

Col1A1、*Col1A2*に変異を認めなかった患者のうち4例でエクソーム解析を行った。このうち1例において、直接シーケンス法で検出できなかった *Col1A1* の p.G326R 変異を認めた。他の3例は既知遺伝子の変異は認めず、現在解析継続中である。

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 μg (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 μg (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、「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)」として臨床研究登録し、東北大学病院倫理委員会でも承認され、平成25年から開始している。現在2名の登録があり進行中である。現時点で治療開始3~6ヶ月経過しているが、いずれの症例も骨密度増加が得られ、治療効果ありと考えられる。しかし、パミドロネートに比べて骨密度の増加率はやや少なく、乳児例の1例では投与量を増量して経過観察中である。

3. 骨形成不全症に関するアンケート調査

1) 一次調査

①産科施設アンケート送付数 707、返信数 191 (回答率 27%)。

骨形成不全症 110 例、生存数 77 例(70%、妊娠中絶されなかった例のうち 92%)、呼吸管理 15 例 (妊娠中絶されなかった例のうち 18%)、看取り医療 13 例 (妊娠中絶されなかった例のうち 15%)、妊娠中絶 26 例 (24%)、遺伝子診断 16 例 (15%)、出生前診断 86 例 (78%)。

②小児科施設アンケート送付数 521、返信数 281 (回答率 54%)。

骨形成不全症 339 例、生存数 330 例 (97%)、呼吸管理 41 例 (12%)、看取り医療 9 例 (3%)、ビスフォスフォネート治療 278 例 (生存例のうち 84%)、遺伝子診断 91 例 (27%)、出生前診断 78 例 (23%)

2) 二次調査

①産科施設アンケート送付数 104、返信 56 (回答率 54%)、

骨形成不全症 91 例、生存数 53 例(58%)、死亡 30 例 (33%)、不明 8 例

a. 出生前診断：はい74名 (81%)、いいえ16名、不明 1 名

- b. 出生前診断の方法：超音波検査74名、胎児CT19名、その他2名(妊婦、家族に同疾患)
- c. 超音波検査所見：大腿骨短縮73名、大腿骨変形44名、他の四肢骨変形38名、肋骨変形24名、狭胸郭28、頭蓋骨の圧迫変形26名、その他6名(BPDが大きい、大腿骨骨折など)
- d. 呼吸管理：あり11名、なし58名
- e. ビスフォスフォネート治療：あり19名、なし44名、不明18名
- f. 妊娠中絶または看取り：あり31名(34%)、なし41名、不明19名
- g. 上記fの理由：出生しても生命予後が不良26名(84%)、骨変形が著明6名(19%)、有効な治療法がない11名(35%)自施設及び周辺施設にNICUがない0名、その他4名(療養困難、妊婦が同疾患)
- h. 遺伝カウンセリング：されていた23名、されていなかった8名
- i. カウンセリング担当：産科医4名、小児科医19名、遺伝専門医7名

②小児科施設アンケート送付数 137、返信 82 (回答率 60%)

骨形成不全症 325 例、生存数 311 例(96%)、死亡 10 例 (3%)、不明 4 例

- a. 臨床病型：I型180名、II型16名、III型87名、IV型24名、V型2名、VI型1名、その他5名、不明10名
- b. 出生前診断：あり77名(24%)、なし207名、不明41名
- c. 出生前診断の方法：超音波検査77名、胎児CT20名、その他15名(胎児MRI、母が同疾患、X線など)
- d. 呼吸管理：あり27名、なし256名、不明42名
- e. ビスフォスフォネート治療：回答のあった82施設中45施設(55%)であり(治療数236名)、治療なし83名、不明4名
- f. 治療薬剤(45施設中)
 - [注射薬]パミドロネート 42 施設(93%)、ゾレドロネート 2 施設(4%)、アレンドロネート 2 施設(4%)、その他 1 施設(インカドロネート)
 - [経口薬]エチドロネート 2 施設(4%)、アレンドロネート 13 施設(29%)、リセドロネート 2 施設(4%)、ミノドロネートなし、その他 1 施設(アルファカルシドール)
- g. 遺伝子診断：あり75例(23%)、なし249例、不明1例
- h. 責任遺伝子：*COL1A1* 45名、*COL1A2* 19名、*CRTAP* 0名、*LEPRE1* 0名、*IFITM5* 1名、*SERPINF1* 0名、その他1名
- i. 遺伝カウンセリング：されていた45名、されていなかった22名
- j. カウンセリング担当：産科医25名、

D. 考察

1型コラーゲン遺伝子 (*Col1A1*, *Col1A2*) 解析を行ったところ、合計 79%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1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%と高頻度であるのと同様であった。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 (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。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 Δ 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。

今回4例でエクソーム解析を施行したが、この方法は骨形成不全症の遺伝子解析の手法として有用である。1型コラーゲン遺伝子は2つ (*Col1A1*, *Col1A2*) あり、いずれも大きな遺伝子である。さらに *Col1A1*, *Col1A2* 以外にも、骨形成不全症の原因として10以上の遺伝子が知られている。エクソーム解析であれば、一度にすべてのエクソン領域を解析することが可能であり、既知遺伝子に変異があるかどうか容易に判断することができる。実際今回も、エクソーム解析を行った4例のうち1例で *Col1A1* の変異を検出できた。

エクソーム解析の問題点は、1件につき数十万円という高額の費用である。今後コ

ストの軽減により費用を低下することができれば、実用的となる。既知遺伝子のみをターゲットにすればより廉価で施行できるが、今回の3例のように既知遺伝子に変異を認めない場合は、解析不能である。

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の臨床試験を開始した。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。点滴静注薬は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。

本臨床試験は登録数がまだ2例と少なく、治療効果についての評価は難しい。今後症例数を増やして、治療効果を明らかにして行きたい。

アンケート調査では、産科施設と小児科施設とで一部異なる結果が得られた。産科施設では骨形成不全症患者の生存数が比較的少なく (一次調査70%、二次調査58%)、小児科施設の調査での生存数と対照的であった (一次、二次とも95%以上)。これは、小児科施設では比較的軽症患者の比率が高く (1型が180名、55%)、産科施設の方がより重症型の患者を扱う頻度が高いためと思われるが、妊娠中絶または看取り医療の選択が35%前後と高率であることは一つの要因である。致死的といわれるII型と、重症ではあるが生存可能なIII型とで、小児科施設の調査でそれぞれ16名 (5%)、87名 (27%) と、その割合に差異を認めることを考えると、妊娠中絶または看取り医療の例の中には、生存可能症例が相当数あった可能性がある。妊娠中絶の理由として、骨変形が著明、有効な治療法がない、療養困難などがあり、必ずしも致死的かどうか確定的ではない理由が挙げられていることからそれは伺える。

小児科施設の二次調査で、ビスフォスフォネート治療を行っている施設は55%であったが、治療を行っている患者数は236例 (73%) と多く、産科施設の21% (19名) と対照的である。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行く必要があると思われる。

一方、出生前診断は多くの例で行われ、超音波検査が非常に有用である。その所見として大腿骨の異常が最も多く、その他の四肢骨、肋骨や胸郭の変化が次いでいる。頭蓋骨の圧迫変形を挙げたものも3分の一あり、他の疾患との鑑別に有用と思われる。胎児CTが20例で施行されていたが、これ

も他の骨系統疾患との鑑別のため行われたものと考えられる。ただ、いずれも骨形成不全症の病型を診断するには不十分であり、重症度判定が可能となる基準や評価法の策定が必要である。

遺伝子診断が行われたのは 23%の症例であり、大部分が 1 型コラーゲン遺伝子異常であった。その際の遺伝カウンセリングは、小児科医が担当していること多いようだが、カウンセリングがされていない施設も少なくなく、遺伝専門医を含めた協力体制が望まれる。

上述の通り小児科施設では、治療としてビスフォスフォネート投与が行われているが、その薬剤の大部分がパミドロネートであった。これは本剤が 20 年以上前から骨形成不全症患者に投与され、効果および起こりうる副反応がよく知られていること、我が国でも治療ガイドラインがあること（日本小児科学会雑誌 2006）などによると考えられる。アレンドロネート注投与は 2 施設に留まったが、本剤は水分負荷が少ないことから患者への負担が少なく、今後治療効果を示して行く必要がある。その他経口薬では、アレンドロネート内服薬が 3 割ほどで投与されていたが、年長の患者と考えられる。

E. 結論

骨形成不全症患者の遺伝子解析は、その重症度の推測に有用であり、費用および効率の改善を要する。

アレンドロネート注は、骨形成不全症の新たな治療として有用である可能性がある。

重症型骨形成不全症に対する認識について、産科医と小児科医との間に相違がある可能性がある。しかし、重症骨形成不全症の有効な治療法の確立は途上にあり、今後知見の蓄積が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 藤原幾磨. 骨系統疾患. 大藪恵一編集. ワンランク上の小児の臨床検査-病態生理に基づく選び方・考え方- 小児科学レクチャー 総合医学社. 3(2):490-493, 2013.

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, Minneapolis, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

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
(分担) 研究報告書

「大理石骨病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。本邦における乳児大理石骨病の診療の実態を把握するため、平成24年度(1年目)に新生児科、小児科医療機関を対象として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、10例が把握された。平成25年度(2年目)は、これらの症例の詳細について二次調査を行った。回答のあった5例のうち、1例は乳児悪性型で骨髄移植が施行されたが死亡していた。残りの4例は生存しており、中間型もしくは遅発型であった。中間型と考えられた3症例においては *CLCN7* の複合ヘテロ変異あるいはヘテロ変異が同定されていた。中間型においても、骨折のほか、顔面神経麻痺や視力障害など患者のQOLに影響を及ぼしうる重大な合併症が存在することが明確となった。

また、1996年～2013年に当研究室において遺伝子診断を行った58例の低フォスファターゼ症日本人症例について、遺伝子型と臨床像との関連性を検討した。活性を完全に喪失している *c.1559delT* 変異が最も多く、116アレル中47アレル(41%)にのぼった。また、周産期良性型と関連する *F310L(p.F327L)* 変異が2番目に多く同定され、116アレル中15アレル(13%)で検出された。同定された *TNSALP* 変異のうち、これまで活性が検討されていなかった変異について発現ベクターを構築し、残存活性を評価した。さらに、周産期重症型低フォスファターゼ症の症例に生後1日目から酵素補充治療を行い、有効性を確認した。本症例の経過から、最重症症例であっても、生後早期から酵素補充療法を行う事で、予後の改善が期待できる事が示唆された。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有用な情報を提供する。

A. 研究目的

大理石骨病は骨吸収の障害に基づく慢性骨硬化性病変の総称で、異質性が高く、予後不良な常染色体劣性型(乳児悪性型)、軽症とされる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* 欠損症などが含まれる。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、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。

乳児大理石骨病は頻度が少なく、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。予後不良な乳児悪性型大理石骨病においては、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、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とされている。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、乳児大理石骨病診療のための診療指針の作成を行うことは、医療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、本邦における乳児大理石骨病の診療の実態を調査・解析を行った。

乳児型大理石骨病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。すなわち、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 *OSTM1*、破骨細胞の分化や活性化に関わる 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。また、遅発型はレントゲン所見から I 型と II 型に分類され、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、本研究においては、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も目的の一つとした。

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、分担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のを見いだした。さらに、日本人患者においては、F310L (p.F327L) 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)。これまで、根本的な治療法がなかったことから、周産期発症症例については中絶や看取りの医療が選択されることもあったが、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、本研究においては、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事も目的と

した。

B. 研究方法

1) 乳児大理石骨病の実態に関する一次調査

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(一次調査)。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) 乳児大理石骨病の実態に関する二次調査

上述の一次調査で「乳児大理石骨病の診療経験あり」との回答を得た医療機関に対して二次調査票を郵送にて送付し、各々の症例について以下の項目に関する調査を行った。

- a) 生存中か死亡か
- b) 性別
- c) 初発時の年齢及び症状
- d) 現在の年齢 (死亡例は死亡時年齢)
- e) 出生前診断の有無
- f) 遺伝カウンセリングの有無、カウンセラーの専門性
- g) 呼吸器使用の有無及び使用期間
- h) 骨髄移植あるいは臍帯血移植の有無と施行時年齢
- i) 骨髄移植ドナーは血縁者、非血縁者のいずれであったか
- j) 経過中に認められた症状
- k) 死亡例の死因
- l) 遺伝子診断施行の有無
- m) 責任遺伝子変異

3) 大理石骨病・類縁疾患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遺伝子診断を行った。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 線像や血液検査所見に基づいて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、直接シーケンス法、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。また、必要に応じて Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法による解析を行った。

4)低フォスファターゼ症の遺伝子診断及び遺伝子型-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。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。さらに、1996～2013年に当研究室で遺伝子診断を行った日本人症例 58 例について、遺伝子型と表現型との相関性を検討した。

5)変異アルカリフォスファターゼの機能解析

同定された *TNSALP* の変異のうち、残存活性が不明な変異について、発現ベクターを構築し、培養細胞 (COS7) に発現させ、残存活性を評価した。

6)周産期重症型低フォスファターゼ症に対する酵素補充治療

平成 24 年より、当研究班研究代表者 (大菌恵一) を責任医師として、低フォスファターゼ症の乳幼児を対象としたヒト組換え非特異的アルカリフォスファターゼ融合蛋白の安全性、有効性及び薬物動態の検討を目的とする治験が開始された。分担者 (道上敏美) の所属施設においても周産期重症型の症例が発生した。治験対象外であったが、倫理委員会の承認のもとで患者家族の同意を得、人道的見地から無償提供された治験薬を用いて、生後 1 日目から治療を開始し、経過を詳細に観察した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析及び酵素補充治療については、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)乳児大理石骨病の実態に関する一次調査

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)乳児大理石骨病の実態に関する二次調査

一次調査で把握された 10 症例について、二次調査を行った。うち、5 症例について調査票が回収された (回答率 50%)。症例が稀少であるので、個々の症例について得られた情報を以下に記載する。

【症例 1】

- a) 死亡
- b) 男児
- c) 初発時 0 歳 4 カ月：肝脾腫、貧血、血小板減少
- d) 1 歳 4 カ月時に死亡
- e) 出生前診断：なし
- f) 遺伝カウンセリング：なし
- g) 呼吸器使用：なし
- h) 骨髄移植：施行 (0 歳)
- i) 骨髄移植ドナー：血縁者
- j) 経過中に認められた症状：血液学的異常、感染症、出血
- k) 死亡例の死因：肺高血圧症
- l) 遺伝子診断：施行
- m) 責任遺伝子変異：*TCIRG1* (c.1305G>T; c.1952/1953delCA 複合ヘテロ変異)

【症例 2】

- a) 生存
- b) 男児
- c) 初発時 1 歳：歯牙萌出遅延
- d) 生存中 (11 歳 6 カ月)
- e) 出生前診断：なし
- f) 遺伝カウンセリング：小児科医が施行
- g) 呼吸器使用：なし
- h) 骨髄移植：なし
- i) 該当せず
- j) 経過中に認められた症状：骨折
- k) 該当せず

- l) 遺伝子診断：施行
- m) 責任遺伝子変異：CLCN7
(p.R286Q/p.S434L 複合ヘテロ変異)

【症例 3】

- a) 生存
- b) 女兒
- c) 初発時 1 歳：歯牙萌出遅延
- d) 生存中 (11 歳 6 カ月)
- e) 出生前診断：なし
- f) 遺伝カウンセリング：小児科医が施行
- g) 呼吸器使用：なし
- h) 骨髄移植：なし
- i) 該当せず
- j) 経過中に認められた症状：骨折、顔面神経麻痺
- k) 該当せず
- l) 遺伝子診断：施行
- m) 責任遺伝子変異：CLCN7
(p.R286Q/p.S434L 複合ヘテロ変異)

【症例 4】

- a) 生存
- b) 男児
- c) 初発時 6 カ月：偶然発見 (父が大理石骨病)
- d) 生存中 (13 歳 6 カ月)
- e) 出生前診断：なし
- f) 遺伝カウンセリング：なし
- g) 呼吸器使用：なし
- h) 骨髄移植：なし
- i) 該当せず
- j) 経過中に認められた症状：なし
- k) 該当せず
- l) 遺伝子診断：施行せず
- m) 該当せず

【症例 5】

- a) 生存
- b) 女兒
- c) 初発時 1 歳：視力障害 (視神経萎縮)
- d) 生存中 (29 歳 0 カ月)
- e) 出生前診断：なし
- f) 遺伝カウンセリング：なし
- g) 呼吸器使用：なし
- h) 骨髄移植：なし
- i) 該当せず
- j) 経過中に認められた症状：視力障害、骨折

- k) 該当せず
- l) 遺伝子診断：施行
- m) 責任遺伝子変異：CLCN7
(p.R767W ヘテロ変異)

今回、二次調査に対して回答のあった 5 例については、1 例が死亡、残りの 4 例が生存していた。回答が得られなかった 5 例については、一次調査の結果から 4 例が死亡していたと考えられ、それらの死亡例は乳児悪性型大理石骨病であったと推定される。今回、回答が得られた上述の 5 症例については、症例 1 は乳児悪性型大理石骨病、症例 2,3,5 は中間型と考えられた。症例 4 は偶然に発見されなければ遅発型の経過を示したと推察される。症例 1 は骨髄移植が施行されたが死亡しており、乳児悪性型の症例については、骨髄移植が行われたとしてもいまだ救命困難であることが明らかとなった。中間型と考えられた症例 2,3,5 においては CLCN7 の複合ヘテロ変異あるいはヘテロ変異が同定されていた。骨折のほか、顔面神経麻痺や視力障害が認められており、中間型においても、患者の QOL に影響を及ぼしうる重大な合併症が存在することが明確となった。

3) 大理石骨病・類縁疾患における遺伝子診断

平成 25 年度には、遅発型と考えられる大理石骨病新規症例 3 例について、遺伝子診断を行い、CLCN7 ヘテロ変異 (p.R762W, p.R286Q) を同定した。p.R762W が同定された 10 歳女児例では反復する股関節痛が診断の契機となっていた。また、p.R286Q が同定された 16 歳の男性例では、10 歳以降これまでに、椎体を含め 30 回以上骨折をしていた。このように、一般に軽症と考えられている遅発型の症例においても、しばしば患者の QOL に大きく影響しうる症状が存在することが明らかとなった。

また、埋没乳歯を主訴として口腔外科を受診した際に骨硬化に気づかれ、大理石骨病が疑われた 18 歳男性について、全身の X 線撮影を施行した結果、長管骨に特徴的な線状骨硬化が認められたことから、Osteopathia Striata with Cranial Sclerosis (OSCS) と診断した。本疾患は X 連鎖性疾患で、WTX 遺伝子の変異により引き起こされる。男性患者は通常、女性よりも重症で、精神発達遅滞を伴い、早期に死亡することが多いが、中には WTX のモザイクの変異や欠失により生存可能な男性症例も存在する。

本症例について *WTX* 遺伝子のシーケンシングを行ったが変異が検出されなかったため、MLPA を施行し、*WTX* 遺伝子のモザイク欠失を同定した。

4) 低フォスファターゼ症の遺伝子診断及び遺伝子型-表現型相関に関する検討

平成 24・25 年度には 12 例の日本人新規症例の遺伝子解析を行い、確定診断した。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、また、この間に低フォスファターゼ症に対する酵素補充療法の治験が開始されたことに伴い、重症型症例では生後まもなく遺伝子診断を依頼される場合が増加し、迅速な確定診断に努めた。

また、1996 年から 2013 年までに当研究室において遺伝子解析を行った 58 例の低フォスファターゼ症日本人症例について、遺伝子型と臨床像との関連性を検討した。活性を完全に喪失している *c.1559delT* 変異が最も多く、116 アレル中 47 アレル(41%)にのぼった。また、70%程度の残存活性を有し、周産期良性型と関連する *F310L* (*p.F327L*)変異が 2 番目に多く同定され、116 アレル中 15 アレル(13%)で検出された。*F310L* は、周産期発症良性型の他、歯限局型の 1 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。

F310L (*p.F327L*)を有する周産期発症良性型においては、石灰化障害は殆ど認めないが、下肢の彎曲が特徴的である。また、成長とともに彎曲が自然に軽快する例も認められる。先天性の四肢彎曲症として経過観察されている症例の中には本病型の低フォスファターゼ症の症例が存在する可能性があることから、本病型の症例の特徴を論文として発表し、周知に努めた。

5) 変異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* の変異のうち、これまで活性が検討されていなかった変異については、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。

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*)について

は、*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*)は活性を喪失していた。周産期重症型で同定された *G474R*(*p.G491R*)と *H324R*(*p.H341R*)、乳児型で同定された *A426T*(*p.A443T*)は活性を完全に喪失していた。乳児型で同定された *H321R*(*p.H338R*)は約 20%活性を保持していた。

6) 周産期重症型低フォスファターゼ症に対する酵素補充治療

分担者の所属施設において周産期重症型低フォスファターゼ症が発生し、倫理委員会の承認のもとで患者家族の同意を得、生後 1 日目から治療を開始した。症例の詳細は以下のとおり。

【症例】

いとこ婚の第 2 子。自然妊娠で妊娠成立。前医で妊娠 28 週時に FL (大腿骨長) -4SD を指摘され、大阪府立母子保健総合医療センター産科に紹介となり、胎児 MRI 検査で低フォスファターゼ症疑いと診断した。現在、乳児型に対する酵素補充療法の治験が開始されており、本症例は対象外であったが、個人輸入での投与が可能であったため、倫理委員会の承認のもとでこれらの点について家族に説明を行い、投与の意思を確認した。妊娠 37 週 5 日で予定帝王切開での児娩出となった。出生後啼泣なく、直ちに気管内挿管し、呼吸管理を開始した。出生時の全身 X 線撮影にて著明な骨石灰化障害を認め、血清 ALP 値が 2 IU/L と低下していたため、低フォスファターゼ症と診断。臍帯血及び児血よりゲノム DNA を抽出し、*TNSALP* 遺伝子解析を行ったところ、患児は *G474R*(*p.G491R*)変異のホモ接合体であることが判明した。本変異型 ALP は活性を完全に喪失していた。日齢 1 より酵素補充療法を開始したところ、骨石灰化の改善、呼吸機能の改善が認められ、気管切開、酸素投与のみにて管理可能となっている。また、成長や発達も認められており、寝返り可能となった。生後 9 カ月時に退院し、現在は外来通院にて治療を続行している。本症例の経過から、最重症の症例であっても、生後早期から酵素補充療法を行う事で、予後の改善が認められる事が示唆された。

D. 考察

平成 24 年度(1 年目)に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た。平成25年度(2年目)に施行した二次調査の結果から、乳児悪性型に加えて、中間型などの症例も乳児期に診断される場合があることが明らかとなった。乳児悪性型の症例においては骨髄移植が行われても救命困難な場合があり、今後、より安全で有効性の高い治療法の開発が必要である。遺伝子診断が施行された症例では、*TCIRG1* 遺伝子の複合ヘテロ変異が乳児悪性型症例で同定され、また、中間型の症例では *CLCN7* の複合ヘテロ変異が同定された。中間型症例では、骨折のほか、顔面神経麻痺や視力障害など患者のQOLに影響を及ぼしうる重大な合併症が存在することが明らかとなった。*CLCN7* 遺伝子のヘテロ変異を同定した遅発型II型の症例の中にも、下肢脚長差や可動域制限を伴う股関節炎、股関節痛などを伴った症例が3例存在した。遅発型大理石骨病II型は不完全浸透を示し、*CLCN7* ヘテロ変異を有していても無症状に経過する場合もある一方で、継続的な治療が必要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、歯限局型等の軽症例についても相談が増加した。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い、データベースを構築していくことで、各症例の病態の理解と正確な予後判定が可能となると考える。低フォスファターゼ症については現在、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行政上も極めて重要である。本研究の成果はこの点についても貢献できる。

E. 結論

乳児悪性型大理石骨病においては骨髄移植

が行われても救命困難な場合があり、今後、より安全で有効性の高い治療法の開発が必要である。中間型や遅発型の大理石骨病症例の一部においても、QOLに大きく影響しうる重大な合併症が存在し、継続的な医療の提供が必要である。

酵素補充療法の開発により低フォスファターゼ症の診療はこれまでの「看取りの医療」から「積極的な治療を行う医療」へと転換しつつある。一方、周産期発症であっても予後良好な症例も存在することから、迅速かつ確実な分子診断による病型診断の提供と予後予測が、有効かつ効率性の高い診療の基盤として必須である。

F. 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(8):e42180, 2012.
- 3) 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 vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 288(4): 2414–2427, 2013.
- 4) Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR. A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone*, 56(2):375-382, 2013.
- 5) Michigami T. Extracellular phosphate as a signaling molecule. *Contrib Nephrol*,

180:14-24, 2013.

- 6) Michigami T. Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 70(22):4213-4221, 2013.
 - 7) Matsushita M, Kitoh H, Michigami T, Tachikawa K, Ishiguro N. Benign prenatal hypophosphatasia: a treatable disease not to be missed. *Pediatr Radiol*, Oct. 22, 2013. E-pub ahead of print.
 - 8) Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. *J Biol Chem*, 289(3):1457-1466, 2014.
 - 9) Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, Choi IH, Ozono K, Cho TJ. Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *Am J Med Genet A*, 164A(1):156-163, 2014.
 - 10) Michigami T. Current understanding on the molecular basis of chondrogenesis. *Clin Pediatr Endocrinol*, 23(1):1-8, 2014.
 - 11) 道上敏美. 遺伝子異常と骨硬化性疾患. 腎と骨代謝, 25(2):153-160, 2012.
2. 学会発表
- 1) 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, 2012.10.12-15.
 - 2) 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, 2012.10.12-15.
 - 3) Michigami T, Cundy T, Tachikawa K, Dray M, Collins J. Phenotypic change in a patient with hypophosphatasia with the onset of renal failure. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, 2013.5.28-6.1
 - 4) Ibata T, Yamamoto T, Nishikawa J, Kitai H, Nishi C, Komuro R, Adachi K, Tsuda T, Michigami T, Ozono K. A case of postmenopausal osteoporosis complicated by hypophosphatasia. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, 2013.5.28-6.1.
 - 5) Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Ozono K, Michigami T. Fetal stage-specific mineral metabolism in *Hyp* mice is associated with effects of FGF23 on placenta. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.
 - 6) Nishino J, Miyagawa K, Kawai M, Yamazaki M, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate induces the expression of *Dmp1* in osteoblast/osteocytes lineage cells via Na^+/Pi Co-transporter and MEK/ERK pathway. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.
 - 7) Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. 2013. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore,

2013.10.4-7.

- 8) Cundy T, Michigami T, Tachikawa K, Collins J, Dray M. Change of phenotypic in a patient with hypophosphatasia with the onset of renal failure. 35th Annual Meeting of the American Society for

Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.

- G. 知的所有権の取得状況
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
(分担) 研究報告書

「CNP 関連疾患・CNP 治療に関する研究」

研究分担者：八十田 明宏 京都大学大学院医学研究科 講師

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) はナトリウム利尿ペプチドファミリーの1つである生理活性ペプチドで、膜型グアニル酸シクラーゼそのものである受容体である NPR-B を介して生物作用を発揮する。分担研究者はこれまでに、CNP/NPR-B 系が強力な骨伸長促進作用を有することを、主に遺伝子改変マウスを用いた研究から明らかにしてきた。一方で、研究代表者は NPR-B の活性型変異により骨の過伸長をきたす症例を報告しており、今後 CNP/NPR-B 系の賦活化が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ている。本分担研究では、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 あるいは NPR-B 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。

A. 研究目的

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、natriuretic peptide receptor A および B (NPR-A および 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、分担研究者はこれまでに、CNP-NPR-B 系が内軟骨性骨化に作用して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 型であるマロト一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)、さらに本研究の研究代表者・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 (*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てきた。そのことを踏まえて本分担研究では、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。

B. 研究方法

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一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、分担研究者は 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 は脳、血管、生殖腺等に遍在的に発現していることが知られている。分担研究者らは、CNP の成長板軟骨における発現を確認したが (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001)、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。

3. 軟骨特異的NPR-Bノックアウトマウスの作製と解析

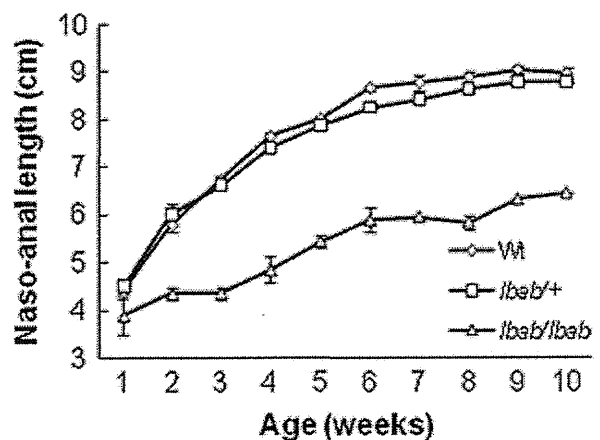
リガンドであるCNPと同様に、NPR-Bも脳、血管、生殖腺等に遍在的に発現していることが知られている。分担研究者らはNPR-Bの成長板軟骨における発現も確認したが (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001)、CNPの場合と同様に、軟骨特異的発現を可能にするII型コラーゲンプロモーターによるCreトランスジェニックマウスを用いてNPR-Bの軟骨特異的ノックアウトマウスを作製し、内軟骨性骨化により形成される骨の表現型をマウスの全長や軟X線写真による各骨長の測定、成長板の組織写真により解析し、完全ノックアウトマウスと比較した。

(倫理面への配慮)

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ている。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(承認番号MedKyo07598)、実験動物に対して苦痛を与えないよう、動物愛護上の十分な配慮をおこなったうえで研究をおこなった。

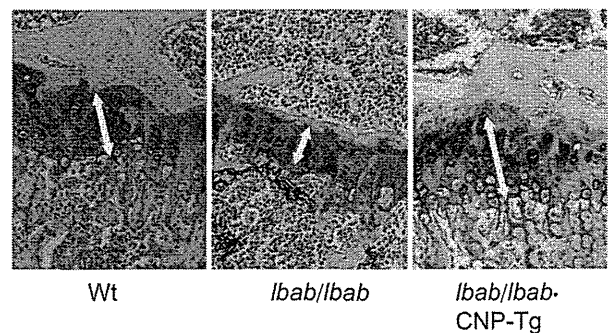
C. 研究結果

1. CNP 遺伝子変異マウス (*Ibab/Ibab*) の解析
 生直後、*Ibab/Ibab* の吻肛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。*Ibab* のヘテロマウス (*Ibab/+*) では野生型との差は認められなかった(図1)。軟X線による解析では、*Ibab/Ibab* 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、橈骨、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、*Ibab/Ibab* の成長板幅は野生型と比較して著しく減少していた。



(図1) *Ibab/Ibab* の成長曲線

さらに、*Ibab/Ibab* 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、*Ibab/Ibab* 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(*Ibab/Ibab*・CNP-Tg)の吻肛長は、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、*Ibab/Ibab* 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、*Ibab/Ibab*・CNP-Tgでは野生型とほぼ同程度であった(図2)。

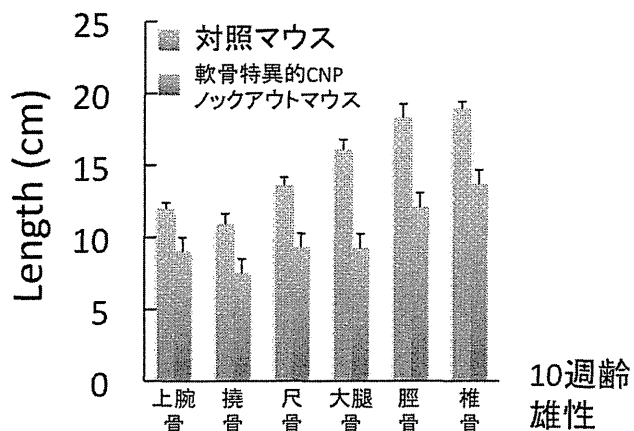


(図2) *Ibab/Ibab*、*Ibab/Ibab*・CNP-Tg の成長板軟骨組織像

2. 軟骨特異的CNPノックアウトマウスの作製と解析

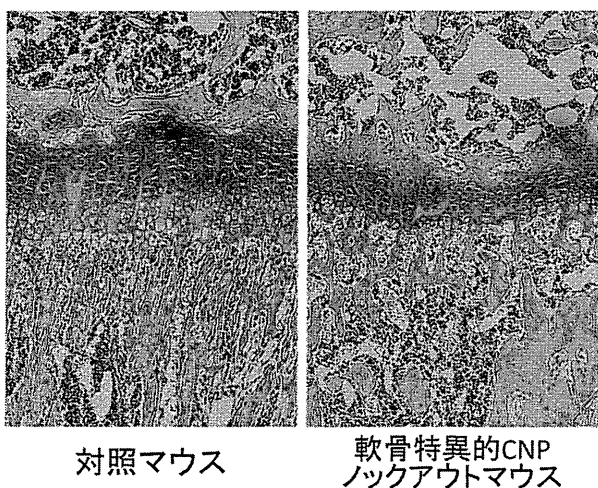
作製された軟骨特異的CNPノックアウトマウスにおいて、著明な低身長が認められ、その吻肛長は対照マウスと比較して79%であった。上腕骨、

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 (図 3)。



(図 3) 軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスの各骨の長さ

また、4 週齢マウスの組織学的解析では、軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスにおいて成長板軟骨幅の縮小を認め、特に肥大化軟骨細胞層における著しい短縮を認めた (図 4)。

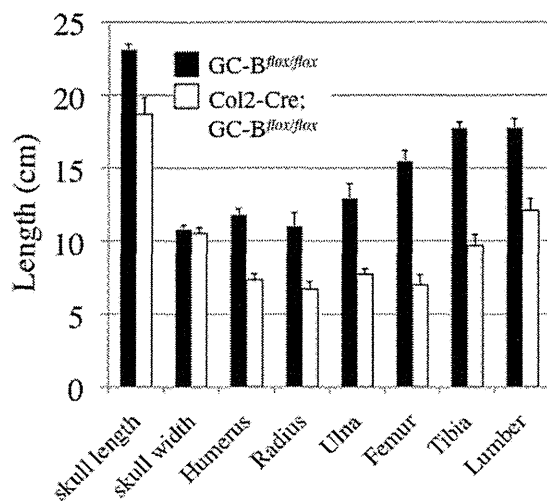


(図 4) 軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスの組織像

3. 軟骨特異的 NPR-B ノックアウトマウスの作製と解析

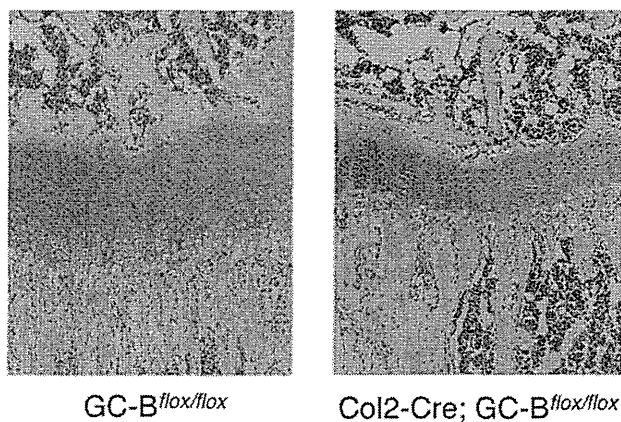
作製された軟骨特異的 NPR-B ノックアウトマウスにおいて、著明な低身長が認められ、その吻髻

長は対照マウスと比較して 63% 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 45~63% となった (図 5)。



(図 5) 軟骨特異的 NPR-B ノックアウトマウスの各骨の長さ

また、4 週齢マウスの組織学的解析では、軟骨特異的 CNP ノックアウトマウスとまったく同様に、NPR-B ノックアウトマウスでは成長板軟骨幅の縮小を認め、特に肥大化軟骨細胞層における著しい短縮を認めた (図 6)。



(図 6) 軟骨特異的 NPR-B ノックアウトマウスの組織像

D. 考察

分担研究者らが同定した 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、その骨伸長障害は分担研究者らがこれまでに報告した 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顎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。また、CNP と NPR-B の軟骨特異的ノックアウトマウスの比較では、CNP と比較して NPR-B のノックアウトマウスの方が、骨伸長障害の表現型が顕著であった。この理由としては、CNP の遍在的発現のため、血管内皮をはじめとする様々な場所で産生された CNP が成長板軟骨まで (hormonal に) 到達しては作用しうると考えれば、受容体ノックアウトマウスの方がリガンドノックアウトマウスより強い表現型が現れたものとして考えられる。ところが、両者の完全ノックアウトマウスにおいても、NPR-B の完全ノックアウトマウスの方が CNP のそれより骨伸長障害が顕著であるという同様の傾向が認められており、上述の解釈のみで現象を説明するのを困難にしている。NPR-B の CNP 以外のリガンドを想定することも必要であり、その候補として、ひとつは同じナトリウム利尿ペプチドファミリーである ANP や BNP が挙げられる。それ以外の全く未知のリガンドの存在の可能性についても、今後検討が必要であるかもしれない。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きたが (マロト型遠位中間枝異形成症および機能亢進型変異)、最近ヒトにおける CNP の遺伝子変異を示唆

する骨伸長障害の症例も報告されている (PLoS One 2014)。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。

E. 結論

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 あるいは NPR-B ノックアウトマウスの解析をおこなって、CNP の骨伸長に対する生理的作用を解析した。CNP-NPR-B 系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。重症骨系統疾患に対する治療戦略として、CNP/NPR-B 系賦活化治療の有効性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. Skeletal Analysis of the Long Bone Abnormality (*lbab/lbab*) Mouse, A Novel Chondrodysplastic C-Type Natriuretic Peptide Mutant. *Calcif Tissue Int*. 90:307-18, 2012

2. 学会発表

国内学会

1. 藤井 寿人, 八十田 明宏, 近藤 絵里, 中尾 一祐, 小山 典昭, 山下 唯, 上田 依利子, 金本 巨哲, 曾根 正勝, 三浦 晶子, 荒井 宏司, 中尾 一和、モデルマウスを用いたムコ多糖症 7 型の骨伸長障害に対する C 型ナトリウム利尿ペプチドの有効性の検討、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012/4/12-21
2. 中尾 一祐, 八十田 明宏, 大澤 賢次, 小山 典昭, 近藤 絵里, 藤井 寿人, 金本 巨哲, 三浦 晶子, 曾根 正勝, 荒井 宏司, 別所 和久, 中尾 一和、内軟骨性骨化における CNP/GC-B 系の生理的意義 軟骨特異的ノックアウトマウスの解析、第 85 回日本内分泌学会学術

総会、2012/4/12-21

3. 藤井 寿人, 八十田 明宏, 近藤 絵里, 中尾 一祐, 小山 典昭, 山下 唯, 上田 依利子, 金本 巨哲, 曾根 正勝, 三浦 晶子, 荒井 宏司, 中尾 一和、ムコ多糖症 7 型モデルマウスの骨伸長障害に対する C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の有効性の検討 生存率に与える影響を含めて、第 30 回日本骨代謝学会学術集会、2012/7/19-21、東京
4. 藤井 寿人, 八十田 明宏, 近藤 絵里, 有安 宏之, 金本 巨哲, 曾根 正勝, 三浦 晶子, 荒井 宏司, 中尾 一和、Zinc Finger Nuclease Technology を用いた C 型ナトリウム利尿ペプチドノックアウトラットの作製 日本内分泌学会、2013.4.25-27、仙台
5. 中尾 一祐, 八十田 明宏, 小山 典昭, 近藤 絵里, 藤井 寿人, 三浦 晶子, 別所 和久, 中

尾 一和、C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の顎顔面形態における影響および顎変形症に対する臨床応用の可能性 遺伝子改変マウスを用いた解析、日本内分泌学会 2013.4.25-27、仙台

6. 近藤 絵里, 八十田 明宏, 藤井 寿人, 三浦 晶子, 中尾 一和、C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)のマウス骨折治癒における役割の解明、日本骨代謝学会、2013.5.28-6.1、神戸
7. 近藤 絵里, 八十田 明宏, 藤井 寿人, 三浦 晶子, 中尾 一和、C 型ナトリウム利尿ペプチドのマウス骨折治癒における役割の解明、日本臨床分子医学会学、2013.7.12-13、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者 仲野 和彦 大阪大学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している骨系統疾患罹患患児の実態調査を行い、歯科的問題点とその対応を検討した。最も多く存在した骨形成不全症の患児においては、象牙質形成不全を高頻度で認め、その対応として乳歯冠による歯冠補綴が有効であることが示された。また、治療に際しては、低年齢児の抑制治療時の易骨折性やビスフォスフォネート製剤投与中の患児に対する配慮が重要であると考えられた。次に頻度が多かった低フォスファターゼ症においては、乳歯の早期自然脱落を高頻度で認め、その対応として小児義歯の装着が有効であると考えられた。低フォスファターゼ症患児の歯科的所見に対する全国規模の実態調査を行ったところ、約80%の症例において乳歯の早期自然脱落を認めることが分かった。また、自然脱落は下顎乳前歯に高頻度で認めるとともに、4歳頃までに生じることが示された。さらに、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を行ったところ、歯根表面においてセメント質の形成が観察され、遺伝子治療が歯に対しても有効であることが示唆された。

A. 研究目的

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、骨系統疾患罹患患児の歯科的問題点を検討し、その解決方法を追究することを目的とした。特に低フォスファターゼ症に関しては、全国調査を行い、可及的に多くの症例で詳細な分析を行うことにした。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析につながる所見を得ることとした。

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名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詳細を調査し、また、患児のカルテ、エックス線等をもとに分析

を行った。

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こども病院内の歯科(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)

大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診中の患児の実態調査および低フォスファターゼ症患児の歯科的所見に対する実態調査に関しては、大阪大学歯学研究科倫理委員会の承認を受けて行った。各症例における学会発表および論文発表に関しては、対象者の保護者より同意を得られた症例のみとした。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、当教室では免疫組織化学的分析を行った。

C. 研究結果

1. 本学歯学部附属病院小児歯科を受診中の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、X連鎖性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(61%)において認められた。象牙質形成不全は永久歯よりも乳歯で症状が重度であった。処置内容としては、エナメル質の剥離、著しい咬耗が認められた乳歯の症例においては、乳歯既製冠やレジンジャケット冠による歯冠補綴を行っており、それらの長期予後は良好であった。緊急の治療が必要な非協力児や低年齢児に対しては、抑制具を使用するなど易骨折性への配慮を行っていた。また、ビスフォスフォネート製剤投与下での抜歯にあたっては、必ず医科施設と連携し処置を行っていた。しかし、ビスフォスフォネート製剤投与中であっても、乳歯の交換期の抜歯で骨髄炎を誘発した症例は認めなかった。

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かった。本院受診症例である乳前歯部に8歯の早期脱落を認めた低フォスファターゼ症(良性周産期型)を罹患していた患児に対しては、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。

X連鎖性低リン血症性くる病の代表的な歯科所見であるう蝕や外傷の既往のない乳

歯の根尖相当部において発生する歯肉膿瘍が、4名中3名に認められた。これらの症例に対しては、一般的な感染根管処置を行っており、その予後は良好であった。また、歯髄感染を防ぐためにあらかじめ歯冠部に全部被覆を施した歯では、長期予後が良好であった。

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

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。病型は、小児型10名、歯限局型7名、良性周産期型4名、乳児型1名、不明が1名であった。このうち、18名と約80%の症例において乳歯の早期脱落を認めた。下顎乳前歯に高頻度で認められ、4歳頃までに自然脱落が生じていた。脱落した症例における脱落歯の平均は4.2本であった。永久歯の早期脱落は1名のみであった。

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、症例数が少なく、系統立てた治療法は確立されていないのが現状である。今回の大規模実態調査の結果から、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、低年齢児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。そこで、当科診療室に「骨系統疾患専門外来」を設け、専門的な見地から診査・診断および処置を行い長期的にフォローしていくシステムを構築した。

低フォスファターゼ症罹患患児における義歯の装着は、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、本疾患罹患患児への早期脱落乳歯への義歯の

装着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、乳歯の早期脱落を機に小児科受診を勧め、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とから、本研究成果について、歯科領域全般に対して広く啓蒙することの重要性を感じた。

E. 結論

骨系統疾患の症状は様々であり、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、各方面の専門的な医科領域との連携が重要である。今後さらに症例を蓄積し、骨系統疾患患児へのよりよい臨床のアプローチ法を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)大川玲奈、仲野和彦 骨系統疾患罹患患児における歯科的問題点とその対応 小児歯科臨床 18, 59-63, 2013.

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問題点とその対応 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^{-/-}* hypophosphatasia mice. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013.3.20, Seattle, USA.

- (6)Okawa R, Nakano K. Application of partial dentures for a case of early exfoliation of multiple primary teeth due to hypophosphatasia. 24th IAPD (International Association of Pediatric Dentistry) Conference, 2013.6.12, Seoul, South Korea.
- (7)大川玲奈 骨系統疾患患児に対するアプローチ 2. 歯科的問題点から 岡山大学病院 臨床セミナー、2013.7.18、岡山
- (8)Nakano K. Nationwide survey of spontaneous early exfoliation of primary teeth in children with hypophosphatasia. The 24th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-child Health Research, 2013.8.31, Fukuoka, Japan.
- (9)仲野和彦 骨系統疾患患児の歯科的問題点とその対応 国立会講演会、2013.7.14、高知
- (10)大川玲奈 骨形成不全症罹患患児における歯科的問題点と対応 第32回日本小児歯科学会近畿地方会大会、2013.9.29、奈良
- (11)大川玲奈 シンポジウム 骨系統疾患罹患患児に対するアプローチ 2. 歯科的問題点から 第32回日本小児歯科学会中四国地方会大会、2013.11.24、岡山

H. 知的所有権の出願・取得状況（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

研究代表者 長谷川高誠 岡山大学大学病院 小児科 助教

研究要旨

Thanatophoric 骨異形成症(致死性骨異形成症:以下 TD)は著明な四肢の短縮、前頭部の突出や低い鼻根部などの顔貌、著明な胸郭の低形成を示す骨系統疾患であり、線維芽細胞増殖因子受容体 3 型の構成的活性型変異が原因である。「致死性」という名称から従来 TD は出生後に死亡する疾患と考えられてきたが、近年長期的に生存する例が報告されている。一方、TD 児の長期的予後、及び小児科、産婦人科各々の TD 児の取り扱いの違いについては依然不明な点が多く、平成 24 年(1 次調査)、25 年(2 次調査)において生存例の実態調査及び小児科、産科における TD 児の取り扱いに関する実態調査を行い、TD 児は周産期の呼吸障害の適切な管理が行われれば、長期生存が可能であることが判明した。一方で、長期的には水頭症、てんかん、肺高血圧症などの合併症を呈することからこれらに対する対応が必要である。

A. 研究目的

Thanatophoric 骨異形成症(致死性骨異形成症:以下 TD)は著明な四肢の短縮、前頭部の突出や低い鼻根部などの顔貌、著明な胸郭の低形成を示す骨系統疾患であり、線維芽細胞増殖因子受容体 3 型(Fibroblast Growth Factor Receptor type 3; FGFR3)の構成的活性型変異が原因である。「致死性」という名称から従来 TD は出生後に死亡する疾患と考えられてきたが、近年長期的に生存する例が報告されている。一方、TD 児の長期的予後、及び小児科、産婦人科各々における TD 児の出生時の取り扱いの違いについては依然不明な点が多い。このことから平成 24 年(1 次調査)、25 年(2 次調査)において生存例の実態調査及び小児科、産科における TD 児の取り扱いに関する実態調査を行った。

B. 研究方法

(1 次調査)

小児科学会専門医の在籍施設 521 施設と産科婦人科学会認定施設 707 施設に対して以下の項目についてのアンケート調査を行った。

- 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) 遺伝子診断を要した人数
- 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)

(2 次調査)

1 次調査にて TD 児の診療経験があった小児科および産婦人科施設に対して個々の症例の詳細についてのアンケート調査を行った。2 次調査のアンケート項目は以下の通り。

- 1) 診断時年齢(小児科のみ)
- 2) 出生前診断法
- 3) 生存者の年齢、死亡時年齢
- 4) 遺伝カウンセリング
- 5) 病型及び遺伝子診断
- 6) 死亡原因
- 7) 生存例の発達の状態、合併症
- 8) 在宅医療への移行症例

(倫理面への配慮)

倫理委医会での承認の後、患者名を記載しない匿名でのアンケート調査とした。

C. 研究結果

1次調査で回答があったのは小児科施設281施設(回答率52%、患者数55名、生存数13名)で、呼吸管理が行われたのは46名、看取りの医療を選択されたのは29名、遺伝子診断は17名であった。出生前診断は47名になされていた。一方、産科婦人科施設で返答があったのは191施設(回答率27%、患者総数117名、生存数3名)で、呼吸管理が行われたのは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