

iPS を用いたシトリン欠損症の肝不全発症解明と革新的治療法開発

九州大学大学院 消化器・総合外科

武石 一樹

1.緒言

先天性疾患であるシトリン欠損症は、肝臓内でシトリンが欠損する疾患で、SLC の変異で発症する遺伝的疾患である¹⁾。シトリン欠損症は、幼児期に発症するものと成人して発症するものに分けられる。病態としては、肝臓内でのアンモニア代謝が障害され、高アンモニア血症を呈し、重度の肝性脳症を発症する。現状では根本治療は肝移植しかない。しかし、シトリン欠損症はアンモニア代謝のみに異常を認め他の肝機能は正常であることが多い²⁾。したがって、シトリン欠損症での肝細胞内での病態を正確に把握し、その遺伝子を治療することができれば、肝移植を行わなくてもシトリン欠損症を治療することができ、ドナー不足が著しい本邦では、肝移植以外の治療法を検索することは必要である。

原因遺伝子の追求および新治療法を確立するためには遺伝子変異を持った肝細胞が大量に必要となる。しかし、肝細胞を大量に培養する技術は確立されておらず、病気肝を使用する研究はできない。そのため、ヒト肝細胞を用いての病気肝を再現できていない。

最近になり山中らが 2007 年³⁾に報告した induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) は、分化した細胞に 4 つの遺伝子を入れることで、初期化され、全ての細胞に分化できる可能性がある幹細胞であり、再生医療への応用が期待されている。我々の研究室では、以前より iPS 細胞から肝細胞を作成し、それを利用することで人工肝臓を作成することに取り組んでいる⁴⁾。先天性に遺伝子変異を持った体細胞、例えば皮膚などから、iPS 細胞を作成し、その細胞から肝細胞を作成することができれば、遺伝子変異を持った肝細胞を実験室にて大量培養することができる可能性がある。また、その肝細胞から人工肝臓を作成することができれば、病気肝を体外で再現することができ、治療薬の開発にかかる危険性や費用、時間を大幅に減らすことができる (図 1)。

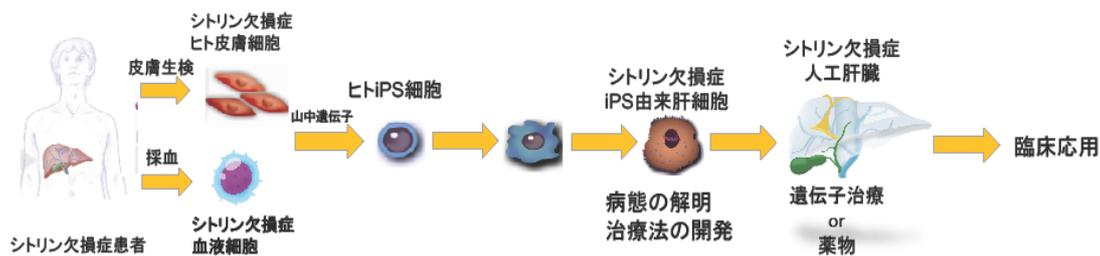


図1 今回の実験モデル

今回の研究の目的は、シトリン欠損症の患者の細胞より iPS 細胞を作成し、肝細胞を作成し、シトリン欠損症の遺伝子変異を持った肝細胞を作成し、その細胞を使用することで、シトリン欠損症の病態の解明し、臨床応用可能な革新的治療法の開発をすることである。

2.方法

2-1) 線維芽細胞採取

当科にてシトリン欠損症にて生体肝移植を受けた症例の摘出肝臓の一部より肝組織を採取し、細胞を分離後に線維芽細胞を採取した。採取した線維芽を培養した。

2-2) iPS 細胞の作成

線維芽細胞のリプログラミングはエピゾマルプラスミドを用いて行った。OCT3/4、p53shRNA、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28 をコードしたエピゾマルプラスミドをヌクレオフェクターを用いて、線維芽細胞に導入。20~30 日間、マトリゲルでプレートし、mTeSR で培養した。コロニーが形成したのち、stem cell マーカーである NANOG、OCT4、SSEA、TRA160 の発現を評価した。

2-3) iPS 細胞から肝細胞への分化

iPS 細胞を Accutase を用いて継代後に、Activin A、BMP4、FGF2 を含んだ RPMI にて 4 日間培養し、内胚葉に分化させる。次に、HGF を含んだ DMEM で 10 日間培養し、肝細胞に分化させた。

2-4) リアルタイム RT-PCR

集めた細胞から RNA を抽出し、SuperScriptIII を用いて、cDNA を作成。Taqman 法を用いて、遺伝子の mRNA 量を測定した。内因性コントロールとしてベータアクチンの mRNA の発現量を用いた。

2-5) 蛍光免疫組織学的染色

4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。ブロッキング後にそれぞれの遺伝子の 1 次抗体を用いて、12 時間反応させた。それぞれの 1 次抗体に対応する HRB で標識された 2 次抗体にて発色させた。DAPI を用いて、核の染色を行った。

2-6) 機能評価

iPS 由来肝細胞を 4 日間培養したメディウムを回収し、 $\alpha 1$ アンチトリプシンのエライザキットを用いて、メディウム中の $\alpha 1$ アンチトリプシンの濃度を測定した。また、尿素測定キットを用いて、メディウム中の尿素の濃度を測定した。

3.結果

3-1) iPS 細胞の作成

摘出した肝組織より繊維芽細胞を採取し、培養後に iPS 細胞を作成した。作成した iPS 細胞は stem cell のマーカーである、NANOG と OCT3/4 の発現を認めた (図 2 (a))。

3-2) 分化誘導

iPS 細胞を肝細胞に分化させるために内胚葉に分化させた。コントロールとして、健康人より採取した iPS 細胞も同時に分化させた。内胚葉のマーカーである SOX17 の発現を免疫組織学的染色にて確認した (図 2 (b))。次に肝細胞に分化させるため、HGF を含むメディウムで 10 日間培養した。シトリン欠損症 iPS 由来肝細胞、コントロール由来 iPS 肝細胞ともに肝細胞特異的マーカーである HNF4 α の発現を免疫組織化学染色にて認めた (図 2 (c))。リアルタイム PCR にて、シトリン欠損症由来およびコントロール由来肝細胞は、共に肝細胞特異的転写因子である HNF4 α の発現量は正常成人肝細胞とほぼ同じレベルであった (図 2 (d))。

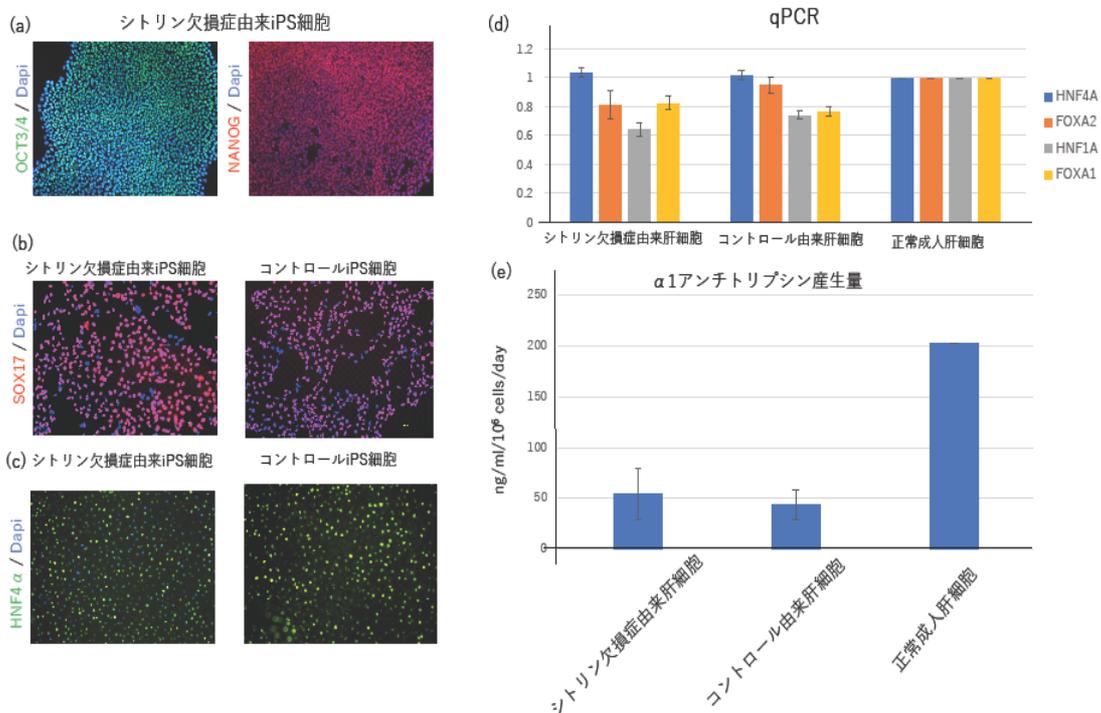


図 2

3-3) 機能評価

分化させた iPS 由来肝細胞の機能を評価するため、分化させた肝細胞を培養し、培養液中の $\alpha 1$ アンチトリプシンの濃度をエライザにて評価した。正常肝細胞細胞の濃度が $200 \text{ ng/ml}/10^6 \text{ cells/day}$ に対して、シトリン欠損症由来肝細胞およびコントロール由来肝細胞のそれは、 $63 \text{ ng/ml}/10^6 \text{ cells/day}$ および $43 \text{ ng/ml}/10^6 \text{ cells/day}$ であり、iPS 由来肝細胞の $\alpha 1$ アンチトリプシンの産生量は、正常成人肝細胞の $1/3 \sim 1/4$ であったが、シトリン欠損症由来細胞とコントロール細胞では有意差を認めなかった。

3-4) アンモニア代謝の比較

シトリン欠損症では、肝細胞でのアンモニア代謝機能が低下し¹⁾²⁾、高アンモニア血症を発症する。したがって、iPS 由来肝細胞におけるアンモニア代謝を確認するために、培養液中のアンモニア代謝の産生物である尿素の量を測定した。シトリン欠損症由来肝細胞、コントロール由来肝細胞の尿素量は、 1.30 ug/ml 、 1.35 ug/ml であり、2 群間で有意差を認めなかった (図 3 (a))。正常成人肝細胞の尿素量は、 13.1 ug/ml であり、iPS 由来肝細胞の約 10 倍の産生量を認めた。iPS 由来肝細胞のアンモニア代謝量が正常成人肝細胞に比べ著しく少ない原因を検討するため、アンモニア代謝に関わる遺伝子である OTC の発現量を比較した。シトリン欠損症由来肝細胞およびコントロール由来肝細胞の OTC の mRNA の発現量は、正常成人肝細胞の発現量に比べて 0.012 、 0.010 であり、正常成人肝細胞に比べ、非常に低発現であった。また、シトリン欠損症由来肝細胞とコントロール由来肝細胞で発現量に有意差を認めなかった (図 3 (b))。

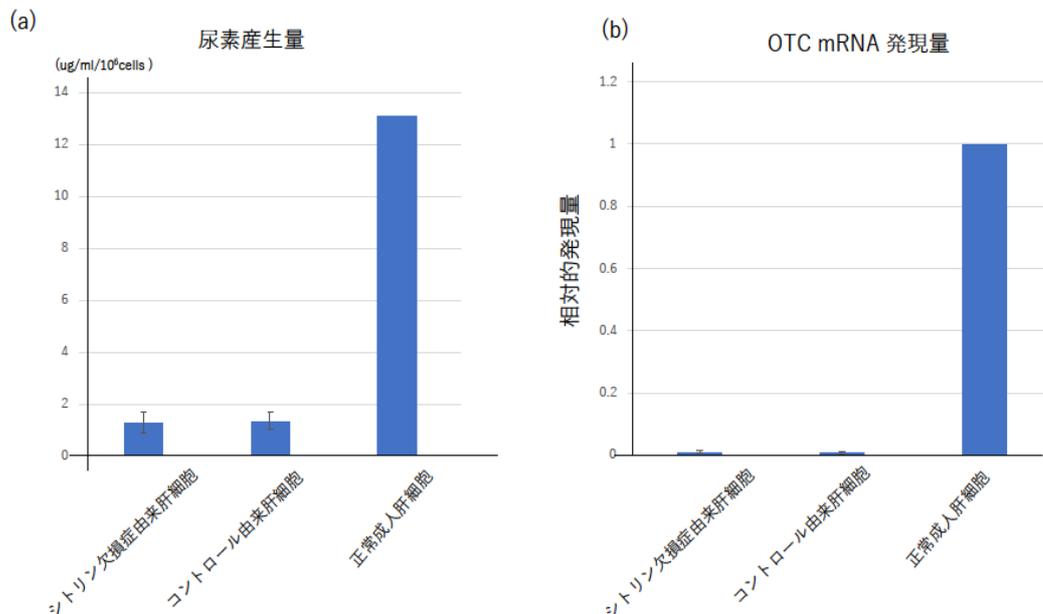


図 3

4.考察

今回、シトリン欠損症より線維芽細胞を採取し、iPS 細胞を作成した。iPS 細胞作成に関しては、シトリン欠損症の遺伝子異常があってもコントロールと同様に iPS 細胞が作成できたことから、シトリン欠損症の遺伝子異常は Stemness の維持には、異常を認めないことがわかった。このことは、シトリン欠損症患者から iPS 細胞作成できること、また、その iPS 細胞から遺伝子治療の可能性があることが証明された。

次にシトリン欠損症由来 iPS 細胞がコントロール由来 iPS 細胞と同じように肝細胞への分化をし、肝細胞特有的遺伝子の発現を認めた。また、肝機能の指標である、 $\alpha 1$ アンチトリプシンの発現量は、2 群間で有意差を認めなかった。このことは、シトリン欠損症遺伝子を認めても肝細胞への分化ができるだけでなく、これまで報告されているようにシトリン欠損症は、アンモニア代謝以外の肝機能は正常であることを示していた²⁾。

シトリン欠損症の病態であるアンモニア代謝について評価するために培養液中の尿素量を比較した。iPS 細胞由来肝細胞の尿素量は、正常成人肝細胞の 1/10 程度であり、シトリン欠損症とコントロールにて有意差を認めなかった。この産生量が低い原因を検討するために、尿素回路の遺伝子である OTC を調べたが、正常成人肝細胞に比べ、どちらの iPS 由来肝細胞もその発現量が 1/100 と非常に低く、2 群間で差を認めなかった。これは、iPS 由来肝細胞が、代謝に関わる遺伝子発現については未熟であることを示しており、この方法では、シトリン欠損症由来肝細胞のアンモニア代謝については、正しく評価できないと考えられた。今後は、肝細胞の代謝についてより成熟した肝細胞を作成するプロトコール（代謝遺伝子の強発現モデル）を検討する予定である。

5.結語

シトリン欠損症患者より iPS 細胞を作成することができ、肝細胞への分化もできた。しかし、iPS 由来肝細胞自体の代謝に関わる遺伝子発現は低く、シトリン欠損症のアンモニア代謝を正確に評価することはできなかった。今後、代謝に対してより成熟した肝細胞を作成することにより、シトリン欠損症の評価が可能となることが期待される。

6.文献

- 1) Yamaguchi N, et al. Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: Identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations. Hum Mutat. 2002;19:122–30.
- 2) Saeki T, et al. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). J Hum Genet. 2002;47:333–41.

- 3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells From Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;24:663-76
- 4) Alexandra Collin de l'Hortet, Takeishi K, et al. Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells With Modifiable SIRT1 Metabolism. *Cell Metab*. 2019; 30:385-401