

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K10546
研究課題名(和文) 家族性大腸腺腫症(FAP)に対する患者iPS細胞を用いた創薬モデルの開発

研究課題名(英文) FAP

研究代表者
中村 泉(Nakamura, Izumi)
福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80423804
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：【背景と目的】家族性大腸腺腫症(FAP)は大腸ガンを生じる常染色体優性の遺伝性疾患である。FAPの原因はAPC遺伝子の変異であるがその分子標的薬は開発されていない。本研究ではFAPを標的とした創薬モデルの構築を行う。【結果】FAP患者の単核球よりiPS細胞(FB5)を20株樹立した。このうち5株がiPS細胞としての品質基準を満たした。【結果】発生過程を模倣することでiPS細胞から大腸上皮細胞の分化誘導法の確立を目指した。これまでに中・後腸細胞までの分化誘導に成功した。【まとめ】最近大腸上皮細胞への分化誘導法が報告された。今後はその最適化によりFB5より創薬モデルを確立する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：樹立したFAP特異的iPS細胞を用いてFAPモデルを確立することで、FAPの初期段階であるポリープ形成機構を遺伝子レベルで詳細に解析することが可能になる。また他のガンドライバー遺伝子の強制発現系と組み合わせることで、ポリープから発ガンに至る過程を詳しく解析することも可能である。社会的意義：FAPモデルが最終的に確立できた場合、本細胞モデルはFAPの大腸上皮組織における過剰増殖を抑制するための低分子化合物をスクリーニングするためのモデル細胞として利用できる。また本細胞モデルはFAPの原因遺伝子であるAPC変異をゲノム編集によって正常化するための実証試験モデルとしても利用できる。

研究成果の概要(英文)：[Background and Objectives] Familial colorectal adenomatosis (FAP) is an autosomal dominant inherited disease that causes colon cancer. The cause of FAP is a mutation in the APC gene, but its molecular target drug has not been developed. In this study, we will construct a drug discovery model targeting FAP. [Results 1] 20 iPS cells (FB5) were established from monocytes of FAP patients. Of these, 5 strains satisfied the quality standards for iPS cells. [Result 2] We aimed to establish a method for differentiating iPS cells into colon epithelial cells by mimicking the developmental process. So far, we have succeeded in inducing iPS cells into the middle and hindgut cells. [Summary] Recently, a method for differentiating iPS cells into colon epithelial cells has been reported. In the future, we plan to establish a drug discovery model from FB5 by optimizing it.

研究分野：外科学

キーワード：家族性大腸腺腫症 FAP iPS細胞 分化 創薬モデル 遺伝性疾患 ポリープ 大腸ガン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【背景】家族性大腸腺腫症(FAP)は 百個以上の腺腫性ポリープが結腸と直腸に生じ、さらにそのポリープから大腸ガンが生じる常染色体優性の遺伝性疾患である。その発生頻度は8,000～14,000人に一人であり、そのほぼ全ての患者は40歳までに結腸がんを発症するため、通常、診断時に大腸全摘術を行う。FAPの原因はがん抑制遺伝子であるWNTシグナリング経路関連タンパクをコードするAdenomatous polyposis coli (APC)における突然変異である。APCのWNTシグナリング経路における役割は以下の通りである。カノニカルWNTシグナリングを受容体から細胞核内に伝達するための分子はbeta-cateninである。このbeta-cateninはリガンド不在時にはbeta-catenin分解複合体(GSK3-beta, Axin, APCによって構成)中のGSK3によるリン酸化を受け更にプロテアソーム分解を受けるためその細胞質における濃度は低く維持される。一方、リガンド存在時にはAxinはWNT受容体と好んで結合しAxin-受容体複合体を形成するためbeta-catenin分解複合体は維持できなくなり、beta-cateninは分解されず細胞質内に蓄積される。最終的にbeta-cateninは核移行して転写因子(LEF1/TCF1)と結合し標的遺伝子群の転写を活性化する。このbeta-catenin破壊複合体において、11のbeta-catenin結合ドメインと3つのAxin結合ドメインを有するAPCは、beta-cateninとAxinが会合するための足場を提供しAxin上にリクルートされたGSK3によるbeta-cateninのリン酸化を高度に促進する。FAPでは、APC遺伝子における突然変異によって短縮され機能不全なタンパクが産生される。この変異型APCタンパクはbeta-catenin破壊複合体の形成を促進できないのでbeta-cateninは細胞質内に蓄積しリガンド非依存的にWNTシグナリング経路が活性化される。その結果、大腸上皮におけるポリープ形成が生じると考えられている。これまでにWNTシグナル伝達経路に関するアゴニスト、アンタゴニストはすでに数多く開発されている。しかしFAPにおける正常APCの欠乏状態を改善するための実用レベルの低分子化合物はまだ開発されていない。

2. 研究の目的

【目的】FAPを標的とした治験薬をスクリーニングするための細胞モデルの構築を行う。そのために、以下のサブテーマに関して研究を実施する。 FAP特異的iPS細胞の樹立 iPS細胞から大腸上皮細胞の分化誘導法の確立 FAP細胞モデルの構築。

3. 研究の方法

(3-1). iPS細胞の樹立および品質評価。

FAP患者由来の血液より密度勾配遠心法により単核球を単離した。この単核球にYamanaka 4 factorsを発現する組換えセンダイウイルスベクター(SeV)法を感染させ、フィーダー細胞(マウス繊維芽細胞)上に低密度で播種した。専用培地で14日間培養しコロニーを形成させiPS細胞の候補となるクローンをクローニングした。樹立したiPS細胞が実用水準であるのかを判定するための品質評価項目は以下の通りである。SeV陰性。マイコプラズマ陰性。コロニーの形態学的特徴がiPS細胞のそれと同一であること。RT-PCR解析により9種類の多能性マーカーが全て発現すること。蛍光免疫法により4種類の多能性マーカーが全て発現しアルカリフォスファターゼ(ALP)陽性であること。

(3-2). iPS細胞からの段階的分化誘導

分化誘導培地はLohr et al.が開発したXeno-free基本培地CDM2をベースにした。前方原条分化誘導培地(APS-medium)はActivin, CHIR99021, PI-130を含む。内胚葉分化誘導培地(DE-medium)はActivin, LDN-193189を含む。中後腸分化誘導培地(MHG medium)はBMP4, CHIR99021,

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

FGF2 を含む。

(3-3). 分化状態の蛍光免疫法による定量解析

細胞試料は 4%PF/PBS で固定/洗浄/ブロッキング後、分化マーカーに対する特異的抗体 (一次抗体) を用いて抗原抗体反応させ、翌朝、蛍光標識化種特異的二次抗体を用いて一次抗体を検出した。陽性細胞の定量解析は ImageJ を用いた。

4 . 研究成果

【結果】 FAP 特異的 iPS 細胞の樹立

FAP 患者より単離した単核球を Yamanaka factors 発現-センダイウイルスベクター (SeV) でリプログラミングし iPS 細胞 (FB5 候補群) を 20 株樹立した。そのうち 9 株 (#1-1, #1-5, #1-6, #1-7, #2-2, #2-6, #3-1, #3-6, #3-7) が SeV 陰性かつマイコプラズマ陰性であったため増幅して凍結保存した。次にこの 9 株の FB5 群について品質検査を実施した。まず全てのクローンが iPS 細胞に固有の形態学的特徴を示すこと、RT-PCR 解析により 9 種類の多能性マーカー群 (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC, NANOG, REX1, SALL4, GDF3, DNMT3B) を発現していることを確認した。さらに、FB5 群のうち特に状態が良い 5 株 (#2-2, #2-6, #3-1, #3-6, #3-7) について、蛍光免疫染色法により 4 種類の多能性マーカー群 (NANOG, OCT4, SSEA4, TRA-1-60) を発現し ALP 活性を有することを確認した。このことは少なくとも 5 株の FAP 特異的 iPS 細胞を樹立できたことを示す。

【結果】 iPS 細胞から大腸上皮細胞の分化誘導法の確立

哺乳類の大腸発生過程を模倣することで iPS 細胞から大腸上皮細胞の分化誘導法の確立を目指した。これまでの発生学的知見に基づく、iPS 細胞から大腸上皮細胞を分化誘導するには、以下の 3 つの発生段階 (①胚盤胞細胞 (iPS 細胞) -> 内胚葉細胞 -> 中・後腸細胞 -> 後腸細胞 -> 大腸上皮細胞) を経る必要がある。第 1 段階である内胚葉細胞の分化誘導は Lohr et al. (2014) を参考にし FOXA2/SOX17 二重陽性を指標にした。iPS 細胞を APS 培地で 24 時間、DE 培地でさらに 24 時間培養すると 90% の細胞が FOXA2/SOX17 二重陽性を示した。第 2 段階である中・後腸細胞の分化誘導は Lohr et al. (2014) を参考にし CDX2/HOXD13 を指標にした。内胚葉細胞を MHG 培地で 4 日間培養すると、20-30% の細胞が CDX2/HOXD13 二重陽性を示した。以上の結果は、中後腸内胚葉の分化誘導が可能であることを示している。

【結果】 FAP 細胞モデルの構築

iPS 細胞から大腸上皮細胞を分化誘導するためのプロトコルは完成していないため、FAP モデルはまだ構築できていない。

【まとめと今後の展望】 最近 iPS 細胞から大腸上皮細胞への分化誘導法が報告され、それに基づいた分化キットが市販された。今後はキットを用いることで FAP 特異的 iPS 細胞を大腸上皮細胞系列に分化させることができるだけ早期に実現し FAP 創薬モデルを確立する予定である。

本研究の学術的意義は以下の通りである。樹立した FAP 特異的 iPS 細胞を用いて FAP モデルを確立することで、FAP の初期段階であるポリープ形成機構を遺伝子レベルで詳細に解析することが可能になる。また他のガンドライバー遺伝子の強制発現系と組み合わせることで、ポリープから発ガンに至る過程を詳しく解析することも可能である。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

また社会的意義は以下の通りである。FAP モデルが最終的に確立できた場合、本細胞モデルは、FAP の大腸上皮組織における過剰増殖を抑制するための低分子化合物をスクリーニングするためのモデル細胞として利用できる。また本細胞モデルは FAP の原因遺伝子である APC 変異をゲノム編集によって正常化するための実証試験モデルとしても利用できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 該当なし	4. 巻 該当無し
2. 論文標題 該当なし	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 該当無し	6. 最初と最後の頁 該当無し
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 培養細胞の生産方法	発明者 横内裕二、江良択 実、鈴木真一	権利者 福島県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-042383	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

福島県立大学 医学部 講座・部門紹介 甲状腺内分泌学講座 http://www.fmu.ac.jp/cms/dte/index.html

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	竹之下 誠一 (Taknoshita Seiichi) (10167489)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石亀 輝英 (Ishigame Teruhide) (50583358)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	野田 勝 (Noda Masaru) (50769643)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	横内 裕二 (Yokouchi Yuji) (60252227)	福島県立医科大学・医学部・博士研究員 (21601)	