

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。

## B. 研究方法

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）窓口を設けている。

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。

- 1) 診療経験の有無
- 2) 現時点での生存している人数
- 3) 児が呼吸管理を要した人数
- 4) 看取りの医療を選択した人数
- 5) 遺伝子診断を施行した人数
- 6) 出生前診断をされていた人数
- 7) 妊娠中絶を選択した人数（産科のみ）

また、NPR-B 異常症が疑われた 2 家系（日本人 1 家系、韓国人 1 家系）を詳細に解析した。

## C. 研究結果

### 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

平成 21～23 年度の難治性疾患克服研究事業で策定した低フォスファターゼ症の診断指針をひきつづき、当研究班 HP (<http://www.bone.med.osaka-u.ac.jp/skeleton/>) 中で掲載している。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. 遺伝子型-表現型の検討

継続して低フォスファターゼ症の *TNSALP* 遺伝子診断を行い、一部は分担研究者の道上敏美が行った。症例の蓄積にともない、日本人に特有の F310L 変異を有し、骨変形を主症状とする比較的軽症の本症が存在することが明確化した。乳歯の早期脱落例も遺伝子検査で本症と確定診断される例が増えている。乳歯早期脱落への対応については、分担研究者の仲野和彦が担当している。

### 3. 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。

### 4. CNP シグナル異常症の病態解析

前述したように、CNP シグナルは骨系統疾患に伴う低身長に対する治療標的として注目されている。CNP の受容体である NPR-B の機能獲得型異常症の表現型は、CNP が過剰投与となった場合の副作用を示していると考えられるところから、その症状を解析している。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 (Miura K et al. PLoS ONE 2012;7:e42180、業績に記載)。これに引き続き 2 つ目の機能獲得型変異を同定した韓国家系は、発端者が 15 歳の男児である (IV-2)。大腿骨頭すべり症のためソウル大学整形外科で骨切り術を受けた。過成長による高身長 (+4.1SD)

大な母趾を認め、当研究班での精査を依頼された。側彎を認めたが第1例目の日本人家系にみられた第5指末節骨の屈曲変形や易骨折性は認めなかった。血中 IGF-1:257 ng/ml (125-557)、尿中 NTx:969 BCE/mM Cr (21-83)、Osteocalcin:118 ng/ml (8-50)、NT-proCNP:9.7 pmol/l と骨形成及び骨吸収の亢進を認めた。発端者の IV-2 以外に、VI-1、3、5、III-1、3、9、11、II-2、6 に高身長および巨大母趾を認め、IV-3、III-3 に大腿骨頭すべり症を認めた IV-1-3、5、III-2-5、7、10、II-10 から DNA を得て、*FGFR3*、*CNP*、*NPR2* および *NPR3* 遺伝子を direct sequence 法により解析し、IV-1-3、5、III-3 の *NPR2* 膜貫通部位に c.1462G>C(p. Ala488Pro) を同定した。p. Ala488Pro (Ko) 及び本邦で同定した p. Val1883Met ベクター (Ja) を HEK293A 細胞に強制発現後 CNP に対する cGMP 産生を解析したところ CNP 無添加状態で野生型、Ko、Jp 発現細胞の cGMP はそれぞれ、1.1、290.0、1549.3 pmol/ml であった。更に  $10^{-7}$ M CNP 添加によりそれぞれ、1253.9、2921.4、3780.9 に上昇した。なお患児の NT-proCNP 測定を行ったが正常範囲内であった。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。また、ホルモン異常や骨系統疾患などによる高身長、低身長小児患者 298 例に対して、CNP の前駆体である NT-proCNP を測定し、現在成長率や GH 治療に対する反応性に対しても解析を行っている。

-3 SD 以下の低身長に対しては、現在、成長ホルモン治療が行われているが、軟骨無形成症では軟骨低形成症に比して、成長ホルモン治療による身長の改善効果に乏しい事を報告した。より高い効果を持つ治療法の開発が望まれる (1年での身長改善が +0.3 SD vs +0.8 SD; 北岡太一ら、第46回日本小児内分泌学会、H24, 9)。今後、疾患特異的 iPS 細胞を用いて、CNP シグナル等をターゲットとした治療法の有効性を検討したいと考えている。

#### D. 考察

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、有効性を明らかにし、臨床現場で使用可能な確立した治療法となるよう、努力する必要がある。

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と考えられる。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。

#### E. 結論

1. 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。
2. 低フォスファターゼ症遺伝子検査の当研究班への依頼は1年間で9例であった。
3. 低フォスファターゼ症に対する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。
4. 疾患特異的 iPS 細胞の作製の準備を整えた。
5. Na 利尿ペプチド受容体 B 型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。第1家系を論文報告し、第2家系についても投稿準備中である。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### 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  $\alpha$ -Klotho both in vivo and in vitro. J Biol Chem, 288(4):2414-2427, 2013.

Ozono K, Namba N, Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Ohata Y, Fujiwara M, Miyoshi Y, Michigami T: Pediatric aspects of skeletal dysplasia. Pediatr Endocrinol Rev, Supple 1: 35-43, 2012

## 2. 学会発表

大藺恵一：骨系統疾患. 第30回日本骨代謝学会学術集会、東京、2012. 7. 19-21.

大藺恵一：骨系統疾患の基礎と臨床—小児科医の立場から—. 小児成長研究会、東京、2012. 7. 28

大藺恵一：骨系統疾患の新たな治療法. 胎児骨系統疾患フォーラム併催、宮城、2012. 12. 2.

Ozono K、Michigami T : Two common mutations in the ALPL gene in Japanese patients with Hypophosphatasia. 6th International Symposium, Huningue, France, 2012. 5. 16-19,

## 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. その他当初の研究計画に照らした本研究成果の進捗状況  
予定通り順調に進捗している

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研究班  
分担研究報告書

「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」

研究分担者 中村 友彦 長野県立こども病院

### 研究要旨

背景 骨系統疾患は全身の骨格の形態や構造に系統的な異常をきたす疾患の総称であり、骨系統疾患国際分類 2010 によると 40 グループ 456 疾患に分類されており、1 万分娩に 2.14 の頻度である。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は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。本研究では全国の主要NICUでの重症骨系統疾患児の現状を把握する。

方法 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。

結論 75カ所(84.2%)より回答を得た。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、脊椎骨端異形成症5例、Campomelic dysplasia4例、致死性四肢短縮症4例、低ホスファターゼ症3例、Pena Shokeir 症候群3例、Cole-carpen-ter 症候群3例などが複数以上の症例であった。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、疾患による差も大きかった。

結語 全国の生存退院、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あきからかにしたい。

### A. 研究目的

骨系統疾患は全身の骨格の形態や構造に系統的な異常をきたす疾患の総称であり、骨系統疾患国際分類 2010 によると 40 グループ 456 疾患に分類されており、1 万分娩に 2.14 の頻度である。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は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。本研究では全国の主要NICUでの重症骨系統疾患児の現状を把握する。

### B. 研究方法

調査対象施設: 全国総合周産期母子医療センター (89 施設-2012 年 9 月時点)

### C. 研究結果

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

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%)

2. 生存入院中 2 例  
 3. 転院 1 例

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%)

致死性四肢短縮症: 4 症例

1. 生存退院、 1 例  
 2. 入院中死亡 3 例

Campomelic dysplasia: 4 症例

1. 生存退院、 3 例  
 2. 入院中死亡 1 例

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%)

先天性多発性関節拘縮: 3 症例

1. 生存退院 2 例  
 2. 転院 1 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

質問 6 : 2 次調査への協力

協力する 47 施設  
 協力しない 3 施設

Pena Shokeir 症候群: 3 症例

1. 生存退院、 1 例  
 2. 生存入院中 1 例  
 3. 入院中死亡 1 例

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

14 番染色体父性片親ダイソミー: 3 症例

1. 生存退院、 2 例  
 2. 入院中死亡 1 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

Cole-carpenter 症候群: 3 症例

1. 生存退院、 2 例  
 2. 入院中死亡 1 例

分節異常骨異形性症: 2 症例

1. 生存退院 2 例  
 在宅酸素 在宅人工呼吸管理

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

Kniest dysplasia: 2 症例

1. 生存入院中 人工呼吸管理  
 2. 生存退院

脊椎骨端異形性症: 5 症例

1. 生存退院、 3 例  
 2. 入院中死亡 2 例

Jeune 症候群: 1 症例

1. 生存入院中 (在宅準備中)

点状軟骨異形性: 5 症例

1. 生存退院、 2 例

Osteo Cranio stenosis: 1 症例

1. 死亡

Raine 症候群：1 症例  
1. 重心病棟転院後入院中 人工呼吸管理

頭蓋骨早期癒合症/多発性関節拘縮：1 症例  
1. 生存転院

Beare Stevenson syndrome：1 症例  
1. 死亡

Gracile bone dysplasia 疑い：1 症例  
1. 生存転院 在宅人工呼吸

Asphyiating thoracic dysplasia：1 症例  
1. 生存退院 在宅人工呼吸

脳・肋骨・下顎症候群：1 症例  
1. 生存退院 在宅人工呼吸

Jarcho-Levin 症候群 1 例  
1. 生存退院 在宅人工呼吸管理

Short-rib polyductily dysplasia：1 症例  
1. 死亡

Apert 症候群：1 症例（心奇形、HLHS, MA, VSD 合併）  
1. 死亡

Pfeiffer 症候群：1 症例  
1. 死亡

胸骨裂：1 症例  
1. 生存退院

軟骨低発生症/重症先天性脊椎骨端異形性症：1 症例  
1. 生存退院

扁平脊椎異形性症：1 症例  
1. 生存退院 在宅人工呼吸

#### D. 考察ならびに結論

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、疾患による差も大きかった。

#### E. 結語

長野県立こども病院での症例を参考に全国の生存退院、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あきからかにしたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi D, Matsui M, Hiroma T, Nakamura T. A lightweight mainstream capnometer with very low dead space volume is useful monitor for neonates with spontaneous and mechanical ventilation; Pilot study. OJPED 2012;2:127-132

2. Iwata S, Nakamura T, Hizume E, Kihara H, Takahashi S, Matsuishi T, Iwata O. Qualitative brain MRI at term and cognitive outcomes at 9 years old following very-preterm birth. Pediatrics 2012;129:e1138-1147

3. Takahashi D, Hiroma T, Nakamura T. PETCO<sub>2</sub> measured by a new lightweight mainstream capnometer with very low dead space volume offers accurate and reliable noninvasive estimation of PaCO<sub>2</sub>. Research and Reports in Neonatology 2011;1:61-66

##### 2. 学会発表

1. 草刈麻衣、中村友彦 当院における骨系統疾患児の長期予後 第57回 日本未熟児新生児学会 平成24年11月29-31日 熊本市

#### 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 研究班  
(分担) 研究報告書

骨系統疾患における歯科的問題に関する研究

研究分担者 仲野 和彦 大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室准教授  
研究協力者 大川 玲奈 大阪大学歯学部附属病院小児歯科助教

## 研究要旨

大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診中の骨系統疾患を有する患児において、各疾患における歯科的問題点を整理し、それぞれに対する解決法を検討した。特に低フォスファターゼ症に関しては、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。乳歯の早期脱落への対応はほとんどなされていなかったが、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。

## A. 研究目的

骨系統疾患は、骨格に異常をきたす疾患の総称であり、骨や関節などに機能障害を生じ、予後不良な疾患があることが知られている。骨系統疾患を有する患児では、歯科的な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を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、その解決法を追究したいと考えた。また、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いたいと考えた。さらに、疾患モデル動物における歯科的所見の分析を行うことで、骨系統疾患が及ぼす歯科的な問題点におけるメカニズムの解明につながる知見を得たいと考えた。

## B. 研究方法

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

TNALP (Tissue non-specific alkaline phosphatase) 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。

(倫理面への配慮)

本研究では、当該疾患対象者の保護者に対し、学会発表および論文発表における同意を得たもののみを対象とした。また、動物実験

に関しては、研究協力機関である日本医科大学において摘出されたマウス下顎骨の供与を受け、当教室で分析を行った。

### C. 研究結果

1. 本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。エナメル質の剥離、著しい咬耗が認められた症例においては、乳歯既製冠やレジックジャケット冠による歯冠補綴を行っていた。

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。義歯の装着によって、審美性の回復が認められ、発音と咀嚼機能の向上が示唆された。これまでに約2年経過しているが、特に問題は生じていない。

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。

### D. 考察

骨系統疾患を有する患児は、その疾患に伴う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。今回の低フォスファターゼ症に対する実態調査の結果をふまえて、それぞれの疾患に生じる歯科的な問題点を意識しながら、低年齢時から継続的に管理していくことが、患児の口腔環境の改善および維持に有効ではないかと考えられた。

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、本研究結果について、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。今後は、免疫組織化学染色において分析するサンプル数を増やし、経時的な歯根の変化を観察する予定である。また、マイクロCT等を用いて、さらなる解析を行っていきたいと考えている。最終的には、骨系統疾患に関連して生じる歯科的な問題点におけるメカニズムを解明し、根本的な解決につながる知見を得たいと考えている。

### E. 結論

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的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と考えている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Okawa R, Nakano K, Matsumoto M, Kawabata K, Ooshima T. Oral manifestations of the patients with hypophosphatasia. *Ped Dent J* 22, 155-162, 2012.

##### 2. 学会発表

- ①大川玲奈、仲野和彦、大嶋 隆 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 第50回日本小児歯科学会記念大会、2012.5.12、東京
- ② 梶原理那、大川玲奈、道上郁美、藤田一世、野村良太、仲野和彦 低フォスファターゼ症罹患児に義歯の装着を行った1例 第31回日本小児歯科学会近畿地方会大会、2012.10.14、明石
- ③ 道上郁美、大川玲奈、阪下 卓、藤田一世、野村良太、仲野和彦 骨形成不全症患児の歯科的管理 第31回日本小児歯科学会近畿地方会大会、2012.10.14、明石
- ④ 大川玲奈、仲野和彦 歯科受診を機に低フォスファターゼ症の疑いと診断された2例 第31回日本小児歯科学会中四国地方会大会、2012.11.4、高松
- ⑤ Okawa R, Nakano K, Sugano-Tajima H, Iijima O, Kishino M, Toyosawa S, Shimada T, Ooshima T. Gene therapy improves cementum defects in *Akp2<sup>-/-</sup>* hypophosphatasia mice. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013.3.20, Seattle, USA.

#### 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

## 研究要旨

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。また、新たな治療法としてアレンドロネート注投与が検討され、今後治療効果が得られることが期待される。

### A. 研究目的

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、肋骨骨折を来た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。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。

### B. 研究方法

#### 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*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *SP7*, *PLOD2*, *IFITM5*) のシーケンスを行う。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析については、東北大学病院倫理委員会にて審査され、承認されたものであり(2009-148)、倫理面には十分配慮している。

自験例の検討では、患者名などの個人情報提示しない。

#### 2. 骨形成不全症の新たな治療法

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。

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。骨形成不全症は言わば先天性の骨粗鬆症であり、また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法を確立し、その有効性と安全性について検討する。

### C. 研究結果

#### 1. 骨形成不全症の遺伝子診断

##### 1) 遺伝子解析結果

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。

## 2) 病型と表現型との関連

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 (81.8%、Ⅰ型:16.7%、Ⅳ型33.3%、 $p=0.026$ )。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 (-5.98、Ⅰ型:-3.53、Ⅳ型2.94、 $p=0.019$ )。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。

## 3) 原因遺伝子と表現型との関連

*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。

## 4) 遺伝子型と表現型との関連

*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 (Gly-Ser100%、その他37.5%、 $p=0.026$ )、胎内骨折 (Gly-Ser85.7%、その他25%、 $p=0.041$ )とGly-Ser変異陽性群の方がより頻度が高かった。また、治療前骨密度SDスコアは、Gly-Ser変異陽性群で-6.08、その他で-4.10とGly-Ser変異陽性群で有意に低値であった ( $p=0.031$ )。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。

## 5) 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 ( $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ SDSに差はなかった。

## 2. 骨形成不全症の新たな治療法

小児骨形成不全症患者に、アレンドロネート注を体重あたり1.8 $\mu$ g (2ml)、4週に1回1時間かけて点滴静注する。これは、成人での用法・用量が、4週に1回アレンドロン酸として900 $\mu$ g (100ml)を30分以上かけて点滴静脈内投与する、となっており、

成人の体重を50kgとして換算したものである。

この治療法について、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り、平成25年中に実施したい。

## D. 考察

Ⅰ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。過去の日本人患者の解析の報告ではⅠ型コラーゲン遺伝子変異陽性率は41%と高くはなかったが (Kataokaら2007)、これは解析方法の違いによるものと思われる (KataokaらはDHPLC法を用いていた)。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が、これは欧米からの報告で、このアミノ酸置換が40%と高頻度であると同様であった。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。

次に、遺伝子変異と表現型との関連について検討したところ、*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 ( $\Delta$ SDS)を指標に用いた。病型による $\Delta$ 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。しかし、GlyからSerへの変異陽性群とその他の変異陽性群とで $\Delta$ SDSを比較した際に有意差を認めなかったことから、今後さらなる症例の積み重ねが必要である。

骨形成不全症の新たな治療法として、アレンドロネート注による治療を検討している。アレンドロネートは骨粗鬆症治療に用いられるビスフォスフォネート製剤の一つであるが、同じアレンドロネートの経口剤は既に骨形成不全症患者への投与が有効であるとの報告がある。点滴静注であれば経口薬に比べ、より確実な投与による効果が期待され、また経口薬でしばしば認められる消化器症状の副作用も軽減することができる。また4週に1回の投与であれば、患者への負担も減らすことができる。何より、経口

薬は錠剤であり幼小児では投与することが不可能であるが、点滴静注薬は新生児であっても投与可能である。

倫理委員会での承認が得られ次第、アレンドロネート注による治療を開始し、その治療効果について評価したい。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 菅野潤子、上村美季、箱田明子、藤原幾磨、呉繁夫. 非致死性骨形成不全症患者における遺伝学的背景と表現型との関連の検討. 第46回日本小児内分泌学会 (2012年 大阪)
- 2) Kanno J, Hakoda A, Fujiwara I. Responsiveness to pamidronate treatment is not related to genotype of type 1 collagen in osteogenesis imperfecta. ASBMR2012, Mineapolis, 2012.

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研究班  
(分担) 研究報告書  
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

研究分担者 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

大理石骨病は骨吸収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、尿細管型アシドーシスを伴う型、免疫異常を伴う型などが存在する。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、骨髄移植などの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。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必要である。今回、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ンネル7(*CLCN7*)遺伝子の変異を同定した。また、低フォスファターゼ症の症例について、組織非特異型アルカリフォスファターゼ(*TNSALP*)の遺伝子診断を行った。また、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。さらに、低フォスファターゼ症症例で同定された新規変異について、機能解析を行った。これらの成果は、低フォスファターゼ症の予後判定や治療法の選択において、有用な情報を提供すると考えられる。

#### A. 研究目的

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、尿細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。通常、乳児期早期に大頭症、進行性難聴および視力障害、肝脾腫、重度の貧血で発症する。これらの症状は未熟骨の吸収障害に基づく。すなわち、難聴、視力障害は神経管狭小化による神経圧迫症状として出現し、貧血は骨髄腔の狭小化による。代償的髄外造血により肝脾腫が引き起こされる。汎血球減少となるため感染や出血を起こす。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、多くの合併症が起こりえることから、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。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・解析する。

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。従来、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、周産期発症例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。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)。現在、低フォスファターゼ症については、酵素補充療法の治験が進行中であり、また、幹細胞移植が行われる症例もあるなど、新規治療の開発が進みつつある。これらの治療は高コストであるため、個々の症例の病型及び生命予後を正確に評価し、治療すべき症例の選択及び治療効果の判定を行う必要がある。そこで、本研究において、低フォスファターゼ症の遺伝子型と治療効果を含めた表現型との関連性を検討し、変異型アルカリフォスファターゼの機能解析を行うことにより、本症の有効かつ効率的な治療戦略に資する。

## B. 研究方法

### 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。回答者の負担を軽減し、回答率を向上させるため、致死性骨異形成症、骨形成不全症、低フォスファターゼ症などの調査と合わせて施行した。アンケートにおいては、以下の項目について調査した。

- ・ 総数及び現時点での生存数。
- ・ 呼吸管理を要した人数。
- ・ 看取りの医療を選択した人数。
- ・ 骨髄移植を施行した人数。
- ・ 遺伝子診断を施行した人数。

- ・ 出生前診断されていた人数。

### 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。末梢血単核球より抽出したゲノムDNAを鋳型として候補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、直接シーケンシング法、あるいはPCR産物をTAクローニングした後にシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。

### 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、塩基配列を決定した。

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関連性を検討した。

### 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。

(倫理面への配慮)

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) 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。4 歳男児例では下肢長差をみとめ、また、18 歳女性においては関節の可動域制限を伴う股関節炎を合併している。これらの症状が大理石骨病と関連しているかどうかについて、今後症例を集積する必要がある。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。その病型と、遺伝子変異は以下の通りである。

症例	解析時年齢	病型	変異
#1	7y	歯限局型	N413S/
#2	9M	周産期発症良性型	N173del/F310L
#3	3y	歯限局型	F310L/c.1559delT
#4	24d	周産期重症型	c.1559delT/c.1559delT
#5	8y	周産期発症良性型	F310L/c.1559delT
#6	5y	歯限局型	E174G/R433C
#7	2M	乳児型	H321R/c.1559delT

当研究班 HP など低フォスファターゼ症の診断指針を公開したことにより、本症の認知度が上昇したと考えられ、より軽症の歯限局型などの遺伝子解析依頼が増加し、確定診断することができた。

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。F310L は、周産期発症良性型の他、今年度解析を行った歯限局型の症例でも検出されており、遺伝的要因と環境要因との相互作用により症状に variation が存在する可能性が示唆された。

#### 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。

### D. 考察

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捗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。また、今後、二次調査により、個々の症例の骨髄移植前後の経過や合併症の有無について詳細に検討することで、本症の診療に有意義な情報を収集し、臨床に還元しようと考えられる。

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。

低フォスファターゼ症については、当研究班の HP などにより診療指針を公開し、診療や遺伝子解析に関する相談窓口も開設したことにより、これまで相談の少なかった歯限局型等の症例の相談が増加した。このように、症例を蓄積し、また、新たな変異については残存酵素活性の評価を行うことで、各症例の分子病態の理解と正確な予後判定が可能となると考える。本症については、現在、酵素補充療法の治験が進行中であり、また、幹細胞移植が行われる症例もあるなど、新規治療

の導入が進みつつある。これらの治療は高コストであるため、個々の症例の病型の確実な診断と及び生命予後の評価に基づき、治療すべき症例を選択し、治療効果の適切な判定を行うことが極めて重要である。本研究の成果はこの点に大きく資すると考える。

## E. 結論

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、80%の症例において骨髄移植が施行されていた。責任遺伝子や変異の種類と転帰との関連性については、現時点では不明であり、今後解析していく必要がある。

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。本病型においては、ほぼ無症状の症例が存在する一方で、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いて、遺伝子解析により確実な病型診断と予後判定を行うことは、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、医療コストの削減にもつながる。

## 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 a-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関連. 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 a-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研究班

(分担) 研究報告書

FGFR3 関連疾患：軟骨低形成症の診断に関する研究

分担研究者 長谷川 高誠 岡山大学病院 小児科 助教

## 研究要旨

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などからの診断が難しい場合があり、遺伝子診断による診断が行われることが多い。今回我々は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の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。

## A. 研究目的

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。今回軟骨低形成症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。

## B. 研究方法

当科に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。

## C. 研究結果

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。

## D. 考察

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割と比較的多く他疾患や体質性の低身長と混同されていた。

## E. 結論

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の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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 長谷川高誠, 山下美保, 古城真秀子, 久保俊英, 沼倉周彦, 田中弘之, 森島恒雄 FBN1 遺伝子異常による Acromicric/Geleophysic dysplasia3 例:GH治療効果の検討 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20日~4月22日 博多

2) 長谷川高誠, 山下美保, 古城真秀子, 久保俊英, 沼倉周彦, 田中弘之 FBN1 遺伝子異常による Acromicric/Geleophysic dysplasia3 例:成長ホルモン治療効果の検討 第46回小児内分泌学会学術集会 2012年09月27日~2012年09月29日 大阪

#### 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

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研究班

(分担) 研究報告書

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

分担研究者 長谷川 高誠 岡山大学病院 小児科 助教

### 研究要旨

致死性骨異形成症および SADDAN (Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans) 症候群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骨系統疾患であり、胸郭の低形成から呼吸障害を来す。特に致死性骨異形成症に関しては周産期医療の進歩により「致死性」という名称にも関わらず、生存例の報告がなされている現状がある。この現状から、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。

#### A. 研究目的

致死性骨異形成症 (Thanatophoric dysplasia: 以下 TD) は線維芽細胞増殖因子受容体 3 型 (Fibroblast growth factor receptor type 3: FGFR3) の構成的活性化変異による軟骨異栄養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、致命的な経過を取る。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。

#### B. 研究方法

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。

1) 診療経験の有無

2) 現時点での生存している人数

3) 児が呼吸管理を要した人数

4) 看取りの医療を選択した人数

5) 遺伝子診断を施行した人数

6) 出生前診断をされていた人数

7) 妊娠中絶を選択した人数 (産科のみ)

#### C. 研究結果

(小児科施設からの解答)

アンケートを送付した 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。

(産婦人科施設からの解答)

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。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。

#### D. 考察