

201128056B

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22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 大菌恵一

平成24年（2012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「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（平成21-23年度）の3年間の研究成果をまとめたものである。当研究班の主任研究者ならびに分担研究者は以前より、低フォスファターゼ症の診療および研究に携わっていたが、平成21年度より研究奨励分野の研究事業として助成を受けることとなり、その支援のもとに共同研究組織として本症の臨床、研究を推進し、大きな成果をあげることができた。

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り、従来、発症時期及び重症度から周産期（致死）型・乳児型・小児型・成人型・歯牙限局型の5病型に分類されてきた。しかしながら、非典型的な臨床像を呈して確定診断に至っていない症例も少なくないと考えられる。こうした背景から、まず、本研究班の最初の研究活動として、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。また、蓄積された症例の遺伝子変異と臨床像との相関についての解析を行い、日本人特有の遺伝子変異に伴う臨床像を明確にした。すなわち、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、一方、c.1559delT変異を両方のアレルに有する症例は周産期に致死的な経過をとる重症型を呈することである。当研究班では前者を周産期発症予後良好型（新生児良性型）と呼んで従来の病型と区別することを提唱してきたが、本病型の存在が国際的にも認知されるに至った。本病型の存在は、遺伝カウンセリングの際や新規治療の対象症例を選択する上で念頭に置かれるべきであり、本症の治療管理方針に大きく関わる重要な成果である。また、調査の結果、重症型であっても呼吸管理下で長期生存している症例が複数存在することも把握された。このことは従来の「致死型」という認識を再考すべき時期が来ている事を示しており、今後、本症の治療管理指針を策定する上で考慮されるべき点である。歯科を対象としたアンケート調査からは、乳歯早期脱落を呈する症例においてQOL上の問題が大きく、早期の治療介

入が必要であることが認識された。また、本研究班の重要な成果として、次世代治療法の開発についての成果があげられる。本症のモデルマウスに対する遺伝子治療においては良好な効果が得られており、今後、臨床応用をめざしていきたいと考えている。

平成 23 年に行われた日本骨代謝学会においては、本症の世界的な研究者で北米での酵素補充療法の責任者でもある 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く機会を設けた。改めて、本症の研究及び治療の進展に対する患者さんご家族の強い期待を痛感した。

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ます。今年度をもって本班研究は終了となりますが、低フォスファターゼ症をはじめとする骨系統疾患に対する診療の向上に貢献できるよう、いっそうの努力をしていく所存です。

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	-----11
2. 分担研究者	折茂英生	-----18
3. 分担研究者	織田公光	-----22
4. 分担研究者	大嶋隆	-----27
5. 分担研究者	道上敏美	-----30
6. 分担研究者	五関正江	-----35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----37
IV. 診断概要		-----40
V. アンケート依頼書 (医学部)		-----41
アンケート依頼書 (歯学部)		-----46
VI. 業績		-----51
VII. 業績別刷		-----55

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

小児科医・産科医にアンケート調査を行い、合計33名の患者に関する回答を得た。胎児期発症した例が15名と約半数を占めた。従来の致死型に相当する重度の骨変形・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た。全国28歯科大学および歯学部小児歯科に対する調査で本症の16名が登録された。本症の診断指針を策定し、ホームページ・総説・学会等において普及に努めた。本症の遺伝子検査の依頼件数が増えた。健常と思われる集団で、最も頻度の高い本症の責任変異である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。c.1559delTのホモ接合体の割合は本症の17%であるので、本症は150000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。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。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論文においても認知された。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。

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し、時間的な空白をなくす努力を行う。

B. 研究方法

1. 診断基準の策定とその普及、疫学調査

主として過去に本症の遺伝子検査の依頼のあった施設を中心に本症に関するアンケート調査を行った。その結果をふまえ、早い段階で本症の診断基準を策定し、その普及を図る。遺伝子変異の頻度を調べ、本症の患者数の推定を行った。

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。

2. 遺伝子型-表現型の相関の検討

TNSALP 遺伝子診断を直接シーケンス法で行う手技には習熟しており、迅速、かつ確実な診断ができる。また、変異型ALPの多面的な機能解析を行った。従来、個人情報保護の観点から、遺伝情報のみを管理しているが、本研究では倫理委員会に申請後、遺伝カウンセリング資格を持つ適切な個人情報管理者をおき、匿名化の上臨床情報との相関性を検討した。特に、重症型である周産期型、乳児型数の把握を行い、予後調査を行った。これらの事により、臨床病型の確定と治療・管理の現状を把握し、より適切な本症の治療・管理ガイドラインの策定を行った。

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した。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。

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の測定を行った。Pyrophosphateの測定は臨床検査レベルでは行われないので、本研究班において測定法を確立するよう努力した。

5. 次世代治療法の開発

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。レンチウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターはいずれもAddgeneより得た。まず293FT細胞へpLenti6-mS1c7a1を遺伝子導入し、その上清中のレンチウイルスを感染させることでヒト皮膚線維芽細胞へのマウスエクトロピックウイルスレセプターの発現を行った。効率の良い方法を確立するまで、もとのヒトの細胞には、現時点では低フォスファターゼ症の患者検体を用いない。

TNALPの発現ベクターを構築し、本症モデルマウスに投与してその効果を判定する(方法の詳細は島田の報告書に記載)。

C. 研究結果

1. 診断基準の策定とその普及、疫学調査

以前、遺伝子検査の依頼のあった、小児科医・産科医にアンケート調査を行い(資料参照)、合計33名の患者に関する回答があった。胎

児期発症した例が15名と約半数を占めた。論文発表した周産期発症良性型以外に、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た（業績4）。また、遺伝子診断を行えること、患者会が設立されていること等を広報した。この間、遺伝子検査の依頼例が10名以上あり、以前の症例を含めると検討例は40例となった。21年度、低フォスファターゼ症の診断指針（表. 9 ページに記載）を作成し、引き続き2年間でその検証と普及を行った。当班研究のホームページを構築し(<http://www.bone.med.osaka-u.ac.jp/>)、その中で診断基準を公開した。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>)ともリンクさせた。同診断指針は、本症の最新の日本語の総説（業績8,9）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15）。

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、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。

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の頻度でみられ、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、150000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15）。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-表現型の相関の検討

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。私達が提唱した周産期発症良性型の存在は国際的にも認知された（図. 10 ページに記載）。

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周産期発症良性型の存在が明確となった。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。

酵素活性をほぼ完全に消失している c. 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 c. 1559delT が同定された。c. 1559delT 変異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。

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。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

全国 28 歯科大学および歯学部小児歯科に対する調査で本症の 16 名が登録された。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-0ct4/ -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。臍帯・胎盤・羊膜組織からの人工多能性幹細胞をもちいた中枢神経系の発達過程の解析など iPS 研究については倫理委員会の承認を得ているが、本症を直接扱うときには、その研究に関する倫理委員会申請を行う予定である。

TNSALP ノックアウトマウスに TNALP-D10 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。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。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。

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、引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られる。

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。

胎児期からの遺伝子治療の可能性が、モデル動物を用いて示された。今後、酵素補充療法との併用も想定され、あらたな治療選択肢を示した。

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。

本研究の総括として、策定した診断指針に基づき、遺伝子解析による病型診断・予後予測も含めて正確な診断をサポートすることは、本症の管理上有用であり、本班研究終了後も継続して提供していく必要があると考える。その中で、従来、致死型として分類され、救命の適応外あるいは人工中絶の対象とされていた症例についても、治療により長期生存が可能になりつつある現状を、産科医・新生児科医・小児科医等に広く啓蒙し、並行して治療についても進歩を促進する必要がある。

E. 結論

1. 低フォスファターゼ症の診断指針を策定し、研究班ホームページや総説を活用して普及に

努めることにより、本症の認知度を上昇させ、確定診断に貢献した。

2. 本症のアンケート調査を実施し、呼吸管理例や乳歯早期脱落例の実態把握を行った。
3. 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。
4. 周産期発症予後良好型が国際的に認知されるに至り、本症の病型分類の改変に寄与した。
5. 本症のモデル動物で、胎児期の遺伝子治療の有効性を示した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyoshi Y, Oue T, Oowari M, Soh H, Tachibana M, Kimura S, Kiyohara Y, Yamada H, Bessyo K, Mushiake S, Homma K, Hasegawa T, Sasano H, Ozono K. A case of pediatric virilizing adrenocortical tumor resulting in hypothalamic-pituitary activation and central Precocious Puberty Following Surgical removal. *Endocr J*. 2009, 56(8):975-982
- 2) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab*. 2009, 27(3):265-271 review.
- 3) Miyauchi Y, Sakaguchi N, Okada T, Makishima M, 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

4) 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

5) 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*. 2010, 91(2):331-332

6) 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 α -Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 398(3):513-518

7) 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*. 2010, 47(5):938-947

8) 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.

- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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 malignancy (HHM) with leukocytosis caused by cutaneous squamous cell carcinoma resulting from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Clin Pediatr Endocrinol. 2011, 20(3), 65-71
- 13) 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 imperfect. J Bone Miner Metab. 2011, 29(5):598-605
- 14) 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
- 15) 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, 56(3)174-176 (Commentary)
- 16) 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
- 17) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. J Biol Chem, 2011, 286(40) 35283-35290
- 18) 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.
- 19) 大藪恵一. 小児とビタミン D. THE BONE, 2011, 25(3):105-110.

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，大藪恵二。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（出願中）

発明の名称「低フォスファターゼ症の遺伝子変異スクリーニング方法」

発明者 渡邊 淳、島田 隆、折茂英生、

特許出願人 学校法人 日本医科大学

出願番号 特願 2009-200612 号

出願日 2009年8月31日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 当初の研究計画どおりにほぼ順調に研究を行った。

低フォスファターゼ症の診断指針

主症状

1. 骨石灰化障害

骨単純 X 線所見として骨の低石灰化、長管骨の変形、くる病様の骨幹端不整像

2. 乳歯の早期脱落(4歳未満の脱落)

主検査所見

1. 血清アルカリフォスファターゼ(ALP)値が低い(年齢別の正常値に注意)

参考症状

1. ビタミン B6依存性けいれん

2. 四肢短縮、変形

参考検査所見

1. 尿中フォスフォエタノールアミンの上昇(尿中アミノ酸分析の項目にあり)

2. 血清ピロリン酸値の上昇

3. 乳児における高カルシウム血症

遺伝子検査

1. 確定診断、病型診断のために組織非特異的 ALP (*TNSALP*)遺伝子検査を行う事が望ましい

参考所見

1. 家族歴

2. 両親の血清 ALP 値の低下

診断基準

主症状一つ以上と血清 ALP 値低値があれば遺伝子検査を行う。参考症状、参考検査所見、参考所見があれば、より確実である。

症例の御相談、遺伝子検査の御依頼、血清ピロリン酸測定の御依頼は、厚生労働省難治疾患克服事業「低フォスファターゼ症」研究班事務局(hypophos@ped.med.osaka-u.ac.jp)までお問い合わせください。

Hypophosphatasia: Nonlethal Disease Despite Skeletal Presentation In Utero (17 New Cases and Literature Review)

Deborah Wenkert,¹ William H McAlister,² Stephen P Coburn,³ Janice A Zerega,¹ Lawrence M Ryan,⁴ Karen L Ericson,³ Joseph H Hersh,⁵ Steven Mumm,^{1,6} and Michael P Whyte^{1,6}

¹Center for Metabolic Bone Disease and Molecular Research, Shriners Hospital for Children, St Louis, MO, USA

²Mallinckrodt Institute of Radiology, Washington University School of Medicine at St Louis Children's Hospital, St Louis, MO, USA

³Vitamin B₆ Laboratory, Department of Chemistry, Indiana University–Purdue University, Fort Wayne, IN, USA

⁴Department of Rheumatology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

⁵Department of Pediatrics, Weisskopf Child Evaluation Center, University of Louisville, Louisville, KY, USA

⁶Division of Bone and Mineral Diseases, Washington University School of Medicine at Barnes-Jewish Hospital, St Louis, MO, USA

ABSTRACT

Hypophosphatasia (HPP) is caused by deactivating mutation(s) within the gene that encodes the tissue-nonspecific isoenzyme of alkaline phosphatase (*TNSALP*). Patients manifest rickets or osteomalacia and dental disease ranging from absence of skeletal mineralization in utero to only loss of adult dentition. Until recently, HPP skeletal disease in utero was thought to always predict a lethal outcome. However, several reports beginning in 1999 emphasized a benign prenatal form of HPP (BP-HPP) where skeletal disease detected in utero had a mild postnatal course. Here we describe prenatal and postnatal findings of 17 additional BP-HPP patients among our 178 pediatric HPP patients. Their findings are compared with those of their siblings with HPP, carrier parents, and others with identical *TNSALP* mutations. New information concerning 7 previously published BP-HPP patients accompanies a review of the HPP literature. Among our 17 BP-HPP patients, prenatal ultrasound showed normal chest or abdominal circumferences where recorded. Sometimes, poor skeletal mineralization, fetal crowding, and third-trimester improvement were observed. Postnatally, extremity bowing further improved (13 patients). BP-HPP severity postnatally spanned the “infantile” to “odonto” HPP phenotypes, resembling our patients who harbored identical *TNSALP* mutation(s). Eight had autosomal dominant (AD) and 9 had autosomal recessive (AR) BP-HPP. Fourteen of our 15 mothers were HPP carriers or affected. Of the 41 cumulative BP-HPP patients (24 literature cases meriting a BP-HPP diagnosis since 1996 plus our 17 patients), 63% had AR BP-HPP. Maternally transmitted HPP involved 11 of the 13 total AD BP-HPP probands ($p = 0.01$), supporting a maternal in utero effect on the baby. Fetal crowding, normal fetal mineralization and chest size, and *TNSALP* heterozygosity seem to identify BP-HPP. However, bowed fetal long bones with AR HPP, specific *TNSALP* mutations, or poor skeletal mineralization before the third trimester do not reliably diagnose HPP lethality. © 2011 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: ALKALINE PHOSPHATASE; METABOLIC BONE DISEASE; RICKETS; PRENATAL DIAGNOSIS; SKELETAL DYSPLASIA

Introduction

Hypophosphatasia (HPP), a heritable metabolic bone disease,⁽¹⁾ is caused by deactivating mutation(s) within the gene that encodes the tissue-nonspecific isoenzyme of alkaline phosphatase (*TNSALP*).⁽²⁾ Consequently, inorganic pyrophosphate (PP_i), a *TNSALP* substrate and inhibitor of mineralization, accumulates extracellularly, causing rickets or osteomalacia.⁽²⁾

Patients have been classified traditionally as having perinatal, infantile, childhood, or adult HPP based on their age at HPP presentation and diagnosis.^(1,2) Those with dental manifestations but no apparent skeletal disease are said to have odonto-HPP.⁽¹⁾ Autosomal recessive (AR) and autosomal dominant (AD) inheritance partly explain the remarkable range of HPP severity.^(1,2) Perinatal HPP and nearly all cases of infantile HPP are inherited as an AR trait, whereas each of the more mild forms

Received in original form December 17, 2010; revised form May 3, 2011; accepted June 20, 2011. Published online June 28, 2011.

Address correspondence to: Michael P Whyte, MD, Shriners Hospital for Children, 2001 South Lindbergh Boulevard, St Louis, MO 63131-3597, USA.

E-mail: mwhyte@shrinenet.org

This article was presented in part at the 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Nashville, TN, September 23–27, 2005. Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 26, No. 10, October 2011, pp 2389–2398

DOI: 10.1002/jbmr.454

© 2011 American Society for Bone and Mineral Research

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）

平成 21-23 年度総合研究報告書

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

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

TNALP（組織非特異型アルカリフォスファターゼ）欠損症である低フォスファターゼ症(HPP)に対する遺伝子治療法の開発を行った。TNALP ノックアウトマウス(HPP マウス)は出生後、成長障害、骨化遅延、痙攣を繰り返し約 2 週間で死亡する。重篤な乳児型 HPP の動物モデルと考えられている。HPP マウスの遺伝子治療法として、レンチウイルスベクター、或いはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの有用性を検討すると共に、発現タンパク質としては野生型 TNALP、可溶性 TNALP、骨親和性 TNALP の治療効果の比較検討を行った。又、胎児期遺伝子治療の可能性についても検討した。その結果、ウイルスベクターを新生児期に一回投与することで、血中の ALP 活性は高値を維持し、痙攣は抑制され、著明な延命効果を認めた。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。野生型 TNALP が細胞膜から遊離して生成される可溶性 TNALP に酸性アミノ酸を付加した骨親和性 TNALP が最も治療効果が高かったが、可溶性 TNALP そのものでも明らかな有効性が認められた。更に、妊娠 15 日目の胎児へのベクターの投与によっても、出生後の症状の改善と延命効果が確認された。これらの結果はウイルスベクターの一回投与により HPP の長期の治療効果を達成できることを示したもので、世界で最初に HPP の遺伝子治療に成功した重要な研究成果である。遺伝子治療は、重篤な周産期型 HPP や乳児型 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

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た。

HPP マウスの遺伝子治療法として、レンチウイルスベクター、或いはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの有用性を検討すると共に、発現タンパク質としては野生型 TNALP、可溶性 TNALP、骨親和性 TNALP の治療効果の比較検討を行った。又、胎児期遺伝子治療の可能性についても検討した。

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。

レンチウイルスベクター

(SIN-HIV-TNALP-D10) はベクタープラスミド及びパッケージングプラスミドを 293T 細胞へトランスフェクションして作製し、陰イオン交換 Q カラム、及びショ糖密度遠心法により精製、濃縮した。AAV ベクターはベクタープラスミド、パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミドのトリプルトランス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。

新生児遺伝子治療としては、出生直後の HPP マウス (1-2 日齢) の経静脈からウイルスベクターを投与し、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。

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

(1) レンチウイルスベクターを使った新生児遺伝子治療：未治療の HPP マウス (TNALP^{-/-}) は出生後、体重が増加せず痙攣を繰り返すようになり平均 18 日で死亡した。一方、レンチウイルスベクター (SIN-HIV-TNALP-D10) を投与した HPP マウスは野生型 (WT) マウス (TNALP^{+/+}) やヘテロマウス (TNALP^{+/-}) とほぼ同じ体重増加を示し、外見や運動機能でも差を認めなかった。痙攣は完全に抑制され、寿命は少

なくとも 10 ヶ月以上延長した。

出生後 10 日での血中 ALP 濃度は WT マウスでは 0.25 ± 0.07 U/ml、HPP マウスでは 0.1 U/ml 以下であった。一方、遺伝子治療を受けた HPP マウスでは 2.67 U/ml と極めて高い血中濃度であった。qPCR によりベクターの臓器分布を調べたところ肝臓で最も高率に発現していることが示された。

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。骨組織の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、遺伝子治療後のマウス骨梁周囲に ALP 活性が認められた。

(2) AAV ベクターによる新生児遺伝子治療：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。

(3) 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。

(4) 胎児遺伝子治療：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。