



Title	低ホスファターゼ症の病因におけるオステオポンチンの役割：ALPL/SPP1 欠損ヒトiPS細胞モデルを用いた解析
Author(s)	上田, 亜侑
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105326
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (上 田 亜 侑)	
論文題名	低ホスファターゼ症の病因におけるオステオポンチンの役割： <i>ALPL/SPP1</i> 欠損ヒトiPS細胞モデルを用いた解析
論文内容の要旨 【背景及び目的】 低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia: HPP) は、組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase: TNSALP) をコードする <i>ALPL</i> 遺伝子の機能喪失に起因する単一遺伝子疾患であり、骨の石灰化障害や乳歯の早期脱落など多様な臨床症状を呈し、発症時期や重症度により6つの病型 (周産期重症型、周産期良性型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型) に分類されている。石灰化障害にはTNSALPの基質の一つであるピロリン酸 (PPi) 蓄積の関与が推察されているが、TNSALPの活性喪失がHPP 患者に認められる多彩な症状をきたす詳細な分子機序については不明な点が多く残されている。近年、酵素補充療法 (enzyme replacement therapy, ERT) の導入により重症例の生命予後は改善したものの、治療効果は十分とは言えず、病態形成機構のさらなる解明と新規治療標的の探索が求められている。 著者らはこれまでに、常染色体潜性遺伝性の重症型 HPP の <i>in vitro</i> モデルとして使用することを目的として、健常人由来人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSCs) に CRISPR/Cas9による遺伝子破壊を適用することにより<i>ALPL</i>-knockout (KO) iPSCsを樹立した。このモデルでは骨芽細胞系列への分化誘導時に著明な石灰化障害が認められ、さらに興味深いことに、オステオポンチン (osteopontin: OPN) の発現が有意に増加していた。<i>Alpl</i>-KOマウスにおいても血清 OPN 濃度の上昇が報告されている。しかし、HPPの病態形成におけるOPNの意義や詳細な分子機構については、これまで十分に検討されていない。 そこで、本研究においては、HPPの病態形成におけるOPN発現上昇の意義を明らかにすることを目的とし、<i>ALPL</i>-KO iPSC株にCRISPR/Cas9システムを適用してOPNのコード遺伝子である<i>SPP1</i>を欠損させることにより、<i>ALPL/SPP1</i>-double knockout (KO) iPSC株を樹立し解析を行った。 【材料と方法】 <i>ALPL</i>遺伝子の両アレルにそれぞれ欠失あるいは逆位によるフレームシフトをきたし、TNSALP酵素活性を完全に喪失した<i>ALPL</i>-KO iPSC 株 (c. [81_277del]; [81_279inv] (p. [Lys27Asnfs]; [Tyr28Glyfs])) に対し、<i>SPP1</i> 遺伝子Exon 5 を標的とする合成guide RNAおよびCas9タンパク質を導入することにより、<i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株を樹立した。 樹立した<i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株を、<i>ALPL</i>-KO iPSC 株、および<i>ALPL</i> および<i>SPP1</i> 以外は遺伝的に同質な isogenic control とともに、TNSALPのリン供与体であるβ-グリセロリン酸、デキサメサゾン、アスコルビン酸、レチノイン酸を含む培地を用いて骨芽細胞系列に分化誘導した。 各細胞のALP活性はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定した。<i>in vitro</i>石灰化能をカルシウム沈着を検出するアリザリンレッド染色およびハイドロキシapatiteを検出するOsteoimageTM蛍光染色により評価し、アリザリンレッド染色陽性面積の定量を行った。遺伝子発現をTaqManシステムによるreal-time PCRにより解析した。また、培養上清中の無機リン酸 (Pi) 濃度の測定を行った。 【結果】 <i>SPP1</i>の両アレルに塩基の挿入によるフレームシフトと未成熟終止コドンが生じた (c. [430insG]; [430insGG] (p. [Gly144GlyfsTer4]; [Gly144GlyfsTer9])) <i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株を樹立した。<i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株由来骨芽細胞においては、<i>SPP1</i> mRNA 発現が著しく低下しており、nonsense-mediated mRNA decayに起因すると考えられた。このことから、<i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株においては、機能的なOPNが欠損していることが確認された。<i>ALPL/SPP1</i>-double KO iPSC 株と<i>ALPL</i>-KO iPSC 株はいずれもTNSALP活性を完全に喪失していた。 β-グリセロリン酸を含む培地を用いて骨芽細胞系列に分化誘導時、<i>ALPL</i>-KO iPSC 株は著明な石灰化障害を示し	

た。*ALPL/SPPI*-double KO 細胞は、*ALPL*-KO 細胞と比較して Alizarin Red染色性およびOsteoImage™ 染色性がわずかではあるが増強し、*in vitro*石灰化能の部分的な回復を示した。骨芽細胞分化のマスター転写因子である *RUNX2* の発現をreal-time PCRにて解析したところ、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においてはDay 28 以降*ALPL*-KO 細胞と比較し有意に上昇し、isogenic control 細胞と同程度の発現レベルを示した。

エクトエンザイムであるTNSALPはPPiや β -グリセロリン酸などの基質を分解しPiを産生する。著者らはHPPにおける石灰化障害にTNSALP酵素活性の低下に伴う細胞外Piのavailabilityの低下が寄与していることを明らかにしている。そこで、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞の石灰化障害の部分的回復に細胞外Piのハンドリングの変化が関与している可能性を考え、細胞外Pi濃度の測定を行った。isogenic control細胞と比較して*ALPL*-KO 細胞のPi濃度は低値を示し*ALPL/SPPI*-double KO 細胞における Pi 濃度は*ALPL*-KO 細胞とほぼ同程度にとどまっていた。一方、細胞外から細胞内へのPi取り込みを担うトランスポーターであるⅢ型 Na^+/Pi 共輸送体をコードする *SLC20A1* および *SLC20A2* の発現をreal-time PCR にて解析したところ、*SLC20A1* ではDay 14、*SLC20A2* では分化誘導 Day 14 及び 28 に*ALPL*-KO 細胞で発現が低下していたのに対し、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞では培養期間を通じて isogenic control 細胞とほぼ同等の発現レベルを示した。

さらに、PPi代謝関連分子の発現におよぼす影響についても検討したところ、細胞内のPPiを細胞外へ輸送するトランスポーターをコードする*ANKH* (*ankylosis progressive homolog*) 遺伝子の発現は、分化誘導 Day 14 の時点で*ALPL*-KO 細胞でisogenic control と比較して低下していたが、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においては*ALPL*-KO 細胞に比較して発現が増加しisogenic control とほぼ同等であった。また、PPi産生酵素である*ENPP1* (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) 遺伝子に関しては培養期間を通じて*ALPL*-KO 細胞における発現が isogenic control と比較して低値を示した一方、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においてはisogenic controlと同等の発現を認めた。

また、骨基質の主要構成タンパク質で骨石灰化の足場となるⅠ型コラーゲンのプロ α 鎖をコードする遺伝子 *COL1A1* および *COL1A2* の発現は、分化誘導Day 42の時点で、*ALPL*-KO 細胞でisogenic control と比較して低下していたが、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においてはisogenic control とほぼ同等の発現を示した。

【考察】

単一遺伝子疾患の疾患特異的 iPSCsは、関心のある細胞種への分化誘導により、病態解析や治療薬の検討等における強力なツールとなる。HPPは日本における重症型の発症頻度が150,000人に1人程度の希少疾患であり、また、2015年に酵素補充薬が導入されるまで重症例は生後早期に死亡していたため、これまでのところヒトHPP患者で血中OPNの測定を行った報告はない。しかし、*ALPL*-KO iPSC株由来骨芽細胞において*SPPI*の発現が上昇していたこと、また、*Alpl*-KO マウスにおいて血中OPNが増加していたことから、HPPの骨格における病態形成にOPNが関与する可能性が示唆され、本研究においては、その詳細な分子機序を明らかにするために、*ALPL/SPPI*-double KO iPSC株を樹立した。

OPNはDMP1やMEPEなどと同じく、骨や歯などの硬組織に存在する非コラーゲン性の基質タンパク質であるSIBLINGファミリーに属し、骨芽細胞以外にも種々の細胞に発現し、さまざまな疾患の病態への関与が示唆されている。本研究において、*SPPI* 遺伝子を欠損させることにより*ALPL*-KO iPSC株由来骨芽細胞の石灰化障害が一部回復した。この観察と一致して、*Alpl/Sppl*-double KOマウスにおいては*Alpl*-KOマウスと比較し骨の低石灰化が一部回復していたことが報告されており、OPNはHPPにおける石灰化障害の憎悪因子であると考えられる。

マウスにおける解析から、Runx2は*Sppl*を始め、*Col1a1*、*Col1a2*、*osteocalcin*などの骨基質タンパク質の発現を増加させることが示されている。今回、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においては、*ALPL*-KO 細胞で認められた*RUNX2*発現の低下が回復し、それに伴い、*COL1A1*、*COL1A2*の発現が是正された。*ALPL*欠損下においては、*SPPI*が *RUNX2*の発現に対して何らかのフィードバック作用を及ぼしている可能性が推察される。さらに、細胞外PiやPPiの制御に関わる遺伝子の発現異常が*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においては是正されていた。

以上より、HPPにおけるOPNの産生増加は、石灰化障害の憎悪因子として働くとともに、骨芽細胞分化や細胞外PiのハンドリングやPPi代謝に影響を及ぼすことにより、HPPの病態を修飾していることが示唆された。

【結論】

HPPにおいて、OPNの産生増加は骨石灰化障害を増悪させるとともに、骨芽細胞分化や細胞外PiやPPiの制御に影響を及ぼす可能性が示唆された。OPNは、HPPの病勢を反映するバイオマーカーや新たな治療標的として期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ 上田亜侑 ）			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	田中 晋
	副 査	教授	田熊一 敬
	副 査	准教授	大川 玲奈
	副 査	講師	山下 元三
論文審査の結果の要旨 本研究は、低ホスファターゼ症(HPP)の病態形成におけるオステオポンチン(OPN)の役割を明らかにすることを目的として、<i>ALPL/SPPI</i>-double KO iPSCs を樹立し、骨芽細胞系列に分化誘導することで検討を行った。 その結果、OPN の産生増加は HPP における骨石灰化障害を増悪させるとともに、骨芽細胞分化および細胞外無機リン酸ならびに無機ピロリン酸の制御に影響を及ぼすことにより、病態を修飾する可能性が示唆された。 以上の結果は、HPP の病態解明に重要な知見を提供するものであり、よって博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。			