

201324078B

---

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24～25年度 総合研究報告書

---

研究代表者 大菌恵一

平成26年（2014年）3月

## 序文

本報告書は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業「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（平成24-25年度）の最終年度の研究成果をまとめたものであります。

現在、骨系統疾患をとりまく環境は大きく変化しています。重症型骨系統疾患患者においては、呼吸機能不全により胎外生活への適応が困難であるため、従来、これらの重症型骨系統疾患は致死型と称され、長期生存が望めない病型であると分類されてきました。しかしながら近年、新生児医療の発展により呼吸管理法が進歩し、さらには酵素補充療法、骨髄移植療法などの原病に対する新規治療法が開発されたことに伴い、重症型骨系統疾患は救命し得る疾患となりつつあります。本研究の初年度に行った実態調査においても、骨系統疾患診療の変化が明らかになりました。そこで、その成果を踏まえ、本年度は、重症骨系統疾患に関する二次調査を実施致しました。その結果、致死性骨異形成症については、長期生存例も把握されたことにより、致死性という診断名は現状にそぐわないことが明らかとなり、日本整形外科学会と連携して病名をタナトフォリック骨異形成症に変更致しました。また、胎児診断される症例が増加したことにより、出生後の迅速かつ的確な対応が可能となってきたことが明らかになりました。大理石骨病については骨髄移植が本症に対する標準治療となりつつあります。一方、低フォスファターゼ症に対する酵素補充療法に対する認知度はまだ低い事が判明しました。また、遺伝カウンセリングは50%程度に行われていましたが、今後、件数の増加に向けた努力が必要であると思われました。

また、遺伝子解析による正確な診断は治療の選択や予後判定を行うための基盤となるため、本研究班においてはホームページ上に診断の相談窓口を開設し、多数の責任遺伝子について変異解析を行っております。依頼件数も増加しています。一部の原因不明の骨系統疾患および疾患概念として確立していないと考えられる過剰運動症候群についても、exome解析を施行中あるいは開始直前の状態です。さらに、本研究班では、骨系統疾患の治療の確立や開発に向けた研究も行ってきました。まず、骨形成不全症に対するアレンドロネート注の有効性、安全性の確立のため、臨床試験を開始しました。また、重症の低フォスフ

アターゼ症に対する酵素補充療法の有効性に関する検討も行っております。さらに、新たな骨系統疾患治療法の開発のため、疾患モデルマウスを用いた研究を行っています。例えば、CNP遺伝子変異マウスの解析を行い、CNPが軟骨細胞の増殖分化に必須であること、頭蓋骨形成にも関与することを見いだしました。CNP(C型Na利尿ペプチド)の治療効果についても検討しています。また、低フォスファターゼ症患者の皮膚線維芽細胞より疾患特異的iPS細胞を作成し、本細胞では酵素活性が低いことを確認しています。現在、疾患特異的iPS細胞を用いた薬剤スクリーニングを計画中です。

本研究班では、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、産科などの立場から、臨床研究、遺伝子解析、細胞培養系やモデル動物などの多面的アプローチにより集学的に研究を行ってきました。本研究で得られた成果はこの分野の発展に寄与し、さらなる研究の礎となるものと考えております。引き続き、骨系統疾患の基礎研究および臨床研究に関し、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26年3月

研究代表者 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	大藪恵一	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
研究者 担	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	国立病院機構大阪南医療センター・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. 分担研究報告		
1. 研究代表者	大藺恵一	1
2. 分担研究者	中村友彦	7
3. 分担研究者	橋本淳	11
4. 分担研究者	藤原幾磨	13
5. 分担研究者	道上敏美	18
6. 分担研究者	八十田明宏	26
7. 分担研究者	仲野和彦	31
8. 分担研究者	長谷川高誠	34
9. 分担研究者	澤井英明	38
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		47
III. 業績別刷		52
IV. 実施アンケート		82

# I . 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、C型Na利尿ペプチドシグナル異常症に関して」

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講師  
研究協力者 窪田拓生 大阪大学大学院医学系研究科小児科学助教

研究要旨

低フォスファターゼ症診断指針について、ホームページ(HP)、学会発表、医学雑誌等を通じて周知に努めた。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は20例近くとなった。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。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例あり、遺伝子診断の重要性が認識されていると考えられた。さらに、二次調査を行い、小児科研修施設では、周産期型14例、周産期良性型4例、乳児型6例、小児型4例、成人型5例、歯限局型1例、呼吸管理14例、生存23例、遺伝子診断17例、出生前診断6例、および、25施設が酵素補充療法の治験が始まっていることを知っていたという結果が得られた。産科の施設では、呼吸管理6例、妊娠中断あるいは看取り11例、生存3例、遺伝子診断12例、出生前診断12例、および、6施設が酵素補充療法の治験が始まっていることを知っていたという結果が得られた。5人の酵素補充療法の治験導入にかかわり、治療期間が1年以上となった症例もある。疾患登録を幅広く行うため、全国組織としてHPP study groupを立ち上げ、意見交換を行った。低フォスファターゼ症特異的iPS細胞を作成あるいは入手し、iPS細胞においてもALP活性が低いことを確認した。TALEN法により遺伝子修復を行うため、変異部位を標的とし、切断活性の高いTALENを設定した。CNP(C型Na利尿ペプチド)シグナルが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の受容体(NPRB)の機能が亢進する変異を有する家系を見いだし、高身長を呈する事を報告した。異なる変異を有する2例目の高身長家系を論文とし、また、他グループからの報告もあり、疾患単位として確立した。機能喪失型のNPRBの家系について、その機能解析を行っている。NT-proCNPの血中濃度を検討し、軟骨無形成症患者において低身長の対象者と変わらないデータを得た。CNPアナログのみならず、細胞内シグナルに対する薬剤が低身長の治療薬となりうる可能性がある。

## A. 研究の背景と目的

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。症状が多彩であり、診断に苦慮する事も多いから、本班研究の前身である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化治療に向けた基礎的・臨床的検討」において作成した本症の診断基準を広め、本症の確実な診断を目指す。最近、国際的な ALP 酵素補充療法の治験が開始され、日本における治験枠の確保と実際のエントリー症例の相談を行なっている。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をめざす。また、効果判定の適切な指標を開発する。最近発足した本症の患者会とも連携し、実態把握を計る。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、現時点で正確な病型分類を行い、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 過剰症では高身長を呈し、NPR-B (Na 利尿ペプチド受容体 B 型) が機能を喪失すると低身長、四肢短縮がみられる。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、機能獲得型変異を伴う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 年度に策定した本症診断指針については、本研究班においても継続してホ

ームページに掲載し、症例の相談 (遺伝子解析を含む) 窓口を設けている。

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、平成 24 年度に調査を行った。

- 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  
妊娠中絶を選択した人数 (産科のみ)

平成 25 年度は、本症の経験のある施設に二次アンケートを行うとともに、本症の予後を大きく改善すると予想される酵素補充療法の認識も把握する事とした。

## C. 研究結果

### 1. 実態調査、診断基準・治療指針の策定

以前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、ホームページ (<http://www.bone.med.osaka-u.ac.jp/>) 中で掲載している。また、研究班ホームページ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、症例の相談および遺伝子検査の依頼がなされ、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。アンケート調査結果 28 例の呼吸管理、10 例の痙攣、21 例の高カルシウム血症、9 例の看取り医療の選択、23 例生存、25 例の遺伝子診断、12 例の出生前診断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 4 例の呼吸管理、7 例の人新中絶、9 例の看取り医療の選択、4 例生存、8 例の遺伝子診断、11 例の出生前診断という結果であった。

さらに、本症の実態を把握するために、二次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 137 施設のう



ち回答があったのは 82 施設で、回答率は 60%であった。アンケート調査結果 14 例の周産期型、4 例の周産期良性型、6 例の乳児型、4 例の小児型、5 例の成人型、1 例の歯限局型、14 例の呼吸管理、23 例生存、17 例の遺伝子診断、6 例の出生前診断、25 施設が酵素補充療法の治験が始まっていることを知っていた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 104 施設のうち回答があったのは 56 施設で回答率は 54%であった。産科 6 例の呼吸管理、11 例の妊娠中断あるいは看取り、3 例生存、12 例の遺伝子診断、12 例の出生前診断、6 施設が酵素補充療法の治験が始まっていることを知っていたという結果であった。

## 2. 遺伝子型-表現型の検討

継続して *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。また、酵素補充療法の治験にエントリーされるためには、遺伝子診断が必要なため、このような症例に対しても遺伝子診断を行なった。

## 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。

準備として 6well plate に 0.1%ゼラチンで表面処理を行い、その 8 時間以降に mouse embryonic fibroblast (MEF) を播種した。さらに 8 時間以上経過した同 plate にホモ接合体 c1559delT 低ホスファターゼ症患者より採取した皮膚線維芽細胞 (n=2)、間葉系幹細胞 (n=1) および健常人から採取した線維芽細胞を 6well plate に播種し、Sendai virus を用いて山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入しリプログラミングを行った。その後 hES+bFGF+VPA にて 1 日 1 度 medium change を

行い 7 日前後ですべての株において iPS 細胞への誘導を確認した。コロニーが成熟した時点で、それぞれのクローンごとに培養を開始した。成熟したコロニーを、それぞれ hES+bFGF+ROCK inhibitor を分注した 12well plate に採取し、さらに同日に、混合して 15 分経過した siRNA+RNAi MAX+OptiMEM を加え virus のサイレンシングを行った。翌日以降から hES+bFGF+ROCK inhibitor Y27632 (Wako) にて medium change を開始し、初回の継代時に再度同方法にてサイレンシングを行った。その後継代および拡大を行いながら選別を行い、RT-PCR にてサイレンシングの確認されたもののうち 3 クローンをそれぞれ実験に用いることとした。実験には継代数 10~20 の株を使用した。

初めに iPS 細胞の段階での ALP 活性について健常人由来のもの (hSF#5, #7) と、c. 1559delT 低ホスファターゼ症患者由来のもの (HPP-H) とで比較を行うこととした。上記と同様に、ゼラチンで処理し、MEF を播種した plate にそれぞれの iPS 細胞を播種し、7 日間培養を行った。その後、ALP 染色および ALP 活性を測定した。ALP 染色に関しては、固定を行った後 BMPurple (Roche) にて染色を行った。ALP 活性測定は、Triton を用いて細胞を回収し、10 分間 -80℃ で凍結融解させたのち、遠心分離によって得られた上清に LabAssay™ ALP (Wako) を用いて測定した。

## 結果

ALP 染色では、健常人由来 iPS 細胞では染色が認められたのに対し、c. 1559delT 低ホスファターゼ症患者由来 iPS 細胞では染色が全く認められなかった。

## 4. CNP シグナル異常症

機能獲得型 NPR-B 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ので症状を解析している。【症例】Case1 (日本人家系、大阪府在住) : 12 歳男児、身長 177cm と高身長で軽度の側彎を認め、手指はくも状で両母趾の過成長が特徴的であった。2 回の骨折歴があり、腰椎骨密度は低値であった。母親、母方祖母にも同様の身体所見を認め、母親に重度の側彎および腰椎圧迫骨折を認めた。Case2 (韓国家系) : 11 歳男児、身長 180cm、Case1 と同様、高身長および両母趾の

過成長を認め、妹、父親、父方叔父、父方祖父、父方曾祖父などにも同様の身体所見を認めた。なお11歳男児にはCase1の男児と異なり左大腿骨頭すべり症に対する手術歴はあるが、骨折歴はない。【目的】CNP-NPR2系の遺伝子異常検索、同定した変異の機能解析、トランスジェニックマウスの作成およびその表現型解析。【方法と結果】NPPCおよびNPR2遺伝子をdirect sequence法により解析し、Case1のNPR2 catalytic domainに点変異(p.Val1883Met)を、Case2のNPR2 transmembrane domainに点変異(p.Ala488Pro)を同定した。変異NPR2遺伝子をHEK293A細胞に強制発現後、CNPに対するcGMP反応を解析したところ、p.Val1883Met変異型受容体発現細胞ではCNP無添加条件においてcGMP濃度は上昇しており、さらにCNP添加によりcGMP濃度は濃度依存的に、野生型受容体発現細胞より上昇した。なおCase1の患児および母親、母方祖母の血中、尿中cGMP濃度は高値であった。更にp.Ala488Pro(Case2)およびp.Val1883Met(Case1)変異型受容体発現細胞の同時解析では、CNP無添加条件においてp.Ala488Pro変異型受容体発現細胞においても既にcGMP濃度は上昇していた。このCNP無添加条件におけるcGMP濃度はp.Val1883Met変異型受容体発現細胞がp.Ala488Pro変異型受容体発現細胞の約4倍程度であり、CNP添加条件においてもp.Ala488Proはp.Val1883Met変異型受容体発現細胞よりも低いながらも濃度依存的にcGMP濃度は上昇した。軟骨特異的に変異NPR2遺伝子(Case1;p.Val1883Met)を発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、変異NPR2の発現量に比例して過成長、椎体・長管骨および頭蓋冠縦径の伸長、骨変形を認め、骨の粗鬆化もみられ、Case1の家系と同様の表現型を確認した。組織学的にはp.Val1883Metトランスジェニックマウスの成長板は野生型マウスに比べて厚く、軟骨の配列は不整であった。【まとめ】NPR2遺伝子の機能獲得型変異による高身長の家系(Case1)を世界で初めて見出し、同変異のトランスジェニックマウスにおいても同様の身体所見を呈することを確認した(PloS ONE 7(8):e42180(2012))。

論文作成後、さらに研究を継続し、WtタイプのTransegeneを導入したTgマウスを新たに作成し、変異遺伝子導入Tgマウス(C57BL/6マウス受精卵にinjectionし、4LineのWtTg

マウスF0マウスを得たのでこれらを解析)とは異なり過成長を起こさないということを確認した。現在解析目的のために継代、コロニーの拡大中であるが、今後これらの複数LineWtTgマウスの成長曲線や成長板の組織学的評価を行うと共に、軟骨から摘出した組織よりNPR2RNAの発現量が少なくとも変異遺伝子Tgマウスと同等あるいはそれ以上であることを確認する予定である。

#### 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ホームページ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いと考えられた。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と思われた。酵素補充療法の治験導入にも関わり、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となる様努力する必要がある。

NPRB機能獲得型変異の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。CNPアナログが治療薬の候補となるのみならず、セカンドメッセンジャーのcGMP以降のシグナル経路を明らかにする事で、あらたな戦略による、低身長治療薬の開発が可能となると考えられた。

#### 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. 当班研究で行った本症の遺伝子検査依頼例は1年間で9例であった。
3. 酵素補充療法治験が開始され、その導入に関わった。
4. 疾患特異的iPS細胞の作成を開始した。
5. Na利尿ペプチド受容体B型の機能獲得型変異の第1家系を論文報告し、第2家系を解析して論文にまとめた。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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
  - 3) Kanai C, Terao M, Tanemura A, Miyoshi Y, Ozono K, Katayama I. Generalized Lichen Nitidus in Russell-Silver Syndrome. *Pediatr Dermatol*, 30(1):150-151, 2013.
  - 4) 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 soluble  $\alpha$ -klotho both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 288(4):2414-2427, 2013.
  - 5) Fujiwara M, Namba N, Ozono K, Arisaka O, Yokoya S, Committee on Drugs, Japanese Society for Pediatric Endocrinology. Treatment of hypophosphatemic rickets with phosphate and active vitamin D in Japan: A Questionnaire-based survey. *Clin Pediatr Endocrinol*, 22(1):9-14, 2013.
  - 6) Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. : Serum fibroblast growth factor 23 is a useful maker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Pediatr*, Epub ahead of print, 2013.
  - 7) Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T. : Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res*, Epub ahead of print, 2014
  - 8) 河野智敬、会津克哉、高橋康男、立川加奈子、道上敏美、大藪恵一、望月弘、低フォスファターゼ症の一部は低身長を契機に診断される、*ホルモンと臨床*、59 (3)、69-73、2011.
2. 学会発表
- 1) 三浦弘司、難波範行、藤原誠、大幡泰久、北岡太一、窪田拓生、大藪恵一、樋口周久、吉川秀樹、妻木範行、道上敏美：ナトリウム利尿ペプチド受容体 B(NPR-B) 変異に起因する軟骨の表現型の解析. 第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、2012. 4. 19-21
  - 2) 窪田拓生、三浦弘司、難波範行、北岡太一、大幡泰久、藤原誠、山本景子、橋真紀子、三善陽子、大藪恵一：小児における血清 NT-proCNP 値と身長及び GH 治療との関連性. 第 16 回小児分子内分泌研究会、北海道、2012. 7. 7-8.
  - 3) 大藪恵一：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.
  - 4) 大藪恵一：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
  - 5) 三浦弘司、難波範行、山本景子、大幡泰久、藤原誠、北岡太一、窪田拓生、大藪恵一、道上敏美、Cho Tae-Joon: ナトリウム利尿ペプチド受容体 2(NPR-2) 機能獲得型変異に伴う高身長-2 家系目. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2012. 9. 27-29
  - 6) 窪田拓生、三浦弘司、難波範行、宮下恵実子、橋井佳子、太田秀明、大藪恵一：小児における血清 NT-proCNP 値測定の意義 - 年齢、成長速度及び GH 治療反応性 -、第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2012. 9. 27-29
  - 7) 北岡太一、山本景子、藤原誠、大幡泰久、三浦弘司、窪田拓生、難波範行、大藪恵一：N540K 変異を有する軟骨低形成症の臨床像および成長ホルモン治療の効果について. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2012. 9. 27-29
  - 8) 大藪恵一：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.
- 9) 大藪恵一: 骨系統疾患の新たな地平線 - 治療法の新展開、第2回徳島骨カルシウム懇話会 (特別講演)、徳島、2013. 2. 28
- 10) 窪田拓生、山本景子、大幡泰久、藤原誠、三浦弘司、北岡太一、三善陽子、難波範行、武鑑真司、山本威久、大藪恵一: ビタミンD 欠乏症くる病と遺伝性低リン血症性くる病の鑑別における血清 FGF23 値の有用性、第65回関西カルシウム懇話会、大阪、2013. 3. 23
- 11) 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,
- 12) Ozono K: Height determination and chondrocyte development-JSPE/ESPE, 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology (特別講演)、Leipzig, Germany, 2012. 12. 09. 20-23
- 13) 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, 2012. 10. 12-15
- 14) Miura K, Namba N, Yamamoto K, Fujiwara M, Ohata Y, Kitaoka T, Kubota T, 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 (NPR2) Gene: 7th Biennial Asia Pacific Paediatric Endocrine Society (APPES) Scientific Meeting, Bali, Indonesia, 2012. 11. 14-17
- 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事業の進捗状況  
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  
(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と課題を把握する。

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。さらに 70 施設にさらに詳細な呼吸管理に関する二次アンケートを依頼し、46 施設 (65%) から回答を得た。

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 dysplasia 4 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。胎児診断の進歩により出生前に診断される症例がおおくなり、分娩方式、蘇生の可否を決定する際に、家族に分かり易い疾患、病態、予後の情報提供が必要である。

家族への情報提供、意見交換のためのネットワークの作成、骨系統疾患に特異的な呼吸管理ガイドラインの作成、インターネット等を使用して、稀少な疾患について情報共有をはかることが課題である。

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呼吸管理の現状が把握でき、医療・福祉・教育の課題が明らかとなった。

A. 研究目的

骨系統疾患は出生直後から人工呼吸管理を含む集中的治療をおこなえば、通常と変わらない生活がおくれる。わが国の新生児集中治療室における難治性骨系統疾患児の特に、呼吸管理、在宅医療についての現状を調べ、その課題を明らかにする。

B. 研究方法

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。

さらに 70 施設にさらに詳細な呼吸管理に関する二次アンケートを依頼し、46 施設 (65%) から回答を得た。

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

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%)

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

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

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

点状軟骨異形性：5 症例

1. 生存退院、2 例

2. 生存入院中 2 例

3. 転院 1 例

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

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

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

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

Cole-carpenier 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

Kniest dysplasia：2 症例

1. 生存入院中 人工呼吸管理

2. 生存退院

Jeune 症候群：1 症例

1. 生存入院中（在宅準備中）

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  
Asphytiating 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

二次アンケートによるさらに詳細な呼吸管理に関する結果。

- 1. 人工呼吸管理を必要とする長期入院患者の患児を管理できる新生児病棟以外の病棟があるか? ある 51%
- 2. 重症骨系統疾患の外来フォローや転棟に関して他科と連携はスムーズにできているか? できている 70%
- 3. 呼吸管理を要する重症骨系統疾患に積極的に在宅医療を目指すか? はい82%
- 4. 医療者や家族間で情報交換できるネットワークは必要か? はい96%
- 5. 胎児診断がついている場合に積極的蘇生をおこなうか? 約40%
- 6. 胎児診断がついている場合に胎児適応の帝王切開をおこなうか? 40%弱
- 7. 胎児診断は71%、方法は超音波検査が主胎児CT, MRIが20%
- 8. 呼吸管理を要した原因は?  
胸郭低形成60%、肺低形成35%、喉頭気管軟化症25%
- 9. 呼吸障害の病態  
閉塞性23%、高速性31%、混合性46%
- 10. 呼吸器から離脱できたか?  
できない52%

- 11. 予後は?  
死亡44%、退院27%、生存入院中15%、転院15%

#### 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

胎児診断の進歩により出生前に診断される症例がおおくなり、分娩方式、蘇生の可否を決定する際に、家族に分かり易い疾患、病態、予後の情報提供が必要である。

家族への情報提供、意見交換のためのネットワークの作成、骨系統疾患に特異的な呼吸管理ガイドラインの作成、インターネット等を使用して、稀少な疾患について情報共有をはかることが課題である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1. Baba A, Nakamura T, Aikawa T, Koike K. Extremely low flow tracheal gas insufflation of helium-oxygen mixture improves gas exchange in a rabbit model of piston-type high-frequency oscillatory ventilation. *BioMedical Engineering OnLine* 2013;12-29
- 2. 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
- 3. Takahashi D, Hiroma T, Nakamura T. PETCO2 measured by a new lightweight mainstream capnometer with very low dead space volume offers accurate and reliable noninvasive estimation of

PaC02. Research and Reports in  
Neonatology 2011;1: 61-66

2. 学会発表

1. Hata Y, Nakamura T. A case of CCHS with  
rare gene mutation. XII World congress of  
Perinatal Medicine. June 11-13 2013, Moscow

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  
(分担) 研究報告書

「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」  
研究分担者 橋本 淳 国立病衣機構 大阪南医療センター 免疫疾患センター 部長

研究要旨 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。その結果、過剰運動症候群はその疾患の認知度はきわめて低く、本邦で加療中の患者はわずかに 16 名であった。原因は全く不明でその疾患概念も治療法も確立されていないことがその理由の一つである。そのような中で、疾患の表現型から分類学的診断や疾患概念構築を独自に行うのではなく、疾患の原因や病態を少しでも明らかにしそれに基づく疾患概念と診断方法の構築を目指す。本研究では 1 例の重症過剰運動症候群患者と健常な両親の全エクソーム解析により遺伝子の de novo 変異を明らかにする検討を進め、全エクソームのライブラリー調整が終了しエクソーム解析中であり 3 月中に結果が得られる。これにより得られた疾患関連候補遺伝子からの絞り込みを、全国で加療中の残り 15 名のなかで同意・協力の得られる患者で行う。これにより疾患と関連が示唆された遺伝子を元に診断・分類方法の構築を行う研究途上にある。

#### A. 研究目的

過剰運動症候群、若年発症の骨パジェット病、遺伝性多発性外骨腫の中でも、過剰運動症候群はその疾患の認知度はきわめて低く、診断されている例が稀少であることが H24 年度の調査で明らかとなった。そこで H25 年度は疾患概念も確立されていない過剰運動症候群に関して、診断、概念の確立のための検討を行うことを目的とした検討を行っている。

#### B. 研究方法

国内外での論文渉猟を行い過剰運動症候群の診断の基準や概念に関しての調査をおこなった。しかし、疾患の概念は世界的にも確立されておらず、その最大の理由はその原因の解析されておらず、また治療法がないことと考えられた。そのような中で、疾患の原因や病態を少しでも明らかにして、それに基づく疾患概念と診断方法の構築を目指すために、孤発性 48 歳の重症患者 1 名とその両親の末梢血球からの全エクソーム解析とバイオインフォマティクスにより疾患に関与する可能性のある遺伝子の de novo 変異解析を行う。複数得られた候補遺伝子から、全国で加療中の残り 15 名の本疾患患者のなかで協力の得られる方での候補遺伝子解析により原因遺伝子絞り込みを行う。疾患と関連が示唆された遺伝子の gene product が診断に容易に利用可

能なものか、あるいは診断方法開発が可能なものかどうかの検討を行う。それらが困難な場合は遺伝子診断を行うことになるので、変異部位と疾患の表現型との関連を明らかにすることで、疾患概念と診断法の確立を行う。

(倫理面への配慮) 遺伝子の解析を行うので、倫理委員会の承認を得た上で患者本人およびご両親に十分な理解と同意を得て行っている。

#### C 研究結果

重症の過剰運動症候群患者とその両親(健常人)の末梢血液サンプルから全エクソームのライブラリー調整が終了し、現在エクソーム解析中である。H26年3月中に解析結果が得られる予定である。

#### D 考察

本疾患の疾患概念は確立されておらず、たとえ診断がなされても原因治療は皆無で現時点では診断による患者利益はあまりない。それゆえに病因・病態解明に基づく疾患概念と診断方法の開発が重要である。このような中で、今回の研究では極めてまれな疾患の重症病態の患者さんから研究についての理解が得られ、ご両親が健在でかつ研究についてのご理解を得られるという希少な条件がそろった。それゆえ本年 3 月中に得られる解析結果は国際的にも貴重であり、学術的な意味合いは大きく、疾患概念の確立や診断に役立つだけでなく治療法の開発に結びつくことが期待できる。

#### E 結論

過剰運動症候群の病態理解の進歩に基づく疾患の診断・概念の確立を目指しての de novo 変異解析を行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneshiro S, Hashimoto J. et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. J Bone Miner Metab. 2013 Oct 12. [Epub ahead of print]  
Sato S, Hashimoto J, et al. Novel sandwich

ELISAs for rat DMP1: age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats. Bone. 2013 Dec;57(2):429-36.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録3. その他  
いずれもなし

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  
(分担) 研究報告書

「致死性骨形成不全症の診断と治療法の確立」

研究分担者：藤原幾磨 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 准教授  
研究協力者：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

研究要旨 骨形成不全症患者の遺伝子解析を直接シーケンス法、MLPA 法、さらにエクソーム解析により行った。解析したうち8割近くの家系で *Col1A1*、*Col1A2* いずれかの1型コラーゲン遺伝子の変異を認めた。それ以外の新規遺伝子変異は認めなかった。1型コラーゲン遺伝子変異による治療効果の違いは見られなかったが、重症度との関連性は認めた。新たな治療法の一つとして、アレンドロネート注の治療効果に関する臨床研究を開始した。まだ症例数は少ないが、 $1.8 \mu\text{g/kg/4}$  週のアレンドロネート点滴静注は、骨密度増加効果を認めている。また、骨形成不全症の管理について現状把握のため全国の産科および小児科施設へのアンケート調査（一次、二次）を行った。患者生存数が産科（一次 70%、二次 58%）の方が小児科（一次、二次とも 95%以上）よりも少なかった。より重症例を扱う頻度が高く、妊娠中絶または看取り医療を選択するのが高率であったためと考えられる。小児科では多くの患者でビスフォスフォネート治療が実施されており、今後はその有効性を産科医に伝えていく必要があると思われる。

#### 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。また我が国において、致死性の型を含め、骨形成不全症の管理がどのように行われているかは知られておらず、現状を把握するため全国の産科および小児科施設へのアンケート調査を行った。

#### 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 法にて行った。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*、*BMP*、*TMEM38*、*WNT1*) のシーケンスを行う。あるいは、可能であれば次世代シーケンサーを用い、エクソーム解析を行った。

(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 (20013-1-124)、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かった(註.平成 25 年 10 月に保険収載された)ため、これまで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平成 24 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方法を確立し、その有効性と安全性について検討する（アレンドロネート注による小児骨形成不全症（重症型を含む）の治療効果に関する臨床研究（臨床試験登録番号：UMIN000010615））。

（倫理面への配慮）

本研究は、東北大学病院倫理委員会にて審査され承認されており（2012-2-201-1）、倫理面には十分配慮している。対象者には説明文書を用いて、本研究の目的、方法、予想される副反応などについて十分説明し、理解いただいた上で行う。

### 3. 骨形成不全症に関するアンケート調査

全国の産科、小児科、新生児科を対象に他の重症骨系統疾患とともに、経験数、生存数、呼吸管理の有無、看取りの医療を選択したかどうか、ビスフォスフォネート治療（小児科のみ）、遺伝子診断の有無について、および出生前診断について調査を行った（一次調査）。

一次調査の結果を踏まえ、二次調査を行った。産科施設に対しては、骨形成不全症症例の出生前診断の有無およびその方法、妊娠中断や看取りの有無およびその理由、遺伝カウンセリングの有無について調査した。また小児科施設に対しては、骨形成不全症症例の臨床病型、出生前診断、人工呼吸管理の有無、ビスフォスフォネート治療の有無と使用した薬剤、遺伝子診断と遺伝カウンセリングについて調査した。

（倫理面への配慮）

本研究は、東北大学病院倫理委員会にて審査され承認されており（2013-1-309）、個人情報の保護など、倫理面には十分配慮している。

## 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 *Coll1A1*、*Coll1A2* 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。上記以外に、大阪大学病院小児科通院中の骨形成不全症患者 3 名についても遺伝子解析を行ったが、臨床病型との関連の検討には含めていない。

19 家系中 8 家系（42%）で *Coll1A1*、6 家系（32%）で *Coll1A2* 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、*Coll1A1*、*Coll1A2* 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 *Coll1A1*、*Coll1A2* の解析を施行したが、欠失は検出されなかった。

大阪の 3 例は、それぞれ *Coll1A2* のミスセンス変異、欠失、*Coll1A1* のスプライシング異常であった。

#### 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

*Coll1A1*、*Coll1A2* 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

*Coll1A1*、*Coll1A2* 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（*Coll1A1*: 1.54、*Coll1A2*: 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。

#### 6) エクソーム解析