームで分解されることが判明した。従って、C-122-C-184 及び C-472-C-480 の 2 つのサブユニット内のジスルフィド結合は TNSALP の適正な立体構造の獲得に必須である事がわかった。
- ・ トランスジェニックマウスの作出と解析により野性型 TNSALP を軟骨に過剰に発現させると骨の石灰化を阻害することがわかった。

A. 研究の目的

低フォスファターゼ症は TNSALP (tissue-nonspecific alkaline phosphatase) 遺伝子上のミスセンス突然変異に起因する先天性の代謝異常疾患であり、これまでに全世界で 2011 年 7 月現在 250 例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を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、今回周産期型低フォスファターゼ症で報告された 2 つのミスセンス変異である TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472

S) の解析を行なった。また、in vivo での TNSALP の役割を確かめる目的で野性型酵素のトランスジェニックマウスを作出して酵素の過剰発現の影響を解析した。

B. 研究の方法

野生型酵素をコードするプラスミド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後、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確認した。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、TNSALP (C184Y) を発現する Tet-On CHO K1 細胞を樹立し、より詳細な解析を行った。一方、type II collagen promoter に TNSALP 遺伝子を組み込んだ胎生 18 日齢 Tg マウスのパラフィン切片とエ

ポキシ樹脂切片を作製し、TNSALP, matrix gla protein (MGP), osteocalcin, type II collagen の局在ならびに石灰化を von Kossa 染色と透過型電子顕微鏡で解析した。

C. 研究結果

1. TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472S) の

解析

COS-1 細胞に一過性の発現した TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472S) はいずれも非常に弱い活性しか認められなかった。しかし、細胞染色の結果からいずれの変異酵素もわずかだが細胞表面に活性を認めた。ウェスタンブローディングにより野性型酵素を発現する細胞では成熟型 (80kDa) とその前駆体の未成熟型 (66 kDa) の 2 つの分子種が認められたが、一方変異酵素では成熟型はほとんど検出できず、未成熟型が大部分であり、しかもジスルフィド結合で高分子量の凝集物を形成していた。両変異酵素は類似した性質を示したので、より酵素活性が低い (分子的な欠陥の大きい) TNSALP (C184Y) の安定株 (Tet-On CHO K1) を樹立し、詳細な解析を行なった。一過性の発現系と一致して、未成熟型の 66 kDa の分子種が大部分であったが、凝集物はわずかであったので、一過性の発現での多量の凝集物の蓄積は過剰発現によるものと考えられた。ホスファチジルイノシトール特異的なホスホリパーゼ C 処理により、わずかではあるが細胞表面に成熟型の分子種が存在していたことから、生合成された TNSALP (C184Y) のごく一部は細胞表面に到達しうることがわかった。数

種のグリコシダーゼ消化の結果、66 kDa は単に分子量が小さいのみならず、高マンノース型の N 結合糖鎖を保持しており、小胞体に蓄積していることが強く示唆された。

野性型の TNSALP 分子はホモ 2 量体として会合していることが知られているので、

TNSALP (C184Y) の分子状態を知る目的でシヨ糖密度勾配遠心法を用いた実験を行なった。その結果、TNSALP (C184Y) はモノマーとして存在することがわかった。この結果はサブユニット内のジスルフィド結合が形成されないためサブユニットは適切な立体構造を取れずに会合できないことを示している。次に蛋白質合成阻害剤のシクロヘキシミドの存在下にチェイス実験/ウェスタンブローディングで解析したところ、66 kDa の分子種は 3 時間後には細胞からほぼ消失することから細胞内で急速に分解されることがわかった。しかもこの分解は LLnL や Lactacystin などのプロテアソームの阻害剤で強く阻害される事からプロテアソームの関与が示唆された。そこでプロテアソームの阻害剤の存在下に免疫沈降で 66 kDa の分子種を回収し、抗ユビキチン抗体を使ったウェスタンブローディングで解析したところ、強くポリユビキチン化されていることが確認された。従って C-122-C-184 のジスルフィド結合を形成できない TNSALP 分子は 2 量体を形成できずに小胞体に蓄積し、ユビキチン化を受けてプロテアソームで分解されることがわかった。

2. トランスジェニック (Tg) マウスの解析