

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19508

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた家族性高コレステロール血症に対する移植治療の検討

研究課題名(英文) Restored Low Density Lipoprotein Uptake in Gene-corrected iPSC-derived Hepatocytes from Homozygous Familial Hypercholesterolemia

研究代表者

岡田 寛史 (Okada, Hirofumi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10735161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ホモ接合体性家族性高コレステロール血症(HoFH)患者(c.901G>T)の末梢静脈血から疾患特異的iPS細胞の樹立を行い、肝細胞への分化誘導および肝細胞に特異的なマーカーの遺伝子発現の確認を行った。その後、LDL受容体遺伝子などの脂質代謝に関連する遺伝子の発現や機能解析を行った。CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集を行い、HoFH患者を由来とするiPS細胞より、ホモ接合体およびヘテロ接合体に野生型と同じ配列を持つiPSクローンを樹立した。肝細胞への分化誘導後、LDL取り込み能に関する解析およびHoFH患者末梢血単核球への免疫反応について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：To examine whether LDLR function of HLCs from genetically-corrected iPSCs can be restored in human, iPSCs were generated from a HoFH patient harboring a point mutation (c.901G>T) in exon 6 of LDLR, which impairs LDL uptake. We generated one homozygous gene-corrected HoFH-iPSC clone and two heterozygous gene-corrected HoFH-iPSC clones using the CRISPR/Cas9 system. Subsequently, we obtained functionally corrected HLCs with significantly recovered LDL uptake ability compared to those without gene correction. Under these conditions, few immunological rejections were observed by cell-mediated cytotoxicity assay.

研究分野：脂質代謝

キーワード：iPS細胞 CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

2006年京都大学山中伸弥らのグループにより、マウス皮膚由来線維芽細胞に4つの転写因子(Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc)を遺伝子導入することで分化万能性と自己増殖性を有した幹細胞、つまり誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)が作製できることが報告された(*Cell*. 2006;25;126(4):663-76.)。このiPS細胞より各臓器の機能細胞へ分化誘導することにより、細胞レベルでの病態モデルの構築や薬効評価に有用であると考えられ、様々な遺伝性疾患で応用されている。肝細胞への分化誘導においても既に方法が報告されており、家族性高コレステロール血症(FH)を含む肝臓を主座とするいくつかの遺伝性代謝疾患において、疾患特異的iPS細胞から病態モデルの構築を行ったとする報告がある(*J Clin Invest*. 2010;120(9):3127-36.)。また、2013年には新しい遺伝子改変技術であるCRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins)が報告された。そこで我々は、ホモ接合体性FH(HoFH)患者より樹立した疾患iPS細胞に対し、疾患の原因と考えられる異常LDL受容体(LDLR)遺伝子を修正し、受容体機能を回復した肝細胞を作製することで、将来的にその由来とする患者への細胞移植治療に応用が可能と考え、本研究を発想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HoFH患者より末梢静脈血より低侵襲に、(1) HoFH疾患モデルを、iPS細胞を用いて構築すること、(2) 遺伝子修正を行いLDLRの発現、LDLとり込み能

の改善を確認すること、(3) ゲノム編集後のiPS細胞由来肝細胞の移植時の免疫反応について検討することである。

## 3. 研究の方法

### (a) 機能細胞への分化誘導及びその確認。

疾患由来iPS細胞を過去に報告された方法(*Nat Protoc*. 2012;7:718-728)を用いて樹立し、各種サイトカインとともに培養することで、肝細胞様細胞(HLCs)を誘導した(*Nat Protoc*. 2013;8:430-437.)。PCRによる遺伝子発現解析、表面マーカーに対する免疫染色により分化誘導を確認した。

### (b) ゲノム編集。

過去の報告にならい(*Stem Cell Reports*. 2015;4(1):143-54)、CRISPR/Cas9システムを使用してLDL受容体の変異を修正した。

### (c) LDLR発現及びLDL取り込み能の評価。

HLCsへ分化誘導後、免疫染色、PCR、ウエスタンブロットを行い、LDLRの発現を確認した。LDLの取り込みについては蛍光標識したLDLを用いてフローサイトメトリーを行い、細胞内への取り込みについて評価した。

### (d) 患者末梢血中リンパ球との共培養。

患者末梢血中リンパ球を採取し、蛍光標識し、遺伝子修正前iPS細胞由来HLCsおよび遺伝子修正後iPS細胞HLCsと共培養を行い、末梢血中リンパ球によるHLCsに対する細胞障害について、ヨウ化プロピジウムを用いたフローサイトメトリー法にて検討した。

## 4. 研究成果

HoFH患者から採取した末梢血より単核球を抽出し、4つの転写因子を導入することによりHoFHからは独立した8 linesのiPS細胞を樹立した。未分化マーカーとして知られるNanog、Oct3/4、SSEA-4、TRA-1-60、

TRA-1-81 を免疫染色により確認した。

また、それらの iPS 細胞のうち 1 line に対しゲノム編集を行い、ホモ接合性に遺伝子修正を行った 1 つの iPS 細胞クローンと、ヘテロ接合性に遺伝子修正を行った 2 つの iPS 細胞クローンを得た。それらの iPS 細胞クローンに対し、未分化マーカーの発現を免疫染色、PCR により確認したのち、HLCs への分化誘導を行った。

LDLR 遺伝子の発現を、real-time PCR により確認したところ、mRNA レベルでの LDLR 遺伝子の発現は、HoFH 患者を由来とする HLCs は野生型(WT)の HLCs と比較し、2 倍程度に亢進しており、ゲノム修正後 iPS 細胞を由来とする HLCs は、WT と同程度であった。また、ウエスタンブロッティング解析では、HoFH を由来とする HLCs では WT と比較して分子量の小さな LDLR タンパクの発現を認め、ゲノム修正後 iPS 細胞を由来とする HLCs では WT と同じ分子量の LDLR タンパクの発現を認めた。HLCs の LDL 取り込み能は WT と比較して、HoFH で低下を認めたのに対し、ホモ接合体性に遺伝子修正された iPS 細胞由来の HLCs は WT と同程度の LDL 取り込み能を認めた。

患者末梢血中リンパ球と HLCs の共培養では、WT 由来の HLCs ではヨウ化プロピジウム陽性細胞を多く認めたのに対し、HoFH 由来 HLCs、ゲノム修正後 iPS 由来 HLCs では有意に少なく、陽性率は同程度であった。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

1. Yoshida S, Nakanishi C, Okada H, Mori

M, Yokawa J, Yoshimuta T, Ohta K, Konno T, Fujino N, Kawashiri MA, Yachie A, Yamagishi M, Hayashi K. Characteristics of induced pluripotent stem cells from clinically divergent female monozygotic twins with Danon disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Jan;114:234-242. 査読有り

2. Okada H, Tada H, Hayashi K, Kawashima H, Takata T, Sakata K, Nohara A, Mabuchi H, Yamagishi M, Kawashiri MA. Aortic Root Calcification Score as an Independent Factor for Predicting Major Adverse Cardiac Events in Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2018 Jan 10. doi: 10.5551/jat.42705. [Epub ahead of print] 査読有り

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

○ 出願状況 ( 計 0 件 )

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○ 取得状況 ( 計 0 件 )

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岡田 寛史 (OKADA, Hirofumi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号 : 10735161

### (2)研究分担者 ()

研究者番号:

### (3)連携研究者 ()

研究者番号:

### (4)研究協力者 ()