

令和 6 年 9 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03004

研究課題名（和文）iPS細胞による脂肪肝モデル再現を利用したNAFLDに対する革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the novel therapy for NAFLD by Engineering Fatty Liver from iPSC cells

研究代表者

武石 一樹（Kazuki, Takeishi）

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：50733713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：PNPLA3の SNPが非アルコール性脂肪肝炎関連肝硬変の危険因子となっているが、その発症する機序を発症させる機序を明らかにすること。SNPを持ったvariant-iPSC、SNPを持たないwt-iPSCを作成。iPSCよりiHSCに分化させ、variant-iHSCではwt-iHSCと比較して、SMA、Col1A1の発現、増殖能、遊走能も有意に高かった。variant-iHSCにてAMIGO2をノックダウンすると、増殖能、遊走能が低下し、SMAとCol1A1の発現も低下PNPLA3のSNPによる肝線維化には、AMIGO2を介したHSCの活性化が関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の一部は非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)を発症し、肝硬変や肝細胞癌へと進展する。本邦におけるNAFLDの有病率は年々増え続けており、NAFLD/NASHへの対策が急務であることは明らかであるが、現在まで有効な治療法は確立されていない。今回の研究にて、PNPLA3 SNPを認める症例では、肝星細胞の活性化が惹起しやすく、AMIGO2遺伝子発現を介して起こっていることがわかった。このAMIGO2をターゲットとして、今後、治療法の確立につながる可能性が非常に高い。

研究成果の概要（英文）：PNPLA3 variant was reported to be related with metabolic associated fatty liver disease. However, the mechanism has not been unveiled yet. The aim of this study is to generate iPSC-derived hepatic stellate cells (iHSC) from human-induced pluripotent stem cells (iPSC) with PNPLA3 single nucleotide polymorphism (SNP) and to clarify the mechanism of liver fibrosis caused by PNPLA3 SNP. Two types of iPSC (Wild, Variant) were differentiated into iHSC. TGF-stimulation resulted in significantly higher secretion of the liver fibrosis markers, SMA and Col1A1 in Variant-iHSCs than in Wild-iHSC. Variant-iHSC secreted significantly more PDGF and TGF- and had significantly higher cell proliferative and migration ability. AMIGO2 knockdown using siRNA in variant-iHSC significantly reduced migration and proliferation ability. The staining for AMIGO2 in cirrhotic liver and normal liver samples showed that AMIGO2 protein expression was observed in PNPLA3-variant samples.

研究分野：肝再生医療

キーワード：iPS細胞 脂肪性肝炎 肝硬変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)は、その一部は非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)を発症し、肝硬変や肝細胞癌へと進展する。本邦における NAFLD の有病率は 29.7% と報告されており、年々増え続けており、肝細胞癌の原因の 32%を占め、2020 年には NASH が肝移植の原因疾患の第 1 位になることが予想されている(Charlton MR, et al. *Gastroenterology* 2011;141:1249-1253)。したがって、NAFLD/NASH への対策が急務であることは明らかであるが、現在まで有効な治療法は確立されていない。genome-wide association study (GWAS)による遺伝子の解析が行われ、patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3)の I148M variant (148 番目のアミノ酸である(I)がメチオニン(M)に置換した変異 rs738409 C>G) が肝臓の脂肪化と強く相関することを報告し(Romeo S et al. *Nat Genet* 2008;40:1461-1465)、**PNPLA3variant を有する人は、有しない人に比べ、肝細胞癌の発症リスクが 2.26 倍になることが報告された**(Krawczak M, et al. *J Hepatol* 2015 62:980-1)。本邦ではこの variant を持っている割合が 21%にもおよび、今後、本邦では NASH は増加し、国民病となることが予測される(Nishioji K, et al. *PLOS One* 2015;10:e0140427, Liu YL, et al. *J Hepatol* 2014; 61:75-81)。GWAS の意義は、遺伝子をピックアップし、その遺伝子について解析を行い、疾患解明や治療法の開発につなげることである。PNPLA3 は、脂肪滴膜に存在し、リパーゼ活性を促進し脂質代謝に関わるとされている。これまでに動物実験や細胞での解析が行われているが、これまでのところ、PNPLA3 の SNP が NASH を発症するメカニズムについてはわかっておらず、治療薬の開発にもつながっていない(Basantani MK, et al. *J Lipid Res* 2011;52:318-329)。このように脂肪肝や NASH の発症メカニズムが解明されない原因として考えられることは、正常肝細胞は手術などの摘出標本に由来し、大量に長期間培養することは非常に難しく、繰り返し解析することができないために、ヒト肝細胞を用いた脂肪肝の研究ができないためである。また、肝臓は肝細胞のみではなく、星細胞や血管内皮細胞などの非実質細胞などと立体構造をなし、密接に関わり合っ臓器として成り立っているため、肝疾患の原因として、肝細胞だけでなく、非実質細胞が関与しており(Mederacke I, et al. *Nat Commun.*2013;4:2823)、正しく脂肪肝のメカニズム解析や治療法の開発につながらない可能性も高い。したがって、脂肪肝発症のメカニズムを解明し、有効な治療法を確立するためには、**ヒト由来の肝細胞だけでなく非実質細胞を含めた臓器として立体構造を持った人工肝臓を作成することで、繰り返し解析できる脂肪肝モデルを再現して、そのメカニズムを解明し、有効な治療方法を探索する必要がある。**

山中教授らが報告した induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)は多分化能を持ち(Yamanaka S et al. *Cell* 2007)、再生医療だけでなく、パーキンソン病などの疾患モデルを再現し、新たな治療法の確立に貢献している(Doi D, et al. *Nat Commun* 2020;11:3369)。iPS 細胞由来細胞を利用する利点は、iPS 細胞が大量に培養することができるため、iPS 由来細胞も大量作成することができ、繰り返し解析ができるだけでなく iPS 細胞は遺伝子改変することもでき、容易にターゲットとする遺伝子を改変した肝細胞や星細胞を作成できる点である。またもう一つの利点として、ヒト由来細胞で行う解析であり、ヒトとフェノタイプが違う動物実験ではないため、ヒトの疾患に有効な治療法を開発することになり、臨床応用への時間も大きく短縮できる。

### 2. 研究の目的

**今回の研究では、PNPLA3 SNP が NASH 発症にどのように関与しているかを明らかにすることで、NASH に対する革新的治療法を開発することが今回の目的である。**

### 3. 研究の方法

肝切除、生体肝移植の切除余剰切片より線維芽細胞を抽出した。標本から DNA を抽出し、シーケンスを行い、PNPLA3(rs738409)の GG(ホモ変異型)を抽出した。

線維芽細胞に山中遺伝子を導入し、iPS 細胞を作成した。

作成した iPS を遺伝子騒動組換えにより、PNPLA3(rs738409)の CC の野生型 iPS 細胞を作成した。

iPS 細胞から肝星細胞に分化させ、肝星細胞のマーカーを評価し、分化度を SNP の有無で比較した。

TGFβ で星細胞を刺激し、肝星細胞の活性化の違いを 2 種類の細胞間で比較した。また、肝線維化に関わるサイトカインの発現量を SNP の有無で比較した。

PNPLA 3 SNP の有無での遺伝子発現ファイルと比較するために、RNA シークエンスに提出し、SNP の有無での遺伝子発現の違いを評価した。

RNA シークエンスで同定された遺伝子をノックアウトすることで、肝星細胞の遊走能、増殖能、活性化の違いをノックアウトしていない細胞と比較した。

生体肝移植を受けた肝硬変患者および健康ドナーの PNPLA3SNP の有無での 8 )で同定された遺伝子の発現の有無を比較した。

### 4. 研究成果

PNPLA3SNP を持った健康人の肝切除した肝臓より線維芽細胞を採取し、大量に培養した。この線維芽細胞に山中遺伝子を導入し、SNP を持った PNPLA3-variant-iPS 細胞を作成した。この PNPLA3-variant-iPS を遺伝子相同組換えにより野生型の配列を持った PNPLA3-wild-iPS 細胞も作成した。作成したこれらの iPS 細胞の Stemness を確認した(図 1)。

この 2 種類の iPS 細胞を星細胞に分化させた。星細胞のマーカーの発現を比較し、2 つの細胞間で星細胞への分化に差を認めなかった。

星細胞を活性化するため作成した星細胞を TGF で刺激した。刺激後では、PNPLA3 SNP を持った星細胞(variant-iHSC)は、持たない星細胞(wild-iHSC)に比べ、活性化マーカーである SMA や COL1A1 の発現量が有意に高値であった(図 2)。

肝線維化を惹起するサイトカインである PDGF-BB および TGFβ1 のメディウム中の濃度を測定したところ、活性化した iPS-Ste は非活性化型と比較すると、その濃度が上昇し、Variant-iHSC と wild-iHSC を比較すると variant-iHSC の方が有意に高かった。

PNPLA3 SNP の有無にて、星細胞の活性化に違いがあることがわかったが、PNPLA3 SNP の有無の違いによる遺伝子発現プロファイルの違いを解明するために、RNA シークエンスに提出した。遺伝子発現の差異を検討したところ、細胞外マトリクスや血管新生、線維化に関わる遺伝子の発現に比較的大きな違いを認めた(図 3)。さらに次に、SNP の有無にて肝線維化に違いを起こす原因遺伝子を同定するために、SNP の有無で発現に差を認めた遺伝子を抽出したところ、MMP28 という遺伝子が同定された。MMP28 の Variant-iHSC での機能を評価するために、siRNA を導入することで、MMP28 の発現を抑制することとした。siRNA を導入することで、MMP28 の発現を抑制することを確認した。MMP28 の発現を抑制すると、variant-iHSC の細胞増殖能および浸潤能は低下した。Variant-iHSC の MMP28 をノックダウンすると、TGFβ で刺激後の αSMA や Collagen 1 A 1 の発現は上昇せず、EMT も惹起されなかった。

iPS 細胞にて遺伝子改変技術を応用して、PNPLA3 SNP のみ違う 2 つの iPS 細胞を作成し、その細胞から肝線維化に関わっている肝星細胞を作成した。この細胞らは、星細胞への分化や活性化していないときには、ほぼ同じ程度の星細胞活性化遺伝子の発現をしていた。しかしながら、一旦、TGF にて活性化すると、その活性化マーカーの発現や肝線維化を惹起するサイトカインの分泌量は、SNP を持った iHSC が有意に高くなっており、この違いが、PNPLA3 SNP に由来にする NASH 発症に関わっていることが示唆された。さらに RNA シークエンスを行うこと

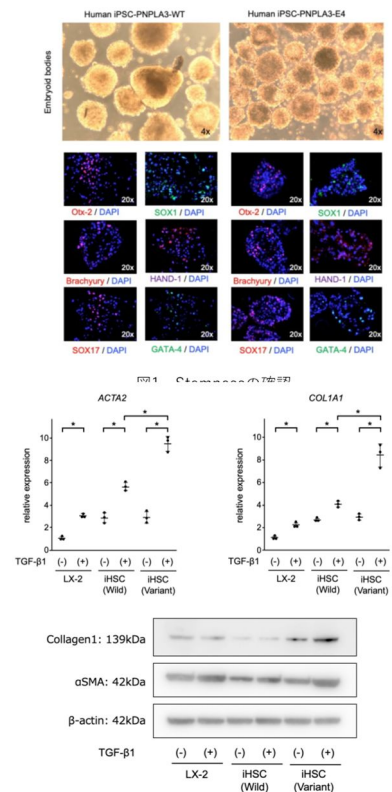


図2 PNPLA3 SNP有無での肝線維化マーカー発現の比較

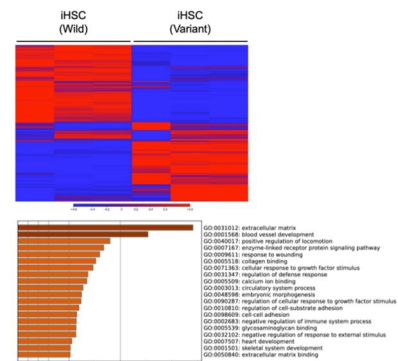


図3 RNAシークエンスによるRNA発現プロファイルの比較

で、多くの肝線維化や血管増生、細胞外マトリックスの蓄成に大きく差があることがわかった。RNA シークエンスの結果より、MMP28 を同定し、siRNA にてノックダウンすることで、PNPLA3 SNP を持った iHSC の活性化がキャンセルされ、今後、治療ターゲットになるかどうか、さらなる検討を進め、PNPLA3 SNP に起因する NASH の治療薬を開発する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPSの肝細胞への共培養による分化誘導と人工肝臓の臨床応用への展開
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPS由来人工肝臓による肝不全治療への応用および遺伝子改変による脂肪肝モデルの再現
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来人工肝臓の作成と免疫不全ラットを用いたiPS由来肝細胞大量培養システム構築による肝不全治療への展開
3. 学会等名 第15回 ラットリソースリサーチ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 完全iPS細胞による移植可能な人工肝臓の作成と今後の臨床応用への展望
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 移植可能完全ヒトiPS細胞由来人工肝臓の機能解析と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第107回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPSの肝細胞への共培養による分化誘導と人工肝臓の臨床応用への展開
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPS由来人工肝臓による肝不全治療への応用および遺伝子改変による脂肪肝モデルの再現
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来人工肝臓の作成と免疫不全ラットを用いたiPS由来肝細胞大量培養システム構築による肝不全治療への展開
3. 学会等名 第15回 ラットリソースリサーチ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 完全iPS細胞による移植可能な人工肝臓の作成と今後の臨床応用への展望
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武石 一樹
2. 発表標題 移植可能完全ヒトiPS細胞由来人工肝臓の機能解析と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第107回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING LIVER DISEASE	発明者 武石一樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US2020/055500	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	三森 功士 (Mimori Koushi) (50322748)	九州大学・大学病院・教授  (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴 (Tomoharu Yoshizumi) (80363373)	九州大学・医学研究院・教授  (17102)	

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