



Title	低ホスファターゼ症患者由来iPS細胞を応用した象牙芽細胞の機能異常の解明
Author(s)	野添, 彬
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95981
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 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 (野添 彬)

論文題名

低ホスファターゼ症患者由来iPS細胞を応用した象牙芽細胞の機能異常の解明

論文内容の要旨

【緒言】

低ホスファターゼ症 (HPP) は *ALPL* 遺伝子の病的バリエーションにより組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP) の欠損によって引き起こされる遺伝性骨系統疾患である。骨や歯の低石灰化や4歳未満での乳歯の早期脱落が主症状として出現するのがHPPの特徴である。年齢や重症度の違いにより異なる臨床症状を呈し、現在6病型に分類されている。6病型のうち、歯にのみ症状が現れる歯限局型HPPと呼ばれる病型が存在する。乳歯の早期脱落の原因はセメント質の形成不全と知られており、その形成には歯根象牙質最外層の外殻象牙質の石灰化が必要であるとされる。HPP患者では乳歯の外殻象牙質に限定した低石灰化があることはすでに報告されているが、そのメカニズムまでは分かっていない。また象牙質の低石灰化や低形成により歯根の短小化、歯髓腔の拡大、象牙質の菲薄化を伴う。このような象牙質の異常が起こることで、齶蝕抵抗性や歯質強度の低下、歯根吸収のリスクが増加する可能性が考えられる。そこで本研究ではHPPの象牙質に生じる病態からHPPの口腔内特有に生じる異常のメカニズムの解明を行うことを目的とした。はじめに健常人由来iPS細胞を用いた象牙芽細胞様細胞 (ODs) への分化誘導実験を行った。次にHPP患者由来iPS細胞に対してゲノム編集技術を応用し、病的バリエーションを健常型まで修復したiPS細胞とさらにその細胞に対して歯限局型HPPと診断された病的バリエーションを変異導入したiPS細胞を作製した。それぞれのHPP患者由来iPS細胞をODsへの分化誘導実験を実施し、HPPの象牙質の分化能、石灰化能、細胞極性についてHPPの病型ごとに比較検討を行った。

【方法】

健常人3人の皮膚線維芽細胞もしくは臍帯血単核球から樹立したiPS細胞から神経堤細胞を経由して分化した間葉系幹細胞 (MSC) を用いて、ODsへの誘導を行った。また、同一のiPS細胞から分化したMSCを分化誘導した骨芽細胞様細胞 (OBs) を比較として用いた。それぞれ21日間分化誘導したのちに遺伝子発現をReal-time quantitative PCR、タンパク質発現をウェスタンブロッティング法、ALP活性の評価をALPラボアッセイキットおよびALP染色、石灰化の評価をアリザリンレッド染色およびメタロアッセイカルシウムで評価した。細胞突起計測のために4日間分化培養し、蛍光免疫染色後に共焦点レーザー顕微鏡で撮影を行った。さらに分化後の細胞形態を評価するために、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った。

周産期重症型HPP (c. 1559delT/c. 1559delT: Perinatal) 患者由来のiPS細胞に関してはCRISPR-Cas9 systemを用いて、病的バリエーションを修復したiPS細胞 (WT/WT: Rescued) を作製した。さらに、Rescued-iPS細胞に歯限局型HPPと診断された病的バリエーションをPrime editingを用いて変異導入を行い、歯限局型HPP-iPS細胞モデル (c. 550C>T: Odonto) を作製した。それぞれ作製したアイソジェニックなHPP-iPS細胞をODsまで21日間分化培養を行い、比較検討を行った。

【結果】

健常人由来ODsでは象牙芽細胞の分化マーカーとして用いられるDSPP、NESのタンパク質発現増加を確認した。細胞極性を示すマーカーである *MAPT* や *NEFL* 遺伝子の発現が健常人由来OBsと比較して、ODsのほうが増加した。また健常人由来ODsは象牙芽細胞の特徴である一方向に細胞突起を伸長する形態を蛍光免疫染色とSEMにて確認できた。健常人由来OBsとODs両細胞ともに経時的にALP活性と石灰化結節の増加を認めた。

ゲノム編集を行ったHPP-iPS細胞のALP活性を確認し、Rescued-iPS細胞は健常人由来iPS細胞と同等レベルまでALP活性が回復し、Odonto-iPS細胞ではALP活性がPerinatal-iPS細胞より改善するもののRescued-iPS細胞より低下したことを確認した。

HPP患者由来iPS細胞から分化させたODsについて、Perinatal-ODsではALP活性の経時的な増加は認めなかった。

Odonto-ODsとRescued-ODsは経時的にALP活性の増加を認めたが、Odonto-ODsと比較しRescued-ODsのほうが著しく増加した。Perinatal-ODsとOdonto-ODsと比較し、Rescued-ODsではDSPP、NESのタンパク質発現が増加した。石灰化能について、

Perinatal-ODsでは21日間分化培養しても石灰化を認めなかった。Rescued-ODsは分化開始から14日目で石灰化陽性を認めた。Odonto-ODsは分化開始から21日目で石灰化陽性を認めたが、Rescued-ODsと比較するとその開始は遅れる結果となった。蛍光免疫染色で細胞突起形成能を確認するために細胞突起の長さを計測したところ、Perinatal-ODsやOdonto-ODsの細胞突起の長さはRescued-ODsの細胞突起と比較し短くなる結果となった。さらに細胞極性マーカーの遺伝子発現を評価すると、*MAPT*はRescued-ODsで高く発現した一方で、*NEFL*はOdonto-ODsで高いことが分かった。さらにOdonto-ODsで高く発現した*NEFL*に対してsiRNAを用いてノックダウンをすると、細胞突起の長さが改善する結果を得た。

【考察】

健常人由来iPS細胞から象牙芽細胞に近似した細胞を*in vitro*で誘導することに成功した。またHPP患者由来iPS細胞に対してゲノム編集を行い、それぞれの病型を再現することができた。Odonto-iPS細胞に導入したc. 550C>Tの病的バリエーションは、ドミナントネガティブ効果によりALP残差活性を低下させることが知られている。今回ゲノム編集技術を応用して作製したHPP患者由来iPS細胞でも、その効果を反映する結果を得ることができた。HPP患者由来iPS細胞から分化させたODsはALP活性に依存して石灰化能が回復した。しかし細胞突起の長さはRescued-ODsと比較し、Perinatal-ODsおよびOdonto-ODsでは細胞突起の長さは短いままであり、これらの結果はALP活性非依存的な病態を示した。*NEFL*とは、中間径フィラメント（IF）に属する細胞骨格を制御するマーカーとして知られており、アクチンフィラメントや微小管（MT）と比較し、自身に極性はない。IFはアクチンフィラメントやMTと相互作用が働くことで細胞の極性や細胞接着をコントロールしており、それぞれの相互作用のバランスが細胞骨格の維持に重要である。*NEFL*が過剰発現することで、産生された*NEFL*タンパクが核の周囲に蓄積することで、軸索の萎縮のような細胞極性の制御異常が起こることが報告されている。Odonto-ODsにおける*NEFL*の高い発現によって、*NEFL*タンパクの蓄積による細胞骨格の萎縮が生じ、結果として細胞極性を下方制御している可能性が考えられる。この*NEFL*の高い発現という結果は、c. 550C>Tの病的バリエーションを有する歯限局型HPPに他のHPPの病型とは異なる特有の病態が存在する可能性を示し、それは象牙芽細胞のような極性を特徴に持つ細胞に影響を及ぼす可能性を示唆した結果となった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (野 添 彬)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 田中 晋
	副 査	教授 山城 隆
	副 査	准教授 大川 玲奈
	副 査	講師 山下 元三
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、低ホスファターゼ症 (HPP) 患者由来 iPS 細胞を用いて、ゲノム編集技術を応用して作製した健常型、周産期重症型、歯限局型 HPP 細胞モデルを象牙芽細胞様細胞へ分化誘導し、その分化能、石灰化能、細胞極性について比較検討を行った。</p> <p>その結果、歯限局型 HPP 細胞モデルは ALP 活性に依存する石灰化能を示す一方で、他のモデルとは異なり <i>NEFL</i> の過剰発現により細胞骨格の制御に異常をきたしていることが示唆された。</p> <p>以上の結果は歯限局型 HPP の原因遺伝子を含めた HPP の病態解明に寄与するものであり、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。</p>		