



Title	Complex intrinsic abnormalities in osteoblast lineage cells of X-linked hypophosphatemia: Analysis of human iPS cell models generated by CRISPR/Cas9-mediated gene ablation
Author(s)	中西, 達郎
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98631
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.
Note	

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	中西 達郎
論文題名 Title	Complex intrinsic abnormalities in osteoblast lineage cells of X-linked hypophosphatemia: Analysis of human iPS cell models generated by CRISPR/Cas9-mediated gene ablation (X連鎖性低リン血症性くる病の骨芽細胞系列における複合的異常:CRISPR/Cas9を用いた遺伝子破壊により作製したヒトiPS細胞モデルの解析)
論文内容の要旨	
〔目 的〕	
<p>X連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) は成熟骨芽細胞/骨細胞に発現する<i>phosphate regulating endopeptidase homolog X-linked (PHEX)</i> 遺伝子の機能喪失を原因とする疾患である。骨からの線維芽細胞成長因子23 (fibroblast growth factor 23: FGF23)の過剰産生が低リン血症およびビタミンD代謝の異常を引き起こすが、XLHの病態形成機構の全容は明らかになっていない。XLHの研究にモデルとして広く使用されてきた<i>Phex</i>を欠損マウス (<i>Hyp</i>マウス)の骨芽細胞/骨細胞においては、FGF23の過剰産生に加えて、さまざまな遺伝子の発現が変化している。このことは、<i>Hyp</i>マウスの病態形成に骨芽細胞系列細胞の複合的な異常が関与していることを示唆するが、ヒトXLHにおいても同様の機序が共有されているかどうかについては不明であり、その理由の一つとして、XLH患者の骨組織から解析に十分な量の骨芽細胞/骨細胞を得ることが困難であることが挙げられる。そこで、本研究においては、ヒトXLHにおける骨芽細胞系列細胞の内在的異常を明らかにすることを目的として、健康男性由来人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSCs) にゲノム編集を適用して<i>PHEX</i>欠損iPSCsを樹立し、<i>PHEX</i>以外は遺伝的に同質 (isogenic)なコントロールiPSCsと共に骨芽細胞系列に分化誘導して解析した。</p>	
〔方法ならびに成績〕	
<p>健康男性臍帯血由来iPSCs株である610B1細胞にCRISPR/Cas9による遺伝子破壊を適用することにより、<i>PHEX</i>欠損iPSCsを樹立した。具体的には、<i>PHEX</i>遺伝子のExon1と3をそれぞれ標的とする2つの合成シングルスガイドRNAをリコンビナントCas9タンパク質と共に610B1に導入し、<i>PHEX</i>欠損iPSCsを2クローン樹立した。樹立した<i>PHEX</i>欠損iPSCsとisogenicなコントロール細胞を、βグリセロリン酸やデキサメサゾン、アスコルビン酸、レチノイン酸を含む骨芽細胞系列への分化培地を用いて49日間培養したところ、コントロールiPSCsにおいては<i>PHEX</i>発現が経時的に増加したが、<i>PHEX</i>欠損iPSCsにおいては分化誘導後も機能的な<i>PHEX</i>転写物を欠損していた。いずれの細胞においても、骨芽細胞分化のマスター転写因子であるRUNX2の発現はDay 28にピークを示した。FGF23の産生は、<i>PHEX</i>欠損iPSCs由来骨芽細胞系列細胞で増加していた。興味深いことに<i>PHEX</i>欠損 iPSCs由来骨芽細胞系列細胞においてはアリザリンレッドによる染色性の増加、ハイドロキシアパタイト蓄積量の増加を認め、腎臓との相互作用が排除されリン供給が充分な<i>in vitro</i>条件下においては<i>PHEX</i>欠損はむしろ石灰化を促進しうることが示唆された。<i>PHEX</i>欠損 iPSCs由来骨芽細胞系列細胞においては石灰化阻害物質である細胞外ピロリン酸の蓄積を認め、組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue non-specific alkaline phosphatase: TNSALP) の活性低下と関連していた。Ⅲ型ナトリウム/リン酸共輸送担体Pit1が減少しており、細胞外無機リン酸の増加を介して石灰化亢進に寄与したことが推察された。また、<i>PHEX</i>欠損 iPSCs由来骨芽細胞系列細胞においてはRUNX2、OPN、DMP1、FGFR1、EGR1の発現が亢進しており、これらは<i>Hyp</i>マウスの骨芽細胞/骨細胞における遺伝子発現変化と一致していた。さらに、<i>PHEX</i>欠損iPSCs由来骨芽細胞系細胞においては、CREBのリン酸化が亢進しており、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (parathyroid hormone related protein: PTHrP) の発現増加に基づくことが示唆された。また、<i>PHEX</i>の欠損はTNSALPコード遺伝子<i>ALPL</i>の細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性を変容させた。</p>	
〔総 括〕	
<p>XLHの病態形成には、FGF23の過剰産生に加えて、骨芽細胞系列細胞の複合的な異常が関与していることが示された。<i>PHEX</i>欠損iPSCs由来骨芽細胞系列細胞で認められた<i>in vitro</i>石灰化の亢進は、XLHの合併症である異所性骨化を想起させる。また、<i>PHEX</i>欠損がPTHrPの発現増加、CREBのリン酸化亢進をもたらすことが明らかとなり、このことがRUNX2をはじめ、種々の遺伝子発現の変化をきたした可能性が推察される。本研究で得られた知見は、今後、XLHの新たな治療戦略の開発の一助となると期待される。</p>	
(1930字)	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		中西 達郎	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	北島 康司
	副 査	大阪大学教授	妻木 乾行
	副 査	大阪大学教授	下村 博一郎

論文審査の結果の要旨

X連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) は骨芽細胞/骨細胞に発現するPHEX遺伝子の機能喪失に基づき、FGF23過剰産生により低リン血症をきたす。一方、*Phex*欠損マウス由来骨芽細胞/骨細胞の解析からは、FGF23の腎臓作用以外の病態形成機構も関与している可能性が示唆されていた。しかし、ヒト骨組織から解析に十分な骨芽細胞/骨細胞を得ることは困難である。そこで、本研究においては、健常男性由来iPS細胞にCRISPR/Cas9システムを適用してPHEX欠損細胞を樹立し、骨芽細胞系列に分化誘導して解析した。その結果、*in vitro*石灰化能の亢進、CREBリン酸化の増強、SIBLING蛋白質の発現増加など、PHEX欠損骨芽細胞系列細胞における複合的な内在性異常が明らかになった。本研究の成果は、XLHの新規病態形成機構を提示し、有効性の高い治療戦略の開発の一助となり得る。よって、学位の授与に値すると考える。

(405字)