

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08977

研究課題名(和文)胆道閉鎖症特異的iPS細胞を用いた胆管発生およびその障害メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of bile duct development and its disorder mechanism using biliary atresia-specific iPS cells

研究代表者

鈴木 完 (Suzuki, Kan)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80598508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：6例の胆道閉鎖症患者の末梢血単核球からiPS細胞を樹立し、その特性解析および全ゲノム解析を完了した。さらに、樹立した胆道閉鎖症特異的iPS細胞からCPM陽性肝前駆細胞への誘導および胆管上皮細胞への誘導が可能であることを示した。一方で、全ゲノム解析データより複数の患者で重複するSNP変異・多型を約3,000ヶ所見だし、遺伝子破壊マウスによって肝臓や胆嚢に異常がある遺伝子などから絞り込みを行い、関連する可能性のある22遺伝子を同定した。また、1患者ではvirtual karyotyping解析で特異的な欠失部位を同定し、その部位に関連するKupffer細胞に発現タンパクがある遺伝子も同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだに明らかな原因が不明である胆道閉鎖症の病態解明に向けて、疾患特異的iPS細胞と全ゲノム解析を組み合わせることで関連遺伝子を探索した。本研究期間に、病態解明に向けた研究の基盤となる胆道閉鎖症特異的iPS細胞の樹立方法が確立され、さらに樹立した胆道閉鎖症特異的iPS細胞から胆管上皮細胞への誘導が可能であることを示しこの細胞ソースが今後の研究に使用可能であることを示した。また、多因子が想定される胆道閉鎖症発症に関連する可能性のある遺伝子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：We established iPS cells from peripheral blood mononuclear cells of 6 biliary atresia (BA) patients, and completed their characterization and whole-genome analysis. Furthermore, it was shown that the established BA-specific iPS cells can be induced into CPM-positive hepatic progenitor cells and biliary epithelial cells. On the other hand, we found approximately 3,000 SNP mutations and polymorphisms that were duplicated in more than 2 patients from the whole genome analysis data, and narrowed down the genes that have abnormalities in the liver and gallbladder of the gene-disrupted mice. 22 genes which have relation to BA pathophysiology were identified. In addition, in one patient, we identified a specific deletion site by virtual karyotyping analysis and confirmed that the gene encoded by the site was expressed in Kupffer cells.

研究分野：Pediatric Surgery

キーワード：biliary atresia BA specific iPS cell whole genome analysis hepatic progenitor cell pathophysiology

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症 (biliary atresia: 以下 BA) は、乳児期早期までに肝外胆管の線維性閉塞がおり、胆汁鬱滞から肝硬変に進展する予後不良な疾患で、その原因はいまだ不明である。BA の成因を解明し、出生前または直後から治療介入や予後予測ができれば、BA 患児にとっての恩恵は大きい。しかし BA の成因に関しては、器官発生異常説、ウイルス感染説、遺伝的素因説、母胎免疫説などがいわれ、有力な説はいまだないのが現状である。BA モデル動物には、いわゆる BA マウスや Sox17 +/- (ヘテロ)マウスなどがあるが、いずれも一部の BA 症例の病態を表現しているのみと考えられ、ヒトでの研究は出生後および発症後の病態をみることにしかできない。そのため、肝外胆管障害過程をリアルタイムに観察できるモデルを構築することが解決のひとつになると考えられるが、現段階では肝内胆管樹・肝外胆管樹の誘導系は確立していない。まずは正常ヒト iPS 細胞からの胆管細胞誘導系の確立が胎児期の異常を証明する上で必要であり、発生中期以降の胆管樹形成の分子メカニズムの解明、胆管幹細胞の安定した長期培養技術、in vitro, in vivo 実験による胆管樹立体構造の構築、さらに胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞を利用した胆管障害過程の検討のための実験系の確立などが必要であるため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、Furuyama らが示した肝臓および胆管の発生機序に重要な Sox9 の発現様式 (Nature Genetics, 43, 34-41, 2011) をもとに、発生中期の胆管形成開始以降に Sox9 陽性細胞から形成される門脈周囲の胆管および肝細胞への分化のいずれかの段階で virus 感染や免疫応答異常、アポトーシス誘導によって胆管細胞の破壊が起こること、あるいは Sox9 陽性上皮細胞で構築される肝外胆管の形成異常があることによって BA が引き起こされるとする新たな仮説をたて、BA 特異的 iPS 細胞を用いてその独自の仮説を実証することを目的とする。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導系において、細胞膜タンパク質カルボキシペプチダーゼ M (Carboxypeptidase M; CPM) の発現を指標にして、細胞を分離すると、簡便に効率よくヒトの iPS 細胞由来の肝前駆細胞を分離できることが Kido らによって示されており (Stem Cell Reports, 5, 1-8, 2015) この CPM を発現している肝前駆細胞から肝細胞と胆管上皮細胞を分化誘導できることもわかっており、さらにこの肝前駆細胞は継代培養や凍結保存も可能であるので、BA 患児から採血によって得られた血球から iPS 細胞を樹立 (Tian L et al. Stem Cell Reserch, 24, 25-28, 2017) し、疾患特異的 iPS 細胞として Sox9 レポーター iPS 細胞を作製し胆管系へ分化誘導をするという点で創造性を有する研究であり、これを用いて、正常人の iPS 細胞から誘導した胆管上皮細胞と遺伝子発現の比較、Sox9 陽性胆管上皮細胞をウイルス感染や免疫系を賦活化させて上皮細胞の障害を比較する実験、アポトーシス誘導実験、細胞遊走実験、3次元培養実験などを行うことで BA の原因解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 「BA 特異的 iPS 細胞の樹立および正常人由来 iPS 細胞から Sox9 陽性胆管上皮細胞由来の胆管・肝細胞の三次元培養の確立」

BA 術後 (生体肝移植未施行 10 例程度を想定) の患者から説明と同意を得た上 (患者が未成年の場合はその保護者から同意を得る) で採血により血球を採取し、BA 特異的 iPS 細胞の樹立を行い、樹立した iPS 細胞から肝前駆細胞を経由し、胆管上皮細胞への分化誘導系についておよび胆管上皮細胞を用いた三次元培養系を樹立しており、Sox9 陽性胆管上皮細胞由来の胆管・肝細胞の三次元培養を確立する。サンプル数が十分でない場合、BA マウスモデルの一つとされる SOX17 ノックアウト iPS 細胞を樹立、あるいは BASM 特異的とされている CFC1 遺伝子の mutation (Ala145Thr missense variant) を入れた iPS 細胞を樹立、また BA との鑑別が問題となる Alagille 症候群の原因遺伝子として知られている JAG1 遺伝子ノックアウト iPS 細胞などの樹立をして胆管の誘導過程における障害を明らかにする。

(2) 「BA 特異的 iPS 細胞を用いた BA の発症機序の解明に向けた研究」

BA 患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞と正常人由来 iPS 細胞を網羅的解析によって比較検討し、BA 特異的 iPS 細胞の特性について検討する。また、Sox9 陽性胆管上皮細胞に分化誘導させそれぞれの発現遺伝子ファイルと比較検討し、マウスの実験的に BA 発症に關与している可能性があるとして報告のある *Invs*, *Hes1*, *Hnf6*, *Hnf1b*, *Foxf1*, *Foxa2*, *Sox17*, *Lgr4*, *Pdx1* などの既知の遺伝子発現の検討や正常人由来 iPS 細胞から胆管発生に關する新たな遺伝子の発現プロファイルを作製し、BA 特異的 iPS 細胞から誘導された胆管の遺伝子プロファイルとの発現の差をみることで BA 特異的な遺伝子発現の異常について検討を行う。さらに、BA 特異的 iPS 細胞から分化誘導した胆管上皮細胞の三次元培養を行い、正常人由来の iPS 細胞から分化誘導した胆管上皮細胞の三次元培養との間で構造的差異の有無を確認する。その差異が見られなかった場合には、両者にウィルス感染させた実験や細胞遊走実験、アポトーシス誘導実験を行い、BA 発症のメカニズムを解明していく。

4. 研究成果

(1) 「BA 特異的 iPS 細胞の樹立および正常人由来 iPS 細胞から Sox9 陽性胆管上皮細胞由来の胆管・肝細胞の三次元培養の確立」

これまでに 6 例の胆道閉鎖症 (biliary atresia: 以下 BA) 患者の末梢血から BA 特異的 iPS 細胞 (以下 BA-iPS 細胞) を樹立し特性解析を済ませ共同研究者の専門施設で維持・品質管理している (さらに 5 例を現在樹立・特性解析中である)。さらに、樹立した 6 例のうち 4 例については BA-iPS 細胞は、細胞膜タンパク質カルボキシペプチダーゼ M (Carboxypeptidase M: CPM) の発現を指標として CPM 陽性肝前駆細胞に誘導し、さらに肝細胞と胆管上皮細胞に誘導できることおよびシスト形成が可能であることを確認したものの、胆管上皮に明らかな異常はみられなかった。

BA 特異的 iPS 細胞から誘導した胆管上皮細胞のシスト形成に明らかな異常がみられなかったため、樹立した BA 特異的 iPS 細胞の変異解析や全ゲノム解析を併行して行い、胆道閉鎖症の病態解明に向けてターゲットの絞り込みをする方針に研究内容がシフトした。

(2) 「樹立 BA 特異的 iPS 細胞の 1 例に認められた特異的な変異についての探索」

6 例のうち 1 例で BA-iPS 細胞、末梢血細胞の両方に virtual karyotyping 解析で明らかな欠失部位 (16p12.2) があり、異常がみられる遺伝子として *METTL9*, *IGSF6*, *OTOF* 遺伝子の 3 つがあり、そのうち *IGSF6* 遺伝子について、遺伝子産物の機能はイムノグロブリン様分子、Kupffer 細胞などのマクロファージで高発現し、International Mouse Phenotyping Consortium の結果では肝臓関連に弱いながらも異常表現型があるとされていることがわかっており、*IGSF6* 遺伝子の KO マウスも存在している。ただし、この KO マウス自体には BA を示唆する異常は示されていないことはわかっている。

(3) 「BA 特異的 iPS 細胞 6 例の全ゲノム解析データからの胆道閉鎖症関連の変異・多型の探索」

樹立した 6 検体の BA-iPS 細胞の全ゲノム解析を行い、各サンプルにおいて標準ヒトゲノムとの差異 (変異・多型候補) が約 6,000,000 ケ所、そのうちタンパク質のアミノ酸残基に変化をもたらすものが約 12,000 ケ所、健康人コントロール iPS 細胞でもみられるものとの差が約 3,000 ケ所、6 検体中で重複してみられる変異・多型が約 3,000 ケ所確認された。

Human Gene Mutation Database と照合して上記の BA6 検体中 2 例以上で変異が Overlap しているものが 8 遺伝子 (*ABCAS*, *ABCA13*, *ABCC2*, *ACAN*, *BRCA2*, *C6*, *DNHD1*, *NOTCH2*) みつかり、うち Allele frequency < 0.1 である *ABCA13*, *NOTCH2* 遺伝子を、さらに International Mouse Phenotyping Consortium Database を用いて、同様の手法で Overlap 変異を探索し、ヘテロで liver phenotype がみられる 4 遺伝子 (*RBBP4*, *CWC22*, *UBR2*, *SSR1*) とホモで liver phenotype がみられる 18 遺伝子 (*ABCGB*, *GP2*, *ADNP2*, *EPHA3*, *EPHA6*, *AIF1L*, *KRT72*, *MUC5B*, *DNMBP*, *SERPINB10*, *ASPSCR1*, *ACOXL*, *EVC2*, *TNN*, *ERAP1*, *MALRD1*, *PLIN4*, *CACNA11*) のうち Allele frequency < 0.1 である *RBBP4*, *EPHA6*, *MUC5B*, *ASPSCR1*, *ACOXL*, *EVC2*, *ERAP1* の 7 遺伝子を疾患特異的な変異をもつ可能性のある遺伝子として絞り込んだ。

目的としていた、胆道閉鎖症の病態解明にはたどり着けなかったものの、今後の研究の基盤

となるような BA 特異的 iPS 細胞の樹立および細胞の維持は行えており、肝胆道系異常に関連する可能性のある遺伝子の絞り込みを行うことが研究期間内の成果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木完 |
| 2. 発表標題 胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞の樹立と胆管細胞への誘導 |
| 3. 学会等名 第37回 日本小児外科学会秋季シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木完 |
| 2. 発表標題 胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞の樹立と胆管細胞への誘導 |
| 3. 学会等名 第48回日本胆道閉鎖症研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kan Suzuki |
| 2. 発表標題 Biliary atresia-specific iPS cell establishment and induction into biliary epithelial cells |
| 3. 学会等名 The 122nd Annual Congress of Japan Surgical Society |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木完 |
| 2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を用いた小児外科疾患の病態解明へ向けた課題 |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 木戸 丈友 (Kido Taketomo) (00401034) | 東京大学・定量生命科学研究所・特任講師 (12601) | |
| 研究分担者 | 藤代 準 (Fujishiro Jun) (60528438) | 東京大学・医学部附属病院・教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 林 洋平 (Hayashi Yohei) (90780130) | 国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー (82401) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|