

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：19K19228

研究課題名（和文）低ホスファターゼ症関連歯周疾患に関するiPS細胞とゲノム編集技術を用いた病態解析

研究課題名（英文）Pathological analysis of periodontitis related Hypophosphatasia using human iPS cells and gene editing

研究代表者

中野 知帆（Nakano, Chiho）

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：30835856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低ホスファターゼ症患者由来のiPS細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導を行った。過去にヒトiPS細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法の報告はなく、既報のiPS細胞の骨芽細胞分化誘導法および間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化誘導法を組み合わせ、iPS細胞から神経堤細胞、間葉系幹細胞を経由して象牙芽細胞へと分化させる方法を試みた。その結果、健康人由来ヒトiPS細胞において、象牙芽細胞の特徴を有する細胞への分化誘導に成功した。また、HPP患者由来iPS細胞では、誘導後の石灰化が認められなかったのに対し、ゲノム編集でHPPの原因となる変異を修復したiPS細胞では誘導後、石灰化が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低ホスファターゼ症（HPP）は非常に稀な疾患で、乳歯の早期脱落はその主たる症状の一つとして知られる。他にも歯の形成不全など口腔内の症状が報告されているが、そのメカニズムは不明である。これらの口腔疾患の治療は歯の喪失を防ぐための予防が中心で、積極的な治療は存在しない。HPP患者の口腔疾患に対する理解を深めることが求められる。

本研究では健康人由来ヒトiPS細胞を用いて象牙芽細胞分化誘導を行い、その特徴を有する細胞を得ることに初めて成功した。またHPP患者由来疾患特異的ヒトiPS細胞を用いて象牙芽細胞石灰化不全の病態を再現し、今後のHPPにおける歯科的研究の足掛かりとなることができた。

研究成果の概要（英文）：Hypophosphatasia is a rare inheritable disease characterized by defective bone mineralization. Early exfoliation of primary teeth is the most frequent abnormality in patients with HPP, but it is also reported other dental mineralized tissues, enamel and dentin, are affected.

In this study, we differentiated HPP patient-derived iPS cells into odontoblast-like cells. We examined a new method of odontogenic differentiation using human iPS cells. We generated human iPS cell-derived neural crest-like cells, which exhibited neural crest markers, then differentiated into odontoblast-like cells via mesenchymal stem cells. Odontoblast-like cells, which are derived iPS cells from three healthy adults, show characteristics of odontoblasts. HPP patient-derived iPS cells show no mineralization after differentiation, while positive mineralization was recognized with the iPS cells corrected mutation causing HPP.

研究分野：口腔外科学

キーワード：iPS細胞 低ホスファターゼ症 組織非特異的アルカリホスファターゼ セメント質形成不全 乳歯の早期脱落 象牙芽細胞分化誘導 ゲノム編集

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(HPP)は骨の石灰化不全を主症状とする遺伝性代謝性骨系統疾患である。組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNSALP)をコードするALPL遺伝子に変異が起こり、その活性が低下することが原因と考えられている。乳歯の早期脱落はHPP患者で最も高頻度に見られる症状の1つであり、軽症のHPPでは診断のきっかけになることも少なくない。その他にもエナメル質や象牙質の形成不全や、永久歯の早期脱落など、口腔内症状の報告は多数あるものの、明らかになっていないことも多い。これは症例が希少であることや、年齢とともにう蝕や歯周病といった口腔内疾患の影響が大きく関係してくることに伴い、正確な診断が困難になってくるのが理由としてあげられる。早期脱落の原因は、セメント質の形成不全によって歯と歯槽骨との間の結合力が弱くなり、正常な咬合やわずかな外力でもそれが異常な刺激となって脱落を引き起こすと考えられているが、なぜ正常なセメント質の形成が阻害され、また、どのように脱落に至るのかという経緯はわかっていない。これまでに、歯の早期脱落に関する研究として、脱落歯の解析や、HPPモデルマウスの歯および歯周組織に対する病態研究が行われてきたが、いずれも乳歯の早期脱落や歯および歯周組織の形成不全が起きる機序の解明には至っていない。現状では、HPP患者のこれらの口腔内疾患に対しては、口腔衛生指導や口腔清掃を行うことで進行を抑制する予防的治療にとどまっており、積極的な治療法は存在しない。

近年わが国では、重症型のHPPに対して世界に先駆けて酵素補充療法が開始されたことにより、生命予後が大幅に改善されている。このため、今まで生存が困難であった重症型のHPP患者についても今後さらに寿命が延びることが予想され、今までのように軽症のHPP患者だけでなく、重症のHPP患者の口腔症状についても治療の必要性が出てくる可能性が高い。歯の喪失は咀嚼障害、構音障害、審美障害の原因となり、時にQOLを大きく低下させる要因となる。今後HPPに伴う歯科的疾患に対するより深い理解や根治的治療法につながる詳細な研究が望まれる。

HPPにおける口腔内疾患の研究を困難にしている要因として、症例が希少であることに加え、年齢が進むにしたがって、通常のう蝕や歯周病との鑑別が難しく、正しく評価ができないという点がある。

iPS細胞は、任意の分化誘導により目的の細胞や組織を作製することが可能になりつつあり、病態の解析、遺伝子治療、創薬開発、再生医療を目指した多くの研究に利用されている。HPPのような稀少性の高い難病研究では、疾患iPS細胞を用いて目的の細胞や組織に分化誘導を行うことで病態モデルを作製し、それを用いて様々な解析を行うことができるため、iPS細胞の有用性は大きい。また、HPPでは原因となるALPL遺伝子の変異は300種類以上報告されているが、疾患iPS細胞を用いればこれらの遺伝子条件を変異ごとに忠実に再現できる点でも有利であると考えられる。

歯科の分野における、再生医療を視野に入れた幹細胞研究も盛んにおこなわれており、歯や歯周組織に関連する細胞の分化誘導のうち、多数の報告があるものの1つが象牙芽細胞への分化誘導である。一方で、これらの研究はマウスiPS細胞やヒト間葉系幹細胞が中心であり、ヒトiPS細胞を用いた研究はまだ少ないのが現状である。より忠実な病態モデルとしてヒトiPS細胞を用いることで、得られるデータの有用性はより高く、より現実的な治療法開発に向けての研究へとつなげていくことができると考えられる。

また、最近ではゲノム編集技術の研究も進んでおり、ヒトiPS細胞に対しても効率よく目的とする遺伝子改変を行うことが可能になってきた。疾患モデルとなるiPS細胞の変異を修復して、修復前の細胞との比較に用いることで、遺伝子背景が統一された条件での評価が可能であり、また、健常の細胞との比較を行えば、データの信用性を高めることができる。

これらのことを背景に、今回の研究では、HPP疾患特異的iPS細胞を用いて、HPPにおける歯科的疾患を再現した病態モデルを作製して、今後の研究の足掛かりとすることを考えた。具体的には、HPP患者由来の皮膚繊維芽細胞から作製したiPS細胞を用いて象牙芽細胞へと分化誘導し、健常人由来iPS細胞との比較を行う。また、ゲノム編集技術を用いて、HPPの原因となっている変異を修復して、健常iPS細胞やHPPのiPS細胞と比較することで、HPPによるTNSALPの活性低下が象牙質形成に及ぼす影響について詳しく検討していくこととした。

2. 研究の目的

(1) ヒトiPS細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法についての報告は過去に存在しない。しかし、マウス iPS 細胞やヒト間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導の報告は多数存在する。また、ヒト iPS 細胞を用いて骨芽細胞分化誘導を行う方法についても多くの報告があり、この中には、iPS 細胞を神経堤細胞に誘導し、その後間葉系幹細胞に分化させた後に骨芽細胞へと分化させることで高効率に分化させることが可能であるという報告も見られた。そこで、これらの報告で用いられている方法を併合させて、iPS 細胞における象牙芽細胞分化誘導法を確立することを目指した。

(2) HPP 患者由来ヒト iPS 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導

(1) で設定された分化誘導法を用いて、HPP 患者由来ヒト iPS 細胞に対し、象牙芽細胞分化誘導を行う。目的の細胞が得られたら、アリザリンレッド染色を用いて石灰化についての評価を行う。さらにゲノム編集技術を用いて HPP の原因となっている変異を修復した細胞を同様に分化誘導し、その結果を比較する。さらに、象牙芽細胞マーカーの発現を確認し、健常、HPP および変異修復後のそれぞれの細胞間で違いがあるかを比較する。

3. 研究の方法

(1) 健常人由来ヒト iPS 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導

過去にヒト iPS 細胞を用いた象牙芽細胞誘導法についての報告はないため、今回の研究の第一段階として、まず分化誘導法の条件設定を行った。

象牙芽細胞は間葉系幹細胞から分化することが知られている。このため、ヒト間葉系幹細胞からの象牙芽細胞誘導法については多く報告があり、誘導後、目的とする細胞が得られたのかという評価についてはこれらの過去のデータを参考とすることとした。また、ヒト iPS 細胞を用いた骨芽細胞誘導法のうち、iPS 細胞から神経堤細胞、間葉系幹細胞を介して最終的に骨芽細胞へと分化誘導する方法が、効率のよい誘導方法として報告されている。

そこで、本研究では、既報であるヒト iPS 細胞の神経堤細胞を介した骨芽細胞分化誘導法およびヒト間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法を組み合わせ、ヒト iPS 細胞から神経堤細胞、間葉系幹細胞を経由して象牙芽細胞への分化誘導が可能なのかを試みた。そして、目的とする細胞が得られているかどうかについては、アリザリンレッド染色を用いた石灰化の評価や象牙芽細胞マーカーを測定することで評価を行った。象牙芽細胞のマーカーとしては、象牙質シアロリントタンパクやネスチンなどを使用した。

(2) HPP 患者由来 iPS 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導

HPP 患者由来 iPS 細胞を (1) で設定した条件にて象牙芽細胞分化誘導を行った。また、これらの iPS 細胞に対し、ゲノム編集技術を用いて HPP の原因となっている変異を修復し、同様に分化誘導を行った。そしてこれら誘導後の iPS 細胞の石灰化能について、アリザリンレッド染色を用いて評価を行った。

4. 研究成果

3 健常人由来ヒト iPS 細胞を用いて象牙芽細胞誘導を行い、すべての株において、石灰化が認められた。また、リアルタイム PCR やウェスタンブロット法を用いた実験では、これらの細胞が象牙芽細胞の特徴を有していた。このことから、今回用いた方法がヒト iPS 細胞を象牙芽細胞へと分化誘導するにあたり有効であることを示している。また、渉獵される限りこれまでにヒト iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導法についての報告はなく、本研究が初めての報告である。今回用いた分化誘導方法は、HPP の歯科疾患に関する研究だけではなく、ヒト iPS 細胞を用いた象牙芽細胞や象牙質に関する研究に広く応用することができる可能性がある。

また、本研究では、HPP 患者由来 iPS 細胞についても同様の方法を用いて象牙芽細胞分化誘導を行った。HPP の iPS 細胞では、分化誘導後も石灰化は認められなかった。一方で、ゲノム編集技術を用いて HPP の原因となる変異を修復した細胞では石灰化を認めた。この結果は、HPP 患者の象牙質で石灰化不全が生じることに矛盾しない。つまり、HPP の病態である TNSALP の活性の低下によって、象牙質の形成不全が起こっていることを示唆する結果となった。

今回の結果によって、ヒト iPS 細胞の象牙芽細胞分化誘導に成功し、また、HPP における象牙芽細胞の病態の再現についても、臨床的な報告と一致する結果となった。このことから、当初の目的であった今後の HPP における歯科的疾患の研究の足掛かりを作るといった目的を果たすことができたといえる。今後は、これらの細胞および分化誘導方法を用いて、HPP における象牙質形成不全が起きる詳細なメカニズムの解析を行っていく予定である。また、この方法を応用して、歯根膜細胞やセメント質の病態モデルの作製や、それらの組織における HPP の病態の解析を行

い、HPPにおける歯科疾患に対する治療法の開発に向けて研究を進めていく予定である。

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

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