

第13回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名	助成金額
岡田 寛史	金沢大学附属病院 救急部	400,000 円
研究課題名	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	
研究の概要	<p>(本文)</p> <p>(1) 研究の学術的背景</p> <p>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。</p> <p>(2) 検討課題</p> <p>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課題として挙げられた。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も確認する予定とした。</p>	
研究の成果	<p>[成果の具体的内容、意義、重要性及び今後の展望等について記入]</p> <p>(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、フローサイトメリー解析により分化誘導効率を確認した。</p> <p>(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リー解析を行い、細胞内への取り込みについて評価した。</p> <p>(c) 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。</p> <p>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。</p>	

研究成果発表状況	〔雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成したWebページ等について記入〕		
経費の執行状況	費目	事項 (主な使用事項を記載)	執行額(円) (費目毎総額を記入)
	物品費	別途資料添付	400,000
	旅費	なし	0
	人件費・謝金	なし	0
	その他	なし	0