

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19600

研究課題名(和文) 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型患者のiPS細胞由来肝細胞を用いた治療薬の探索

研究課題名(英文) Development of novel therapy for progressive familial intrahepatic cholestasis using patient-specific iPS cells

研究代表者

今川 和生 (IMAGAWA, Kazuo)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40708509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では通常得ることの難しい進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型患者の肝細胞をiPS細胞を介して誘導し、in vitroで解析することで新たな治療を探索することを試みた。対象患者の末梢血からiPS細胞を作製し、分化段階特異的な液性因子を用いて肝細胞に分化誘導した。得られた肝細胞はアルブミンを高発現し、電子顕微鏡像で毛細胆管を形成し、胆汁排泄能の低下を認めた。これまでに同症で薬効が報告されているフェニル酪酸により胆汁酸トランスポーターの発現や胆汁排泄能が改善した。iPS細胞由来肝細胞を同症の治療薬探索に利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop novel therapy for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2, we attempted to establish a PFIC2 model by using iPSC technology. We generated the induced pluripotent stem cells from the patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. Then, the induced pluripotent stem cells were differentiated into hepatocyte-like cells. The hepatocyte-like cells expressed albumin, and formed bile canaliculi. The biliary excretion capacity of hepatocyte-like cells was impaired. The biliary excretion capacity of the BD-HLCs could be increased by 4PBA treatment. These results suggested that the drug efficacy could be evaluated by using BD-HLCs.

研究分野：小児科学

キーワード：黄疸 遺伝性肝疾患 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

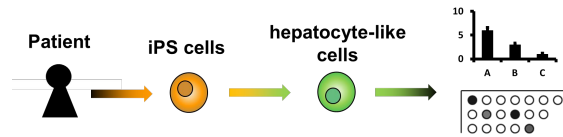
遺伝性疾患では、患者由来 iPS 細胞 (疾患 iPS 細胞) およびその派生細胞において遺伝子異常を継承するため、病態を再現し得る。したがって、遺伝性稀少難治疾患の研究において疾患 iPS 細胞は特に有用なツールである。さらに、動物実験ではなくヒト細胞を用いた研究が可能である利点がある。特に、肝細胞や心筋細胞、神経細胞などの生検で得難く、かつ研究利用に限りのあった患者細胞を低侵襲で作製できるため、これらの臓器における遺伝病患者から作製した iPS 細胞は、疾患解析や治療薬探索を推進するモデル細胞となることが期待される。

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (PFIC2) は胆汁酸トランスポーター-BSEP に異常を有し、高度の胆汁うっ滞性肝障害から肝硬変、肝不全へと進展して致死的な経過を辿ることが知られている。現時点では救命のために肝移植を要し、移植後は生涯に渡って免疫抑制治療が必要となるほか、移植医療に伴う医療経済や医療スタッフの負担は大きい。

疾患解析や新規治療薬のスクリーニングでは、しばしばモデル動物が用いられるが、BSEP ノックアウトマウスはヒトと異なって肝障害が軽度であるため、これまで PFIC2 の疾患モデルには用いられなかった。そこで、PFIC2 患者から作製した iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、PFIC2 における疾患メカニズム解明や新規治療薬探索の研究を推進するための有用なツールとなることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は肝移植に替わる治療法の開発が望まれている PFIC2 において、その解析研究を進めるために動物モデルとの表現型の違いのある同症患者由来 iPS 細胞と分化誘導肝細胞が有用であるかどうかを検討することを目的とする。



3. 研究の方法

PFIC2 患者の末梢血から iPS 細胞を作製する。PFIC2 患者由来 iPS 細胞からアクチピンなどの分化段階特異的液性因子を添加した培養系で肝細胞へ分化誘導した。

肝特異的発現分子であるアルブミンの免疫染色、ELISA、リアルタイム PCR、フローサイトメトリーなどで分化誘導肝細胞の評価を行った。

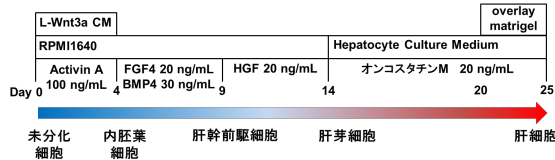
BSEP 遺伝子は肝臓でのみ発現している。そこで、新規 BSEP 遺伝子変異の影響を調べるために、分化誘導肝細胞から得られた mRNA を用いてスプライシング異常の有無をシーケンシングして解析した。

フェニル酪酸作用下で肝細胞膜上の BSEP タンパク発現や胆汁排泄能が改善するか否かを調べた。

4. 研究成果

PFIC2 患者から採血し、山中 4 因子搭載のセンダイウイルスベクターを作用させて iPS 細胞を作製した。得られた iPS 細胞は OCT4 などの未分化マーカーを発現し、三胚葉への分化傾向を示した。

PFIC2 患者由来 iPS 細胞から肝細胞へと分化誘導した。得られた肝細胞は各種アッセイでアルブミンを発現していることを確認した。また、電子顕微鏡像で毛細胆管様の構造形成を認めた。



また BSEP 遺伝子の新規変異を有する症例においては、iPS 細胞由来分化誘導肝細胞から得た mRNA、cDNA を用いたダイレクトシーケンスで解析を行い、タンパクをコードしない 5' 非翻訳領域の変異(c.-24C>A)がスプライシング異常を惹起することを認めた。

PFIC2 の新規治療薬候補であるフェニル酪酸を用いて薬効を示すかどうかを確認した。PFIC2 患者由来分化誘導肝細胞はフェニル酪酸によって BSEP の発現が改善したほか、胆汁排泄能(BEI 値)が改善した。

これらの結果より、PFIC2 患者の iPS 細胞由来肝細胞を同症の治療薬探索に利用できる可能性が示唆された。

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 1 件)

1. Imagawa K, Takayama K, Isoyama S, Tanikawa K, Shinkai M, Harada K, Tachibana M, Sakurai F, Noguchi E, Hirata K, Kage M, Kawabata K, Sumazaki R, Mizuguchi H. Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific

induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. Sci Rep; 7: 41806. 2017. [査読有] doi: 10.1038/srep41806

[学会発表](計 7 件)

1. Kazuo Imagawa, Shigemi Isoyama, Ken Tanikawa, Masato Shinkai, Masayoshi Kage, Ryo Sumazaki. Splicing analysis using induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells generated from a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. October 6th, 2016. Montreal, Canada.

2. Kazuo Imagawa, Kazuo Takayama, Shigemi Isoyama, Ken Tanikawa, Masato Shinkai, Masayoshi Kage, Kenji Kawabata, Ryo Sumazaki, Hiroyuki Mizuguchi. Human iPSC-derived hepatocyte-like cells generated from patients with bile salt export pump deficiency recapitulate the phenotype of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. 66th Annual Meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases (AASLD), November 14th, 2015. San Francisco, USA.

3. 今川 和生, 谷川 健, 新開 真人, 鹿毛 政義, 須磨崎 亮. 進行性家族性肝胆汁うっ滞症 2 型の疾患モデル - iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた解析 -. 第 42 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2015 年 10 月 17 日. 広島国際会議場 . 広島県広島市

4. 今川 和生, 高山 和雄, 磯山 茂美, 谷川 健, 新開 真人, 野口 恵美子, 鹿毛 政義, 川端 健二, 須磨崎 亮, 水口 裕之. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型の iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた BSEP スプライシング異常の解析. 第 32 回日本小児肝臓研究会. 2015 年 7 月 25 日. 鳥取大学. 鳥取県米子市

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今川 和生 (Imagawa Kazuo)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40708509

5. 今川 和生, 谷川 健, 鹿毛 政義, 須磨崎 亮. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型の iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた病態再現とフェニル酪酸の薬効評価. 第 51 回日本肝臓学会総会. 2015 年 5 月 21 日. ホテル日航熊本等. 熊本県熊本市

6. 今川 和生, 高山 和雄, 磯山 茂美, 野口 恵美子, 新開 真人, 立花 雅史, 櫻井 文教, 川端 健二, 須磨崎 亮, 水口 裕之. 進行性家族性胆汁うっ滞症 2 型の疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究. 第 118 回日本小児科学会学術集会. 2015 年 4 月 17 日. 大阪国際会議場. 大阪府大阪市

7. Kazuo Imagawa, Kazuo Takayama, Shigemi Isoyama, Emiko Noguchi, Masato Shinkai, Ken Tanikawa, Masayoshi Kage, Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Ryo Sumazaki, Hiroyuki Mizuguchi. Disease modeling of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 with patient-specific iPSCs derived hepatocyte-like cells. 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 16th, 2015, Osaka, Japan.