

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：83712

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791051

研究課題名(和文) L アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎に対する新規試験管内疾患モデルの開発

研究課題名(英文) Development of novel disease modeling for L-asparaginase associated acute pancreatitis

研究代表者

船戸 道徳 (FUNATO, Michinori)

独立行政法人国立病院機構長良医療センター(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：30420350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎は医薬品の致死的な副作用の一つである。それ故、その発症要因を解明するための簡便なアッセイ系の開発が必要不可欠である。これまでの研究で以下のことを明らかにした。1) L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の既往を有する患者2例からiPS細胞を樹立した。2) 既報の分化誘導法を改良し、高効率な膵臓前駆細胞の作製に成功した。3) 高速スクリーニングにより、膵臓前駆細胞から膵外分泌細胞へ選択的に分化誘導する低分子化合物を見いだすことに成功した。4) この化合物はindolactam Vとの併用効果を示した。

研究成果の概要(英文)：L-asparaginase-associated pancreatitis is occasionally life-limiting, thus cell-based assay may be helpful to understand the mechanism of the important problem. Currently, we established iPS cells from two females with a history of L-asparaginase-associated pancreatitis. In addition, we modified previously reported differentiation protocol to pancreatic lineage on the basis of developmental biology insight, and have succeeded in the efficient generation of pancreatic progenitor cells. Furthermore, we have performed high-throughput screening of chemical compounds and identified a small molecule to efficiently induce pancreatic progenitor cells into pancreatic exocrine lineages. The small molecule expands differentiated pancreatic exocrine cells, and acts synergistically with indolactam V.

研究分野：小児消化器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性膵炎 iPS細胞 分化誘導法

1. 研究開始当初の背景

医薬品の副作用は、薬物代謝・動態関連分子や薬物標的分子の遺伝子多型、ならびにそれらの発現に影響する環境要因が複雑に関連している。このため、これまでの動物モデルや入手可能なヒト試料を用いた実験では種差や個体差の違い等の問題により限界を有していた。近年、ヒト幹細胞由来の分化細胞を用いたアッセイ系の開発が進められており、そのアッセイ系を用いた多くの医薬品の薬物動態の解明に期待が寄せられている。このような背景のもと、筆者はこれまでの臨床経験の中で、早期発見と対症療法に努めるしか手だてのない L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎に着目した。

L-アスパラギナーゼは、1971年に急性リンパ性白血病の治療に導入されて以来、特に高危険群やT細胞型急性リンパ性白血病の予後を著明に改善し、その有効性や重要性には疑いが無い。しかしながら、使用開始後30年以上が経つ現在においても、その薬物動態が明らかではなく、使用中に約半数の患者が過敏反応をはじめとするさまざまな副作用を起こし、中でも、最も重篤な致死の副作用として文献上約2-18%の患者に急性膵炎を発症させる。

このL-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎に関して、これまでに投与量や回数、投与時期などの発症要因が統計的に検討されてきたが、明確な結論までには至っていない(Knoderer HM et al. 2007)。

そこで、その発症要因を解明するための簡便なヒト幹細胞由来のアッセイ系の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト幹細胞技術を用いて医薬品の致死の副作用の一つである薬剤性急性膵炎の発症要因を解明し、その予測法を確立することである。特にL-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎に焦点を絞り、まず患者由来人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS細胞)から分化誘導した膵外分泌細胞を用いて急性膵炎の試験管内疾患モデルを構築する。次にこのアッセイ系を用いて薬剤性急性膵炎の発症要因の解明および予測法を確立する。最終的には本研究の成果を医薬品の安全かつ効率的な開発、さらには広く難治疾患である急性膵炎の発症メカニズムの解明や治療法の開発に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

本研究計画は、L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の発症要因の解明および発症予測法の確立を目指し、まず薬剤性膵炎の既往を有する患者iPS細胞由来の膵外分泌細胞を用いて薬剤性急性膵炎の試験管内疾患

モデルの構築を行う。その後、このアッセイ系を用いて薬剤性急性膵炎の発症要因を解明し、臨床データとの統計学的解析を行い、発症予測法を確立する。研究計画を図1に示す。

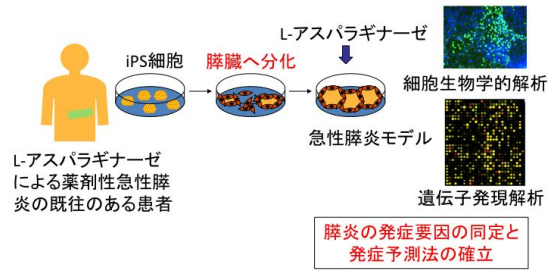


図1 研究計画

具体的な研究計画は、以下の4つである。

L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の既往を有する患者からの疾患特異的iPS細胞樹立

ヒト幹細胞から高効率に膵外分泌細胞を作製する分化誘導法の開発

患者iPS細胞由来の膵外分泌細胞を用いた急性膵炎の試験管内疾患モデルの構築

L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の発症要因の解明に向けた基盤研究の開始

4. 研究成果

1) L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の既往を有する患者から疾患特異的iPS細胞の樹立

L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の既往を有する患者2例(13歳女性と21歳女性)からiPS細胞を樹立した。1例はレトロウイルスベクターにより初期化誘導4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)を、もう1例はエピゾーマルベクターにより初期化誘導6因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53shRNA)をそれぞれの線維芽細胞へ遺伝子導入し、疾患特異的iPS細胞を樹立した。図2に示す。

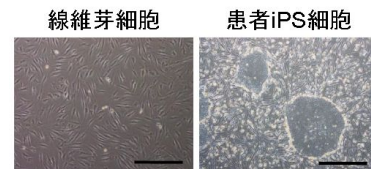


図2 患者iPS細胞

これまでに、導入遺伝子のサイレンシング、分化誘導効率の評価、未分化マーカーの解析、核型解析、Short tandem Repeat解析、胚様体形成の評価、テラトーマ形成による評価等が終了した。図3、4に示す。

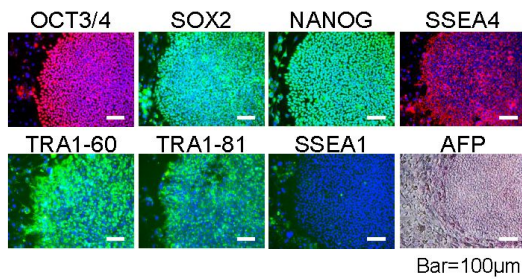


図3 未分化マーカーの発現

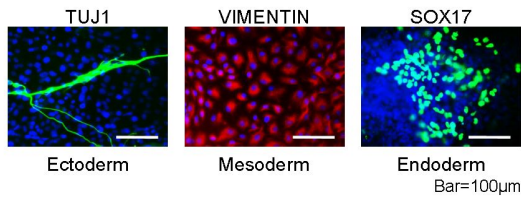


図4 胚様体形成による多分化能

2) ヒト幹細胞から高効率に膵外分泌細胞を 作製する新規の分化誘導法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究により既報の膵内分泌細胞の分化誘導法(Chen et al. 2009)を以下の方法で改良し、新規の膵外分泌細胞の分化誘導法を開発した。

高効率な膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)の作製に成功

試験管内でコロニー状態にあるヒト幹細胞を単一細胞に解離させ分化誘導する方法を開発し、さらに加える液性因子や化合物の組み合わせを若干変えることによって、80%以上の高効率な膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)の作製に成功した。

膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)から膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)に分化誘導する低分子化合物の探索に成功

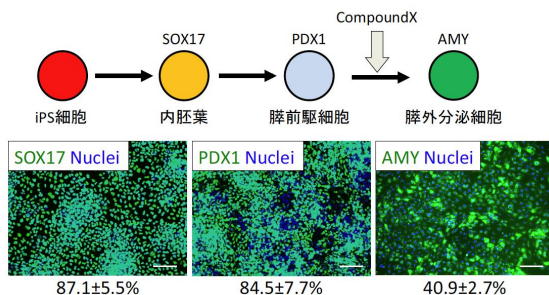


図5 新規の膵外分泌細胞の分化誘導法

ヒト iPS 細胞から作製した膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)と京都大学 iPS 細胞研究所が所有する化合物ライブラリーおよびそのスクリーニング設備を用いて、膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)から膵外分泌細胞(AMY 陽性

細胞)に選択的に分化誘導する低分子化合物(CompoundX)を見いだすことに成功した。その成果を図5に示す。

作製した膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)において膵外分泌細胞系譜の遺伝子の発現を確認

発見した CompoundX を用いて分化誘導した膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)において、消化酵素(AMY2A, PRSS1)や蛋白分解酵素(CPA1, ELA2A)に関連する膵外分泌細胞系譜の遺伝子の発現を確認した。

作製した膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)の生理機能を確認

分化誘導した膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)の生理機能を多方面から確認しており、これまでに培養上清中に生理機能を有するアミラーゼ蛋白が分泌されていることと透過型電子顕微鏡を用いて細胞質に分泌顆粒が存在することを確認した。

indolactam V との併用効果を確認

高速スクリーニングにより見出した低分子化合物(CompoundX)と膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)を作製の際に使用する indolactam V(プロテインキナーゼ C の活性化物質)を併用することで膵外分泌細胞の作製がさらに高効率になることを見出した。

患者疾患特異的 iPS 細胞から膵外分泌細胞の作製に成功

新規に開発した膵外分泌細胞の分化誘導法を用いて、L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の既往を有する患者疾患特異的 iPS 細胞から膵外分泌細胞(AMY 陽性細胞)の作製に成功した。

今後については、以下の研究計画をさらに進めていく。

ヒト幹細胞由来の膵外分泌細胞の生理機能解析

患者 iPS 細胞由来の膵外分泌細胞を用いた薬剤性急性膵炎の試験管内疾患モデルの構築

L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の発症要因の解明

日本小児白血病研究会との共同研究による臨床データの統計学的解析

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Michinori Funato, Taro Toyoda, Yasushi Kondo, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Keisuke Okita, Isao Asaka, Motonari Uesugi, Zen-ichiro Kato, Akira Ohta, Shinya Yamanaka, Naomi Kondo, Kenji Osafune. Development of an efficient differentiation method from iPSCs/ESCs into pancreatic exocrine lineages towards novel pancreatic disease models. ISSCR 11th Annual Meeting. June 12-15, 2013. Boston, USA.

船戸道徳、豊田太郎、近藤恭士、細川吉弥、須藤智美、沖田圭介、浅香勲、上杉志成、加藤善一郎、太田章、山中伸弥、近藤直実、長船健二：病態解析に向けたヒト iPS/ES 細胞から膵外分泌細胞への高効率分化誘導法の開発 日本再生医療学会総会(第12回) 2013年3月22日 横浜

船戸道徳、豊田太郎、近藤恭士、細川吉弥、須藤智美、沖田圭介、浅香勲、上杉志成、加藤善一郎、太田章、山中伸弥、近藤直実、長船健二：病態モデル作製に向けたヒト iPS/ES 細胞から膵外分泌細胞への高効率分化誘導法の開発 日本再生医療学会総会(第13回) 2014年3月6日 京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称：膵外分泌細胞の誘導方法
発明者：長船健二/船戸道徳/西野憲和
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：61/745,945
出願年月日：2012/12/26
国内外の別：米国

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船戸道徳 (FUNATO, Michinori)
国立病院機構長良医療センター臨床研究部・再生医療研究室 室長
研究者番号：30420350

(2) 研究協力者

長船健二 (OSAFUNE, Kenji)
京都大学 iPS 細胞研究所 准教授
研究者番号：80502947