

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：83712

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860838

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発症予測法の開発

研究課題名(英文)Understanding the pathogenesis of L-asparaginase-associated 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) 2,900,000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) 既報の分化誘導法を改良し、新規の膵外分泌細胞の分化誘導法を構築した。2) ヒトiPS細胞由来の膵外分泌細胞が生理機能を有するアミラーゼ蛋白を合成及び分泌することを確認した。また、この膵外分泌細胞が発生期の形態形成に関わることも確認した。3) 先天性膵外分泌機能不全(ダイヤモンド・ブラックファン貧血)の患者由来のiPS細胞を用いて試験管内疾患モデルを構築した。

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 efficient differentiation methods for pancreatic exocrine acinar cells from human iPSCs by identifying a small molecule. The induced exocrine acinar cells showed the synthesis and release of functional alpha-amylase protein, and contributed morphogenesis of acinar structure formation. Furthermore, we established in vitro disease models by applying iPSCs derived from the patient with Shwachman-Diamond syndrome, a congenital disorder characterized by exocrine insufficiency.

研究分野：小児消化器病学

キーワード：急性膵炎 iPS細胞 膵外分泌機能不全 疾患モデル

## 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並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、医薬品の副作用を解析するには限界を有していた。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、最も重篤な致死的副作用として文献上約2-18%の患者が急性膵炎を発症する。

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学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、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及び発症予測法の確立を行うことは必要不可欠なことである。発症要因を解明することや発症予測法を確立することで、治療法や使用薬物の選択、投薬量の調整、予測された副作用に対する事前あるいは極めて早期からの対応が可能となり、安全な治療が可能になることはもちろん、何より治療プロトコル遂行に有用と考えられる。

## 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的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にある。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及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及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。

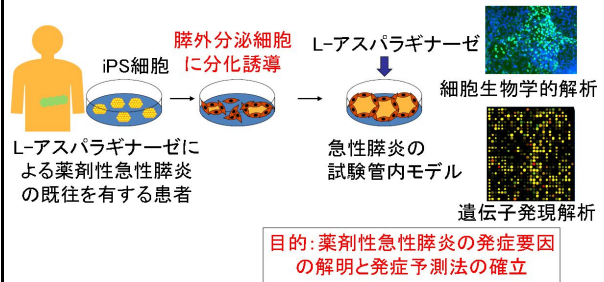


図1 研究計画

これまでの若手研究(B)(H24-25)において、京都大学iPS細胞研究所(長船研究室)との共同研究により以下の所見を見出した。

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(図2)。

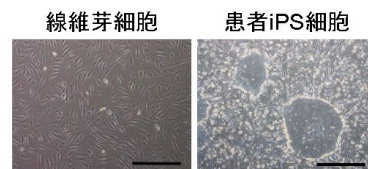


図2 患者iPS細胞

正常の膵臓発生を模倣した3つのステップ(ヒト幹細胞 胚体内胚葉 膵前駆細胞 膵外分泌細胞)から構成される新規の分化誘導法を開発する目的で、京都大学iPS細胞研究所が所有する増殖因子と低分子化合物ライブラリーを高速スクリーニングにて探索し、膵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(Compound X)を見いだした(図3)。

高速スクリーニングにより見出した低分子化合物(Compound X)と膵前駆細胞を作製する際に使用する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、最大で約60%の高効率に膵外分泌細胞が誘導されることを見出した。

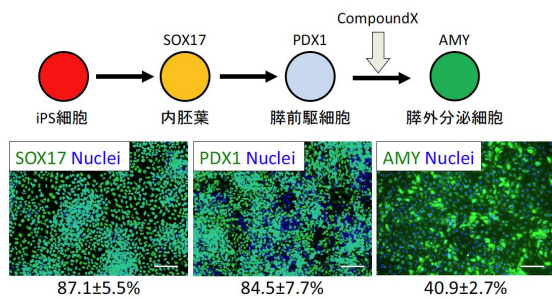


図3 新規に開発した膵外分泌細胞の分化誘導法

新規に開発した分化誘導法で作製した膵外分泌細胞が生理機能を有することを多方面から確認しており、これまでに膵外分泌細胞系譜の遺伝子が発現していること、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ること、さらに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。

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 iPS 細胞から膵外分泌細胞の作製に成功した(図3)。

#### 4. 研究成果

##### 1) ヒト幹細胞由来の膵外分泌細胞の生理機能の解析

###### 膵外分泌刺激機構の検討

これまでの膵外分泌刺激機構に関する研究では、特に、げっ歯類の膵外分泌細胞を用いて、コレシストキニンAレセプターとコレシストキニンに親和性の弱いコレシストキニンBレセプター、さらにはアセチルコリンレセプターを介した膵分泌刺激実験が行われてきた(Phillips et al. 2010)。一方、ヒトの膵外分泌細胞ではコレシストキニンAレセプターが欠損しており、主にコレシストキニンBレセプターとアセチルコリンレセプターによって膵外分泌機構が制御されていることが報告されている(Ji B et al. 2004)。そこで、まず、新規の分化誘導法で作製したヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞がこのコレシストキニンBレセプターとアセチルコリンレセプターを発現しているかどうかを調べ、作製した膵外分泌細胞にはこれらのレセプターが発現していることを確認した(図4)。

次に、京都大学大学院工学研究科(森研究室)との共同研究で、コレシストキニンやアセチルコリン刺激により、ヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞内のカルシウム濃度が上昇するかどうか調べ、期待通り反応することを確認した。

最後に、これらの刺激により、試験管内で

アミラーゼや蛋白分解酵素(トリプシンやプロテアーゼなど)などの消化酵素の分泌量が上昇するかどうか調べたが、分泌量の増加は確認出来なかった。

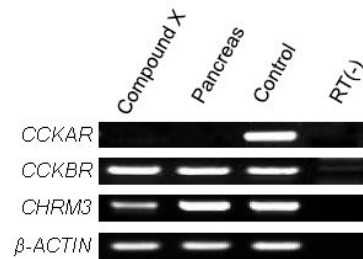


図4 コレシストキニン及びアセチルコリンに対する受容体の発現解析

##### 膵外分泌細胞の成熟化に関する検討

上述のように、コレシストキニンやアセチルコリンのような膵外分泌刺激機構に十分なアミラーゼ分泌の上昇反応が認められなかった原因の一つとして、作製した膵外分泌細胞の未熟化が考えられた。

そこで、誘導した膵外分泌細胞の成熟化を添加する成長因子の最適化や培養期間の検討などにより試みた。まず、これまでに膵外分泌細胞の長期培養に効果を示すと報告された epidermal growth factor (EGF), CCK8, basic fibroblast growth factor (bFGF), follistatin, dexamethasone, FGF7、さらにこれらの組み合わせを検討した結果、EGF と bFGF の添加により、膵外分泌細胞の培養が維持できることを確認した。次に、最適な日数を検討した結果、7 日間の培養期間が限界であることを確認した。最終的に、誘導した膵外分泌細胞を、EGF と bFGF の添加により7日間培養した細胞で、コレシストキニンやアセチルコリンに対する分泌刺激反応が得られるかどうか検討したが、反応は認められなかった(図5)。

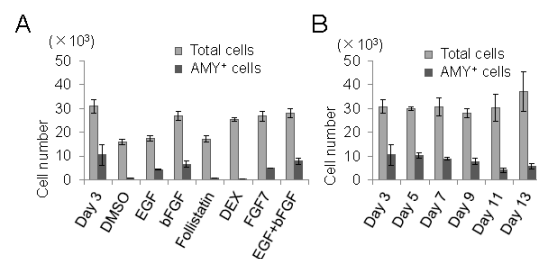


図5 膵外分泌細胞の成熟化

試験管内の解析においては、げっ歯類の膵外分泌細胞と異なりヒトの膵外分泌細胞の分泌刺激機構はいまだ未解明な部分も多く、今後のさらなる課題と考えられた。



作製した膵外分泌細胞の発生期における形態形成に関する検討

ヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞は試験管内において、既報のヒト膵外分泌細胞の反応と同様に、その分泌刺激機構に対して、十分な反応が得られなかった。そこで、作製した膵外分泌細胞の特徴をさらに別角度から検討するため、発生期における膵臓の形態形成に関わる特徴を解析した。方法は、胎生期 (E14.5) のマウスの膵外分泌細胞とヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞をそれぞれ分離した後、再度、共培養により胚様体を形成し、1 週間器官培養を行った。結果、ヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞がマウスの膵外分泌細胞とともに線房構造を示すことを確認した (図 6)。

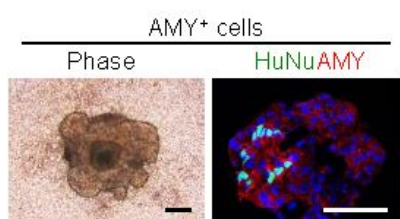


図 6 ヒト iPS 細胞由来の膵外分泌細胞の線房構造

先天性膵外分泌機能不全 (ダイヤモンド・ブラックファン貧血) の患者由来の iPS 細胞を用いた疾患の解析

ここまでの研究により、作製した膵外分泌細胞が十分な分泌刺激機構を有しないことから、すぐに L-アスパラギナーゼによる薬剤性急性膵炎の患者 iPS 細胞由来の膵外分泌細胞を用いて、新規の薬剤性急性膵炎の試験管内疾患モデルを構築することは極めて難しいと判断した。

そこで、先天性膵外分泌機能不全 (ダイヤモンド・ブラックファン貧血) の患者由来 iPS 細胞を用いて、その疾患を解析できるかどうか検討を行なった。

まず、骨髄不全、骨格異常、そして膵外分泌機能不全の症状を有し、SBDS 遺伝子に複合ヘテロ接合体変異 (c.258+2T>C, c.97A>G) を有するダイヤモンド・ブラックファン貧血患者 1 例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。患者血液細胞にエピソードベクターにより初期化誘導 6 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53shRNA) を導入し、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

次に、新規に開発した膵外分泌細胞の分化誘導法を用いて、ダイヤモンド・ブラックファン貧血患者疾患特異的 iPS 細胞から膵外分泌細胞が作製出来ることを確認した。

最後に、ダイヤモンド・ブラックファン貧

血患者疾患特異的 iPS 細胞由来の膵外分泌細胞の特徴を解析したところ、試験管内で死細胞が増加していること、蛋白分解酵素阻害剤を添加することでその死細胞が減少することを確認した。

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 4 件)

船戸道徳 ヒト iPS 細胞技術を用いた膵外分泌細胞の高効率分化誘導法の構築と応用 SMA 研究協議会 (第 30 回) 2015 年 7 月 5 日 岐阜

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

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 11<sup>th</sup> 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

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(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

〔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