



Title	4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts
Author(s)	武鎧, 真司
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/81892
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

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	武鑑 真司
論文題名 Title	4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts (4-フェニル酪酸は骨形成不全症患者由来iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞の石灰化を促進する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 骨形成不全症 (OI) は主にCOL1A1、COL1A2遺伝子変異により骨脆弱性をきたす疾患である。対症療法としてビスホスホネート製剤による治療が行われているが、重症例に対する効果は限定的である。4-フェニル酪酸 (4-PBA) はOIゼブラフィッシュモデルに対して効果を示し、新規治療薬として期待される薬剤である。OI患者由来の細胞を用いて、OIの病態解析と4-フェニル酪酸の効果を検討することを目的とする。 〔方 法(Methods)〕 COL1A1あるいはCOL1A2遺伝子変異を同定したOI患者6例 {グリシン置換変異2例、ナンセンス変異1例、エクソンスキップ変異3例} から、皮膚線維芽細胞を採取し、健常者由来線維芽細胞3株と比較して実験を行った。小胞体 (ER) 内へのI型コラーゲン蓄積の程度を蛍光免疫染色によって評価した。I型コラーゲンの遺伝子発現をRT-qPCRで、蛋白量をELISAで評価した。細胞から分泌されたI型コラーゲンの電気泳動パターンをSDS-PAGEで、翻訳後修飾をLC-MSで評価した。I型コラーゲンのらせん構造の異常をCollagen Hybridizing Peptideで検出した。線維芽細胞からiPS細胞を作成し、iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞での石灰化能をアリザリンレッド染色とCa定量により評価した。上記の実験で4-PBAの効果を検討した。 〔成 績(Results)〕 グリシン置換変異とエクソンスキップ変異のOIの線維芽細胞ではプロコラーゲンの過剰なERへの蓄積がみられ、4-PBAによって蓄積が減少した。I型コラーゲンの遺伝子発現、蛋白量はともにグリシン置換変異のOIで増加しており、4-PBAによっていずれも減少した。分泌されたI型コラーゲンの電気泳動パターンはグリシン置換変異のOIで健常より幅の広いバンドがみられ、LC-MSではリジンの糖鎖過修飾がみられたが、4-PBAによる変化はみられなかった。OI由来のI型コラーゲンにはらせん構造の異常が検出され、4-PBAによって異常が減少した。誘導骨芽細胞の石灰化能はグリシン置換変異のOIで低下しており、4-PBAの添加によって石灰化能が改善した。 〔総 括(Conclusion)〕 従来、I型コラーゲンの質に異常があるとされてきたグリシン置換変異のOIはI型コラーゲンの量の異常も有する可能性がある。4-PBAは過剰なI型コラーゲンの産生を抑制することでER内のI型コラーゲンの蓄積を減少させることに加えて、らせん構造を改善させることで石灰化能を促進させる可能性がある。我々はOIの治療薬として4-PBAの国内特許を2018年に取得しているが、4-PBAは既に他の疾患に対して臨床応用されているため、OIの新規治療薬として期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			武鑑 真司
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	大 園 東 一
	副 査	大阪大学教授	藤 井 孝
	副 査	大阪大学教授	池 田 雄 次
論文審査の結果の要旨			
申請者は主にI型コラーゲン(Col I)の変異により骨脆弱性をきたす疾患である骨形成不全症(OI)について、患者由来細胞を用いた病態解析と4-フェニル酪酸(4-PBA)の効果を検討した結果を論文として発表した。方法は、遺伝子変異を同定したOI患者6例の皮膚線維芽細胞を採取し、Col Iの小胞体(ER)内への蓄積を蛍光免疫染色で、遺伝子発現をRT-qPCRで、蛋白量をELISAで評価、分泌されたCol Iの電気泳動パターンをSDS-PAGEで、翻訳後修飾をLC-MSで評価、Col Iのらせん構造の異常をCollagen Hybridizing Peptideで検出した。線維芽細胞からiPS細胞を作成し、iPS細胞から分化させた骨芽細胞の石灰化能をアリザリンレッド染色とCa定量で評価した。上記の実験で4-PBAの効果を検討した。結果は、OIでは過剰なER内蓄積がみられ、4-PBAは蓄積を減少させた。遺伝子発現、蛋白量は共にグリシン置換変異のOIで増加しており、4-PBAにより減少した。SDS-PAGEではグリシン置換変異のOIで幅の広いバンドがみられ、LC-MSでは糖鎖過修飾がみられたが、4-PBAによる変化はなかった。OIではらせん構造の異常が検出され、4-PBAにより検出シグナルは減少した。石灰化能はグリシン置換変異のOIで低下しており、4-PBAにより改善した。考察として、従来、Col Iの質に異常があるとされてきたグリシン置換変異のOIは量の異常も有する可能性があり、4-PBAは過剰なCol I産生を抑制することで石灰化能を改善させる可能性があること、4-PBAはすでに他の疾患に対して臨床で使用されており、OIの新規治療薬として期待されることを述べた。以上の論文を審査した結果、学位に値するものと認める。			