

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

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト iPS 細胞を用いた呼吸器難病の病態機序の解明と新規創薬基盤の確立
(英語) Application of human iPS cells for disclosing the pathogenic mechanisms of intractable respiratory diseases and finding novel therapeutic agents

研究開発実施期間: 平成29年8月29日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 平井 豊博
(英語) Toyohiro Hirai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科呼吸器内科学 教授
(英語) Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University

II 研究開発の概要

1. 研究開発の成果

特発性間質性肺炎(IIPs:指定難病85)、嚢胞性線維症(CF:指定難病299)、肺胞微石症(PAM:小児慢性特定疾病)の3疾患について、鑑別を要する類似疾患も一部含めてそれぞれ33症例、3症例、7症例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、核型解析、未分化マーカーの発現確認、三胚葉分化能などの性状評価を実施し、同意の得られた症例はすべて、理化学研究所バイオリソースセンターの細胞バンクに寄託した。また各症例に付随する胸部 X 線、胸部 CT、呼吸機能検査等の臨床情報についても入手可能な範囲で寄託した。IIPs は平成29年度から令和4年度にかけて症例をリクルートし、原因遺伝子の同定済み症例について研究協力者からの紹介を受け、家族発症の症例を重点的に集めた。また、IIPs でこれまでに国内外から報告されてきた既知の原因遺伝子についてはパネルシーケンシングを設計し、それによって明らかになったものも含めて、最終的に *SFTPA1*(2家系)、*SFTPA2*(2家系)、*SFTPC*(2家系)、*ABCA3*(1家系)、*TERT*(1家系)、*RTEL1*(1家系)、*MUC5B* (rs35705950:1家系)に疾患原因と考えられるバリエーションを持つ疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。遺伝子修復 iPS 細胞株については IIPs では *SFTPA1* および *SFTPC*、肺胞微石症では *SLC34A2* について各1症例について病的バリエーションに対するゲノム編集を行い、正常な塩基配列に修復した iPS 細胞株を樹立した。一部の症例では遺伝子編集で病的バリエーションの発現の

みを落とし、野生型のアレルのみが発現するコントロール iPS 細胞株も樹立した。

疾患モデル開発についてはすでに疾患特異的 iPS 細胞を樹立していた IIPs と類似の家族発症の間質性肺炎を来たすことの知られるヘルマンスキー・パドラック症候群 II 型 (Hermansky-Pudlak syndrome type 2; HPS2) 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞での遺伝子修復株が樹立できており、解析が先行していた。そこで、分化誘導した肺泡オルガノイドを用いた解析をさらに進め、患者由来細胞では肺サーファクタントの産生・分泌を担うラメラ体の分布・形態・分泌に異常を認めることから、肺サーファクタント脂質の分泌を生細胞イメージングなどで可視化・定量化する方法を報告した (*Stem Cell Reports*, 2019)。同時期に海外から特発性肺線維症 (IPF) 患者の肺組織のシングルセル解析結果が複数報告され、線維化した肺組織の肺泡上皮細胞では、II 型肺泡上皮細胞から I 型肺泡上皮細胞への正常な分化過程が障害されていることが明らかとなったため、iPS 細胞を用いてこの再現を試みた。iPS 細胞由来の I 型肺泡上皮細胞については分化誘導法が確立していなかったため、1 細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析により同定し、Wnt シグナル経路の抑制が I 型肺泡上皮細胞への分化を促進することを見出した。また、IPF で報告されている II 型から I 型肺泡上皮細胞への分化異常が、健常者 iPS 細胞由来の肺泡上皮細胞では肺泡間葉細胞の存在によって抑制されている可能性を見出し、疾患モデルに有用な知見と考えられ、論文報告した (*Stem Cells*, 2021)。

遺伝子修復株も樹立した疾患特異的 iPS 細胞については、分化誘導の最適化と表現型評価を優先的に進め、IIPs 特異的 iPS 細胞株と、原因遺伝子変異を修復した iPS 細胞株からそれぞれ肺泡オルガノイドを作成し、上皮・間葉成分のそれぞれについて網羅的遺伝子発現解析を進めた。特に *SFTPC* に病的バリエーションを持つ疾患特異的 iPS 細胞については、遺伝子修復前後の遺伝子発現変動をエンリッチメント解析により比較することで、複数の遺伝子群が変動することを確認したが、これらの変化の程度はバリエーションの種類などの要因で程度が異なり、病態とも関連しうる可能性が見出された。そこで、家族発症例の原因遺伝子として注目される *SFTPC* の様々な病的バリエーションに基づく細胞表現型からスクリーニング系及び薬効評価系確立を目指し、まずは直接的な上皮細胞への影響を株化培養細胞を用いて簡便に評価する方法を検討し、細胞障害性の指標として ER ストレスや蛋白質凝集塊の形成等を発光レポーターやハイスループットイメージアナライザーを用いた化合物スクリーニングにも応用できる定量性の高いレポーターシステムを構築した。本システムを利用して、機能既知 2480 化合物の評価とハイスループット評価系のバリデーションを行い、病態に関連すると考えられる少数の化合物を絞り込んだ。さらにこれらの化合物を用いて、*SFTPC* の病的バリエーションを持つ疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した肺泡上皮細胞の薬効評価系のバリデーションを行い、iPS 細胞やマウスモデルの病態解析及びスクリーニング系作成時の陽性コントロールに使用できる化合物を同定した。同時に、薬効評価系として、何が本当に適切であるかを検証するために、研究協力者の協力を得て、新規報告のものを含めた複数の *SFTPC* 病的バリエーションの機能評価を行い、これに臨床情報を盛り込んだ *SFTPC* 病的バリエーションの機能解析と層別化を行い、論文投稿中である。また、間質性肺炎における上皮-間葉相互作用への効果も確認できるような肺泡オルガノイドを用いたモデルの開発も行った。ブレオマイシンを添加すると、肺泡上皮細胞を中心とする細胞老化が誘発され、TGF β シグナルの活性化を経て、線維芽細胞の活性化と遊走が引き起こされ、肺泡オルガノイドを培養していた基質全体の収縮や細胞外マトリクスが蓄積するという肺線維症の病態と類似した現象を認め、ヒト iPS 細胞を用いた新しい肺線維症の疾患モデルとして論文報告した (*Stem Cell Reports*, 2021)。この方法と *SFTPC* の病的バリエーションを持つ疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデルを用いて、上記で同定した化合物の薬効評価をしたところ、表現型の改善が見られ、今後、スクリーニングで同定した化合物の評価や病態解析系に応用できることが期待される。この成果は化合物評価系の構築と合わせ、論文としてまとめた (in revision)。肺泡オルガノイドの間葉細胞については従来より研究利用が可能となっている胎児肺由来の肺線維芽細胞を使用してきたが、より生理学な意味を持ち、病態解析に有用なツールを目指して、肺泡間葉細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導する方法も開発し論文報告した (*Cell Rep Methods*, 2022)。また、疾患特異的 iPS 細胞による *in vitro* での疾患モデルが *in vivo* でも整合性が取れるか否かを確認するため、リクルートした患者と同じバリエーションを導入した肺線維症モデルマウスの開発も行い、既

報の *SFTPC* 変異と同様にブレオマイシン感受性が高いことを見出し、さらに iPS 細胞で薬効の確認できた化合物を投与すると、一定の治療的効果を認めることも明らかにできた。

一方、CF の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析系を構築するために、CF の中でも患者数も複数報告され、病因が明確な 3849+10kb C>T 変異に着目した。この変異はスプライシング異常による偽エクソンが生成することで、早期終止コドンを生じてナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) による分解を受け、CFTR の発現量が減少するために CF を発症する。この変異をヘテロ、ホモで持つ患者それぞれから iPS 細胞を樹立し、気道上皮細胞への分化誘導の最適化を行った。分化誘導した iPS 細胞から RNA、タンパク質を抽出し、病因となる *CFTR* のスプライシング異常および mRNA 発現量の低下を検出し、さらに、ウェスタンブロットティングにより異常 CFTR タンパク質の検出に成功したほか、フォルスコリンにより cAMP を介した CFTR 刺激による気道上皮オルガノイドの膨張 (Forskolin Swelling Assay) を可視化し定量化する方法を確立し、CF 患者の病態を iPS 細胞分化誘導系を用いてアッセイできる系の構築に成功した。症例集積を検討したが、国内患者のリクルートが困難だったため、H29-R1 年度で終了し、R2 年度以降は当該研究期間中に設立した大学発ベンチャー企業に研究を引き継いだ。

また、R2-R4 年度にかけて実施した PAM の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析では、分化誘導した肺胞オルガノイドでは明らかなオルガノイド内腔での微石の形成を確認することができなかつたため、微石の形成を再現するため、II 型肺胞上皮細胞を長期培養する方法の開発を進めた。iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞を免疫不全マウスの肺胞に低効率ながらも生着できることがわかり (*Biomaterials*, 2021)、PAM の疾患特異的 iPS 細胞とその遺伝子修復株に対して追加のゲノム編集を行い、レポーター細胞としての機能も持たせることができたので、これを用いてマウス肺胞に生着させる条件を検討した。

2. 研究成果の意義

呼吸器領域における代表的な難治性疾患として知られる IIPs、CF、PAM について患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を樹立でき、理化学研究所バイオリソースセンターの細胞バンクに寄託して、可能な症例については臨床情報も添付したことで、直接診療に関わっていない研究者でも iPS 細胞を用いた希少難治性呼吸器疾患の研究を開始できるようになった。IIPs は国内患者数 1 万人以上とされ、平均生存期間は 5 年程度の依然重篤な疾患である。近年、最も予後不良の病型である特発性肺線維症 (IPF) に対してピルフェニドンやニンテダニブなど新規治療薬も使用可能となっているが、効果は限定的であり、病状を十分に改善させるまでには至っていない。本研究課題で実施した疾患特異的 iPS 細胞の研究では、疾患の原因となる患者自身の遺伝子のバリエーションを反映した疾患モデルを通じて病態メカニズムの解明から層別化、それに対応した創薬の可能性を期待できる。

CF は *CFTR* の遺伝子変異を原因とする遺伝性疾患で、日本では稀だが欧米人では出生 3000 人に 1 人が発症し、気道上皮細胞の機能異常により気道感染症を繰り返して呼吸不全に至る重篤な疾患である。*CFTR* の機能異常様式により病型分類がなされており、それらを標的に Ivacaftor などの分子標的治療薬が開発されているが、多数の遺伝子変異パターンも報告されており、未だ多くの患者では有効な治療法が存在しないのが実情であり、疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデルは初代細胞を要さないことや入手には限界のある呼吸器細胞を十分数確保できるため、本研究課題で実施した疾患モデルの開発は今後の創薬につながることを期待される。

PAM はリン酸カルシウムを主成分とする微石が肺胞内に出現する常染色体劣性遺伝疾患であり、II 型肺胞上皮細胞に特異的に発現する IIb 型ナトリウム依存性リン運搬蛋白質 NaPi2b (SLC34A2) の機能欠損が原因と報告されている。有効な治療法はなく極めて希少な疾患のため患者由来の呼吸器細胞はほぼ入手は不可能だったが、本研究課題において当初の予想を上回ってリクルートすることができ、肺胞微石症を計 6 症例とその類似疾患であるびまん性肺骨化症を 1 症例樹立することができた。

IIPs、CF、PAM はいずれも進行性の疾患であり、最終的に呼吸不全に対する肺移植しかないのが実情であり、我が国においては慢性的に肺移植ドナー不足が続いている現状を鑑みると、根本的治療薬もしくは少なくとも

疾患の進行を抑制し得る薬剤の開発は喫緊の課題でもある。これまで各疾患の病態解明や創薬が困難であった理由として、*in vitro*、*in vivo*とも患者の病態を適切に反映した汎用性の高いモデルが存在せず、研究の技術基盤がなかったことがあげられるが、本研究課題を通して、疾患特異的 iPS 細胞を用いることでこれらの解決を期待できるようになった。

1. Results of the research project

Patient-derived iPS cells were established from 33, 3, and 7 cases for research on idiopathic interstitial pneumonia (IIPs), cystic fibrosis (CF), and pulmonary alveolar microlithiasis (PAM), respectively, including similar diseases requiring differential differentiation. Karyotypes, expression of undifferentiated markers, and differentiation potential to three germ layers were evaluated. The pathogenic variants of IIPs patient-derived iPS cells included of *SFTPA1* (2 families), *SFTPA2* (2 families), *SFTPC* (2 families), *ABCA3* (1 family), *TERT* (1 family), and *RTEL1* (1 family), and *MUC5B* (rs35705950: 1 family line). Genome editing was performed on the pathogenic variants of *SFTPA1* and *SFTPC* in IIPs and *SLC34A2* in alveolar microlithiasis in one case each, and the alleles with pathogenic variants were knocked out and/or gene-corrected in some cases. In the early days of this project, we worked on disease modeling of Hermansky-Pudlak syndrome type 2 (HPS2), which is known to cause familial interstitial pneumonia similar to IIPs for which patient-derived iPS cells had already been established, while we recruited new patients with IIPs. We analyzed the alveolar organoids derived from the HPS2 patient-derived iPS cells as well as their gene-corrected ones, revealing that the distribution, morphology and secretion of lamellar bodies in the patient-derived alveolar type II (AT2) cells were abnormal. We visualized and quantified the secretion of pulmonary surfactant using live cell imaging (*Stem Cell Reports*, 2019). Since no method had been established for generating iPS cell-derived alveolar epithelial type I (AT1) cells, we identified AT1 cells by single-cell RNA-seq and found that suppression of the Wnt signaling pathway promoted differentiation of AT2 into AT1 cells. In addition, we speculated that the abnormal differentiation from AT2 to AT1 cells reported in IPF lung tissues may be suppressed by the presence of lung alveolar mesenchymal cells based on the culture of alveolar epithelial cells derived from human iPS cells (*Stem Cells*, 2021). Next, we generated alveolar organoids from IIPs patient-derived iPS cell lines as well as their gene-corrected ones and performed transcriptome analyses of epithelial and mesenchymal components, which probably mirror their pathological mechanisms. In order to establish a screening system based on the cellular phenotype of various SFTPC mutations, we investigated a simple method to evaluate direct effects on epithelial cells using cell lines, and then developed a luminescent reporter and a high-throughput image analysis to evaluate the effects of *SFTPC* variants for ER stress and protein aggregation. We also developed a model of pulmonary fibrosis using alveolar organoids that were able to recapitulate a pathogenic epithelial-mesenchymal interactions, and found that the addition of bleomycin induced cellular senescence predominantly in AT2 cells via activation of TGF β signaling. In this model, the activated fibroblasts were migrated, and the entire substrate on which alveolar organoids were cultured substantially shrank and extracellular matrix accumulated, a phenomenon similar to the pathogenesis of pulmonary fibrosis (*Stem Cell Reports*, 2021). We applied this method to the evaluation of drug efficacy in a disease model using patient-derived iPS cells with pathological variants of SFTPC (in revision). We also established a method of generating iPS cell-derived lung alveolar mesenchymal cells which can induce alveolar organoids with possible application to disease models (*Cell Rep Methods*, 2022). In order to confirm whether the *in vitro* disease model using patient-specific iPS cells is consistent *in vivo*, we

generated a mouse model of pulmonary fibrosis and analyzed phenotypes of that and evaluated the drug efficacy of the identified compound.

On the other hand, to analyze pathogenic mechanism of CF using patient-derived iPS cells, we focused on the 3849+10kb C>T mutation in CF. This mutation generates a pseudo-exon due to splicing aberration, resulting in a premature termination codon, which is degraded by the nonsense mutation-dependent mRNA degradation mechanism (NMD) and causes CFTR expression level to decrease, resulting in CF. We established iPS cells from both heterozygous and homozygous patients with this mutation and the iPS cells were differentiated into airway epithelial cells. By extracting RNA and proteins from differentiated iPS cells, we succeeded in detecting abnormal CFTR protein by Western blotting and *CFTR* mRNA expression level, which is the cause of splicing defects and CF, as well as cAMP-mediated CFTR stimulation by forskolin (forskolin swelling assay). We hoped to recruit patients, but due to difficulties in recruiting patients in Japan, we terminated the project after research over the 2018-2020 fiscal year. In the pathological analysis of PAM using disease-specific iPS cells conducted from the 2021 to 2023 fiscal year, we were unable to confirm the microlithiasis in the lumen of alveolar organoids induced by differentiation, so we worked on developing a method to mature AT2 cells to recapitulate microlithiasis.

2. Significance of the project

We were able to establish patient-derived iPS cells for studying IIPs, CF, and PAM, which are known as intractable lung diseases, and deposited them with the corresponding clinical data for possible cases at RIKEN BioResource Center. IIPs is still a serious disease even in recent years, while the two FDA-approved drugs, pirfenidone and nintedanib are available for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Both drugs' efficacy has been limited and they have yet to show sufficient improvement in disease status. The patient-derived iPS cell research will continue to elucidate the pathological mechanisms through disease models that reflect the patient's own genetic variants and to realize drug discovery and precision medicine with their probable appropriate stratification. In addition, CF is an inherited disease caused by genetic mutation of CFTR, which is rare in Japan but affects 1 in 3,000 births in Europe and the U.S. It is a serious disease that leads to respiratory failure due to repeated airway infections caused by dysfunction of airway epithelial cells. However, there are still no effective therapies for many patients. The iPS cell-based disease models do not require primary cells and therefore, it is expected that iPS cells would be an unlimited source of patient-derived lung cells and could lead to drug discovery in the future. Further, PAM is an autosomal recessive genetic disorder in which calcium phosphate-based microliths appear in the alveoli, and is reported to be caused by a functional defect of type IIb sodium-dependent phosphorus transport protein NaPi2b (SLC34A2), which is specifically expressed in AT2 cells. In this project, we were able to recruit more patients than initially expected and established a total of six cases of alveolar microlithiasis and one similar case of diffuse pulmonary ossification (DPO).

IIPs, CF, and PAM are all progressive, refractory lung diseases, and lung transplantation for respiratory failure is the only treatment available. The reason why it has been difficult to elucidate the pathophysiology of diseases and develop new drugs is that there is few accessible model that appropriately reflects the pathophysiology of patients both *in vitro* and *in vivo*, and there has been no technological basis for patient-derived cells. Therefore, this project has paved a road for the future drug discovery in a manner otherwise impossible.