

令和元年8月30日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21668

研究課題名(和文) 新規腸疾患モデルの構築と難治性腸管吸収不全症の解明

研究課題名(英文) Development of novel human intestinal disease model to elucidate intractable gastrointestinal malabsorption disorders

研究代表者

佐々木 健吾 (Sasaki, Kengo)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態外科部・レジデント

研究者番号：10740871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸は小腸下部で再吸収され門脈を経由し肝臓へ運ばれ化学抱合を受けたのち再度小腸へ分泌される腸肝循環が行われる。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型(PFIC1)は、膜タンパクであるATP8B1遺伝子の異型接合性変異(常染色体劣性遺伝)により、SLC10A2などの胆汁酸トランスポーターの発現を2次的に低下させ吸収不良症を引き起こす。本研究では、樹立したPFIC1-iPS細胞から小腸オルガノイドの作製に成功しその特性解析と胆汁酸吸収可視化モデルの構築を行った。定量PCR解析では、コントロールに比し胆汁酸トランスポーターであるSLC10A2の発現が低下し、胆汁酸の吸収低下も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでPFIC1患者の肝臓における病態については数多く研究されてきているが、小腸についての研究は殆ど成されていない。小腸吸収不良の原因と関連するSLC10A2の低下と胆汁酸吸収を可視化できるシステムを構築することが出来た。これにより、SLC10A2の発現が増強する薬剤を探索・評価することが可能となりPFIC1型の創薬開発へ貢献することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Bile acids are reabsorbed in the lower part of the small intestine, transported to the liver via the portal vein, chemically conjugated, and then secreted back into the small intestine for enterohepatic circulation. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 (PFIC 1) is a heterozygous mutation of the membrane protein ATP8B1 gene that causes malabsorption by secondarily decreasing the expression of bile acid transporters such as SLC10A2. In this study, we succeeded in producing small intestinal organoids from PFIC1-iPS cells, and characterized them and constructed a model for visualizing bile acid absorption. Quantitative PCR analysis revealed decreased expression of SLC10A2, a bile acid transporter, and decreased bile acid absorption compared with controls.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆汁酸 オルガノイド iPS細胞 SLC10A2

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

1. 研究開始当初の背景

小児における難治性下痢症の原因は多岐にわたるが新生児期から発症し腸管の代謝・吸収能が関連する病態は特に重症度が高い。脂肪の消化吸収に関しては、脂肪酸を主成分とする胆汁が担っている。胆汁酸は腸管内でその界面活性作用により食物中脂溶性成分とミセルを形成することで可溶化しリパーゼによる作用を補助し腸管からの吸収を促進する。胆汁酸は小腸下部で再吸収され門脈を經由し肝臓へ運ばれ化学抱合を受けたのち再度小腸へ分泌される腸肝循環が行われる。最近、疾患と関連する脂肪酸の新たな作用が着目され、さらに胆汁酸が脂肪吸収のみならずそれ自体さまざまな生理活性機能を持つことが報告されてきた。

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型 (PFIC1; Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 1) は、膜タンパクである ATP8B1 (ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1) 遺伝子の異型接合性変異 (常染色体劣性遺伝) により発症する。ATP8B1 遺伝子の異常により ABCB11 (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1) や SLC10A2 (solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter), member 2) など多くの胆汁酸トランスポーターの発現を 2 次的に低下させるが、その機序は全くわかっていない。肝臓では胆汁排泄障害が生じ、黄疸、激しい皮膚掻痒、成長障害などを引き起こす。さらに進行すると肝硬変に至る。また、小腸に発現している胆汁酸トランスポーターである SLC10A2 の発現も低下しており、吸収障害による下痢が生じる。重度の胆汁うっ滞症および肝硬変に対し、外科的治療として肝移植が行われており、これによって肝臓における胆汁排泄は正常化する。しかしながら、同時に腸管内への胆汁排泄量が増え、一方小腸の吸収障害は是正されていないため、下痢が増悪、さらに脂肪肝が生じ、かつての移植成績は良好ではなかった。そのため人工肛門による胆汁の皮膚外瘻を造設し、胆汁の小腸通過を回避させる方法などが行われているが、小児における人工肛門は著しく生活の質を低下させ、またその人工肛門の有効性についても一定の見解は得られていない。

2. 研究の目的

腸管における脂肪吸収と腸管吸収機能不全との関連を分子レベルで解明していくため、単一遺伝子性疾患に着目し体外培養系の疾患モデル構築を行う。PFIC1 の iPS 細胞とミニ腸作製によるオルガノイド技術による胆汁酸循環 (腸管) モデルの構築を行う。

3. 研究の方法

ATP8B1 遺伝子変異による進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型 (PFIC1) から疾患 iPS 細胞の樹立を行い、腸管分化誘導体を作製し胆汁酸腸管代謝メカニズムを解析していく。

a) PFIC1 組織解析: 小腸の組織学的評価および胆汁酸トランスポーターの発現解析

b) PFIC1 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

c) 疾患モデルの作成・評価: PFIC1-iPS 細胞を分化誘導し腸管様構造体を作製

d) PFIC1 病態解明・治療薬開発: 病態モデルを構築し既存の薬剤の添加実験を行い、SLC10A2 の発現が増強する薬剤を見出す。

4. 研究成果

PFIC1 患者組織から iPS 細胞を樹立し、ミニ腸作製を行った。iPS 細胞はゲノムインテグレーションフリーの mRNA リプログラミング法により PFIC1-iPS 細胞を作製できた。作製したミニ腸に対して、腸管トランスポーター群に対し網羅的に遺伝子発現解析を行った結果、SLC10A2 の発現はコントロール iPS 細胞由来ミニ腸に比し大きく低下していた。可視化胆汁酸試薬を活用し、胆汁酸吸収能を評価する系を構築できた。PFIC1-iPS 細胞由来ミニ腸では、胆汁酸の吸収が低下していた。PFIC1 病態モデルかつ化合物スクリーニングを行えるシステムを構築出来た。

5 . 主な発表論文等

1. Uchida H, Machida M, Miura T, Kawasaki T, Okazaki T, Sasaki K, Sakamoto S, Ohuchi N, Kasahara M, Umezawa A, Akutsu H. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. JCI Insight 2017; 2(1): e86492.
2. Kasahara M, Sasaki K, Uchida H, Hirata Y, Takeda M, Fukuda A, Sakamoto S. Novel technique for pediatric living donor liver transplantation in patients with portal vein obstruction: The "pullout technique". Pediatr Transplant 2018 ; 22(8): e13297.
3. Uchida H, Sakamoto S, Sasaki K, Takeda M, Hirata Y, Fukuda A, Hishiki T, Irie R, Nakazawa A, Miyazaki O, Nosaka S, Kasahara M. Surgical treatment strategy for advanced hepatoblastoma: Resection versus transplantation. Pediatr Blood Cancer 2018 ; 65(12): e27383.

〔雑誌論文〕(計 14 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笠原群生、福田晃也、内田孟、吉岡孝子、中澤温子、阿久津英憲、梅澤明弘、町田正和、川崎友之

ローマ字氏名：Kasahara,Mureo, Fukuda,Akinari, Uchida,Hajime, Yoshioka,Takako, Nakazawa,Atsuko, Akutsu,Hidenori, Umezawa,Akihiro, Machida,Masakazu, Kawasaki, Tomoyuki

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。