

201231141A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究
平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大藪恵一

平成25年（2013年）3月

序文

本報告書は、厚生労働省難治性疾患克服事業「重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究」研究班（平成24-25年度）の初年度の研究成果をまとめたものであります。

まず、簡単に本研究を実施する背景を述べさせていただくと、現在、骨系統疾患をとりまく環境が大きく変化していることがあげられます。すなわち、重症型の骨系統疾患患者では呼吸機能が不十分で人工呼吸管理が必要で、胎外生活への適応がうまくできませんでした。従来、この重症型を致死型と称して長期生存が望めない病型であると分類していました。しかし、新生児医療の発達により呼吸管理法が進歩し、さらには原病に対する治療、すなわち酵素補充療法、骨髄移植療法などの新規治療法が開発されて、重症型の骨系統疾患は救命できる疾患となってきました。本研究では、まず、本邦における重症骨系統疾患の現状を把握するために、複数の疾患に対して全国施設を対象として、診断名、合併症、転帰などに関して調査研究を行いました。その上で、骨系統疾患に伴う肺低形成の呼吸管理の至適条件を検討し、さらなる予後の改善を目指します。また、正確な診断は治療の選択や予後判定を行うための基本となりますので、ホームページに診断の相談窓口を設け、多数の責任遺伝子について変異解析を行うようにしております。骨系統疾患に伴う乳歯脱落、歯牙欠損などを対象に実態調査を行い、歯科的問題の実態を明らかにします。これらの結果を踏まえ、各疾患個別の診断と管理のガイドラインを作成していく予定です。患者会等との連携により、成果を普及させていく事も重要な班研究の柱としております。また、新たな治療法の開発のため、モデル動物を用いて、CNP(C型Na利尿ペプチド)治療効果を検討し、さらに、骨系統疾患特異的iPS細胞を作成し、新規治療法の開発と有効性の検討ができる基盤作りを行うよう計画しております。

本班研究では、重症骨系統疾患の予後改善を目的として、新生児科、小児科、整形外科、歯科、内科、産科などの集学的研究を行い、この分野の発展に寄与したいと考えております。本研究事業の遂行に、ご理解、ご支援を賜ります様よろしくお願いいたします。

平成25年3月

主任研究者 大藪恵一

重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究班

	氏名	所属	職名	役割分担
研究代表者	大菌恵一	大阪大学大学院医学系研究科小児科学	教授	低フォスファターゼ症、C型Na利尿ペプチドシグナル異常症に関して
研究分担者	中村友彦	長野県立こども病院	副院長	呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究
	橋本淳	国立病院機構大阪医療センター・免疫疾患センター	部長	過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究
	藤原幾磨	東北大学大学院医学系研究科	准教授	致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立
	道上敏美	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所環境影響部門	部長	大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究
	八十田明宏	京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌・代謝内科学	講師	CNP関連疾患・CNP治療に関する研究
	仲野和彦	大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学	准教授	骨系統疾患における歯科的問題に関する研究
	長谷川高誠	岡山大学病院	助教	FGFR3関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究・致死性骨異形成症及びSADDAN症候群の実態に関する研究
	澤井英明	兵庫医科大学産科婦人科学	准教授	胎児骨系統疾患の症例調査と診断支援（平成25年度より）
研究協力者	佐藤俊哉	京都大学大学院医学研究科医療統計学	教授	統計
	長谷川久弥	東京女子医科大学東医療センター新生児科	教授	呼吸管理
	難波範行	大阪大学大学院医学系研究科小児科学	助教	データ整理
	窪田拓生	大阪大学大学院歯学部顎口腔病病因病体制御学	助教	データ整理
	澤田健二郎	大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学教室	講師	産科情報
	菅野潤子	東北大学大学院医学系研究科小児科医師育成寄付講座	助教	データ整理
	大川玲奈	大阪大学大学院歯学部小児歯科学	助教	データ整理

目 次

I. 総括研究報告		
研究代表者	大菌恵一	-----1
II. 分担研究報告		
1. 研究代表者	大菌恵一	----- 14
2. 分担研究者	中村友彦	----- 18
3. 分担研究者	仲野和彦	----- 21
4. 分担研究者	藤原幾磨	----- 24
5. 分担研究者	道上敏美	----- 27
6. 分担研究者	長谷川高誠	----- 32
7. 分担研究者	八十田明宏	----- 36
8. 分担研究者	橋本淳	----- 39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 40
IV. 疾患概要		----- 43
V. 実施アンケート		----- 54
VI. 業績別刷		----- 58

I . 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究
(総括) 研究報告書

代表研究者 大菌恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教授

研究要旨

平成 21～23 年度の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」班において策定した低フォスファターゼ症診断指針について、当研究班ホームページ(HP)で引き続き公開し、周知に努めた。この HP を通じて、あるいは直接の相談により、主治医から本研究班にコンサルトされて遺伝子解析が行われた症例の数は、今年度は 9 例であった。日本人の本症において 2 番目に多い F310L 変異 (p. F327L) 変異が周産期発症良性型に関連することについて周知を図った。小児科・産科・新生児科医療機関を対象として、2003 年～2012 年の 10 年間の低フォスファターゼ症の診療経験に関するアンケート調査を行った。その結果、28 例の呼吸管理例が把握され、23 例は生存していた。遺伝子診断を施行された症例は 25 例存在し、本症における遺伝子診断の重要性が認識されていると考えられた。本症に対する酵素補充療法の国際共同治験が行われる事となり、大菌は日本の治験責任者として、5 症例の治験導入に関わった。

CNP(C 型 Na 利尿ペプチド)シグナルが軟骨成長を促進する事が近年報告され、軟骨無形成症等の低身長を呈する骨系統疾患の治療薬として期待されている。CNP に対する受容体 NPR-B の機能獲得型変異を有する家系を見だし、過成長による高身長を呈する事を世界で初めて報告した。さらに異なる NPR-B 変異を有する 2 例目の高身長家系を見だし、新たな疾患単位として確立した。

CNP/NPR-B 系の賦活化はヒトの重症骨系統疾患に対する新たな薬物治療戦略となることが期待される。新たに同定された機能低下型の CNP 遺伝子変異マウスおよび軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスを用いて、CNP/NPR-B 系の生理的な骨伸長促進作用に関する解析をおこなった。

全国の主要 NICU での重症骨系統疾患児の現状を把握するために、全国の総合周産期母子医療センター 89 カ所を対象に 2006 年 1 月～2011 年 12 月まで 5 年間の「人工呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の実態調査」をおこなった。49%の施設が骨系統疾患児の人工呼吸管理の経験があり、全症例数は 87 例であった。疾患としては骨形成不全症 12 例、致死性骨異形成 11 例、軟骨無/低形成症 8 例、点状軟骨異形成症 6 例、低フォスファターゼ症 3 例、などであった。87 例中 28 例 (32%) が自宅へ退院できておりそのうち 22 例は気管切開+在宅人工呼吸で退院し、3 名は在宅酸素療法で退院していた。疾患別の検討では、骨形成不全症は 12 例中 6 例、軟骨無/低形成症は 8 例中 5 例が退院しているのに対し、致死性骨異形成症は 11 例中 2 例の退院に留まっており、疾患による差が大きいことが明らかとなった。

低フォスファターゼ症に関して、全国の歯科領域施設に対する実態調査を行い、23 名の患児における詳細な情報が得られた。その結果、約 80%の患児において乳歯、特に下顎乳前歯の自然脱落が 4 歳頃までに生じていることが分かった。多数の乳歯が自然脱落した症例において小児義歯の装着を行ったところ、審美性の回復に加えて、咀嚼および発音機能が向上する可能性が示唆された。さらに、低フォスファターゼ症モデルマウスの下顎骨を用いた免疫組織学的研究において、遺伝子治療が歯科的症状の改善にも有効であることが示された。

骨形成不全症患者の遺伝子解析を行い、遺伝子変異と表現型との関連について検討した。19 家系中 74%に 1 型コラーゲン遺伝子 (*Col1A1*, *Col1A2* のいずれか) の変異を認めた。変異陽性者のうち、Gly から Ser への変異を認める群が、その他の変異を認める群に比しより重症な表現型を呈していた。パミドロネートによる治療効果 (腰椎骨密度 SD スコアの変化) と、病型、変異遺伝子、遺伝子型との間には、統計学的有意差は認めなかった。

本邦における乳児悪性型大理石骨病の診療の実態を把握するため、新生児科、小児科医療機関を対象とし、2003 年～2012 年の 10 年間の乳児大理石骨病の診療経験に関するアンケート調査を行った。その結果、10 例が把握され、80%の症例が骨髄移植を受けていることが明らかとなった。一方、遺伝子診断を施行された症例は 20%にとどまっていたことから、大理石骨病の遺伝子診断の体制の確立が急務であることが明らかとなった。遅発型大理石骨病 3 例について遺伝子診断を行い、2 例について

クロライドチャネル7 (*CLCN7*) 遺伝子の変異を同定した。

軟骨低形成症は線維芽細胞増殖因子受容体3型 (fibroblast growth factor receptor type 3: FGFR3) 遺伝子の変異によって引き起こされる四肢短縮型低身長症であるが、21名の軟骨低形成症疑い患者に対してFGFR3 遺伝子解析を行い、8名に既知の変異を認めた一方で、他の疾患であった患児(4名)や体質性低身長症が疑われた患児も認めた。これらの事から臨床所見のブラッシュアップによりある程度他疾患の紛れ込みを防ぐ事が出来ると考えられた。日本における致死性骨異形成症の診療の実態について小児科、産婦人科施設に対してアンケート調査を送付し調査を行った。その結果、小児科施設において13名、産科施設において3名の生存例があることが判明した。

骨系統疾患治療歴のある全国146施設に郵送で、過剰運動症候群、若年発症の骨パジェット病、重症の遺伝性多発性外骨腫の診療状況調査を行い、その頻度と重症度情報を得た。

A. 研究目的

骨系統疾患は、骨/関節のみならず全身的な症状を呈するが、重症型では呼吸機能が不十分で人工呼吸管理を要する。従来、この重症型を致死型と称して人工流産の対象としていた。しかし、新生児医療の発達により呼吸管理法が進歩し、原病に対する治療、酵素補充療法など新規治療法が開発されてきたので、重症骨系統疾患をとりまく環境は大きく変化している。本研究では、まず、複数の重症骨系統疾患を対象とし、呼吸管理を行っているかどうかを含め、診療の実態について調査研究を行う。また、正確な診断のために、多数の遺伝子について変異解析を行う。骨系統疾患に伴う乳歯脱落、歯牙欠損などを対象に実態調査を行い、歯科的問題の実態を明らかにする。研究者および患者会のネットワークづくりのため、骨系統疾患解説のホームページ(HP)を作成し、最新の情報を提供するとともに、患者会のHPとリンクさせる。アンケート調査などを踏まえて、各疾患個別の診断と管理のガイドラインを作成し、HPに掲載する。また、新たな治療法の開発のため、モデル動物を用いて、CNP(C型Na利尿ペプチド)治療効果の検討や、CNP/NPR-B系異常症の表現型の詳細な解析を行う。以下に、項目別に記載する。

1) 低フォスファターゼ症に対する診断指針の確立と新規治療法の開発(大菌恵一)

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。これまで、確立された治療法はなかったが、現在、ALP 酵素補充療法の国際共同治験が開始されたところである。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と有効性・安全性の評価をめざす。本症の患者会との連携やアンケート調査により、本症の実態を把握する。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、現時点で遺伝子診断に基づく正確な病型分類及び予後予測を行い、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す。

2) C型Na利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究(大菌恵一)

CNP/NPR-B/cGMP(cyclic GMP)シグナル系が内軟骨性骨化に重要であることが、近年、動物モデルおよびヒトの疾患において報告されている。すなわち、CNP 過剰症は過成長による高身長を呈し、受容体であるNPR-B(Na利尿ペプチド受容体B型)の機能喪失は低身長、四肢短縮を引き起こす。これらの知見により、CNP作用を増強することが、軟骨無形成症等の低身長を呈する骨系統疾患の治療薬のターゲットとして期待されている。NPR-Bの機能喪失型変異は四肢短縮と低身長を呈するが、これまで、本遺伝子の機能獲得型変異により引き起こされる疾患は知られていなかった。高身長と巨大母趾を呈する家系でNPR-B機能獲得型変異を疑い解析した。

3) 呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究 (中村友彦)

骨系統疾患は1万分娩に2.14の頻度で出生する。出生直後から人工呼吸管理を含めた集中治療を要する症例からほぼ通常と変わらない生活を送ることができる症例まで、その症状や予後は多岐にわたる。全国の主要NICUでの重症骨系統疾患児の現状を把握するための調査を行った。

4) 骨系統疾患における歯科的問題に関する研究 (仲野和彦)

骨系統疾患を有する患児では、歯科的問題点を有することが多いが、日常臨床で遭遇する頻度が少ないことから、包括的な実態調査やその対策の検討が遅れている。

本研究では、大阪大学歯学部附属病院小児歯科に受診している患児のうち、骨系統疾患を有している患児の歯科的問題点を検討し、その解決法を追究する。特に低フォスファターゼ症に関しては、全国規模の調査を行い、可及的に多くの症例で詳細な分析を行った。さらに、疾患モデル動物における歯科的問題点の分析を行うことで、骨系統疾患が及ぼす歯科的問題点におけるメカニズムの解明をめざした。

5) 致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立 (藤原幾麿)

骨形成不全症は先天的な1型コラーゲンの異常による疾患であり、骨脆弱性のため易骨折性を認める。軽症のものでは外傷により年1~2回程の骨折が見られる程度で、骨変形は来さないことが多い。しかるに重症のものでは、胎児期から骨化不全や全身骨の骨折を認め、四肢骨の変形のみならず、肋骨骨折を来して胸郭低形成となり、出生後呼吸不全を起こすため、最重症のものでは致死性である。

骨形成不全症には根本的な治療法はないが、ビスフォスフォネート製剤のうち特にパミドロネートが骨折頻度を減少させ、患者のQOL改善に効果があるとして、現在国際的にも骨形成不全症の標準的な治療となっている。しかるにパミドロネート注は骨形成不全症に保険適応ではないため、殆どの場合保険外投与となっており、また多くの輸液量を必要とするため幼弱小児患者に投与する際は、心肺腎各臓器への負担とならないよう配慮が必要である。

一方、骨形成不全症のうち最重症型は致死型

とも呼ばれ、胸郭低形成に伴う呼吸不全のため生後間もなく死亡する例が多く、積極的な治療が施行されなかったり、妊娠中に診断がついた時点で妊娠継続が中断されたりする例もある。しかし骨形成不全症患者の知能は正常であり、重症例であっても救命することには意義があると考えられる。

本研究の目的は、胎児期での適切な診断を行い、出生後呼吸管理とともにビスフォスフォネートにより生命予後を改善させる治療法を確立することである。

6) 大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究 (道上敏美)

大理石骨病は、骨吸収の障害に基づくび慢性骨硬化性病変の総称である。異質性が高く、予後不良な常染色体劣性型(乳児悪性型)、軽症の常染色体優性成人型(遅発型)の他、中間型、尿管型アシドーシスを伴う carbonic anhydrase II 欠損症などが存在する。乳児悪性型は骨髄機能不全、肝脾腫、進行性難聴や聴力障害などの症状を呈し、治療が行われなければ予後不良である。遅発型では骨折や骨髄炎などを起こす。近年、複数の責任遺伝子が同定されたが、これらは破骨細胞の形成や機能に関与する。乳児型大理石骨病を引き起こす責任遺伝子としては、これまでに5遺伝子が同定されている。空胞型プロトンポンプ a3 サブユニットをコードする *TCIRG1*、クロライドチャンネルをコードする *CLCN7*、マウスの *grey-lethal* のヒトオルソログである *OSTM1*、破骨細胞の分化や活性化、生存に関わる RANKL をコードする *TNFSF11*、RANKL に対する受容体 RANK をコードする *TNFRSF11A* である。遅発型の II 型は *CLCN7* のヘテロ変異により引き起こされるが、I 型は *LRP5* 遺伝子の機能獲得型変異に基づく。病型により病態や臨床症状、予後、治療が異なるため、遺伝子診断を含めた病型診断が重要である。こうした背景から、本研究の目的の一つは、確実な診断を提供するため、上述の複数の遺伝子を網羅する分子診断の体制を確立することである。

また、乳児悪性型大理石骨病は頻度が少なく、かつ予後不良であるところから、本邦の患者の実態については、これまで、まとまった研究がなされてこなかった。治療としては、正常な破骨細胞前駆細胞の供給を目的として造血幹細胞移植が行われるが、早期に移植がなされなければ、生命予後や、神経学的予後は不良である。

骨髄移植が必要であることや、多くの合併症が起りえることから、症例を詳細に解析し、乳児悪性型大理石骨病診療のための診療指針の作成を行うことは、厚生労働行政上も重要な課題であると考えられる。そこで、本研究においては、まず、本邦における乳児悪性型大理石骨病の診療の実態を調査・解析した。

また、低フォスファターゼ症の遺伝子解析を行い、臨床像と遺伝子型との関連性を解析した。

7) FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究（長谷川高誠）

軟骨低形成症 (hypochondroplasia:HCH) は線維芽細胞増殖因子受容体3型 (fibroblast growth factor receptor type 3:FGFR3) 遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされる四肢短縮型低身長症であるが、身体所見やレントゲン所見が軟骨無形成症と比べても軽度であり、正常児とのオーバーラップする部分もあることから診断が難しく、また他の疾患との混同も多く見受けられる疾患である。また頻度の多い軟骨無形成症と比して成長ホルモン治療による低身長の改善度合いは良く、正しい診断が患児達の身長予後を改善することが考えられる。

今回軟骨低形成疑いにて遺伝子解析依頼を受けた21名の児につきFGFR3遺伝子解析を行い、FGFR3遺伝子異常による軟骨低形成症の頻度及び変異が認められなかった児の他の原因疾患についても遺伝子解析を行った。

8) FGFR3 関連疾患：致死性骨異形成症及びSADDAN 症候群の実態に関する研究（長谷川高誠）

致死性骨異形成症 (Thanatophoric dysplasia:以下TD) はFGFR3の構成的活性化変異による軟骨異常症の中の一疾患であり、近位部優位の四肢の短縮、前頭部の突出、平坦な鼻根部の他に著しく狭い胸郭により出生時より呼吸困難を来し、致死的な経過を取る。その一方で周産期医療の進歩により気管内挿管下の呼吸管理を行うことで長期生存例も報告されている。

またSADDAN (Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans) 症候群も同様にFGFR3遺伝子の変異により著明な成長障害や呼吸障害を来すが、稀少な疾患出あるため日本における診療の実態は不明である。

このため今回現在の日本における致死性骨異

形成症およびSADDAN症候群に関する診療の現状について明らかにする目的で小児科、産婦人科医に対するアンケート調査を行った。

9) CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究（八十田明宏）

ナトリウム利尿ペプチドは生体内の生理活性ペプチドであり、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) およびC型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の3種類がある。その受容体は膜型グアニル酸シクラーゼそのものである2つのサブタイプ、GC-A (NPR-A) と GC-B (NPR-B) であり、ANP と BNP は NPR-A と、CNP は NPR-B と結合することによって生物作用を発揮する。このうち ANP と BNP はそれぞれ心臓の心房および心室から分泌される心臓ホルモンとしての循環器系における作用が知られていたが、八十田らはこれまでに、CNP およびその受容体 NPR-B が内軟骨性骨化に作用し、骨の伸長を促進することを、主に遺伝子改変マウスを用いた研究によって示してきた。一方で、NPR-B の機能喪失型変異が骨系統疾患の1型であるマロト型遠位中間肢異形成症の原因であることが報告され (*Am. J. Hum. Genet.* 2004)、さらに大菌らは、NPR-B の活性型変異による骨伸長促進の症例を報告しており (PLoS One 2012)、CNP/NPR-B 系の骨系統疾患に対する病態生理学的意義や、その賦活化による治療戦略も想定される。そのことを踏まえて今回、マウスを用いた CNP/NPR-B 系の骨伸長促進作用に関する基礎的な解析をおこなった。

10) 過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究（橋本淳）

過剰運動症候群、本邦での若年発症の骨パジェット病は極めてまれでありその頻度も不明である。遺伝性多発性外骨腫は稀ではないが、小児期に重症化する例は少なくその頻度は不明である。これら3疾患の国内での治療中の患者の有無を調査した。

B. 研究方法

全国の主要施設に対し、骨系統疾患の診療実態に関してアンケート調査を行った。なお、倫理面への配慮に関しては、遺伝子解析については、各施設の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。遺伝子組換えマウスの作製・使用に関しては、研究機関内で組換え DNA 実験計画書を提出して承認を得た。また、動物実験については、研究機関内において実施を承認されており、実験動物に対して苦痛を与えないよう、動物愛護に充分配慮した上で研究をおこなった。

1) 低フォスファターゼ症に対する診断指針の確立と新規治療法の開発(大藪恵一)

平成 21～23 年度の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」班において策定した低フォスファターゼ症診断指針については、本研究班においても継続して HP に掲載し、症例の相談（遺伝子解析を含む）窓口を設けた。

2003年～2012年の10年間の低フォスファターゼ症の診療経験に関するアンケート調査を行った。小児科については日本小児科学会専門医の在籍施設(合計521施設)、産婦人科については産科婦人科学会認定施設(合計707施設)に対して以下の項目についてのアンケートを送付し、調査を行った。

2) C 型 Na 利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究 (大藪恵一)

高身長と巨大母趾を呈する家系で NPR-B 機能獲得型変異を疑い解析した。

3) 呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究 (中村友彦)

全国総合周産期母子医療センター (89 施設-2012 年 9 月時点) を対象として、重症骨系統疾患児の現状を把握するための調査を行った。

4) 骨系統疾患における歯科的問題に関する研究 (仲野和彦)

①大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診中の患児における骨系統疾患の実態調査

大阪大学歯学部附属病院小児歯科の登録患者約 2000 人から骨系統疾患を有する患児を抽出し、病名、歯科的症状およびそれらへの対応について調査した。

②低フォスファターゼ症患児の歯科的所見に対する全国における実態調査

全国の小児歯科関連施設、口腔外科関連施設

および小児病院内の歯科 (合計 446 施設) に対して低フォスファターゼ症患児の受診の有無について問い合わせを行い、該当者が存在する場合は、病型、早期脱落乳歯および永久歯の有無とその時期、処置内容等の情報提供を依頼した。

③遺伝子治療を行った低フォスファターゼ症モデルマウスにおける歯科的所見の検討

TNSALP 遺伝子をレンチウイルスベクターで導入した骨髄細胞を生後 2 日齢のノックアウトマウスに移植し、3 か月生存したマウスの下顎骨を摘出後、パラフィン切片を作製し、オステオポンチン抗体の免疫組織化学染色を行い観察した。なお、この下顎骨サンプルは、日本医科大学大学院分子遺伝医学分野 島田 隆教授より供与を受けた。

5) 致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立 (藤原幾麿)

①骨形成不全症の遺伝子診断

骨形成不全症患者血液より DNA を抽出し、1 型コラーゲン遺伝子 (*Col1A1*, *Col1A2*) の解析を直接シーケンス法及び MLPA 法にて行う。上記 2 遺伝子に変異を認めない場合は、他の原因遺伝子 (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PP1B*, *FKBP10*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *SP7*, *PLOD2*, *IFITM5*) のシーケンスを行う。

②骨形成不全症の新たな治療法

ビスフォスフォネート製剤の一つで 2012 年に薬価収載された「ボナロン注 (アレンドロネート) は我が国で初めて骨粗鬆症治療薬として認可された点滴静注薬である。他のビスフォスフォネート製剤が骨形成不全症に有効であることを考えると、アレンドロネート注による治療が骨形成不全症に有効であることが予想される。しかるに、アレンドロネート注は小児に対する安全性が確立されておらず、ましてや重症型の新生児患者への投与経験は報告がない。

そこで、本研究では、アレンドロネート注の小児骨形成不全症患者への投与方法を確立し、その有効性と安全性について検討する。

6) 大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究 (道上敏美)

①乳児悪性型大理石骨病の診療に関する実態調査

新生児科及び小児科医療機関を対象に、2003 年～2012 年の 10 年間における乳児大理石骨病

の診療経験に関するアンケート調査を行った。

② 大理石骨病における遺伝子診断

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。上述したように、大理石骨病においては複数の責任遺伝子が同定されていることから、症例のX線像、血液検査所見に基づき、候補と考えられる遺伝子を選択し、変異を探索した。

③ 低フォスファターゼ症における遺伝子解析及び遺伝子型-表現型相関に関する検討

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遺伝子解析を行った。

1996年～2012年に当研究室で遺伝子解析を行った日本人の低フォスファターゼ症53例について、遺伝子型と表現型との相関性を検討した。

④ 変異型アルカリフォスファターゼの機能解析

低フォスファターゼ症において同定されたTNSALPの新規変異について、発現ベクターを構築し、培養細胞に遺伝子導入して残存活性を評価した。

7) FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究 (長谷川高誠)

HCH疑いでFGFR3遺伝子解析依頼のあった21名につき患者及び家族の同意を得て解析を行った。患者末梢白血球よりDNAを採取し、PCR-ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。FGFR3遺伝子異常を認めなかったものに関しては臨床情報やレントゲン所見の情報を元に原因疾患の解析を行った。

8) FGFR3 関連疾患：致死性骨異形成症及びSADDAN症候群の実態に関する研究 (長谷川高誠)

小児科については日本小児科学会専門医の在籍施設(合計521施設)、産婦人科については産科婦人科学会認定施設(合計707施設)に対して以下の項目についてのアンケートを送付し、調査を行った。

9) CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究 (八十田明宏)

① CNP 遺伝子変異マウス (*lbab/lbab*) の解析

これまでに、ヒトにおけるマロトー型遠位中間肢異形成症と同様に GC-B の機能喪失型遺伝子変異を有し、内軟骨性骨化の障害による骨伸長障害を示す自然発症突然変異マウス

が2系統 (*cn/cn* および *slw/slw*) 報告されていたが、八十田は CNP の遺伝子変異によってその活性が野生型の 10%程度に低下する自然発症突然変異マウス (*lbab/lbab*) について報告した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008)。今回、新たな自然発症 CNP/NPR-B 系活性低下モデルとしての *lbab/lbab* について、マウスの全長や軟X線写真による各骨長の測定、成長板の組織学的解析をおこない、CNP/NPR-B 系の骨伸長における生理的意義を検討した。

② 軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスの作製と解析

CNP/NPR-B 系の骨伸長促進作用が成長板軟骨における局所作用によるものか否かを明らかにするために、軟骨特異的発現を可能にする II 型コラーゲンプロモーターによる Cre トランスジェニックマウスを用いた Cre-loxP システムにより CNP の軟骨特異的ノックアウトマウスを作製し、その内軟骨性骨化により形成される骨の表現型をマウスの全長や軟X線写真による各骨長の測定、成長板の組織写真により解析し、完全ノックアウトマウスと比較した。

10) 過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究 (橋本淳)

日本整形外科学会骨系統疾患全国登録に過去7年間に症例登録が一例でも行っていた全国146施設に郵送調査を行った。質問は過剰運動症候群について疾患概念をしており診断経験があるかどうか、通院患者の年齢分布、遺伝性多発性外骨腫については歩行不能や呼吸管理に至る重症例の数、骨パジェット病に関しては20歳以下の若年発症例の有無を中心に行った。

C. 研究結果

1) 低フォスファターゼ症に対する診断指針の確立と新規治療法の開発 (大菌恵一)

① 低フォスファターゼ症実態調査、診断基準・治療指針の策定

低フォスファターゼ症の診断指針を当研究班 HP で掲載している。また、研究班 HP 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ているが、主治医からの症例

の相談および遺伝子検査の依頼が増加し、新たな症例の確定診断に有用であった。

本症の実態を把握するために、アンケート調査を行った。アンケートを送付した小児科研修施設 521 施設のうち回答があったのは 281 施設で、回答率は 52%であった。小児科を対象としたアンケート調査では、呼吸管理 28 例、痙攣 10 例、高カルシウム血症 21 例、看取り医療の選択 9 例、生存 23 例、遺伝子診断 25 例、出生前診断 12 例という結果であった。産科の施設においては、アンケートを送付した 707 施設のうち回答があったのは 191 施設で回答率は 27%であった。産科を対象としたアンケート調査では、呼吸管理 4 例、妊娠中絶 7 例、看取り医療の選択 9 例、生存 4 例、遺伝子診断 8 例、出生前診断 11 例という結果であった。

② 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。研究計画および説明同意書は倫理委員会の承認を受け、1 人の患者において、繊維芽細胞から iPS を作成することについて、同意を得た。

2) C 型 Na 利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究 (大菌恵一)

第 1 例目の NPR-B の機能獲得型異常症家系 (日本人家系) は英文原著の形で報告した。これに引き続き 2 つ目の機能獲得型変異を同定した。本邦の家系 (易骨折性あり、大腿骨頭すべり症なし) と表現型の相違点が認められた。

3) 呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究 (中村友彦)

過去 5 年間 [2006 年 1 月-2011 年 12 月末まで] に新生児病棟に入院した人工呼吸管理を必要とした重症骨系統疾患児骨系統疾患について全国アンケート調査結果を行った。

回答 : 75 回答 (84.2%)

質問 1. 新生児病棟において人工呼吸管理を必要としている (N-CPAP/DPAP, BiPAP 等含む) 長期入院患者の患児 (早産児を除く) を管理できる、貴院内の新生児病棟以外の病棟はありますか?

ある 38 (51.4%)

ない 36 (48.6%)

質問 2 : 上記長期入院患者管理病棟での主に担当となる医師は?

新生児科医師 10 施設

小児科医師 20 施設

複合した科 6 施設

その他 1 施設

質問 3 : 転棟可能な人工呼吸管理 (重複可)

N- CPAP 26 施設

(68.4%)

BiPAP 28 施設

(73.7%)

挿管による人工呼吸管理 37 施設

(47.4%)

気管切開で人工呼吸管 18 施設

(97.4%)

質問 4 : 転棟に当たっての必要条件? (重複可)

親の受け入れがある 27 施設 (71.1%)

在宅の意志がある 24 施設 (63.2%)

呼吸・循環が安定 32 施設 (84.2%)

胃瘻手術が済み 3 施設 (7.9%)

気管切開術 19 施設 (50%)

期間限定 8 施設 (21.1%)

質問 5 : 過去 5 年間 [に新生児病棟に入院した人工呼吸管理を必要とした重症骨系統疾患児がいましたか?

いる 37 施設 (49.3%)

いない 36 施設 (48.0%)

無回答 2 施設 (2.7%)

具体的病名と予後

骨形成不全症 : 12 症例

1. 生存退院、 6 例

2. 生存入院中 1 例

3. 転院 2 例

4. 入院中死亡 2 例

5. 退院後死亡 2 例

致死性骨異形性 : 11 症例

1. 生存退院、 2 例

2. 生存入院中 1 例

3. 入院中死亡 8 例

軟骨無/低形成症 : 9 症例

1. 生存退院、 5 例

2. 生存入院中 3 例

3. 転院 2 例

低ホスファターゼ症 : 3 症例

1. 生存退院、 1 例

2. 生存入院中 1 例

3. 転院 1 例

4) 骨系統疾患における歯科的問題に関する研究 (仲野和彦)

①大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診している患児における骨系統疾患の実態調査

本学歯学部附属病院小児歯科を受診している骨系統疾患を有する患児は36名であった。内訳としては、骨形成不全症が18名、低フォスファターゼ症が11名、低リン血症性くる病が4名、鎖骨頭蓋異形成症が1名、脊椎骨端骨異形成症が1名、軟骨無形成症が1名であった。

骨形成不全症の代表的な歯科的所見である象牙質形成不全は11名において認められた。

また、低フォスファターゼ症における乳歯の早期脱落に対する処置は、ほとんど行われていないようであった。本院を受診中の低フォスファターゼ症に罹患した女児において乳前歯部に8歯の早期脱落を認めた症例に対して、4歳11か月の時点で小児義歯の装着を試みた。

②低フォスファターゼ症患者の歯科的所見に対する全国における実態調査

合計23名の罹患児(男児12名、女児11名)に対する情報を得た。病型の内訳は、小児型が10名、歯限局型が7名、良性周産期型が4名、乳児型が1名であり、1名は不明であった。このうち、18名(78%)において乳歯の早期脱落が認められた。特に、下顎乳前歯に高頻度で認められ、4歳頃までに平均4本程度の自然脱落が生じることが明らかになった。一方で、永久歯では脱落がほとんど生じないようであった。

③低フォスファターゼ症モデルマウスを用いた検討

低フォスファターゼ症モデルマウスに対して遺伝子治療を施すと、オステオポンチンの発現が下顎切歯歯根表面に認められ、セメント質の形成が確認できた。しかし、ヘテロ型マウスと比較すると、オステオポンチンの発現は同程度までには回復していなかった。

5) 致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立 (藤原幾麿)

①骨形成不全症の遺伝子診断

東北大学病院小児科通院中の小児骨形成不全症患者19家系20名(男性9名、女性11名;年齢3~19歳)の*Col1A1*、*Col1A2*解析を行った。病型はI型6名、III型11名、IV型3名であった。

19家系中8家系(42%)で*Col1A1*、6家系(32%)で*Col1A2*の変異を認めた(計14家系、74%)。変異の内訳は、ミスセンス変異10家系、ナンセンス変異2家系、フレームシフト2家系であった。アミノ酸置換では、*Col1A1*、*Col1A2*ともグリシン(Gly)からセリン(Ser)への置換が最も多かった(14家系中7家系)。また、異なる家系間で同一の変異は検出されなかった。直接シーケンス法で変異が検出されなかった例において、MLPA法による*Col1A1*、*Col1A2*の解析を施行したが、欠失は検出されなかった。

重症型のIII型で胎内骨折を来した頻度が他の病型よりも有意に高かった。治療前腰椎骨密度SDスコアも、III型で有意に低値であった。歯牙形成不全や青色強膜の頻度、治療前身長には、病型間で有意差はなかった。

Col1A1、*Col1A2*それぞれの変異陽性群間で、歯牙形成不全、青色強膜、胎内骨折の頻度や治療前骨密度、治療前身長に差異は認めなかった。

Col1A1、*Col1A2*のいずれかに変異を認めた者のうちGlyからSerへ変異を認める群と、その他の変異陽性群とで表現型の違いの有無について検討したところ、歯牙形成不全、胎内骨折ともGly-Ser変異陽性群の方が頻度が高かった。また、治療前骨密度SDスコアは、Gly-Ser変異陽性群で有意に低値であった。これらの結果から、Gly-Ser変異陽性群はより重症な表現型を呈すると言える。

②病型、原因遺伝子、遺伝子型とパミドロネート治療効果との関連

パミドロネートを半年間投与し、治療前後の腰椎骨密度SDスコアの変化(Δ SDS)を治療効果として、病型、原因遺伝子、遺伝子型との関連について検討した。

病型による Δ SDSは、I型1.21、IV型1.65、III型2.16と重症度が増すに従い高値となったが、統計学的有意差は認めなかった。原因遺伝子による Δ SDSの違いは見られなかった(*Col1A1*:1.54、*Col1A2*:1.65)。また、Gly-Ser変異陽性群とその他の変異陽性群とでも Δ SDSに差はなかった。

③骨形成不全症の新たな治療法

小児骨形成不全症患者に対するアレンドロネート治療について、現在東北大学病院倫理委員会に申請中であり、また臨床研究登録のプロトコルも作成中である。

6) 大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究 (道上敏美)

①乳児悪性型大理石骨病の診療に関する実態調査

新生児科及び小児科医療機関 521 施設を対象に、10 年間の乳児大理石骨病の診療経験に関するアンケート調査を行った。返信数は 281 施設 (回答率 53%) であり、以下の回答を得た。

- ・ 総症例数：10 例
- ・ 現時点での生存数：5 例
- ・ 呼吸管理を要した人数：2 例
- ・ 看取りの医療を選択した人数：1 例
- ・ 骨髄移植を施行した人数：8 例
- ・ 遺伝子診断を施行した人数：2 例
- ・ 出生診断されていた人数：0 例

骨髄移植を施行した症例が、80%にのぼった。遺伝子診断を施行した人数は 20%にとどまった。

②大理石骨病における遺伝子診断

中間型ないし遅発型と考えられる大理石骨病症例 3 例について、遺伝子解析を行った。うち 2 例について、*CLCN7* 遺伝子の新規のヘテロ変異を同定した。これらの症例は常染色体優性大理石骨病 II 型と考えられた。1 名は 4 歳男児、もう 1 名は 18 歳女性であった。両者ともに脊椎の硬化像 (rugged-jerger vertebra) を認めた。18 歳女性では骨吸収のマーカーである TRACP5b が測定されており、著明な高値であった。常染色体優性大理石骨病 I 型においては TRACP5b は上昇しておらず、値発型の大理石骨病の病型診断に TRACP5b の測定が有用であることが示唆された。

③低フォスファターゼ症における遺伝子解析及び遺伝子型-表現型相関に関する検討

今年度は、国内から 7 例の低フォスファターゼ症の遺伝子解析の依頼があった。

また、1996 年から 2012 年までに当研究室において遺伝子解析を行った 53 例の低フォスファターゼ症について、遺伝子型を検討したところ、活性を完全に喪失している c.1559delT 変異が 106 アレル中 43 アレル (41%) にのぼった。また、70%程度の残存活性を有し、周産期発症良性型と関連する、F310L (p. F327L) 変異が 106 アレル中 14 アレル (13%) で検出された。

④変異型アルカリフォスファターゼの機能解析

出生時から四肢彎曲、内反足、成長障害、歯牙脱落を呈した症例において同定された変異

V90I (p. V107I) 及び A451V (p. A468V) を有するアルカリフォスファターゼ発現ベクターを構築し、残存活性を評価した。V90I (p. V107I) は、野生型の 15%程度に活性が著明に低下しており、A451V (p. A468V) は完全に活性を喪失していた。

7) FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究 (長谷川高誠)

21 名のうち FGFR3 遺伝子変異が認められたのは 9 名でそのうち 1 名は G380R を認め軟骨無形成症であった。残りの 8 名に関しては N540K が 6 名、S84L が 1 名、R200C が 1 名であった。S84L は父が同変異を持つ家族例で、R200C 変異は母が同変異を持ち 4 世代にわたる家系であった。

FGFR3 遺伝子変異を認めなかった 12 名のうち 3 名は FBN1 遺伝子変異を認める

Acromicric/Geleophysic dysplasia であり、臨床像の肝腫大やハスキーな声、レントゲン像では大腿骨頭の変形などが軟骨低形成症との鑑別点となった。また 1 名は FGD1 遺伝子異常による Aarskog 症候群であり、ショール様の陰嚢の存在によりが診断の手がかりとなった。

8) FGFR3 関連疾患：致死性骨異形成症及び SADDAN 症候群の実態に関する研究 (長谷川高誠)

アンケートを送付した小児科施設 521 施設のうち回答があったのは 281 施設で回答率は 52% であった。診療されていた患者の総数は 55 名で現在の生存患者数は 13 名であった。

呼吸管理を行ったのは 46 名、看取りの医療を選択したのは 29 名であった。遺伝子診断を施行されたのは 17 名であった。また出生前に診断されていたのは 47 名であった。

産科施設 707 施設のうち回答があったのは 191 施設で回答率は 27% であった。診療されていた患者総数は 117 名で、生存数は 3 名であった。呼吸管理を行われたのが 21 名、看取りの医療を選択したのが 47 名、妊娠中絶を選択したのは 49 名であった。遺伝子診断を選択したのは 15 名、また出生前診断の経験数は 93 名であった。

9) CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究 (八十田明宏)

① CNP 遺伝子変異マウス (*lbab/lbab*) の解析

生直後、*lbab/lbab* の吻臀長は野生型と比較して若干の低下を認めたものの、生後の急速な成長を欠如し、10 週齢で野生型の 60~70%にとどまった。*lbab* のヘテロマウス (*lbab/+*) では

野生型との差は認められなかった。軟X線による解析では、*lbab/lbab*において、その長さが内軟骨性骨化により規定される頭蓋骨前後径、上腕骨、撓骨、尺骨、大腿骨、脛骨、椎骨の長さは野生型の60~70%であった。また、生後3日の成長板軟骨の組織学的検討において、*lbab/lbab*の成長板幅は野生型と比較して著しく減少していた。

さらに、*lbab/lbab*を、II型コラーゲンプロモーターにより軟骨においてCNPを過剰発現させたトランスジェニックマウス(CNP-Tg)と交配させることにより、*lbab/lbab*の成長板におけるCNPの作用を検討したところ、交配により得られたマウス(*lbab/lbab*・CNP-Tg)の吻髯長は、4週齢以降野生型マウスとほぼ同程度となり、内軟骨性骨化により形成される各骨の長さも10週齢において野生型とほぼ同じとなった。組織学的検討において、*lbab/lbab*の成長板軟骨幅は野生型と比較して著しく減少していたが、*lbab/lbab*・CNP-Tgでは野生型とほぼ同程度であった

②軟骨特異的CNPノックアウトマウスの作製と解析

軟骨特異的CNPノックアウトマウスにおいて、著明な低身長が認められ、その吻髯長は対照マウスと比較して79%であった。上腕骨、撓骨、尺骨、大腿骨、脛骨、および椎骨の長さも短くなり、それぞれ65~75%となった

10) 過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究(橋本淳)

有効回答件数103件(70.5%)を得た。過剰運動症候群の疾患概念を知っており診断経験ありとした回答は3/103(2.9%)であった。

過剰運動症候群の通院患者数は計7例であった。疾患概念を説明の上で確認された通院患者数は28例であった。遺伝性多発性外骨腫患者数は少なくとも70例が申告され、歩行不能に至った例が24例であったが、体幹(胸郭や脊柱)の変形により呼吸管理を要するに至った例はなかった。骨パジェット病に関しては、20歳以下で診断された例は5例で現在20歳未満が2例であった。いずれも歩行不能にいたる重症の機能障害に至っていない。

D. 考察

1) 低フォスファターゼ症に対する診断指針

の確立と新規治療法の開発(大菌恵一)

低フォスファターゼ症に対する、診断指針の策定および研究班HP等を活用した広報活動により、本症の認知度が高まっていると考えられた。遺伝子診断が行われている症例の率も高く、主治医や患者を対象とするコンサルテーション業務の継続性が重要であることが認識された。酵素補充療法の治験導入にも関与することができたので、今後、酵素補充療法の安全性、有効性を明らかにする必要がある。

2) C型Na利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究(大菌恵一)

NPR-B機能獲得型変異による過成長の2家系目を見だし、本症は疾患単位として確立された。本疾患の病態を詳細に解析し、セカンドメッセンジャーのcGMP以降のシグナル経路などCNP作用の分子機序を明確にすることは、CNPアナログに加えて、骨系統疾患関連性低身長に対する新たな治療戦略の開発につながると期待できる。

3) 呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究(中村友彦)

87例中28例(32%)が自宅へ退院できておりそのうち22例は気管切開+在宅人工呼吸で退院し、3名は在宅酸素療法で退院していた。骨形成不全症は12例中6例、軟骨無/低形成症は8例中5例が退院しているのに対し、致死性骨異形成症は11例中2例の退院に留まっており、疾患による差も大きかった。

4) 骨系統疾患における歯科的問題に関する研究(仲野和彦)

骨系統疾患を有する患児は、その疾患に伴随する特徴的な歯科的症状を有することが多いものの、症例数が少ないため、系統立てた治療法は確立されていないのが現状である。低フォスファターゼ症罹患患児における小児義歯の装着は、審美性、発音機能および咀嚼機能の回復だけではなく、咬合力負担を分散させることによって残存歯の早期脱落を予防する可能性が示唆された。近年、本疾患罹患児の早期脱落乳歯への義歯による治療が健康保険適応として認められたこともあり、今後必要に応じて義歯の装着を積極的に行いたいと考えている。また、本院の歯科医師によって見つけられた乳歯の早期脱落を機に小児科受診を勧め、小児科に

において低フォスファターゼ症との診断に至ったケースが実際にあった。このことから、本研究成果について、歯科医師をはじめとして関連領域の専門家にも広く啓蒙する必要性を感じた。

低フォスファターゼ症モデルマウスにおける歯科的所見に関する分析では、遺伝子治療が歯科的症状の改善に有効であることが示唆された。

5) 致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立 (藤原幾麿)

1型コラーゲン遺伝子 (*Col1A1*, *Col1A2*) 解析を行ったところ、74%の家系で変異を認めた。欧米での報告では 90%前後の変異陽性率であるが、これは人種による違いかもしれない。*Col1A1*, *Col1A2*とも Gly から Ser への置換が最も多かった。今回の遺伝子解析で特筆すべきは、殆どの患者が同一地域 (宮城県、岩手県) の患者であったにもかかわらず、異なる家系間で同じ変異が検出されず、*Col1A1*, *Col1A2*の変異が異質性に富んでいることを示唆している。

*Col1A1*と *Col1A2*の変異の有無による表現型の違いは認めなかった。しかし、いずれの遺伝子変異でも Gly から Ser への変異を認める患者の方がより重症であった。今後、致死型の患者の遺伝子解析を行う際に、この変異を認める場合は特に重症であることを考慮して治療にあたるべきと考える。

パミドロネートによる治療効果の検討については、骨折頻度の変化では短期間での評価が難しいため、今回は腰椎骨密度 SD スコアの変化 (Δ SDS) を指標に用いた。病型による Δ SDS は、統計学的に有意ではなかったが、臨床病型が重症となるほど高値であった。このことから、致死性の最重症患者においても、その他の病型の患者と同様の治療量でも、同等かそれ以上の効果が期待できる可能性はあると思われる。

6) 大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究 (道上敏美)

今回、新生児科及び小児科医療機関を対象に 10 年間の乳児大理石骨病の診療経験に関するアンケート調査を行った結果、把握された総症例数は 10 例であった。アンケートの回答率が 53%であったことを考慮すると、本邦においては、年間 1~2 例の乳児大理石骨病の新規症例が発生していると考えられる。筆者自身が以前

経験した症例を含め、骨髄移植が間に合わずに早期死亡するケースが多いと思われたが、今回の調査では、80%の症例において骨髄移植が施行できており、半数の症例が現時点で生存していた。骨髄移植前後の管理の進歩による可能性がある。遺伝子解析がなされた症例が 20%にとどまっているので、責任遺伝子や変異の種類と転帰との間の関連性の有無については、現時点では不明であり、今後解析していく必要がある。

今回、遅発型大理石骨病 II 型の 2 例において、*CLCN7* 遺伝子のヘテロ変異を同定した。うち 1 例は 4 歳男児であった。遅発型はしばしば成人型と呼ばれるが、実際には小児期に診断される例も存在する。本症例は、中間型の症例ほどではないものの、既に明らかな骨硬化を示し、骨折も経験していた。また、下肢脚長差も認められた。もう 1 例の 18 歳女性も、骨痛、骨折を経験しており、また、可動域制限を伴う股関節炎を伴っていた。遅発型大理石骨病 II 型は乳児悪性型や中間型に比較すると軽症であり、また、不完全浸透を示し、*CLCN7* ヘテロ変異を有していても症状が明確ではない場合もある。しかしながら、今回、変異を同定した 2 症例のように、患者の QOL の障害となる、重大な合併症を有する症例も存在することが明らかとなった。

7) FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究 (長谷川高誠)

今回軟骨低形成症を疑われた児の約 4 割が FGFR3 遺伝子変異を有しており、依頼時から正しい診断をされていたことが分かった。その一方で Acromicric dysplasia、Geleophysic dysplasia、Aarskog 症候群など他疾患の紛れ込みが 2 割そして診断がつかなかった児や体質性の低身長と思われた児が 4 割と比較的によく他疾患や体質性の低身長と混同されていた。

8) FGFR3 関連疾患：致死性骨異形成症及び SADDAN 症候群の実態に関する研究 (長谷川高誠)

小児科施設、産婦人科施設両方の回答から致死性という名称に反してのべ 16 名の患児が生きていることが判明した。

生存例が存在する一方で、積極的な治療がおこなわれず、看取られた例や中絶を行われた例も多数存在し、日本における TD、SADDAN 症候群患児に対する取り扱いの施設毎の違いが存在した。

9) CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究 (八十田明宏)

CNP 機能低下型突然変異マウス (*lbab/lbab*) における骨伸長障害についての解析をおこなった。*lbab/lbab* における CNP の活性は 10%程度であるが、その骨伸長障害は CNP の完全ノックアウトマウス (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001) とほぼ同程度であり、成長板軟骨幅が減少する組織学的所見も同様であった。これらの表現型は軟骨における CNP の過剰発現によりほぼ完全に回復し、CNP の生理的な骨伸長促進における成長板軟骨での局所的な作用の重要性が示唆された。

さらに、軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスにおいて、CNP 完全ノックアウトマウスと同様の低身長・骨伸長障害が確認された。CNP 完全ノックアウトマウスにおける吻髁長や各骨の伸長障害の程度も、軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスとほぼ同程度であり (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001)、CNP の生理的な骨伸長促進作用は、成長板軟骨局所における局所因子としての作用によるところが大きいことが示された。

これまでに、CNP/GC-B 系の変異をきたす自然発生突然変異マウスとして、NPR-B の機能喪失型変異マウスが 2 系統 (*cn/cn* および *slw/slw*) 報告されていたが、今回はじめて CNP の自然発症突然変異マウスが同定された。ヒトにおいてはこれまでに NPR-B の変異のみが報告されているが (マロト型遠位中間枝異形成症および機能亢進型変異)、今後ヒトにおいても骨系統疾患の 1 病型として、CNP の遺伝子変異が同定される可能性がある。また、NPR-B の機能亢進型変異の症例において著明な骨伸長促進が認められることから、ヒトの骨伸長障害に対して CNP/NPR-B 系の賦活化が有望な治療法となることが示唆される。今後本研究課題において、重症骨系統疾患に対する治療戦略として、CNP/NPR-B 系賦活化治療の基礎検討を進める予定である。

10) 過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究 (橋本淳)

過剰運動症候群は疾患概念自体が十分に知られておらずその診断例が希少であること、20歳未満の骨パジェット病も希少であることが明らかとなった。一方、多発性遺伝性外骨腫症は比較的多いが、歩行能力を喪失する重症例はまれ

であることが明らかとなった。

E. 結論

1) 低フォスファターゼ症に対する診断指針の確立と新規治療法の開発 (大藪恵一)

アンケートによる実態調査を行い、28 例の低フォスファターゼ症が把握された。遺伝子検査の依頼は 1 年間で 9 例であった。

酵素補充療法国際共同治験が開始され、その導入に関わった。

疾患特異的 iPS 細胞の作製の準備を整えた。

2) C 型 Na 利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究 (大藪恵一)

NPR-B の機能獲得型変異に伴う高身長を新たな疾患単位として確立した。

3) 呼吸管理を必要とする重症骨系統疾患児の生命・生活予後改善のための研究 (中村友彦)

全国の NICU における骨系統疾患の生存退院、入院例の二次長期予後調査をおこない、従来予後不良とされてきた難治性骨系統疾患の長期生存例の医療・福祉・教育の現状と課題を明らかにする必要がある。

4) 骨系統疾患における歯科の問題に関する研究 (仲野和彦)

骨系統疾患の歯科的症状は様々であり、重症度も異なるために対応が難しい。また、骨系統疾患における歯科の問題に対応するためには小児科領域との連携が重要である。

今後さらに症例を蓄積し、骨系統疾患を有する患児へのよりよい臨床的アプローチをエビデンスに基づいて構築していきたい。

5) 致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立 (藤原幾磨)

骨形成不全症の遺伝子解析にて、74%に 1 型コラーゲン遺伝子 (*Col1A1*, *Col1A2* のいずれか) の変異を認めた。

変異陽性者のうち、Gly から Ser への変異を認める群が、その他の変異を認める群に比しより重症な表現型を呈していた。

パミドロネートによる治療効果と、病型、変異遺伝子、遺伝子型との間には、有意差は認めなかった。

6) 大理石骨病の実態及び低フォスファターゼ症の分子病態に関する研究 (道上敏美)

本邦においては年間 1~2 例の乳児大理石骨病の新規症例が発生していると考えられた。責任遺伝子や変異の種類と転帰との関連性について今後解析していく必要がある。

CLCN7 変異に基づく遅発型大理石骨病 II 型においても QOL に影響を及ぼす合併症を有する症例が存在することが明らかとなった。

低フォスファターゼ症における遺伝子診断は治療法の選択や治療効果の評価に有用な情報を提供すると考えられた。

7) FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究 (長谷川高誠)

HCHの診断において臨床所見のブラッシュアップによりある程度他疾患の紛れ込みを防ぐ事が出来ると考えられたが、その一方で診断に難渋する症例もあり、遺伝子診断による診断体型の確立がHCH児の身長予後の改善に必要であると考えられた。

8) FGFR3 関連疾患：致死性骨異形成症及びSADDAN 症候群の実態に関する研究 (長谷川高誠)

TD及びSADDAN症候群は適切な医療的介入がな

されれば生存することが出来る疾患であり、「致死性」という名称の是非を含め、今後長期生存例の予後、合併症などを含めた二次調査を行い、患児の取り扱いについてさらに検討することが必要であると考えられた。

9) CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究 (八十田明宏)

機能低下型の自然発症 CNP 遺伝子変異マウスおよび軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスを用いて CNP の骨伸長に対する生理的作用を解析した。CNP は局所因子として作用し、内軟骨性骨化による生理的な骨の伸長を促進することが示された。今後、重症骨系統疾患に対する治療戦略として、CNP/NPR-B 系賦活化治療の基礎検討を進める予定である。

10) 過剰運動症候群、骨パジェット病、遺伝性多発性外骨種に関する研究 (橋本淳)

これらの疾患が少数例ながら把握された。二次調査が必要かつ実施可能であると考え、当該疾患の最終的な治療経過と治療上の遭遇している現在の問題点の把握を目的とした二次調査を 2013 年度に実施する予定である。

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)
重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究
(分担) 研究報告書

低フォスファターゼ症及び C 型 Na 利尿ペプチドシグナル異常症に関する研究

代表研究者 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
研究協力者 窪田拓生 大阪大学大学院歯学研究科口腔外科学第一助教

研究要旨

平成 21～23 年度の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」班において策定した低フォスファターゼ症診断指針について、当研究班ホームページ(HP)で引き続き公開し、周知に努めた。この HP を通じて、あるいは直接の相談により、主治医から本研究班にコンサルトされて遺伝子解析が行われた症例の数は、今年度は 9 例であった。策定した診断指針及び HP の有用性が確認された。乳歯早期脱落例の解析依頼例が増加した。また、これまで提唱してきた新生児良性型についてもさらに症例が蓄積され、本病型が認知されつつあることが推察される。また、小児科・産科・新生児科医療機関を対象として、2003 年～2012 年の 10 年間の低フォスファターゼ症の診療経験に関するアンケート調査を行った。その結果、28 例の呼吸管理例が把握され、23 例は生存していた。遺伝子診断を施行された症例は 25 例存在し、本症における遺伝子診断の重要性が認識されていると考えられた。本症に対する酵素補充療法の国際共同治験が行われる事となり、日本の治験責任者として、5 症例の治験導入に関わった。現在、製剤の投与が開始されている。

CNP(C 型 Na 利尿ペプチド)シグナルが軟骨成長を促進する事が近年報告され、軟骨無形成症等の低身長を呈する骨系統疾患の治療薬として期待されている。CNP に対する受容体 NPR-B の機能獲得型変異を有する家系を見だし、過成長による高身長を呈する事を世界で初めて報告した。さらに異なる NPR-B 変異を有する 2 例目の高身長家系を見だし、新たな疾患単位として確立したと考えている。本疾患の分子病態を詳細に解析し、軟骨における CNP の作用機序を明らかにすることは、CNP アナログのみならず、細胞内シグナル分子を標的とする、骨系統疾患関連性低身長に対する新たな治療戦略の開発につながると期待できる。

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。これまで、確立された治療法はなかったが、現在、ALP 酵素補充療法の国際共同治験が開始されたところである。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と有効性・安全性の評価をめざす。本症の患者会との連携やアンケート調査により、本症の実態を把

握する。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、現時点で遺伝子診断に基づく正確な病型分類及び予後予測を行い、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す。

CNP-NPR-B(Na 利尿ペプチド受容体 B 型)-cGMP(cyclic GMP)シグナル系が内軟骨性骨化に重要であることが、近年、動物モデルおよびヒトの疾患において報告されている。すなわち、CNP 過剰症は過成長による高身長を呈し、受容体である NPR-B(Na 利尿ペプチド受容体 B 型)の機能喪失は低身長、四肢短縮を引き起こす。これらの知見により、CNP 作用を増強することが、軟骨無形成症等の低身長を呈する骨系統疾患の治療薬のターゲットとして期待さ