

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
(疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 患者由来 iPS 細胞を用いた胆道異常の病態モデリングと治療法開発  
(英語) Disease modeling and therapeutic development of biliary tract abnormalities using patient-derived iPS cells

研究開発実施期間: 令和5年7月6日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高崎 真美  
(英語) Mami Takasaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 理化学研究所・バイオリソース研究センター・iPS 細胞高次特性解析開発チーム・開発研究員  
(英語) RIKEN・BioResource Research Center・iPS Cell Advanced Characterization and Development Team・  
Research & Development Scientist

## II 研究開発の概要

和文:

出生時に胆道に異常をきたしている難病として、アラジール症候群が挙げられる。アラジール症候群(指定難病 297)は、発生頻度の低い希少疾患であり、国内には、200～300 人の患者がいる。診断の契機となることの多い胆汁うっ滞は、多くは成長とともに徐々に軽快する傾向にあるが、約 1/3 の症例は1歳を過ぎても高度の胆汁うっ滞が持続して肝硬変に進行し、門脈圧亢進に起因する静脈瘤、脾機能亢進、肝肺症候群などが問題となる。そこで、アラジール症候群には外科的治療法以外の予防的、あるいは進行を食い止めることが可能な治療法が求められている。それを実現させるために、それらの病態機序の解明と病態モデルを構築することが本研究開発のねらいである。

アラジール症候群の原因遺伝子として JAGGED1(JAG1)や NOTCH2 が知られており、これらは NOTCH シグナル経路のリガンドおよびレセプターであるため、その主要な分子発症機序に関与していることが示唆されている。今後は既存の動物モデルマウスとヒト細胞モデルを組み合わせ、病態解明と治療法開発を進めることが期待される。患者自身の胆管組織を体外で培養し、解析することはこれまでに実施されたことはなく、倫理的、技術的に困難である。また、胆管組織由来の有用な不死化細胞株はない。そ

のため、患者由来細胞を用いた病態モデル開発と創薬研究を行うためには、iPS 細胞由来の胆管組織を誘導した上で解析・評価を行うことが必須である。

そこで、本課題では、アラジール患者由来細胞を用いた病態モデル開発と創薬研究を行うため、iPS 細胞由来の胆管組織を誘導して解析・評価を行った。4 例のアラジール症候群の患者から末梢血を採取し、そこから単核球を遠心分離した上で培養し、iPS 細胞化因子を搭載したセンダイウイルスベクターを感染させ、iPS 細胞専用培地に置き換えていくことで iPS 細胞作製を行なった。さらに、作製されたコロニーをピックアップし、シングルセルに由来すると考えられる iPS 細胞株を樹立した。これらの iPS 細胞株の拡大培養を行なったのちに、凍結ストックバイアルを確保した。さらにこれらの iPS 細胞株の自己複製、多能性、核型といった基本的特性を解析評価した。その結果、これらの iPS 細胞株において、自己複製マーカータンパク質の発現が確認されたことから自己複製が維持されていることがわかった。これらの iPS 細胞を培養条件下において胚葉体形成法によって、ランダムに分化させたところ、三胚葉組織それぞれへの分化誘導が確認されたことから、これらの iPS 細胞株が多能性を保有していることがわかった。これらの iPS 細胞株からゲノム DNA 抽出を行ない、CGH (comparative genome hybridization)/CNV (copy number variation) アレイによる“virtual karyotyping”法を行なったところ、これらの iPS 細胞株が正常核型を維持していることがわかった。また、これらの iPS 細胞株のマイコプラズマ感染陰性を確認している。さらに STR-PCR 法によって、元の血液サンプルと同一サンプルであることを確認している。以上の解析から、これらの患者から病態モデルなどの解析に供することが可能な質をもった iPS 細胞株を作製することができたと考えられる。

次に、これらの作製した 4 例のアラジール症候群患者由来 iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、JAG1 遺伝子の全 26 個のエキソン領域のシークエンス配列を解読した。その結果、患者で同定されている JAGGED1 遺伝子の変異を確認することができた。これら 4 例の患者由来 iPS 細胞から mRNA を抽出して、定量的 RT-PCR を行って、JAG1 遺伝子及び NOTCH2 遺伝子の発現量を解析したところ、JAG1 遺伝子に関して、一部の iPS 細胞株での発現量が有意に低下していた。一方、NOTCH2 遺伝子に関しては、全体的な発現低下はあったものの、統計的に有意な違いはなかった。これらの iPS 細胞からタンパク質を抽出し、JAG1 タンパク質の発現量を Western blot 法で調べた。mRNA での結果と同様に、一部の iPS 細胞株での JAG1 発現量が有意に低下していた。アラジール症候群特異的な遺伝子改変として JAGGED1 の遺伝子変異を導入した iPS 細胞をゲノム編集技術で作製した。また、我々は JAG1 変異による胆管低形成を評価可能な実験系の確立にも取り組んだ。iPS 細胞を用いて人工血管を作製し、その周囲で iPS 細胞由来の肝臓オルガノイドを共培養することで、胆管構造を誘導することに成功した。さらに、JAG1 ノックアウト iPS 細胞から分化誘導した血管平滑筋様の細胞を人工血管作製に用いた場合に、胆管構造が誘導されないことを確認した。すなわち、Ex vivo においてアラジール症候群における JAG1 の変異による胆管の低形成を評価することが可能になった。患者由来の iPS 細胞および JAG1 ノックアウト iPS 細胞から胆管形成に関連する細胞種の分化誘導や胆管オルガノイドの解析を行うことは、アラジール症候群の責任遺伝子である JAGGED1 が関与する NOTCH シグナルの異常による胆管組織の形成異常の分子機構の解明およびアラジール症候群の新規治療法の開発の基盤となる。また、本課題に参加する医学研究者に iPS 細胞に関連する技術移転を行なった。

本研究課題の遂行によって、先天的に胆道に異常を呈する患者由来 iPS 細胞が本邦で初めて樹立され、その病態モデルが作られた。これらは予定された十分な成果が得られたことを示している。特に、JAG1 ノックアウト iPS 細胞に対する、胆道構造を伴う肝臓オルガノイドという新技術を用いた解析結果は、Nature Communications 誌に掲載され、その科学的な価値は非常に大きいと考えられる。さらに、現在進めているアラジール症候群患者由来 iPS 細胞を用いた病態モデル開発とそれらの解析は、世界で初めての成果となるため、今後の本研究の進展に対する価値が高いと期待される。アラジール症候群患

者由来 iPS 細胞の樹立と特性解析の結果については、現在論文にまとめている段階であり、今後、速やかに投稿を行う予定である。さらにそれらの iPS 細胞を用いた病態モデルについては、治療法の創出も含めて、ハイインパクトなジャーナルに掲載されることを目指し、数年以内に論文を投稿する予定である。

本研究課題による研究活動で、胆道異常を呈するアラジール症候群患者由来 iPS 細胞を作製し、それを用いた病態モデルを開発したことから、以下の今後の研究開発成果のさらなる展開が期待できる。(1) 胆道異常患者由来 iPS 細胞の利活用。これまでに本邦でアラジール症候群など胆道異常に関する患者由来 iPS 細胞が樹立された例はなく、研究をする上でのバイオリソースとして非常に重要である。今後、患者由来 iPS 細胞を利活用し、研究へと役立てることが十分に期待できる。さらに、アラジール症候群は希少疾患であり、対象遺伝子がどのような変異に起因するのかを把握しておくことは、今後の分子機序の解明を行う研究に非常に重要である。(2) 胆道異常患者由来 iPS 細胞から作られた胆管組織の表現型解析。培養条件下で胆道異常を再現したモデルを示した研究例は非常に少ない。特にアラジール症候群の患者由来 iPS 細胞を用いた病態モデルは今回が初めての例となる。そのためにこれらの分化誘導技術を用いることで、将来的な治療法開発の指標として有用な、培養条件下でさらなる異常表現型を同定することができる期待される。また、これらの異常表現型の発生様式と上記のゲノム情報と照らし合わせることで、各候補遺伝子の病態への関与が解明できることが期待される。(3) 分子標的の探索/化合物スクリーニング。本研究計画期間や今後の研究で見出される異常表現型は、患者由来 iPS 細胞を用いた胆道異常に対する治療法の開発の糸口となる。そのため、本研究計画終了後では、分子標的の探索/化合物スクリーニングをさらに進めて、有望なターゲットを見出すことを予定している。さらにはモデル動物を用いて試験を経てから、前臨床試験、そして臨床試験へと進めることを将来的なビジョンとしている。

これらの技術と成果は、現在は根本的な治療法のないアラジール症候群や別の胆道異常疾患に対して、治療法開発の進展に大いに資するものである。また、本研究グループでは、希少疾患であるアラジール症候群に加えて、胆道閉鎖症（指定難病 296）患者由来 iPS 細胞を作製し、その解析結果を論文発表しており、研究分担者の鈴木を代表として科研費基盤研究 C 事業として、「胆道閉鎖症特異的 iPS 細胞を用いた肝星細胞の機能解析と肝線維化抑制へ向けた基礎研究」に採択されている。さらに、研究分担者の木戸らのグループは、2024 年度から AMED 事業課題として、「原発性硬化性胆管炎（指定難病 94）の線維化に対する治療薬シードの同定」にも採択されている。これらの課題遂行においても、本課題で培った疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究開発の知見と技術が活かせると考えている。これらの課題遂行を通して、胆道異常に関する社会的な治療法のニーズに応えられると期待される。また、本研究課題を遂行して挙げた成果は、本疾患領域において、iPS 細胞研究者と臨床に携わる疾患研究者が継続して共同研究を行うからこそ成し得たものであり、上記のように相次いで別の研究課題に採択されていることは iPS 細胞研究者と臨床に携わる疾患研究者が継続して共同研究を行なって、本疾患領域の研究を進展させるメリットにつながっている。

英文：

Alagille syndrome (designated as intractable disease 297) is a rare disease characterized by abnormalities in the bile ducts at birth with a low incidence, with 200 to 300 patients in Japan. Cholestasis, which often triggers diagnosis, tends to gradually improve with growth in many cases, but about one-third of cases persist with severe cholestasis beyond one year of age, progressing to cirrhosis, and complications such as varices, hypersplenism, and hepatopulmonary syndrome due to portal hypertension become problematic. Therefore, preventive

or progression-stopping treatments other than surgical methods are sought for Alagille syndrome. The aim of this project is to elucidate the pathogenesis and construct disease models to achieve this.

The causative genes for Alagille syndrome, JAGGED1 (JAG1) and NOTCH2, are ligands and receptors of the NOTCH signaling pathway, which is suggested to be involved in the main molecular pathogenesis. It is expected that combining existing animal models and human cell models will advance the understanding of the disease and the development of treatments. Culturing and analyzing the patient's own bile duct tissue *in vitro* has not been done yet and is ethically and technically challenging. Additionally, there are no useful immortalized cell lines derived from bile duct tissue. Therefore, to develop disease models and conduct drug discovery research using patient-derived cells, it is essential to induce bile duct tissue derived from human iPS (induced pluripotent stem) cells for analysis and evaluation.

In this project, peripheral blood samples were collected from four patients with Alagille syndrome. Mononuclear cells were separated by centrifugation and cultured, and iPS cells were generated by infecting with Sendai virus vectors carrying iPS cell factors and replacing with iPS cell-specific medium. Furthermore, colonies were picked, and iPS cell lines derived from single cells were established. After expanding these iPS cell lines, frozen stock vials were secured. The basic characteristics of these iPS cell lines, such as self-replication, pluripotency, and karyotype, were analyzed and evaluated. From these analyses, it is considered that iPS cell lines of sufficient quality for analysis such as disease models were created from these patients. Also, iPS cells with JAGGED1 gene mutations, specific to Alagille syndrome, were generated using genome editing technology. Using these iPS cell lines, differentiation of liver organoids including bile ducts and blood vessels, and related cell types from iPS cells was carried out. As a result, hypoplasia of the bile ducts, a symptom of Alagille syndrome, could be reproduced. Analyzing these bile duct cells and bile duct organoids will form the basis for elucidating the molecular mechanisms of bile duct tissue formation abnormalities due to abnormalities in the NOTCH signaling pathway involving the JAGGED1 gene, which is responsible for Alagille syndrome, and for developing new treatments for Alagille syndrome. Additionally, technology transfer related to iPS cells was conducted to medical researchers participating in this project.

Through the execution of this research project, iPS cells derived from patients with congenital bile duct abnormalities were established for the first time in Japan, and their disease models were created. These results indicate that sufficient outcomes were achieved as planned. Furthermore, the development of disease models and their analysis using iPS cells derived from Alagille syndrome patients are the first achievements in the world, and the value of future progress in this research is expected to be high. Through the research activities of this project, iPS cells derived from Alagille syndrome patients with bile duct abnormalities were created, and disease models using them were developed, leading to the expectation of further development of the following future research and development outcomes: (1) Utilization of iPS cells derived from patients with bile duct abnormalities. There have been no examples of iPS cells derived from patients with bile duct abnormalities such as Alagille syndrome being established in Japan, making them very important as bioresources for

research. It is expected that patient-derived iPS cells can be utilized and contribute to research in the future. Furthermore, since Alagille syndrome is a rare disease, understanding the mutations in the target genes is very important for future research to elucidate the molecular mechanisms. (2) Phenotypic analysis of bile duct tissue created from iPS cells derived from patients with bile duct abnormalities. There are very few research examples showing models that reproduce bile duct abnormalities under culture conditions. In particular, this is the first example of a disease model using iPS cells derived from Alagille syndrome patients. By using these differentiation induction techniques, it is expected that further abnormal phenotypes can be identified under culture conditions as useful indicators for future treatment development. Additionally, by comparing the occurrence patterns of these abnormal phenotypes with the above genomic information, it is expected that the involvement of each candidate gene in the disease can be elucidated. (3) Exploration of molecular targets/compound screening. The abnormal phenotypes discovered during this research project period and future research will serve as clues for developing treatments for bile duct abnormalities using patient-derived iPS cells. Therefore, after the end of this research project, it is planned to further advance the exploration of molecular targets/compound screening to find promising targets. Furthermore, after testing with model animals, the vision is to proceed to preclinical trials and then clinical trials. These technologies and findings greatly contribute to the development of treatments for Alagille syndrome and other bile duct abnormalities, which currently have no fundamental treatments.