

#### D. 考察

HPP マウスの主要な死因は痙攣重積による呼吸不全であると考えられている。これは ALP の重要な基質である PLP (pyridoxal phosphate) の分解ができなため、神経細胞内での神経伝達物質の代謝障害が起きるためと考えられている。ビタミン B6 の投与で痙攣を部分的に抑制できることが報告されているが、遺伝子治療による TNALP の持続的酵素補充により痙攣は完全に抑制され、延命効果が得られることが明らかになった。

ヒトでも重症例で痙攣が認められるケースがあるが、HPP の主要な症状は骨化不全である。これまでヒトで試みられた可溶性 ALP を使った酵素補充療法は効果がなかった。その主な理由は、投与された ALP の量が不十分で、実際に機能すべき骨組織で十分な活性がなかったためと考えられている。酸性アミノ酸を付加した TNALP が骨組織に親和性をもつことが *in vitro* 及び *in vivo* の実験で報告されている。我々の遺伝子治療の実験からも TNALP-D10 の骨組織親和性は明らかである。TNALP-D10 を使った酵素補充療法や遺伝子治療は HPP の骨症状の有効な治療法として期待される。現在、骨親和性 TNALP を使った酵素補充療法の治験が開始されている。

我々の遺伝子治療研究により明らかになった重要な点は、TNALP-D10 だけでなく可溶性の TNALP-F の発現によっても HPP マウスに対する治療効果が得られた点である。野生型 TNALP は GPI アンカーにより細胞膜表面に結合しているが、一部が切断

され可溶性 TNALP として血中に放出されている。遺伝子治療により持続的に高値の ALP 活性を血中で持続できれば、自然界には存在しない TNALP-D10 を使わなくとも、可溶性 TNALP で十分治療できることが示された。今後、TNALP-D10 と TNALP-F の至適治療濃度の検討を進めていきたい。

更に注目すべき点として、AAV ベクターを使った胎児期遺伝子治療により、軟骨細胞への遺伝子導入が確認できたことである。新生児期もしくは成体へのベクター全身投与による遺伝子治療実験では、体内で生成した酵素が血流により骨・軟骨へ移動し作用することが示されているが、ベクター自身の軟骨細胞への導入は確認できていない。胎児期遺伝子治療で軟骨細胞への遺伝子導入が可能となった理由として、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。今後は、低フォスファターゼのみならず、他の遺伝性・全身性骨系統疾患に対する治療のひとつの選択肢となりうる可能性が考えられる。

様々なウイルスベクターが開発されているが、長期発現が可能で *in vivo* 投与できるベクターとしてはレンチウイルスベクターと AAV ベクターが有力候補となっている。レンチウイルスベクターは染色体に組み込まれるため長期に安定した発現が期待できるが、挿入変異による発癌性が危惧されている。一方、AAV ベクターは病原性がなく非分裂組織での長期発現が可能のため、多くの遺伝子治療プロトコル

で使われている。両ベクター共に、マウスの治療実験では有用性が示されたが、レンチウイルスベクターのヒトへの全身投与は行われていない。ヒトでの治療を考えた場合、AAVベクターによる遺伝子治療は非常に実現性の高い方法であると考えられる。

#### E. 結論

重篤な乳児型低フォスファターゼ症(HPP)のモデルと考えられている TNALP (組織非特異型アルカリフォスファターゼ)ノックアウトマウスに対する、ウイルスベクターを使った遺伝子治療の有用性を示した。又、現在治療が行われている骨親和性 TNALP-D10 だけでなく可溶性 TNALP でも HPP マウスに対する治療効果があることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Iijima, O., Narisawa, S., Maeda, T., Millán, J., Shimada, T.

(2011) Prolonged survival and phenotypic correction of *Akp2*<sup>-/-</sup> hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. J. Bone Miner. Res. 26:135-142

4) 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

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 the American Society of Gene & Cell Therapy. 2011. May 18-21 Seattle, WA

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) Watanabe A, Naing BT, Sawai H, Karasugi T, Kondo H, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T. Genotype frequency of 1559T deletion (1559delT) in the TNSALP gene and clinical significance of

hypophosphatasia in Japan. 2010 ACMG Annual Clinical Genetics Meeting. 2010. 3. Albuquerque, NM 112)

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

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

11) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, JL., Shimada, T. Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 第8回ALPS meeting、2009. 7 新潟

12) 松本多絵、山本晴子、三宅弘一、三宅紀子、小田垣祐子、折茂英生、島田隆: AAV ベクターによる低ホスファターゼ症の遺伝子治療. 第54回人類遺伝学会、2009、9、東京

13) 渡邊淳、澤井英明、近藤仁美、Than Naing Banyar、菅野華子、唐杉樹、池川志郎、折茂英生、島田隆: 周産期型定フォスファターゼ症の課題—変異スクリーニング法の開発と TNSALP1559Tdel 保因者頻度の同定. 第54回人類遺伝学会、2009、9、東京

14) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millan, JL., S

himada, T. Long term phenotypic correction of severe infantile hypophosphatasia in a mouse model by neonatal injection of lentiviral vector. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2009. 5. San Diego

1 5) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millan, JL., Shimada, T. Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 11<sup>th</sup> International Congress of Inborn Error of Metabolism. 2009. 9. San Diego

1 6) Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Shimada, T. Adeno-associated virus (AAV) type-8 mediated systemic neonatal gene therapy for Hypophosphatasia. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2009. 10. Honolulu

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）

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 折茂 英生 日本医科大学大学院（医学研究科医科生物化学分野） 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* 石灰化アッセイ法とアルカリフォスファターゼの自然基質のうちピロリン酸の定量法の確立を試みた。石灰化アッセイでは、活性が野生型の 35%以上では *in vitro* での石灰化を認め、*in vivo* 表現型との相関を認めた。この方法を日本人に多い p.F327del 変異に応用したところ、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。また、non RI 法によるピロリン酸定量法を確立し、ノックアウトマウスでの高値を確認した。

#### 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ため、*in vitro* 石灰化アッセイと、アルカリフォスファターゼ (ALP) の自然基質の非 RI 定量法を確立する。

#### B. 研究方法

①石灰化アッセイ：変異 ALP 発現プラスミドを、ALP をほとんど発現しない骨芽細胞様細胞株 U<sub>2</sub>OS 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。

②ALP の自然基質のうちピロリン酸 (PPi) を、UDP-glucose pyrophosphorylase 法により生成する NADPH を蛍光測定することにより実験室レベルで測定する。

(倫理面への配慮) 動物実験は日本医科大学実験動物管理室において日本医科大学動物実験規定を遵守して行った。

#### C. 研究結果

①石灰化アッセイ：既に解析され、報告されている変異 5 種類と多型 2 種類について解析すると、活性が野生型の 35%以上では *in vitro* での石灰化が認められ、*in vivo* の症状と相関していた。さらに、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 変異について検討した。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  $3.1 \pm 0.9$  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  $3.2 \pm 0.7$  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 (図 1)。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。

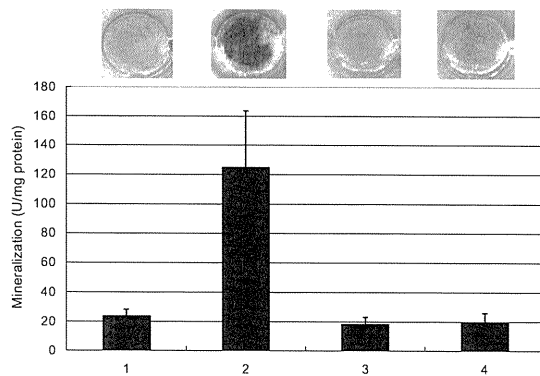


図1. in vitro 石灰化アッセイ

1: mock、2: 野生型、3: c1559delT、4: p.F327del。上段は代表的な Alizarin Red S 染色像を示す。下段のグラフは可溶化後の吸光度測定による石灰化の程度を表示した。

②野生型 ( $Akp2^{+/+}$ ) およびノックアウトマウス ( $Akp2^{-/-}$ ) の血清 PPi を定量し、ノックアウトマウスでの高値を認めた。またこれらのマウスに ALP 発現レンチウイルスベクターを生後 1~3 日に投与した場合、ノックアウトマウスへの投与では PPi 値が減少していた (表 1)。

表1. マウスの血清ピロリン酸濃度

野生型 (8-17 週 ; n = 4)	18.4 ± 2.5
▪ M	
$Akp2^{-/-}$ (8-17 週 ; n = 3)	23.5 ± 2.0
▪ M	
野生型 + ALP 発現ベクター*	18.2 ± 3.3
▪ M	
$Akp2^{-/-}$ + ALP 発現ベクター	*
19.7 ± 1.5	▪ M

\*ALP 発現ウイルスベクター導入マウスは 14 週にて測定した (野生型 n = 2、 $Akp2^{-/-}$  n = 4)。

#### D. 考察

①活性と in vitro 石灰化の関連性が認められたことは、遺伝子型から表現型の予測の可能性を示唆したものであり、in vitro 石灰化アッセイが質的診断に資することができることが示された。

②非 RI 法による PPi の測定は、一般の測定室にて短時間で行える利点がある。治療を行ったノックアウトマウスで PPi 値の減少を認めたことは、治療効果の判定に使用できることを示した。今後はヒトにおける有効性の検証が必要となる。

#### E. 結論

予後と治療効果判定のために、新規に開発した in vitro 石灰化アッセイ法を新規変異に応用し、有用性を証明した。また ALP 基質であるピロリン酸の非 RI 法による定量法を開発し、マウス血清の測定に応用できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### a. 原著

- 1) Hager, S., Lampert, F. M., Orimo, H., Stark, G. B., Finkenzeller, G.: Up-regulation of alkaline phosphatase expression in human primary osteoblasts by cocultivation with primary endothelial cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mRNA stabilization. *Tissue Eng.* 15: 3437-3447 (2009).
- 2) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Iijima, O., Narisawa, S., Maeda, T., Millán, J.L., Shimada, T.: Prolong

ed survival and phenotypic correction of *Akp2*<sup>-/-</sup> hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. *J. Bone Miner. Res.*, 26:135-142 (2011).

3) 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).

4) 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).

#### b. 総説

5) Orimo, H.: The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* 77: 4-12, 2010.

#### 2. 学会発表

1) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J.L., Shimada, T.: Long term phenotypic correction of severe infantile hypophosphatasia in a mouse model by neonatal injection of lentiviral vector. 12th Annual M

eting of the American Society of Gene Therapy, 2009.5. (San Diego, CA).

2) Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Orimo, H., Shimada, T.: Adeno-associated virus (AAV) type-8 mediated systemic neonatal gene therapy for hypophosphatasia. 第15回日本遺伝子治療学会、2009.7.

3) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J. L., Shimada, T.: Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 第8回ALPS研究会、2009.7.

4) Watanabe, A., Orimo, H., Shimada, T.: Genotype frequency and clinical significance of 1559T deletion in the *TN-SALP* gene in Japan. 第8回ALPS研究会、2009.7.

5) Yamamoto, S., Orimo, H., Matsumoto, T., Narisawa, S., Millán, J.L., Shimada, T.: Lentivirus mediated neonatal gene therapy for severe infantile hypophosphatasia. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2009. 8. (San Diego, CA).

6) 折茂英生:硬い組織はどうしてできるのか?—石灰化のメカニズムとアルカリホスファターゼ. 第77回日本医科大学医学会総会、2009.9.

7) 松本多絵、山本晴子、三宅弘一、三宅紀子、小田垣祐子、折茂英生、島田 隆:AAVベクターによる低ホスファターゼ血症の遺伝子治療. 第54回日本人類遺伝学会大会、2009.9.

8) 渡邊 淳、澤井英明、近藤仁美、Banya

r Than Naing、菅野華子、唐杉 樹、池川志郎、折茂英生、島田 隆：周産期型低フォスファターゼ症の課題 —変異スクリーニング法の開発と TNSALP 1559T del 保因者頻度の同定—。第 54 回日本人類遺伝学会大会、2009.9.

9) Matsumoto, T., Yamamoto, S., Miyake, K., Miyake, N., Odagaki, Y., Orimo, H., Shimada, T.: Adeno-associated virus (AAV) type8 mediated systemic neonatal gene therapy for hypophosphatasia.

59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2009.10. (Honolulu, Hawaii).

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

11) 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).

12) 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 155

9delT 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.

13) Orimo, H., Kiyama, A., Matsumura, T.: Characteristics of a deletion of Phe327 (p.F327del) in tissue-nonspecific alkaline phosphatase from a hypophosphatasia patient. 第 9 回 ALPS 研究会、2011.7.

14) 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.

15) 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.

16) 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フォ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. 知的所有権の取得状況

##### 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

なし



## 研究要旨

発症メカニズムの解明を目的として低フォスファターゼ症患者で報告されたミスセンス突然変異の影響を分子レベルで解析した：軽症例の TNSALP (A99T) および TNSALP (P91L) と重症例 TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472S)

TNSALP のトランスジェニックマウスの作出と解析

### 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骨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方法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ている。本研究では、優性遺伝する事が知られている軽症型の患者で報告された TNSALP (A99T) と歯限局型患者で報告された TNSALP (P91L)、さらに周産期型患者で報告された 2 つのミスセンス変異の検討を行った。TNSALP (C184Y) と TNSALP (C472S) の解析を行なった。なおアミノ酸の番号は成熟タンパク質の N 末端アミノ酸を +1 とする非標

準命名法による。また、*in vivo* での TNSALP の役割を確かめる目的で野生型酵素のトランスジェニックマウス (Tg) 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鑄型にして部位特異的突然変異法を用いて点突然変異を導入し、変異の導入を確認するために全翻訳領域に対応する塩基配列を確認した。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、必要に応じて Tet-On CHO K1 細胞を樹立してより詳細な解析を行った。実施した主な分析法は、酵素活性測定、細胞の酵素活性染色、蛍光抗体法、ウェスタンブロッティング、ショ糖密度勾配遠心法、酵素消化による細胞表面の処理などである。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 (A99T 別名称 A116T)

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

分子的に説明するものである。

#### 2. TNSALP (P91L、別名称 P108L)

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

#### 3. 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、一過性の発現系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ということがわかった。特異的な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。野生型の 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分解が強く阻害されること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。

4. トランスジェニック (Tg) マウスの解析  
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 (A99T) と TNSALP (P91L)  
優性遺伝する低フォスファターゼ症に関しては、一般の変異酵素は野生型とヘテロ 2 量体を形成する結果野生型酵素の活性を抑制すると単純に考えられていたが、TNSALP (A116T) は高分子量の凝集物を形成し、しか

も野生型酵素のサブユニットの一部はその中に捕捉されており、当初の予測よりの複雑であった。TNSALP (A116T)の細胞生物学的な解析により、優性遺伝する低フォスファターゼ症の発症機序の一端が明らかになった。一方、TNSALP (P91L)はこれまでの解析から TNSALP (A99T)と非常に類似した性質を示すことがわかっているがさらに詳しい検討が必要である。

2. 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篤であると推測される。

3. 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

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

2. 学会発表

1. 金城奈津子、大島邦子、織田公光、早崎治朗：歯限局型低フォスファターゼ症で報告された変異型組織非特異型アルカリフォスファターゼの解析。平成 22 年度日本小児歯科学会秋期大会抄録（郡山）小児歯科誌 48 (5) 57、2010

2. 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）

3. 長谷川智香、織田公光、佐々木宗、田幡千尋、柳 鏗晟、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 0-044 平成 23 年 7 月 29  
日

4. 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  
P1-49 平成 23 年 7 月 28 日

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）

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

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として乳歯の早期脱落を挙げる事が出来る。この現象は、歯と歯槽骨を結合させる線維の歯根側結合部であるセメント質の形成不全と、萌出した乳歯にかかる多大な咬合圧によってもたらされると考えられる。同じことが永久歯でも起こる事が考えられ、保護者にとっては、永久歯の早期脱落は最も必要な関心事となっている。その例は極めて少ないものの、永久歯早期脱落の可能性について、明確に説明できる根拠は未だ示されていない。この研究の目的は、低フォスファターゼ症患者における歯科的治療指針を確立することである。

B. 研究方法

1. 全国 28 歯科大学および歯学部小児歯科に対して、低フォスファターゼ症患者の有無、その病態、早期脱落乳歯の有無、その脱落時期、早期脱落永久歯の有

無とその時期について問い合わせる。

2. 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。

3. 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、エックス線学的、および免疫組織学的に診査し、野生株と比較する。

C. 研究結果

1. 全国の 20 の小児歯科から回答があり、そのうち 6 大学で 9 名の患者の報告を得た。大阪大学においては 7 名の患者を診ており、全国の大学病院小児歯科においては、16 名が登録された。そのすべての患者において、永久歯の早期脱落は認められなかった。文献的に永久歯の早期脱落を報告した症例では、乳臼歯の早期脱落が認められている。このことは、永久歯萌出時期に口腔内の存在する乳歯の数が少なく、乳歯の早期脱落の場合と

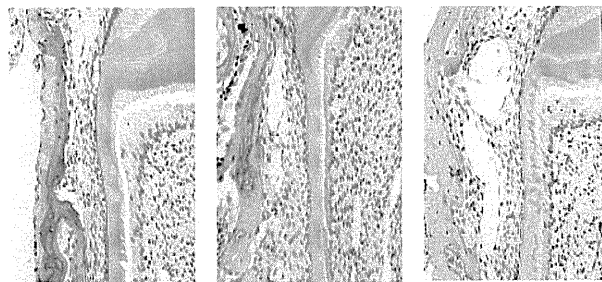
同じように、萌出する永久歯に過剰な咬合圧がかかっていた可能性が高いと考えられた。

2. 当科で定期診査中の患者においては、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。

3. 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。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。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



永久歯の早期脱落を予防するためには、萌出する永久歯に対する咬合圧を軽減するために小児義歯の装着が薦められた。

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

『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.

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



## 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、周産期発症型は致死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。現在、低フォスファターゼ症については、北米で酵素補充療法の治験が行われているのをはじめとして、新規治療法が開発されつつあるが、前述のように重症度に幅があることから、分子診断にもとづく正確な病型分類及び予後判定が極めて重要であると考えられる。こうした状況から、本研究班においては、さらに本症の症例を蓄積し、詳細な遺伝子型-表現型解析を行った。その結果、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ことが明確となった。F310L を有する症例においては、特徴的な下肢の彎曲を呈するが、骨石灰化障害を殆ど認めないため、しばしば確定診断が遅れる症例が少なくなく、また、骨変形が自然に軽快する症例も存在していた。また、これまで、乳児期早期に致死的な経過をとるとされてきた c.1559delT ホモ接合体症例において、積極的な呼吸管理などにより、骨症状の改善、より長期の生存が期待できることを示した。これらの結果から、ALP の要求性には年齢依存性があり、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ことが示唆された。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た。さらに、今回の実態調査の結果を踏まえて低フォスファターゼ症診断のためのガイドラインを策定し、研究班ホームページ上で公開したところ、これまで見逃されることの多かった周産期発症予後良好型の症例に関するコンサルテーションの件数が増加し、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、本ガイドライン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、周産期発症型は致死

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 c.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。

さらに、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。

(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

### 1. 低フォスファターゼ症日本人症例の遺伝

### 子型と臨床像

1996 年から 2010 年に当研究室で *TNSALP* 遺伝子解析を行った日本人症例 40 例について、遺伝子型と臨床像との相関性に関して検討した。検討した 40 例、80 アレルのうち、c.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-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 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 変異はすべての病型で検出されたが、本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。ただし、本変異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、最近で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-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 c.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。

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  $12.8 \pm 11.3$  IU/L であるのに対して、周産期良性型では  $120.5 \pm 78.6$  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ので、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  $88.0 \pm 77.0$  IU/L、小児型では  $99.7 \pm 58.3$  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 c.1559delT/L282P、c.1559delT/K207E、c.1559delT/Y419C、K207E/G409C、F310del/ であった。そのうち、c.1559delT/L282P 及び c.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、c.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 c.1559delT/E218V、c.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。

## 2. F310L 変異を有する症例の特徴的な臨床像

本研究において症例を蓄積していく中で、日本人で 2 番目に頻度の高い変異である F310L を有する症例が追加され、特徴的な臨床像が明確化された。



図1 F310L 変異を有する症例の X 線像

F310L 変異を有する症例は、いずれも図 1 に示すものとほぼ同様の X 線像を示し、骨石灰化障害を殆ど認めなかったが、周産期より下肢の特徴的な彎曲を示した。骨石灰化障害が存在しないために低フォスファターゼ症の確定診断までに時間を要し、原因不明の先天性四肢短縮症などとして経過観察されていることが少なくなかった。生命予後は良好であり、骨変形も自然に軽快する傾向があったが、骨変形軽快例でも明らかな低身長が認められ、低身長が本症の重要な臨床所見であることが明らかとなった。

このような F310L 変異症例の臨床像を考慮して低フォスファターゼ症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で公開するとともに、遺伝子解析に関する相談窓口を開設したところ、その後の 2011 年に新たに遺伝子解析を行った日本人症例 6 例中の 3 例が F310L 変異症例であった。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、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た。

## D. 考察

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現在北米で治験が行われている酵素補充療法などの治療介入を行うことで、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。

また、研究班による本症の診断ガイドラインの策定後、F310L 変異を有する症例の確定診断例が増加した。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。

本研究により存在が明確化された周産期発症予後良好例については、筆者らの症例の蓄積及び情報の発信により海外においても認知されるようになってきており、2011 年に国外における本症の専門家である Whyte が発表した総説の中でも詳細に記述された (Whyte, *J Bone Miner Res*, 2011)。このように、国際的にも、本症の病型分類が従来の 5 つの分類に代わって筆者らが提唱してきた周産期発症予後良好型を含む 6 病型分類が用いられるようになりつつある。北米で治験中の酵素補充療法は近い将来日本にも導入されることが考えられるが、周産期発症であっても予後が良好である症例が存在すること、骨症状が自然軽快する症例が存在することから、治療対象の選択及び治療効果の評価については、分子診断にもとづく正確な予後判定が必須であると推察される。

## 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。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。