

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17333

研究課題名（和文）低ホスファターゼ症の治療薬としての小分子化合物の探索

研究課題名（英文）Investigation of small molecule compounds for hypophosphatasia

研究代表者

高橋 知男（Takahashi, Tomoo）

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：10624934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：低ホスファターゼ症（Hypophosphatasia, HPP）患者由来の間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、骨および軟骨分化だけでなく、DNA複製、細胞回転、核酸代謝（特に、RNA代謝）およびリボソーム生合成に関わる遺伝子群が優位に変動していた。また、細胞外マトリックス、胚発生、ケラチン代謝、骨格リモデリング、リラクシンシグナル伝達経路、およびWntシグナル伝達経路などのいくつかの生物学的プロセスへ関与していることも明らかにした。治療薬の標的となる経路はまだ同定できていないが、メタボローム解析結果と合わせて今後、さらに検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで重症HPPの間葉系幹細胞（MSC）および骨芽細胞（Ost）に関する網羅的遺伝子発現解析は国内外で行われていない。今回、HPPのMSCとOstが骨分化・軟骨分化以外の生物学的プロセスに関与していること、そして、ALPが細胞外で働く酵素として考えられていたが、ALPが多くの細胞内機能に影響を及ぼしていることを明らかにできたことはHPPだけでなくALPが関与する多くの疾患において学術的な意義が高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive genetic expression analysis using mesenchymal stem cells and osteoblasts derived from patients with hypophosphatasia (HPP) revealed that not only bone and cartilage differentiation, but also DNA replication, cell cycle, nucleic acid metabolism such as RNA metabolism and ribosome biosynthesis fluctuated. We also identified that genetic profile of HPP were involved in several biological processes including extracellular matrix, embryonic development, keratin metabolism, skeletal remodeling, relaxin signaling pathways, and Wnt signaling pathways. The target route of the therapeutic drug has not yet been identified, but we plan to further investigate it in the future together with the results of metabolome analysis.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：低ホスファターゼ症 間葉系幹細胞 遺伝子発現プロファイル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1．研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症（Hypophosphatasia, HPP）は、*TNSALP* 遺伝子変異によって、骨の石灰化障害をきたす疾患で、重症例は致死的な経過をとる。酵素補充療法の開始により骨の石灰化の回復を認め一定の効果がみられているが、正常な骨構造に達しない。本研究では、HPP 患者由来の間葉系幹細胞および骨芽細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析から幹細胞の機能や骨分化に関わる分子メカニズムを明らかにして、幹細胞の維持および骨分化の回復を促進する小分子化合物を探索することが目的である。本研究の成果により同定された小分子化合物は、HPP に対する根治療法の開発へつながるだけでなく、健常人が加齢により生じる骨粗鬆症に対する治療へも応用できる可能性が高い。

## 2．研究の目的

本研究では HPP 患者由来の間葉系幹細胞（MSC）および骨芽細胞（Ost）を利用して、網羅的遺伝子発現解析から stemness や骨分化に関わる分子メカニズムを明らかにして、stemness の維持や骨分化の回復を促す小分子化合物を探索する。

## 3．研究の方法

### a. MSCおよびOstのstemnessや骨分化に関わる分子メカニズムの同定

HPP 患者、HPP 保因者および健常人の MSC・Ost の網羅的遺伝子発現に関して、詳細な解析（Ontology analysis, Pathway analysis）を行う。また、HPP 患者から樹立した iPS 細胞から分化誘導した MSC および Ost に関して、網羅的遺伝子発現を行い、同様の解析を行う。遺伝子発現解析の結果、健常人と患者において stemness および骨分化に関わる優位差を認めた遺伝子を同定する。なお、これまでの研究でいくつかのターゲットとなる遺伝子を同定しているため、Ontology analysis/Pathway analysis の結果を踏まえて、候補遺伝子を絞り込む。

### b. HPP由来MSC・Ostの機能を回復する遺伝子の同定

HPP 由来 MSC や Ost は stemness や骨分化が低下しているため、候補遺伝子をノックダウンあるいは強制発現して、stemness および骨分化の機能が回復することを検討する。具体的な方法として、stemness はコロニー形成能、増殖能、遺伝子発現で、骨分化は MSC を骨分化誘導培地（Dex+ViC+ -GP）で培養後、免疫染色、ALP 活性、遺伝子発現および石灰化能で評価する。また、生体内での効果を示すために、HPP モデルマウス（当該研究室で飼育中）にウイルスベクターに搭載した候補遺伝子を投与して、骨の石灰化の回復や生存率の改善を確認する。

### c. 小分子化合物の探索

上記で同定した遺伝子に作用する小分子化合物をデータベースなどから探索する。候補小分子化合物のうち、

## 4．研究成果

- (1) HPP 患者 3 名の骨髄から培養した MSC および Ost を用いて、網羅的遺伝子発現をおこなった。Gene Set Enrichment Analysis( GSEA )を行なったところ、HPP-MSC で高発現している遺伝子群として、DNA 複製、動原体、ATPase 活性、cell cycle などに関与する遺伝子群を認めた( 図 1A, B )。また、低発現している遺伝子群として、骨形成、軟骨形成、type1 インターフェロン、インターフェロン などに関与する遺伝子群を認めた( 図 1C,D )。
- (2) HPP-Ost に関して、染色体分離、動原体などに関与する遺伝子群が高発現していた( 図 2A, B )一方、リボソーム合成、セリン代謝などに関与する遺伝子群が低発現していた( 図 2C, D )。

図 1 HPP-MSC の GO 解析

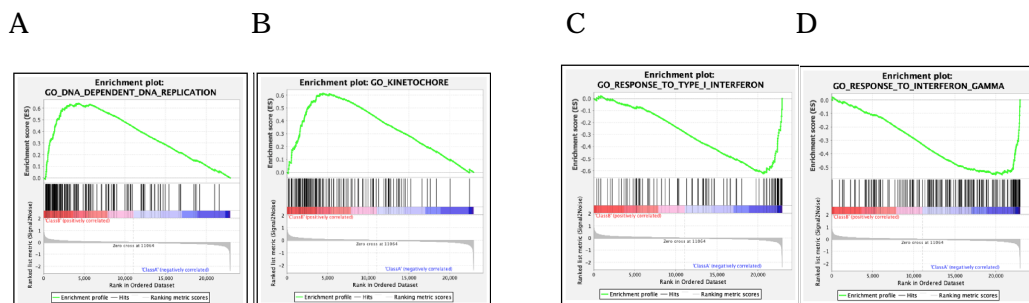
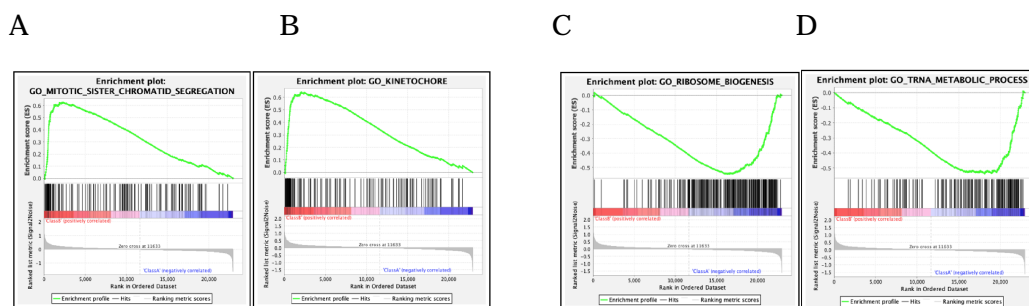


図 2 HPP-Ost の GO 解析



- (3) 次に、HPP-MSC のクラスター解析を行なったところ、初期のネットワーク解析は 1,259 遺伝子であった( 図 3 )。GO 解析を加えたクラスター解析では、核酸代謝( 特に、RNA 代謝 )およびリボソーム合成に関する遺伝子群が有意に変動していた( 図 4 )。次に、KEGG 経路解析では、低リン酸血症性くる病、先天性全身性脂肪異栄養症、家族性部分型脂肪異栄養症、および骨形成不全症という term が同定された( 図 5 )。これらを踏まえて、GO 分子機能の上位用語は、ビタミン D 受容体結合、成長因子結合、および細胞外マトリックス構成成分であった。遺伝子優先順位付け分析に関して、*MMP20*、*KRT6B*、*KRT81*、*KRT86*、*KRT83*、*KRT14*、*KCTD1*、*INIP*、*IL17RC*、および *SH3PXD2B* が明らかになった。これらの遺伝子は、細胞外マトリックス、胚発生、ケラチン代謝細胞、骨格リモデリング、リラクシンシグナル伝達経路、および Wnt シグナル伝達経路などのいくつかの生物学的プロセスに関与していた。

図 3 初期のネットワーク解析

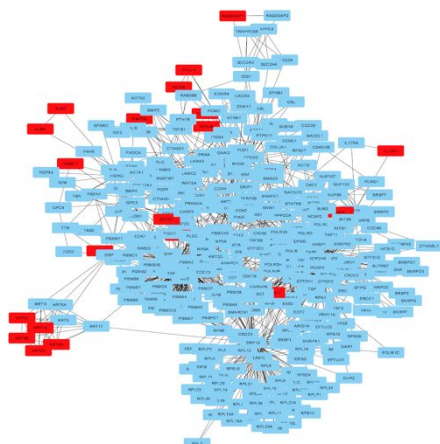


図 4 GO 解析を加えたクラスター解析

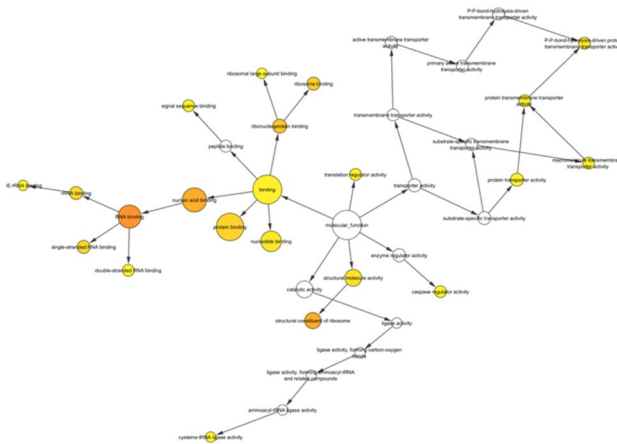
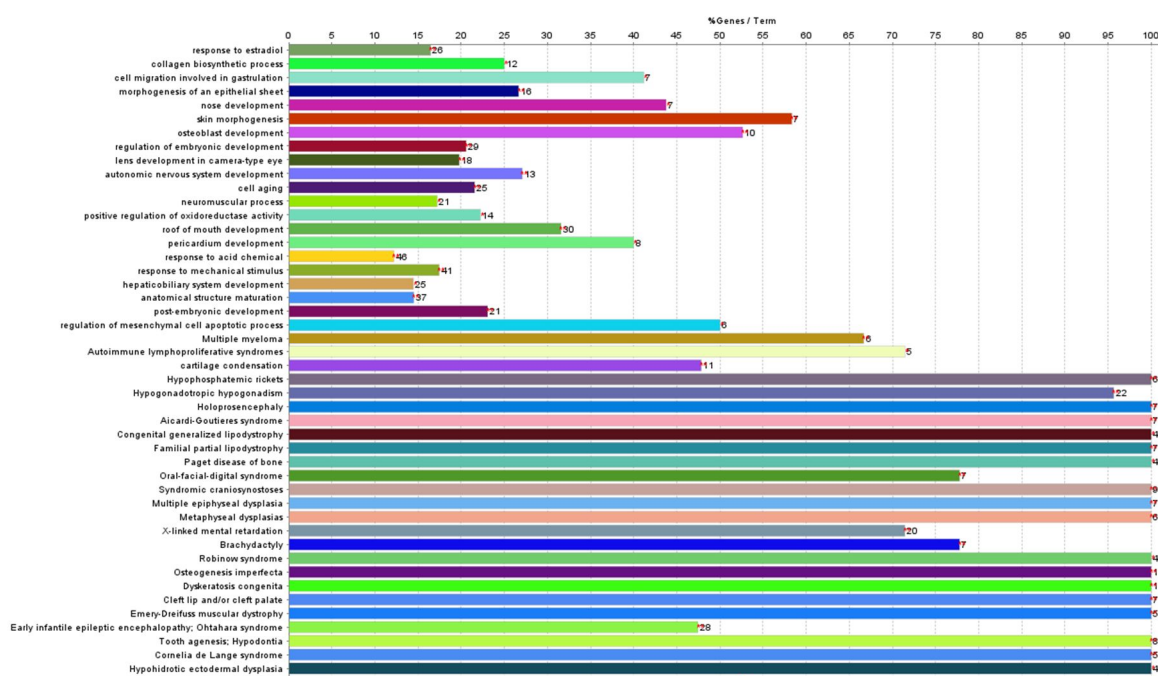


図 5 KEGG 経路解析



- (4) 上記の解析から候補遺伝子を選択して、shRNA で ALP をノックダウンした MSC を用いて、候補遺伝子をノックダウンあるいは強制発現して、stemness および骨分化の機能が回復するか検討した。stemness (コロニー形成能および増殖能) および骨芽細胞 (骨分化培地での骨芽細胞の分化および石灰化) を確認したが、現時点で、明らかに stemness および骨分化の機能を改善される遺伝子を同定できていない。しかし、pathway 解析で同定された核酸代謝に関与する遺伝子において、別途行っているメタボローム解析結果から同定された候補代謝産物が stemness および骨分化に影響を及ぼすことが明らかとなった。この候補代謝産物の生合成・分解に関与する遺伝子が MSC の機能を回復されるかどうか現在検討中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	竹谷 健  (Takeshi Taketani)	島根大学医学部小児科・教授	
研究協力者	宮本 憲一  (Miyamoto kenichi)	島根大学医学部生命科学講座・助教	

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
---------	---------