

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10009

研究課題名(和文) 低ホスファターゼ症の遺伝子治療へ向けた分子生物学的アプローチ

研究課題名(英文) Molecular biological approaches to gene therapy for hypophosphatosis

研究代表者

齊藤 陽子 (Saito-Iwase, Yoko)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30404487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エレクトロポレーション(EP)法とは非ウイルス遺伝子導入法の1つで、細胞に電流を流して細胞膜に一過的な穿孔を作り細胞外にある核酸を細胞内に取り込ませる方法である。EPによる遺伝子導入条件は「電圧、時間、回数」で制御されるが、ヒトやマウスなど細胞の違いや臓器や組織などの違いによりその最適条件は異なる。本研究では乳歯歯髄細胞(HDDPC)への遺伝子導入条件の検討を行い、最適な条件を検討した。また、その条件においてHPP-HDDPC(低ホスファターゼ患者由来乳歯歯髄細胞)へのALP発現ベクター導入によるALP過剰発現細胞株の樹立を試み、続いて樹立されたALP-HPPHDDPCについての解析を行った。

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患者は、全身的な問題だけでなく、小児期より歯の早期脱落、嚥下障害、口腔機能発達不全など口腔内の問題も認め、乳歯の早期脱落を契機に低ホスファターゼ症(HPP)と診断されることが多く、歯科が重要な役割を果たし得る疾患である。本研究では、先天的にALP活性が低下したHPP患者由来乳歯歯髄細胞に対して、遺伝子工学的処置(ゲノム編集)を行い、ALP遺伝子を本来の遺伝子型へと修正することで、乳歯歯髄細胞におけるALPの役割の一部が細胞レベルで明らかとなった。この結果はHPP患者への細胞療法につながり、ひいてはテーラーメイド型再生医療の基礎的研究への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Electroporation (EP) is a non-viral gene transfer method in which an electric current is applied to cells to create transient perforations in the cell membrane, allowing nucleic acids located outside the cell to be incorporated into the cell. However, the optimal conditions differ depending on the differences in cells, organs, and tissues, such as human and mouse. Therefore, in this study, we examined the optimal conditions for gene transfer to deciduous dental pulp cells (HDDPC) and attempted to establish ALP-overexpressing cell lines by introducing ALP expression vectors into HPP-HDDPC (deciduous dental pulp cells derived from low-phosphatase patients) under these conditions, and subsequently, established The established ALP-HPPHDDPCs were then analyzed.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：HPP ALP ゲノム編集 乳歯

1. 研究開始当初の背景

- (1) 低ホスファターゼ症 (HPP) は、alkaline phosphatase (ALP) 遺伝子変異により発症し、本邦では主に ALP 遺伝子上の c.1559delT 変異、p.F327L 変異が多い¹⁾。HPP は多様な症状を呈し、骨欠損、呼吸不全、てんかん発作、運動発達遅滞、精神発達遅滞、易骨折などの全体的な問題の他、口腔機能発達不全、嚥下障害、歯の早期脱落などの口腔内の問題を認める¹⁾。ALP 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた基礎的研究では、ALP 減少は個体の生理機能にほとんど影響しないことから、ヒトとマウスでの ALP の役割は大きく異なる可能性がある。
- (2) 我々は健常な小児より得た乳歯歯髄細胞 (HDDPC) の幹細胞特性が個人間で異なることを見出した。5 人の被験者のうち 2 人は、ALP 高活性を示した。しかもこれら細胞は、他の被験者よりも初期化因子導入による iPS 細胞化を受けやすいこと、言い換えれば、リプログラミングされ易いという特徴を示した。更に、高い増殖能を持ち、OCT3/4 や NANOG といった幹細胞マーカーの発現も認められた²⁾。

以上から、「ALP 活性の上昇は、細胞の未分化状態と非常によく相関する」と考え、ALP が幼若な未分化性に関連すると判明しているとは言え、それが単なる未分化マーカーに留まるのか、または、細胞の未分化性維持に何らかの積極的な役割を果たしているかは、未だ十分には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、先天的に ALP 活性が低下した HPP 患者由来の HDDPC (以下、HPP-HDDPC) に遺伝子工学的な操作 (ALP 発現ベクターの遺伝子導入) を加え、これら遺伝子改変細胞と親株の HPP-HDDPC 間で比較検討することで、HDDPC における ALP の役割を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳歯歯髄細胞への高効率な遺伝子導入条件の検討

健常児脱落乳歯から歯髄を採取し、酵素処理後、10%FBS (Equitech Bio) 添加 MEM α (Wako Pure Chemical Industries) にて 5% CO₂、37°C で培養し、HDDPC を単離した。Neon[®] Transfection system (Invitrogen) を用いたエレクトロポレーション (EP) 法にて、HDDPC へ plasmid DNA pTd-Tomato (赤蛍光遺伝子発現ベクター) と pTrans (Transposase 遺伝子発現ベクター) を全 24 条件で共導入した。導入後、2 日目に赤蛍光画像を撮影し、それを分析ソフト ImageJ にて各条件での遺伝子導入効率の解析を行い、最適条件を検討した。

(2) HPP-HDDPC への ALP 発現ベクター導入による ALP 過剰発現細胞株の樹立

HPP-HDDPC への ALP 発現ベクターの遺伝子導入には、human non-tissue-specific ALP (TNSALP) cDNA と neomycin 耐性遺伝子 (neo) を搭載する発現ベクター pTNSALP を使用した。これを基に piggyBac 系ベクターに構築し直し、最終的にトランスポゾンベクター pT-TNSALP を構築した。HPP-HDDPC に pT-TNSALP を Neon[®] にて遺伝子導入し、neo を含む培地で細胞を選別した。生じたコロニーを拾い、拡大させた後、ALP 活性検出キットを用いて ALP タンパク質発現の有無を調べた。in vitro での細胞挙動 (増殖速度、細胞間接触、細胞形態、多分化能など) について親株の HPP-HDDPC と比較検討した。

4. 研究成果

(1) HDDPC の取得 :

健常児脱落乳歯から歯髄を採取し、酵素処理後、MEM α (10%FBS) にて 5% CO₂、37°C で培養することで HDDPC を単離した。

遺伝子導入 :

Neon[®] を用いた EP 法にて、HDDPC へ 2 種の plasmid DNA (pTd-Tomato と pTrans) を共導入した。EP 条件は、電圧 : 1300 ~ 1800mV、時間 : 10 ~ 20ms、回数 : 1 ~ 3 回の組み合わせで行い、cuvette 当たり 10⁴ 個の細胞に遺伝子導入後、24-well plate 内の well へ細胞を播種した。

遺伝子導入効率の判定 :

導入後、2 日目に赤蛍光画像を取り込み、それを分析ソフト ImageJ にて各条件における遺伝子導入効率の解析を行ったところ、電圧は 1300 から 1600mV にかけて電圧が高いほど遺伝子導入細胞数は増加したが、1700 mV 以上では、遺伝子導入細胞数は減少した。時間

は 10ms と 20ms で比較すると、20ms の方が遺伝子導入細胞は多かった。“1300mV, 10ms, 1pulse”の条件では蛍光細胞が最も少なく、“1600mV, 20ms, 1pulse”で蛍光細胞が最も多く (図 1)、全 24 の導入条件を検討した結果、HDDPC においては“1600mV, 20ms, 1pulse”が最適な条件であると考えられた (図 2) ³⁾。

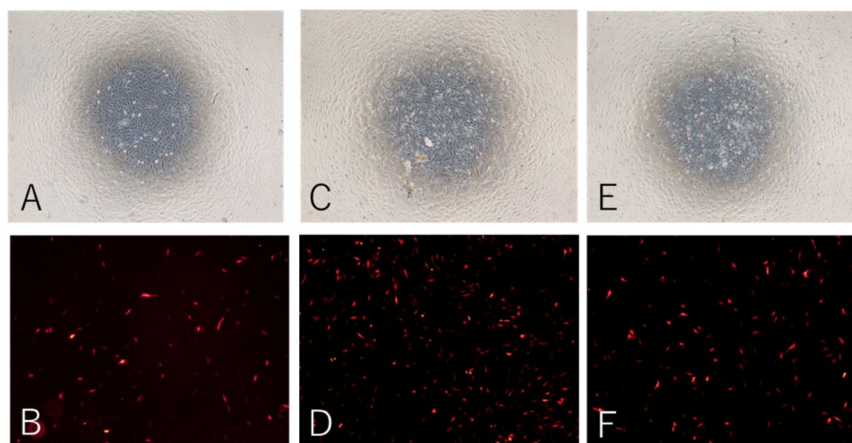


図 1 各条件での導入後2日目の細胞 bar: 100 μ m

A : 1300mV、10ms、1pulse C : 1600mV、20ms、1pulse E : 1700mV、10ms、1pulse
 B : A の赤蛍光画像 D : C の赤蛍光画像 F : E の赤蛍光画像

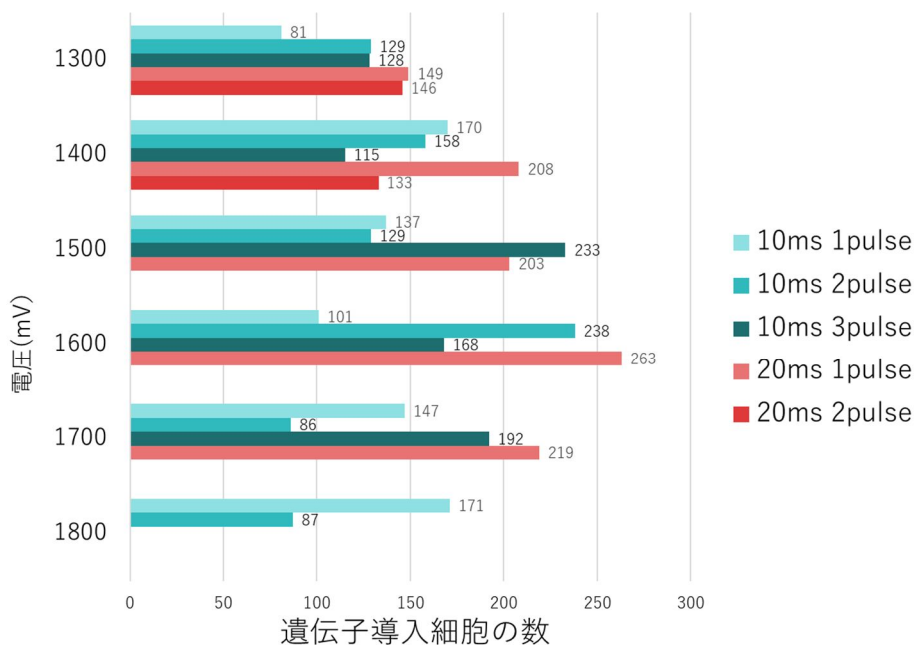


図 2 各条件での導入後2日目の遺伝子導入細胞の数

(2) HPP-HDDPC への ALP 発現ベクター導入：

HPP 患児の乳歯歯髄より初代培養細胞を 35mmDish に播種し、MEM α (10%FBS)にて 5% CO₂、37°Cで培養し、3 継代後に (1) で得られた条件にて、pTNSALP を遺伝子導入した。4 日後から neomycin (G418) 800 μ g/mL (TaKaRa Bio Inc.)にて選別し、生じたコロニーをピックアップし 2 継代後に ALP タンパク質の発現を調べたところ、AJP タンパク質の発現を認め、親株と比較し、細胞増殖能が増強されていた (図 3)。

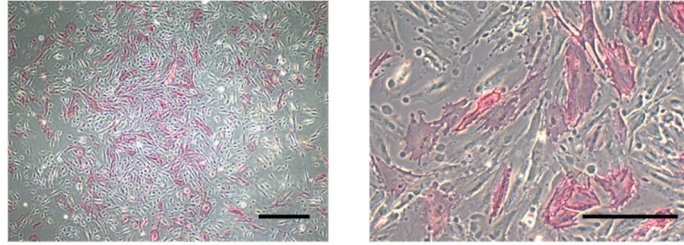


図3 ALPタンパク質の発現 bar: 100 μ m

<参考文献>

- 1) 村上智哉, 齊藤一誠: 難病の早期診断のために小児歯科医ができること【低ホスファターゼ症】低ホスファターゼ症ケーススタディ. 小児歯科臨床, 23(2), 52-55, 2018.
- 2) Inada E, Saitoh I, Sato M et al. J Investig Clin Dent. 2016 Sep 18. doi: 10.1111/jicd.12236.
- 3) 井葉野夏実, 清川裕貴, 坂田健輔, 稲田絵美, 大竹慎司, 村上智哉, 澤味規, 岩瀬陽子, 齊藤一誠: 乳歯歯髄細胞への高効率な遺伝子導入条件の検討と多機能 feeder 細胞の樹立. 小児歯科学雑誌, 61(suppl-2): 238-238, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Masahiro, Saitoh Issei, Kiyokawa Yuki, Iwase Yoko, Kubota Naoko, Ibane Natsumi, Noguchi Hirofumi, Yamasaki Youichi, Inada Emi	4. 巻 10
2. 論文標題 Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of Cell Maturation: Towards a New Paradigm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3338 ~ 3338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123338	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 -

1. 著者名 Ibane Natsumi, Inada Emi, Otake Shinji, Kiyokawa Yuki, Sakata Kensuke, Sato Masahiro, Kubota Naoko, Noguchi Hirofumi, Iwase Yoko, Murakami Tomoya, Sawami Tadashi, Kakiyama Yoshito, Maeda Takeyasu, Terunuma Miho, Terao Yutaka, Saitoh Issei	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Genetically Modified Human Feeder Cells in Maintaining the Integrity of Primary Cultured Human Deciduous Dental Pulp Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 6087 ~ 6087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11206087	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 井葉野夏実, 清川裕貴, 坂田健輔, 稲田給美, 大竹慎司, 村上智哉, 澤味規, 岩瀬陽子, 齊藤一誠
2. 発表標題 乳歯歯髄細胞への高効率な遺伝子導入条件の検討と多機能feeder細胞の樹立
3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会大会（長崎）
4. 発表年 2023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
研究分担者	佐藤 正宏 (Masahiro Sato) (30287099)	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・共同研究員 (82612)	
研究分担者	稲田 絵美 (Emi Inada) (30448568)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	野口 洋文 (Hirofumi Noguchi) (50378733)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	齊藤 一誠 (Issei Saitoh) (90404540)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	

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