



Title	日本人X染色体連鎖性低リン血症性くる病患者的PHEX遺伝子解析結果と表現型との関連性
Author(s)	石原, 康貴
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/76272">https://doi.org/10.18910/76272</a>
rights	This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC-BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 石 原 康 貴 ）	
論文題名	日本人X染色体連鎖性低リン血症性くる病患者的 <i>PHEX</i> 遺伝子解析結果と表現型との関連性
<p>論文内容の要旨</p> <p><b>【研究目的】</b></p> <p>X染色体連鎖性低リン血症性くる病（XLH, X-linked hypophosphatemic rickets）は血清FGF23(Fibroblast growth factor 23)上昇による低リン血症、骨変形、O脚、低身長、また腓付着部症や口腔内においてはう蝕や外傷を伴わずに生じる特発性歯膿瘍を特徴とする先天性疾患であり、その原因遺伝子は<i>PHEX</i>遺伝子（Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome）であることが明らかにされている。現在その<i>PHEX</i>遺伝子の機能やFGF23との関連、FGF23産生増加の機序は未だ明らかになっておらず、遺伝子変異と表現型の相関についても様々な報告があり結論は不明瞭なままである。今回、日本人XLH患者の有する<i>PHEX</i>遺伝子変異とFGF23を含む臨床パラメータとの関連性を比較検討すること、また現在まで行われていなかった<i>PHEX</i>タンパクの三次元構造解析からXLHの重症度に関連する要素を検討することを目的とし、医学系研究科小児科学教室において38名のXLH患者の解析を行った。</p> <p><b>【研究方法】</b></p> <p>本研究は大阪大学ヒトゲノム研究「カルシウム代謝異常・リン代謝異常・骨疾患の遺伝学的解析」（承認番号700-9）と「骨系統疾患における原因遺伝子の解明」（承認番号688-6）がすでに倫理審査委員会の審査を受け承認されている。</p> <p><b>研究 1. 遺伝子変異解析</b></p> <p>対象：当院または他施設に受診中のXLHと臨床的に診断された患者および患者家族38例（男性12名、女性26名。28家系のうち家族例15名、孤発例23名）を対象とした。</p> <p>1-1: 上記対象患者及び家族に同意を得て静脈血を採取しリンパ球よりgDNAを抽出した。<i>PHEX</i>遺伝子の22個のエクソン及び3'UTR領域、5'UTR領域についてプライマーを設計、得られたDNAを用いてPCR（Polymerase chain reaction）を行いサンガーシーケンスにて塩基配列を解析した。また、<i>PHEX</i>遺伝子に変異を認めなかった症例については<i>FGF23</i>、<i>DMP1</i>（Dentin matrix protein 1）、<i>ENPP1</i>（Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1）遺伝子についても同様にサンガーシーケンスを追加して行った。</p> <p>1-2：サンガーシーケンスにて<i>PHEX</i>遺伝子上に変異が認められなかった症例について、MLPA（Multiplex ligand-dependent probe amplification）を行い<i>FGF23</i>遺伝子および<i>PHEX</i>遺伝子の欠失または重複変異の有無を確認した。</p> <p>1-3：サンガーシーケンス、MLPAにて変異が検出されなかった症例のうち、同意を得られた3例について、全エクソームシーケンスならびにCNV（Copy number variation）解析を行った。</p> <p><b>研究 2. 遺伝子型と表現型との関連の検討</b></p> <p>2-1：診療記録より各症例の性別、年齢、治療開始前のFGF23、ALP（Alkaline phosphatase）、PTH（Parathyroid hormone）、1,25(OH)<sub>2</sub>D、25(OH)D、%TRP（Tubular reabsorption of phosphate）、Tmp/GFR（Ratio of the maximum rate of tubular phosphate reabsorption to glomerular filtration rate）、身長SD（Standard deviation）、RSS（Rickets severity score）、リン製剤ならびにビタミンD製剤の必要投与量を解析した。<i>PHEX</i>遺伝子変異をTruncating変異群（ナンセンス変異・フレームシフト変異・スプライス異常）とNon-truncating変異群（ミスセンス変異）に分類したとき、Truncating変異群において重度の骨疾患を呈するというHolmらの報告<sup>(1)</sup>に基づき、自験例も同様に2群に分類し臨床パラメータをMann-Whitney検定にて比較検討した。またエクソン上における変異の位置と臨床パラメータとの相関についても検討した。</p> <p>2-2：予想されるアミノ酸配列からI-TASSERを用いて正常および各変異<i>PHEX</i>タンパクの立体構造をホモロジーモデリングし、構造変化の程度およびそれが臨床パラメータに与える影響、またリガンド候補となる分子について検討した。PyMOLを使用し、得られた各タンパクモデルの活性部位および活性部位キャビティの可視化、重ね合わせを行った。</p>	

## 【研究結果】

### 研究 1. 遺伝子変異解析

1-1 : 38名のうち33名はサンガーシーケンスにて*PHEX*遺伝子に変異が同定され、その内訳は既報変異8種類 (20名)、新規変異7種類 (9名)、既報と同部位で他塩基への置換を生じる変異が3種類 (4名) であった。変異の種類はナンセンス変異5種類 (15名)、フレームシフト変異3種類 (3名)、スプライス異常4種類 (7名)、ミスセンス変異6種類 (8名) であった。変異はC端側に多く分布しており、既報と類似した結果となった。サンガーシーケンスにて*PHEX*遺伝子の変異が同定されなかった5症例について、*FGF23*、*DMP1*、*ENPP1*遺伝子の変異探索も行ったが、いずれも変異は検出されなかった。

1-2 : 変異が同定されなかった5症例について*PHEX*遺伝子と*FGF23*遺伝子においてMLPAを行ったが、エクソン全体および3'UTR、5'UTR領域にわたって欠失や重複といったコピー数の変化は認められなかった。

1-3 : 変異が同定されなかった5症例のうち3例で全エクソームシーケンスを行ったが、*PHEX*を含む既知の低リン血症性くる病関連遺伝子には変異は同定されなかった。CNV解析によっても病的変異となるコピー数異常は同定されなかった。

### 研究 2. 遺伝子型と表現型との関連の検討

2-1 : 患者の臨床パラメータから*FGF23*の上昇と血清リンの低下、またALPの上昇と%TRP、TmP/GFR、身長SDの低下が認められ、XLHの病態と矛盾のない結果であった。Truncating群とNon-truncating群では1,25(OH)<sub>2</sub>D値が有意にTruncating群で高く認められたが、その他の臨床パラメータでは差は認められなかった。また*PHEX*遺伝子のN端側に変異を持つ症例とC端側に変異を持つ症例との比較においても臨床パラメータには差を認めなかった。

2-2 : *PHEX*タンパクはアミノ酸配列の相同性からネプリライシンという既知の亜鉛含有メタロペプチダーゼと類似した構造および機能を有すると推定されている。変異タンパクの予測モデルを構築した結果、一部の変異体において亜鉛結合部位を喪失している可能性が示唆された。しかしながら亜鉛結合部位の有無では臨床パラメータの有意な差は認められなかった。また、予測モデルから亜鉛以外のリガンド候補を推定したところ、ネプリライシン阻害剤であるホスホラミドン(RDF)がより高い信頼度スコアでリガンドとして推定された。変異ごとにモデル構築を行い、p.G585R変異のみがRDFではなくN-(3-Phenyl-2-Sulfanylpropanoyl)Phenylalanylalanineをリガンドの第一候補としていたが、リガンドの違いによる臨床パラメータの差は見られなかった。さらに、活性部位キャビティを可視化すると、2つの変異においてキャビティ中央の分断が見られた。分断の有無で臨床パラメータを比較したところ、p.G579R変異において他変異より高いRSSと多いビタミンD製剤必要投与量が示唆されたが、この1例のみであったため統計学的に有意な差は認められなかった。

活性部位から離れた部位において各変異タンパクの立体構造の差異を検討したところ膜貫通領域の細胞外領域に対する角度が鈍角の変異体と鋭角の変異体の2つに分けられ、内向きの変異においてビタミンD製剤必要量が高くなる可能性が示唆された。またp.R747\*変異は*PHEX*タンパクを構成する749個のアミノ酸のうち活性部位とは無関係と考えられる最後の3アミノ酸が欠けたものであるが、この変異タンパクと正常タンパクのモデルを重ね合わせたとところRMSD(Root Mean Square Deviation)は0.867と小さく、構造的なずれが微細でも本症を発症することが明らかとなった。

## 【考察ならびに結語】

本研究において、日本人におけるXLHの発症原因となる*PHEX*遺伝子新規変異が7種類同定された。また*PHEX*タンパクはメタロペプチダーゼとしての機能が推定されているが、活性部位に関わる変化では臨床パラメータの違いを生じず、膜貫通領域やC端のわずかな構造変化によっても病態変化をきたすことから基質結合性とは独立して立体構造変化が*PHEX*タンパクの機能に影響する可能性が示唆された。

- (1) I.A. Holm, A.E. Nelson, B.G. Robinson, R.S. Mason, D.J. Marsh, C.T. Cowell, T.O. Carpenter, Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the *PHEX* gene in X-linked hypophosphatemic rickets, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (2001) 3889-3899.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 石 原 康 貴 )			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	教授	古郷 幹彦
	副 査	教授	鵜澤 成一
	副 査	准教授	久保庭 雅恵
	副 査	講師	大川 玲奈
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究は骨や歯の石灰化異常を呈する X 染色体連鎖性低リン血症性くる病について、原因遺伝子である <i>PHEX</i> の変異解析および変異タンパク三次元構造予測を行い臨床パラメータとの関連性を検討した。その結果、現在まで想定されてきた <i>PHEX</i> の酵素活性とは独立して、立体構造変化が発症機序に関与している可能性が示唆された。本研究の結果は、X 染色体連鎖性低リン血症性くる病の治療戦略を考える上で、重要な知見を得るものであり、博士（歯学）の学位に値するものであると認める。</p>			