

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	https://doi.org/10.18910/76272
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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

日本人 X 染色体連鎖性低リン血症性くる病患者的の
PHEX 遺伝子解析結果と表現型との関連性

2020 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座

口腔外科学第一教室

石原 康貴

緒 言

X染色体連鎖性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets: XLH, OMIM 307800)はリン代謝異常を来す優性遺伝形式の先天性疾患である。3.9-5/100,000人の頻度で発生し、臨床症状としては骨変形や低身長、不全骨折および骨痛といった骨の症状の他、腱・靭帯の異常な石灰化や感音性難聴、口腔内においては歯牙発育異常（象牙質形成不全に伴う歯根短縮や歯髓腔の拡大、鋭く突出した髓角、エナメル質低形成）が挙げられる¹⁾。

またXLH患者の歯科症状として特徴的であるのは特発性根尖周囲膿瘍であり、視診上う蝕や外傷がなく健全と思われる歯であっても膿瘍形成を生じることが多い²⁾。歯牙についての組織学的研究により、石灰化不全を原因とする多孔質な象牙質と、髓角からエナメル象牙境に至る微小な亀裂が認められ、これらが感染経路となっている可能性が報告されている³⁾。

XLHの原因遺伝子は *PHEX* (Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)である⁴⁾ことが判明しており、*PHEX*遺伝子の機能喪失型変異を有する患者においてはリン利尿因子であるFGF23 (Fibroblast growth factor 23)の産生が増加し⁵⁾、尿中リン排泄亢進による低リン血症、くる病（小児の骨石灰化障害）が発症する⁶⁾。現在まで、一般的にXLHの治療方法にはリン製剤と活性型ビタミンD製剤の経口投与が選択されてきた。しかしながらこの治療法によるリン代謝の完全な正常化は難しく、くる病症状が残存する⁷⁾症例がある。さらに、リン製剤と活性型ビタミンD製剤の投与はさらなる血清FGF23の上昇を生じ、腎石灰化や副甲状腺機能亢進症などの副作用を起こす⁸⁾ことが報告されている。2018年に抗FGF23抗体であるBurosumabが開発さ

れ、従来の治療法において十分な効果が得られなかった患者においても血清リン値やくる病所見の改善が認められるようになったが、その長期的効果は明らかではなく、腱・靭帯の石灰化や歯科症状における治療効果については未だ不明瞭⁷⁾である。また Burosumab は小児においては2週間毎の皮下注射が必要であり、経口投与製剤に比べ侵襲度が高いという側面もある。XLHの本態である血清 FGF23 の産生増加を根本的に抑制するためには *PHEX* 変異が FGF23 産生増加をもたらす機構を標的とした新規治療法の確立が必要であるが、現在 *PHEX* の機能や FGF23 との関連、FGF23 産生増加の詳細な機序は明らかになっておらず、根治的治療法の開発には至っていない。PHEX タンパクは M13 エンドペプチダーゼファミリーに属するネプリライシンとアミノ酸相同性が高く⁴⁾、同様にタンパク分解能を持つ酵素であると推測されてきた。ネプリライシンとの共通点として PHEX タンパクにも活性中心である亜鉛結合部位や、リガンドを内包するためのタンパク内キャビティの存在が示唆されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾が、現在まで PHEX タンパクがリガンドとする物質は同定されておらず、そもそも生体内で分解酵素として機能しているのかどうかについても未知である。また、酵素活性だけでは XLH 発症を説明できない *PHEX* 変異も報告¹²⁾されており、酵素機能以外の側面についても視野に入れた検討が必要と考えられる。また *PHEX* の機能解明のためのアプローチとして、*PHEX* の genotype-phenotype correlation に関するいくつかの研究⁹⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が行われてきた。患者から同定された *PHEX* 変異を様々な特徴において分類し phenotype を比較した結果、XLH の重症化に寄与する genotype を見出せば、*PHEX* の主となる機能がその genotype に強く依存していると予想することが可能である。しかしなが

ら今のところ遺伝子変異と表現型の相関については結果が定まらず、相関の有無自体や相関する genotype について統一した見解は得られていない。また既報における *PHEX* 変異の分類は変異の場所や種類といった観点で行われており、*PHEX* タンパクの三次元構造を対象として検討したものはない。そこで、本研究では I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement, <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)¹⁶⁾を用いた *PHEX* タンパクの三次元構造予測を行った。I-TASSER はアミノ酸配列からホモロジーモデリングを行うツールで、2006 年から 2016 年までの CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction)において最も予測精度の高いアルゴリズムとしてランクされている。I-TASSER から出力される結果には *PHEX* タンパクが酵素として機能する上での活性部位や結合可能なリガンド、タンパク内の空洞部分 (キャビティ) についての予測情報も含まれているが、構造全体を予測することで活性部位以外の非酵素機能的な側面についても検討比較することが可能である。今回、日本人 XLH 患者の有する *PHEX* 遺伝子変異の位置や種類と FGF23 を含む臨床パラメータとの関連性を明らかにすること、また現在まで行われていなかった *PHEX* タンパクの三次元構造解析から XLH の重症度に関連する構造上の要素を明らかに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。

材料と方法

患者：

単純 X 線画像におけるくる病変化、また低リン血症と血清 intact FGF23 値の上昇 (>30 pg/mL)を認め XLH と臨床的に診断された当院または共同研究施設に受診中の 38 例（男性 12 名、女性 26 名。家族発症例 5 家系 15 名と孤発例 23 名を含む）を対象とした。集団は成人 5 名、小児 33 名で構成され、年齢は月齢 7 ヶ月から 60 歳まで（中央値：月齢 25 ヶ月）であった。血清 intact FGF23 値は FGF-23 ELISA kit（株式会社カイノス、東京都）を用いて測定され、この方法での測定可能範囲は 3-800 pg/mL である。なお、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）が既に倫理審査委員会の審査を受け承認されている。

臨床パラメータ：

診療記録より臨床パラメータとして各症例の性別、年齢、治療開始前の血清 FGF23、ALP (Alkaline phosphatase)、PTH (Parathyroid hormone)、1,25(OH)₂D (1,25-dihydroxyvitamin D)、25(OH)D (25-hydroxyvitamin D)、%TRP (Tubular reabsorption of phosphate)、T_{mp}/GFR (Ratio of the maximum rate of tubular phosphate reabsorption to glomerular filtration rate)、身長 SD (Standard deviation)、RSS (Rickets severity score)、リン製剤ならびに活性型ビタミン D 製剤（アルファカルシドール）必要投与量を解

析した。なお RSS の評価は大阪大学医学部附属病院小児科に所属する XLH を専門的に診療している 3 名の小児科医によって盲検的に解析した。

サンガーシーケンス：

対象患者及び家族に同意を得て静脈血を採取し MagDEA Dx SV (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社、千葉県、松戸市)を用いてリンパ球より gDNA を抽出した。

PHEX 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 gDNA 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。*PHEX* 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。また、*PHEX* 遺伝子に変異を認めなかった症例については XLH 以外の遺伝性くる病原因遺伝子である *FGF23*、*DMP1* (Dentin matrix protein 1)、*ENPP1* (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。

MLPA (Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification)：

FGF23 遺伝子および *PHEX* 遺伝子の欠失または重複の有無を検討するために、SALSA® MLPA® kit P223 PHEX (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) の仕様に従い、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて電気

泳動を行った。得られたデータは Coffalyser.Net (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands)を用いて解析した。

全エクソームシーケンス：

上記解析で変異が同定されず、同意を得られた3例について、全エクソームシーケンスを行った。1症例ごとに約3000万ペアリードの100bpリードがHiSeq 3000 (Illumina, San Diego, California, USA)にて得られ、BWAにてアライメント、SAMTools、picard、gatkで変異リスト作成、ANNOVARにてアノテーションを行った。またEXCAVATOR2を用いてCNV (Copy number variation)解析を行った。

I-TASSERによる三次元構造予測：

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PHEX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。またPyMOL (<https://pymol.org>)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。2種類のタンパクの構造のずれを表すRMSD (Root Mean Square Deviation)はPyMOLのColorByRMSDスクリプト (<https://pymolwiki.org/index.php/ColorByRMSD>)を用いて計算・可視化した。

統計：

2 群間を Mann-Whitney 検定にて比較検討した。なお有意水準は 5%とし、JMP® Pro 14

(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて統計処理を行った。

結 果

研究 1. 遺伝学的解析

1-1：サンガーシーケンス

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た (図 1)。

既知変異は c.871C>T (p.Arg291*)、c.1601C>T (p.Pro534Leu)、c.1645+1G>A、c.1700+1G>A、c.1735G>A (p.Gly579Arg)、c.1958C>A (p.Ala653Asp)、c.2104C>T (p.Arg702*)、c.2239C>T (p.Arg747*)の 8 種類 (20 名)、新規変異は c.446delA (p.Ala151Gfs*70)、c.457_470del (p.Ala153Tfs*14)、c.1169delC (p.Ser390fs1*)、c.1753G>A (p.Gly585Arg)、c.1769-2delA、c.2176G>T (p.Glu726*)、c.2182C>T (p.Gln728*)の 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は c.1657G>A (p.Gly553Arg)、c.1769-1G>A、c.1942G>C (p.Gly648Arg) の 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。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。

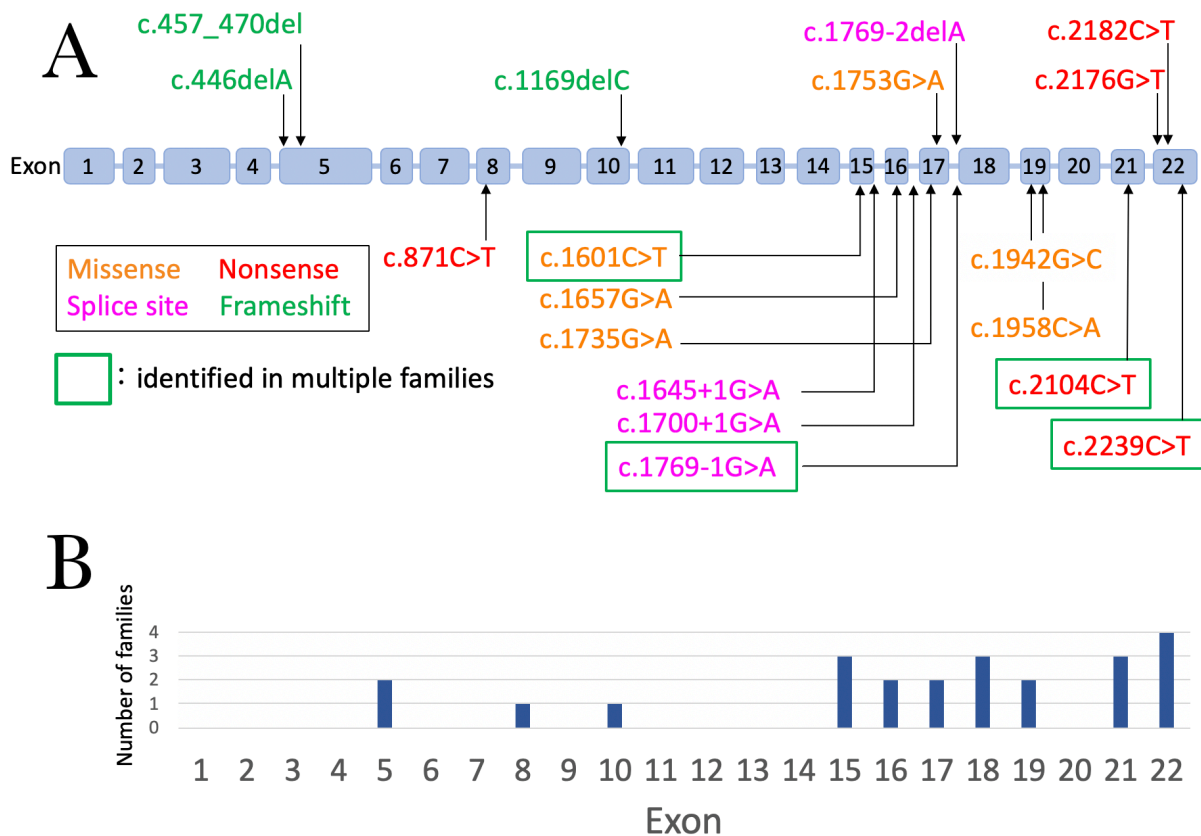


図1. サンガーシーケンスによる遺伝子変異解析結果

本研究において同定された *PHEX* 遺伝子変異の分布。A. 22 個のエクソンの上段に新規変異を、下段に既知変異あるいは既知変異と同部位の変異を示している。文字色は変異の種類を表しており、また緑枠で囲まれた変異は複数の家系において同定された。エクソン 15 より後方において変異の種類が多く認められている。B. 各エクソンにおける変異家系数を示している。家系の数においても変異はエクソン 15 以降に偏って多く同定された。

1-2 : MLPA

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

数の変化は全症例で認められなかった。

1-3：全エクソームシーケンス

変異が同定されなかった 5 症例のうち 3 例で同意が得られ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 (*PHEX*、*FGF23*、*DMP1*、*ENPP1*、*FAM20C*、*PTHR1*、*FGFR1*、*SLC34A3*、*SLC9A3R1*、*CLCN5*、*OCRL*、*CYP27B1*、*CYP2R1*、*VDR*、*HNRNPC*、*CYP3A4*)に病的変異は同定されなかった。CNV解析においても病的変異となりう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：変異の種類や変異部位と臨床パラメータとの比較

*PHEX*変異が同定された患者 33 人の臨床パラメータから血清 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ることが分かった (表 1)。既報⁹⁾¹⁴⁾と同条件で分類し比較を行った場合、Truncating 群と Non-truncating 群では血清 1,25(OH)₂D 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 649 アミノ酸に変異を持つ症例と C 端側に変異を有する症例の間にも、臨床パラメータの差を認めなかった。

表 1. 臨床パラメータ

			Number	Median (Q1, Q3)
FGF23	↑	(pg/mL)	26	78 (62.6, 96.3)
P	↓	(mg/dL)	29	2.5 (2.3, 2.9)
ALP	↑	(U/L)	29	1757 (1067, 2231)
iPTH		(pg/mL)	26	69.2 (38.5, 80.0)
1,25(OH) ₂ D		(pg/mL)	25	61 (45.3, 82.0)
25(OH)D		(ng/mL)	22	19.3 (14.4, 24.3)
%TRP	↓	(%)	25	85.5 (80.8, 88.8)
TmP/GFR	↓	(mg/dL)	25	2.22 (1.8, 2.31)
身長 SD	↓		28	-2.09 (-2.80, -1.21)

FGF23: Fibroblast growth factor 23, ALP: Alkaline phosphatase, PTH: Parathyroid hormone, 1,25(OH)₂D: 1,25-dihydroxyvitamin D, 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D, %TRP: Tubular reabsorption of phosphate, Tmp/GFR: Ratio of the maximum rate of tubular phosphate reabsorption to glomerular filtration rate, SD: Standard deviation. 矢印: 正常範囲より上昇 (↑) または低下 (↓)、Q: quartile.

2-2: 予測三次元構造と臨床パラメータの比較検討

2-2-1: 亜鉛結合部位の有無による比較

PHEX 変異タンパクの予測モデルを構築した結果、p.Ala151Gfs*70、p.Ala153Tfs*14、p.Arg291*、p.Ser390fs1*、p.Arg702*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(図 2)。一方、p.Pro534Leu、p.Gly553Arg、p.Gly579Arg、p.Gly585Arg、p.Gly648Arg、p.Ala653Asp、p.Glu726*、p.Gln728*、p.Arg747*では亜鉛結合部位の残存が予測された。この 2 群において比較検討を行ったが、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 (表 2)。

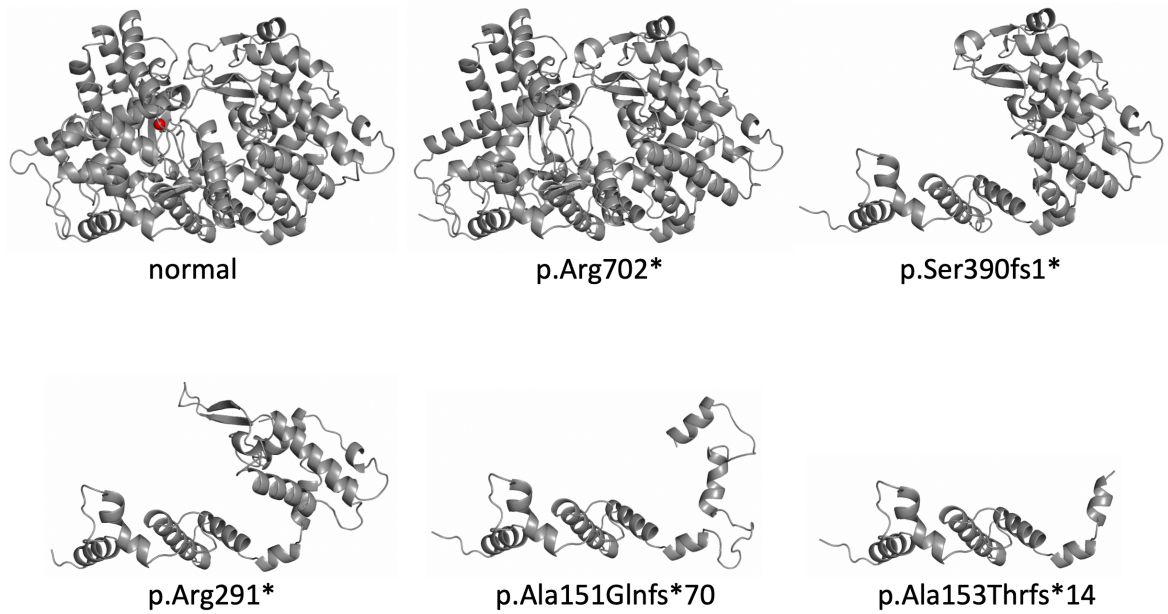


図 2. 亜鉛結合部位を喪失した PHEX 変異タンパク

左上に正常 PHEX タンパクの立体構造予測モデルを示し、タンパクに結合している亜鉛イオンを赤色の球で表している。

表 2. 亜鉛結合部位の有無による臨床パラメータの比較

	亜鉛結合部位あり	亜鉛結合部位なし	P value
	Median (Q ₁ ,Q ₃)	Median (Q ₁ ,Q ₃)	
FGF23	77 (58.3, 82.8)	79 (67.3, 1 z 40)	NS
P	2.6 (2.5, 3.2)	2.7 (2.7 2.85)	NS
ALP	1757 (1258, 2471)	2240 (2023, 2550)	NS
iPTH	67.6 (28.8, 87.1)	63 (52.8, 131)	NS
1,25(OH) ₂ D	56.2 (46.1, 68.2)	93 (30.4, 124)	NS
25(OH)D	21.5 (18.5, 25.9)	19.5 (7.55, 25.0)	NS
%TRP	85.6 (82.3, 88.8)	89 (88.5, 93.2)	NS
TmP/GFR	2.23 (2.00, 2.31)	2.40 (2.31, 2.52)	NS
身長 SD	-2.29 (-2.78, -1.11)	-1.75 (-2.09, -0.58)	NS
RSS	2.17 (1.75, 2.96)	2.41 (1.98, 3.63)	NS
P/BW	0.103 (0.021, 0.134)	0.068 (0.042, 0.148)	NS
Vit.D/BW	0.050 (0.035, 0.080)	0.080 (0.023, 0.091)	NS

P/BW: 体重当たりのリン製剤必要量、VitD/BW: 体重当たりの活性型ビタミン D 必要量
Q: quartile、NS: not significant

2-2-2：リガンド候補による比較

正常 PHEX タンパクの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(Protein Data Bank ID: 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。自験例ミスセンス変異タンパクにおいてそれぞれのリガンド候補予測を行ったところ、p.Gly585Arg 変異のみが RDF ではなく N-(3-Phenyl-2-Sulfanylpropanoyl)Phenylalanylalanine(PDB ID: OIR)をリガンドの第一候補としていたが、p.Gly585Arg とそれ以外の RDF をリガンド第一候補とするミスセンス変異との間に臨床パラメータの差は見られなかった (表 3)。

2-2-3：キャビティの形態による比較

タンパク内のキャビティを可視化すると、正常 PHEX タンパクにおいてキャビティが RDF 結合部位および亜鉛結合部位と接していることが判明した。同様に自験例ミスセンス変異タンパクのキャビティも可視化したところ、p.Gly579Arg と p.Ala653Asp の 2 つの変異においてキャビティ中央部の分断が見られた (図 3)。分断の有無でミスセンス変異を 2 群に分け臨床パラメータを比較したところ、p.Gly579Arg において他ミスセンス変異より高い RSS と多い活性型ビタミン D 製剤必要投与量が示唆されたが、この 1 例のみであり統計学的に有意な差は認められなかった (表 3)。

2-2-4：細胞内および膜貫通ドメインの向きによる比較

次に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（図3）、ミスセンス変異の中では鋭角の p.Gly579Arg、 p.Gly648Arg 変異において体重当たりの活性型ビタミン D 製剤必要量が高くなる可能性が示唆された（表3）。

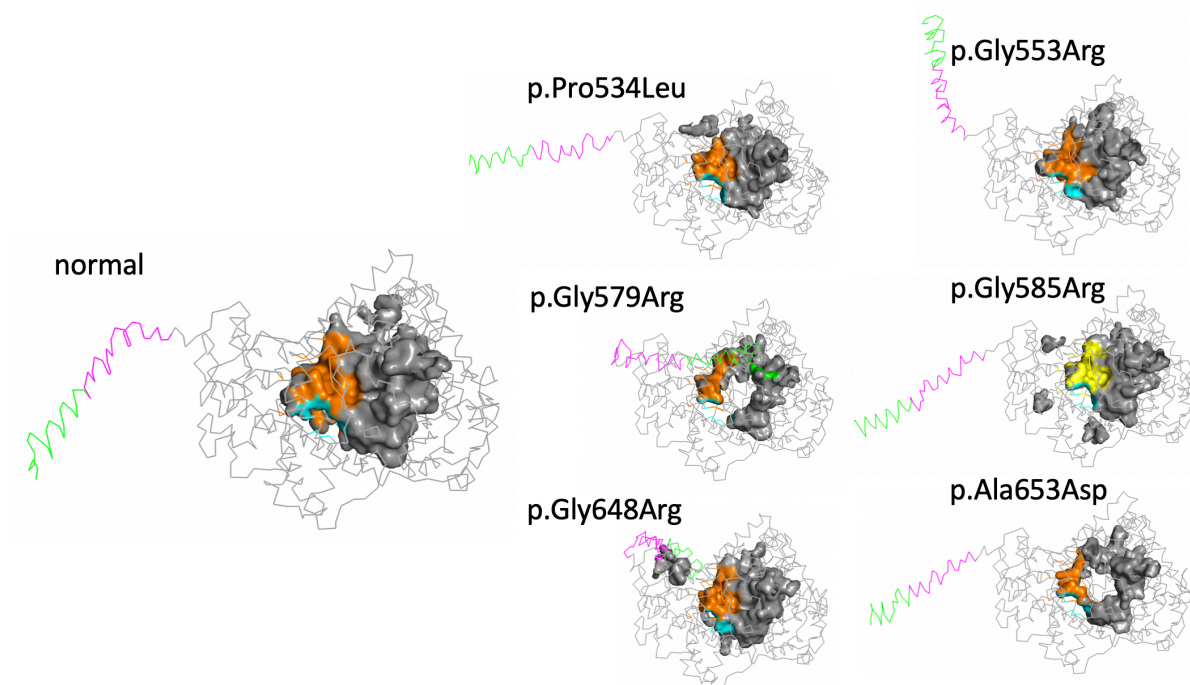


図3. 正常およびミスセンス PHEX 変異タンパク立体構造

細胞内ドメインを緑色、膜貫通ドメインを紫色、細胞外ドメインを灰色のリボンで示し、細胞外ドメインに存在するキャビティを濃灰色で着色した。さらにキャビティ表面のうち亜鉛結合部位と接する面を水色、RDF 結合部位と接する面を橙色、OIR 結合部位と接する面を黄色で示している。p.Gly579Arg 変異タンパクと p.Ala653Asp 変異タンパクではキャビティ中央に分断が見られ空間の狭小化が示唆されている。また、p.Gly579Arg 変異タンパクと p.Gly648Arg 変異タンパクでは細胞内および膜貫通ドメインが鋭角に折れ曲がり細胞外ドメイン側へ向かう構造となっている。

表 3. ミスセンス変異症例の臨床パラメータ比較

変異	性別	月齢	FGF23	P	1,25D	%TRP	TmP /GFR	身長 SD	RSS	P/BW	Vit.D/BW
p.P534L	F	35	ND	2.6	46.0	85.6	2.23	-3.44	ND	0.13	0.035
p.P534L	F	20	76	2.5	61.0	88.8	2.22	-0.95	1.83	0.19	0.065
p.P534L	M	467	60	1.7	67.0	77.9	1.32	-1.90	ND	ND	ND
p.G553R	F	29	78	2.4	64.0	89.0	2.31	-1.00	2.17	ND	ND
p.G579R	F	22	84	2.8	46.1	82.4	2.31	-2.59	4.33	0.18	0.084
p.G585R	F	38	50	2.5	42.4	89.0	2.23	-1.41	2.17	0.019	0.047
p.G648R	M	17	ND	2.9	44.6	ND	ND	-1.14	ND	0.09	0.093
p.A653D	F	720	91	2.2	34.0	80.4	1.77	-2.81	ND	0.14	0.019

ND: no data

考 察

本研究では PHEX の機能解明の一助とするため、同定された各変異の特徴から XLH の重症化に寄与する因子を検討した。既報において重症化に寄与するとされた変異の種類や位置、また酵素機能に関与する点において臨床パラメータへの影響は認められなかった一方、変異 PHEX タンパクの細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインが折れ曲がり細胞外ドメインへ近づくことが治療抵抗性を増加させている可能性、また細胞外ドメインが現在まで想定されてきたような酵素活性とは独立した機能を有している可能性が示唆された。

・細胞内ドメイン・膜貫通ドメインの位置による影響

I-TASSER の予測モデルにおいて細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインが細胞外ドメインに対して鋭角に位置したミスセンス変異 p.Gly579Arg、p.Gly648Arg は、その他のミスセンス変異を有する患者と比較して体重当たりの活性型ビタミン D 製剤必要量が多く、さらに小児症例の中で比較を行うと p.Gly579Arg 変異 1 例のみであるが、血清 FGF23 値ならびに RSS についても他ミスセンス変異より高く、より重症である可能性が示唆された。

PHEX タンパクはネプリライシンの構造から II 型膜貫通タンパク¹⁷⁾と考えられており、N 端から 24Val までの短い細胞内ドメインと 25Val から 49Ala までの膜貫通ドメインを有し、50Lys から C 端の 749Trp までは大きな細胞外ドメインを形成する¹⁸⁾。細胞内および膜貫通ドメインが鋭角である変異タンパクにおいて活性型ビタミン D 製剤必要量が多く必要であるという今回の結果は、これらの変異の治療抵抗性が高いことを意味し、

p.Gly648Arg 変異においては亜鉛結合部位の喪失やリガンドおよびキャビティの変化が見られないことから、変異タンパクが酵素機能障害以外の機構によっても XLH 症状に寄与している可能性を示唆している。膜貫通ドメインが折れ曲がり細胞外ドメイン側へ近づくことで細胞膜と細胞外ドメインの干渉が生じ、膜への適切な結合が不可能となることが推測される (図 4)。この状態においては変異 PHEX タンパクの酵素活性低下や喪失とは別に、XLH 発症の要因となっている可能性がある。仮にこれらの変異タンパクが細胞膜上に発現できたとしても、膜貫通ドメインの強い屈曲は細胞外ドメインと膜、細胞質との接近を引き起こし、本来相互作用するはずの他の分子が細胞外ドメインの結合表面と接触するのを阻害しうると予測される。Tenenhouse らは先行研究¹²⁾において変異 PHEX タンパクのペプチダーゼ活性低下やタンパク質輸送障害が XLH 発症を引き起こすとしているが、p.Phe731Tyr 変異についてはどちらも正常タンパクと同等の機能を有しておりさらなる検討が必要と述べている。この p.Phe731Tyr 変異について、本研究において自験例と同様に I-TASSER での予測モデル構築を行ったところ、鋭角の細胞内・膜貫通ドメインを持つ構造となり p.Gly579Arg 変異や p.Gly648Arg 変異と同様の現象が起こっている可能性が示唆された。

また自験例として同定されたナンセンス変異 p.Arg747*は PHEX タンパクを構成する 749 個のアミノ酸のうち、活性部位に含まれず空間的にも影響を与えないと考えられる最後の 3 アミノ酸が喪失したものであるが、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において RMSD は 0.867 と小さく構造的なずれが微細であったことから、細胞外ドメイン

の持つ酵素機能以外の未知の機能が存在し、先述の細胞質側への接近によるドメイン表面への結合阻害や末端3アミノ酸の喪失がこの機能を障害してXLHを引き起こすという新たな仮説が考えられた。

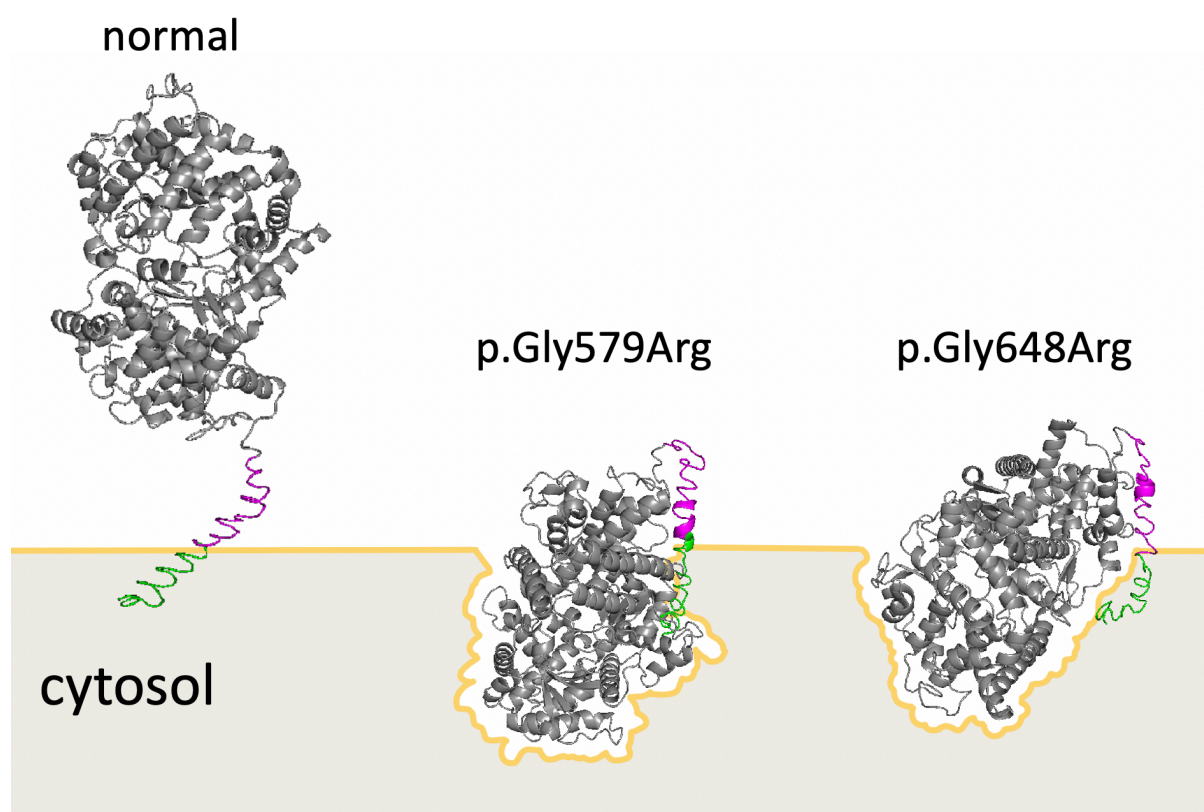


図4. 細胞内および膜貫通ドメインの屈曲がもたらす影響（仮説）

細胞内ドメイン（緑）、膜貫通ドメイン（紫）が細胞外ドメインへ近付くように鋭角に屈曲する変異タンパクは細胞外ドメインの向きを細胞質側へと変化させ、本来相互作用を持つ他分子との結合が妨げられると予想される。

・ 遺伝学的解析

本研究において *PHEX* 遺伝子の変異は 18 種類同定され、既報部位に同定されたものは 11 種類であった。Human Gene Mutation Database (HGMD®) 2019.4 に記載されている変異の数は 588 種類であり、これに対して自験例は 3% に相当する変異数であるが、*PHEX*

全 22 エクソン中のエクソン 15 以降に変異が集中して存在しており、この C 端側の領域に変異が偏っているという結果はいくつかの先行研究¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾と一致する。

・先行研究との比較

変異の位置や種類での比較検討を行った先行研究⁹⁾¹⁴⁾と本研究では、異なる点として人種の違いや変異種類の分布の差が存在する。既報ではナンセンス変異・ミスセンス変異・スプライス異常・塩基挿入および欠失がそれぞれ標本集団の 15-30%ずつ存在しているのに対し、自験例はナンセンス変異が 45%を占め塩基の欠失を持つ症例は 10%に留まった。これは対象患者集団にナンセンス変異を共通に持つ家族例が 2 家系存在していることに影響を受けている。

・酵素活性に関連する要素

亜鉛結合部位はネプリライシンをはじめとする亜鉛結合性メタロペプチダーゼの酵素機能発現において必須であり、HE_{xx}H (His-Glu-Xaa-Xaa-His) および EN_xAD_xGG (Glu-Asn-Xaa-Asp-Xaa-Gly-Gly) の 2 つの亜鉛結合モチーフによって構成されている²²⁾²³⁾。

PHEX はそのアミノ酸配列の 580-584 番目に HEFTH (His-Glu-Phe-Thr-His)、642-649 番目に ENIADNGG (Glu-Asn-Ile-Asp-Asn-Gly-Gly) を含んでおり、580 番目までに生じたナンセンス変異やフレームシフト変異によって容易に亜鉛結合部位は喪失されると考えられる。また p.Arg702*のように亜鉛結合部位から離れた部位での変異でも、分子のわずかな

位置変化で亜鉛結合を保てなくなることが予測モデルから判明した。しかしながら、本研究で得られた結果は、亜鉛結合部位の有無と XLH の重症度は無関係であるという可能性を示唆している。

リガンド候補として予測されたホスホラミドン (RDF) は *Streptomyces tanashiensis* から培養されたタンパク²⁴⁾で、亜鉛結合部位近傍の原子と水素結合およびイオン結合を作り²⁵⁾、タンパク内のキャビティに入り込むことでネプリライシンのみならず様々なメタロペプチダーゼの阻害剤として機能する²⁶⁾。p.Gly585Arg 変異タンパクにおいてのみリガンドとされた OIR も、効果は不明であるが同様にネプリライシンと相互作用する物質でありリガンドとして機能するとされている²⁷⁾²⁸⁾。構造予測から得られたリガンド候補の相違は、結合可能な残基が異なることに起因する。RDF が結合するとされるアミノ酸 17 残基のうち、OIR の結合部位にも含まれているのは 4 残基 (100Lys、108His、537Asp、554Ser) を除いた 13 残基であり、さらに OIR は 2 つの残基 (559Glu、576Tyr) を独自に持つ。しかしながら PyMOL での重ね合わせにおいてこれら 6 つの一致しない残基については正常タンパクと p.Gly585Arg 変異タンパクで大きな構造のずれを認めず、変異アミノ酸の近傍にも構造変化は見られなかった。OIR と比較し分子量が大きい RDF が p.Gly585Arg 変異タンパクと衝突し結合不能となっている可能性が推測されるが、仮説でありさらなる検討が必要である上、これらのリガンドの相違によって表現型の差は認められず PHEX タンパクの機能との関連性も低いものであると考えられる。

先述のように RDF はネプリライシンのキャビティに入り込む形で結合し阻害効果を発揮する²⁶⁾ため、PHEX タンパクにおいても何らかのリガンドが同様にキャビティ内に配置される可能性が考えられる。PyMOL で描出されたキャビティ表面に活性部位と接する部分が存在していたことも、キャビティがリガンドとの結合の場として機能することを支持している。この考えの下ではキャビティの変形はリガンドとの結合能の喪失あるいは低下を引き起こすと予想され、実際に 2 つの変異タンパク予測モデルにおいてキャビティの狭小化が確認されたが、表現型として現れる差は認められず、変異タンパクはキャビティとは無関係に XLH の発症を起こしている可能性が高いと考えられた。

・研究の限界

今回使用した I-TASSER はホモロジーモデリングを主体としているが、この手法はタンパクが置かれている生体内環境についてはパラメータとして扱わないため、例えば細胞膜を想定した構築や温度や pH による影響、またタンパクの立体構造ダイナミクスといった部分までは予測することができない。また膜タンパクは立体構造解析のために必要な高精度の結晶化やリン脂質の維持といった操作が難しく、今後 PHEX タンパクについての詳細な構造解析が可能となればさらなる検討が行えると考えられる。

結 語

PHEX 遺伝子の機能解明のため立体構造解析を含めた genotype-phenotype correlation の検討を行ったところ、細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインの方向が病態に寄与する可能性が示唆され、従来想定されてきた酵素機能とは独立した *PHEX* の機能の存在が推測された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院医学系研究科小児科学講座 大藪恵一教授、窪田拓生先生、大幡泰久先生に深甚なる謝意を表します。大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 朝野仁裕先生、宮下洋平先生には遺伝子変異解析において有益な御助言、御指導を頂き深謝の意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）の教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

- 1) Ruppe MD. X-Linked Hypophosphatemia. 2012 [Updated 2017 Apr 13]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83985/>
- 2) Kindlon D, Sollee N, Yando R. Specificity of behavior problems among children with neurological dysfunctions. *J Pediatr Psychol*. 1988;13(1):39-47.
- 3) Coyac BR, Falgayrac G, Penel G, Schmitt A, Schinke T, Linglart A, et al. Impaired mineral quality in dentin in X-linked hypophosphatemia. *Connect Tissue Res*. 2018;59(sup1):91-6.
- 4) Francis F, Hennig S, Korn B, Reinhardt R, Jong PD, Poustka A, et al. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genetics*. 1995;11(2):130-6.
- 5) Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):4957-60.
- 6) Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004;19(3):429-35.
- 7) Gordon RJ, Levine MA. Burosumab treatment of children with X-linked hypophosphataemic rickets. *The Lancet*. 2019;393(10189):2364-6.
- 8) Yavropoulou M, Kotsa K, Psarrakou AG, Papazisi A, Tranga T, Ventis S, et al. Cinacalcet in hyperparathyroidism secondary to X-linked hypophosphatemic rickets: case report and brief literature review. *Hormones*. 2010;9(3):274-8.
- 9) Zhang C, Zhao Z, Sun Y, Xu L, JiaJue R, Cui L, et al. Clinical and genetic analysis in a large Chinese cohort of patients with X-linked hypophosphatemia. *Bone*. 2019;121:212-20.
- 10) Rowe P. Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphataemic rickets (HYP). *Human Molecular Genetics*. 1997;6(4):539-49.
- 11) Labiuk SL, Sygusch J, Grochulski P. Structures of soluble rabbit neprilysin complexed with phosphoramidon or thiorphan. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*. 2019;75(6):405-11.
- 12) Sabbagh Y, Boileau G, Campos M, Carmona AK, Tenenhouse HS. Structure and function of disease-causing missense mutations in the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2213-22.
- 13) Song HR, Park JW, Cho DY, Yang JH, Yoon HR, Jung SC. PHEX gene mutations and genotype-phenotype analysis of Korean patients with hypophosphatemic rickets. *J Korean Med Sci*. 2007;22(6):981-6.

- 14) Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, Mason RS, Marsh DJ, Cowell CT, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3889-99.
- 15) Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, Cabanas P, Pombo M, Gil M, et al. Genetic diagnosis of X-linked dominant Hypophosphatemic Rickets in a cohort study: tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)2D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet.* 2011;12:116.
- 16) Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W174-81.
- 17) Sako S, Niida Y, Shima KR, Takeshita Y, Ishii KA, Takamura T. A novel PHEX mutation associated with vitamin D-resistant rickets. *Hum Genome Var.* 2019;6:9.
- 18) Dixon PH, Christie PT, Wooding C, Trump D, Grieff M, Holm I, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(10):3615-23.
- 19) Ichikawa S, Traxler EA, Estwick SA, Curry LR, Johnson ML, Sorenson AH, et al. Mutational survey of the PHEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Bone.* 2008;43(4):663-6.
- 20) Filisetti D, Ostermann G, von Bredow M, Strom T, Filler G, Ehrich J, et al. Non-random distribution of mutations in the PHEX gene, and under-detected missense mutations at non-conserved residues. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(5):615-9.
- 21) Li SS, Gu JM, Yu WJ, He JW, Fu WZ, Zhang ZL. Seven novel and six de novo PHEX gene mutations in patients with hypophosphatemic rickets. *Int J Mol Med.* 2016;38(6):1703-14.
- 22) Menach E, Hashida Y, Yasukawa K, Inouye K. Effects of conversion of the zinc-binding motif sequence of thermolysin, HEXXH, to that of dipeptidyl peptidase III, HEXXXH, on the activity and stability of thermolysin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(9):1901-6.
- 23) Jones BF, Hotez PJ. Molecular cloning and characterization of Ac-mep-1, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworms. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119(1):107-16.
- 24) Umezawa S, Tatsuta K, Izawa O, Tsuchiya T. A new microbial metabolite phosphoramidon: Isolation and structure. *Tetrahedron Letters.* 1972;97-100.
- 25) Ferraris DM, Sbardella D, Petrera A, Marini S, Amstutz B, Coletta M, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* zinc-dependent metalloprotease-1 (Zmp1), a metalloprotease involved in pathogenicity. *J Biol Chem.* 2011;286(37):32475-82.
- 26) Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol.* 2000;296(2):341-9.

- 27) PDB ID: OIR, <http://www.rcsb.org/ligand/OIR> (2020/01/04 アクセス)
- 28) Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D1035-41.