

低ホスファターゼ症の腎臓における 小腸型 ALP 遺伝子発現の検討

Study on Expression of the Intestinal Alkaline Phosphatase Gene
in the Hypophosphatemic Kidney

野田 聖子*	山田 麻子**	中岡 加奈絵*
Seiko NODA	Asako YAMADA	Kanae NAKAOKA
	竹谷 健***	五関-曾根 正江**
	Takeshi TAKETANI	Masae GOSEKI-SONE

要約 アルカリホスファターゼ (ALP) はリン酸モノエステルを加水分解する酵素であり、ヒトにおいては4種類のアイソザイムに分類される。そのうち、組織非特異型 ALP に関しては、その遺伝子の突然変異により発症する低ホスファターゼ症 (HPP) が知られており、HPP は血清ならびに組織中の ALP 活性低下により特徴づけられ、硬組織の低石灰化やくる病様変化を呈する先天性代謝異常疾患である。しかし、これまでに HPP 患者の腎臓において小腸型 ALP (intestinal ALP : IAP) の関与が明らかでないため、腎生検で得られた HPP 患児の腎臓における IAP の遺伝子である intestine ALP (*ALPI*) 遺伝子発現について検討した。HPP 患児の腎臓において、*ALPI* 遺伝子から転写される mRNA の発現欠如が認められた。これは、HPP 患児が IgA 腎症を発症していたことに起因する可能性も考えられ、今後他の症例においても HPP 患者での小腸型 ALP の役割についても検討していきたい。

キーワード : 低ホスファターゼ症, 組織非特異型アルカリホスファターゼ, 小腸型アルカリホスファターゼ

Abstract Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes several monophosphate esters, and in humans it is classified into at least four isozymes. Hypophosphatasia (HPP) is known to develop as a result of a mutation in the tissue-nonspecific ALP (*TNSALP*) gene. HPP is a congenital metabolic disorder characterized by decreased ALP activity in serum and tissue. HPP presents as hypocalcification of bone and teeth and changes similar to rickets. The role played by intestinal ALP (IAP) in the kidneys of patients with HPP is unclear, so the current study examined expression of the *ALPI* gene in the kidneys of a pediatric patient with HPP and IgA nephropathy. Tissue samples were obtained via a kidney biopsy. Expression of mRNA transcribed from *ALPI* was lacking in the patient's kidneys. This may be due to the fact that the patient developed IgA nephropathy in addition to HPP. The current authors wish to study the role of IAP in other patients with HPP in the future.

* 日本女子大学大学院 人間生活学研究科 人間発達学専攻

Graduate School of Human Life Science, Division of Human Development, Japan Women's University

** 日本女子大学 家政学部 食物学科
Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Sciences and Design, Japan Women's University

*** 島根大学 医学部 小児科
Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

Key words : Hypophosphatasia,
Tissue-nonspecific alkaline phosphatase,
Intestinal alkaline phosphatase

I. 諸言

アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase ; ALP ; EC 3.1.3.1) は植物を除き、細菌から高等動物まで広く生物界に存在し、骨、肝臓、腎臓、小腸、胎盤など種々の組織に存在する酵素である。アルカリ性に至適 pH を有し、リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒している。ヒトにおいて、ALP は骨、肝臓、腎臓などに存在する組織非特異型 ALP (tissue-nonspecific ALP ; TNSALP)、小腸に局在する小腸型 ALP (intestinal ALP ; IAP)、胎盤型 ALP、生殖細胞型 ALP の少なくとも 4 型に分類されている¹⁻⁴⁾。

TNSALP は骨芽細胞の細胞膜に存在し、石灰化局所のリン酸濃度を高めることにより石灰化を促進する酵素として考えられてきた。TNSALP 遺伝子は第 1 染色体上に位置し、12 個のエキソンからなる¹⁾。低ホスファターゼ症 (hypophosphatasia ; HPP) は、血清ならびに組織中の ALP 活性低下により特徴づけられ、硬組織の低石灰化やくる病様変化を呈する先天性代謝異常疾患であり、重篤なケースが多い常染色体劣性遺伝形式と優性遺伝形式が存在する⁵⁾。HPP は発症時期の早いものほど症状が重く、最も重症例である周産期型 (perinatal type)、生後 6 か月以内に症状が確認され、くる病の所見を呈する乳児型 (infantile type)、生後 1~2 歳で確認され、その症状が多様な小児型 (childhood type)、大人になってから症状を呈する成人型 (adult type)、歯牙の早期脱落などが引き起こされる歯限局型 (odontohypophosphatasia)、臨床症状は HPP に類似するが、血清の活性は正常値を示す pseudohypophosphatasia 型の 6 型に分類される⁶⁾。2015 年に、日本において、HPP は小児慢性特定疾患および難病にも指定され⁷⁾、その治療方法として酵素補充療法や遺伝子治療が検討されている^{8) 9)}。

IAP は小腸上皮細胞の刷子縁膜に高濃度に存在し、食事性因子と深く関連していることが示唆されている^{10) 11)}。また、粘膜防御因子としての作用も報告され、炎症の制御にも関わる¹⁰⁾。Alkaline phosphatase, intestine (ALPI) 遺伝子は第 2 染色体上に位置し、11 個のエキソンからなる²⁾。NCBI の AceView gene database によると、ALPI 遺伝子から 2 種類の alternative splicing mRNA [the variant aAug10 (NM_001631) and the variant bAug10 (M31008)] が

報告されており、main variant である the variant aAug10 は、小腸組織からクローニングされた全長 2,550 bp の mRNA である。一方、the variant bAug10 は腎臓組織からクローニングされた全長 1,884 bp の mRNA である¹²⁾。

HPP は TNSALP 遺伝子変異によって発症するため、これまでに TNSALP に関する研究は多数存在するが、HPP 患者における IAP 発現に関する報告はない。そこで、本研究では、HPP 患児および正常腎臓組織における IAP 発現についての結果を報告する。

II. 方法

1. 症例

HPP 患児 (男児) における身体特性および生化学データを Table 1 に示した。TNSALP 変異は複合ヘテロ変異 (c.1559delT/p.F327L) であった。骨 X 線所見では、長幹骨 (上腕骨、大腿骨) の変形が認められた。この HPP 患児は出生時に痙攣で発症し、骨の変形、高カルシウム血症、肺の低形成が認められ、レントゲンによる所見では低石灰化、長幹骨の変形、長幹端の舌状変化、短頭が認められた。出生時の ALP は 3 IU/L であった。現在、低身長が認められ、成長ホルモン分泌不全で成長ホルモン投与中である。血尿が続くため、腎生検を行ったところ IgA 腎症と診断され、免疫抑制剤を使用し、現在は症状が改善されている。

また、9 歳男児 (ALP : 404 IU/L) の腎臓の正常組織を比較のため用いた。

なお、本研究は島根大学医学部附属病院倫理審査委員会において、審査を受け承認を得たものである (研究等管理番号 : 20100825-1)。

Table 1 Physical characteristics of the patient

age	11 years old
height	126 cm
body weight	35 kg
serum ALP	223 U/L
serum Ca	9.6 mg/dL
serum IP	6.1 mg/dL
urea PEA	1518.8 μ mol/gCr
ALP; alkaline phosphatase	
Ca; calcium	
IP; inorganic phosphorus	
PEA; phosphoethanolamine	

2. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 分析

チオシアン酸フェノール-クロロホルム法¹³⁾により、腎生検により得られた腎皮質組織サンプルから total RNA を抽出し、cDNA 合成キット (PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis Kit, タカラバイオ (株), 滋賀) を用いて 2 μg の total RNA から相補的な DNA (complementary DNA ; cDNA) を作製した。

PCR プライマーは、h*TNSALP* : human *TNSALP*¹⁴⁾, IAP the variant aAug10 の h*IAP-a* : human *IAP-a* および the variant bAug10 の h*IAP-b* : human *IAP-b*¹⁵⁾, *GAPDH* : Glyceraldehyde phosphatase dehydrogenase を用いた。

PCR は SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) で実施し、PCR 産物について 5.25% ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、解析を行った。染色したゲルを UV ライト下で撮影し、画像解析ソフト (CS Analyzer 3 for Windows, アトー (株), 東京) を用いて、泳動バンドの濃度測定を行い、mRNA 発現量を比較した。なお、全ての測定値は、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* で標準化した。

Ⅲ. 結果

1. Semiquantitative RT-PCR 分析

正常な腎臓、HPP 患児の腎臓において、2 種類の alternative splicing mRNA (aAug10 および bAug10) の発現量を比較するため、それぞれに特異的なプライマーを用いて PCR 分析を行った。それぞれの PCR 産物を用いた電気泳動像を Figure 1 に、電気泳動像のバンドをデンストメーターにより解析した結果を Figure 2 に示した。Figure 1 および Figure 2(A) に示したように、正常な腎臓において、*TNSALP* 遺伝子の PCR 産物 (h*TNSALP*; 195 bp) のバンドが検出され、HPP 患児の腎臓では検出されなかった。また、Figure 1 および Figure 2(B) に示したように、正常な腎臓において、the variant aAug10 の PCR 産物 (h*IAP-a*; 278 bp) のバンドが検出され、HPP 患児の腎臓では検出されなかった。Figure 1 に示したように、正常な腎臓および HPP 患児の腎臓では the variant bAug10 の PCR 産物 (h*IAP-b*; 407 bp) のバンドは検出されなかった。

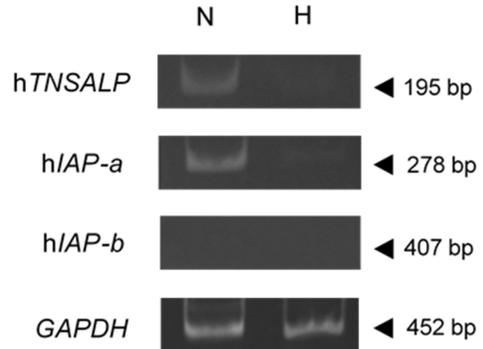


Figure 1 Detection of h*TNSALP*, h*IAP-a*, and h*IAP-b* mRNA with RT-PCR

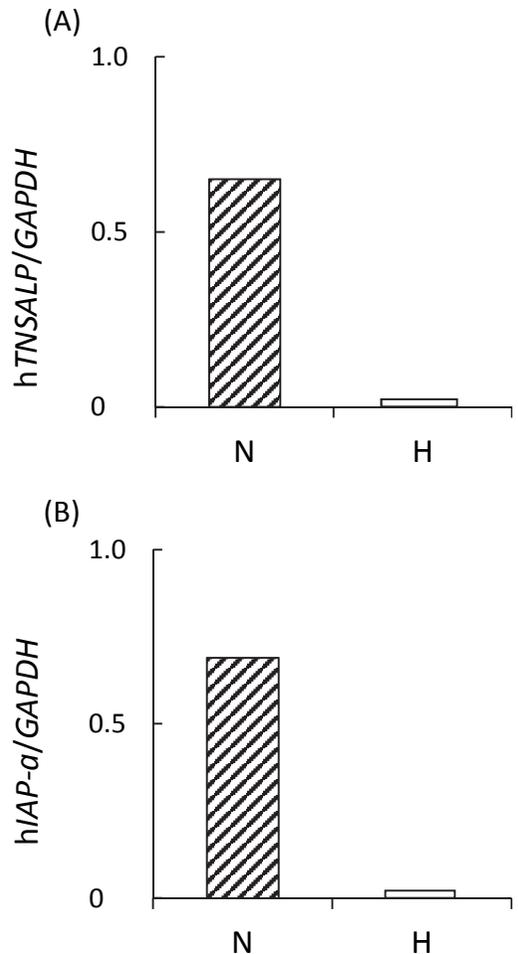


Figure 2 Relative levels of expression of h*TNSALP* and h*IAP-a* mRNA

図の説明

Figure 1. Detection of h*TNSALP*, h*IAP-a*, and h*IAP-b* mRNA with RT-PCR.

The PCR products were electrophoresed in a 5.25% polyacrylamide gel.

h*TNSALP*; human tissue-nonspecific alkaline phosphatase), h*IAP-a*; human intestinal alkaline phosphatase-a, h*IAP-b*; human intestinal alkaline phosphatase-b, N: normal kidney, H: kidney with hypophosphatasia.

Figure 2. Relative levels of expression of h*TNSALP* and h*IAP-a* mRNA.

All values are normalized to the housekeeping gene *GAPDH*.

(A) h*TNSALP* (human tissue-nonspecific alkaline phosphatase), (B) h*IAP-a* (human intestinal alkaline phosphatase-a).

N: normal kidney, H: kidney with hypophosphatasia.

IV. 考察

本研究では、HPP 患児の腎臓および正常な腎臓における IAP 発現の比較を行った。

ヒトの IAP の遺伝子として、*ALPI* 遺伝子が同定されており、第2染色体上に位置している²⁾。ヒト IAP は、胎盤型 ALP と 86.5% のアミノ酸相同性を示し、*TNSALP* とは 56.6% のアミノ酸相同性を示すことが報告されている¹⁶⁾。HPP は、*TNSALP* 遺伝子異常により ALP 活性低下をきたす疾患であるため、Figure 1 および Figure 2(A) に示したように、HPP 患児の腎臓において *TNSALP* 遺伝子の mRNA 発現は確認されなかった。日本人では、T1559del および p.F327L の遺伝子変異が比較的多いことが報告されている。T1559del 遺伝子変異ではほぼ完全に酵素活性が失われ、重篤な症状を呈する。p.F327L 遺伝子変異は低身長を特徴とし、石灰化の改善を有する非致死性のタイプであることが報告されている^{17) 18)}。本研究における HPP 患児は出生時から血清 ALP が低値を示し、低石灰化も認められているが、ALP 変異は c.1559delT/p.F327L であり、予後良好の表現型であった。また、本研究における HPP 患児は IgA 腎症を発症していた。IgA 腎症とは、血尿や蛋白尿を認め、腎糸球体に免疫グロブリンである IgA が沈着する疾患である。進行すると腎機能が低下し、高血圧の合併や腎不全に伴う症状が起こる。

これまでに HPP 患者における IAP の発現に関する報告は存在しないため、本研究では *ALPI* 遺伝子

から転写された alternative splicing mRNA である the variant aAug10 および the variant bAug10 の発現を検討した。HPP 患児の腎臓において、*TNSALP* 遺伝子異常の代償作用として IAP が上昇している仮説も考えられたが、the variant aAug10 および the variant bAug10 の発現は認められなかった。これは、HPP 患児が IgA 腎症を発症していたことに起因する可能性も考えられた。一般に、腎臓では 90% が *TNSALP*、10% が *IAP* を発現している¹⁹⁾。小腸組織からクローニングされた the variant aAug10 は、*ALPI* 遺伝子から転写される main variant であり、正常な腎臓において発現が認められた。一方、腎臓組織からクローニングされた the variant bAug10 の発現は、HPP 患児の腎臓および正常な腎臓でも発現は確認されなかった。本研究で用いたのは腎皮質組織であり、IAP の2種類の mRNA について、腎臓の部位による発現量の違いが推察された。IAP は小腸上皮細胞における脂質吸収の調節や、細菌性内毒素により誘発される炎症の制御に関わっている可能性が示されており²⁰⁾、HPP 患児において *TNSALP* だけでなく *IAP* の発現も低下していることは、これらに関連した生体内への影響が見られる可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、本研究で用いた HPP 患児の腎臓において、*TNSALP* 遺伝子だけでなく、*ALPI* 遺伝子の発現も低下していることが示された。本研究では、腎生検を行った HPP 患児 1 症例のみの検討であるため、今後より多くの HPP 患者における IAP 発現について検討し、HPP 患者における IAP の役割について新たなデータを提供していきたい。

謝辞

本研究の報告にあたり、ご協力いただきました患者様およびご家族の皆様にご心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H : J Biol Chem, 263, 12002-12010 (1988)
- 2) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H : J Biol Chem, 263, 12011-12019 (1988)
- 3) Millán JL : Nucleic Acids Res, 15, 10599 (1987)
- 4) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M : J Biol Chem, 263, 12020-12027 (1988)
- 5) Whyte MP : Endocr Rev, 15, 439-461 (1994)
- 6) Whyte MP : Bone and Mineral Research, William,

- A. Peck.(eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 175-218 (1989)
- 7) 低ホスファターゼ症 (難病指定 172). 公益財団法人難病医学研究財団/難病情報センター, <http://www.nanbyou.or.jp/entry/4565> [accessed 17.05.30]
 - 8) Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H : *J Pediatr*, 154, 924-930 (2009)
 - 9) Taketani T, Oyama C, Mihara A, Tanabe Y, Abe M, Hirade T, Yamamoto S, Bo R, Kanai R, Tadenuma T, Michibata Y, Yamamoto S, Hattori M, Katsube Y, Ohnishi H, Sasao M, Oda Y, Hattori K, Yuba S, Ohgushi H, Yamaguchi S : *Cell Transplant*, 24, 1931-1943 (2015)
 - 10) Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millán JL, Hodin RA : *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 3551-3556 (2008)
 - 11) Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL : *Mol Cell Biol*, 23, 7525-7530 (2003)
 - 12) Homo sapiens gene ALPI, encoding alkaline phosphatase, intestinal. AceView genes database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/AceView/av.cgi?db=human&term=ALPI&submit=Go>; 2012 [accessed 16.07.01]
 - 13) Chomczynski P, Sacchi N : *Nat Protoc*, 1, 581-585 (2006)
 - 14) Goseki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Ogata Y, Yanagishita M, Oida S : *Calcif Tissue Int*, 64, 160-162 (1999)
 - 15) Noda S, Yamada A, Nakaoka K, Goseki-Sone M : *Nutr Res*, 46, 59-67 (2017)
 - 16) Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH : *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 1234-1238 (1987)
 - 17) Michigami T, Uchihashi T, Suzuki A, Tachikawa K, Nakajima S, Ozono K : *Eur J Pediatr*, 164, 277-282 (2005)
 - 18) Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S : *Arch Dis Child*, 99, 211-215 (2014)
 - 19) Nishihara Y, Hayashi Y, Adachi T, Koyama I, Stigbrand T, Hirano K : *Clin Chem*, 38, 2539-2542 (1992)
 - 20) Lallès JP : *Nutr Rev*, 68, 323-332 (2010)

