

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
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 発生学的ニッチと人為的遺伝子改変を用いたヒト iPS 細胞からの臓器の再生
(英 語) Study of organ regeneration from human iPS cells using developmental niche and artificial genetic manipulation

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 長船 健二
(英 語) Kenji Osafune

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・iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門・教授
(英 語) Kyoto University・Dept. of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)・Professor

II 研究開発の概要

近年、再生医学が進展し、ヒト iPS 細胞（人工多能性幹細胞）から様々な臓器の構成細胞種が *in vitro* で分化誘導可能となっており、iPS 細胞から作製した細胞種や細胞塊およびシートなどの簡単な構造の組織を移植する細胞療法の臨床試験が 10 以上の難治性疾患に対して開始されている。しかし、ヒト iPS 細胞から臓器移植に用いるための、複雑な構造を有し、血管や神経などの組織と機能的に連結した臓器を作製することは可能となっていない。また、*in vitro* でヒト iPS 細胞から作製される組織やミニ臓器であるオルガノイドは直径数ミリ程度の大きさしかなく、ヒト体内のものと同等のサイズの組織や臓器を作製する技術は未開発であり、再生医学研究が直面する大きな課題となっている。

上記課題の解決に向けて、異種動物の体内環境を活用した臓器再生、とりわけ「胚盤胞補完法（blastocyst complementation）」と呼ばれる実験手法が開発され、研究が進展している。胚盤胞補完法では、目的とする臓器を欠失する遺伝子改変動物の受精卵胚盤胞に健常な未分化 iPS 細胞を注入することで、本来欠失するはずであった臓器が iPS 細胞から補完され形成される。実際に、マウスとラットという遺伝的に近い種間では、本手法を用いた臓器形成が報告された（Kobayashi T. et al., Cell 2010; Yamaguchi T. et al., Nature 2017）。しかし、ヒト iPS 細胞からマウスやブタなどの遺伝的に離れた異種動物の体内で臓器を作製することは未だ成功しておらず、その技術の開発が必要とされている。また、受精卵に注入されたヒト iPS 細胞が、異種動物の体内で神経細胞や生殖細胞などに分化する可能性があり、倫理面の課題もある。

ヒトと異種動物間のキメラ形成を阻害する機構の 1 つとして、正常発生と組織の恒常性維持の監視機構である細胞競合（cell competition）が考えられており、最近、マウスとヒトの多能性幹細胞間における細胞競合機序の解

析において関与が見いだされた NF- κ B, p65, MYD88 などのシグナル経路の発現抑制や抗アポトーシス分子 BCL2 の強制発現がマウスとヒト間のキメラ率を向上させることが報告された (Zheng C. et al., Nature 2021)。よって、細胞競合をはじめとするシグナル経路や分子の発現制御によって異種動物間のキメラ形成を促進できる可能性がある。しかし、細胞競合における排除メカニズムとしてオートファジー、ミトコンドリア機能の異常、小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) ストレス、老化などが報告されているが、その上流にて制御する遺伝子や機構は不明のままである (Amoyel M. & Bach E.A. Development 2014)。

本研究では、目的臓器を欠失する遺伝子改変動物の子宮内胎仔の臓器形成予定領域にヒト iPS 細胞由来の胎生期前駆細胞を移植し、その後、胎仔を出生まで母体内で成長させる技術の開発と網羅的スクリーニングによってヒトと異種動物間のキメラ形成を促進する因子を同定し、その因子の強制発現を組み合わせることで、異種動物の体内でヒト iPS 細胞由来の臓器を作製する方法の開発を目指した。具体的には、膵臓を欠失する遺伝子改変マウスの子宮内胎仔膵臓形成予定領域に膵前駆細胞を移植する技術を開発する。また、目的遺伝子を強制発現する CRISPR/dCas9 システムを導入したヒト iPS 細胞株由来の膵前駆細胞にヒトの細胞表面抗原、分泌因子、転写因子に対するプール型 gRNA を導入し、マウス胎仔由来膵前駆細胞との *in vitro* でのキメラ形成を評価する網羅的スクリーニングを実施し、ヒト・マウス膵前駆細胞間のキメラ化促進因子を同定する。さらに、同定因子を用いた検討をヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞とブタ胎仔由来膵前駆細胞間でも実施し、ヒト・ブタ膵前駆細胞間のキメラ化促進を検証する。次に、その同定されたキメラ化促進因子を強制発現するヒト iPS 細胞株を樹立、分化誘導した膵前駆細胞を膵臓再生に用いる。同様に、CRISPR/dCas9 システムを導入したヒト iPS 細胞株由来の腎前駆細胞とマウスおよびブタ胎仔由来腎前駆細胞との *in vitro* キメラ腎組織形成系においてキメラ化促進因子を同定し、その因子を導入したヒト iPS 細胞由来腎前駆細胞を腎臓形成不全となる遺伝子改変マウスの子宮内胎仔腎臓形成予定領域へ移植することで、マウス体内で腎臓を再生する。本研究は、発生学的ニッチと人為的遺伝子改変を組み合わせる点で全く独自かつ新規であり、同じ方法論をヒトとほぼ同等の大きさの臓器を有するブタに応用することでヒト iPS 細胞からヒトサイズの臓器再生という革新的な技術開発に発展可能である点に特色がある。

本研究の開始前に、申請者らは、ヒトの膵臓および腎臓の正常発生過程を再現した独自のヒト iPS 細胞から膵前駆細胞 (Kimura A. et al., Cell Chemical Biology 2020) と腎前駆細胞 (ネフロン前駆細胞; Tsujimoto H. et al., Cell Reports 2020) の分化誘導法を確立していた。さらに、それらのヒト iPS 細胞由来の膵および腎前駆細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植することによって、膵前駆細胞が膵外分泌および内分泌組織を含む膵組織と腎前駆細胞が糸球体と尿細管を含む腎組織に分化する臓器形成能を有することを確認しており、それらのヒト iPS 細胞由来膵および腎前駆細胞を本研究に用いた。また、申請者らの分化誘導法にて腎前駆細胞への分化効率の高いヒト iPS 細胞株に CRISPR/dCas9 を導入した株を樹立し、ヒトの約 2,000 種の細胞表面抗原および分泌因子と約 2,000 種の転写因子に対するプール型 gRNA のライブラリの構築とヒト iPS 細胞由来の膵および腎前駆細胞の 1 細胞に 1 つの gRNA が発現する導入培養条件を確立していた。

本研究の開始後、令和 4 年度には、ヒト・マウス間のキメラ化促進因子の探索に向けて、申請者らの分化誘導法にて膵前駆細胞への分化効率の高いヒト iPS 細胞株にスクリーニング用の CRISPR/dCas9 を導入した株の樹立を開始した。また、ヒト iPS 細胞由来膵および腎前駆細胞とマウス胎仔由来膵および腎前駆細胞を組み合わせた *in vitro* の共培養を用いたキメラ化促進因子スクリーニング系の構築の検討を開始した。また、動物実験用の高感度の超音波診断装置 (エコー) を導入し、遺伝子改変マウス子宮内胎仔の体内への膵および腎前駆細胞の移植方法の検討を行った。さらに、腎臓がそれぞれ無形成、部分欠損、低形成となる遺伝子改変マウスを導入し、それらから摘出した腎臓形成予定領域を用いて *in vitro* においてキメラ腎組織を作製する培養法の検討を行い、キメラ腎組織作製に最適な遺伝子改変マウスの選択を開始した。

令和 5 年度には、マウス子宮内胎仔の体内に細胞を注入した後に、胎仔および母親マウスが共に生存し出産まで至るための技術的なポイントをいくつか見出すことで細胞移植法を確立した。そして、マウス体内でドナー細胞由来の膵組織とドナー細胞とホスト腎臓から構成されるキメラ腎臓の作製に成功した。また、膵臓のキメラ化促進因子スクリーニング用の CRISPR/dCas9 を導入したヒト iPS 細胞株の樹立を完了した。次に、ヒト iPS 細胞

由来臍前駆細胞とマウス胎仔由来臍前駆細胞の共培養条件を検討し、細胞競合によってヒト iPS 細胞由来臍前駆細胞の大半が死滅する *in vitro* のキメラ化促進因子スクリーニング系を構築した。さらに、既報のキメラ化促進因子を強制発現するヒト iPS 細胞株を樹立し、臍前駆細胞へ分化誘導の後に前述のマウス胎仔由来臍前駆細胞との共培養系に適用することで、ヒト iPS 細胞由来臍前駆細胞の生存率（キメラ率）の向上を確認した。

令和 6 年度には、ヒト iPS 細胞由来腎前駆細胞とマウス胎仔由来腎前駆細胞の共培養条件の検討を継続したが、臍前駆細胞の場合と異なり細胞競合によるヒト iPS 細胞由来腎前駆細胞の死滅が少なく、CRISPRa スクリーニングによるキメラ化促進因子の同定が困難であることが判明した。そこで、CRISPRa スクリーニングに代わり、RNA シーケンシングなどの transcriptome 解析を実施することで、ヒト iPS 細胞由来腎前駆細胞とマウス胎仔由来腎前駆細胞の *in vitro* の共培養における新規のキメラ化促進因子を 1 つ同定し、その因子のシグナル経路を活性化することで、形成されるヒト・マウスのキメラ腎組織においてヒト腎細胞の比率を有意に増加させることに成功した。また、ヒト iPS 細胞由来臍前駆細胞とマウス胎仔由来臍前駆細胞の CRISPRa スクリーニングを実施し、約 10 個のキメラ化を促進する細胞表面抗原および分泌因子の候補を同定し、キメラ化促進の再現性の確認と機能解析を進めた。

本研究の成果は、ヒト iPS 細胞からの臓器再生という現在の再生医学研究が直面する課題の解決に貢献する。また、同じ手法にて、ブタの発生学的ニッチとヒトとブタのキメラ形成を促進する人為的遺伝子改変を組み合わせることで、次のステップとしてヒト iPS 細胞からヒトサイズの臓器再生に発展可能である。そして、臍臓と腎臓の作製法を開発することによって、透析治療を必要とする慢性腎不全患者や 1 型糖尿病患者へ再生腎臓と臍臓の移植を行い、透析治療やインスリン注射の必要のない世の中を創る目標を達成し、腎疾患患者および糖尿病患者の QOL 低下を抑え、患者の健康寿命の延伸と労働人口の増大、透析医療費、糖尿病医療費をはじめとして増え続ける医療費を削減することでより豊かな社会の実現に貢献する。さらに、本研究のさらなる進展によってヒト iPS 細胞から移植用臓器の作製法が確立されれば、臍臓と腎臓のみならず、肝臓、心臓、小腸などの他の臓器の作製法開発に繋がり、多くの臓器に発症する難治性疾患の完全な解決がもたらされる。また、本研究の成果は、異種動物間のキメラ形成を阻害する要因と機序を解明する細胞生物学的な知見の入手にも繋がる。以上、本研究の成果に基づく今後の研究の発展によって、新たな医療技術を開発することで本邦の医薬品、医療関連産業とひいては経済界の活性化が期待されるため、本研究の成功によるインパクトは図りしれない。

(英語)

Regenerative medicine research has made significant progress in recent years, using induced pluripotent stem cells (iPSCs) to generate numerous organ-constituting cell types and tissues with simple structures, such as cellular aggregates and cell sheets. However, the size of such tissues or mini-organs, organoids, remains small, at several millimeters in diameter. The technology to generate transplantable and human-sized organs from human iPSCs with functional vasculature and neural connections has yet to be established.

To overcome these issues, research focused on generating organs from iPSCs by leveraging the *in vivo* environment of xenogenic animals offers an alternative solution. Specifically, an experimental approach called blastocyst complementation - a process in which animal blastocysts with disrupted target organ formation, through genetic manipulation, are injected with undifferentiated iPSCs to generate donor cell-derived target organs - has attracted attention. Indeed, blastocyst complementation between genetically close animals, such as mice and rats, has successfully generated mouse iPSC-derived pancreata in rats and vice versa (Kobayashi *et al.*, Cell 2010; Yamaguchi *et al.*, Nature 2017). However, organ regeneration using blastocyst complementation between genetically distant animals, such as humans and mice or pigs, has not been achieved.

Cell competition, crucial for normal development and maintaining tissue homeostasis, is believed to contribute to the challenges of forming chimeras between humans and xenogenic animals. A recent study demonstrated that deleting cell competition-related molecules, such as NF-kB, p65, and MYD88, increases

chimera formation between mouse and human pluripotent stem cells (Zheng *et al.*, Nature 2021). However, the detailed mechanisms of cell competition and its regulation remain to be elucidated.

In this study, we aimed to develop the technology necessary for transplanting human iPSC-derived embryonic pancreatic and kidney progenitor cells into mouse embryos genetically manipulated to disrupt endogenous pancreas or kidney morphogenesis for generating donor cell-derived organs in mice. In addition, we also aimed to identify factors facilitating chimeric tissue formation between human iPSC-derived pancreatic and kidney progenitors and mouse embryonic pancreatic and kidney progenitors by CRISPRa screening using human iPSC lines transduced with CRISPR/dCas9 and gRNA pools targeting approximately 2,000 human cell surface molecules and secreted factors, as well as about 2,000 human transcriptional factors. By transplanting human iPSC-derived pancreatic and kidney progenitors overexpressing newly identified factors into target organ morphogenesis-disabled mouse embryos in utero, we aimed to generate human iPSC-derived pancreata and kidneys in vivo in mice.

Through this study, we gained technical insights while establishing a method for in utero cell transplantation into embryonic mice using highly sensitive ultrasonography to enhance both dam and embryo survival to birth. We also developed a CRISPRa screening platform by co-culturing human iPSC line-derived pancreatic progenitors with mouse embryonic progenitors. By screening approximately 2,000 human cell surface molecules and secreted proteins, we identified about 10 candidate factors that may facilitate the formation of chimeric pancreatic tissue. In addition, we identified a suitable genetically manipulated mouse line for chimera formation with human iPSC-derived kidney progenitors. By transcriptomic analysis of these co-cultured kidney progenitors, we identified a factor that modulates chimeric kidney tissue formation and confirmed that activating the related signaling pathway increases the ratio of human cells in the in vitro co-cultures.

Our findings contribute to overcoming a significant hurdle in advancing regenerative medicine - the generation of transplantable organs from human iPSCs. As our next step, we will apply the same strategy to pigs, which have organs similar in size to humans, to generate full-size human pancreata and kidneys. Ultimately, we aim to prevent QOL declines in patients with type 1 diabetes or end-stage renal failure by transplanting human iPSC-derived pancreata or kidneys and help revitalize the Japanese medical industry and economy by developing innovative medical technologies and novel therapeutic products.