

Tg マウスでは軟骨細胞の細胞膜に沿って TNSALP 強陽性反応を観察したが、骨端軟骨の低形成や type II collagen 陽性反応は認めなかった。一方、Tg マウスの肥大化層および骨幹端の骨梁における石灰化は抑制されていたが、石灰化抑制因子である MGP や osteocalcin の局在は野生型マウスと同様であった。電顕観察を行うと、軟骨基質には非常に細かな微細結晶を有する石灰化球が、また、骨基質には長く伸長した石灰化結晶で構成される石灰化球が観察された。このことから、TNSALP を過剰発現しても異所性石灰化を誘導するのではなく、石灰化には基質小胞などの石灰化開始構造物が本質的に重要と思われた。また、Tg マウスの石灰化抑制の原因として、石灰化を制御する蛋白によるものではなく、過剰な TNSALP がリン酸モノマーのほかにピロリン酸や他のイオン分子を生成する可能性が推測された。以上、生理的石灰化において ALP には至適な活性と局在性が重要と推察される (研究支援者：北海道大学歯学研究科・硬組織発生生物学 網塚憲生教授)。

D. 考察と結論

1. TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472S) の解析により TNSALP が適正な立体構造を取る上でサブユニット内ジスルフィド結合の重要性が明らかになった。
細胞内で合成された変異酵素のごく一部のみが機能分子として細胞表面に発現する。よって、骨芽細胞や肥大軟骨細胞でもこれらの変異酵素は同じく十分な活性を

発現できないため低石灰化を引き起こすと考えられる。本変異は劣性遺伝すると考えられており、患者はいずれも複合ヘテロ接合体であることから、もう一方の変異も重症型であると推測される。

2. Tg マウスの解析により肥大化層および骨幹端の骨梁における石灰化は抑制されていることがわかった。その原因は今のところ不明である。現在、軟骨ではなく骨芽細胞に発現させるために TNSALP を type I collagen promoter の下流に組み込んだ Tg マウスの作出を準備している。

E. 健康危険情報 特になし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. Sato Y., Al-Shawafi HA, Oda K:
Structural and functional importance of the disulfide bond in tissue-nonspecific alkaline phosphatase: Analysis of two missense mutations (C184Y and c472S) associated with perinatal hypo-phosphatasia.
第9回 ALPS 研究会 (第29回日本骨代謝学会学術集会共済) 抄録 平成23年7月30日 (大阪)

2. 長谷川智香、織田公光、佐々木宗、田幡
千尋、柳 鋳晟、郭 穎、井上 貴一郎、
李 敏啓、小守壽文、山本 恒之、網塚
憲生：アルカリフォスファ
ターゼトランスジェニックマウスにお
ける基質石灰化機構の解明. 第 29 回
日本骨代謝学会学術集会、大阪) 抄録
平成 23 年 7 月 29 日 抄録 0-044

3. 菊池 渉、織田公光、三浦俊英、その他：
卵巣摘出ラットにおける血清骨型酒石酸
抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b)
の有用性の検討. 第 29 日本骨代謝学会学
術集会、大阪) 抄録
平成 23 年 7 月 28 日 抄録 P1-49

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

厚生労働科学研究補助金（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

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 マウスの歯を免疫組織学的に診査し、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。

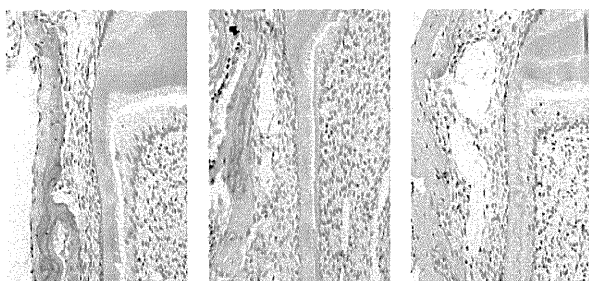
C. 研究結果

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。ただ、上顎乳中切歯の早期脱落に対しては、審美的な観点から、義歯の装着を考慮する必要があった。

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。免疫染色で調べると、野生型マウスでは、歯槽骨の表層と歯根のセメント質に相当する部分にセメント質／骨関連遺伝子であるオステオポンチンの強い発現を認めた。ヘテロ型マウスでは野生型と比較して、発現は弱いですが、歯槽骨の表層と歯根のセメント質に相当する部分にオステオポンチンの強い発現

を認めた。KO マウスでは、野生型およびヘテロ型マウスと比較して、全体的にオステオポンチンの発現が低下しており、セメント質に相当する部分も不明瞭であった (図)。

(図) 免疫組織学的染色 (Osteopontin). 左 ; 野生型, 中 ; ヘテロ型, 右 ; KOマウス



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、まだサンプル数が少なく、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、KO マウスにおいても、ヒトにおいて生じているセメント質の形成不全が起きていることが示唆された。

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

Okawa R, Nakano K, Matsumoto N, Ooshima T. Oral manifestations in patient with hypophosphatasia: report of 14 cases. The 23rd Congress of the International Association of Pediatric Dentistry: Athens, Greece, June 15-18, 2011.

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

A. 研究目的

低フォスファターゼ症は組織非特異的アルカリフォスファターゼ(TNSALP)遺伝子の異常により発症する骨系統疾患で10万出生に1人程度の頻度で発生するとされる¹⁻³。血清および骨のアルカリフォスファターゼ活性の低下がみられるが、その程度は様々で臨床像も症例により大きく異なる。一般に発症時期が早いほど重症と考えられ、最重症型は呼吸不全のため周産期に死亡する。一方軽症型の中には成人期まで病気に気づかず、病的骨折を起こして始めて低フォスファターゼ症と診断されるものもある。現在までに6つの臨床病型が知られている(表1)。

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

低フォスファターゼ症の疾患概念は確立しており、小児科ではよく認知された骨系統疾患である。身体所見やX線像だけで診断がつかない場合でも、血清アルカリフォスファターゼ値の測定や遺伝子診断により、他の骨系統疾患との鑑別は比較的容易なはずである。しかし整形外科の診療現場では低フォスファターゼ症患者を診療する機会は決して多いものではない。実際には歯科や小児科で診断が確定された患者の整形外科の問題点につき相談をうけるという形式をとることが多いと考えられる。本研究では本疾患が整形外科医にどのように認識され、診断・治療が行われているのかにつき調査したので報告する。

B. 研究方法

日本整形外科学会では1990年から骨系統疾患の全国登録を行っている。研究分担者の安井は2000年から2002年まで日本整形外科学会の骨系統疾患委員会の委員長を務めた経験を有するので、1990年から2009年までの20年間に登録された4268症例の骨系統疾患の内訳を分析してみた。その結果、低フォスファターゼ症は4268症例中たった1例しか含まれていないことがわかった。このことが何を意味するのかにつき考察を加える。また低フォスファターゼ症と

よく似た X 像を呈する疾患との鑑別についても自験例をふりかえり考察を加える。

C. 研究結果

骨系統疾患全国登録一覧表 (2009 年
日本整形外科学会小児整形外科委員会編)

	疾患名	症例数	男	女
1	骨形成不全症	636	313	323
2	軟骨無形成症	567	272	295
3	多発性軟骨性外骨腫症	269	163	105
4	多発性骨端異形成症	127	80	47
5	低リン血症性くる病	113	49	64
6	先天性脊椎・骨端異形成症	105	41	64
7	骨幹端異形成症	84	38	46
8	ムコ多糖症	82	59	23
9	内軟骨腫症	81	38	43
10	線維性骨異形成症	81	39	42
11	軟骨低形成症	76	43	33
12	大理石骨病	6 4	33	30
13	くる病	56	24	32
14	偽性軟骨無形成症	54	31	23

15	鎖骨・頭蓋骨異形成症	46	29	17
.
40	屈曲肢異形成症	7	3	4
55	低フォスファターゼ症	1	0	1
.
121	その他	1062	554	508
	合計	4268	2197	2069

1990 年から 2009 年までの 20 年間に日本整形外科学会に登録された骨系統疾患は 4268 症例であった。登録された病名は 1000 種類を超えたが診断不明のものも 31 例含まれていた。

最も多く登録された疾患は骨形成不全症であり、第 2 位が軟骨無形成症であった。低フォスファターゼ症は 1 例しか登録されていなかった。

冒頭に述べたように低フォスファターゼ症の発生頻度は 10 万出生にひとりとされる。これに対し軟骨無形成症は 2 万出生にひとりの割合で発生することが知られている。とすれば低フォスファターゼ症の患者は軟骨無形成症の 5 分の 1 程度存在するはずである。つまり 100 名あまりの患者登録が行われてもよいはずである。

なぜ低フォスファターゼ症の登録が少ないのかにつき考察してみる。

D. 考察

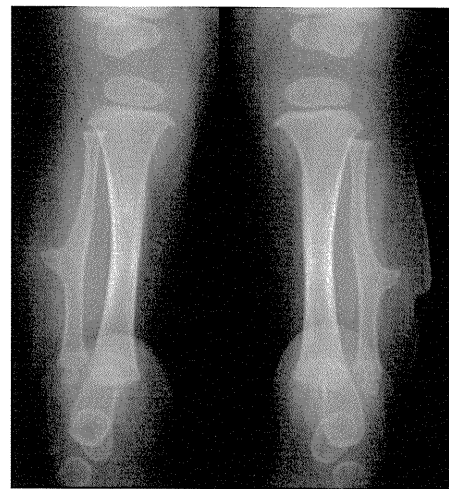
骨系統疾患の診断に際しては遺伝形式、身体所見、X線所見、臨床検査所見、組織学的所見などが重要とされるが、外来診療で最も頼りになるのは特徴的なX線所見である。たとえば軟骨無形成症などは専門家が見れば骨盤正面の単純X線写真1枚だけで殆ど診断を誤ることはない。骨系統疾患の世界的権威である J. W. Spranger も骨系統疾患の表現型はX線像に集約されるとし、1992年にはX線所見だけに基づいた「骨系統疾患国際分類」を発表している。現在用いられている国際分類は遺伝子診断を基にして作られたものであるが、基本骨格は Spranger らのX線所見だけで作成した分類とほとんど同じである。

整形外科医が外来診療の中で骨系統疾患の診断にあたる際に最も参考にするのはX線所見である。低フォスファターゼ症のX線像の特徴は骨の低石灰化、すなわちくる病様変化である。X線像だけで低フォスファターゼ症をビタミンD欠乏性くる病や低リン血症性くる病と鑑別するのは難しく、日本整形外科学会の全国登録にくる病として登録された疾患の中に低フォスファターゼ症が含まれている可能性は否定できない。整形外科でくる病の疑いをもたれた患者は直ちに小児科に紹介されることが多く、その時点で日本整形外科学会の登録から脱落する可能性もある。

図1 低フォスファターゼ症のX線像



図2



0歳女子（血清ALP値86 IU/L）

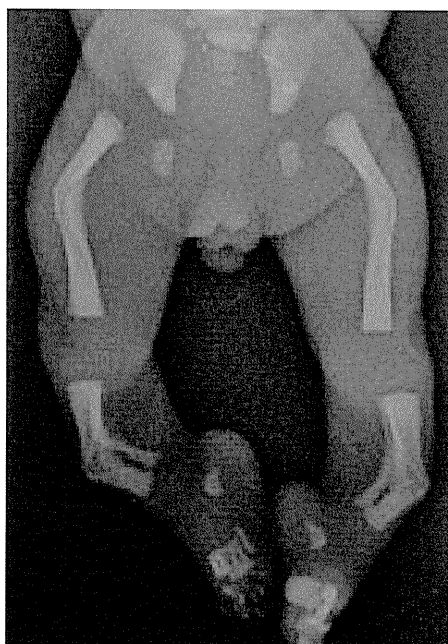
2歳（血清ALP値113 IU/L）

新生児期の低フォスファターゼ症のX線像をみると大腿骨や下腿骨は骨幹部中央で彎曲しているものがある（図1）。彎曲部の凹側には骨形成によるリモデリングの跡がみられ骨幹部にくの字型の縦線が入っている。この所見は屈曲肢異形成症

（campomelic dysplasia）の大腿骨や下腿骨と驚くほど類似する（図3）。また腓骨の骨幹部中央には外方にむかって骨棘が形

成され（図2）同部の皮膚に陥凹（skin dimple）がみられる。全く同様の所見が屈曲肢異形成症にも見られる。屈曲肢異形成症は軟骨細胞の転写因子である SOX9 の異常により発症する疾患であり、気管軟骨軟化症に伴う呼吸障害により多くは新生児期、乳児期に死亡する。原因遺伝子の異なる二つの疾患の表現型にこのような共通点があることは興味深い。整形外科医にとって低フォスファターゼ症よりも認知度が低いと思われる屈曲肢異形成症が20年間で7例登録されているのも不思議である。

図3 :Campomelic dysplasia のX線像(新生児)



E. 結論

低フォスファターゼ症は10万出生あたりひとりの割合で発生するとされるが、とすれば整形外科では認知度が低い疾患である。X線所見だけではビタミンD欠乏性くる病や低リン血症性くる病と鑑別がつかないため骨系統疾患の全国登録から漏れている可能性がある。低フォスファターゼ症の

新生児期のX線像は屈曲肢異形成症と類似点が多い。

F. 健康危険情報

低フォスファターゼ症を疑う疾患に遭遇すればX線検査だけでなく血清アルカリフォスファターゼ値の測定を行い、できれば遺伝子検査により診断を確立すべきである。

G. 発表 なし

H. 知的財産権 なし

文献

1. 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. 2011 Feb 10. [Epub ahead of print]
2. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. Ann N Y Acad Sci. 2010 Mar;1192:190-200.
3. 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

業績

1. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T: Ubiquitin Ligase Cbl-b Is a Negative Regulator for Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling during Muscle Atrophy Caused by Unloading. *Mol Cell Biol* (2009), 29(17):4798-4811.
2. Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamamoto K, Suzuki A, Shimane K, Nakamura Y, Yano K, Iikuni N, Tsukahara S, Kamatani N, Okamoto H, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hara M, Toyama Y, Horiuchi T, Tao K, Yasutomo K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Yamanaka H, Momohara S: Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Ann Rheum Dis*(2010), 69(2):368-73.
3. Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada GH, Wada Y, Yasui N, Yoneda T: The $\alpha 3$ isoform vacuolar type H^+ -ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Mol Cancer Res*(2011) , 9(7):845-55, (Epub 2011 Jun 13)

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が、我々は周産期発症であっても予後良好な症例が存在することを明らかにしてきた。日本人患者においてはc.1559delTとF310Lという2つの変異の頻度が高く、c.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。本研究班により作成したホームページなどを通じて、平成23年には国内から6例、国外より2例の低フォスファターゼ症遺伝子解析の依頼があった。国内からの6例のうち3例は、これまで見逃されることの多かった石灰化障害を殆どみとめない周産期発症予後良好型の症例であり、いずれの症例においてもF310L変異が同定された。このことから、本研究班において平成21年度に策定した低フォスファターゼ症診断のためのガイドライン（研究班ホームページにて公開中）がこれまで未診断であった症例の確定診断に有用であったと考えられた。

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。筆者らは、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により、本症の日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ことを目的として本研究を行った。

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、あるいはPCR産物をTAクローニングした後にシーケンスを行い、塩基配列を決定した。(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

本研究班においては、平成21年度に診断のためのガイドラインを策定し、研究班のホームページを作成してその中で公開した。また、このホームページに遺伝子診断についての相談窓口を開設したところ、本ホームページを閲覧して低フォスファターゼ症を疑い、遺伝子解析を依頼されるケースが増加した。本ホームページが疾患に対する情報提供やコンサルテーションに極めて有用であったと考えられる。

平成23年には、国内から6例の遺伝子解析の依頼があった。その病型と、遺伝子変異は以下の通りである。

症例	病型	変異
1	周産期発症良性型	R13X/F310L
2	周産期発症良性型	F310L/c.1559delT
3	周産期致死型	N173del/c.1559delT
4	乳児型	R119H/c.1559delT
5	周産期発症良性型	N173del/F310L
6	周産期致死型	H324R/c.1559delT

今回、6例中の3例が周産期発症良性型に

分類され、F310L変異を有していた。いずれの症例も、骨の石灰化障害は殆どなく、特徴的な下肢の彎曲変形を認めた。症例1及び2は、石灰化障害がないために当初は本症を疑われず、整形外科にて原因不明の先天性四肢彎曲症として経過観察されていたが、今回、確定診断することができた。研究班ホームページや学会での情報発信により日本人の本症に石灰化障害が軽微で下肢彎曲を特徴とする病型が存在することが徐々に認知されるようになった結果、今回F310Lを有する症例が多く確定診断されることになったと考えられる。

症例4の乳児型症例は、まだ症状を認めない生後1日の時点で、ルーチンの血液検査により血清ALP値の低下に気づかれ、その後の経過で3カ月時に高カルシウム血症、脛骨の軽度彎曲を認め、低カルシウム乳投与による管理を開始することができた。この症例について発症前から経過観察により迅速な処置が行えたのも、低フォスファターゼ症の認知度が上がり、診断が早くなったことを示唆すると考える。

今年度は、国外(ニュージーランド)からも2例の症例の紹介があり、遺伝子診断を行った。いずれも成人型の症例であり、1例はT117H/G438Sの複合ヘテロ接合体、もう1例はR255Cのヘテロ接合体であった。

D. 考察

今回、F310L変異を有する症例が新たに3例診断された。いずれの症例も、これまでの症例と同様、周産期発症予後良好型の病型を示し、骨石灰化障害はほとんど認めなかったが、特徴的な下肢の彎曲を呈していた。本病型は古典的な周産期型の症例とはレントゲン像が大きく異なることから、未診断の症例も少なくないと考えられ、今後、本病型の認知度が上がるにつれて、確定診断される症例が増えると期待される。また、症状を呈する

前から本症であることを診断できた乳児型の症例においては、高カルシウム血症が増悪する前に治療を開始することができ、症状の重症化を防ぐことができた。これらのことから、ひきつづき本症の認知度を高め、より早期の確定診断及び治療の開始をめざすことの重要性が示唆され、また、ホームページを活用した情報発信及びコンサルテーションの有用性が示された。

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。この周産期発症予後良好例は F310L 変異と関連しており、石灰化障害は殆ど認めないが、下肢の彎曲が特徴的である。先天性の四肢彎曲症として経過観察されている症例の中には低フォスファターゼ症の症例が存在する可能性がある。研究班ホームページによる診断ガイドラインの公開や遺伝子診断に関する相談窓口の開設は、本症患者の迅速な確定診断及び治療の開始に極めて有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohata Y, Arabori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima YI, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:E943-947, 2011

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*,

56:174-176, 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. *J Biol Chem*, 286:3094-3103, 2011

2. 学会発表

道上敏美. 小児における骨系統疾患：その分子病態と遺伝子型-表現型解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 平成 23 年 7 月 28-30 日、大阪.

須藤ゆう、吉田登、澤田里恵、椿原麻由子、鈴木光幸、春名英典、工藤孝広、道上敏美、大藪恵一、清水俊明. ALTE 様症状を契機に診断に至った乳児型低フォスファターゼ症の 1 男児例. 第 45 回日本小児内分泌学会. 平成 23 年 10 月 6-8 日、大宮

H. 知的財産権の出願・登録上場

該当なし。

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、血清中の骨型アルカリフォスファターゼ (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、血中リン濃度の関連と男女差について明らかにすることができた。そこで、変異型 ALP 発現ベクターを用いた *in vitro* 実験において、リン濃度との関連について詳しい解析を行った。さらに、ヒトを対象として得られた結果を参考にして、各種栄養因子と血中 BAP 活性や各組織中の ALP 活性との関連について動物実験による *in vivo* での検討を進めており、今後の食事療法に役立てられる可能性が示唆された。

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、骨型アルカリフォスファターゼ (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、遺伝子解析を行った。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った。

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として培地中のリン酸濃度を変化させて比較した。

また、動物実験により、各種栄養因子と血中 BAP 活性や組織中の ALP 活性との関連についても検討を行った。

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 日に日本女子大学ヒトを対象とした実験研究に関する倫理委員会において、本研究計画の承認を得ている)。また、動物を対象とした研究においては、日本女子大学動物倫理委員会の指針に従って実施した。

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。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た。その結果、血中の BAP 活性と血中リン濃度が深く関わっていることが明らかになり、マウス骨芽細胞様細胞である ST2 細胞を用いて、培地中のリン酸濃度が BAP 活性の発現へどのような影響を与えるかについて検討を行った (論文にまとめ、投稿中)。さらに、動物実験を用いて、ビタミンやリン摂取量などの栄養因子と血中 BAP 活性や各組織中の ALP 活性との関連について解析を進めている。

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

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sogabe N., Maruyama R., Baba O., Hosoi T., Goseki-Sone M. Effects of long-term vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* 48, 1036-1042, 2011.

2) Haraikawa M., Sogabe N., Tanabe R., Hosoi T.,

Goseki-Sone M. Vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression. *J. Nutr. Sci Vitaminol.* 57:274-279, 2011

2. 学会発表

1) Goseki-Sone M. et al., Implication of gender Differences in the association between bone-specific alkaline phosphatase activity and serum biochemical parameters or dietary nutrients. アメリカ骨代謝学会 ASBMR 2011 annual meeting, in, (San Diego, California, USA) : M00190 : *J. Bone Miner. Res.* 26: S440, 2011.

2) 五関 - 曾根 正江 他 「若年成人における骨型アルカリホスファターゼ活性と血中骨代謝マーカーおよび栄養因子との関連」第 29 回日本骨代謝学会 P1-29、大阪 2011 年 7 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

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

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
Sugano, H., Matsumoto, T., Miyake, K., Watanabe, A., Iijima, O., Migita, M., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., <u>Shimada, T.</u>	Successful gene therapy <i>in utero</i> for lethal murine hypophosphatasia.	<i>Hum. Gene Ther.</i>		in press	2011
Matsumoto, T., Miyake, K., Yamamoto, S., <u>Orimo, H.</u> , Miyake, N., Odagaki, Y., Adachi, K., Iijima, O., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., <u>Shimada, T.</u>	Rescue of Severe Infantile Hypophosphatasia Mice by AAV Mediated Sustained Expression of Soluble Alkaline Phosphatase.	<i>Hum. Gene Ther.</i>	22	1355-1364	2011
Yamamoto, S., <u>Orimo, H.</u> , Matsumoto, T., Iijima, O., Narisawa, S., Maeda, T., Millán, J., <u>Shimada, T.</u>	Prolonged survival and phenotypic correction of <i>Akp2</i> ^{-/-} hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy.	<i>J. Bone Miner. Res.</i>	26	135-142	2011
Watanabe A, Karasugi T, Sawai H, Banyar Tang Naing, Ikegawa S, <u>Orimo H, Shimada T.</u>	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.	<i>J. Hum. Genet.</i>	56	166-168	2011
Ohata Y, Arabori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, <u>Michigami T.</u> Imura A, Nabeshima YI, Yamazaki Y, <u>Ozono K.</u>	Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood.	<i>J Clin Endocrinol Metab,</i>	96(6)	E943-947	2011

<p><u>Ozono K, Michigami T.</u></p>	<p>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.</p>	<p><i>J Hum Genet</i></p>	<p>56(3)</p>	<p>174-176</p>	<p>2011</p>
<p>Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, <u>Ooshima T, Michigami T</u>, Yoshikawa H, Yoneda T.</p>	<p>Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis.</p>	<p><i>J Biol Chem</i></p>	<p>286(4)</p>	<p>3094-3103</p>	<p>2011</p>

IV. 疾患概要

研究奨励分野 研究対象 疾患概要

【疾患名】	低フォスファターゼ症
【患者数】	100-200人、本邦では15万出生に一人の発症と推定
【概要】	低フォスファターゼ症は骨系統疾患の一つで、組織非特異的アルカリフォスファターゼ(ALP)の欠損が原因である。発症時期および症状の広がりに基づいて、胎内で発病する周産期型、生後半年以内に発病する乳児型、小児期に発病し乳歯の早期脱落を伴う小児型、成人期に発病する成人型、症状が歯に限局する歯限局型の5つの病型に分類される。この他に、周産期発症でも予後良好な病型も存在する。四肢短縮、内反膝、骨折、骨変形、低身長、痙攣、乳歯早期脱落などの症状を呈する。骨X線像では、くる病類似の所見を呈するが、血中ALP活性は低値である。
【原因の解明】	本症は、ALPの活性低下により発症するが、症状とその原因の因果関係には不明な点が多い。たとえば、ALP活性低下により、ビタミンB6の代謝障害が起こり痙攣を引き起こされると考えられているが、不明な点も多い。また、酵素補充療法に向けて北米において治験が始まっているが、対象患者の選定や治療効果の判定等、残された課題も多い。本症の正確な病型分類を行い、個別の治療・管理指針を確立することを目指す。
【主な症状】	四肢短縮、内反膝、骨痛、骨変形、低身長、痙攣、乳歯早期脱落などの症状を呈する。重症例では呼吸障害により致死的である。乳児型ではしばしば高カルシウム血症を伴い、体重増加不良を呈する。骨強度の低下により易骨折性となる。
【主な合併症】	呼吸障害、体重増加不良、骨折
【主な治療法】	確実な治療法はない。対症療法として人工呼吸、低カルシウムミルク、抗痙攣剤(ビタミン6)。先進的実験的治療法として骨髄移植。今後の期待として、リコンビナントALPによる酵素補充療法。
【研究班】	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

V. 診断指針