

# 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 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) iPS細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点  
(英語) Center for development of innovative technologies for metabolic  
organs using induced pluripotent stem (iPS) cells

研究開発実施期間：平成25年7月8日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 谷口 英樹  
(英語) Hideki Taniguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 公立大学法人横浜市立大学・特別契約教授  
(英語) Special Contract Professor, Yokohama City University Graduate School of Medicine

## II 研究開発の概要

### 1. 研究開発の背景・目的

我々はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、従来の「細胞の分化誘導」という開発概念から脱却し、異なった細胞系譜の時空間的な相互作用を活用した「臓器の再構成に基づく分化誘導」を実現化し、世界で初めて、ヒト肝臓オルガノイドをヒト iPS 細胞から人為的に創出するための基盤技術を確立している (Takebe T, Taniguchi H *et al*, *Nature*, 2013; W02013/047639, 特許第 6456425 号, 米国 US11,326,150 等)。本研究では、尿素サイクル異常症および肝硬変を対象とする臨床用ヒト iPS 細胞由来肝芽 (ヒト iPSC 肝芽) 移植の臨床試験に向け、全ての構成細胞がヒト iPS 細胞に由来する肝芽の製造プロトコルの確立・大量製造法の構築・最適な移植操作技術の確立・非臨床 PoC (Proof of Concept) 取得・非臨床安全性確認・臨床試験の実施体制整備を実施した。

### 2. 尿素サイクル異常症治療に向けた研究開発

尿素サイクル異常症 (OTC/CPS1 欠損症) はアンモニアの代謝異常に起因する先天性代謝異常症であり、現在の根治療法は肝移植のみである。しかしながら、肝移植は肝臓が一定のサイズに成長するまで安全に実施出来ず、乳幼児患者における肝移植までのブリッジ治療法の確立が求められている。本研究では、ヒト iPSC 肝芽の門脈内移植による尿素サイクル異常症の治療法開発を推進した。

## 2-1) 臨床投与を目指したヒト iPSC 肝芽の製造法の開発

ヒト iPSC 肝芽の大量製造を実現化するため、肝芽作製に必要な全ての細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導する製造プロトコルを確立した上で、拠点内で産学連携体制を構築し、大量調製を可能とする培養容器や臨床用途に適合する分化誘導培地を企業と共同で開発した (*Cell Reports*, 2017; *Sci Rep*, 2020; W02014/199622, 特許第 6400575 号, 米国 US11,060,065 等, W02015/182159, 特許第 6560199 号, 米国 US10,752,879 等; W02014/196204, 米国 US10,494,593 等)。さらに、高感度な未分化細胞の残存評価系 (*Sci Rep*, 2020; W02019/240247; W02020/149391)、シングルセル RNA シーケンス技術に基づく分化誘導細胞のヘテロジェネイティ解析系 (*Nature*, 2017)、代謝フラックス解析を活用した尿素サイクルの定量的代謝評価系 (*Methods Mol Biol*, 2022) 等を構築し、ヒト iPSC 肝芽の製造基盤を確立した。確立した技術に基づいてヒト iPSC 肝芽工程を構築し、製造安定性を確認した。以上より、臨床投与に対応可能なヒト iPSC 肝芽の製造法を確立した。

## 2-2) ヒト iPSC 肝芽移植による尿素サイクル異常症治療の PoC 確認

実験動物中央研究所との共同研究により、免疫不全を背景に持ち OTC 機能低下による軽症型および重症型尿素サイクル異常症を再現する疾患モデルマウスを作製し、ヒト iPSC 肝芽移植による治療効果を確認した。軽症型 OTC 欠損症モデルマウスの腎皮膜下へのヒト iPSC 肝芽を移植により、アンモニア代謝機能が改善した。代謝フラックス解析により移植後組織のヒト肝細胞領域の OTC 活性を測定したところ、ヒト肝細胞と近似した OTC 活性が検出された。重症型 OTC 欠損症モデルマウスの腎皮膜下へのヒト iPSC 肝芽移植により、生存率の改善・アンモニア代謝機能の改善・移植組織における OTC 活性が確認されるとともに、アンモニア由来代謝物の尿中排泄が検出された。さらに、臨床試験でのヒト iPSC 肝芽移植効果をより正確に予測するため、軽症型 OTC 欠損症モデルマウスの門脈内にヒト iPSC 肝芽を移植した結果、肝臓の OTC 活性が有意に改善した。以上より、ヒト iPSC 肝芽は尿素サイクル異常症に対して治療効果を示すことが確認された。

## 2-3) 尿素サイクル異常症治療の臨床試験に向けた準備

尿素サイクル異常症を対象とするヒト iPSC 肝芽移植の臨床試験の実現に向け、横浜市立大学に細胞培養加工施設 (Cell processing Facility: CPF) を整備した (W02016/047571, 特許第 6440432 号, 米国 US10,647,955 等; W02015/111544, 特許第 6259838 号等)。さらに、ヒト iPSC 肝芽の試験製造を通じた製造・品質試験 SOP 検証、免疫不全動物への移植による一般毒性・造腫瘍性・体内分布評価、輸送試験を実施し、ヒト iPSC 肝芽移植の安全性を確認した。また、臨床医師との連携体制の構築、尿素サイクル異常症コンソーシアム設立による患者リクルート体制の強化を図った。試験製造・非臨床データ、臨床プロトコル、実施体制情報等を第 1 種再生医療等提供計画として文書化し、特定認定再生医療等委員会に申請した。これにより、当初の研究目的を達成した。

## 3. 肝硬変治療に向けた研究開発

肝硬変は様々な肝疾患の最終的な進行病態であり、国内に約 40~50 万人以上の患者が存在すると推定されている。さらに、肝移植以外に根治療法がなく、治療法を早急に開発することが社会的に強く望まれている。また、肝硬変は門脈圧亢進を示す場合が多く、門脈からのヒト iPSC 肝芽投与はリスクが懸念されるため、肝臓表面への移植が可能な大型のヒト iPSC 肝芽の作製技術を新たに開発し、治療効果や安全性検討を推進した。

### 3-1) 肝硬変治療に向けた新規融合型ヒト iPSC 肝芽の創出

本プログラムにおいて、従来のヒト iPSC 肝芽を集合・融合させ、大型のヒト iPSC 肝芽 (融合型ヒト iPSC 肝芽) を創出する手法を新規開発した (W02019/189324, 特許第 7228269 号)。融合型ヒト iPSC 肝芽は豊富な血管

系を有するとともに、生体内で胆管様構造や類洞様構造を有する肝臓組織を構築することから、従来の肝芽に比べて生体内組織への近似性が向上していると考えられた。

### 3-2) 融合型ヒト iPSC 肝芽移植による肝硬変治療の PoC 確認

肝硬変に対する融合型ヒト iPSC 肝芽移植の有効性を確認するため、マウス・ラットを用いて薬剤誘導性の肝硬変動物モデルを作製した。このモデルは、Child-Pugh 分類の GradeB/C を再現し、線維化モデルとして妥当と考えられた。また、肝臓表面に融合型ヒト iPSC 肝芽を安全かつ確実に移植するため、肝表面の被膜剥離手法 (*Int J Mol Sci*, 2021)、移植後の被覆固定法 (*Sci Rep*, 2020; W02020/189561) を開発した。これらの基盤技術を活用し、融合型ヒト iPSC 肝芽を薬剤誘導性肝硬変モデル動物の肝表面へ移植した結果、生存率・肝線維化・血液凝固活性等が有意に改善されることを確認した (W02020/145231)。融合型ヒト iPSC 肝芽移植による治療効果の機序について検討し、線維化改善を誘導するメカニズムの一端を明らかにした。さらに、ヒトへの外挿性を担保するため、カニクイザルの薬剤誘導性肝硬変モデルを確立した上で (*Sci Rep*, 2020)、カニクイザル iPSC 細胞から作製した融合型 iPSC 肝芽をカニクイザル肝硬変モデルに移植し、同種移植による治療効果を検討した結果、線維化改善等の治療効果が確認された。以上より、融合型 iPSC 肝芽移植は肝硬変に対して治療効果を示すことが明らかとなった。

### 3-3) 肝硬変治療の臨床試験に向けた準備

臨床投与に向けて大型の融合型ヒト iPSC 肝芽の作製法を開発した。肝硬変治療においては、肝細胞換算で  $10^9$  オーダーの大量細胞製造が必要と試算されるため、複数の細胞製造施設を利用した製造体制を構築するとともに、製造規模のスケールアップ検証を実施した。製造規模拡大による目的外細胞混入のリスク上昇に対応するため、未分化細胞混入の超高感度検出法 (W02021/095798, 特許第 7138841 号)、シングルセル RNA シーケンス技術を用いた低品質細胞の高感度検出法を確立した。以上より、肝硬変治療へ向けた融合型ヒト iPSC 肝芽製造の基盤技術を確立した。並行して、臨床試験に向けた臨床医との連携体制を構築した。横浜市立大学附属病院は、肝疾患診療連携拠点病院として神奈川県における慢性肝炎・肝硬変・肝不全患者診療の一大拠点であり、臨床試験において十分な肝硬変患者数を確保可能である。同病院内に国際臨床肝疾患センターを設立し (2019 年)、本拠点の分担研究者が同センター業務に参画しながら臨床試験実施に向けた連携体制を構築した。以上の様に、本プログラムにより、融合型ヒト iPSC 肝芽移植による肝硬変治療の基盤構築を達成した。

一方、臨床医との緊密な意見交換の中で、医学的・社会的ニーズならびに患者リクルートの観点から、臨床試験の対象患者を NASH 肝硬変に限定することが望ましいと考えた。融合型ヒト iPSC 肝芽移植による NASH 肝硬変の治療法開発については、令和 5 年度の AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラムにおいて採択され、当該プログラムで NASH 肝硬変に対する堅牢な PoC 取得を進め、臨床応用に繋げる予定である。

## 4. 研究開発の意義

本拠点において開発に成功したヒト iPSC 肝芽は、現在、隆盛を極めている「オルガノイド研究」の扉を開いた画期的な研究成果である。本研究では、精度の高いシングルセル RNA シーケンス法を駆使して、ヒト iPSC 肝芽が生体内臓器に近似した分化を辿ることを世界に先駆けて明らかにした (*Nature*, 2017)。さらに、臨床試験の実施を前提として、ヒト iPSC 肝芽の均質性を担保した大量製造法および製造体制を確立し、ヒューマン・オルガノイドの工業的製造へと大きく踏み出した (*Cell Reports*, 2017)。さらに、これらのオルガノイドを融合させることにより、大型で肝表面移植に対応可能な機能的新規オルガノイド (融合型ヒト iPSC 肝芽) を創出し、肝疾患治療への臨床応用を推進した。これらの研究成果は、オルガノイド研究を世界的に先導するものであり、極めて高い科学的・医学的価値を有している。また、ヒト iPSC 細胞を用いた肝臓オルガノイドの再構成技術は腎臓や膵臓など、他の臓器創出にも応用可能であること、オルガノイドを用いた疾患モデルの作製

が可能であることなども示しており、再生医療開発を超えて、多くの研究領域に非常に大きなインパクトをもたらしている。

## **1. Research background and aims**

We previously achieved "differentiation based on organ reconstruction" by utilizing the spatiotemporal interaction of multiple cellular lineages, and world-firstly developed the foundational technology to artificially create human organoids from hiPSCs (Takebe T, Taniguchi H et al., *Nature*, 2013). This project aims to advance the clinical application of hiPSC-liver bud (hiPSC-LB) for treating metabolic liver diseases and liver cirrhosis by establishing a stable and large-scalable system for producing clinical-grade LBs entirely from hiPSCs, developing the most suitable transplantation process for clinical application, obtaining the non-clinical Proof of Concept (PoC), confirming the non-clinical safety, and preparing frameworks for the clinical trial implementation.

## **2. Research and Development for Urea Cycle Disorder Treatment**

Urea cycle disorders (OTC/CPS1 deficiency) are congenital metabolic disorders caused by abnormalities in ammonia metabolism, while the current definitive treatment, liver transplantation, cannot be safely performed until the liver reaches a certain size. In this project, we have promoted the development of a bridging strategy for urea cycle disorders with portal vein transplantation of hiPSC-LBs.

### **2.1 Development of the production method of hiPSC-LB for clinical administration**

In this project, we established a production system using cells entirely from hiPSCs, built an industry-academia collaboration system within the project, and developed a culture vessel that enables large-scale preparation and a differentiation medium that is suitable for clinical application in collaboration with our industry partners (*Cell Reports*, 2017; *Sci Rep*, 2020). Moreover, we developed technologies to ensure the safety and quality of hiPSC-LB by constructing a highly sensitive detection system for residual undifferentiated cells using novel marker genes we identified (*Sci Rep*, 2020), establishing heterogeneity analysis methods based on single-cell RNA sequencing of the differentiated cells (*Nature*, 2017), and setting up a cellular metabolic flux analysis system with mass spectrometry (*Methods Mol Biol*, 2022). With these technologies, we have successfully established a stable manufacturing method for hiPSC-LB that is suitable for clinical administration.

### **2.2 PoC confirmation for treating Urea Cycle Disorders through hiPSC-LB Transplantation**

We confirmed the therapeutic effects of hiPSC-LB transplantation in mild and severe OTC deficiency immunodeficiency mice, created through collaborative research with the Experimental Animal Research Institute. Transplantation of hiPSC-LB under the renal capsule significantly improved ammonia metabolism function in mild and severe OTC deficiency model mice, and metabolic flux analysis showed that the OTC activity of hepatic lineages in transplanted areas is comparable to human hepatocytes. Moreover, in severe OTC deficiency mice, we also detected a significant improvement in survival rates and confirmed the presence of ammonia-derived metabolic products in the urine. Furthermore, we have found that portal vein transplantation of hiPSC-LB could also significantly improve OTC activity in the liver of mild OTC deficiency mice. Thus, we confirmed that hiPSC-LBs demonstrate therapeutic effects for urea cycle disorders.

### **2.3 Preparation for clinical trials of Urea Cycle Disorder treatment**

To realize the clinical trial of hiPSC-LB transplantation for urea cycle disorders, we set up a Cell Processing Facility within Yokohama City University for large-scale manufacturing. Through trial manufacturing of hiPSC-LBs, we verified the Standard Operating Procedures of manufacturing and quality testing and confirmed the safety of hiPSC-LB transplantation by evaluating general toxicity, tumorigenicity, and in vivo distribution with immunodeficient models. We also established a collaborative framework with clinical physicians and strengthened the patient recruitment system by establishing the Urea Cycle Disorder Consortium. Based on these efforts, we applied Class I Regenerative Medicine to the Specially Certified Committee for Regenerative Medicine, achieving the initial research objectives.

## **3. Research and Development for liver cirrhosis treatment**

Liver cirrhosis represents the advanced stage of various liver diseases, and it is estimated that there are over 400,000 to 500,000 patients in Japan. Furthermore, liver cirrhosis lacks curative treatments other than liver transplantation, emphasizing the urgent need to develop new therapeutic approaches. Considering the potential risks associated with the portal vein transplantation of hiPSC-LB in cirrhosis patients, we developed a large-size hiPSC-LB that can be transplanted onto the surface of the liver and investigated the therapeutic efficacy and safety of hiPSC-LB using liver cirrhosis models.

### **3.1 Development of Fused hiPSC-LO for liver cirrhosis treatment**

We have successfully developed a large-size hiPSC-LB (Fused hiPSC-LB) by aggregating and fusing conventional hiPSC-LB. These fused hiPSC-LB exhibit enhanced resemblance to the native liver by presenting a well-developed vascular network and maturing into bile duct-like and sinusoid-like structures in vivo.

### **3.2 PoC confirmation for treating liver cirrhosis with Fused hiPSC-LB Transplantation**

To confirm the effectiveness of fused hiPSC-LB transplantation for liver cirrhosis, we developed drug-induced liver fibrosis models with mice and rats, which accurately reproduces the pathological conditions equivalent to Child-Pugh Grade B/C. We also advanced technologies to peel the liver surface membrane (*Int J Mol Sci*, 2021) and fix transplanted LB on the liver (*Sci Rep*, 2020) that help transplant Fused hiPSC-LB safely and reliably. With these developed technologies, we detected significant improvements in survival rates, liver fibrosis, and blood coagulation activity by surface transplantation of Fused hiPSC-LB in cirrhosis models. Additionally, we shed light on how Fused hiPSC-LBs transplantation improves fibrosis. Furthermore, to ensure extrapolation to humans, we also developed a drug-induced liver cirrhosis model in the cynomolgus monkey (*Sci Rep*, 2020), and confirmed the therapeutic efficacy of cynomolgus monkey Fused iPSC-LBs on liver fibrosis with allogeneic transplantation. Thus, our results suggest that Fused hiPSC-LBs show promising therapeutic effects against liver cirrhosis.

### **3.3 Preparation for Clinical Trials of liver cirrhosis treatment**

Not only for model transplantation, but we also generated a larger fused hiPSC-LB suitable for clinical administration. Because about  $10^9$  cells derived hiPSC-LB would be necessary for one cirrhosis patient, we established a manufacturing system by utilizing multiple cell production facilities to scale up the production. To address the increased risk of unintended cell contamination associated with the scale-up production, we developed an ultra-sensitive detection method for undifferentiated cell contamination and a high-sensitivity detection method for low-quality cells using single-cell RNA sequencing technology. Therefore, we have established foundational technologies to produce Fused hiPSC-LB for treating liver cirrhosis.

Moreover, we established a collaborative framework with clinical physicians in preparation for the clinical trial. Yokohama City University Hospital has been designated as a collaborative hospital for liver disease treatment and is a major center for the diagnosis and treatment of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and liver failure in Kanagawa, ensuring sufficient cirrhosis patients of the clinical trial implementation. Since 2019, the International Clinical Liver Disease Center has been established within the hospital, and researchers from our program have participated in the center's activities and built a collaborative framework for the clinical trial implementation. These results suggest that we have achieved the foundation for liver cirrhosis treatment using fused hiPSC-LB transplantation. Through close discussions with clinical physicians, considering medical and social needs and patient recruitment, NASH-induced liver cirrhosis would be the most targeted patient of the clinical trial. In 2023, we were adopted by the AMED Program for Accelerating Regenerative Medicine, Cell Therapy, and Gene Therapy Realization to obtain robust PoC for treating NASH-induced liver cirrhosis and develop a clinical therapeutic strategy for NASH-induced liver cirrhosis.

## **4. Significant of achievements**

The successful development of hiPSC-LBs in this project represents a groundbreaking achievement in the flourishing "organoid research" field. In this project, we pioneered highly accurate single-cell RNA sequencing to reveal the stepwise differentiation of hiPSC-LB towards liver-like organs within the living body (*Nature*, 2017). Moreover, in preparation for clinical trials, we have established a stable and large-scalable manufacturing system for generating homogeneous hiPSC-LBs, taking significant steps toward the industrial production of human organoids (*Cell Reports*, 2017). By fusing these hiPSC-LBs, we have created functional fused organoids (fusion-type human iPSC liver buds) capable of large-scale liver surface transplantation, promoting their clinical applications in liver disease treatment. These research achievements belong to the world's highest level and hold tremendously high social, scientific, and medical value. Furthermore, these advanced organoid technologies can also be applied to generate other organs, including kidneys and pancreas, and develop organoid disease models, significantly contributing to various research areas beyond regenerative medicine.