

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15421

研究課題名(和文) 遺伝性膵炎患者由来iPS細胞を用いたヒト膵炎細胞モデルの構築と創薬への応用

研究課題名(英文) Establishment of hereditary pancreatitis patient-derived iPS cells

研究代表者

正宗 淳 (Masamune, Atsushi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90312579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は膵炎関連遺伝子異常を有する患者由来iPS細胞作成・腺房細胞への分化誘導法開発である。まず、遺伝性膵炎患者よりインフォームドコンセントに基づき採取した末梢血を用いて研究を実施した。末梢血より単核球を分離し、初期化6因子を遺伝子導入してiPS細胞を樹立した。検体採取を行ったすべての患者でiPS細胞の樹立が可能であり、細胞株として維持・保存した。二次元培養条件下での分化誘導法スクリーニングにより、新規低分子化合物を用いた誘導条件でアミラーゼ等膵腺房細胞マーカー発現が認められることを確認した。最終分化誘導には課題を残したが、遺伝的素因を有する膵炎患者のiPSライブラリー化を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は指定難病でもある遺伝性膵炎を含め、遺伝的素因により発症する膵炎患者においてiPS細胞を作成し、機能解析に供することのできる基盤形成につながった。通常の検査に附随して得られる末梢血検体からの樹立が可能であり、施設間連携の点からも疾患特異的iPS細胞樹立のためのモデルの一つになりうると考えられる。既知遺伝子のみならず、原因遺伝子が不明なケースについてもiPS細胞化により将来の解析に備えることが可能となった点は意義深い。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the current study is to establish iPS cells from patients with gene mutation related to chronic pancreatitis. In addition, we tried to establish a novel protocol to differentiate iPS cells into mature pancreatic acinar cells. We obtained peripheral blood mononuclear cells from blood samples of patients who agreed participation, with a written informed consent. Introduction of Yamanaka factors led to the formation of iPS cells in all of the patients. Established iPS cells were cultured and stored for further usage. A novel differentiation protocol using small molecule agents was established by the 2D-culture based drug screening. This protocol induced acinar cell marker, such as amylase, in iPS cells. However, final differentiation protocol into mature acinar cells has not yet been established. The current study enabled iPS cell library from patients with pancreatitis caused by genetic burden.

研究分野：消化器内科

キーワード：遺伝性膵炎 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵消化酵素の異所性活性化と膵炎

膵炎の本態は膵消化酵素の異所性活性化による膵臓の「自己消化」と捉えられる。膵炎の病態解明には、膵腺房細胞内における消化酵素の活性化や細胞内シグナル伝達機構などの解析が重要である。しかし、生体から十分な量のヒト膵組織を得ることは困難で、分離したヒト膵腺房細胞もごく短期間しか生存しない。このため実用的なヒト膵炎細胞モデルは存在しておらず、ラットやマウスから分離した膵腺房細胞を用いて行われてきた。しかし、ヒト同様に膵腺房細胞の細胞寿命が非常に短く継代不可能であること、さらに膵外分泌刺激に対するコレシストキニン受容体などの発現がヒトと異なるという大きな問題点がある (Case, Pancreatology 2006)。

(2) 膵炎関連遺伝子異常

膵炎の成因としてはアルコール性が最多であるが、遺伝性膵炎を始めとして、その発症に遺伝的背景を有する症例がみられる。1996年に遺伝性膵炎の原因として、カチオニックトリプシノーゲン (PRSS1) 遺伝子変異が同定された (Whitcomb, Nat Genet 1996)。その後、トリプシン活性の20%を阻害する膵分泌性トリプシンインヒビター (SPINK1) 遺伝子異常やキモトリプシン C (CTRC) 遺伝子異常が報告された (Witt, Nat Genet 2000)。研究代表者は日本において膵炎関連遺伝子異常の系統的・網羅的解析が可能な唯一の施設として、長年この分野の研究ならびに臨床に従事してきた。2013年には国際共同研究として、膵消化酵素カルボキシペプチダーゼ A1 (CPA1) 遺伝子異常が若年性膵炎と関連することを明らかにした (Witt H, Nat Genet 2013)。さらに膵炎関連遺伝子異常を有する遺伝性膵炎や特異性膵炎患者を多数定期的に診療している。

(3) 人口多能性幹細胞 (iPS 細胞) 樹立技術の確立

山中らにより開発・確立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製技術により、患者を含む特定の個人由来の多能性幹細胞が樹立可能となった。神経疾患をはじめとして、患者から樹立された iPS 細胞 (疾患特異的 iPS 細胞) を用いた難治性疾患の病態解析、創薬、治療法開発が大きく期待されている。iPS 細胞樹立技術を用いることで膵炎関連遺伝子異常を有するヒト膵腺房細胞を大量に作成可能と考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

膵炎関連遺伝子異常を有する膵炎患者より樹立した疾患特異的 iPS 細胞を膵腺房細胞に分化誘導することにより、世界初の実用的なヒト膵炎細胞モデルを作成することが本研究の目的である。膵炎の本態は、膵腺房細胞内における膵消化酵素の異所性活性化による膵臓の自己消化とされる。ヒト膵組織は入手困難であり長期培養も出来ないことから、これまでヒト膵腺房細胞モデルは確立されていない。一方、遺伝性膵炎をはじめとした膵炎関連遺伝子異常を有する膵炎患者では、膵腺房細胞内でのトリプシンの活性化や不活性化機構に異常が生じ膵炎を発症する。すなわち、このような患者から樹立した iPS 細胞から膵腺房細胞を分化誘導すれば、膵炎特異的細胞モデルが作成できる。作成したモデルは膵炎の病態解明や治療薬開発につなげ、膵炎の克服を目指す。

3. 研究の方法

遺伝性膵炎患者由来 iPS 細胞樹立のため、当院通院中の遺伝性膵炎患者よりインフォームドコンセントに基づき採取した末梢血を用いて研究を実施した。末梢血より単核球を分離し、エピゾーマルベクターにより初期化 6 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, shp53) を遺伝子導入して iPS 細胞を樹立した。エピゾーマルベクターの染色体への組み込みがない iPS 細胞株を選択し、以後の分化誘導実験に供した。

4. 研究成果

(1) 患者検体の輸送と iPS 細胞株樹立

遺伝性膵炎患者由来末梢血検体を研究分担施設である京都大学 iPS 細胞研究所へ輸送し、上述の方法による初期化にて iPS 細胞化が可能であった。検体採取を行ったすべての患者で iPS 細胞の樹立が可能であり、細胞株として維持・保存した。

(2) 樹立 iPS 細胞のクオリティコントロール

患者より樹立した iPS 細胞を解析し、エピゾーマルベクターの染色体への組み込みがないこと、細胞株として維持培養が可能であるか確認した。すべての患者において、上記を達成する細胞株が 10 種類程度確保された。

(3) 患者由来 iPS 細胞を用いた分化誘導法開発

すでに確立された、二次元培養条件下での分化誘導法スクリーニングにより膵外分泌系譜細胞への誘導法を探索した。その結果、新規低分子化合物を用いた誘導条件でアミラーゼをはじめとする複数の膵腺房細胞マーカー発現が認められることを確認した。しかしながら同誘導法では遺伝性膵炎の原因遺伝子の一つである PRSS1 遺伝子の発現がみられず、PRSS1 機能異常の解析に適したモデルではないと判断した。

(4) PRSS1 発現組織の作製

iPS 細胞から膵前駆細胞までの invitro での分化誘導法を行った後に、独自の方法で更なる分化誘導を進めたところ、30 日程度で PRSS1 発現を認める膵外分泌組織様の構造体を作成することができた。しかしながら低分子化合物やサイトカインを用いて、本構造体を更に成長・増大させる手法の開発には至らなかった。

(5) 今後の展望

当初 iPS 細胞を作成した PRSS1 遺伝子変異を有する患者に加えて、他の遺伝子変異を有することを確認している膵炎患者からも iPS 細胞を樹立し、細胞株として維持・保存した。今後は明らかな遺伝的背景を有しながら既知の遺伝子異常が同定されない膵炎患者について、iPS 細胞株化による検体保存を行うことも考慮している。未知の原因遺伝子を含む膵炎 iPS 細胞ライブラリ構築は、病態解明のみならず遺伝子異常を直接ターゲットとする新規治療法開発のプラットフォームとなることが期待される。本研究計画の実施により特定済み遺伝子変異を持つ iPS 細胞株が複数作成できたことはその最初の一步であり、有意義な結果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. Lasher D, Szabó A, Masamune A, Chen JM, Xiao X, Whitcomb DC, Barmada MM, Ewers M, Ruffert C, Paliwal S, Issarapu P, Bhaskar S, Mani KR, Chandak GR, Laumen H, Masson E, Kume K, Hamada S, Nakano E, Seltsam K, Bugert P, Müller T, Groneberg DA, Shimosegawa T, Rosendahl J, Férec C, Lowe ME, Witt H, Sahin-Tóth M. *Am J Gastroenterol.* 2019 Feb 13. [Epub ahead of print] doi: 10.14309/ajg.0000000000000051. 査読有
2. Nationwide epidemiological survey of early chronic pancreatitis in Japan. Masamune A, Kikuta K, Nabeshima T, Nakano E, Hirota M, Kanno A, Kume K, Hamada S, Ito T, Fujita M, Irisawa A, Nakashima M, Hanada K, Eguchi T, Kato R, Inatomi O, Shirane A, Takeyama Y, Tsuji I, Shimosegawa T; Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases in Japan. *J Gastroenterol.* 52(8):992-1000, 2017 doi: 10.1007/s00535-017-1311-8. 査読有
3. Genome-wide association study identifies inversion in the CTBR1-CTBR2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. Rosendahl J, Kirsten H, Hegyi E, Kovacs P, Weiss FU, Laumen H, Lichtner P, Ruffert C, Chen JM, Masson E, Beer S, Zimmer C, Seltsam K, Algül H, Bühler F, Bruno MJ, Bugert P, Burkhardt R, Cavestro GM, Cichoż-Lach H, Farré A, Frank J, Gambaro G, Gimpfl S, Grallert H, Griesmann H, Grützmann R, Hellerbrand C, Hegyi P, Hollenbach M, Iordache S, Jurkowska G, Keim V, Kiefer F, Krug S, Landt O, Leo MD, Lerch MM, Lévy P, Löffler M, Löhr M, Ludwig M, Macek M, Malats N, Malecka-Panas E, Malerba G, Mann K, Mayerle J, Mohr S, Te Morsche RHM, Motyka M, Mueller S, Müller T, Nöthen MM, Pedrazzoli S, Pereira SP, Peters A, Pfützer R, Real FX, Rebours V, Ridinger M, Rietschel M, Rösmann E, Saftoiu A, Schneider A, Schulz HU, Soranzo N, Soyka M, Simon P, Skipworth J, Stickel F, Strauch K, Stumvoll M, Testoni PA, Tönjes A, Werner L, Werner J, Wodarz N, Ziegler M, Masamune A, Mössner J, Férec C, Michl P, PH Drenth J, Witt H, Scholz M, Sahin-Tóth M; all members of the PanEuropean Working group on ACP. *Gut.* 67(10):1855-1863, 2017 doi: 10.1136/gutjnl-2017-314454. 査読有
4. Nationwide survey of hereditary pancreatitis in Japan. Masamune A, Kikuta K, Hamada S, Nakano E, Kume K, Inui A, Shimizu T, Takeyama Y, Nio M, Shimosegawa T. *J Gastroenterol.* 53(1): 152-160. 2017 doi: 10.1007/s00535-017-1388-0. 査読有
5. No Association Between CEL-HYB Hybrid Allele and Chronic Pancreatitis in Asian Populations. Zou WB, Boulling A, Masamune A, Issarapu P, Masson E, Wu H, Sun XT, Hu LH, Zhou DZ, He L, Fichou Y, Nakano E, Hamada S, Kakuta Y, Kume K, Isayama H, Paliwal S, Mani KR, Bhaskar S, Cooper DN, Férec C, Shimosegawa T, Chandak GR, Chen JM, Li ZS, Liao Z. *Gastroenterology.* 150(7):1558-1560.e5, 2016 doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.071. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. Masamune A. Using genetics to identify novel therapeutic targets in pancreatitis. 2017 annual meeting of American Pancreatic Association. 2017年11月8日-11日 San Diego, USA
2. 正宗 淳 全国調査が明らかにする膵炎診療の実態と課題. 第48回日本膵臓学会大会 2017年7月15日 京都

3. Masamune A. Genetics of pancreatitis in Japan. PancreasFest 2016 年 7 月 27 日-29 日 Pittsburgh, USA

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：児玉 裕三

ローマ字氏名：Kodama, Yuzo

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：80378687

研究分担者氏名：長船 健二

ローマ字氏名：Osafune, Kenji

所属研究機関名：京都大学

部局名：iPS細胞研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：80502947

研究分担者氏名：濱田 晋

ローマ字氏名：Hamada, Shin

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：20451560

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。