

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）成育期疾患 iPS 細胞樹立と新規病態モデルの研究開発
（英語）Study of iPSCs-derived disease models in pre- and postnatal development

研究開発実施期間：令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）阿久津 英憲
（英語）Hidenori Akutsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・センター長
（英語）Director of Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development,

II 研究開発の概要

妊娠から成人までの成育期を対象とする成育医療では、疾患や病態は多岐にわたり遺伝学的特性を持つ先天性疾患や発生・分化に起因する病態を対象としている。本研究開発計画においては、成育期希少疾患を対象に、疾患 iPS 細胞樹立しオルガノイド分化誘導技術を応用することで疾患の発症、病態解明、創薬応用を目指していく。研究開発は、対象臓器や病態の特性から、疾患研究の専門家とともにより効率・効果的に研究を実施する体制の下進めてく。それぞれの疾患 iPS 細胞研究は、患者リクルート体制および臨床検体の取扱い手続き準備を整え実施していく。本申請における研究体制は、世界的な業績もある疾患研究の研究者、臨床および iPS 細胞研究者が連携し、チーム成育として密な連携を構築するとともに妊娠と薬情報センターや関連企業とも研究協力体制を構築している。疾患 iPS 細胞を活用し成育期希少疾患の研究を発展させるとともにスムーズにスクリーニング系等の産業基盤へ発展するよう研究を行う。研究体制には、疾患研究および臨床にも携わる研究者を揃え、加えて疾患ゲノム解析の専門家と創薬等の出口へ繋がるように企業とともに協力体制を構築し研究開発を進める。

初年度には、患者リクルート体制および臨床検体の取扱い手続き準備を整えた。難治性消化管疾患の病態モデル・創薬スクリーニング基盤技術開発では、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型（PFIC1）の異なる4患者の iPS 細胞を樹立することに成功した。胆汁酸吸収動態の評価系モデルの基盤を構築することができた。MIRAGE 症候群の iPS 細胞樹立を実施し、副腎皮質分化誘導系を検証するシステムの構築にも成功した。インプリンティング異常症の病因・病態モデル開発では、偽性副甲状腺機能低下症の疾患家族から iPS

細胞の樹立に成功し、遺伝子発現制御機構の解析を実施する系の構築をすることが出来た。成育期の複数の疾患モデルにおいて、疾患発症機序を解析する重要な基盤の構築をすることが出来た。

次年度には、初年度で整備し得た研究基盤を背景し疾患研究を進めた。難治性消化管疾患の病態モデル・創薬スクリーニング基盤技術開発では、PFIC1-iPS 細胞を樹立し、腸管オルガノイド・ミニ腸 (PFIC1-ミニ腸) を作製した。PFIC1-ミニ腸を活用し胆汁酸吸収動態の可視化評価系の基盤を構築することができた。先天性副腎皮質過形成の疾患 iPS 細胞を活用し、治療法評価モデル構築し得た。インプリンティング異常症の病因・病態モデル開発では、偽性副甲状腺機能低下症の疾患家族から樹立した iPS 細胞を応用し遺伝子発現制御機構の評価を実施しえた。

最終年度には、腸管オルガノイド・ミニ腸 (PFIC1-ミニ腸) の RNA-seq 解析から胆汁吸収不全の病態に関連する分子機序モデルを想定することができた。MIRAGE 症候群では、疾患の知見をまとめ総説として国際誌に報告した (Narumi S. *Pediatr Int* 2022)。先天性副腎皮質過形成症 (CAH) の中の 1 つのタイプである 11 β 水酸化酵素欠損症に対する新しい遺伝子治療モデル研究では、疾患 iPS 細胞を活用し開発した。アデノ随伴ウイルスベクター 用いたもので、CAH に対する遺伝子治療開発のヒトモデルとしては初めての成果となった (Naiki Y, et al. *Hum Gene Ther* 2022)。インプリンティング異常症の病因・病態モデル開発では、偽性副甲状腺機能低下症 (PHP1B) の疾患家族から樹立した iPS 細胞を応用し遺伝子発現制御機構の評価を実施しえた。偽性副甲状腺機能低下症 1B 型 (PHP1B) は、孤発例、常染色体顕性遺伝 (AD) 例に共通して GNAS 遺伝子座の A/B-differentially methylated regions (DMRs) の低メチル化を示す。A/B-DMR 低メチル化により A/B 発現が増加し、母性発現遺伝子 NESP55 は A/B-DMR のメチル化確立に必要である。NESP55 や GNAS 上流の STX16 の欠失は AD-PHP1B の原因となる。今回、母由来アレル GNAS へのレトロトランスポゾン挿入を認めた初めての家族性 PHP1B の症例を明らかにすることができた。レトロトランスポゾン挿入により NESP55 の発現低下が生じ、A/B-DMR のメチル化確立が不十分となり、PHP1B が発症したと考えられた (Kawashima S, et al. *J Bone Miner Res* 2022)。

本事業の対象は希少疾患が主であるが、疾患 iPS 細胞を活用することで疾患の診断や治療法開発へ貢献する成果を得ることができた。研究基盤も構築出来たことも重要で今後も成育医学の発展へ活用していきたい。

In the medicine for pre- and postnatal development, it covers diverse type of sick condition and congenital diseases with genetic characteristics, and most pathological condition strongly related with the organ/tissues' development and differentiation. The etiology and the pathological mechanism of the diseases are not clearly identified in many cases, and there are many rare diseases. Major pharmaceutical companies do not actively promote research and development of new therapies for such rare diseases, because the number of patients who can be treated with such drugs is too small as becoming "Market". In addition, developmental diseases are caused by cellular/tissue development and differentiation, making it difficult to establish a disease biological model leading to develop new drugs. Here, we present a promising study plan which derive rare disease specific iPS cell lines. It expects to lead to disease onset and disease state elucidation by steadily continuing medical research among growth-stage diseases and constructing the establishment of induction system of the are diseases' iPS cells. The target diseases include progressive familial intrahepatic cholestasis, MIRAGE syndrome, congenital adrenal hyperplasia, and imprinting diseases including Kagami-Ogata syndrome.

In the first year of the project, we set up a system to recruit patients and prepared procedures for handling clinical samples. In our efforts to develop technology for screening pathological models and discovering drugs for gastrointestinal diseases that are difficult to treat, we successfully created induced pluripotent stem (iPS) cells from four different patients with progressive familial intrahepatic

cholestasis type 1 (PFIC1). This allowed us to establish a model for evaluating the absorption kinetics of bile acids, which forms the basis of our evaluation system. We also established iPS cells for MIRAGE syndrome and developed a system to validate the induction of adrenocortical differentiation. In our exploration of the causes and mechanisms of imprinting disorders, we successfully generated iPS cells from a family member with pseudohypoparathyroidism. This enabled us to construct a system for analyzing the regulatory mechanisms of gene expression, providing an important foundation for studying disease pathogenesis in various models. In the final year of the project, we performed RNA-seq analysis on the PFIC1-mini guts, which allowed us to propose a molecular mechanistic model related to the pathogenesis of bile malabsorption. Additionally, we developed a new gene therapy model for 11 β hydroxylase deficiency, a type of congenital adrenocortical hyperplasia, using diseased iPS cells. This model represents the first human model for gene therapy development in this specific condition, utilizing an adeno-associated virus vector. Overall, although our project primarily focuses on rare diseases, we were able to obtain results that contribute to the development of diagnostic and therapeutic methods for various diseases by utilizing disease-specific iPS cells. It is important to highlight that we have also established the biomodels that will continue to be utilized for pediatric rare diseases.