

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16894

研究課題名（和文）低フォスファターゼ症の新規治療戦略確立に向けた包括的骨形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the role of tissue non-specific alkaline phosphatase in osteogenesis for the therapy of hypophosphatasia.

研究代表者

梶谷 尚世（Kajitani, Naoyo）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00513087

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）：本研究は、低フォスファターゼ症（HPP）における新規治療戦略の確立を目指し、その原因である組織非特異的アルカリフォスファターゼ（TNALP）の生物学的機能をより詳細に理解することを目的とした。そのために未だ知られていない細胞内でのTNALPの機能解明を試みた。その結果、これまで研究されてきた細胞膜表面だけでなく、ミトコンドリアにも局在していることが明らかとなった。そこでミトコンドリア機能におけるTNALPの役割を調べるため、TNALPを欠損させたヒト骨肉腫細胞株を作製し、ミトコンドリアの呼吸機能の解析を行ったが、顕著な差違は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、唯一の治療法である酵素補充療法は、長期的な投与により中和抗体が産生されその効果が薄れてしまうこと、骨形成以外の症状には効果がないことなどが問題となっている。また、骨形成についても酵素補充療法の効果は部分的であるため、患者のQOL向上を目指した新規治療戦略の確立が望まれる。そのためには、まずHPPの原因であるTNALPの生物学的役割を詳細に理解し、治療の標的分子を明らかにすることが重要であると考えられる。したがって、本研究のような基礎生物学的なHPPの病態理解を目指した研究は、学術的、社会的観点から見ても意義は大きい。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to understand the function of tissue non-specific alkaline phosphatase (TNALP) to develop the novel therapy for hypophosphatasia. To achieve this purpose, we focused on the intracellular TNALP and observed that TNALP localized in mitochondria. To analyse the function of mitochondria localized TNALP, TNALP deficient human osteosarcoma cell line was established and analysed the mitochondrial respiratory function. However, significant difference was not indicated.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：低フォスファターゼ症 組織非特異的アルカリフォスファターゼ ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

低フォスファターゼ症 (HPP, hypophosphatasia) は、ALPL 遺伝子がコードする組織非特異的アルカリフォスファターゼ (TNALP) の活性低下による先天性骨系統疾患である。現在、唯一の治療法である人工アルカリフォスファターゼによる酵素補充療法は、部分的な骨の石灰化を補う効果は認められるものの、長期的な投与により中和抗体が産生されることや、細胞内の機能は補えない。

TNALP は細胞膜表面に存在する膜タンパク質であり、ATP や無機ピロリン酸などから無機リン酸を生成することが知られている。この無機リン酸が骨形成に必要な hidroキシアパタイトの合成に重要なファクターであるため、TNALP の活性低下が骨形成不全を引き起こす主な原因となっている。しかし、HPP 患者に見られる症状は骨形成不全だけでなく、神経系や筋肉などにも認められる。このことから、TNALP の生物学的役割は未だ十分に理解できていない。

2. 研究の目的

現在行われている酵素補充療法では十分な骨構造の改善には至らないことから、TNALP は骨の石灰化以外にも、細胞内で骨芽細胞の分化・成熟、あるいは骨芽細胞の性質維持に重要な役割を担っていることが考えられる。そこで本研究では、骨芽細胞内で TNALP の生物学的役割を明らかにし、TNALP の細胞内機能が骨形成に寄与するメカニズムを明らかにすることを目的とした。それによって、現在の酵素補充療法に代わる、あるいは酵素補充療法との併用によって治療効果をより向上させる新規 HPP 治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

TNALP の細胞内機能を理解するため、まず免疫沈降法による TNALP が脱リン酸化の標的とするタンパク質の同定を試みた。ただし、この解析には専門的な技術と機器が必要であるため、東北大学・加齢医学研究所に協力を依頼し、解析を行なった。次に、細胞内 TNALP の生物学的役割を調べるため、ヒト骨芽細胞株である HOS 細胞と CRIPR-Cas9 システムを用いて TNALP を遺伝子破壊した細胞株 (ALPL-KO) を作製した。ガイド RNA は、エキソン 2 の開始コドンとエキソン 12 の終止コドン近傍に設計し、それぞれのコンストラクトを HOS 細胞にトランスフェクションした。その後、FACS による単一細胞分離した後、PCR による目的細胞クローンのスクリーニングを行った。そうして得られた ALPL-KO HOS 細胞を用いて、TNALP の機能不全が細胞にもたらす影響を解析した。

4. 研究成果

1) TNALP の相互作用タンパク質の同定

東北大学・加齢医学研究所に解析を依頼した TNALP と相互作用するタンパク質については、同定することができなかった。これは、TNALP が酵素であるという性質から、一般的なタンパク質同士の相互作用とは異なるという可能性や、細胞膜に局在する TNALP のように、ATP や無機ピロリン酸などの非タンパク質の分子を基質としている可能性が考えられた。その一方で行ったヒト骨肉腫細胞株、HOS 細胞を用いて行った免疫染色により、TNALP はミトコンドリアにも存在していることが観察された (図 1)。

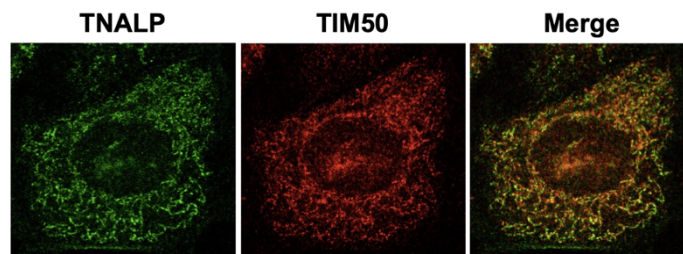


図 1 HOS 細胞における TNALP の免疫染色。
左: TNALP, 中央: TIM50 (ミトコンドリアマーカー), 右: 重ね合わせ

2) ALPL-KO HOS 細胞株の樹立

次に、ミトコンドリア局在型 TNALP の機能を解析するため、CRIPR-Cas9 システムによる HOS 細胞の ALPL 遺伝子ノックアウト細胞株の樹立を試みた。その結果、得られた ALPL-KO HOS 細胞クローンを用いて以降の解析を行った (図 2)。

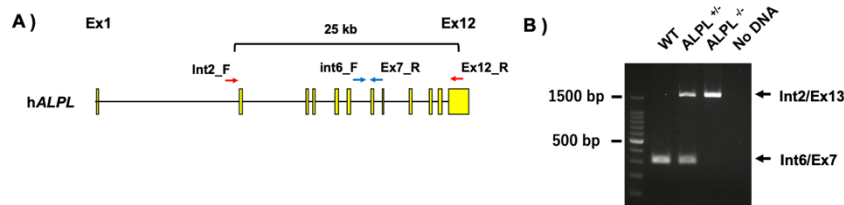


図2 ALPL-KO HOS細胞株の樹立。

A: ヒトALPL遺伝子とガイドRNAの設計。赤矢印: ガイドRNA, 青矢印: スクリーニング用プライマーセット

B: ALPL-KO HOS細胞株スクリーニングPCRのアガロース電気泳動

3) Flux analyzer によるミトコンドリア呼吸機能解析

樹立した ALPL-KO HOS 細胞株ではミトコンドリアに局在する TNALP が存在しないため、ミトコンドリアでの ATP 産生量や酸素消費量に影響がないかを調べるため、Flux analyzer を用いたミトコンドリアの呼吸機能解析を行った。しかし、Wild-type HOS 細胞との明らかな変化は認められなかった。また、1 細胞あたりのミトコンドリア存在量への影響を調べるため、定量 PCR によるミトコンドリア DNA のコピー数解析を行ったが、呼吸機能解析同様、Wild-type HOS 細胞との間に明らかな差異は認められなかった (図 3)。

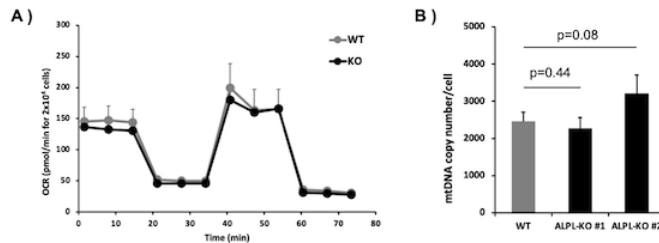


図3 ALPL-KO HOS細胞株におけるミトコンドリア呼吸機能とミトコンドリアコピー数

A: ミトコンドリア呼吸機能解析

B: 1 細胞あたりのミトコンドリアコピー数解析

以上のまとめとして、本研究により TNALP は細胞膜表面にあるだけでなく、ミトコンドリアにも局在するバリエーションが同定された。ミトコンドリアは、細胞の生存や増殖に必要なエネルギー産生の中心的な役割を担う細胞内小器官である。そのため、ミトコンドリアに局在する TNALP の欠損はミトコンドリアの機能に何らかの影響をもたらすと期待されたが、本研究で調べた限りではミトコンドリア機能に明らかな異常は観察されなかった。しかしながら、TNALP の活性低下は骨形成不全をもたらすことから、ミトコンドリア局在型 TNALP が骨形成に何らかの役割を担っている可能性は十分にのこされており、今後骨形成とミトコンドリア機能との関係性とそのメカニズム解明に向け、研究を進めていきたい。

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