

氏 名 宋 丹  
学位の種類 博士（ 医学 ）  
学位記番号 博甲第 10391 号  
学位授与年月 令和 4 年 3 月 25 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 Wilson' s disease model establishment from human  
induced pluripotent stem cells  
(ヒト誘導多能性幹細胞から作られたウィルソン病の病態モデル)

主 査	筑波大学教授	博士（生命科学）	山崎 聡
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	加野 准子
副 査	筑波大学講師	博士（農学）	蕨 栄治
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	今川 和生

## 論文の内容の要旨

宋丹氏の博士学位論文は、ウィルソン病（WD）肝モデルの新しい治療薬の開発を目的とし、疾患 iPS 細胞を用いることで薬剤のスクリーニングを行うことで一定の薬物を同定することに成功した。その要旨は以下のとおりである。

### （目的）

著者は人工多能性幹細胞（iPSC）は、試験管内で病態生理を研究するための有望なツールであり、患者由来の iPS 細胞株を用いてウィルソン病（WD）モデルを構築することを目的としている。WD は銅代謝異常症であり、ATP7B の機能不全によって引き起こされる。従来の治療法として銅キレート剤が使用されているが、通常、重篤な副作用を引き起こし、コホート研究によって効果に大きなばらつきがある。そのため、肝障害の悪化を防ぐための新たな治療薬の探索が急務となっている。

著者は、ATP7B の複合ヘテロ接合体変異を有する WD 患者から作製した 4 つの iPS 細胞株を使用することでウィルソン病肝モデルを構築するために、WD の iPSC を強固な分化プロトコルで肝細胞に誘導し、さらに WD 特異的な肝細胞で WD の疾患特徴を同定することを目標にしている。さらに、トランスクリプトームデータから、WD-Hep の制御異常遺伝子は、WD 特異的肝細胞のレチノイドシグナル伝達経路と脂質代謝の異常や all-trans retinoic acid (ATRA) の脂肪肝関連疾患に対する治療効果を評価するために、WD-specific hepatocyte を用いた脂肪症モデルを構築することで WD やその他の脂肪性肝疾患における肝脂肪症に対する潜在的な治療法を開発するための有効なプラットフォーム構築を大きな目的としている。

### （対象と方法）

著者は、患者固有の iPSC 株を用いてウィルソン病（WD）肝モデルを確立し、WD による肝不全の悪化を防ぐための新しい治療薬を探索することを目的とし、4 人の WD 患者の iPSC 株を使用してウィルソン病モデルを確立している。これら 4 つの WD iPSC 系統の多能性を、それらの多能性マーカーの発現、胚様体形成アッセイ、および奇形腫形成アッセイによって調べ iPSC 株から肝細胞に分化させている。著者のプロトコルを使用して、WDiPSC と WTiPSC の肝分化能を比較した結果、ATP7B の発現と Cp の分

泌は、患者の iPSC 由来の肝細胞で検出可能になり、さらに、ATP7B 欠損 iPSC および R778L ホモ接合変異 iPSC からの変異補正 iPSC を使用して、WD 関連疾患の特徴を検証している。最後に、脂肪肝モデリングを行うことで、肝臓脂肪疾患に対する ATRA の治療機能を調査するために、WD 固有の肝細胞を使用して確立している。

この方法から著者は、患者由来の iPSC 細胞を用いてウィルソン病肝モデルを確立し、WD 肝モデルを使用して、ATRA が Cp 分泌を増加させ、脂質誘発性 ROS 産生を減少させることにより、WD 表現型を有意に逆転させることができることを確認することで、レチノイドが WD の悪化を防ぐための新しい治療薬である可能性があることを明確に述べている。

#### (結果)

著者は4つのWD iPSC 株はすべて高い多能性を有していたこと、そのiPS株は染色体には明らかな挿入や欠失は認められなかったこと、4つのiPSC株はすべてATP7B遺伝子の複合ヘテロ接合体変異を有していたこと、ATP7Bタンパク質の発現量は、これらのiPS細胞から分化したWD特異的肝細胞の間で変動していたことを明らかにしている。一方、血漿中の下流銅運搬体であるセルロプラスミン(Cp)の発現と分泌は、WD特異的肝細胞とATP7B欠損肝細胞で一貫して低下していたことから、WDに関連した表現型は、ATP7B欠損iPS細胞やヘテロ接合型R778LWD患者由来iPS細胞でさらに顕在化しており、Cpを用いた薬剤スクリーニングから、all-trans retinoic acid(ATRA)がCp分泌量を有意にアップレギュレートすることを見いだしている。トランスクリプトーム解析の結果では、WD特異的肝細胞の制御異常遺伝子は、レチノイドシグナル伝達経路と脂質代謝経路に密接に関連していることを発見している。興味深いことに、WD特異的肝細胞由来のステアロシスモデルを用いると、ATRAはオレイン酸処理したWD特異的肝細胞の脂質蓄積によって引き起こされる活性酸素種(ROS)産生を緩和することができることも明らかにしている。

#### (考察)

このWD特異的肝細胞では、ATP7Bタンパク質の発現が、iPS細胞株によって異なる変異の影響を受けていることが解明された。一方、Cpの発現はWD特異的な肝細胞で一貫して減少していることから、著者の現在のWDモデルが、この疾患の特徴をin vitroで再現できていると著者は考察している。Cpを用いた薬物スクリーニングの結果、ATRAや他の臨床的に承認されているレチノイドが、Cpの発現と分泌の減少を回復させることが明らかになり、トランスクリプトーム解析の結果では、WD iPSC由来肝細胞のレチノイドシグナル伝達経路と脂質代謝の異常が明らかになったことから、銅の代謝異常と脂質の代謝異常の間に何らかの関係がある可能性が示唆できたと述べている。詳細なメカニズムはまだ解明されていないが、著者の研究は、レチノイドシグナル伝達経路がWD病の治療だけでなく、他の脂肪肝疾患の治療のための貴重な治療標的であることを提示していると考察している。

#### (批評)

著者は患者さん由来の iPSC を用いてウィルソン病肝モデルを作製することで、ATRA が Cp の分泌を増加させ、脂質による活性酸素の産生を減少させることにより、WD の表現型を有意に回復させることを明らかにした。本研究で得られた知見は、レチノイドが WD の悪化を防ぐ新しい治療薬となる可能性を詳細に述べている。

令和4年1月12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。