

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) ダイレクトリプログラミングによる臨床応用可能なヒト肝前駆細胞の作製と革新的肝再生誘導法の開発

(英語) Generation of clinically applicable human hepatic progenitor cells and development of an innovative liver regeneration therapy using direct reprogramming technology

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) 鈴木 淳史

(英語) Atsushi Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 九州大学・生体防御医学研究所・教授

(英語) Division of Organogenesis and Regeneration, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

肝移植を必要とする重篤な肝疾患に対する再生医療を考えた場合、主に2つの異なる疾患形態に対する医療アプローチが考えられる。肝細胞が大量に死滅する急性肝不全や先天性代謝異常症では、肝細胞の補充を目的とした細胞移植による治療効果が期待できる。しかし、移植用肝細胞の採取には大きな侵襲を伴い、またES/iPS細胞から肝細胞を分化誘導する場合も細胞の未成熟性や発がんの問題が残る。一方、線維化が進行した非代償性肝硬変では細胞移植の効果は低いと考えられるため、肝臓の機能回復促進に基づく肝再生誘導法の開発が期待される。しかし、現時点においてこうした治療法は確立されておらず、肝再生不全による病態悪化は免れない。

近年、生体内外を問わず、ある細胞に別の細胞の運命を統御する転写因子を発現させ、その細胞の運命を別の細胞へ変化させる「ダイレクトリプログラミング」が多くの細胞種で可能になってきた。この手法を用いて採取が容易な細胞から肝細胞を大量に作製することができれば、それらをドナー細胞とする細胞移植医療の確立が期待できる。また、肝硬変患者の肝臓内においてダイレクトリプログラミングを誘導することができれば、肝再生能の回復によって自己治癒能力が向上し、重度の肝硬変でも短期間で効率良く治療できる可能性がある。

研究開発代表者らは、ダイレクトリプログラミングの手法を用いて、ヒトの臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)か

ら高い増殖能と肝細胞・胆管上皮細胞への二分化能を有する「誘導肝前駆細胞 (iHepPC)」を作製することに成功した (Inada et al., *Nat Commun*, 2020 ; 特許登録済み)。ヒト iHepPC は培養下で安定的に増殖し、ヒト iHepPC から分化した肝細胞を急性肝不全モデルマウスへ移植すると肝臓由来の肝細胞と同等の救命効果を示すことから、細胞移植医療への応用が期待できる。しかし、細胞移植医療でヒト iHepPC を実用化するためには、染色体を傷つけるレトロウイルスベクターの排除が不可欠である。そこで本研究では、染色体を傷つけない手法によるヒト iHepPC 誘導法の確立を目指して研究を進めた。その結果、レトロウイルスベクターを用いて作製したヒト iHepPC と同等の能力を有するヒト iHepPC を染色体を傷つけない手法によって繰り返し作製することに成功し、さらに導入遺伝子そのものを消去可能な実験系を構築することにも成功した。今後、ゲノム挿入フリー/ベクターフリーのヒト iHepPC を作製し、それらから大量の肝細胞を調達可能になれば、入手が難しい肝細胞の代わりにヒト iHepPC 由来肝細胞をドナー細胞とする細胞移植医療の確立が見込まれる。しかし、ヒト iHepPC へのリプログラミング効率は決して高いとはいえないため、十分な数のドナー細胞を得るまでには時間がかかるという問題がある。そこで本研究では、ヒト iHepPC 移植医療の実現を見据え、ヒト iHepPC へのリプログラミング効率を改善させるべく研究を行った。近年、細胞の性質変化やリプログラミングにおいて、特定の低分子化合物が強い効果を有することが多くの研究で明らかになっている。そこで、過去の研究で細胞のリプログラミングに影響を与えることが報告されている 10 個の低分子化合物を候補として選出し、それら低分子化合物がヒト iHepPC へのリプログラミング効率に与える影響を解析した。その結果、10 個の低分子化合物の中にヒト iHepPC へのリプログラミング効率を顕著に上昇させるものが含まれることが判明した (論文投稿中 ; 特許出願済み)。また、エピゲノム解析及びトランスクリプトーム解析を行った結果、同定した低分子化合物はエピゲノムレベル並びにトランスクリプトームレベルで細胞の状態変化に作用し、ヒト iHepPC へのリプログラミングをより効果的に誘導することが明らかとなった。今後、当該低分子化合物を用いたヒト iHepPC 誘導法を標準化することで、大量のヒト iHepPC をより短い時間で調達するための汎用性の高いプロトコルを構築し、臨床応用への足がかりとして活用したいと考えている。

本研究では、遺伝子治療を基盤とした「生体内ダイレクトリプログラミング」による肝疾患の治療法開発に向けた研究も行い、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた誘導因子導入法を確立し、AAV 投与後の治療効果や有害事象について、それらを他シーズによる検証データと定量的に比較することにより、有用性の評価を行った。加えて、近年患者数が急速に増加しつつある代謝機能障害関連脂肪肝炎 (MASH) のモデルマウスを作製し、AAV ベクター投与後の治療効果や有害事象の検証を進めた。今後、生体内ダイレクトリプログラミングによる肝再生誘導法の治療効果を実証することで、非代償性肝硬変に対する新しい治療コンセプトを提唱できる可能性がある。一方、生体内ダイレクトリプログラミングによる革新的な疾患治療法の開発を進める中で、「次世代型ゲノム編集プラットフォーム」の開発の必要性を見出し、その研究も行った。その結果、シンプルなガイド RNA 設計で Cas9 の活性を微調整できる新技術の開発に成功した (Kawamata et al., *Nat Biomed Eng*, 2023 ; 特許登録済み)。具体的には、従来の sgRNA の 5' 末端にシトシンを伸長させることで、シトシンの長さ依存的に細胞内の gRNA-Cas9 複合体の存在量が低下し、DNA との親和性や切断活性も同時に抑制されることで、編集効率の低下が誘導された。活性レベルとゲノム編集効果の相関関係を調べた結果、短いシトシン伸長は両アレル編集能力を維持しつつ、細胞毒性を低減し、相同組換え効率を上昇させた。長い伸長の場合は、オンターゲット活性は低下したが、それ以上にオフターゲットの大幅な抑制効果が得られ、片アレル編集や 1 塩基置換などの精密編集効率を高めることができた。一方で、活性調節 sgRNA は、Cas12a や CRISPRa/i などの Cas9 以外のゲノム編集プラットフォームに対する調節にも適用できることを見出した。また、活性レベルと編集効率の相関関係を導き出す数理モデルの構築にも成功した。近年著しい発展を見せる遺伝子治療技術と本研究の成果が有機的に連結することで、非代償性肝硬変に対する遺伝子

治療をベースとした肝再生誘導法の確立が期待できる。

以上の研究に加え、本研究では、転写因子を用いずに化合物だけでダイレクトリプログラミングを誘導する次世代技術の開発も行い、成体マウスの肝臓から採取した肝細胞を複数の化合物を含む特殊培地で培養するだけで、遺伝子導入を伴わずに腸前駆細胞へとその細胞運命を転換させることに成功した (Miura et al., *Nat Commun*, 2024)。具体的には、これまでの研究で確立した肝前駆細胞用の培養系を用いて成体マウスの肝細胞を培養することで、それらが高い増殖能を有する肝前駆細胞様の細胞へと脱分化することを見出した。

「dediHep (dedifferentiated hepatocyte)」と名付けたこれら脱分化型肝細胞は、単層培養下において上皮細胞と間葉系細胞のハイブリッド状態を呈しており、この状態への脱分化誘導と脱分化状態の維持が Hippo シグナル伝達経路の阻害に依存し、TGF- β シグナル伝達経路の活性化には依存しないことが明らかとなった。dediHep は、単層培養下で間葉系細胞マーカーであるビメンチンの発現に依存して未熟な状態のまま安定的に増殖するが、三次元浮遊培養下では凝集体を形成して増殖を停止し、成熟肝細胞の機能特性を再獲得することが判明した。また、dediHep から再分化した肝細胞を高クロシン血症 1 型モデルマウスの肝臓へ移植すると、肝臓組織を長期にわたり再構築することが可能であった。dediHep が上皮細胞と間葉系細胞のハイブリッド状態という特殊な表現型を有することから、研究開発代表者は、dediHep が肝臓以外の内胚葉由来臓器の細胞にも分化できるのではないかと考え、その検証を行った。すると、単層培養下にある dediHep の 90%以上が、腸上皮細胞の分化に必須の転写因子である Cdx2 を発現していることが判明した。そこで、胎生期腸前駆細胞の培養条件 (三次元マトリゲル培養) で dediHep を培養してみた。その結果、生体由来の腸前駆細胞と同様に、dediHep が一層の上皮細胞から成る球形のオルガノイドを形成し、そのオルガノイドが長期間安定的に増殖可能なことが判明した。さらに、これら dediHep 由来の腸上皮オルガノイドを大腸炎モデルマウスの大腸へ移植すると、大腸上皮組織を長期間、機能的に再構築することが可能であった。成体マウスの肝細胞が、複数の化合物を含む特殊培地で培養するだけで腸前駆細胞へとリプログラミングするという発見は、肝臓の全容を理解するための「肝臓学」の発展に貢献するだけでなく、潰瘍性大腸炎や腸上皮化生などの関連疾患の研究や治療に役立つことが期待される。

(英語)

In recent years, direct reprogramming, wherein transcription factors that govern the fate of one cell type are ectopically expressed to induce conversion into another cell type, has been demonstrated across a variety of cell types. If hepatocytes could be efficiently generated from easily accessible cells via this method, it would offer a promising foundation for the development of cell transplantation therapies using these cells as donor sources. Moreover, if direct reprogramming could be induced *in vivo* within the livers of patients with liver diseases, it could enhance endogenous regenerative capacity and potentially enable rapid and efficient treatment of even advanced liver diseases.

In previous research, we have successfully generated human induced hepatic progenitor cells (iHepPCs) from human umbilical vein endothelial cells using direct reprogramming. These iHepPCs exhibit high proliferative capacity and bipotential differentiation potential toward both hepatocytes and biliary epithelial cells. With the goal of advancing the clinical application of iHepPC-based cell transplantation therapies, we focused on establishing a method to induce iHepPCs without causing insertion of introduced genes into chromosomes. As a result, we successfully generated iHepPCs with functional properties comparable to those previously reported, employing a non-integrative approach, and additionally established an experimental system that allows for

the removal of the introduced genes themselves.

Given that the reprogramming efficiency toward iHepPCs remained suboptimal, we conducted investigations to enhance the efficiency of this process. Through this effort, we identified small-molecule compounds that markedly improved reprogramming efficiency. We demonstrated that these compounds facilitate cellular state transitions at both the epigenomic and transcriptomic levels, thereby promoting more effective reprogramming toward the iHepPC state. In the future, by standardizing the iHepPC induction method using the relevant small molecules, we aim to establish a versatile protocol for efficiently obtaining large quantities of iHepPCs in a shorter period, and use this as a stepping stone toward clinical applications.

Additionally, we pursued the development of therapeutic strategies for liver diseases based on *in vivo* reprogramming. We established a protocol for the delivery of reprogramming factors using adeno-associated virus (AAV) vectors and evaluated both therapeutic efficacy and potential adverse effects following AAV administration. As part of our broader efforts to innovate disease treatment strategies through *in vivo* reprogramming, we also worked to improve genome editing technologies by modifying the CRISPR-Cas9 system. Specifically, we developed a novel activity-regulatable guide RNA (gRNA) platform, enabling the construction of a next-generation genome editing system that maximizes both safety and editing efficiency under controlled gRNA activity. With the remarkable advancements in gene therapy techniques in recent years, the integration of these developments with the findings of this research is expected to lead to the establishment of a novel liver regeneration-inducing method that promotes the restoration of liver function.

Furthermore, we aimed to develop next-generation reprogramming technologies that do not rely on transcription factors. We successfully induced the conversion of hepatocyte cell fate, isolated from adult mouse livers, into intestinal progenitor cells by culturing them solely in a specialized medium containing a combination of small molecules, without the need for gene introduction. This discovery is expected to contribute not only to the advancement of hepatology, enhancing our understanding of the liver, but also to the research and treatment of related diseases such as ulcerative colitis and intestinal metaplasia.