

氏名	今川 和生		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8258 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells (疾患特異的 iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2型の病態モデル)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	増本 幸二
副査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修
副査	筑波大学准教授	医学博士	安部井 誠人
副査	筑波大学助教	博士（医学）	西村 健

## 論文の内容の要旨

今川氏の博士学位論文は、小児の難病である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (progressive familial intrahepatic cholestasis; PFIC) 2型のモデル作成の研究成果であり、実際には PFIC2型患者から採取した血液より iPS 細胞を樹立し、これを分化誘導することで、疾患特異的な肝細胞を作成している。この肝細胞を用いて、PFIC2の主要な病態が再現されることを確認しており、これまでにない疾患特異的なモデルとなることを検討したものである。その要旨は以下の通りである。

### (目的)

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (progressive familial intrahepatic cholestasis; PFIC) 2型は、胆汁酸トランスポーター (bile salt export pump; BSEP) の遺伝子に異常があるために、肝細胞の胆汁排泄能が著しく低下し、胆汁うっ滞性肝障害から肝硬変、肝不全へと進展する致死的な疾患である。これまでに根治可能な治療薬は開発されておらず、救命のために肝移植を要する。移植後は生涯に渡って免疫抑制治療が必要となるほか、時に BSEP 蛋白に対する抗体が産生されて病気が再燃する場合もある。一般に病態解析や新規治療薬のスクリーニングには、しばしばモデル動物が用いられるが、BSEP ノックアウトマウスはヒトと異なって肝障害が軽度であるため、これまで PFIC2 型の疾患モデルとして用いられていない。また、ヒト肝細胞を用いた研究は、採取に侵襲性を伴うことや、細胞リソースに限りあることが課題となっていた。一方で、近年開発された iPS 細胞技術と分化誘導技術によって肝細胞を得ることが比較的容易になり、特に患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルや疾患解析研究は大きな広がりを見せている。そこで、この研究で今川氏は、PFIC2 型の新規疾患モデルの創生を目的とし、同症患者から iPS 細胞を作製し、それから分化誘導した肝細胞が病態に適しているかまでの解析を行っている。

### (対象と方法)

### (1) PFIC2 型患者からの iPS 細胞樹立する研究

当院で治療中の PFIC2 型患者 2 名から採血を行い、分離した血液細胞に山中 4 因子搭載センダイウイルスベクターを作用させて iPS 細胞を樹立させている。iPS 細胞の特性評価として、リアルタイム PCR および免疫蛍光染色で未分化関連マーカーの発現を評価し、さらに、胚様体形成による三胚葉への分化能を解析していた。また、樹立した iPS 細胞ゲノムにおいて *BSEP* 遺伝子変異が元の細胞から継承されているか否かを確認するために、ダイレクトシーケンスでの解析も加えている。

### (2) iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究

(1)の研究で樹立した iPS 細胞に分化段階特異的な液性因子を加えて肝細胞へと分化誘導した後、リアルタイム PCR、免疫蛍光染色、フローサイトメトリー、ELISA で肝細胞の特性を有するか否かを評価していた。加えて、電子顕微鏡像により毛細胆管構造の有無を検討している。

### (3) 分化誘導肝細胞で PFIC2 病態が反映されているか検討する研究

PFIC2 特有の病態である胆汁排泄能低下の有無を biliary excretion index (BEI) アッセイにより検討し、さらに免疫蛍光染色で *BSEP* 蛋白の発現低下の有無を確認している。

## (結果)

### (1) PFIC2 型患者からの iPS 細胞樹立する研究の結果

この研究では、PFIC2 型患者から樹立した iPS 細胞 (PFIC2-iPS) は OCT3/4 や NANOG 等の未分化関連マーカーを発現し、胚様体形成で三胚葉への分化傾向があることを確認している。また、iPS 細胞の *BSEP* 遺伝子変異が患者血液細胞の *BSEP* 変異と一致していることも示されている。したがって、この研究では、PFIC2 型患者の血液細胞から iPS 細胞が樹立されただけでなく、作成された iPS 細胞株が元の細胞の *BSEP* 変異を反映していることも明らかにしている。

### (2) iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究の結果

この研究では、(1)で作成した iPS 細胞から肝細胞へと分化誘導を行っている。アクチビン、FGF4、BMP4、HGF、オンコスタチン M を分化時期特異的に添加し、分化誘導開始後 25 日目に分化誘導肝細胞がアルブミンを高発現していることを確認している。また、分化誘導後期にマトリゲルを重層して培養することで、毛細胆管の構築が促進されていた。このことは電子顕微鏡で毛細胆管構造が観察され、蛍光胆汁色素の排泄が認められたことによって示されている。以上の成果により、iPS 細胞から肝細胞へ分化誘導されたことを確認している。

### (3) 分化誘導肝細胞で PFIC2 病態が反映されているかを検討した結果

研究(2)で作成した PFIC2-iPS 由来分化誘導肝細胞を用い、病態特異的な所見を認めるかを確認したところ、細胞膜側での *BSEP* 発現低下と胆汁排泄能低値が認められ、PFIC2 の主要な病態が再現されていることが証明されていた。また *BSEP* は肝臓で特異的に発現する遺伝子で、血液細胞では発現していないことも確認されている。ここで検討した iPS 由来分化誘導肝細胞での解析結果からは、この血液由来の細胞を用いることで、患者から肝細胞を得るための侵襲的な肝生検を回避でき、患者に有利であることが示されている。そこで、そのことを確認するため、*BSEP* 遺伝子の 5' 非翻訳領域に変異を有する 1 名の PFIC2 患者について、iPS 由来分化誘導肝細胞の RNA を解析し、スプライシング異常が認められることを証明していた。

## (考察)

著者は近年、PFIC2-iPS 細胞は未分化性と多分化能を有していることが確認されており、血液細胞からリプログラミングされると考えられている。この考えに基づいて、今回樹立した iPS 細胞から、さらに分化誘導した肝細胞はアルブミンを発現するなど肝臓の特性を有しており、この研究を通して、PFIC2-iPS 細胞が効果的に分化誘導されたことが示されていた。また、免疫染色や胆汁排泄アッセイにより PFIC2 の病態が *in vitro* で再現できていることも証明されている。さらにこの分化誘導肝細胞を解析することにより、PFIC2 患者で初めて 5' 非翻訳領域の変異により *BSEP* のスプライシング異常が起ることを見出していた。以上の結果から、この研究で作成した PFIC2-iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は PFIC2 の疾患モデルとして有用であることが明らかにされている。

**(結論)**

PFIC2-iPS から分化誘導した肝細胞を用いて、PFIC2 型の主要病態である胆汁排泄能低下が *in vitro* で再現され、肝臓特異的に発現する BSEP のスプライシング異常も見出され、本症の *in vitro* 疾患モデルとなり得ることが証明されている。さらに、将来的にはこの細胞を利用して、PFIC2 型の治療に貢献できる新規薬剤の開発に役立てることができる可能性が示されていた。

## 審査の結果の要旨

**(批評)**

現在まで、その病態を十分に反映する疾患特異的モデルが欠如していた PFIC2 について、今川氏は PFIC2 患者の血液から、PFIC2-iPS 細胞株を樹立し、その細胞株を分化誘導した肝細胞を作成した。この肝細胞については、PFIC2 の病態を *in vitro* で再現できることも確認しており、*in vitro* 疾患モデルとして有用であることを証明している。この手技を用いれば、現在臨床診断で用いられる肝生検を行わずに診断が可能となることが予測され、極めて臨床に即した有用な研究であると考えられた。

平成 29 年 1 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。