

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) ヒト多能性幹細胞を用いた異種移植による肺の臓器再生モデルの開発
(英語) Generation of humanized lung animal models via xenotransplantation using pluripotent stem cells

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) 後藤 慎平
(英語) Shimpei Gotoh

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 臨床応用研究部門 教授
(英語) Professor, Department of Clinical Application, Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

<研究開発の目的・ねらい>

肺は自己再生が難しく、重症例では肺移植が必要となるが、ドナー不足や免疫抑制の課題がある。これを克服するため、多能性幹細胞を活用した肺の再生医療が期待されている。特に、多能性幹細胞から肺原芽細胞、II型肺胞上皮細胞、肺胞間葉細胞への分化誘導法が確立されてきたが、細胞移植について、マウスやブタを用いた異種移植モデルで有用性を評価する必要がある。本研究は、ヒト・マウス・ブタの知見を融合し、再生医療の基盤技術確立を目指した。

<研究開発の背景>

研究代表者らはヒト多能性幹細胞から分化誘導した肺原芽細胞を、あらかじめナフタレンと放射線を組み合わせて肺傷害を誘発した免疫不全マウスに移植し、2か月まで生着するモデルを開発していたが、マウス肺上皮のうち1%をヒト細胞で置換するのみに留まっていた。そこで肺胞上皮に対してより選択的なアブレーションを行って置換率や検出感度を向上させ、細胞の成熟度や機能の評価する必要があった。また、ヒトへの細胞移植モデルを実現するため、大型動物モデルとしてブタを用いて多能性幹細胞由来呼吸器細胞の移植モデルを確立する必要があった。

<研究開発の概要>

本研究課題は令和4～6年度にかけて、京都大学（後藤慎平）、実中研（高橋武司）、明治大学（長嶋比呂志）、東京大学（小林俊寛）の各機関の研究室がチームを組んで実施した。代表者・後藤のチームは、肺胞オルガノイドの分化誘導や維持に有用なヒト iPS 細胞由来肺胞間葉細胞の分化誘導法を確立し、肺線維症モデルマウスを用いた異種移植で線維化抑制効果について調査した。一方、ヒト iPS 細胞由来の肺原芽細胞および肺胞上皮細胞をマウス肺に移植する条件検討では、実中研・高橋グループの開発した遺伝子組換え NOG マウスを用いて標的細胞を選択的にアブレーションした NOG マウスに長期生着させて移植した細胞が機能的に成熟することを確認した。ヒト由来細胞による置換率はマウス片肺において目標と設定した>40%を達成した。さらにヒト血球系細胞の追加移植を実施した。ブタを用いたモデル開発では東京大学・小林グループが樹立したマルチレポーター・ブタエピブラスト幹細胞を用いて肺原芽細胞への分化誘導を最適化した。明治大学・長嶋グループではブタエピブラスト幹細胞からクローン豚を作成する技術で、小児間質性肺疾患の原因遺伝子に変異を持つブタを作成し、後藤グループと連携してヒト iPS 細胞由来の肺胞間葉細胞の移植試験を実施した。これら4機関の密な連携により、小動物から大動物までをカバーする肺再生医療の実現に向けた技術基盤を構築した。主な成果は以下の通りである。

- ① ヒト多能性幹細胞由来の肺原芽細胞をレポーター遺伝子により可視化し、細胞移植用に分化誘導法を最適化した。特にヒト iPS 細胞由来の移植実験用肺原芽細胞のスケールアップに取り組み、ヒト iPS 細胞から肺原芽細胞を分化誘導する段階では、Carboxypeptidase M (CPM)陽性細胞を磁気ラベルして単離する方法で、1回で最大 1×10^8 個までの CPM 陽性肺原芽細胞を単離できる体制を構築した。この段階での細胞移植は肺胞だけでなく気道上皮への分化能も有しており、安定的に生着させるには 5×10^6 個/頭もの移植細胞を要したことから、移植する細胞の状態についても検討し、肺原芽細胞からさらに肺胞上皮に分化を進めて移植する条件を検討した。中空のアルギン酸でできたファイバーの中で6週間かけて増殖および肺胞上皮への分化誘導することにより細胞数を増やし、1頭あたりの細胞移植を減らしても安定的な生着を得られるようになった。
- ② 肺胞オルガノイドの作成や維持に有用な肺胞間葉細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導する方法を確立し、肺線維化抑制効果について *in vitro*、*in vivo* で検討を進めた。細胞投与方法について検討した結果、肺胞間葉細胞は経静脈投与でも肺に選択的に集積し、肺胞腔にも細胞が移行することが分かった。ヒト iPS 細胞から分化誘導した肺胞間葉細胞をブレオマイシン肺線維症モデルに投与すると、免疫不全(NOG)マウスでも短期間で消失することが分かったが、線維化に対する効果を評価できた。
- ③ 標的細胞をアブレーションできる遺伝子組換え NOG マウスを作成して、細胞移植前に肺傷害を誘導してからヒト iPS 細胞由来肺原芽細胞を経気管的に移植すると長期生着を確認できるようになった。40%を超える置換率を達成した個体も得られた。長期生着したヒト iPS 細胞由来

肺原芽細胞がどのような細胞に分化していたかをマウス肺からヒト由来細胞を単離して1細胞レベルでの遺伝子発現解析を行って詳細に解析し、機能や成熟度について明らかにした。

- ④ ブタ多能性幹細胞の基盤拡充のため、ブタ後期胚盤胞から新たなエピブラスト幹細胞株を樹立した。また、複数のレポーター細胞株を樹立して段階ごとの呼吸器系統への分化誘導条件の最適化を行った。
- ⑤ 多能性幹細胞由来の呼吸器細胞移植による大型動物での治療モデルを確立するため、ブタエピブラスト幹細胞を利用して、小児間質性肺疾患の原因遺伝子バリエーションを持つクローンブタを作成し、病態解析のための病理サンプルやシングルセルおよび空間トランスクリプトーム解析を実施した。疾患モデルブタに対して、ヒト iPS 細胞由来の肺胞間葉細胞を移植し、安全性や薬効の評価に利用できる可能性を見出した。

<考察と今後の展望>

本研究課題により呼吸器再生医療にむけたマイルストーンとなる成果を積み上げることができた。肺胞間葉細胞を用いた治療モデル、肺原芽細胞による肺胞再建モデル、さらにはヒトへの外挿性を期待できる難治性呼吸器疾患モデルブタの開発やそれを用いた細胞移植試験など、多角的なアプローチを通じて得られた知見は、今後の非臨床 PoC 研究や臨床応用に向けた開発戦略にとって非常に有益である。将来的には、細胞のデザインによって再生能や炎症制御機能を強化する「スマート細胞移植」の技術開発へと展開できる可能性がある。今後は産学連携を通じて臨床応用への橋渡しも進めながら、引き続き難治性呼吸器疾患に対する新たな治療手段の確立を目指す。

(英語)

<Objectives>

The lung has limited self-regenerative capacity, and lung transplantation is the final treatment option in patients with severe respiratory failure. However, the shortage of donors and the need for immunosuppression remain significant challenges. To overcome these limitations, regenerative therapies using pluripotent stem cells (PSCs) have garnered significant attention. We have established methods for differentiating PSCs into lung progenitor cells, alveolar type II (AT2) epithelial cells, and alveolar mesenchymal cells, while it is essential to evaluate the efficacy of these cells in xenotransplantation models using mice and larger animals such as pigs. This project aimed to integrate knowledge across human, mouse, and pig models to establish a robust foundation for lung regenerative medicine.

<Background>

Dr. Gotoh's team previously reported a model in which human PSC-derived lung progenitor cells were transplanted into immunodeficient mice with chemically and radiation-induced lung injury, achieving engraftment for up to two months. However, the engraftment was limited to replacing only 1% of the mouse lung epithelium with human cells. Therefore, more efficient engraftment was demanded to analyze the human PSC-derived lung cell maturation and functions. Furthermore, to facilitate future clinical applications, it was necessary to establish xenotransplantation models using pigs as a large animal species.

<Research outcome>

This collaborative project was conducted from FY2022 to FY2024 in collaboration of Kyoto University (Dr. Gotoh), CIEM (Dr. Takahashi), Meiji University (Dr. Nagashima), and the University of Tokyo (Dr. Kobayashi). Dr. Gotoh's team developed a method to generate alveolar mesenchymal cells from human iPSCs that support alveolar organoid formation and maintenance, and evaluated their antifibrotic effects in a mouse model of pulmonary fibrosis via xenotransplantation. For transplantation of iPSC-derived lung progenitors into mouse lungs, Dr. Takahashi's team developed genetically engineered NOG mice. This allowed long-term engraftment of the transplanted cells, with human cell replacement rates exceeding 40%. Human immune cell co-transplantation was also achieved. For the pig model, Dr. Kobayashi's team established multi-reporter pig epiblast stem cell lines and contributed to optimization of the derivation of lung lineages. Dr. Nagashima's team generated cloned pigs harboring gene mutations responsible for a childhood interstitial lung disease using pig epiblast stem cells. In collaboration with Dr. Gotoh's team, they conducted xenotransplantation experiments with human iPSC-derived alveolar mesenchymal cells. Through this tight collaboration among four teams, a technical foundation was established that spans from small to large animal models for lung regenerative medicine.

<Conclusion and perspectives>

This research achieved several milestones in lung regenerative medicine. It established concepts of alveolar mesenchymal cell therapy, lung progenitor-based alveolar reconstruction, and a swine disease model suitable for human disease recapitulation. These results provide a strong foundation for future preclinical PoC studies and clinical translation. The findings pave the way for "smart cell transplantation" strategies that enhance lung regeneration through cell engineering. Moving forward, academia-industry partnerships will be promoted to facilitate clinical applications and develop novel treatments for intractable lung diseases.