

患者を対象とした Z-521 の治療的使用試験報告、
第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、
12. 09. 27-29

なし

3) 武鍵真司, 山本威久, 中山尋文, 木島衣理, 金野 浩, 溝口好美, 山本勝輔, 下辻常介, 窪田拓生, 大藪恵一: ビタミン D 欠乏性くる病における O 脚の程度と血中 Cr 値との関係: 骨変形と骨格筋量との関連性、第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、 12. 09. 27-29

4) 中山尋文, 山本威久, 武鍵真司, 木島衣理, 下辻常介, 山本勝輔, 北岡太一, 大藪恵一, 長谷川高誠, 田中弘之: 多発性嚢胞腎を合併した低リン血症性ビタミン D 抵抗性くる病の 1 症例、第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、12. 09. 27-29

5) Kubota T, Kitaoka T, Ohata Y, Fujiwara M, Miura K, Miyoshi Y, Namba N, Takeyari S, Yamamoto T, Ozono K: Usefulness of Serum Fibroblast Growth Factor 23 Levels in the Diagnosis and Management of Vitamin D-Deficient Rickets. ASBMR 2012 Annual Meeting, Minneapolis, USA, 12. 10. 12-15

6) 窪田拓生, 北岡太一, 三浦弘司, 大幡泰久, 三善陽子, 藤原 誠, 山本景子, 難波範行, 武鍵真司, 山本威久, 大藪恵一: ビタミン D 欠乏性くる病の診断における血清 FGF23 濃度の有用性、第 22 回臨床内分泌代謝 Update、さいたま、13. 01. 18-19

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

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 24 年度分担研究報告書

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態・診断に関する研究

研究協力者 皆川 真規（千葉県こども病院 内分泌科 部長）

研究要旨

低カルシウム血症の原因診断において、25OH ビタミン D 値と Ellsworth-Howard 試験 (E-H 試験) はビタミン D 欠乏症と偽性副甲状腺機能低下症の鑑別のキーとなる。25OHD 低値と E-H 試験でボーダーライン近くの正常反応を示した症例で治療経過観察、2 回目の E-H 試験と GNAS のエピ変異解析を行った。2 回目の E-H 試験も 1 回目と同様な結果であったが、GNAS のエピ変異解析により偽性副甲状腺機能低下症 1b 型と確定診断した。E-H 試験の cAMP 反応は血漿の反応も含め再現性が良好であったが、リン反応については再現性が悪かった。E-H 試験の結果がボーダーライン近くの場合、結果の解釈には注意が必要であり、偽性副甲状腺機能低下症とビタミン D 欠乏症などとの鑑別診断にはエピ変異の解析が有用である。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) の診断基準について本調査研究班で過去に「副甲状腺機能低下症の診断の手引き」を策定した。その診断アルゴリズムによれば、腎機能異常のない低カルシウム血症において高リン血症をみとめた場合、intact PTH が高値 (30pg/ml 以上) であれば偽性副甲状腺機能低下症として Ellsworth-Howard 試験 (E-H 試験)、Gs α 活性、Albright osteodystrophy の結果を参考に確定診断することになっている。

しかし、Gs α 活性の測定は研究室レベルであり、方法も標準化されておらず一般の臨床現場では利用できない。PHP 1b 型 (PHP-1b) を含めた Albright osteodystrophy を有しない症例の診断では、Ellsworth-Howard 試験が唯一の確定診断のための検査となっている。現在、PHP-1b については、GNAS の DNA メチル化異常の分析により分子生物学的診断が可能となっているが、これにより E-H 試験の結果の検証が可能になった。臨床的検査による診断の問題点について検討した。

B. 研究方法

【対象】

(症例) 9歳6ヵ月 女児
偶然発見された低 Ca 高 P 血症。
(既往歴・家族歴) 特筆すべきことなく、長期の投薬歴もなし。

(生活歴) 自宅は海沿いの町にあり、父母妹弟、祖父母との 7 人暮らし。偏食なし。学業成績は普通。

(現症) 身長: 130.0cm (-0.6SD)、体重: 28.0kg (肥満度: +1.4%)、骨格変形なし

Albright hereditary osteodystrophy 所見:

皮下石灰化(-)、円形顔貌(-)

中手骨短縮(-)

(検査結果)

Ca 7.4 mg/dl, Mg 2.2 mg/dl, IP 6.0 mg/dl

Alb 4.9 g/dl, ALP 727 IU/l, Cre 0.31 mg/dl

Intact PTH 480 pg/ml (10-65)

1,25(OH)₂D 54.6 pg/ml (20-70)、25OHD 9 ng/ml

尿 Ca/Cre: 0.02、%TRP: 96.6%、TmP/GFR: 7.4mg/dl

TSH 2.71 μ U/ml、fT3 3.9 pg/ml、fT4 1.3

ng/dl
LH 0.1 mIU/ml, FSH 2.8 mIU/ml, E2 < 18 pg/ml
(骨 X 線)くる病所見なし。骨年齢:10 歳(GP 法)

【方法】

常法通り E-H 試験を実施。

1 回目の結果が、PHP-II 型の反応(リン酸反応の適用基準は満たしていない)であり、血清 25OHD 値が低値(9 ng/ml)であったことから、ビタミン D 欠乏状態にあると判断。血清 ALP 高値でないことと、X 線上くる病所見を認めないことが診断上問題であったが、ビタミン D 欠乏による低 Ca 血症と暫定診断し、市販サプリメントによるビタミン D (その後服薬アドヒアランスの問題があり活性型ビタミン D に変更した)・カルシウムの補充と生活指導(日光浴をすすめる)によって治療を行った。

血清 25OHD 値が改善(24 ng/ml)しているにもかかわらず intact PTH の高値(370 pg/ml)が持続することから、2 回目の E-H 試験を実施。合わせて、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン解析法で GNAS の A/B 領域のメチル化解析(既報)を行い、分子生物学的診断を実施した。

(倫理面への配慮)

研究にあたっては、施設の倫理委員会の承認のもとで個人情報の保護と研究対象者の人権を最優先として、患者に対し十分に説明を行い書面による承諾を得ておこなった。

C. 研究結果

1. E-H 試験(1 回目)の結果

尿 cAMP 増加は、1.39 μ mol/h (正常基準値 ≥ 1.0)、12.5 倍(同 ≥ 10 倍)と、近位尿細管の外因性 PTH に対する反応低下はなしと判定された。また、リン酸排泄量の差: 18.1 mg/2h (同 ≥ 35)であった(ただし、リン酸反応の評価可能な条件下での検査でないため参考値)

また、判定基準には含まれないが、血漿 cAMP 頂値は、74 pmol/ml (同 ≥ 100)と低反応であった。

2. E-H 試験(2回目)の結果

尿 cAMP 増加は、0.99 μ mol/h (≥ 1.0)、10.0

倍(≥ 10 倍)であり、近位尿細管の外因性 PTH に対する反応はボーダーラインであった。また、リン酸排泄量の差: 35.9 mg/2h (≥ 35)と正常基準値内であったが、リン酸反応の評価可能な条件下での検査でないため判定保留であった。また、血漿 cAMP 頂値は 51 pmol/ml (≥ 100)とやはり低反応であった。

3. メチル化感受性制限酵素を用いたサザン解析法の結果

GNAS の A/B 領域のメチル化解析では、完全脱メチル化で PHP-1b に合致する結果であった。

D. 考察

PHP の診断に際しては以下の注意が必要である。

- ビタミン D 欠乏と他の病態の併存可能性が十分ある。
- 偽性副甲状腺機能低下症 1b 型の腎近位尿細管の反応性には多様性があり、Ellsworth-Howard 試験の結果にも判定基準ボーダーラインを示すことがある。
- 診断アルゴリズムのみに頼った診断をすべての症例に適用することはできない。
- 偽性副甲状腺機能低下症 1b 型の診断には GNAS のメチル化解析が有用であること。(現在は MLPA 法が一般的になっている)

E. 結論

偽性副甲状腺機能低下症の診断に際して、E-H 試験の結果がボーダーライン近くの場合、解釈には注意が必要であり、エピソードの解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 皆川真規. 低カルシウム血症の診断アルゴリズム. 小児内科 (2012) 44:577-582

2. 学会発表

1) 皆川真規 偽性副甲状腺機能低下症 第 85 回日本内分泌学会学術集会 平成 24 年 4 月 19 日

2) 北中幸子、高木美奈子、磯島豪、堀倫子、福本誠二、皆川真規 FGF23 遺伝子変異を同定した常染色体優性遺伝低リン血症

性くる病の本邦初家系 第30回日本骨代謝学会学術集会 平成24年7月20日

- 3) 北岡太一、大藪恵一、長谷川行洋、皆川真規、安達昌功、難波範行、數川逸郎、朝倉由美、内藤優己、志村麻美 家族性低リン血症性くる病患者を対象としたZ-521の治療的使用試験報告 第46回日本小児内分泌学会学術集会 平成24年9月27日
- 4) 高木美奈子、磯島豪、堀倫子、福本誠二、皆川真規、北中幸子 FGF23遺伝子変異による常染色体優性低リン血症性くる病の本邦初報告家系—血中FGF23値と無症状例について— 第46回日本小児内分泌学会学術集会 平成24年9月28日

G. 知的所有権の取得状況

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）
分担研究報告書

くる病・骨軟化症診断マニュアルの改訂

| | | |
|-------|-------|----------------------------------|
| 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 |
| | 大藪 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、昨年度くる病・骨軟化症の診断マニュアルを作成した。今年度、各種学会での議論をもとに、より明快なマニュアルに改訂した。

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を昨年度作成した。しかしこのマニュアルには、いくつかの問題点が存在することが明らかとなった。そこでより明快なマニュアルへの改訂を目的とした。

B. 研究方法

各種学会での議論をもとに、昨年度作成したマニュアルを改訂した。
(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改訂版を別紙に示す。

D. 考察

昨年度のマニュアルには、診断に必要な

項目が必ずしも明確ではなかったこと、病因鑑別のフローチャートが多少複雑だったことなどの問題点が残されていた。そこでこれらの点を改訂した。特にくる病・骨軟化症の診断では、大項目と小項目の組み合わせにより、確実例に加え、疑い例を拾い上げることとした。本マニュアルの妥当性の検討は、今後の課題である。

E. 結論

くる病・骨軟化症の診断マニュアルを改訂した。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

くる病・骨軟化症の診断マニュアル

【診断指針】

●くる病

大項目

- a) 単純 X 線像でのくる病変化(骨幹端の杯状陥凹、または骨端線の拡大や毛ばだち)
- b) 高アルカリホスファターゼ血症*

小項目

- c) 低リン血症、または低カルシウム血症*
- d) 臨床症状
 - 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、関節腫脹のいずれか

*年齢に応じた基準値を用いて判断する。

1) くる病

大項目 2 つと小項目の 2 つをみたすもの

2) くる病の疑い

大項目 2 つと小項目の 2 つのうち 1 つをみたすもの

●骨軟化症**

大項目

- a) 低リン血症、または低カルシウム血症
- b) 高骨型アルカリホスファターゼ血症

小項目

- c) 臨床症状
 - 筋力低下、または骨痛
- d) 骨密度
 - 若年成人平均値(YAM)の80%未満
- e) 画像所見
 - 骨シンチグラフィーでの肋軟骨などへの多発取り込み、または単純 X 線像での Looser' s zone

1) 骨軟化症

大項目 2 つと小項目の 3 つをみたすもの

2) 骨軟化症の疑い

大項目 2 つと小項目の 2 つをみたすもの

除外すべき疾患

癌の多発骨転移、腎性骨異栄養症、原発性副甲状腺機能亢進症

**くる病として発症した症例は、くる病の診断指針に準じる。

○骨石灰化障害を惹起する薬剤使用例では、くる病、骨軟化症いずれにおいても、低リン血症、または低カルシウム血症の存在を除いて判断する。

解説

【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、くる病と呼ぶ。

【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、関節腫脹が認められることがある。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。

【検査所見】

単純骨X線でのくる病変化には、骨幹端の杯状陥凹、骨端線の拡大や毛ばだちがある(図1)。骨軟化症では、低石灰化領域を示すLooser's zoneが認められることがある(図2)。二重エネルギーX線吸収測定法などによる骨密度の測定では、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、骨密度の低下が認められる。このため骨密度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。骨シンチグラフィーでは、肋軟骨への数珠状の取り込みなど、多発性の取り込みが認められることが多い(図3)。生化学所見では、高骨型アルカリホスファターゼ血症が特徴的であり、一部を除いて慢性の低リン血症も認められる。

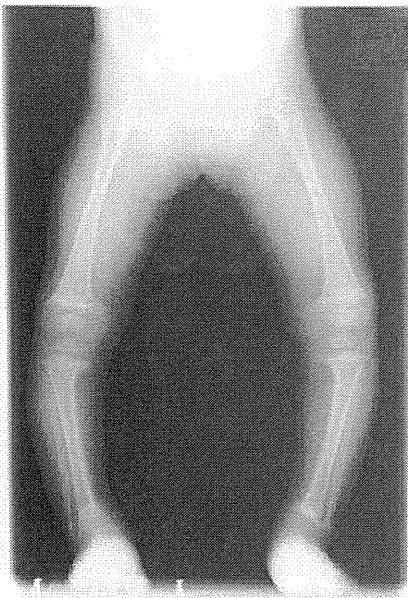


図1. 単純X線でのくる病所見

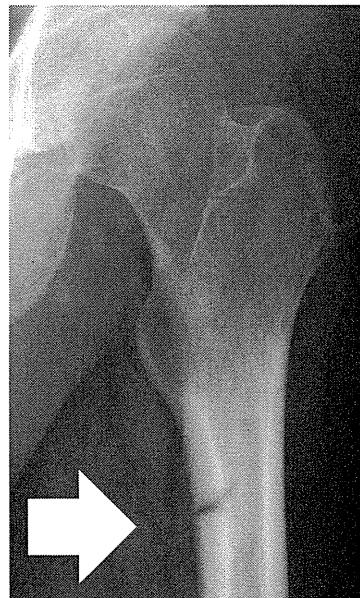


図2. Looser's zone

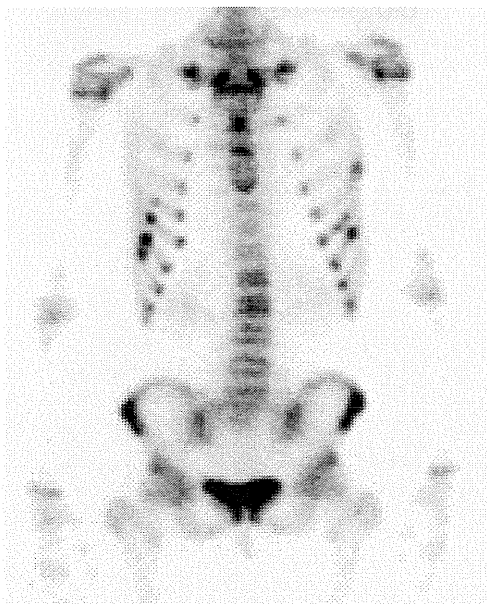


図3. 骨シンチグラフィーでの多発取り込み

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 phosphate concentration. Lancet 1975; 2: 309-310)を用い、血中リン濃度と C_{PO_4}/C_{creat} (あるいはTRP)を結ぶ直線がTmP/GFR軸と交わる値より求める。基準値 2.3 - 4.3 mg/dl。

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

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

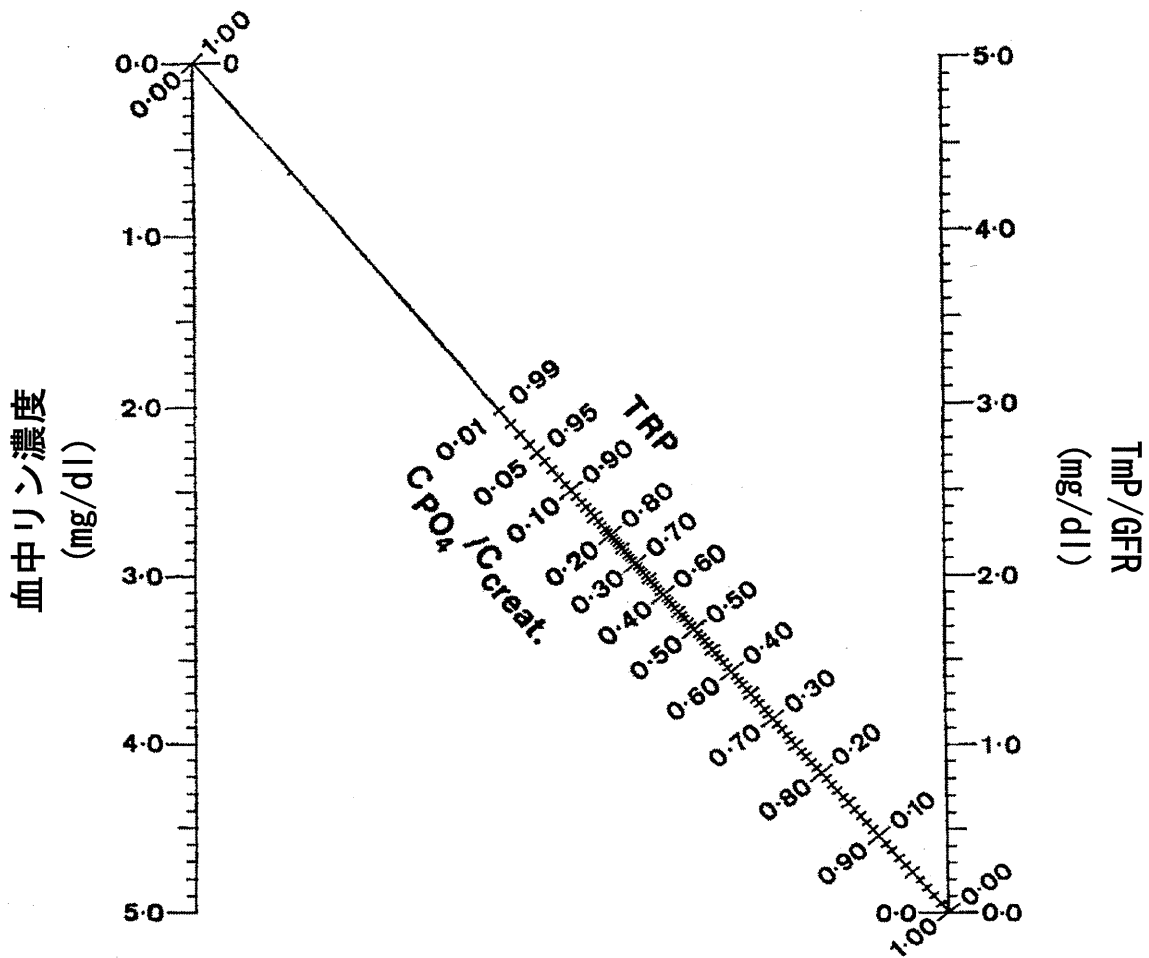


図4. TmP/GFR算出のためのノモグラム

【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、テトラサイクリン標識での二重標識の消失によってなされる。ただし実際には、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。

くる病の臨床診断は、単純 X 線所見でのくる病所見と生化学所見、および臨床症状によりなされる。

骨軟化症は、骨粗鬆症などの各種他疾患と混同される場合が稀ではないものの、症状とともに、大部分の症例で低リン血症や高骨型アルカリホスファターゼ血症が存在し、骨シンチグラフィーでの多発性取り込みや単純 X 線像での Looser' s zone が認められることが診断の一助となる。

【鑑別を要する疾患、混同されやすい疾患】

低骨密度：骨粗鬆症、腎性骨異常栄養症など

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

骨シンチグラフィーでの多発取り込み：骨転移

くる病様骨変化：低ホスファターゼ症

【病因とその鑑別】

骨石灰化を障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)。ただしビタミン 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。このビタミン D 欠乏の診断は、血中 25-水酸化ビタミン D [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-水酸化ビタミン D [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。また、近年ビタミン D 不足や欠乏の頻度が高いことが報告されている。従って他の病因によるくる病・骨軟化症に、ビタミン D 欠乏が合併する可能性を考慮しておく必要がある。

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 5 に、また各種病因によるくる病・骨軟化症の代表的生化学所見を表 3 に示す。典型的な症例ではこれらの図表により、くる病・骨軟化症の病因の鑑別が可能である。ただし実際の症例では、前述のように複数の病因が関与している場合がある。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。

FGF23 関連低リン血症性疾患診断の手引

以下の①および②を満たす場合、FGF23 関連低リン血症性疾患と考えられる。

① 慢性の低リン血症の存在

成人 < 2.5 mg/dl

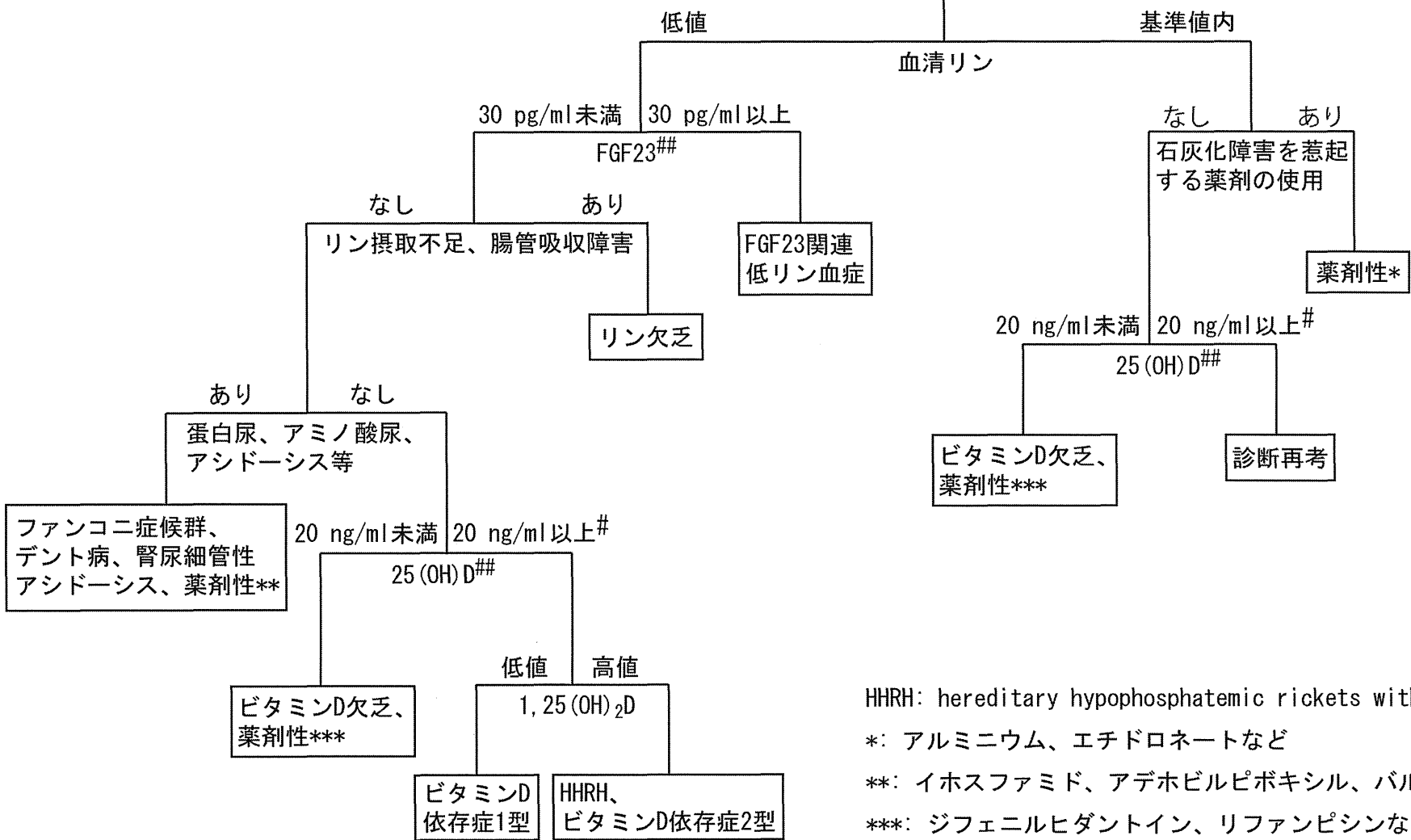
小児 < 3.5 mg/dl

乳児 < 4.5 mg/dl

② FGF23 30 pg/ml 以上*

*Kainos 社製キットによる全長 FGF23 測定を用いる。

くる病・骨軟化症



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。

図 5. くる病・骨軟化症の病因鑑別フローチャート

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尿症を伴う遺伝性低リン血症性くる病・骨軟化症³⁾ (hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: HHRH)

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

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

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

表3. くる病・骨軟化症の主な病因の生化学所見

| | 血清カルシウム | 血清リン | TmP/GFR | 骨型アルカリホスファターゼ | 1, 25(OH) ₂ D | 25(OH)D | FGF23 |
|------------------|---------|------|---------|---------------|--------------------------|---------|-------|
| FGF23 関連低リン血症 | →↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↓→ | → | ↑ |
| リン欠乏 | → | ↓ | ↑ | ↑ | →↑ | → | ↓→ |
| ファンconi症候群 | → | ↓ | ↓ | ↑ | ↓→ | → | ↓→ |
| ビタミンD 依存症 1 型 | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ | → | ↓→ |
| ビタミンD 依存症 2 型 | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | → | ↓→ |
| HHRH | → | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | → | ↓→ |
| ビタミンD 欠乏 | ↓→ | ↓→ | ↓→ | ↑ | →↑↓ | ↓ | ↓→ |
| アルミニウム、エチドロネートなど | → | → | → | ↑ | → | → | → |

↓↑: 他疾患との鑑別に特に有用な検査所見を示す。

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、骨芽細胞／骨細胞における 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。また、XLH 患者の骨組織においては骨細胞周囲に低石灰化領域を認め、治療後も残存することから、骨芽細胞／骨細胞の内在的な機能異常が XLH の病態形成に大きく関与することが示唆される。そこで、本研究においては、*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詳細に解析した。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* 由来の骨細胞において *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いた。また、*Dmp1* をはじめとする SIBLINGs ファミリー蛋白質のリン酸化に関わる *Fam20C* の発現も、*Hyp* 由来の骨芽細胞／骨細胞で増加していた。*Hyp* 骨における *Fgf23*、*Dmp1* 及び *Fam20C* の発現増加は胎児期より観察された。XLH 妊婦の管理においては、児の出生後、速やかに FGF23 測定を行い、児が罹患しているかどうかを診断し、早期に治療を開始することが身長予後の改善につながると考えられる。また、III 型ナトリウム／リン酸共輸送担体 *Pit1* の発現は、20 週齢の *Hyp* 由来骨芽細胞／骨細胞においては著明に増加していたが、*Hyp* 胎仔骨においては増加を認めなかったことから、出生後、母体からの経胎盤リン輸送の途絶による血清リン値の低下に伴い、代償的に増加することが示唆された。さらに、XLH においては通常、リン酸塩と活性型ビタミン D の併用による治療が行われるところから、単離した初代骨細胞を用いて無機リン酸や活性型ビタミン D に対する応答性を検討した。WT 及び *Hyp* 由来のいずれの細胞においても、*Dmp1* の発現がリン刺激により増強し、活性型ビタミン D により抑制された。以上より、リンの恒常性維持においては、*Phex*、*Dmp1*、*Fgf23*、*Fam20C* の機能的連関が重要な役割を担っており、骨細胞は活性型ビタミン D や細胞外無機リン酸などの液性因子のシグナルを直接受容して遺伝子発現を変化させることによりリン代謝調節に関与することが示唆された。

A. 研究目的

遺伝性低リン血症性くる病のうちで最も頻度の高い 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。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。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。また、

XLH の骨組織においては、骨細胞周囲に低石灰化領域が認められ、治療後にも残存するところから、骨芽細胞／骨細胞の機能異常が推定されてきた。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 の病態を明らかにし、効果的な治療プロトコー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'側に欠失を有し、XLH のモデルとして確立されている *Hyp* マウスを実験に用いた。20 週齢の雄性 *Hyp* (*Phex^{Hyp}/Y*) あるいは野性型 (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) リン代謝関連遺伝子の発現解析

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 胎仔の骨における遺伝子発現についても検討を行った。*Dmp1* の発現については、免疫染色も行った。

3) 初代骨細胞の細胞外無機リン酸濃度変化及び活性型ビタミン D に対する応答性

Hyp マウス及び WT マウスより上述の方

法で単離した初代骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋し、1 mM (正常血清中の濃度) または 10 mM (高濃度) の無機リン酸存在下にて 24 時間培養した後に RNA を抽出し、real-time PCR により遺伝子発現を解析した。また、薬理量である 10^{-8} M の 1,25 位水酸化ビタミン D に対する応答性についても検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は、当該施設 (大阪府立母子保健総合医療センター研究所) の動物実験委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) マウス骨からの初代骨芽細胞／骨細胞単離法の確立

WT マウス長管骨より単離した細胞について骨芽細胞マーカーである *Keratocan*、骨細胞マーカーである *Sost* の発現を検討した結果から、前述の方法により段階的に回収した細胞集団のうち(Fraction 1-9)、Fraction 3-5 が骨芽細胞に相当し、EGTA による脱灰を開始した後に回収された Fraction 6-9 が骨細胞に相当することが示唆された。*Hyp* 骨より単離した細胞においても同様に、Fraction 3-5 で骨芽細胞、Fraction 6-9 で骨細胞に富む細胞集団が回収されることを確認した。

2) *Hyp* 骨細胞における *Fgf23*、*Dmp1* 及び *Fam20C* の発現増加

20 週齢の雄性 *Hyp* 及び WT マウスより上述の方法により単離した新鮮な骨芽細胞、骨細胞より RNA を抽出し、リン代謝関連分子の発現を検討した。*Hyp* 由来細胞については WT 細胞と比較して *Fgf23* 発現の増加を認めた。また、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* 由来細胞では著明に増加していた。抗 *Dmp1* 抗体を用いた免疫染色においても、*Hyp* マウスの骨においては、骨細胞周囲の染色性の増加を認めた。

Fam20C は分泌型キナーゼで、*Dmp1* をはじめ生物学的石灰化に関わる SIBLINGs ファミリーの蛋白質をリン酸化する。また、*Fam20C* ノックアウトマウスは低リン血症性くる病を呈することが報告されている。今回、単離した骨芽細胞、骨細胞における *Fam20C* の発現を検討したところ、*Hyp* 由来の細胞で発現の増加を認めた。

Hyp 由来骨細胞で認められた *Fgf23*、*Dmp1*、*Fam20C* の発現上昇の出現時期を明確にするため、E18.5 の雄性胎仔より摘出した骨の遺伝子発現を検討した。*Hyp* 胎仔の骨では WT 胎仔の骨と比較して *Fgf23*、*Dmp1*、*Fam20C* の発現がいずれも増加していた。一方、III 型ナトリウム／リン酸共輸送担体 *Pit-1* の発現についても検討したところ、20 週齢成獣マウス由来の骨芽細胞／骨細胞においては、*Hyp* 細胞で増加を認めたが、血清リン値が低下していない胎仔期には WT との間に差を認めなかった。このことから、*Pit-1* の発現は、出生後に血清リン値の低下にともない、代償的に増加することが示唆された。

3) 初代骨細胞の無機リン酸及び活性型ビタミンに対する応答性

24 時間の高濃度 (10 mM) リン酸刺激は、*Hyp* 及び WT のいずれの骨細胞においても、*Dmp1* の発現を増加させ、骨細胞が細胞外無機リン酸濃度変化にたいして応答性を示すことが明らかとなった。*Fgf23* の発現は、24 時間のリン酸刺激では明らかな変化を示さなかった。また、24 時間の 1,25 位水酸化ビタミン D による刺激は、*Hyp* 及び WT のいずれの骨細胞にお

いても、*Dmp1* の発現を著明に抑制した。

D. 考察

今回の検討から、*Hyp* マウスにおける *Phex* の機能喪失は *Fgf23* に加えて *Dmp1* 及び *Fam20C* の発現増加をもたらすことが明らかとなった。*DMP1* の機能喪失型変異に基づく ARHR の患者や *Dmp1* ノックアウトマウスにおいては FGF23 の産生増加が報告されており、*Dmp1* は *Fgf23* の産生に対して抑制的に働くと推察されることから、*Hyp* 骨細胞において *Fgf23* と *Dmp1* の発現が共に増加していることは興味深い。また、*Fam20C* ノックアウトマウスも FGF23 の上昇、低リン血症性くる病を呈することが報告されており、*Hyp* マウスの骨細胞において *Fam20C* の発現も増加していたことは、*Phex*、*Dmp1*、*Fgf23* 及び *Fam20C* の間の密接な機能的連関がリン代謝調節において重要な役割を担っていることを示唆する。XLH は FGF23 の産生過剰により尿中リン酸排泄増加、活性型ビタミン D 値の低下を来す FGF23 関連性低リン血症性くる病であるが、今回、*Hyp* マウスの骨細胞において *Dmp1* や *Fam20C* の発現が増加していたことから、これらの分子の発現増加も XLH の病態形成に関与していることが推察される。

Hyp マウスにおいて、胎仔期より骨での *Fgf23*、*Dmp1*、*Fam20C* の発現が増加していたことから、出生後、胎盤を介する母体からのリン供給の途絶にともない、症状が出現することが予測される。従って、XLH 妊婦の管理においては、児の出生後、速やかに FGF23 測定を行い、児が XLH に罹患しているかどうかを診断し、早期に治療を開始することが身長予後の改善につながると考えら

れる。

E. 結論

リンの代謝調節においては Phex、Fgf23、Dmp1 及び Fam20C の機能的連関が重要な役割を担っており、XLH においては FGF23 の上昇に加え、DMP1 や FAM20C の発現異常が病態形成に関わると考えられた。また、XLH 妊婦の管理において、児の出生後速やかな FGF23 測定による診断確定と管理が必要であることが推察された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K, Michigami T: Vinculin functions as a regulator of chondrogenesis. *J Biol Chem*, 287(19):15760-15775, 2012.

Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, Kubota T, Hirai H, Higuchi C, Tsumaki N, Yoshikawa H, Sakai N, Michigami T, Ozono K.: An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One*, 7:e42180, 2012

Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T: FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble α -Klotho both in vivo and in vitro. *J Biol*

Chem, 288(4):2414-2427, 2013.

2. 学会発表

道上敏美: 骨細胞と骨外臓器との連関. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

小林郁江, 今西康雄, 永田友貴, 山形雅代, 蔵城雅文, 石村栄治, 道上敏美: 骨軟化症を合併する抗ミトコンドリア抗体 (M2)陽性 Fanconi 症候群の近位尿細管では NaPi-2c と共にメガリンの発現も低下する. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

山崎美和, 宮川和晃, 大幡泰久, 川井正信, 大菌恵一, 道上敏美: FGF23 の血中分泌過程における破骨細胞性骨吸収の関与の可能性. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

川井正信, 木下さおり, 大幡泰久, 宮川和晃, 山崎美和, 大菌恵一, 道上敏美: FGF23 は可溶性 klotho 存在下で軟骨細胞の増殖・成熟を抑制する. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

川井正信, 木下さおり, 大幡泰久, 大菌恵一, 道上敏美: FGF23 は軟骨細胞増殖をリン代謝非依存性に抑制し, X連鎖性低リン性くる病に伴う低身長の一因となりうる. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会, 大阪, 2012.9.27-29.

Yamazaki M, Miyagawa K, Ohata Y, Kawai M, Ozono K, Michigami T: Osteoclastic bone resorption might be involved in the secretion of FGF23 into circulation. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, U.S.A. ,

2012.10.12-15.

Kawai M, Kinoshita S, Ohata Y,
Miyagawa K, Yamazaki M, Ozono K,
Michigami T: FGF23 suppresses
chondrocyte proliferation and maturation
in the presence of soluble α -Klotho both in
vitro and in vivo. 34th Annual Meeting of
the American Society for Bone and
Mineral Research, Minneapolis, U.S.A. ,
2012.10.12-15.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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 24 年度分担研究報告書

常染色体優性低 Ca 血症（ADH）モデルマウスの検討

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

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：

我々はこれまでに Ca 感知受容体 (CaSR) 阻害薬 (calcilytics) による常染色体優性低 Ca 血症 (ADH) 治療の有効性について、変異 CaSR 遺伝子を導入した細胞を用い *in vitro* で示してきた。今回、わが国で報告されている CaSR 活性型変異 C129S を導入したノックインマウスを作成し、calcilytics の添加が CaSR シグナルに及ぼす影響について解析した。このノックインマウスでは、ADH と同様の Ca 代謝異常が認められた。さらに calcilytics は野生型マウスの Ca 代謝に殆ど影響を及ぼさない投与量で、ノックインマウスの Ca 代謝異常を是正した。以上の結果から、*in vivo* においても ADH に対する calcilytics の有効性が認められ、特効薬となりうる可能性が示された。

A. 研究目的

カルシウム感知受容体 (CaSR) 活性型変異による常染色体優性低 Ca 血症 (ADH) では、低 Ca、高 P 血症といった副甲状腺機能低下症と同様の所見がみられる。ADH の治療においては、活性型ビタミン D₃ 投与は高 Ca 尿症をきたしやすく、腎石灰化、腎結石、腎不全のリスクとなることが知られている。また PTH 補充を行っても腎結石や骨石灰化異常が出現することから、本症に対しては新たな治療法の確立が必要である。CaSR 阻害薬 (calcilytics) は CaSR 阻害作用を介して PTH 分泌促進作用を有することから、ADH 治療に利用できる可能性がある。我々はこれまでに、HEK 細胞に我が国で報告されている 7 種のヒト CaSR 活性型変異を導入すると細胞外 Ca 増加に対する細胞内 Ca 上昇反応の亢進が再現され、これらの細胞に calcilytics を添加すると用量依存的な CaSR 阻害作用を発揮し、ADH に見られる異常が是正されることを示してきた。そこで今回は CaSR 活性型変異遺伝子を導入したノックインマウスを作成し calcilytics が ADH の病態を是正し得るか否かを *in vivo* で検討した。

B. 研究方法

ADH に見られる CaSR 活性型変異のうち、細胞外ドメインの C129S 変異と、細胞膜貫通ドメインの A834E 変異をマウス CaSR 遺伝子領域に導入したノックインマウスを作製し、calcilytics がこれらのマウ

スの Ca 代謝指標に及ぼす効果を検討した。

C. 研究結果

ノックインマウスにおいては、片アレルにおいてマウス CaSR 開始コドン部にヒト活性型変異 CaSR が挿入されており、マウス CaSR はフレームシフトにより発現しないことを確認した。より重症の ADH 患者由来の A843E 変異を導入したノックインマウスは生殖能力が低く、今回は検討が行えなかった。C129S 変異 CaSR ノックインマウスでは、低 Ca・高 P 血症、高 Ca 尿症、低 P 尿症といった、ADH の表現型が再現できた。Calcilytics 1mg/kg を連日投与したところ、血清 intact PTH は野生型マウスではほとんど変化がみられないのに対して、ノックインマウスでは投与後 30 分で有意な上昇がみられた。これに伴い、血清 Ca はノックインマウスでは投与後 4 時間で有意に上昇し、尿中 Ca 排泄は投与後 2 日目で野生型マウスの前値レベルまで低下した。血清 P は、野生型、ノックインマウスとも有意な低下がみられ、ノックインマウスでは投与後 4 時間で野生型マウスの前値レベルまで低下した。

D. 考察

Calcilytics は、野生型マウスの Ca 代謝指標をほとんど変化させない投与量で、細胞外ドメインの C129S 変異ノックインマウスに見られる ADH 患者と同様の病態を是正したことから、ADH の特効薬たり得る可能性が示された。今後さらに、より重症例である細胞膜貫

通ドメイン A834E 変異ノックインマウスに対する有効性や至適投与量について検討を行うとともに、長期投与が骨や腎などに及ぼす影響を活性型ビタミン D や PTH 製剤と比較しつつ検討する必要がある。

E. 結論

Calcilytics は in vitro に加え CaSR 変異ノックインマウスを用いた in vivo の検討においても ADH の病態に対し有効である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuriwaka-Kido R, Kido S, Miyatani Y, Ito Y, Kondo T, Omatsu T, Dong B, Endo I, Miyamoto K-I, Matsumoto T 2013 Parathyroid Hormone (1-34) Counteracts the Suppression of Interleukin-11 Expression by Glucocorticoid in Murine Osteoblasts: A Possible Mechanism for Stimulating Osteoblast Differentiation against Glucocorticoid Excess. **Endocrinology**, in press
2. Hagino H, Takano T, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T, Matsumoto T 2013 Eldecalcitol reduces the risk of severe vertebral fractures and improves the health-related quality of life in patients with osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, in press
3. Hagino H, Shiraki M, Fukunaga M, Nakano T, Takaoka K, Ohashi Y, Nakamura T, Matsumoto T 2012 Three years of treatment with minodronate in patients with postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Metab** 30:439-446
4. Ikegame A, Ozaki S, Tsuji D, Harada T, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Nakano A, Kagawa K, Takeuchi K, Abe M, Watanabe K, Hiasa M, Kimura N, Kikuchi Y, Sakamoto A, Habu K, Endo M, Itoh K, Yamada-Okabe H, Matsumoto T 2012 Small molecule antibody targeting HLA class I inhibits myeloma cancer stem cells by repressing pluripotency-associated transcription factors. **Leukemia** 26:2124-2134
5. Kagawa K, Nakano A, Miki H, Oda A, Amou H, Takeuchi K, Nakamura S, Harada T, Fujii S, Yata K-I, Ozaki S, Matsumoto T, Abe M 2012 Inhibition of TACE Activity Enhances the Susceptibility of Myeloma Cells to TRAIL. **PLoS ONE** 7:e31594
6. Matsumoto T 2012 Osteoporosis Treatment by a New Active Vitamin D3 Compound, Eldecalcitol, in Japan. **Curr Osteoporos Rep** 10:248-250
7. Matsumoto T, Endo I 2012 Eldecalcitol for the treatment of osteoporosis. **Drugs Today (Barc)** 48:189-196
8. Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R, Kondo T, Endo I, Kido S 2012 Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling [Review]. **Endocr J** 59:91-101
9. Nakamura T, Matsumoto T, Sugimoto T, Shiraki M 2012 Dose-response study of denosumab on bone mineral density and bone turnover markers in Japanese postmenopausal women with osteoporosis. **Osteoporos Int** 23:1131-1140
10. Nakano A, Miki H, Nakamura S, Harada T, Oda A, Amou H, Fujii S, Kagawa K, Takeuchi K, Ozaki S, Matsumoto T, Abe M 2012 Up-regulation of hexokinaseII in myeloma cells: targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate. **J Bioenerg Biomembr** 44:31-38
11. Okazaki R, Hagino H, Ito M, Sone T, Nakamura T, Mizunuma H, Fukunaga M, Shiraki M, Nishizawa Y, Ohashi Y, Matsumoto T 2012 Efficacy and safety of monthly oral minodronate in patients with involutional osteoporosis. **Osteoporos Int** 23:1737-1745
12. Shiraki M, Saitoh H, Matsumoto T 2012 Eldecalcitol normalizes bone turnover markers regardless of their pre-treatment levels. **Curr Med Res & Opinion** 28:1547-1552