

京都大学	博士（医学）	氏名	保科 あずさ
論文題目	Development of new method to enrich human iPSC-derived renal progenitors using cell surface markers (細胞表面抗原マーカーを用いたヒト iPSC 細胞由来の腎前駆細胞を濃縮する新規方法の開発)		
(論文内容の要旨) 【目的】 ヒト iPSC 細胞から分化誘導される胎生期の腎前駆細胞を用いた細胞療法が腎疾患に対する新たな治療法として検討されている。京都大学 iPSC 細胞研究所、応用再生医学研究分野では、以前に 2 種の腎前駆細胞マーカーである核内転写因子 OSR1 と SIX2 に対するレポーターヒト iPSC 細胞(OSR1-GFP/SIX2-tdTomato ノックイン iPSC 細胞)を用いて分化誘導と単離を行った OSR1(+)SIX2(+) 腎前駆細胞を虚血再灌流による急性腎障害 (acute kidney injury; AKI) モデルマウスの腎被膜下に移植することによって治療効果が得られることを報告した (Toyohara et al., 2015)。しかし、得られた治療効果はレポーターヒト iPSC 細胞株を用いた研究成果であることから、他のヒト iPSC 細胞株で効果を評価できない点が課題であった。また、現在の分化培養では未分化細胞や腎臓系譜ではない細胞が混入し、それらは移植した際の腫瘍化や予期せぬ副作用の原因となる危険性がある。そこで本研究では、ヒト iPSC 細胞から分化誘導した腎前駆細胞を用いてスクリーニングを行うことによって、腎前駆細胞のみを効率よく単離できる細胞表面抗原マーカーを見出し、単離した腎前駆細胞の性質の評価と AKI モデルマウスへの治療効果を検討した。 【方法・結果】 ヒト iPSC 細胞から上述の方法で分化誘導した腎前駆細胞を用いて 242 種類の細胞表面抗原マーカーに対するモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。その結果、CD9(-)CD140a(+)-CD140b(+)-CD271(+)の組み合わせで単離した細胞集団が、治療効果を有する OSR1(+)SIX2(+)腎前駆細胞を最も効率よく濃縮できることを見出した (一致率 63.8±3.3%, n=3)。次に、同定された細胞表面抗原マーカーを用いた単離によって、腎前駆細胞マーカーである OSR1、SIX2、HOXD11 を発現する細胞を濃縮できることが免疫染色で確認できた。また、単離された細胞において CITED1、CDH11(Cadherin 11)、ITGA8(Integrin alpha 8)、HOXA11 などの他の腎前駆細胞マーカーの発現上昇も定量的 PCR 法にて確認した。さらに、単離された細胞を細胞塊にして in vitro で器官培養を行うことによって尿細管様の構造が形成され、腎前駆細胞としての発生学的機能を有していることを確認した。最後に、本研究で同定された細胞表面抗原マーカーの組み合わせにより単離した腎前駆細胞を虚血再灌流による AKI モデルマウスの腎被膜下に移植したところ、移植群において有意に腎機能の悪化が抑制された。また、移植後 12 日目の組織評価では、移植群において宿主腎臓での尿細管腔の拡張、尿細管刷子縁の消失などの急性期の腎障			

害所見が有意に抑制されていた。また、AKI 後の腎線維化は腎予後と密接に関連することが知られているが、抗 α SMA (α -smooth muscle actin) 抗体による染色では、移植群において宿主腎臓の線維化が有意に抑制されていることを確認した。

【考察】 本研究では、ヒト iPSC 細胞由来の胎生期の腎前駆細胞を濃縮できる新規の細胞表面抗原マーカーの組み合わせを同定した。さらに、それにより単離した細胞の AKI に対する治療効果を確認した。今回の結果は、ヒト iPSC 細胞由来の腎前駆細胞を用いた細胞療法の臨床応用や、腎疾患モデル作製に貢献することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)
 ヒト iPSC 細胞から分化誘導される胎生期の腎前駆細胞を用いた細胞療法が腎疾患に対する新たな治療法として検討されている。しかし、現在の分化培養では未分化細胞や腎臓系譜ではない細胞が混入し、それらは移植した際の腫瘍化や予期せぬ副作用の原因となる危険性がある。そこで申請者は、ヒト iPSC 細胞から分化誘導した腎前駆細胞を用いてスクリーニングを行い、CD9(-)CD140a(+)-CD140b(+)-CD271(+)の細胞表面抗原の組み合わせで単離される細胞集団が、急性腎障害(AKI)モデルマウスに対して治療効果を有する 2 種の核内転写因子マーカー OSR1 および SIX2 の両陽性腎前駆細胞を最も効率よく濃縮できることを見出した。この細胞表面抗原を用いた方法で単離される細胞は SIX2、OSR1、HOXD11 などの腎前駆細胞マーカーを発現しており、器官培養することにより in vitro で尿細管様構造を形成した。さらに、単離した細胞を虚血再灌流による AKI モデルマウスの腎被膜下に移植したところ、移植群において有意に腎機能の悪化が抑制された。移植後 12 日目の腎組織の評価では、AKI によって起こる急性期の腎障害と線維化が移植群において有意に抑制されていた。以上の研究はヒト iPSC 細胞由来の腎前駆細胞を用いた細胞療法の臨床応用に貢献することが期待される。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 8 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降