

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 23 年度分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症合併妊娠に関する検討

分担研究者 森 昌朋 群馬大学大学院病態制御内科学 教授
研究協力者 山田 正信 群馬大学大学院病態制御内科学 講師

研究要旨:甲状腺ホルモン不応症 (RTH) には、全身の代謝はほぼ正常の全身型と甲状腺ホルモン中毒症症状が前面にでる下垂体型がある。今回私たちは、下垂体型を示した甲状腺ホルモン受容体 β の F455S 変異症例の妊娠例を経験し、その胎児の経過や遺伝子診断に関する遺伝カウンセリングから、以下のような問題点が明らかとなった。1) 妊娠する可能性のある RTH の疑われる女性は計画妊娠のため積極的に遺伝子診断による確定診断が必要である。2) 胎児が正常児であった場合、甲状腺中毒状態に暴露され低体重などになるため出生前診断を検討する余地がある。3) 児が正常児であった場合 PTU などによる治療の可能性がある。4) RTH 妊婦に対する適切な β 遮断薬の使用法の検討が必要である。4) 出生前診断を考えた遺伝子診療体制の強化と内分泌代謝専門医、甲状腺専門医への臨床遺伝学や遺伝カウンセリング技術の教育が必要である。5) RTH 合併妊娠例が希なため、全国レベルでのデータの集積が必要である。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) は、主に甲状腺ホルモン受容体 β 遺伝子 (TR β) の異常により発症し、変異 TR が正常 TR の機能を阻害する dominant negative 作用があり常染色体優性遺伝を示す。私たちは、11 才時に甲状腺中毒症状を主訴として発見された新規甲状腺ホルモン受容体変異 F455S による下垂体型 RTH 症例の妊娠出産の経験をした。本研究では本症例と胎児並びに出産後の児の経過を観察し、RTH 症例の妊娠出産にともなう問題点について考察する。

B. 研究方法

- 1) 新規甲状腺ホルモン受容体変異 F455S を持つ症例の 11 才時から 21 才時までの経過を検討する。
- 2) 上記症例の血清 TSH や甲状腺ホルモン値の妊娠出産後の推移を検討する。
- 3) 児の出産後の体重などの理学的所見、血清 TSH や甲状腺ホルモン値などの推移を検討する。
- 4) 本症例の遺伝カウンセリングの問題点を考察する。

C. 研究結果

- 1) 新規甲状腺ホルモン受容体変異 F455S 症例の 11 才時の血清 TSH は 5.9 $\mu\text{U}/\text{ml}$ と高値、FT4 値も 5.7ng/dl と高値であった。
- 2) 11 才から 21 才までの間、軽度甲状腺中毒症状

が続いており、動悸に対して β 遮断薬、ADHD 様の精神症状にジアゼパンなどを屯用で服用していた。

3) 妊娠 16 週での血清 TSH 値は 1.46 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT4 値は 2.56 ng/dl であり、動悸などの甲状腺中毒症症状があり、 β 遮断薬を開始し動悸は軽快した。

4) 遺伝カウンセリングを行い RTH の病態、児への遺伝の可能性、児が正常児であった場合の影響、出産後の児の遺伝子診断などについて説明したが、児の遺伝子診断は出生前も含め希望されなかった。

5) 出生時の児の体重は 2712g、Apgar score 9-9-10、臍帯血の血清 TSH は測定感度以下、FT4 値は 1.55ng/dl と軽度高値、生後 11 ヶ月後の血清 TSH 値は 1.97 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT4 値は 1.37 ng/dl と児は正常児である可能性が高い。

D. 考察

Joao Anselmo らは、アズレス諸島においては Founder 効果で RTH の R243Q 変異症例が多く、妊娠した R243Q 変異症例において流産率が 22.9% と高率であることを報告している。特に変異を持つ女性が正常児を妊娠した場合に、児は低体重となるのは、RTH 合併妊婦の血清甲状腺ホルモン値が高値のため、胎盤を介して児が甲状腺中毒症に暴露されることが原因と考えられる (JAMA, August 292:691-695, 2004)。この報告を基に Roy E. Weiss らは、RTH 合併妊

娠の妊婦の遺伝子診断が行われている場合、積極的に出生前診断を勧め、児が正常児であった場合妊婦への PTU などの使用を勧めている。

しかし、本邦においては RTH に関する出生前診断の経験はなく、また、児が正常児と判明した際の PTU をはじめとした治療法は確立されていない。また、妊婦に対する β 遮断薬の治療法についても検討が必要である。

E. 結論

甲状腺ホルモン不応症の女性が妊娠した際、特に児が正常児である場合、出生児低体重など甲状腺ホルモン中毒症の症状が認められる。これらを考慮して、遺伝子診断の適応や出生前診断の適応、抗甲状腺製剤の適応などを示すことは今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahara M, Johnson K, Eckstein A, Taguchi R, Yamada M, Abiru N, Nagayama Y. Adoptive Transfer of Antithyrotropin Receptor (TSHR) Autoimmunity from TSHR Knockout Mice to Athymic Nude Mice. *Endocrinology*. 2012 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Taguchi R, Yamada M, Horiguchi K, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Mori M. Haploinsufficient and Predominant Expression of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1)-Related Genes, *MLL*, *p27^{Kip1}* and *p18^{Ink4C}* in Endocrine Organs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415:378-383
3. Nakajima Y, Yamada M, Taguchi R, Satoh T, Hashimoto K, Ozawa A, Shibusawa N, Okada S, Monden T, Mori M. Cardiovascular complications of patients with aldosteronism associated with autonomous cortisol secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 96:2512-2518.

2. 学会発表

1. 潜在性甲状腺機能低下症は女性において高 TG 血症の危険因子である
中島康代, 山田正信, 田口亮介, 土岐明子, 石田恵美, 吉野聡, 佐藤哲郎, 橋本貢士, 阿久沢まさ子, 安藤義孝, 森昌朋、第 54 回

日本甲状腺学会、2011

2. アルツハイマー病関連遺伝子 Seladin-1 遺伝子プロモーター上における TR と LXR のクロストーク、石田恵美, 橋本貢士, 小澤篤志, 渋谷信行, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋
第 54 回日本甲状腺学会、2011
3. 特異な TSH と甲状腺ホルモンの推移を呈した進行甲状腺濾胞癌の一例、小澤厚志, 山田正信, 登丸琢也, 渋谷信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋、第 54 回日本甲状腺学会
4. バセドウ病の再発、再燃を予測するマーカー (Siglecl1) の開発、2011
橋本貢士, 石田恵美, 田口亮, 片野明子, 中島康代, 登丸琢也, 小澤厚志, 渋谷信行, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋、第 54 回日本甲状腺学会、2011
5. TRH による膵臓 β 細胞 FGF21 遺伝子発現調節、渋谷信行, GarayJennifer, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋、第 54 回日本甲状腺学会、2011
6. 核内受容体転写共役因子 PDIP1 に結合する新規核蛋白の同定とその機能解析、片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 登丸琢也, 石塚高広, 田口亮, 小澤厚志, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋、第 54 回日本甲状腺学会、2011
7. マイクロアレイを用いた PDIP1KO マウスにおける高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性の病態解析、佐藤哲郎, 吉野聡, 片野明子, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋、日本肥満学会、2011
8. ヒストンメチル化酵素 MLL のインスリン分泌への関与、田口亮, 山田正信, 渋谷信行, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋、日本肥満学会、2011
9. レプチンの視床下部 下垂体 甲状腺系制御機構 TRH ノックアウトマウス (TRHKO) の解析、山田正信, 田口亮, 中島康代, 渋谷信行, GarayJennifer, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋、日本肥満学会、2011
10. 腫瘍性骨軟化症 (TIO) が疑われ、全身静脈サンプリングで腫瘍が同定され治癒し得た 1 例：椎名啓介, 齋藤従道, 古賀康彦, 橋爪洋明, 山田正信, 森昌朋, 平戸純子, 熊谷有紗, 元井亨, 福本誠二、日本内科学会関東地方会 580 回、2011
11. TRH 遺伝子欠損マウスにおける膵ランゲルハンス島遺伝子発現解析、渋谷信行、

- Guerrero Jennifer Garay, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
12. 肝での糖代謝における TR-LXR クロストークの役割、橋本貢士, 石田恵美, 渋沢信行, 小澤厚志, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 13. 腫瘍性骨軟化症(TIO)が疑われ、全身静脈サンプリングで腫瘍を発見した 1 例
齋藤従道, 山田正信, 野原惇, 多賀谷裕子, 大井晋介, 高橋洋樹, 土屋天文, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 14. 核内受容体 PPAR γ の転写共役活性化因子 PDIP1 に結合する新規核蛋白の同定、片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 石塚高広, 登丸琢也, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 門傳剛, 山田正信, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 15. 異所性甲状腺を合併した甲状腺ホルモン不応症からの知見 新規甲状腺ホルモン受容体変異体(R316C)の機能解析、中島康代, 山田正信, 堀口和彦, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 徳弘悦郎, 鬼形和道, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 16. 甲状腺ホルモンによる Alzheimer 病の分子標的治療の探索 Seladin-1 遺伝子転写制御を介して、石田恵美, 橋本貢士, 小澤厚志, 渋沢信行, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 17. 加齢と甲状腺機能 潜在性甲状腺機能低下症とメタボリック症候群、山田正信, 中島康代, 正村泰博, 佐藤哲朗, 橋本貢士, 阿久澤まさ子, 安藤義孝, 森昌朋、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011
 18. バルプロ酸ナトリウム(VPA)は甲状腺ホルモン不応症(RTH)の糖代謝異常を改善する
橋本貢士, 石田恵美, 小澤厚志, 渋沢信行, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋
第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011
 19. メタボローム解析を用いた PDIP1 ノックアウト(KO)マウスにおける高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性の分子病態解析、佐藤哲郎, 吉野聡, 片野明子, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011
 20. 核内受容体 PPAR γ の転写共役活性化因子 PDIP1 に結合する新規核蛋白の同定、片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 石塚高広, 登丸琢也, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 門傳剛, 山田正信, 森昌朋、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011
 21. レプチンの TRH-TSH-甲状腺系制御機構、山田正信, 田口亮, Jennifer Garay, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許の取得
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）
平成 23 年度分担研究報告書

甲状腺刺激ホルモン α 鎖、 β 鎖ならびに転写因子GATA2発現抑制に関する研究

研究協力者 佐々木茂和 浜松医科大学第2内科 講師

研究要旨 甲状腺ホルモン(T3)による甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生の抑制(負の調節)は下垂体-甲状腺系の中心的メカニズムである。TSHは α 鎖(α -glycoprotein subunit, α GSU)と β 鎖(TSH β)の2量体であり、それぞれをコードする遺伝子のプロモーター上には転写因子GATA2が結合してその転写を維持している。今まで私達はin vitroの実験系を用いて負の調節の機序を解析してきた。その結果、「T3による負の調節の機序としてT3受容体(TR)がT3依存性にGATA2の転写活性化能を阻害する」というモデルを私達は提唱している。しかし生体内においてはT3によるTSH産生の負の調節は極めて急峻であって、整数的なT3の動きに対してTSHは指数関数的に変動する(リニア・ログの関係)。今回私達は、GATA2遺伝子の発現自体もまたT3によって転写レベルで負に調節されていることを見いだした。このようなメカニズムがT3によるTSHへの急峻な産生抑制機構の背景となっている事が示唆される。

A. 研究目的

下垂体-甲状腺系においては、下垂体由来のTSH、甲状腺由来のT3、T4がネガティブフィードバックループを形成している。このうち全身の細胞が真に必要とし、生命維持に関わるホルモンはT3、あるいはそのプロホルモンであるT4である。そしてTSHはT3、T4レベルのわずかな変化を鋭敏に感知する事によってT3ならびにT4レベルを一定に保とうとする。このネガティブフィードバックは単なる反比例でなく、血清T3、T4の整数的な変化に対しTSHは指数関数的に上下する(リニア/ログの関係)。事実、血清TSHは甲状腺機能の極めて鋭敏な指標であって、潜在性甲状腺機能低下症ならびに潜在性甲状腺機能亢進症の病態の背景となっている。また甲状腺ホルモン不応症ではこのような関係が障害されて不適切TSH分泌を来し、診断の手がかりとなる。TSHは α 鎖(α -glycoprotein subunit, α GSU)と β 鎖(TSH β)の2量体であるが、両者の発現維持には転写因子GATA2が必須である。私達はこれまでに、TSH産生細胞(thyrotroph)の分化を決定する転写因子Pit1とGATA2ならびにTRを共発現させれば、T3結合TRによるTSH β への負の調節が観察可能であることを報告してきた(Nakano K. et al. Biochem J. 2004 ;

378(Pt 2): 549-57)。用いたCV1細胞は下垂体とは無関係な腎由来の細胞である。このCV1細胞でTSH β への負の調節が観察できた事はGATA2、Pit1、TR以外の下垂体特異的因子は必ずしも必須でない事を示唆した。さらに私達は真の転写活性化因子はPit1でなくGATA2であること(Kashiwabara Y. et al. J Mol Endocrinol. 2009; 42(3): 225-37)、従来提唱されていた負のT3応答配列(negative T3-responsive element, nTRE)は必須でない事を見いだした(Matsushita A. et al. Mol Endocrinol. 2007; 21(4): 865-84)。私達はこの系を用いて「T3による負の調節の機序としてT3受容体(TR)がT3依存性にGATA2の転写活性化能を阻害する」というモデルを提唱してきた(Sasaki S et al. 2011 Negative regulation of the thyrotropin β gene by thyroid hormone. In: CONTEMPORARY ASPECTS OF ENDOCRINOLOGY, Evanthia Diamanti-Kandarakis ed. <http://www.intechopen.com/books/contemporary-aspects-of-endocrinology>, InTech (open access), Rijeka, Croatia, pp. 101-138)。この系においてTRHシグナル系を活性化してTSH β プロモーターの活性の前値を上げておくと、それはT3によって基礎値の約1/6にまで低下し

た(Ohba K. et al. PLoS One. 2011 Apr 14;6(4):e18667)。しかし、生体内で観察される指数関数的な減少には至らなかった。このことは生体内ではリニア・ログの関係を維持するための更なる仕組みが存在してしていることを示唆した。ところで、転写因子 GATA2 をコードする遺伝子は6エクソンからなり、主に上流の1Sプロモーターによって発現制御される。興味深い事に GATA2 遺伝子の非コード領域には少なくとも3つのGATA応答配列が存在し、GATA2 自身が結合すると考えられる。すなわち、GATA2 遺伝子は GATA2 自身によってオートレギュレーションされポジティブフィードバック・ループを形成している。このポジティブフィードバック・ループは GATA2 自身によって非線形の指数関数的な制御を受けると予想される。特にイントロンIVのエンハンサー領域に存在するGATA応答配列は血球系、血管内皮、胎盤でのGATA2の発現にとって重要である事が知られている。前述のようにTRがT3依存性にGATA2の転写活性化能を阻害することがGATA2遺伝子上でも起こっているならば、このポジティブフィードバック・ループもまたT3で抑制され、TSH産生がT3によって急峻な抑制を受けている可能性がある。そこで今回、私達は以下の検討を行った。

B. 研究方法

thyrotrophの細胞株としてとしてT α T1細胞が樹立されている。これは α GSUプロモーターに結合したSV40 Large-T抗原を用いて作製されたトランスジェニックマウスから分離された。しかし前述のように α GSUプロモーターにはGATA応答配列があり、GATA2の発現が高くなるとSV40 Large-T抗原が増加し、thyrotroph本来の表現型を失う可能性がある。実際、T α T1の核抽出液を用いウエスタンブロット法でGATA2蛋白を検討しても、その発現は僅か下下垂体とは全く無関係のHela細胞と同等であった(Ohba K. et al. PLoS One. 2011 Apr 14;6(4):e18667)。ところで下下垂体前葉の分化の過程でゴナドトロピン産生細胞(gonadotroph)はthyrotrophと近縁関係にある。

gonadotrophには転写因子Pit1は存在していないため、TSH β もまた産生していないが、どちらも α GSUとGATA2は発現している。T α T1細胞と類似の方法でgonadotroph由来のL β T2細胞が樹立された。ここで用いられたのはLH β プロモーターに融合したSV40 Large-T抗原であって、このプロモーターにはGATA配列は含まれておらず、gonadotroph本来の高いGATA2と α GSUの発現が期待できる。今回、L β T2細胞ならびにT α T1細胞を用いてGATA2発現に対するT3の効果を検討した。

(倫理面への配慮) In vitroの実験であり、倫理面では問題がない。

C. 研究結果

まず抗GATA2抗体を用いてL β T2細胞の内因性GATA2蛋白を検討したところ、その発現はT α T1細胞の約5倍であった。次にこのL β T2細胞を用いて、下垂体特異的なTRであるTR β 2が存在すること、またL β T2細胞の α GSUのmRNAがT3で抑制されることをRT-PCRで確認した。そしてエクソン2、3に設定したプライマーを用いてRT-PCRを行うと、GATA2mRNAはT3濃度依存性に約1/6程度に急峻な抑制を受けた。ウエスタンブロットで調べるとGATA2蛋白はT3で約1/5に抑制された。T3の影響をT α T1細胞で調べると、基礎の発現は弱いもののやはりGATA2はT3で抑制された。L β T2細胞においてGATA2蛋白への抑制はT3の濃度と暴露時間に依存性であった。翻訳後の調節としてGATA2蛋白は約30分の半減期でユビキチン化され分解される。事実プロテアーゼ阻害剤MG132を長く作用させるとGATA2の蛋白レベルは約3倍に上昇した。しかしMG132存在下でもT3の抑制効果は維持された。また腎臓由来CV1細胞に遺伝子導入で外因性に発現したFLAG-タグのGATA2はT3の効果を認めなかった。視床下部からの甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)のシグナルは蛋白リン酸化酵素C(PKC)を活性化させる。このPKCもまたGATA2の転写活性化能を増強することを私達は報告している(Ohba K. et al. PLoS One. 2011 Apr 14;6(4):e18667)。

そこで L β T2 細胞を用いて PKC 活性化剤 phorbol 12-0-tetradecanoate-13-acetate (TPA) の作用をウエスタンブロットで調べると GATA2 蛋白は約 2～3 倍に増加し、GATA2 遺伝子の発現が TSH β 遺伝子に似た PKC 系の制御を受けていることを示唆した。

D. 考察

私たちは T3 による TSH 産生へネガティブフィードバックの本質は T3 結合 TR が GATA2 の転写活性化能を阻害することで TSH β 、 α GSU の発現を抑制することであることを報告している。しかし、*in vivo* においてはそれは単なる反比例ではなく、前述のようにリニア・ログの関係にある。今回の結果は GATA2 の発現自体もまた T3 によって抑制されること、言い換えれば T3 でまず抑制されるのは GATA2 の発現である可能性を示唆した。血球系や血管内皮では GATA2 遺伝子はその機能的 GATA 応答領域を介し、GATA2 はそれ自身の発現を促進する。これは非線形なポジティブフィードバックと考えられる。現在、L β T2 細胞や T α T1 細胞における GATA2 の発現に GATA2 のポジティブフィードバックが関わっているかどうかを確認中である。本研究はネガティブフィードバックを支える根底の原理とは必ずしも単純な抑制や反比例でない事を具体的に示し、ホメオステシスとは何かを考え直す切掛けとなる可能性がある。

E. 結論

TSH α 、TSH β 遺伝子の転写活性化因子である GATA2 の発現は T3 によって抑制されることが判明した。このことが TSH 産生へのネガティブフィードバックにおけるリニア・ログな関係の背景になっている事が示唆された。

F. 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

甲状腺ホルモン (T3) による転写因子 GATA2 蛋白の発現抑制 : TSH のネガティブフィードバックにおける役割 日本内分泌学会雑誌 87(1) 111, 2011 Abst #P-3-7-3

TSH β 遺伝子の転写活性化因子 GATA2 蛋白は T3 によって負に調節される。日本内分泌学会雑誌 87(2) 509, 2011 Abst #0-1-2

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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）

平成 23 年度分担研究報告書

FGF23 関連低リン血症性疾患の全国疫学調査(最終報告)

分担研究者 松本俊夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

分担研究者 福本誠二 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 講師

共同研究者 遠藤逸朗 徳島大学病院 内分泌代謝内科 講師

研究要旨：全国一次調査では、FGF23 関連低リン血症性疾患の年間発症症例数は 117 例(95%CI 75-160)と推定された。二次調査では、施設回答率 37.9%で腫瘍性骨軟化症 35 例、X 染色体優性低リン血症性くる病 36 例、常染色体劣性低リン血症性くる病 13 例、同 2 と常染色体優性低リン血症性くる病が各 1 例、含糖酸化鉄剤投与による低リン血症 6 例であった。これらの疾患ではいずれも腎尿細管リン再吸収閾値(TmP/GFR)低下を伴う低リン血症が認められ、かつ FGF23 血中濃度が 30pg/ml 以上であった。したがって FGF23 関連低リン血症の診断にあたり、FGF23 血中濃度が 30pg/ml 以上であるとの条件の妥当性が確認できた。また、TIO 症例では腫瘍の全摘がリン代謝の改善には必須であり、含糖酸化鉄剤投与に伴う低リン血症では同剤の投与中止により血清リンは速やかに正常化した。FGF23 関連低リン血症性疾患の診断には FGF23 測定が有用であるが、その原因は本邦においても多様であることが確認された。

A. 研究目的

FGF23 関連低リン血症性疾患の本邦での実態を明らかにし、本疾患のより良い診断、治療法確立への一助とすることを研究目的とした。

B. 研究方法

特定疾患の疫学に関する研究班(班長 埼玉医科大学公衆衛生学 永井正規教授)との共同研究による全国調査を施行した。対象機関となる全国 2895 施設(抽出率約 20%)に対し、FGF23 関連低リン血症性疾患の診断の手引き、第一次調査票および調査依頼状を徳島大学より郵送した。第一次調査で 2005 年から 2009 年までに症例ありと回答を戴いた施設に対しては第二次調査票ファイル(Excel)をメールで送信し、記入、返信戴いた。第二次調査票送付施設、埼玉医科大学および徳島大学の共同臨床研究として、徳島大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

2895 施設中 1149 施設より回答があり(回答率 39.7%)、患者有りの施設は 95、患者数 331/5 年間であった。年間発症症例数は、男性 55 例(95% CI

30-81)、女性 62 例(95% CI 40-84)合計 117 例(95% CI 75-160)と算出された。

二次調査では、腫瘍性骨軟化症(TIO) 35 例、X 染色体優性低リン血症性くる病(XLH) 36 例、常染色体劣性低リン血症性くる病(ARHR1が 3 例、ARHR2 が 1 例) 4 例、常染色体優性低リン血症性くる病(ADHR)が 1 例、含糖酸化鉄剤投与による低リン血症 6 例、その他線状皮脂腺母斑症候群、グリベック投与後を 1 例ずつ認めた。一方、FGF23 関連低リン血症性くる病の正確な病因が確定されている例は 53.6%にとどまった。二次調査症例では、いずれの症例でも腎尿細管リン再吸収閾値(TmP/GFR)低下を伴う低リン血症が認められるとともに、血中 FGF23 濃度が 30 pg/ml 以上であった。TIO 症例において腫瘍摘出が行われた症例ではいずれも、血清リン、TmP/GFR、FGF23 値の改善が認められたが、腫瘍残存例においては TmP/GFR は基準値内まで改善しなかった。XLH 症例では、活性型ビタミン D₃あるいは無機リン製剤による治療で、血清リン濃度の改善はほとんど認められなかった。含糖酸化鉄剤による低リン血症では、平均 1.1mg/dl と著明な低リン血症が認められたが、含糖酸化鉄剤の中止により速やかに血中 FGF23 値の

正常化とともに血清リン値の正常化が認められた。

D. 考察

FGF23 関連低リン血症性疾患の診断にあたり、FGF23 血中濃度が 30pg/ml 以上であるとの条件の妥当性が確認できた。また、TIO では腫瘍の全摘により治癒が見込めることから、責任腫瘍局在診断能の向上が必要と考えられた。XLH においては、活性型ビタミン D₃ やリン製剤では生化学所見の改善は乏しい。従って XLH に対しては抗 FGF23 抗体療法など、新たな治療法の確立が必要と考えられた。わが国においても、FGF23 関連低リン血症性疾患の病因は多様であることが明らかとなったことから、今後その簡便かつ明確な鑑別診断法の開発が必要である。

E. 結論

本疫学調査の結果により、FGF23 関連低リン血症性疾患の病因が多様であること、本症疾患診断における FGF23 測定の有用性が明らかとなった。これらの結果は、将来的には本症治療法の開発にも貢献するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hori M, Shimizu Y, Fukumoto S 2011 Minireview: fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and bone metabolism. **Endocrinology** 152:4-10
- 2) Fukumoto S, Shimizu Y 2011 Fibroblast growth factor 23 as a phosphotropic hormone and beyond. **J Bone Miner Metab** 29:507-514
- 3) Shimizu Y, Fukumoto S, Fujita T 2012 Evaluation of a new automated chemiluminescence immunoassay for FGF23. **J Bone Miner Metab** 30:217-221
- 4) Shimada T, Fukumoto S 2012 FGF23 as a novel therapeutic target. **Adv Exp Med Biol** 728:158-170

2. 学会発表

- 1) FGF23-related hypophosphatemic diseases in Japan. Itsuro Endo, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osaka Japan, July 29th 2011

- 2) FGF23 関連低リン血症性疾患の全国疫学調査. 遠藤逸朗、福本誠二、松本俊夫 第 84 回日本内分泌学会学術総会クリニカルアワー 3、神戸、2011/4/21

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許の取得
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

くる病・骨軟化症診断マニュアルの作成

研究分担者	福本 誠二	東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科
	大菌 恵一	大阪大学大学院医学系研究科小児学講座
	杉本 利嗣	島根大学医学部内科学講座
	岡崎 亮	帝京大学ちば総合医療センター
	竹内 靖博	虎ノ門病院内分泌代謝内科
	道上 敏美	大阪府立母子保健総合医療センター
	皆川 真規	千葉県こども病院内分泌科
	松本 俊夫	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体情報内科学

研究要旨

くる病・骨軟化症は必ずしも頻度の高い疾患ではないことから、専門家以外の医師による診断は容易ではないと考えられる。一方近年、多くのくる病・骨軟化症の病因が明らかにされ、病因に基づいた新たなくる病・骨軟化症の分類が可能となった。そこで本研究班の従来成果と分担研究者との議論をもとに、くる病・骨軟化症の診断マニュアルを作成した。今後、本マニュアルの妥当性の検証が必要である。

A. 研究目的

くる病・骨軟化症は必ずしも頻度の高い疾患ではないことから、専門家以外の医師による診断は容易ではないと考えられる。一方近年、多くのくる病・骨軟化症の病因が明らかにされた。そこで最新の知見を元にした、くる病・骨軟化症の診療マニュアルの作成を目的とした。

B. 研究方法

本研究班の従来成果、および最新の文献検索を元に、分担研究者と議論を重ねることにより、くる病・骨軟化症診断マニュアルを作成した。

(倫理面への配慮) 生体試料を用いておらず、問題ない。

C. 研究結果

本検討により作成したマニュアルを別紙に示す。

D. 考察

大部分のくる病・骨軟化症は、病因に応じた治療により症状の改善が期待される。しかしくる病・骨軟化症の原因疾患の鑑別には、現在保険適用となっていない25-水酸化ビタミンDや繊維芽細胞増殖因子23(fibroblast growth factor 23: FGF23)の測定が必須である。本マニュアルではこれらの測定項目を含めることにより、将来的な保険適応の一助となることを期待するとともに、より確実な病因鑑別を目指した。一方小児期のくる病と成人の骨軟化症では、病態や検査所見が異なるものと考えられる。本マニュアルでは、簡便であることを優先してくる病と骨軟化症を区別しなかった。今後本マニュアルの妥当性が検討されることにより、より良いマニュアルの作成が望まれる。

E. 結論

くる病・骨軟化症の診断マニュアルを作成した。本マニュアルの使用により、本症患者の的確な診断、治療が可能となることが望まれる。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

【定義】

くる病、骨軟化症は、骨石灰化障害を特徴とする疾患である。このうち、成長軟骨帯閉鎖以前に発症するものを、くる病と呼んでいる。

【症候】

くる病では、成長障害、O脚・X脚などの骨変形、脊柱の彎曲、頭蓋癆、大泉門の開離、肋骨念珠などが認められる。骨軟化症では、骨痛や筋力低下に加え、胸郭の変形(鳩胸)、脊柱の変形、偽骨折(Looser's zone)が生じることがある。

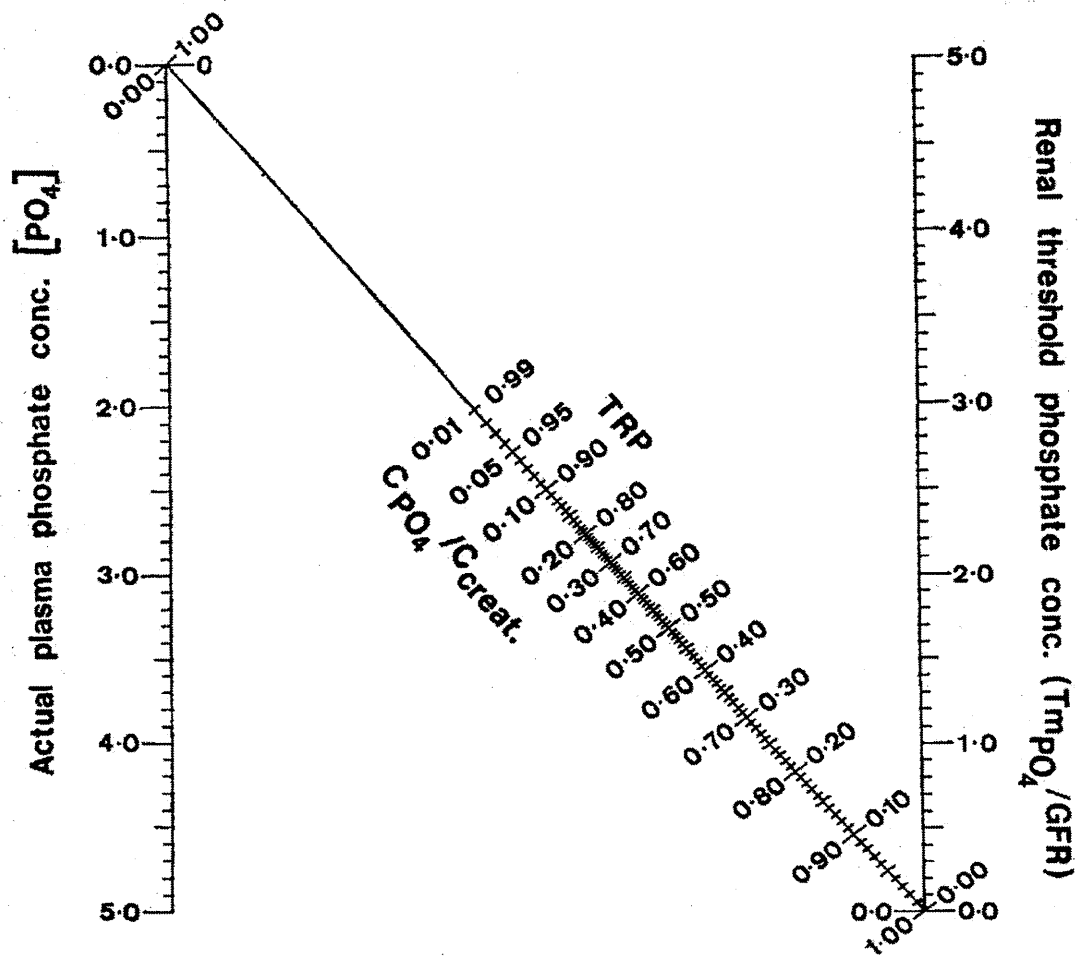
【病因】

低ホスファターゼ症や骨石灰化を阻害する薬剤によるくる病・骨軟化症を除き、大部分のくる病・骨軟化症では、慢性の低リン血症が認められる(表1)。ビタミンD欠乏性くる病では、低リン血症ではなく低カルシウム血症が主徴となることがある。くる病・骨軟化症の原因となる慢性の低リン血症の原因は、ビタミンD代謝物作用障害、腎尿細管異常、線維芽細胞増殖因子23(fibroblast growth factor 23: FGF23)作用過剰、およびリン欠乏に大別される。FGF23は、腎尿細管リン再吸収と腸管リン吸収の抑制により、血中リン濃度を低下させるホルモンである。過剰なFGF23活性により、いくつかの低リン血症性くる病・骨軟化症が惹起される(表2)。くる病・骨軟化症の病因の鑑別フローチャートを、図1に示す。25-水酸化ビタミンD[25(OH)D]とFGF23の測定は、現状では保険適応となっていないが、一部の検査センターでは可能である。

【検査所見】

単純骨X線では、くる病変化(骨幹端の杯状陥凹、骨端線の拡大や毛ばだち)やLooser's zoneが認められることがある。二重エネルギーX線吸収測定法などによる骨塩量の測定では、骨中のカルシウム含量が測定される。従って骨軟化症では、骨塩量の低下が認められる。このため骨塩量の低下が認められる場合には、骨粗鬆症の診断の前に骨軟化症の可能性を考慮する必要がある。骨シンチグラムでは、肋軟骨への数珠状の取り込みなど、多発性の取込が認められることが多い。生化学所見では、一部を除いて低リン血症、高ALP血症(骨型)が認められる。ビタミンD欠乏の診断は、血中25(OH)D濃度の低値によりなされる。ビタミンD欠乏患者の1,25(OH)₂D濃度は種々の値を示しうることから、血中1,25(OH)₂D濃度の測定はビタミンD欠乏の診断には有用ではない。

リン摂取不足、腸管リン吸収障害などによるリン欠乏の場合、およびビタミンD欠乏の一部では、尿細管リン再吸収閾値(TmP/GFR)は低値を示さない。一方それ以外の原因による低リン血症では、TmP/GFRの低下が認められる。TmP/GFRは、下記のノモグラム(Walton RJ, Bijvoet OL. Nomogram for the derivation of renal tubular threshold concentration. Lancet 1975; 306: 309-310.)により求められる。基準値 2.3 - 4.3 mg/dl。



Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration.

$C_{PO_4}/C_{creat} = (\text{尿中リン} \times \text{血中クレアチニン}) / (\text{尿中クレアチニン} \times \text{血中リン}) = FE_{PO_4}$
 (fractional excretion of phosphate)

$TRP(\text{tubular reabsorption of phosphate}) = 1 - C_{PO_4}/C_{creat}$

【診断】

骨石灰化障害の確定診断は、骨生検による類骨の増加、テトラサイクリンラベリングでの二重標識の消失によってなされる。ただし、上記の症候、生化学所見と薬剤使用歴などにより、大部分のくる病・骨軟化症の臨床診断が可能である。従って、侵襲的検査である骨生検が必要となることは、ごく稀である。

【鑑別を要する疾患、混同されやすい疾患】

- 低骨量：骨粗鬆症など
- 骨変形：骨系統疾患
- 骨痛：リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎など
- 筋力低下：神経・筋疾患
- 骨シンチグラフィでの多発取込：骨転移

表 1. くる病・骨軟化症の病因

○低リン血症

ビタミンD代謝物作用障害

ビタミンD欠乏

薬剤(ジフェニルヒダントイン、リファンピシンなど)

ビタミンD依存症1型¹⁾

ビタミンD依存症2型²⁾ など

腎尿細管異常

高Ca尿症を伴う低リン血症性くる病・骨軟化症³⁾

ファンconi症候群

デント病⁴⁾

腎尿細管性アシドーシス

薬剤(イホスファミド、アデホビルピボキシル、バルプロ酸など) など

FGF23関連低リン血症性くる病・骨軟化症(表2参照)

腫瘍性骨軟化症

X染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 など

リン欠乏

リン摂取不足、腸管吸収障害 など

○低カルシウム血症

ビタミンD欠乏の一部

○その他の原因による石灰化障害

低ホスファターゼ症⁵⁾

薬剤(アルミニウム、エチドロネートなど)

1) *CYP27B1* 遺伝子変異、常染色体劣性遺伝

2) *VDR* 遺伝子変異、常染色体劣性遺伝

3) *SLC34A3* 遺伝子変異、常染色体劣性遺伝

4) *CLCN5* 遺伝子変異、X染色体劣性遺伝

5) *TNSALP* 遺伝子変異、常染色体劣性遺伝または常染色体優性遺伝

表 2. FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症

X 染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (XLHR)
PHEX 遺伝子変異
常染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (ADHR)
FGF23 遺伝子変異
常染色体劣性低リン血症性くる病・骨軟化症 1 (ARHR1)
DMP1 遺伝子変異
常染色体劣性低リン血症性くる病・骨軟化症 2 (ARHR2)
ENPP1 遺伝子変異
腫瘍性くる病・骨軟化症
McCune-Albright 症候群/線維性骨異形成症
含糖酸化鉄、ポリマルトース鉄による低リン血症性くる病・骨軟化症
線状皮脂腺母斑症候群に伴う低リン血症性くる病・骨軟化症

XLHR: X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia

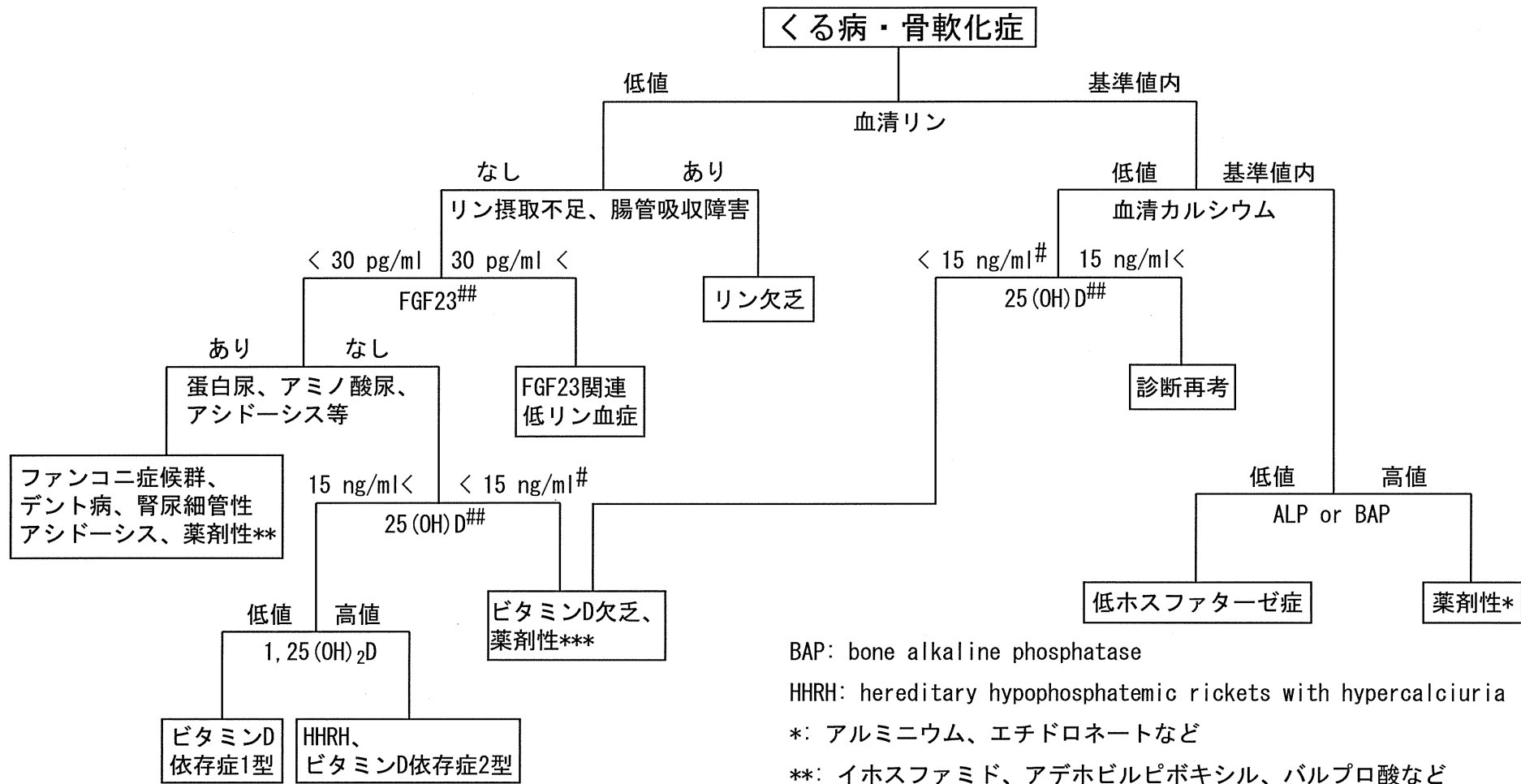
ADHR: autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia

ARHR: autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia

PHEX: phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome

DMP1: dentin matrix protein 1

ENPP1: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1



BAP: bone alkaline phosphatase
 HHRH: hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria
 *: アルミニウム、エチドロネートなど
 **: イホスファミド、アデホビルピボキシル、バルプロ酸など
 *** ジフェニルヒダントイン、リファンピシンなど

小児では、より高値であってもくる病の原因となることがある。
 ## 保険適用外検査。

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 23 年度分担研究報告書

血清カルシウム・リン制御機構に関する研究

分担研究者 大藪恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 教授
研究協力者 難波範行 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 助教

研究要旨

くる病の主要な原因はビタミン D 欠乏性くる病と低リン血症性くる病であるが、両者の鑑別が容易でない場合がある。本研究で、ビタミン D 欠乏性くる病 (VitD-def) と低リン血症性くる病 (HPR) の鑑別における fibroblast growth factor 23 (FGF23) の有用性を検討した。研究対象は当科において VitD-def 及び HPR と診断を受け、未治療であった 30 名。VitD-def の症例は 21 名で、平均年齢は 1.5 歳、HPR は 9 名で、平均年齢は 5.7 歳であった。HPR に比べて VitD-def において、血清 Ca 値と 25OHD 値は有意に低く、血清 P 値、PTH 値、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 値、TmP/GFR 値は有意に高いという結果が得られたが、症例によりばらつきがあり、個々の数値のみによる両者の鑑別は困難であった。HPR において少なくとも 3 例は血清 25OHD 値が低下していた。血清 FGF23 値は VitD-def において 18 pg/ml 以下、HPR において 46 pg/ml 以上であり、両者の間に血清 FGF23 値の明瞭な違いが見られた。以上の結果から血清 FGF23 値が 20 pg/ml 以下の場合、ビタミン D 欠乏性くる病を積極的に疑う根拠となりうると考えられた。本結果は、くる病の診断のガイドラインに記載する根拠となると考えられた。

A. 研究目的

1. 遺伝性低リン血症性くる病の代表的疾患である X 染色体連鎖性低リンくる病 (XLH) 患者では、活性型ビタミン D とリン酸剤による治療が行われるが、その効果は十分ではない。原因として、リン製剤として適切な薬剤がないこと、信頼できる治療指標がないこと、病態の本質的な治療法でないことなどがあげられる。本研究では、低リン血症性くる病のよりよい治療法の開発を目的とし、臨床的なニーズに応えるものである。XLH の発症に関わる PHEX/FGF23/Klotho について検討することおよびビタミン D 欠乏症と比較検討することに特色があると考えられる。
2. くる病の主要な原因はビタミン D 欠乏性くる病と低リン血症性くる病であるが、両者の鑑別が容易でない症例が散見される。その要因として、ビタミン D の欠乏・不足状態が稀ではなく、低リン血症性くる病の病態をビタミン D 欠乏が修飾するためと考えられる。そこで、我々はビタミン D 欠乏性くる病と低リン血症性くる病の鑑別におけるリン調節因子である FGF23 の有用性を検討し、くる病の原因をより正確に診断する手段を提供する事を目的とする。

B. 研究方法

1. XLH 自験例における解析
当院で経過観察中の XLH 患者 14 名のうち、2 回以上血清 FGF23 値を測定し、かつ治療中である 9 名を対象に、血清 FGF23 (Kainos 社キット) とともに、年齢、身長、体重、治療内容、血清 Ca, P, Alb, ALP, PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, 25OHD, BUN, Cre, 尿 Ca, P, Ca/Cr, %TRP, TmP/GFR, 推定 GFR (Schwartz の式より計算) を測定した。倫理面への配慮として、研究計画は大阪大学大学院医学系研究科の倫理委員会に申請し、承認されている。承認内容に十分配慮して研究を遂行している。(本研究の一部は治験と重複するため、結果記載は治験終了後の来年度に行う)。
2. くる病の鑑別診断の研究対象は大阪大学医学部附属病院小児科及び箕面市立病院小児科においてビタミン D 欠乏性くる病及び低リン血症性くる病・骨軟化症と診断を受け、未治療であった 30 名である。ビタミン D 欠乏性くる病の診断はくる病の臨床症状や X 線所見に加えて、血清 25OHD 値の低下を認め、治療中止後も再燃を認めない症例とした。くる病をきたす他の疾患を合併している場合は除外した。低リン血症性くる病の診断はくる病の所見に加えて、血清リン値の低下を認め、腎疾患を認めない症例

とした。成人の一例は同症例の親で血清リン値の低下を認めた症例である。また遺伝子診断は未実施である。検討項目は血清カルシウム (Ca) 値、リン (P) 値、アルカリフォスファターゼ (ALP) 値、副甲状腺ホルモン(インタクトPTH) 値、1,25 水酸化ビタミン D (1,25(OH)₂D) 値、25OHD 値、FGF23 値、尿中カルシウム/クレアチニン比 (U-Ca/Cr)、尿細管リン再吸収閾値 (TmP/GFR) である。なお、倫理面への配慮として、血清 FGF23 の測定に関して大阪大学医学部附属病院 臨床研究倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

ビタミン D 欠乏性くる病の症例は 21 名 (男 9 名、女 12 名) で、平均年齢は 1.5 ± 0.5 歳 (0.2 - 2.5) であった。低リン血症性くる病の症例は 9 名 (男 2 名、女 7 名) で、平均年齢は 5.7 ± 11.6 歳 (0.6 - 36.5) であった。低リン血症性くる病に比べてビタミン D 欠乏性くる病において、血清 Ca 値が有意に低く、P 値が有意に高いという結果が得られたが、両者の値の分布には重なりが認められた。ビタミン D 欠乏性くる病において、低 Ca 血症 (血清補正 Ca 値が 8.3mg/dl 以下) を認めた症例は 21 例中 2 例のみであった。また、低 P 血症を認めなかった (血清 P 値が 4mg/dl 以上) 症例は 21 例中 10 例であった。血清 25OHD 値はビタミン D 欠乏性くる病において、全例 17.1ng/ml 以下であった。低リン血症性くる病の症例においても、少なくとも 3 例は 15ng/ml 以下であった。したがって、これら 3 例は低リン血症性くる病にビタミン D 欠乏を合併していると考えられた。血清 1,25(OH)₂D 値はビタミン D 欠乏性くる病において有意に増加していた。しかし、ビタミン D 欠乏性くる病の症例と低リン血症性くる病の症例の数値の分布には若干の重なりが認められた。また、血清 ALP 値はビタミン D 欠乏性くる病と低リン血症性くる病の間に明らかな差を認めなかった。血清 PTH 値は低リン血症性くる病に比べてビタミン D 欠乏性くる病においては、有意に高値であったが、両者の値の分布には重なりが認められた。さらに、TmP/GFR 値は低リン血症性くる病に比べてビタミン D 欠乏性くる病において、TmP/GFR が有意に高値であったが、両者の値の分布には若干の重なりが見られた。U-Ca/Cr 値はビタミン D 欠乏性くる病と低リン血症性くる病の間に明らかな差を認めなかった。血清 FGF23 値はビタミン D 欠乏性くる病において 18 pg/ml 以

下、低リン血症性くる病において 46 pg/ml 以上と、両者の間に血清 FGF23 値の明瞭な違いが見られた。

D. 考察

ビタミン D 欠乏性くる病の症例は低カルシウム血症を認める症例が少なく、低リン血症を認めない症例は約半数であった。また、低リン血症性くる病においてビタミン D 欠乏症を合併している可能性を考慮すべきと考えられた。低リン血症性くる病に比べてビタミン D 欠乏性くる病において、血清 Ca 値と 25OHD 値は有意に低く、血清 P 値、PTH 値、1,25(OH)₂D 値、TmP/GFR 値は有意に高いという結果が得られたが、症例によりばらつきがあり、個々の数値のみによる両者の鑑別は困難と思われた。一方、血清 FGF23 値はビタミン D 欠乏性くる病において 18 pg/ml 以下、低リン血症性くる病において 46 pg/ml 以上であり、両者の間に血清 FGF23 値の明瞭な違いが見られた。以上の結果から血清 FGF23 値が 20 pg/ml 以下の場合、ビタミン D 欠乏性くる病を積極的に疑う根拠となりうると考えられた。

E. 結論

血清 FGF23 値が 20 pg/ml 以下の場合、ビタミン D 欠乏性くる病を積極的に疑う根拠となりうると考えられた。本結果は、くる病の診断のガイドラインに記載する根拠となると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohata Y, (他 10 名), Ozono K. Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(6):E943-E947.
- 2) Miura K, (他 10 名), 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.
- 3) Kitaoka T, (他 7 名), 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.
- 4) Otomo T, (他 3 名), Ozono K. Elevated Bone Turnover in an Infantile Patient with

- Mucopolysaccharidosis II; No Association with Hyperparathyroidism. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2011, 20(1):7-12.
- 5) 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.
 - 6) Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N. Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 2012, 105(2):266-269.
 - 7) Hashimoto N, (他 12 名), Ozono K. SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome. *J Hum Genet*, 2011, 56(12):846-851.
2. 学会発表
- 1) 大藪恵一 現代の栄養欠乏としてのビタミン D 欠乏
日本ビタミン学会第 63 回大会 : 11. 06. 04-05, 広島
 - 2) Ozono K. Osteoporosis and osteopetrosis in the young. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR: 11. 09. 04-08, Gold Coast, Australia
 - 3) ○大藪恵一 小児科医が知っておくべき骨系統疾患 第 23 回 奈良小児内分泌研究会 特別講演: 11.10.27, 橿原
 - 4) 大藪恵一 周産期のカルシウムリン代謝 第19回 Bone Research Joint Meeting: 11.11.08, 吹田
 - 5) Ozono K. Recent advances in research and clinical practice for rickets.the Research Center for Rare Disease Invited lecture : 11. 11. 23, Seoul, Korea
 - 6) ○ Ozono K. management of patients with achondroplasia/hypochondroplasia. Invited lecture : 11.11.22, Seoul, Korea
 - 7) ○三浦弘司, 難波範行, 大藪恵一, 道上敏美 ナトリウム利尿ペプチド受容体Bの機能獲得型変異に伴う高身長家系 ―内分泌学的検討― 第 84 回日本内分泌学会学術総会: 11.04.21-23, 神戸
 - 8) ○Miura K, (他 5 名), Ozono K. Three-Generation Dominant Transmission of Tall Stature Due to Gain-of-Function Mutation of the Natriuretic Peptide Receptor B. PAS/ASPR 2011 (PEDIATRIC ACADEMIC SOCIETIES and ASIAN SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH) : 11.04.30-05.03, Denver, USA
 - 9) ○Miyoshi Y, (他 4 名), Ozono K. Serum Triiodothyronine to Thyroxine Ratio in a Child with T3-Predominant Graves Disease. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo: 11.06.04-07, Boston, USA
 - 10) ○Fujiwara M, (他 7 名), Ozono K. Two Novel Mutations of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 alpha in Maturity-Onset Diabetes of the Young 1 in Japan. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo: 11.06.04-07, Boston, USA
 - 11) ○Ozono K, M.D., Ph.D. Tall stature and macrodactyly due to a gain-of-function mutation of NPR-B. 2011 GeNeSIS Investigators Meeting: 11.06.24-26, Vienna, Austria
 - 12) ○三浦弘司, (他 5 名), 大藪恵一, (他 4 名) ナトリウム利尿ペプチド受容体 B の機能獲得型変異はヒトおよびマウスにおいて成長促進と低骨密度をもたらす 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 : 11. 07. 28-30, 大阪
 - 13) 大幡泰久, (他 4 名), 大藪恵一, 道上敏美 胎児期特異的ミネラル代謝調節機構における FGF23 の関与—Hyp マウスを用いた解析 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 : 11. 07. 28-30, 大阪
 - 14) ○Miura K, (他 9 名), Ozono K. A gain-of-function type mutation of the natriuretic peptide receptor B causes acceleration of skeletal growth and osteoporotic change in humans and mice. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR: 11.09.04-08, Gold Coast, Australia
 - 15) ○Ohata Y, (他 4 名), Ozono K, Michigami T. Analysis of the roles of FGF23 in fetus-specific mineral metabolism using *Hyp* mouse. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR: 11.09.04-08, Gold Coast, Australia
 - 16) ○Miyagawa K, Ozono K, (他 5 名). 1,25(OH)₂D and PTH Up-regulate Rankl while Down-regulate Phex and Dmpl in Primary Osteocytes Isolated from Mouse Bones. ASBMR 2011 Annual Meeting : 11.09.16-20, San Diego, USA

17) ○宮川和晃, 大藪恵一, (他 6名) リン代謝における骨細胞の機能-Hyp マウスを用いた解析-
第 29 回小児代謝性骨疾患研究会: 11.12.03, 東京

G.知的所得権の取得状況

1. 特許の取得

特許なし

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）
平成 23 年度分担研究報告書

X 連鎖性低リン血症性くる病における骨芽細胞／骨細胞機能異常に関する研究

研究協力者 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

研究要旨

X 連鎖性低リン血症性くる病(XLH)は *PHEX* 遺伝子の変異に基づき、骨での FGF23 産生増加により低リン血症、ビタミン D 活性化障害が引き起こされるが、本症における FGF23 産生増加の機序は不明である。本研究では、*Phex* 遺伝子に欠失を有する *Hyp* マウスを XLH のモデルとして用いて、骨芽細胞・骨細胞の機能異常について解析した。20 週齢の *Hyp* マウス及び野生型(WT)マウスの長管骨より、初代骨芽細胞及び骨細胞を分化段階に応じて分画として単離し、遺伝子発現を検討したところ、*Hyp* の骨細胞において *Fgf23* の発現増加が確認された。さらに、常染色体劣性低リン血症性くる病(ARHR)の責任遺伝子である *Dmp1* の発現についても、*Hyp* 骨細胞においては WT 細胞と比べて著明に増加しており、骨芽細胞に相当する分画においても高い発現を認めた。*Fgf23* の糖鎖修飾に関わる *Galnt3* の発現については、*Hyp* 細胞と WT 細胞の間で差を認めなかった。*Hyp* 及び WT マウスより単離した初代骨細胞は、活性型ビタミン D に対して同様の応答性を示した。*Hyp* 骨における *Fgf23* 及び *Dmp1* の発現増加は胎仔期より観察された。*Hyp* 母体の妊娠において、*Hyp* 胎仔の血中 FGF23 値は母体の約 20 倍と極めて高い値を示したが、同腹の WT 胎仔の血中 FGF23 値は WT 母体の胎仔と同程度の低い値を示し、母体の FGF23 は胎盤を通過しない、あるいは通過後すみやかに分解されることが推察された。*Hyp* 胎仔の腎臓においてはビタミン D 代謝酵素やナトリウム／リン酸(Na^+/Pi)共輸送担体の発現変化を認め、*Fgf23* 過剰発現の影響が考えられた。

A. 研究目的

XLH は *PHEX* の機能喪失変異に基づき、骨での FGF23 産生増加により低リン血症及びビタミン D の活性化障害が引き起される疾患である。FGF23 の主たる産生細胞は骨細胞であり、また、XLH の責任分子である *PHEX* や *ARHR* の責任分子である *DMP1* も骨細胞に比較的特異的に発現しているところから、リン代謝における骨細胞の重要性が示唆されているが、これらの多彩な分子群の発現制御や機能的連関の詳細については不明な点が多い。また、XLH に対しては従来、リン酸塩と活性型ビタミン D の投与が行われてきたが、これらの治療は FGF23 産生をさらに増加させ、病態を増悪させる可能性がある。こうした背景から、本研究においては、XLH のモデルである *Hyp* マウスを用いて骨芽細胞／骨細胞の機能異常を詳細に解析し、リン代謝関連分子の発現制御機構を明らかにすることにより、XLH に対する効果的な治療プロトコルの確立に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

1) マウス骨からの初代骨芽細胞／骨細胞の単離

Phex 遺伝子の 3'側に欠失を有する *Hyp* マウスを実験に用いた。20 週齢の雄性 *Hyp* (*Phex^{Hyp/Y}*)あるいは野生型(WT)マウスより無菌的に長管骨を摘出、微細化し、collagenase 処理による基質の消化と EGTA 処理による脱灰を反復し、各ステップで遊離する細胞を回収することにより、骨芽細胞及び骨細胞を分化度に応じて段階的に単離した。単離された細胞の性状は骨芽細胞、骨細胞マーカー遺伝子の発現により確認した。

2) 遺伝子発現解析

上記の方法で単離した初代骨芽細胞、骨細胞より RNA を抽出し、TaqMan®システムによる real-time PCR を用いて遺伝子発現を検討した。また、E18.5 のマウス胎仔骨における遺伝子発現についても検討を行った。

3) 周産期のミネラル代謝に関する解析