

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17385

研究課題名(和文) 胎児治療による低フォスファターゼ症に対する新たな治療戦略の創成

研究課題名(英文) Development of a novel fetal therapy in Hypophosphatasia

研究代表者

長谷川 瑛洋 (Akihiro, Hasegawa)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：20839055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：周産期型低フォスファターゼ症は胎児期より全身性骨化障害を生じる遺伝性疾患である。酵素補充療法(Enzyme Replacement Therapy; ERT)により全身の骨化や呼吸障害が改善するが、出生前には治療を開始できないため、疾患モデルマウスを用いて出生前経母体的ERTと酵素分泌遺伝子を高発現させた間葉系間質細胞の胎児移植による新規治療法の開発を行った。出生前酵素補充療法の仔マウスへの効果は限定的であったが、経母体的投与の安全性を確認できた。胎児への細胞移植では間葉系幹細胞における移植に成功したが、仔マウスの症状改善には至らなかった。酵素分泌量や移植細胞数、移植経路などが今後の課題となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期型低フォスファターゼ症に対する出生前経母体的酵素補充療法と酵素分泌遺伝子を高発現させた間葉系間質細胞の胎児移植による新規治療法の開発を行った。出生前酵素補充療法の効果は限定的であったが、経母体投与の安全性を確認できた。今後臨床的な適応に向けては更なる研究が必要と考えられる。また胎児への細胞移植では間葉系幹細胞における移植に成功したが、仔マウスの症状改善には至らなかった。胎児への細胞移植により長期的な効果が期待できること、治療による侵襲度を軽減できる可能性があること、また免疫寛容を誘導することで免疫抑制剤の使用なく、投与した細胞を生着させることができる可能性が十分にある。

研究成果の概要(英文)：Perinatal hypophosphatasia (HPP) is a genetic disorder that causes systemic ossification disorders beginning in utero. Enzyme Replacement Therapy (ERT) improves ossification impairment and respiratory insufficiency, however ERT cannot be initiated prenatally. Therefore, we attempted to develop a novel fetal therapy by prenatal ERT and in utero transplantation of mesenchymal stromal cells expressing high levels of enzyme-secreting genes in a HPP model mouse. Although the effect of prenatal ERT on the pups was limited, the safety of trans-maternal administration was confirmed. In utero cell transplantation into murine fetuses was successful, however, it did not improve the symptoms of the HPP pups. The amount of enzyme secretion, the number of transplanted cells, and the transplantation route are future issues.

研究分野：胎児治療、周産期医学

キーワード：低フォスファターゼ症 胎児治療 子宮内幹細胞移植 TNSALP ES細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症(Hypophosphatasia; HPP)は胎児診断可能であるが、現在治療方法が確立していない疾患である。HPPは *Alkaline Phosphatase, Liver(ALPL)* 遺伝子変異により Tissue non-specific alkaline phosphatase(TNAP)活性の低下を認め、全身骨の低石灰化、四肢短縮などを引き起こす。その中でも胸郭低形成に続く肺低形成により出生後に新生児死亡に至ることもあり、集学的な治療を要する。治療法として TNSALP 酵素補充療法(Enzyme Replacement Therapy; ERT)により全身の骨化障害や呼吸不全が改善するという報告がされたものの、出生前には治療を開始することができず、また1週間に3回または6回の皮下投与を行い、かつ一生涯の投与を要し、患者への侵襲度が高いことが問題となっている。このため、より早期からの治療介入を可能とし、より侵襲度の低い治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

我々は HPP 疾患モデルである *Akp2* ノックアウトマウスを用いて2つの治療法の開発を行った。(1) 出生前経母体的酵素補充療法では子宮内から進行する症状に対して、経胎盤的に治療を行うことで、出生前酵素補充療法の治療効果と母体安全性について検討を行った。

(2) 子宮内細胞移植法では、*ALPL* を高発現させた間葉系間質細胞の子宮内細胞移植による治療効果についての検討を行った。子宮内細胞移植では長期的な効果を期待できるだけでなく、免疫寛容を誘導できる可能性があり、免疫抑制剤の使用なく、投与した細胞が生着できる可能性が十分にある。その場合は生着した細胞と同じドナー細胞を用いることで、生後でも拒絶されない同種移植を繰り返し施行できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 出生前酵素補充療法 研究デザイン

母体解析のために、出生前 ERT 群と対照群を用意した。出生前 ERT 群では、胎生日(E) 11.5~14.5 に妊娠した *Akp2*^{+/+}ヘテロ接合体マウスの後頸部に、遺伝子組換え TNAP を皮下投与した。対照群には、同じ胎生日から出産までの期間にリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)を *Akp2*^{+/+}ヘテロ接合体マウスに皮下投与した。

生後19日目の仔マウスの解析には、*Akp2*^{+/+}マウス、未治療 *Akp2*^{-/-}マウス、*Akp2*^{-/-}マウスに出生前および出生後に ERT を施行した群(出生前 ERT 群)、*Akp2*^{-/-}マウスに出生後に ERT を施行した群(出生後 ERT 群)の4群を用意した。出生前 ERT 群では、*Akp2*^{+/+}雄と交配した妊娠中の *Akp2*^{+/+}ヘテロ接合体母マウスに、E11.5-14.5 の段階から E18.5 まで遺伝子組換え TNAP を投与し(皮下注射、8.2 mg/kg/day) その母体より出生した *Akp2*^{-/-}仔マウスに生後18日目まで酵素補充(皮下注射、8.2 mg/kg/day)を行った。出生後 ERT 群では、*Akp2*^{+/+}ヘテロ接合体母マウスには酵素投与を行わず、*Akp2*^{-/-}仔マウスに生後18日目まで酵素補充(皮下注射、8.2 mg/kg/day)を行った。Asfotase alfa(遺伝子組換え TNAP)は Alexion Pharmaceuticals 社から購入した。

(2) 血清アルカリホスファターゼ(Alkaline Phosphatase; ALP)活性測定

出生前 ERT 群と対照群の母マウスでそれぞれ第0日目と第3日目に尾静脈から、離乳後は下大静脈から採血を行った。仔マウスについては、*Akp2*^{+/+}マウスおよび出生前 ERT 群 *Akp2*^{-/-}マウス、出生後 ERT 群 *Akp2*^{-/-}マウスは生後19日目に採血し、未治療 *Akp2*^{-/-}マウスの血液サンプルは生後17-19日目に採血し、血清 ALP 活性を計測した。

(3) μ CT 解析および組織学的解析

治療を行った *Akp2*^{+/+}マウスより大腿骨を摘出し、 μ CT を用いて皮質骨・海綿骨・総骨の密度、皮質骨面積、皮質骨の厚さ、最小慣性モーメントの撮像を行った。組織学的解析では、出生前 ERT 群、対照群の母マウスの後頸部の皮膚を、離乳後に採取した。母体マウスの皮膚は HE 染色で、仔マウスの大腿骨 H&E 染色、アルシアンブルー染色、ALP 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

(4) ES 細胞由来間葉系間質細胞への遺伝子導入

ES 細胞間葉系間質細胞へ骨親和性 TNAP(TNSALP-D10)を搭載したレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。EGFP をマーカーとして感染効率を確認した。

(5) 子宮内細胞移植

Akp2^{+/-}ヘテロ接合体妊娠マウスの胚発生日(E)11.5~14.5日目に *ALPL* を高発現させた細胞を子宮内の胎児へ移植した。*Akp2*^{+/-}ヘテロ接合体妊娠マウスの胚発生日(E)11.5~14.5日目にイソフルラン吸入麻酔ののちに、子宮内の胎仔の胎位を確認し、腹腔内または肝臓内移植を行った。腹腔内移植であれば胎仔肝臓直下に、肝臓内移植であれば胎仔肝臓に直接細胞懸濁液を5 μ L投与した。

(6) 子宮内細胞移植後の出生マウスの組織学的検査

子宮内細胞移植後に出生した *Akp2*^{+/-}マウスは生後0日目に腹部全体を採取し、HE染色並びにVimentin染色で鏡検した。

4. 研究成果

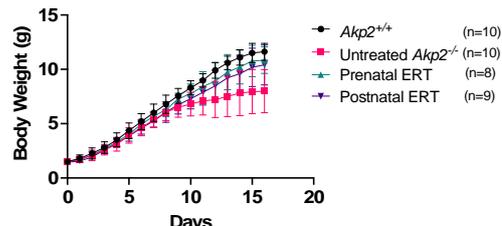
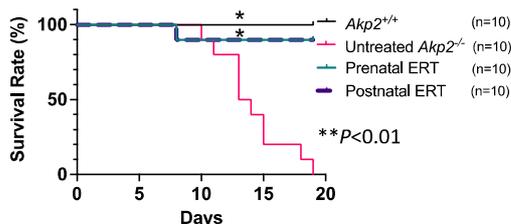
出生前酵素補充療法

(1) 母体の解析

注射部位の局所反応や異所性骨石灰化の有無、血清ALP活性の計測などから酵素補充療法による母体の安全性を評価した。出生前ERT群、対照群ともに母マウスの後頸部に局所反応や炎症所見を認めなかった。血清ALP活性は、出生前ERT群の母マウスで有意に上昇した。母体マウスの全身CTでは、異所性石灰化は認めなかった。

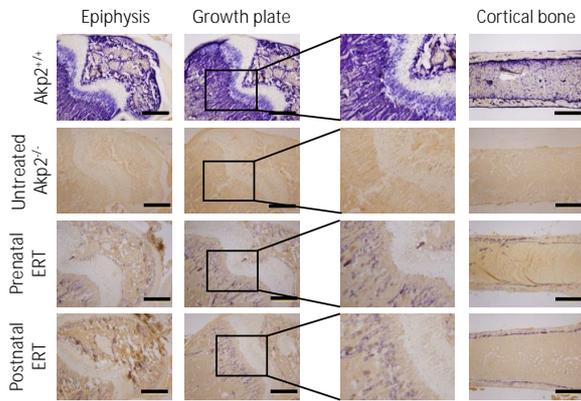
(2) 出生前および出生後のERT群での生存率、体重増加、血清ALP活性と大腿骨長

Akp2^{+/-}マウス群、出生前ERT *Akp2*^{+/-}マウス群、出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群、および未治療 *Akp2*^{+/-}マウス群を解析した。出生前および出生後のERT群の生存期間は、未治療 *Akp2*^{+/-}マウスと比較して有意に延長した($p < 0.01$)。 *Akp2*^{+/-}マウス群(100%)、出生前ERT *Akp2*^{+/-}マウス群(90%)、出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群(90%)のマウスは19日目まで生存した。一方、未治療 *Akp2*^{+/-}マウスは10日目から19日目の間にすべて死亡し、生存期間の中央値は13.5日であった。出生前および出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群の生後16日まで測定した成長曲線は、 *Akp2*^{+/-}マウス群の成長曲線と同程度であった。また出生前および出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群の生後16日目に測定された体重は、未治療 *Akp2*^{+/-}マウス群と比較して有意に改善した($p < 0.01$)血清ALP活性は、出生前および出生後ERT群 *Akp2*^{+/-}マウス群で未治療 *Akp2*^{+/-}マウス群よりも有意に高かった。血清ALP活性の平均値は以下の通りであった。19日目の *Akp2*^{+/-}マウス群: 343.5 U/L、19日目出生前ERT *Akp2*^{+/-}マウス群: 1298 U/L、19日目出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群: 1473 U/L、17日目~19日目の未治療 *Akp2*^{+/-}マウス群: 67.85 U/Lであった。生後19日目における出生前および出生後ERT群 *Akp2*^{+/-}マウスでは、生後17-19日目の未治療 *Akp2*^{+/-}マウスと比較し大腿骨長が改善された。



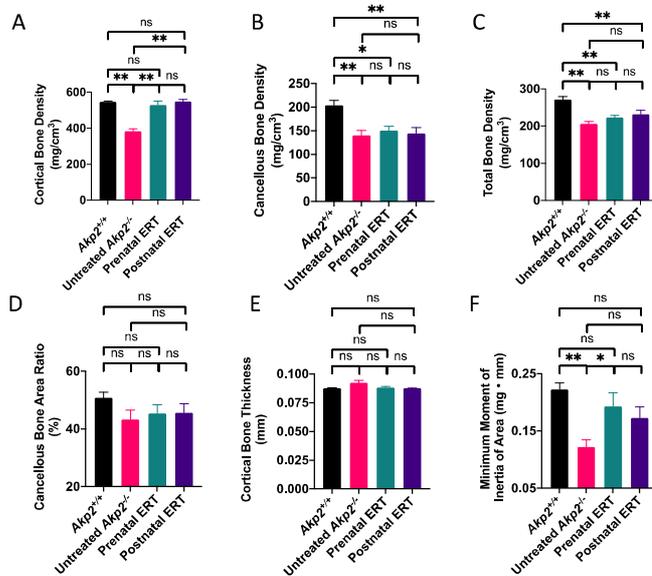
(3) 組織学的検査

生後19日目の *Akp2*^{+/-}マウス群、出生前ERT *Akp2*^{+/-}マウス群、出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウス群、生後17~19日目に未治療 *Akp2*^{+/-}マウス群において大腿骨骨端、成長板、皮質骨の組織学的解析を行った。未治療 *Akp2*^{+/-}マウスでは、大腿骨骨端の軟骨細胞の異常増殖と不規則な配列、及び長軸方向の骨端形成不全、不十分な二次骨化が見られた。 *Akp2*^{+/-}マウスの大腿骨の海綿骨および骨膜表面では強いALP活性が観察されたが、未治療 *Akp2*^{+/-}マウスの大腿骨ではALP活性は検出されなかった。一方で、出生前および出生後ERT *Akp2*^{+/-}マウスの大腿部の成長板および骨膜周囲にはALP活性が存在した。



(4) μ CTによる骨格形態の解析

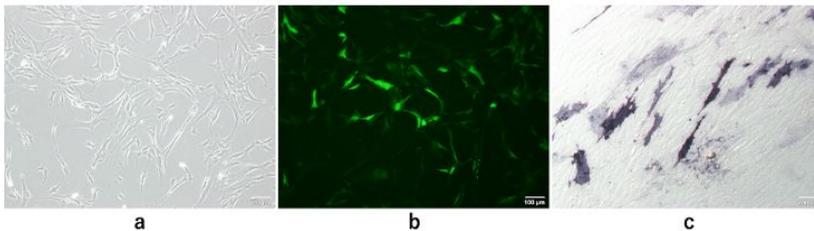
マウス大腿骨遠位端の成長板を基準に近位側の海綿骨を関心領域とし、 μ CTを撮像し、骨パラメーターについて評価した。未治療 $Akp2^{-/-}$ マウスでは不均一な皮質骨厚、成長板の構造異常、海綿骨密度の減少が観察された。出生前および出生後 ERT $Akp2^{-/-}$ マウス群は、未治療 $Akp2^{-/-}$ マウス群と比較し、皮質骨密度を有意に改善した。しかし、出生前および出生後 ERT は、海綿骨密度、総骨密度、皮質骨面積比および皮質骨厚を改善することができなかった（下図 A-E）。出生前 ERT $Akp2^{-/-}$ マウス群では、未治療 $Akp2^{-/-}$ マウス群と比較して最小二次極慣性モーメントを有意に改善したが、出生後 ERT $Akp2^{-/-}$ マウス群では、未治療 $Akp2^{-/-}$ マウス群と比較し有意な改善は得られなかった（下図 F）。



子宮内細胞移植法

(1) ALPL 高発現間葉系間質細胞の作成

ALPL-MSC の遺伝子導入効率は何 80% 程度であった（下図 a, b）。また TNAP タンパクの発現を確認するため ALP 染色を行ったところ紫色に染色され、同細胞より TNAP タンパクの発現を確認した（下図 c）。

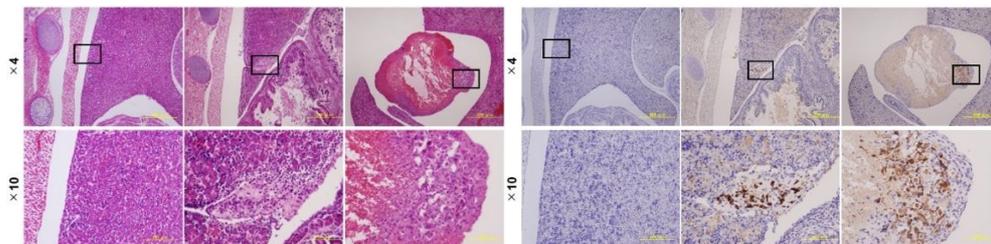


(2) 継代数毎の ALPL-MSC における ALPL 遺伝子発現量の比較

継代数毎の ALPL-*MSC* における ALPL 遺伝子発現量の比較のため qPCR を施行した。遺伝子導入前の *MSC*、ポジティブコントロールに設定した皮質骨・軟骨の初代培養細胞と比較し 15~30 倍の ALPL 発現を認めた。

(3) 新生児マウスへの移植細胞の生着確認

移植経路に応じた平均産仔率は、腹腔内移植では 22.4 %、肝臓内移植では 20.0 %であり統計学的有意差は認めなかった ($p=0.69$)。また生後 0 日目マウスの胸腹部をサンプリングし、HE 染色とビメンチン染色を行ったところ組織学的に検討を行い腹腔内移植では肝表面、肝臓内移植では肝臓内に *MSC* の生着を認めた。しかしながら胎仔マウスは数日以内で死亡し表現型の改善までには至らなかった。



低ホスファターゼ症に対する新規胎児治療法の開発

低ホスファターゼ症に対する新規胎児治療法として、出生前酵素補充療法と子宮内細胞移植法の2つに関して検討を行った。

出生前 ERT 群の母体マウスでは異所性石灰化は起こらなかった。出生前および出生後 ERT は、いずれも *Akp2*^{-/-}マウスの成長、生存率、骨の石灰化を改善した。しかし、出生前 ERT 群と出生後 ERT 群を比較した場合、マウスへの出生前追加投与の効果はわずかであると思われた。今後出生前 ERT のプロトコルのさらなる改善と長期的な観察が必要であると考えられる。

また ALPL を高発現させた *MSC* を用いて子宮内細胞移植を行った。移植経路に関しては腹腔内・肝臓内移植の両アプローチで細胞を生着させることに成功し、産仔率は同程度得られたが、どちらのアプローチも仔マウスの表現型の改善には至らなかった。酵素分泌量や移植細胞数、移植経路の検討などが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Akihiro, Nakamura-Takahashi Aki, Kasahara Masataka, Saso Nana, Narisawa Sonoko, Mill?n Jos? Luis, Samura Osamu, Sago Haruhiko, Okamoto Aikou, Umezawa Akihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Prenatal enzyme replacement therapy for Akp2?/? mice with lethal hypophosphatasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 168 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 The Intraperitoneal injection could optimize Engraftment and Survival in the Murine model of In Utero Mesenchymal Stem Cell Transplantation
2. 発表標題 Akihiro Hasegawa, Osamu Samura, Haruhiko Sago, Aikou Okamoto
3. 学会等名 The 74th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------