

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08256

研究課題名(和文) 骨石灰化におけるピロリン酸濃度とその調節機構の解明 網羅的代謝物遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Pyrophosphate regulatory mechanism in bone mineralization

研究代表者

窪田 拓生 (Kubota, Takuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40629135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸は、骨形成に不可欠なミネラルである。しかし、リン酸が骨形成分化を促進する機構は十分には理解されていない。リン酸濃度に差を認めた α -グリセロリン酸もしくは無機リン酸を含む培地を用いてヒト骨髄由来間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導した。本研究では、リン酸は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化初期にWNT5b、WNT11、リン酸化c-Junの発現を上昇させ、非古典的Wntシグナル経路を活性化し、骨形成分化を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の正常な発達・恒常性維持は人間の健康にとって重要であり、骨形成を担う骨芽細胞分化のメカニズムを探ることは、骨形成の生理や代謝性骨疾患の病態の研究に不可欠である。我々は、本研究でリン酸によって誘導される骨芽細胞分化の初期段階における非古典的Wntシグナル伝達経路の活性化の関与について示した。これらの知見は、骨形成分化におけるリン酸と非古典的Wntシグナル伝達経路の関連について新たな視点を提供する。

研究成果の概要(英文)：Phosphate is an essential mineral for bone formation. However, the mechanism by which phosphate promotes osteogenic differentiation is not fully understood. We induced differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) into osteoblasts using media containing α -glycerophosphate or inorganic phosphate which resulted in different phosphate concentrations. In this study, we found that phosphate upregulates the expression of WNT5b, WNT11, and phosphorylated c-Jun during early differentiation of MSCs into osteoblasts, activates the non-canonical Wnt signaling pathway, and promotes osteogenic differentiation.

研究分野：小児科学

キーワード：骨代謝 リン酸 間葉系幹細胞 非古典的Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

骨格の石灰化は、骨芽細胞が分泌した I 型コラーゲンを中心とする骨基質蛋白にカルシウムと無機リン酸 (Pi) がハイドロキシアパタイト (HA) の形で沈着することで進行する。骨の石灰化には細胞外マトリックスに存在する Pi やカルシウムとともに、強力な石灰化阻害物質であるピロリン酸 (PPi) が重要な役割を果たしているが、骨の石灰化過程の調節機構は十分には明らかではない。さらに、リン酸が骨芽細胞分化に関与していることが知られているが、そのシグナル経路は明らかではない。

細胞外 PPi は、ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP1) による ATP からの産生や ANK による細胞内から細胞外への輸送により増加するとされている (Calcif Tissue Int. 2016;98(4):398)。一方、組織非特異型アルカリホスファターゼ (ALP) は PPi を分解する。また、石灰化に必要な Pi は、ALP によるリン酸エステル結合を有する分子や PPi の分解、PHOSPHO1 によるホスホコリンの分解によって供給されるとされている。また、オステオポンチンも石灰化を抑制することが知られている。さらに、プリン作用性シグナル伝達経路に関する、ATP トランスポーター ABCG6 や AMP をアデノシンと Pi に代謝する CD73 の遺伝子変異によって異所性石灰化が起こることが明らかになってきている。ENPP1 や ALP はプリン作用性シグナル伝達経路の分子を代謝する一方、ATP 代謝産物であるアデノシンは ALP 発現を抑制する。このように、様々な分子が石灰化に関与しているが、骨石灰化に適切な Pi 濃度、PPi 濃度、PPi/Pi 比は明らかではなく、骨石灰化や骨芽細胞分化に関与する分子の全体像も解明されていない。

骨・軟骨の低石灰化を示す代表的疾患である X 連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) のモデルマウスでは、過剰な線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) が ALP の発現を抑制し、骨の PPi が増加していると報告されている (PLoS Biol. 2016;14(4):e1002427)。したがって、XLH の低石灰化は低リン血症のみならず、過剰な PPi が関与している可能性がある。

低ホスファターゼ症 (HPP) は骨・軟骨の低石灰化と血清 ALP 活性の低下を特徴とする遺伝性骨疾患である。HPP では、ALP 活性低下による骨での PPi の増加と Pi の低下によって、骨の低石灰化が生じると考えられているが、HPP の骨局所の PPi 濃度、PPi/Pi 比は明らかではない。近年、ALP の酵素補充療法が開発され、周産期重症型の HPP 患者の生命予後が改善されたことが報告されている。しかしながら、現在の投与方法では、一部の患者において、低石灰化が十分には改善せず、骨レントゲン検査において、低石灰化を示す病様変化が残存する (日児誌 2019;123(2):386)。骨低石灰化病変を消失させるために、投与方法の改善に加えて、よりよい治療法が開発が望まれる。また、骨石灰化の程度を反映するバイオマーカーや遺伝子発現プロファイルが存在しないことも治療効果判定を困難にしている。

2. 研究の目的

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞や HPP 患者由来の iPS 細胞を用いて、骨石灰化に適切な Pi、PPi 濃度や PPi/Pi 比は明らかにすること、メタボローム解析や RNA-sequencing によって、骨石灰化の程度や骨芽細胞分化を反映するバイオマーカーや遺伝子プロファイルや骨石灰化関連新規物質を明らかにすることが目的である。本研究結果は、HPP の病態解明や新規治療法の開発に繋がるのみならず、ALP や PPi の関与が示唆されている XLH の病態解明につながる可能性があり、さらに、これまで検討されていない骨粗鬆症診療で活用できる石灰化マーカーの開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

- 1) 細胞培養・試薬: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) (429Z022) を PromoCell から購入し、-MEM を含んだ維持培地 (MM) で培養した。骨芽細胞分化培地 (DM) には 100 nM dexamethasone (Wako)、50 μ M L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich) と 10 mM の -glycerophosphate (GP) (Sigma-Aldrich) もしくは 1 mM、3 mM Pi のリン酸ナトリウム (Na₂HPO₄; Sigma-Aldrich) を含んだ。
- 2) 石灰評価: カルシウム沈着を評価するアリザリン染色を行った。その沈着量をカルシウムアッセイキット (CA01M, Metallogenics) を用いて定量した。
- 3) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性評価: ALP test kit (291-58,601, Wako) を用いた。蛋白量を bicinchoninic acid (BCA) アッセイキット (Thermo Scientific) を用いて評価し、ALP 活性を蛋白量で補正した。
- 4) Pi、PPi 測定: phosphate test kit (270-49,801, Wako)、pyrophosphate assay kit (ab112155, Abcam, UK) を用いた。
- 5) 定量 PCR (qPCR): 総 RNA は RNeasy Mini Kit (74,106, Qiagen) を用いて抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with a gDNA Remover (FSQ-301, Toyobo) を用いて cDNA を合成した。qPCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (QPS-201, Toyobo) を用いて行い、GAPDH を内在性コントロールとした。各検体は三つ組みで行い、データは 2^{-Ct} 法で解析した。
- 6) RNA sequencing (seq) データ処理: 総 RNA を抽出し、quality control (QC) 後、RNA をライブラリー作製に用いた。作製されたライブラリーは HiSeqX platform (Illumina) を用いて

2 × 101-bp paired end readsでシーケンスされた。データをFASTQファイルに変換し、adapter trimming後、quasi-mapping法を用いてデータを解析した。参照トランスクリプトームにGRCh38を用いた。データ取得後、DESeq2を用いて主成分分析、differential gene expression (DGE) analysisを行った。パスウェイ解析はGene Ontology (GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)を用いて行った。

- 7) Western blot analysis: 蛋白はRIPA Buffer (PTH4492, Wako)を用いて抽出し、BCA assay (Thermo Scientific)で濃度を測定した。蛋白を2 × sodium dodecyl sulfate loading bufferで煮沸し、Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて、分離、転写した。膜をブロッキング後、次の抗体で反応させた: WNT5b (2530, Cell Signaling Technology), c-Jun (9165, Cell Signaling Technology), phosphor-c-Jun (Ser73) (3270, Cell Signaling Technology), -Catenin (total, 8480, Cell Signaling Technology), phosphor- -Catenin (Ser33/37/Thr41) (inactive, 9561, Cell Signaling Technology), non-phosphor- -Catenin (active, 8841, Cell Signaling Technology), phosphor-GSK-3 (Ser9) (5558, Cell Signaling Technology), alpha-Tubulin (ab15246, Abcam), p44/42 MAPK (ERK1/2) (4695, Cell Signaling Technology), P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (4370, Cell Signaling Technology)。TBST bufferで洗浄後、horseradish peroxidase-labeled secondary antibody immunoglobulin Gでプローブし、Clarity™ Western ECL Substrate (170-5060, Bio-Rad Laboratories) chemiluminescence reagentsに反応させ、Bio-Rad image analysis system (Bio-Rad Laboratories)を用いて検出した。標的蛋白をalpha-tubulinで補正した。
- 8) siRNA: WNT5bの発現抑制には、ヒトWNT5b mRNA sequence: 5'-CTCCTGGTGGTCATTAGCTTT-3'に相当するWNT5b siRNA (Qiagen, USA)の21-bpオリゴヌクレオチドを4配列作製した。WNT5bのsiRNA (si-WNT5b)にはHiPerFect HTS reagent (301704, Qiagen)を用いた。陰性コントロールとしてAllStars Negative Control siRNA (1027415, Qiagen)を使用した。発現抑制は48時間後の定量PCRで評価した。4種の配列の中で、si-WNT5b-3が最も発現抑制を示したため、以後の実験で使用した。形質導入の48時間後に分化培地に交換し、その7日目に遺伝子、蛋白発現を評価した。
- 9) 統計: データは平均 ± 標準誤差で示した。2群間の比較はt-test、多群間の比較はone-way analysis of variance (ANOVA)、Turkey significant difference testで行った。P値 < 0.05を有意とした。

4. 研究成果

1) Pi 濃度がMSCの骨形成分化と石灰化に与える影響

GPをPiに置き換えて、Pi濃度が骨分化に及ぼす影響を検討した。Pi濃度は、培養中、GP群ではMM群に比べて増加し続けたが、1 mM Pi群と3 mM Pi群では安定しており、MM群よりも高い値を示した。特に、7日目には、4群中、3mM Pi群で最も高いPi濃度が観察された。PPi濃度は、MM群が3つの誘導群より高く、Pi/PPi比はMM群と3つの誘導群の比較で著しく低下した。次に、骨形成や石灰化に関与する遺伝子の発現量を調べた。7日目のRUNX2、COL1A1、OPN、OCN、ANKH、ENPP1のmRNA発現量は、3 mM Pi群でGP群、1 mM Pi群、MM群より増加した。しかし、培養時間の延長により、GP群および1mM Pi群の遺伝子発現量は、3mM Pi群の遺伝子発現量に達した。以上の結果から、3mM PiはGP群、1mM Pi群に比べ、骨形成と石灰化を促進することが示唆された。

2) RNA-seq解析によるMSCからの骨芽細胞分化の初期段階へのPi濃度の影響

MSCの培養により、3mMのPiが培養7日目に骨芽細胞分化と石灰化を促進することが示された。そこで、培養7日目のトランスクリプトームの変化を調べるため、RNA-seqを行い、遺伝子発現を網羅的に評価した。主成分分析により、サンプルグループ間の差異を説明することができた。3 mM Pi群とGP群の比較では、発現増加遺伝子は138個、発現低下遺伝子は78個にとどまった。3mMのPi群とGP群の間で発現が異なる遺伝子は、骨芽細胞分化の際にPiに素早く反応することに寄与していると考えられるため、MM、GP、3mM Pi群のDGE解析にK-means clustering法を適用して遺伝子発現パターンを詳細に検討した。その結果、クラスター2の67遺伝子は、MM、GP、3mM Pi群の順に徐々に増加していることがわかった。そこで、GO解析の生物学的プロセス解析において、3 mM Pi群でGP群に比べて発現量が増加したクラスター2の67遺伝子に注目した。遺伝子-遺伝子相互作用プロットでは、生物学的プロセスに関与する遺伝子の状態が示された。KEGG濃縮解析の結果、3 mM Pi群とGP群の比較において、Wntシグナル伝達経路の構成要素であるNKD2、CCN4、SERPINF1、WNT5B、CTNBN1の発現が増加していた。Wntシグナル伝達経路は、骨組織の発生と恒常性維持に不可欠な経路である。以上のことから、RNA-seq解析により、MSCの骨芽細胞分化初期段階において、GP群と比較して3mM Pi群で骨芽細胞分化、石灰化、Wntシグナル伝達経路に関連する遺伝子発現が増加することが示された。

3) 高濃度Piは非古典的および古典的Wntシグナル伝達経路の活性化を促進する

RNA-seq 解析により、Wnt シグナル伝達経路が 3mM Pi により活性化されることが明らかになったため、qPCR により Wnt シグナル伝達経路の構成要素の発現を調べた。その中で、WNT5b、WNT11、JUN、ROR2、MAPK9 は非古典的 Wnt シグナルにおける成分であり、Axin2、 β -Catenin、WISP2、WNT2、LRP5 は古典的 Wnt シグナルにおける成分だった。qPCR では、3 mM Pi 群では、MM 群、GP 群と比較して、7 日目に WNT5b、JUN、ROR2 の発現量が増加していることが示された。Axin2、 β -Catenin、LRP5、WISP2、WNT2 の発現は GP 群と 3mM Pi 群間で同等であった。これらの mRNA 発現研究は、骨形成分化の初期段階において、非古典的 Wnt シグナルの構成要素が高い Pi 濃度に反応し、古典的 Wnt シグナルには反応しないことを示唆した。培養 7 日目に非古典的 Wnt シグナル経路増強を確認するためにウェスタンブロットを行ったところ、7 日目の WNT5b とリン酸化 c-Jun/c-Jun 比は MM 群および GP 群と比較して 3mM Pi 群で有意に増加した (図 1)。一方、総 β -カテニン、活性型 β -カテニン、p- β -カテニン (不活性型)、p-GSK-3 (不活性型) のタンパク発現量は、3mM Pi 群と GP 群の間で差がなかった。以上の結果から、MSC からの Pi 誘導骨芽細胞分化には、古典的 Wnt シグナルだけでなく非古典的 Wnt シグナル経路も関与しており、高 Pi 群では骨芽細胞分化の初期段階で非古典的 Wnt シグナル経路、少なくとも WNT5b/c-Jun シグナル経路が速やかに活性化していることが示された。

4) Pi によって誘導された WNT5b は Wnt シグナル経路をさらに誘導する

qPCR とイムノブロットングにより、骨分化誘導後 7 日目に高濃度 Pi が WNT5b を含む非古典的 Wnt シグナル伝達経路を活性化することが示された。そこで、WNT5b の発現を阻害が、Pi 処理によって誘導される非古典的および古典的 Wnt シグナル経路にさらに影響を与えるかどうかを検討した。骨形成誘導後 7 日目の細胞に si-WNT5b を形質導入した。予想通り、WNT5b mRNA 発現と蛋白発現が抑制された。非古典的 Wnt シグナルに関しては、si-WNT5b を形質導入した 3 mM Pi 群と GP 群の両方で、WNT11 mRNA の発現レベルも低下していた。JUN と ROR2 の mRNA 発現量は、WNT5b をノックダウンした 3mM Pi 群では減少したが、GP 群では有意差は見られなかった。一方、古典的 Wnt シグナルにおける Axin2、 β -Catenin、WISP2、WNT2、LRP5 の mRNA 発現量は、3mM Pi 群と GP 群で、si-WNT5b と si-Cont の間に差はなかった。リン酸化 c-Jun/c-Jun 比は、si-WNT5b を添加した 3mM Pi 群で明らかに減少したが、GP 群では減少しなかった。古典的 Wnt シグナル経路については、si-WNT5b と si-Cont の形質導入間では、3mM Pi 群と GP 群ともに、総 β -Catenin、p- β -Catenin、活性型 β -Catenin、p-GSK3 の発現量に差はみられませんでした。これらの結果から、Pi によるリン酸化 c-Jun と JUN、ROR2、WNT11 mRNA の発現レベルは、少なくとも部分的には WNT5b によって媒介されていることが示された。

5) WNT5b の発現抑制による骨形成分化の抑制

WNT5b の発現抑制が、培養 7 日目の MSC からの骨形成分化および Pi による石灰化誘導に及ぼす影響を検討した。RUNX2 および ALPL の mRNA 発現レベルは、si-WNT5b を形質導入した 3mM Pi 群では、si-Cont を形質導入した 3mM Pi 群に比べ減少したが、GP 群では減少しなかった。OPN mRNA 発現量は、si-WNT5b を導入した GP 群、3mM Pi 群とともに、si-Cont を導入した群と比較して増加した。次に、si-WNT5b を形質導入した 3mM Pi 群と GP 群の両方で、si-Cont を形質導入した群と比較して、TNAP 活性と石灰化レベル (図 2) が減少した。さらに、si-Cont 処理と比較して si-WNT5b 処理で Pi/PPi 比は低下していた。これらの結果から、WNT5b を阻害することで、Pi によって促進される骨形成分化、TNAP 活性、石灰化に影響を与えることが示唆された。また、WNT5b をノックダウンした場合の RUNX2、ALPL、JUN、ROR2 の mRNA レベルやリン酸化 c-Jun レベルの結果を考慮すると、WNT5b を介した非古典的 Wnt シグナル経路が Pi による初期骨形成分化に関与していると考えられる。

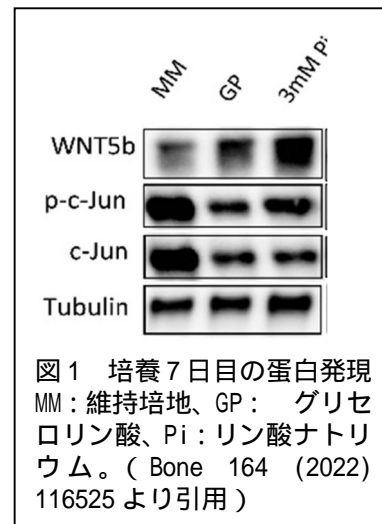


図 1 培養 7 日目の蛋白発現
MM: 維持培地、GP: グリセロリン酸、Pi: リン酸ナトリウム。(Bone 164 (2022) 116525 より引用)

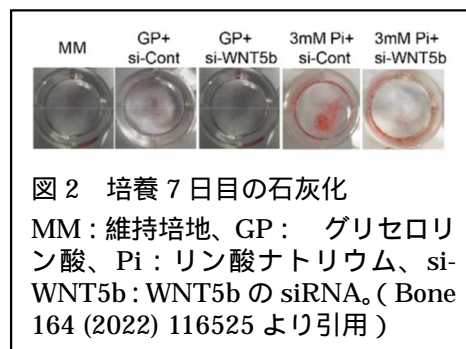


図 2 培養 7 日目の石灰化
MM: 維持培地、GP: グリセロリン酸、Pi: リン酸ナトリウム、si-WNT5b: WNT5b の siRNA。(Bone 164 (2022) 116525 より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kubota Takuo, Namba Noriyuki, Tanaka Hiroyuki, Muroya Koji, Imanishi Yasuo, Takeuchi Yasuhiro, Kanematsu Masanori, Sun Wei, Seino Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 40
2. 論文標題 Self-Administration of Burosumab in Children and Adults with X-Linked Hypophosphataemia in Two Open-Label, Single-Arm Clinical Studies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advances in Therapy	6. 最初と最後の頁 1530 ~ 1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12325-022-02412-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakano Yukako, Kubota Takuo, Ohata Yasuhisa, Takeyari Shinji, Kitaoka Taichi, Miyoshi Yoko, Ozono Keiichi	4. 巻 70
2. 論文標題 Assessment of body fat mass, anthropometric measurement and cardiometabolic risk in children and adolescents with achondroplasia and hypochondroplasia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ22-0477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rui Shumin, Kubota Takuo, Ohata Yasuhisa, Yamamoto Kenichi, Fujiwara Makoto, Takeyari Shinji, Ozono Keiichi	4. 巻 164
2. 論文標題 Phosphate promotes osteogenic differentiation through non-canonical Wnt signaling pathway in human mesenchymal stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116525 ~ 116525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2022.116525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishihara Y, Ohata Y, Takeyari S, Kitaoka T, Fujiwara M, Nakano Y, Yamamoto K, Yamada C, Yamamoto K, Michigami T, Mabe H, Yamaguchi T, Matsui K, Tamada I, Namba N, Yamamoto A, Etoh J, Kawaguchi A, Kosugi R, Ozono K, Kubota T	4. 巻 153
2. 論文標題 Genotype-phenotype analysis, and assessment of the importance of the zinc-binding site in PHEX in Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets using 3D structure modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116135 ~ 116135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Briot K, Portale AA, Brandi ML, Carpenter TO, Cheong HI, Cohen-Solal M, Crowley RK, Eastell R, Imanishi Y, Ing S, Insogna K, Ito N, Jan de Beur SM, Javaid MK, Kamenicky P, Keen R, Kubota T, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Burosumab treatment in adults with X-linked hypophosphataemia: 96-week patient-reported outcomes and ambulatory function from a randomised phase 3 trial and open-label extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 e001714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/rmdopen-2021-001714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Nobuaki, Kubota Takuo, Kitanaka Sachiko, Fujiwara Ikuma, Adachi Masanori, Takeuchi Yasuhiro, Yamagami Hitomi, Kimura Takehide, Shinoda Tatsuya, Minagawa Masanori, Okazaki Ryo, Ozono Keiichi, Seino Yoshiki, Fukumoto Seiji	4. 巻 39
2. 論文標題 Clinical performance of a novel chemiluminescent enzyme immunoassay for FGF23	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01250-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Namba Noriyuki, Kubota Takuo, Muroya Koji, Tanaka Hiroyuki, Kanematsu Masanori, Kojima Masahiro, Orihara Shunichiro, Kanda Hironori, Seino Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Safety and Efficacy of Burosumab in Pediatric Patients With X-Linked Hypophosphatemia: A Phase 3/4 Open-Label Trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 bvac021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvac021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mukai Masashi, Yamamoto Takehisa, Takeyari Shinji, Ohata Yasuhisa, Kitaoka Taichi, Kubota Takuo, Yamamoto Katsusuke, Kijima Eri, Hasegawa Yasuhiro, Michigami Toshimi, Ozono Keiichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Alkaline phosphatase in pediatric patients with genu varum caused by vitamin D-deficient rickets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 807 ~ 815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satomura Yoshinori, Bessho Kazuhiko, Kitaoka Taichi, Takeyari Shinji, Ohata Yasuhisa, Kubota Takuo, Ozono Keiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Neonatal cholestasis can be the first symptom of McCune-Albright syndrome: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Pediatrics	6. 最初と最後の頁 7 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5409/wjcp.v10.i2.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Satomi, Kubota Takuo, Naganuma Junko, Arisaka Osamu, Ozono Keiichi, Yoshihara Shigemi	4. 巻 39
2. 論文標題 Incidence rate of vitamin D deficiency and FGF23 levels in 12- to 13-year-old adolescents in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 456 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01173-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeyari Shinji, Kubota Takuo, Ohata Yasuhisa, Fujiwara Makoto, Kitaoka Taichi, Taga Yuki, Mizuno Kazunori, Ozono Keiichi	4. 巻 296
2. 論文標題 4-Phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100027 ~ 100027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Takuo, Fukumoto Seiji, Cheong Hae II, Michigami Toshimi, Namba Noriyuki, Ito Nobuaki, Tokunaga Shin, Gibbs Yoshimi, Ozono Keiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-term outcomes for Asian patients with X-linked hypophosphataemia: rationale and design of the SUNFLOWER longitudinal, observational cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e036367 ~ e036367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2019-036367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 治療可能な小児の骨疾患 “ 低ホスファターゼ症 ” ~ 早期診断の鍵はALP低値の確認 ~
3. 学会等名 第35回近畿小児科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuo Kubota
2. 発表標題 New Trends in the Diagnosis and Treatment of X-Linked Hypophosphatemic Rickets
3. 学会等名 2022 Taiwan Human Genetics Society Spring Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 軟骨無形成症の診療ガイドライン 早期からの疾患管理の重要性
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 低ホスファターゼ症Update 酵素補充療法の効果とこれからの課題
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 小児骨疾患の成人期管理に向けて 小児科の立場から
3. 学会等名 第24回日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 最大骨量を増やすためにできることは何か？ 小児科の立場から
3. 学会等名 第24回日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuo Kubota
2. 発表標題 Diagnosis and Treatment in Pediatric Bone Diseases: From Childhood to Adulthood
3. 学会等名 The 10th International Congress of Endocrinology and Metabolism in conjunction with the 41st Annual Scientific Meeting of the Korean Endocrine Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 軟骨無形成症の包括的診療 - 当科のデータから見る診療科連携 -
3. 学会等名 第55回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 低ホスファターゼ症患者のモニタリングと多職種連携 小児内分泌科医が果たすclinical care coordinatorとしての役割
3. 学会等名 第55回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 骨ミネラル代謝疾患患者の診療科連携
3. 学会等名 第32回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 小児疾患の疾患モデルと新規治療法
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 ビタミンD 抵抗性くる病・骨軟化症のレジストリ
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 FGF23関連低リン血症性くる病・骨軟化症の治療薬の進歩
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 くる病診断と線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) 測定の意義
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田拓生, 中山尋文, 高谷里依子, 皆川真規, 井上大輔, 竹内靖博, 福本誠二, 大園恵一
2. 発表標題 低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病 / 骨軟化症の多施設研究と疾患レジストリ
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishihara Y, Ohata Y, Takeyari S, Kitaoka T, Fujiwara M, Nakano Y, Yamamoto K, Yamada C, Yamamoto K, Michigami T, Mabe H, Yamaguchi T, Matsui K, Tamada I, Namba N, Yamamoto A, Etoh J, Kawaguchi A, Kosugi R, Ozono K, Kubota T
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis, and assessment of the importance of the zinc-binding site in PHEX in Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets using 3D structure modeling.
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 成長曲線から見た骨疾患
3. 学会等名 第123回 日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 小児とビタミンD
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 ビタミンD代謝と疾患
3. 学会等名 2020年 日本小児内分泌学会特別学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 骨系統疾患の診療<小児科の立場から>
3. 学会等名 第6回 日本産科婦人科遺伝診療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山尋文, 山田知絵子, 宮田 京, 中野由佳子, 山本賢一, 武鍵真司, 大幡泰久, 藤原誠北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一
2. 発表標題 パミドロン酸からゾレドロン酸に投与変更した小児骨疾患の検討
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubota T, Ohata Y, Ishihara Y, Fujiwara M, Takeyari S, Yamamoto K, Nakano Y, Kitaoka T, Nakayama H, Yamada C, Ishimi T, Okawa R, Nakano K, Akiyama T, Kakimoto H, Araki S, Sano S, Ogata T, Ozono K.
2. 発表標題 Clinical, Biochemical and Genetic Study in Patients with Odontohypophosphatasia in Japan
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田拓生, 中山尋文, 高谷里依子, 皆川真規, 井上大輔, 竹内靖博, 福本誠二, 大園恵一
2. 発表標題 低リン血症性ビタミンD 抵抗性くる病 / 骨軟化症のアンケート調査と患者レジストリ
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田知絵子, 窪田拓生, 大幡泰久, 北岡太一, 大園恵一
2. 発表標題 家族歴を有し遺伝子診断されたX連鎖性低リン血症性骨軟化症の1例
3. 学会等名 臨床内分泌代謝UPDATE2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------