

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト肝細胞の自己複製、分化、移植能力を有する前駆細胞へのリプログラミング法の
確立

(英語) Reprogramming adult human hepatocytes into liver progenitors with unlimited
self-renewal, efficient differentiation, and transplantation capacities

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 遊佐 宏介
(英語) Kosuke Yusa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学・医生物学研究所・教授
(英語) Professor, Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University

II 研究開発の概要

当初報告されたラット由来 CLiP (chemically induced liver progenitor) 細胞は、長期にわたり増殖能また肝細胞への再分化能を保持することができた。同等の能力を有するヒト CLiP 細胞が樹立できれば肝細胞移植療法また *in vitro* 試験のための肝細胞供給源として使用することができると期待された。しかし、本共同研究英国側における研究から、マウスおよびヒト肝細胞から、報告された培養方法で樹立した CLiP 細胞は、樹立当初は増殖能分化能を保持できるが、その能力は細胞継代とともに失われることがわかった。具体的にはマウス CLiP 細胞では増殖能は保たれるが継代とともに分化能が失われた。ヒト CLiP 細胞の場合、胎児肝細胞由来 CLiP 細胞では増殖能は維持できるが分化能が急速に失われ、成人肝細胞由来 CLiP 細胞は増殖能、分化能ともに急速に失われた。そこで、本研究では、ヒト CLiP 細胞を肝細胞移植療法また *in vitro* 試験のための肝細胞供給源とする応用を目指し、増殖能、分化能に関与する遺伝子を CRISPR-Cas システムを用いた網羅的遺伝子探索により同定し、分化、増殖能を維持できるヒト CLiP 細胞の樹立を目標とした。

研究開発提案時に、マウス CLiP 細胞の培養や分化に関する基礎データは既に英国側チームにて得られており、マウス CLiP 細胞の培養、分化法はほぼ確立していた。この中で、樹立直後に特定の細胞表面マーカーを発現する細胞集団を集めることで分化維持能力の高い細胞を濃縮することが可能となった。英国側がヒト CLiP 細胞の培養・分化条件をさらに最適化する研究開発 1 年次に、我々はまずマウス CLiP 細胞を用いて CRISPR スクリーニングを実施し、マウス CLiP 細胞の増殖、分化に関わる遺伝子を同定することとした。CRISPR スクリーニングに供する細胞として、我々が開発した Cas9 発現マウスを英国側に供与し、最新の知見に基づいて作製した Cas9 発現マウス CLiP 細胞を日本側へ導入した。我々の研究室で開発した CRISPR-KO スクリーニングの常法に則り、我々のゲノムワイド guide RNA (gRNA) ライブラリーを用いてスクリーニングを実施した。本スクリーニングでは、分化後のソート前細胞集団とソーティングにより回収したアルブミン陽性細胞分画を NGS 解析し、各 gRNA の出現頻度を算出、比較①として培養開始時とソート前集団の比較で増殖性、比較②としてソート前集団とアルブミン陽性細胞分画の比較で分化能に関する遺伝子の検出を試みるストラテジーを取った。まず、ゲノムワイド gRNA ライブラリーによる網羅的遺伝子破壊が達成されたかどうかを評価するため、比較①を解析した結果、False discovery rate (FDR) <10% カットオフにて生存・増殖必須遺伝子が 1758 遺伝子検出され、期待したヒット遺伝子数を得た。また培養により生存必須遺伝子群(リボソーム、プロテアソーム、スプライシング因子等)は脱落するので、これを Gene set enrichment analysis により解析した結果、有意な負の濃縮、即ち脱落が検出され、網羅的遺伝子破壊が達成されていることを確認した。続いて、比較②の解析結果と比較①の解析結果を統合し解析した結果、FDR<20% カットオフで分化亢進をもたらす遺伝子として 54 ヒットを得た。一方、分化低下を引き起こす有意な遺伝子は検出されなかった。これまでの知見や、また低分子化合物による制御可能な因子の観点からそれぞれ 9 遺伝子を選定し、個別の確認実験を行った結果、分化亢進をもたらす因子として同定された遺伝子 A と遺伝子 B に関して有意な再現性を確認することができた。前述の通り、マウス CLiP 細胞は増殖能は維持するが、分化能は維持できない。再現性の確認された両遺伝子が、長期培養での分化能維持にどのような効果を示すか検証するため、CRISPR gRNA 導入による遺伝子破壊後、培養を長期維持しつつ、経時的に分化効率の解析を実施した。gRNA を導入した初代マウス CLiP 細胞培養開始後 3 日目から 21 日目(約 3 週間)は分化効率の大きな低下はみられないが、その後、コントロール gRNA 発現細胞では急速に分化能を失った。一方で、二遺伝子、特に遺伝子 A においては、初期に分化能が若干減少するものの、その後、約 90 日まで分化能が維持された。以上より、同定した二遺伝子は長期分化能の維持に効果的に働くと考えられた。遺伝子 A 産物に関しては、低分子化合物が複数創生されており、抗がん剤として臨床試験が行われている。そこで阻害剤 2 剤を用い

て、マウス CLiP 細胞の分化能に対する効果を検証した。約 10 日間の処理において阻害剤の一つは分化能を亢進する傾向が見られ、阻害剤を用いた改変培地による長期間での分化能維持の可能性が示唆された。遺伝子 A 破壊 mCLiP 細胞はこのように長期に渡る分化能の維持が可能であり、その作用機序を解析するため、遺伝子発現解析を実施した。分化前のマウス CLiP 細胞を解析に供したがアルブミンや CYP を含む多くの遺伝子が発現上昇しており、肝臓の機能と関連した経路の濃縮が見られた。野生型 CLiP 細胞ではこれらの遺伝子発現が消失する一方、遺伝子 A 破壊細胞では、肝細胞としての形質をある程度維持したまま増殖することが長期の分化能維持に寄与していることが示唆された。以上から、マウス CLiP 細胞の分化能の長期維持に遺伝子 A の破壊がプラスに作用することが明らかとなった。阻害剤を用いた改変培養液でも分化能亢進の傾向が見られており、マウス CLiP 細胞の解析においては、スクリーニングの完了と候補遺伝子の取得を超えて、その有効性を証明することもできた。また後述するように、この成果により英国側によってヒト CLiP 細胞培養法の改良がなされ、長期の維持が可能となった。

ヒト CLiP 細胞の作製及び培養条件の最適化は英国側において順次進められ、日本側で上記のマウス CLiP 細胞のスクリーニングが完了し、ヒト CLiP 細胞解析が開始可能となった時点での最適培養条件を技術移転し、CRISPR スクリーニングを実施することとした。レンチウイルスを用いた CRISPR システムを使うため、我々の研究室での常法に則り、ヒト CLiP 細胞への Cas9 の導入、導入細胞でのゲノム編集活性の確認を実施した。2 次元分化培養での CRISPR スクリーニングはマウス CLiP 細胞と同様の方法で実施することとし、分化後のアルブミン陽性細胞分画をソーティングにより回収し、比較①として培養開始時とソート前集団の比較で増殖性、比較②としてソート前集団とアルブミン陽性細胞分画の比較で分化能に関する遺伝子の検出を試みた。データ解析の結果、まず、比較①において、FDR<10% カットオフを用いた場合の増殖必須遺伝子が 1459 ヒット同定された。これは、大規模がん細胞株スクリーニング (Nature 2019) と比較して同程度であり、網羅的変異細胞の作製が効率よく行われ、スクリーニングが機能していることを示した。次に、増殖能を増加させる遺伝子変異を解析した結果、FDR<5% カットオフで 18 遺伝子を見出し、そのほとんどががん抑制遺伝子であった。特に TP53 破壊は強い増殖亢進効果があり、正常細胞で通常検出されるものである。ヒト CLiP 細胞に特異的と思われる経路は検出されなかったことから、増殖性に関しては用いた改変培養液で十分であると考えられる。次に分化能への影響を比較②から評価した。FDR<5% カットオフでアルブミン陽性細胞率を亢進させる候補が 8 因子見出された。うち 4 因子に関しては同一のユビキチン経路に関与することから、これらの因子がアルブミン発現に強い影響を与えることが示唆された。実際、個別遺伝子の破壊による再現性試験を実施したところ、遺伝子 C と遺伝子 D の破壊細胞はコントロールと比べて長期培養時のアルブミン陽性率が高い傾向が認められ、スクリーニング結果を一定程度確認することができた。

ヒト CLiP 細胞を用いた 2 つ目のスクリーニングとして、ヒト CLiP 細胞を改良型培養法で維持し 3 次元分化を行うと CYP3A4 の良好な発現を得られたとの英国側の結果に基づき、3 次元分化培養における分化効率に関わる遺伝子のスクリーニングを実施することとした。CRISPR スクリーニングの必要規模は 2×10^8 細胞であるため、培養装置の規模拡大が必要であり、二つの異なるタイプの 3 次元培養装置を比較検討し、Disc vessel タイプの培養器を導入した。しかし、実際の 3 次元分化培養の再現性のコントロールは非常に難しく、スフェロイド形成の異常、不安定な細胞生存率、またスフェロイド乖離条件等、数々の条件検討を行う必要があった。英国側でも 3 次元培養装置を用いた条件検討を行い、情報を共有しつつ、改良に取り組んだ結果、スフェロイド形成と細胞の生存率は、分化培地にメチルセルロースを添加することで改善することができ、一回あたりの分化で 5×10^7 cells の回収が

可能なレベルまで改良できた。しかし、これでもまだ通常の CRISPR スクリーニングの規模には到達しておらず、複数回のサンプルをプールしカバー率を達成させた。しかし、小規模 3 次元分化培養で得られていた *CYP3A4* 遺伝子の発現を伴うほどの分化効率を達成することはできず *CYP3A4* 発現に着目したスクリーニングは断念し、アルブミン陽性細胞に着目したスクリーニングを実施することとした。スクリーニング解析の結果、NGS 解析のリード深度 (read depth) は gRNA あたり 306-374 reads と十分あるにも関わらず、全くリードが検出されない gRNA が平均 29.1% あった。このことは 3 次元分化培養によりライブラリーの複雑性が大きく損なわれていることを意味し、3 次元培養ではスフェロイド形成時に大きな負荷がかかり、インプットの細胞数よりもはるかに少数の細胞からなるスフェロイドが形成されている可能性が示唆された。今回の結果は、ヒト CLiP 細胞のスフェロイド化に際しクローン選択が起きていることを示唆するものと考え、今後のヒト CLiP 細胞開発に新しい知見を与えた。しかし、この様なクローン選択が発生した場合は通常ゲノムワイドスクリーニングは成立しない。実際、統計解析を行なっても有意なヒットを検出することはできなかった。

Initial research on rat-derived CLiP (chemically induced liver progenitor) cells suggested their potential for long-term proliferation and redifferentiation into liver cells, making them a promising candidate for liver cell transplantation therapy and the use in in-vitro toxicology testing. However, subsequent studies on mouse and human CLiP cells revealed a decline in these abilities over time with cell passaging.

To overcome this limitation, our study aimed to identify genes related to proliferation and differentiation using the CRISPR-Cas system to establish human CLiP cells with sustained proliferative and differentiation capabilities.

Firstly, we used mouse CLiP cells, for which the UK team of this collaborative project had established optimal culture and differentiation conditions. To perform CRISPR-based gene editing, we generated mouse CLiPs from our Cas9-expressing mice. We then conducted a CRISPR screen with focus on proliferation and differentiation. From the analysis on proliferation, we identified 1758 cell-essential genes, indicating that genome-wide mutagenesis with our system worked as expected. For the differentiation screen, we isolated ALB-expressing cells after differentiation using cell sorter and compared them with a pre-sort cell fraction. We identified 54 candidates, which when disrupted enhanced differentiation. Among them, Men1 and Rnf111 were validated in individual knockout studies. Moreover, when cultured in a long term (~90 days), Men1-deficient mouse CLiP cells exhibited prolonged differentiation ability. Small-molecule inhibitors targeting Men1 showed the increase in differentiation efficiency in a short-term assay, suggesting its potential application for the future development.

While we conducted the mouse CLiP screen, the UK team optimized the culture conditions for human CLiP cells, resulting in their long-term maintenance and improved differentiation. Human CLiP cells generated and maintained in this revised culture condition repopulated in the mouse liver at an efficiency similar to primary human hepatocyte. We used these human CLiP cells and the culture condition to perform a CRISPR screen. In a 2-D culture setting, we performed this screen in the same experimental setting as mouse CLiP screen. In the proliferation screen, we identified 1459 cell-essential genes, which are equivalent to the number of cell-essential genes identified in a large-scale cancer cell line study, indicating the effective genome-wide mutagenesis. In the differentiation screen focusing on ALB expression, we obtained 8 hits, which when disrupted promote albumin expression. Of these, 4 factors are involved in the same biological pathway. When 2 of them were tested in individual knockouts in a short-term culture, their phenotype was validated. Further validation in a long-term setting is required.

As the human CLiP cells in our condition were able to differentiate in a 3-D condition and could give rise to CYP3A4-expressing cells, we decided to perform a third screen in the 3-D differentiation to identify genes affecting 3-D differentiation. However, achieving successful 3D differentiation was challenging due to clonal selection issues, which hindered genome-wide screening.

Despite this setback, our research holds significant implications for liver cell transplantation therapy and in vitro testing. It also provides valuable insights for future advancements in human CLiP cell development. The identification of Men1 as a key gene for differentiation offers a potential target for therapeutic interventions.