

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17552

研究課題名（和文）家族性高コレステロール血症におけるiPS細胞由来肝細胞の細胞移植治療に関する検討

研究課題名（英文）Investigation of cell transplantation therapy of iPS cell-derived hepatocytes in familial hypercholesterolemia

研究代表者

岡田 寛史 (Okada, Hirofumi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10735161

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）：iPS細胞を細胞移植のセルソースとして活用することを目的とし、下記の研究を行った。ホモ接合体性家族性高コレステロール血症患者を由来とするiPS細胞に対しゲノム編集を行い、正常LDL受容体遺伝子配列をもつiPS細胞の作製をおこなった。各種サイトカインとともに培養し、誘導機能細胞（肝細胞）を作製した。機能細胞へ分化誘導後、LDL受容体の発現を解析し、LDLの取り込み能について評価した。患者末梢血リンパ球と遺伝子修正後iPS細胞および機能細胞を共培養し、免疫反応を確認した結果、遺伝子修正されたiPS細胞を由来とする機能細胞は、免疫原性を増加させず、細胞移植片としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホモ接合体性FH患者では、診断後早期より積極的な介入を必要とし、終生LDLアフェレーシスによる治療を必要とするものも少なくない。根治的な治療はなく永続的に必要とすることから、患者の身体的負担、医療費等を考慮すると、移植治療が可能となった場合の、社会的および学術的な影響は大きいものと思われる。加えて、ホモFHに対する、他の機序による新薬の開発を想定した場合においても、疾患特異的iPS細胞由来肝細胞を用いて疾患モデルを構築することは、ヒト個体での薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術として重要な役割を持つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have performed the following studies with the aim of utilizing iPS cells (iPSCs) as a cell source for cell transplantation. Genome editing was performed on iPSCs derived from the patient with homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH) to generate iPSCs with normal LDL receptor (LDLR) gene sequences. Differentiation induction of hepatocyte-like functional cells was confirmed by gene expression analysis and flow cytometry analysis, and functional analysis of the cells was performed. Functional cells derived from genetically corrected iPSCs showed improved LDL uptake ability. Immune responses were confirmed by co-culturing patient peripheral blood mononuclear cells with genetically corrected iPSCs and functional cells. These results indicate that LDL uptake of HoFH-derived iPSC-derived HLCs can be restored by genetic correction without further immunogenicity gain, suggesting that gene-corrected iPSC-derived HLCs can be applied to treat HoFH.

研究分野：循環器内科学

キーワード：家族性高コレステロール血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症(以下 FH)は、著明な高コレステロール血症、腱黄色腫、早発性冠動脈硬化症を特徴とする遺伝性の疾患で、多くが low density lipoprotein (LDL) 受容体遺伝子の欠損・変異によることが報告されている。また、変異アレルを 2 つ有するホモ接合体性 FH 患者は、25 万人に 1 人の頻度と推定されているが、急性冠症候群を若年にて発症しうするため、早期より積極的な介入が推奨されている。しかしながら、近年保険収載された PCSK-9 阻害薬を含め、ホモ接合体性 FH 患者に対する根治的な治療はなく、最大限の薬物治療を行なったうえでも、LDL アフェレーシスによる永続的な動脈硬化予防が必要となる。このような背景の中、ホモ接合体性 FH に対する新規治療の開発が期待されている。

一般的に、LDL 受容体は、全体のおよそ 75%程度が肝臓に存在すると言われており、現在想定されているホモ FH に対する根治的な治療としては肝細胞の LDL 受容体に対する遺伝子治療か、もしくは健常な LDL 受容体を持つ肝臓の移植が挙げられる。遺伝子治療に関しては 1994 年、Grossman らにより少数例のホモ FH 患者に対するウイルスベクターを用いた遺伝子治療が報告されているが、根治的な効果は得られておらず、また肝移植に関しても治療に際しての侵襲性やドナーの問題より、発展していない。2006 年京都大学の山中らのグループにより、分化万能性と自己増殖能を有した幹細胞、つまり人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)が作製できることが報告され、各臓器の機能細胞へ分化誘導することにより、細胞レベルでの病態モデルの構築や薬効評価に有用であると考えられている。肝細胞への分化誘導においても既に報告されており、FH を含む肝臓を主座とするいくつかの遺伝性代謝疾患において、病態モデルの構築を行ったとする報告がある。2013 年には新しい遺伝子改変技術である CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins) が報告され、その方法は iPS 細胞においても応用され、遺伝性疾患に対する変異遺伝子の修復についての報告がある。そこで我々は、ホモ FH 患者より樹立した疾患 iPS 細胞に対し、疾患の原因と考えられる異常 LDL 受容体遺伝子を修正し、受容体機能を回復した肝細胞を作製することで、それらをセルソースとして活用する自家細胞移植治療の可能性について検討することとした。

2. 研究の目的

我々は、平成 27 年度科学研究費助成事業採用“ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた家族性高コレステロール血症に対する移植治療の検討”に関して研究を進め、対象とするホモ接合体性 FH 患者より疾患特異的 iPS 細胞の樹立、またその iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の確立、CRISPR/Cas9 を用いた疾患 iPS 細胞に対する遺伝子修正を行った。

本研究の目的は、ホモ接合体性 FH に対する新規治療としての、iPS 細胞を用いた細胞移植治療を想定した下記の基礎研究を行うことである。

- (a) ホモ接合体性 FH 患者より樹立した疾患特異的 iPS 細胞を由来とする肝細胞を用いて、疾患モデルを構築する。
- (b) 疾患特異的 iPS 細胞に対し、CRISPR/Cas9 システムなどのゲノム編集ツールを用いて、LDL 受容体をコードする異常遺伝子の修復を行う。
- (c) 遺伝子編集後の iPS 細胞およびその細胞より分化させた機能細胞において、由来とする患者血清との免疫反応を調べ、自家移植片としての可能性を検討する。

(d) 遺伝子修正後 iPS 細胞を由来とする肝細胞を LDLR ノックアウトマウスへ移植し、細胞移植片としての有効性について解析する。

予定した検討課題としては、遺伝子修正後の iPS 細胞由来肝細胞に対する in vitro での細胞レベルにおける機能解析、また実験動物を使用し生体内での LDL 受容体機能の評価、つまり高 LDL コレステロール血症の改善もしくは動脈硬化進行の抑制が可能かどうかについての検討が挙げられた。また、患者末梢血中リンパ球との共培養、遺伝子発現解析を行い遺伝子修復後 iPS 細胞由来肝細胞との免疫反応についての検討を予定した。

3. 研究の方法

(a) 疾患 iPS 細胞に対するゲノム編集後、機能細胞への分化誘導及びその確認

疾患由来 iPS 細胞を各種サイトカインとともに培養することで、誘導機能細胞（肝細胞）を誘導する。各々遺伝子発現、表面マーカーにより分化誘導を確認する。分化誘導効率を確認し、必要があれば FACS を用いて、単一細胞集団に分離する。

(b) LDL 受容体発現及び LDL 取り込み能の評価

機能細胞へ分化誘導後、免疫染色、PCR、ウエスタンブロットを行い、LDL 受容体の発現を確認する。LDL の取り込みについては標識した LDL を用いてフローサイトメトリーを行い、細胞内への取り込みについて評価する。

(c) ノックアウトマウスへの移植

免疫不全マウスと LDL 受容体欠損マウスを掛け合わせたマウスを用意する。高脂肪食を与え、そのマウスの肝臓に、上記にて得られた機能細胞を移植し、血清 LDL コレステロール値に対する降下作用及びリポタンパクを含めた詳細な脂質プロファイルを評価する。また、ラジオアイソトープを用いた実験を行い、生体内での LDL 取り込みについて詳細に評価する。移植方法としては、直接シート状の細胞をマウス肝臓表面に移植する方法と脾臓内もしくは上腸間膜静脈へ注入方法があり、生着率の良い方法を採用する。

(d) 患者末梢血中リンパ球との共培養、遺伝子発現解析

FH 患者末梢血リンパ球と遺伝子修正後 iPS 細胞および機能細胞を共培養し、移植細胞におけるアポトーシスの増加やリンパ球の活性化を評価し、免疫反応を確認する。免疫反応が確認された場合、iPS 細胞由来機能細胞に対してマイクロアレイ解析を行い、遺伝子を網羅的に解析する。過剰に発現している遺伝子を抽出し、抽出された各遺伝子の強制発現モデルを作成し、それらの細胞に対する免疫反応を確認する。

4. 研究成果

(a) 疾患由来 iPS 細胞をゲノム編集し、正常 LDL 受容体遺伝子をもつ iPS 細胞の作製をおこなった。各種サイトカインとともに培養し、誘導機能細胞（肝細胞）を作製した。遺伝子発現解析により分化誘導を確認し、フローサイトメトリー解析により分化誘導効率を確認した。

(b) 機能細胞へ分化誘導後、免疫染色、PCR、ウエスタンブロットを行い、LDL 受容体の発現を確認した。LDL の取り込み能についてフローサイトメトリー解析を行い、細胞内への取り込みについて評価した。

(c) LDL 受容体欠損マウスを入手し、高脂肪食を与え動脈硬化モデルマウスを作製した。入手に時間を要したため細胞移植実験は行うことができないまま研究期間を終了した。

(d) 患者末梢血リンパ球と遺伝子修正後 iPS 細胞および機能細胞を共培養し、免疫反応を確認した。野生型である健常者を由来とする機能細胞は、多数の細胞死が引き起こされたが、患者由

来の機能細胞は共培養による細胞死は少なく、同時に遺伝子修正された iPS 細胞を由来とする機能細胞に関しても、細胞死は元の患者由来細胞と同等であり、患者の単核球に対し抗原性を示さないと考えられた。

ホモ接合体性 FH 患者では、診断後早期より積極的な介入を必要とし、終生 LDL アフェレシスによる治療を必要とするものも少なくない。根治的な治療はなく永続的に必要とすることから、患者の身体的負担、医療費等を考慮すると、移植治療が可能となった場合の、社会的および学術的な影響は大きいものと思われる。加えて、ホモ FH に対する、他の機序による新薬の開発を想定した場合においても、疾患特異的 iPS 細胞由来肝細胞を用いて疾患モデルを構築することは、ヒト個体での薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術として重要な役割を持つものと考えられた。

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 Okada Hirofumi, Nakanishi Chiaki, Yoshida Shohei, Shimojima Masaya, Yokawa Junichiro, Mori Masayuki, Tada Hayato, Yoshimuta Tsuyoshi, Hayashi Kenshi, Yamano Tomoyoshi, Hanayama Rikinari, Yamagishi Masakazu, Kawashiri Masa-aki	4. 巻 9
2. 論文標題 Function and Immunogenicity of Gene-corrected iPSC-derived Hepatocyte-Like Cells in Restoring Low Density Lipoprotein Uptake in Homozygous Familial Hypercholesterolemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41056-w	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

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------