

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08994

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性肝疾患の病態解析と治療への応用に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of a hereditary liver disease using induced pluripotent stem cells

研究代表者

小林 武嗣 (Kobayashi, Takeshi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60740248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：銅代謝異常と肝障害を有し、臨床症状の異なる一卵性双生児症例において、その差の原因を探求する目的に、網羅的遺伝子解析を行った。その結果から、ウィルソン病の原因遺伝子であるATP7Bに、過去に報告がない同じ遺伝子異常があることを見出した。症例の末梢血から誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS cells)を樹立し、細胞レベルでのウィルソン病の表現型の確認とその症例間での差について検討したが、iPS細胞由来肝細胞において銅代謝異常を確認したが、その表現型の差の原因は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：We performed the comprehensive analysis to elucidate the clinical difference between clinically divergent identical twins with abnormality of copper metabolism. We detected the mutations in ATP7B gene which is the causative gene of Wilson's disease. We generated induced pluripotent stem cells (iPS cells) from peripheral blood cells of each identical twin. In vitro, although we confirmed the abnormality which is the phenotype of Wilson's disease, we could not confirm the difference in the phenotype between identical twins.

研究分野：消化器内科

キーワード：iPS細胞 ウィルソン病 銅代謝異常 一卵性双生児

1. 研究開始当初の背景

ウィルソン病は、銅の移送障害により、臓器に銅が沈着することで生じる常染色体劣性遺伝性疾患である。その頻度はおよそ3万人に1人で認められ、発症年齢も3歳から50歳とばらつきがある。銅沈着部位としては、肝臓や中枢神経系、角膜などがあげられ、臨床症状として肝障害(劇症肝炎、肝硬変など)や神経症状(企図振戦、知能低下など)、カイザーフライシャー角膜輪が認められる。責任遺伝子は、13番染色体長腕に存在するATP7Bと同等されており、これまでに様々な遺伝子異常部位が報告されているが、これら遺伝子型と臨床型の関連性を証明した報告は少ない。特に、予後不良である劇症肝炎を呈するウィルソン病も報告されており、これら危険因子の探索は、治療方針を決定するうえでも重要な課題と考えられる。ウィルソン病の診断は、(1) 肝生検による肝銅含量の増加:肝組織の湿重量で 200 μ g/g以上 (2) 血清セルロプラスミン値の低下:20 mg/dL以下、(3) 尿中銅排泄量の増加が項目としてあげられるが、上記で確定診断されない症例も存在し、その場合には遺伝子検査も有用となる。ウィルソン病の治療としては、銅を含む食事制限を主とし、銅キレート剤(D-ペニシラミンや塩酸トリエンチン)が用いられているが、永続的に内服することによる副作用(血球減少や腎障害、急性アレルギー反応など)が認められる症例もあり、その場合は肝移植も考慮されるが、より低侵襲的根治的な新規治療薬の開発が切望されている。

一方、京都大学山中先生らのグループは、体細胞から誘導多能性幹細胞(iPS細胞:induced

pluripotent stem cells)を作製したことを報告、これら作製された細胞は、組織再生を目的とした新たな細胞ソースとして期待されている(Cell. 2006 25;126(4):663-76)。様々な疾患特異的 iPS 細胞が作製され、その細胞を用い、疾患発症のメカニズムを検討した報告も多くあるが、iPS 細胞を用いたウィルソン病について詳細に検討した報告はない。実験動物や他代用の培養細胞を用いて検討されていたことが、疾患特異的 iPS 細胞を用いることで、症例毎の遺伝子異常を背景とした細胞レベルでの研究が可能となり、前臨床段階の研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

遺伝性肝疾患であるウィルソン病の発症メカニズムを、疾患由来iPS細胞および誘導肝細胞を用いてその発症メカニズムと表現型の差異について解析することおよび新規治療薬の探索を主目的とする。(1) 遺伝子診断されたウィルソン病症例から iPS 細胞を作製および肝細胞を誘導する。(2) 誘導肝細胞の網羅的な遺伝子発現を解析し、遺伝子異常と遺伝子発現の差異を検討する。(3) 劇症肝炎を呈した症例群の誘導肝細胞に様々な刺激を加え、その表現型の差異について検討し、特に劇症肝炎を呈する重症化因子の有無や発症機序を解明する。(4) 上記の結果から、重症化予防や新規治療薬の開発を検討する。

3. 研究の方法

1) 遺伝子同定されているウィルソン病症例を選定。劇症肝炎を呈した症例を含むウィルソン病症例を 10 症例程度想定する。異なる

遺伝子異常部位を有している症例を選定し、その臨床型を確認する。

2) 症例静脈血 T 細胞から iPS 細胞を作製。末梢血 T 細胞から iPS 細胞を作製する(Cell Stem Cell. 2010 2;7(1):11-4)。ウィルソン病症例から静脈血を採取し、密度勾配分離法にて単核球分画を単離し、抗 CD3 抗体で固相化した培養皿内で、IL-2 を含む培地を用いて培養、活性化させる。培養 5-6 日目にセンダイウイルスを用いて、4 因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入する。feeder 細胞上に遺伝子導入された T 細胞を、iPS 細胞用培地を用いて培養 2-3 週間後に iPS 細胞であることの確認(染色、遺伝子発現 など)を行う。

3) 疾患特異的 iPS 細胞から肝細胞を誘導。iPS 細胞から肝細胞への分化段階に適した液性因子(増殖因子やサイトカイン等)を順次作用させることにより、内胚葉、肝幹前駆細胞、成熟肝細胞へ分化させる (Nat Protoc. 2013;8(2):430-7)

4) 誘導肝細胞の網羅的遺伝子発現の解析。マイクロアレイ法を用いてウィルソン病症例および健康者由来 iPS 細胞および誘導心筋細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する。結果を RT-PCR 法を用いて確認を行う(Circ J. 2011;75(9):2260-8)。

5) 誘導肝細胞に対して様々な負荷(銅負荷、虚血負荷、活性酸素負荷、肝炎ウイルス負荷など)を与え、細胞障害、遺伝子発現の差異さらに劇症肝炎の危険因子について検討する。誘導肝細胞に対して、銅負荷、低酸素負荷、過酸化水素水負荷、肝炎ウイルス感染を行い、細胞障害(細胞内銅濃度測定、MTS アッセイ:

生存細胞、TUNEL 染色:アポーススなど)およびマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。劇症肝炎発症症例と非発症症例由来の誘導肝細胞の差異を解析する。

6) 新規治療薬の検討。

網羅的遺伝子発現解析の結果から、劇症肝炎群にて優位に活性化しているカスケイドに注目し、細胞障害を起こしうる因子を修飾する薬剤の効果を判定する。

4. 研究成果

ウィルソン病一卵性双生児症例から、採血を採取し、末梢血 T 細胞から iPS 細胞を樹立した。遺伝子異常の再確認のため、エキソーム解析を行い、既知の ATP7B 遺伝子異常と現在まで報告例のない ATP7B 遺伝子異常が確認されたが、一卵性間で表現型が異なる原因となりえる遺伝子差異は確認されなかった。過去に報告された分化誘導プロトコルを用いて、肝細胞への分化誘導を行い、免疫染色、遺伝子発現解析から、肝細胞様細胞への分化を確認した。抗 ATP7B 抗体を用いた免疫染色では、染色されることが確認されたことから、ATP7B が欠損されているわけではなく、機能が低下していることが考えられた。

未報告遺伝子異常のため、その異常による表現型が描出していることを確認するため、まずは、HepG2 細胞をコントロールとし、銅負荷条件の選定を行い、ウィルソン病 iPS 細胞由来肝細胞を用いて銅取り込み能の確認を行った。本ウィルソン病症例から樹立された iPS 細胞を用いた、銅負荷・細胞内濃度分析では、細胞内銅濃度の低下が確認され

た。高濃度銅負荷では細胞障害が確認され、
現在本モデルを用いて、銅による細胞障害機
序に関して検討を行なっている。一卵性双生
児からの iPS 細胞樹立であるが、本症例の肝
障害における表現型はやや異なっていたた
め、現在までに、エキソーム解析による検
討、銅取り込み能の差異、銅負荷による
細胞障害確認解析を行ったが、明確な原因を
確認できなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shohei Yoshida, Chiaki Nakanishi,
Hirofumi Okada, Masayuki Mori,
Junichiro Yokawa, Tsuyoshi Yoshimuta,
Kunio Ohta, Tetsuo Konno, Noboru Fujino,
Masa-aki Kawashiri, Akihiro Yachie,
Masakazu Yamagishi, Kenshi Hayashi.
Characteristics of induced pluripotent
stem cells from clinically divergent female
monozygotic twins with Danon disease. J
Mol Cell Cardiol. 2018 Jan;114:234-242.
doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.019. (査読あ
り)

〔学会発表〕(計1件)

Nakanishi C, Yoshida S, Okada H, Mori M,
Yokawa J, Shimojima M, Yoshimuta T,
Sakata K, Hayashi K, Kawashiri M,
Yamagishi M. Effect Application and
Problems of Disease-specific Induced
Pluripotent Stem Cells. The 81st Annual
Scientific of The Japanese Circulation
Society.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

1. 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・医
薬保健学域医学類・循環器病態内科学

<http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp>

2. 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・医
薬保健学域医学類・先進的地域医療研究講座

<http://www.med.kanazawa-u.ac.jp/lab/dep5-12.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 武嗣 (Kobayashi, Takeshi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60740248

(2)研究分担者

中西 千明 (Nakanishi, Chiaki)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80623660

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4)研究協力者 なし

()

研究者番号：