

O-8-1

致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの硬組織石灰化不全治療を目的とした新規遺伝子治療

高橋(中村)有希^{1,2}、渡辺 淳^{2,3}、笠原 正貴¹

¹東京歯科大学薬理学講座、²日本医科大学学生化学・分子生物学講座、³日本医科大学附属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部

低ホスファターゼ症 (HPP) は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子 (*TNALP*) の変異により、血中のアルカリホスファターゼ (ALP) 濃度が低下し、硬組織の石灰化不全、呼吸困難、痙攣発作、乳歯の早期脱落を主徴とする遺伝性疾患であり、本邦においては致死性である周産期型や乳児型の頻度が高い。現在、酵素補充療法が行われているが、酵素の半減期が短いため、長期反復投与の必要性があり、また侵襲性も高い。すでに我々は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療実験を行うことにより、単回投与で延命効果を得ることに成功している。しかしながら、硬組織石灰化不全の治療効果に関しては課題が残され、低身長や易骨折性、乳歯の早期脱落に対しての有効な治療法はない。したがって、本研究では、硬組織に分布するALP濃度を上昇させるための至適AAVベクター投与量を検討し、硬組織石灰化不全の改善の可能性を検討することを目的とした。生後1日齢のHPPモデルマウス大腿四頭筋に骨親和型TNALPを発現するよう構築したAAVベクターを筋肉注射し、90日齢で大腿骨のレントゲン撮影を行い、解析した。血中のALP活性を20 U/mLまで上昇させた結果、未治療マウスは30日以内に死亡するのに対し、治療マウスは90日までの延命効果が認められた。また、行動量も増加し、大腿骨の形態不正や伸長不全の改善が確認された。今回の結果より、硬組織に十分な量のALPを補充することにより、その石灰化不全の改善が可能であることが示唆された。今後、発現効率を向上させた投与ベクターの開発と、石灰化不全の改善に適したベクター投与量ならびに安全なALP濃度を検討していく予定である。本研究結果は、生後でも硬組織に十分な量のALPを補充することにより、重症乳児HPP患者のQOLを高められる可能性を示している。

O-8-2

アミノ酸トランスポーターLAT1特異的阻害薬による破骨細胞抑制

林啓太郎¹、Jutabha Promsuk¹、遠藤仁²、安西尚彦^{1,3}

¹獨協医科大学医学部薬理学講座、²ジェイファーマ株式会社、³千葉大学大学院医学研究院薬理学

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) は必須アミノ酸を細胞内に取り込むトランスポーターである。その発現は、正常組織においては一部の限られた組織に極僅かにみられるのに対し、癌細胞においては非常に高いことがわかっている。このような知見から、LAT1は癌細胞におけるアミノ酸の取り込みを効率的に行うための重要なトランスポーターとして考えられている。

一方、我々はヒト末梢血単球におけるLAT1の発現がほとんど見られなかったのに対し、単球より分化させた破骨細胞におけるLAT1の発現が顕著に増加していることを見出した。そこで、破骨細胞分化におけるLAT1の機能を調べるために、LAT1特異的阻害薬存在下でヒト末梢血単球から破骨細胞分化を誘導させたところ、多核細胞およびTRAP活性陽性細胞の数が顕著に減少しており、LAT1特異的阻害薬によって破骨細胞への分化が抑制されていることがわかった。以上の結果から、LAT1は破骨細胞分化に必須であることが明らかとなった。

LAT1特異的阻害薬は癌患者に対する臨床試験が計画されているが、我々はLAT1がT細胞の活性化にも重要であることを最近明らかにしていることから、LAT1特異的阻害薬は既存の薬とは異なる薬理作用で炎症と骨破壊を抑制する新規のリウマチ治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

O-8-3

高度に保存されたs5Bのグリシンの変異はPAI-1欠損症を引き起こす

Iwaki T¹, Nagahashi K¹, Takano K², Suzuki-Inoue K², Kanayama N¹, Umemura K¹,
Urano T¹

¹Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan ²University of
Yamanashi, Yamanashi, Japan,

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is a member of the serine protease inhibitor (SERPIN) superfamily and is the primary physiological regulator of urokinase and tissue type plasminogen activator (uPA and tPA). Complete PAI-1 deficient humans present with massive bleeding tendencies. We recently identified a new complete PAI-1 deficiency, which was caused by single amino acid replacement in PAI-1 molecule at its very C-terminus (G397R). Though the mutant is full length and its reactive site is conserved, the activity and the antigen levels of PAI-1 in plasma are nearly undetectable. In order to elucidate possible mechanisms how this mutation caused PAI-1 deficiency, recombinant Wt and G397R PAI-1 were expressed in S2 cells. Though the cells appeared capable to synthesize Wt and the mutated PAI-1 inside the cells, the mutated PAI-1 was hardly secreted due to intra-cellular multimerization. This multimerization was likely triggered by self-polymerization of the mutated PAI-1 in the cells, which is typically observed in serpinopathies in other SERPIN and causes disturbance of the secretion from the cells.

G397 of PAI-1 locates in strand 5B, and this glycine is well conserved in other Serpins. This glycine allows the close packaging of overlying phenylalanines that is essential to the stability of the serpin molecule. It was reported that mutation of this glycine in antithrombin III and neuroserpin also triggered self-polymerization, and caused antithrombin III deficiency and familial dementia, respectively. Therefore, the locus of the mutation appeared quite important to maintain the correct conformation of PAI-1.

O-8-4

ヒトiPS細胞のミトコンドリア機能に基づいたクロルピリホスの毒性評価

○山田茂、関野祐子、諫田泰成

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

【目的】医薬品や化学物質の中には、ヒト発達期の曝露により神経毒性の誘発が懸念されるものがあり、安全性の評価は重要である。現在、妊娠動物を用いた発達神経毒性試験が行われているが、コストや種差などの問題もあり、新たなin vitro評価系が期待されている。そこで我々は、発達期のモデルとしてヒトiPS細胞および神経前駆細胞を用いて、in vitro発達神経毒性評価系の確立を試みた。

【方法】ヒトiPS細胞は253G1株を用いた。神経前駆細胞は、TGF β 及びBMPシグナル阻害剤によるDual SMAD阻害法により分化誘導を行い、分化マーカーであるNestinの発現により分化の確認を行った。陽性対照物質としては、ヒトでの発達神経毒性が報告されている有機リン系農薬クロルピリホス (CPF) を用いた。

【結果】まずヒトiPS細胞を用いて、CPFで72時間曝露を行ったところ、MTT法により細胞増殖の低下が認められた。また、CPFの作用点として細胞内エネルギー供給に着目し、ATPの定量を行った結果、CPFによるATP量の減少が認められた。ミトコンドリアはATPなどのエネルギー産生器官であり、分裂・融合の形態変化により品質管理を行う事が知られている。そこでCPF曝露によるミトコンドリア形態への影響を調べた。その結果、CPFによりMfn1タンパク質の発現が低下した。他のミトコンドリア制御因子には特に変化が認められなかった。さらに、分裂ミトコンドリアを持つ細胞の割合が増加した。次に、神経前駆細胞を用いて、同様の検討を行った。未分化iPS細胞とは異なり、CPF曝露によって細胞増殖・ATP量・ミトコンドリア形態にはほとんど影響が認められなかった。現在、ヒトiPS細胞の分化状態に対して感度の違いのメカニズムを検討中である。

【結論】ヒトiPS細胞において、CPFはMfn1発現低下を介したミトコンドリア機能障害により毒性を引き起こすことが示唆された。ヒトiPS細胞を用いたミトコンドリア機能評価系は、医薬品や化学物質の発達期における毒性評価に有用である可能性が示唆された。