The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	低ホスファターゼ症患者由来iPS細胞におけるTALENを用いた遺伝子変異修復
Author(s)	中野, 知帆
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69485
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　中野　知帆　　）	
論文題名	低ホスファターゼ症患者由来iPS細胞におけるTALENを用いた遺伝子変異修復

論文内容の要旨

低ホスファターゼ症（Hypophsphatasia; 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*ALPL*遺伝子の異常により、ALPの酵素活性が低下することによって、骨代謝に異常が生じる遺伝性疾患である。この遺伝子変異によって、アルカリホスファターゼ（Alkaline Phosphatase; ALP）の酵素活性が低下し、骨の低石灰化など様々な全身症状がみられる。ALPの活性低下による石灰化障害の機序としては、蓄積するピロリン酸の影響や局所のリン濃度の低下などが考えられているが、完全には理解されていない。

HPPは発症時期と重症度によって、6病型（周産期重症型、周産期軽症型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型）に分類されている。原因となる変異は今日までに300種類以上確認されており、日本で最も頻度が高いc.1559delT変異は、この変異由来のALPの活性がほぼ消失していることから、周産期重症型との関連が指摘されている。治療法として、近年酵素補充療法が開始され、今まで致死的であった周産期重症型や乳児型においても治療が可能になり、生存率は飛躍的に向上した。しかし、酵素補充療法には、薬剤が高価であることや、長期にわたる頻回の皮下注射が必要であるといった問題も残されており、この治療法のさらなる改善や代替療法の開発が望まれる。

治療法の開発を行うためには、より詳細にHPPの病態を解明し、ヒトの遺伝子変異を有する疾患モデルの存在が必要となる。本研究では、HPP患者由来のiPS細胞を作成し、さらに遺伝子修復を行うことによって、同症にみられる骨の石灰化不全の疾患モデルを樹立することを目的として研究を行った。

まず、c.1559delTホモ接合体HPP患者およびc.678G>A/c.1559delTヘテロ接合体HPP患者由来の皮膚線維芽細胞に、センダイウイルスを用いて山中4因子を導入し、iPS細胞を作製した。続いて、これらのiPS細胞に対し、遺伝子操作技術の一つであるTranscription Activator-Like Effector Nuclease（TALEN）を用いて、c.1559delT変異の片側アレルにおける変異修復を行った。

健常人由来iPS細胞、HPP患者由来iPS細胞およびc.1559delT変異について修復を行ったiPS細胞についてALP染色を行ったところ、健常のiPS細胞では陽性であったのに対し、HPP患者由来のiPS細胞では陰性であった。また、c.1559delT変異を修復したiPS細胞ではALP染色は陽性であった。

これらのiPS細胞を用いてALP活性を測定すると、HPP患者由来のiPS細胞では健常のiPS細胞に比べてALP活性は有意に低値であった。それに対し変異を修復したiPS細胞では、修復前に比べALP活性が有意に上昇していた。また、健常のiPS細胞のALP活性と比較すると変異修復後のiPS細胞の活性は1/2程度であった。

さらにこれらを用いた骨芽細胞への分化誘導実験を行った。本研究では、iPS細胞から神経堤細胞および間葉系幹細胞を介した骨芽細胞分化誘導法を採用した。

骨芽細胞分化誘導後に行ったALP染色において、健常の細胞では、骨芽細胞へと分化が進むにつれて染色は強くなった。HPPの細胞では分化が進んでも、陰性ないしは非常に弱い陽性を示した程度であった。変異修復した細胞では、それぞれ同時期の健常の細胞の染色程度よりは弱いものの、それぞれ修復前の細胞と比べると明らかに強陽性であり、また骨芽細胞分化が進むにしたがって染色が強くなる様子も観察された。また、骨芽細胞分化誘導後8日目で行ったALP活性測定では、HPPの細胞の活性は健常の細胞に比べて1/12～1/15程度と有意に低かった。一方、変異を修復した細胞では、それぞれの修復前と比べ4～7倍程度の活性の上昇がみられた。

また、骨芽細胞分化誘導後の石灰化について、アリザリンレッド染色およびvon Kossa染色を用いて評価した。健常の細胞では、骨芽細胞分化誘導培地で培養を開始してから2週間程度でアリザリンレッド染色、von Kossa染色いずれにおいても陽性を示した。HPP患者由来の細胞では3週間培養しても石灰化は認められなかったのに対し、変異を修復したiPS細胞では分化誘導後3週間程度で、健常よりは弱いもののアリザリンレッド染色、von Kossa染色において染色を認めた。

以上の結果より、本研究によって、c.1559delT変異をもつHPP患者の石灰化不全モデルの作製に成功し、片側アレルにおける変異修復によって、表現型が改善されることが示された。

HPP患者由来iPS細胞では、ALPの酵素活性が極めて低く骨芽細胞分化も認められなかったことから、骨芽細胞分化におけるALPの重要性が確認された。一方で、ゲノム編集でヘテロ接合性変異となった細胞では骨芽細胞分化と石灰化が認められた。c.1559delT変異は日本人患者において4割以上を占めることから、今後遺伝子治療あるいは再生医療への応用も期待される。

しかし健常人由来の細胞と比較した場合、片側アレルのみ変異修復を行った細胞ではALP活性は有意に低かった。また石灰化は遅く、程度も低いことが明らかとなった。これはつまり、*ALP*遺伝子量（およびその酵素活性）と骨芽細胞への分化誘導効率には有意な相関が存在していると解釈することができる。したがって、今後はこれらの疾患モデル細胞を、*ALPL*遺伝子の量に依存した骨芽細胞分化への影響や、HPPの病態メカニズムの解析に利用することができると考えられる。

実際の臨床症例において、ヘテロ接合性変異を有する保因者（キャリア）では、血清ALPの軽度の低値が認められるが、HPPの徴候は認めず、無症状か軽い症状を認めるのみにとどまっていることと、今回1アレルのみの修復で石灰化がみられたことは矛盾しない。しかしながら、この1アレルのみの変異修復株で、骨芽細胞のALP活性や石灰化レベルが健常の細胞に比べて低い原因としては、*ALPL*遺伝子を修復した細胞と健常児細胞では由来する患者が異なるために遺伝子背景に違いがあるということ、あるいは、今回の誘導骨芽細胞の石灰化過程が生体内での石灰化を十分には反映していない可能性の二つが挙げられる。これらの疑問を解決するためには、HPP患者由来iPS細胞において*ALPL*遺伝子の両アレルでの変異修復を行い、ALPの酵素活性や石灰化について評価することや、三次元培養やオルガノイドなどを用いて生態内環境により近い条件で骨芽細胞分化を行い、さらに骨という組織が作り上げられていく過程をとらえることが必要と考えられる。

HPPでは乳歯の早期脱落などの歯および口腔内の症状も認められる。その病態機構の理解は不十分であり、効果的な治療法はいまだ存在しない。また、酵素補充で長期生存が可能になった周産期重症型の歯についてもまだわかっていないことが多い。近年間葉系幹細胞を用いた歯槽骨や歯の組織の再生療法について、さまざまな研究が行われており、今後治療への応用も期待されている。しかし、間葉系幹細胞の増殖能や多分化能は培養中に低下しやすく、必要な細胞数の確保が困難であるという欠点がある。本研究において変異修復を行った疾患iPS細胞を間葉系幹細胞に分化させることに成功したことから、本手法を歯科領域に利用することにより、より簡便に理想の細胞数を得られるだけでなく、同時にHPPにおける歯の病態の解明にも用いることが可能となると考えられる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　中野　知帆　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷　幹彦
	副 査	教授	仲野　和彦
	副 査	准教授	中澤　敬信
	副 査	講師	村上　智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、低ホスファターゼ症における石灰化不全の病態を再現する疾患モデルの構築を目的とし、同疾患の患者由来 iPS 細胞に対し TALEN を用いて原因となる遺伝子変異を修復し、これらを骨芽細胞分化誘導してその ALP の活性や石灰化能の変化について検討したものである。

その結果、低ホスファターゼ症患者由来の細胞では ALP 活性は低く、石灰化も認められなかったのに対し、変異修復を行った細胞では、ALP 活性は上昇し、石灰化も確認された。

以上の結果は、本研究において作製された病態モデルおよび変異修復モデルが、今後低ホスファターゼ症における、より深い病態メカニズムの解析などへの応用が期待できることを示唆するものであり、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。