

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	岩 本 芳 浩
論文題目	Generation of macrophages with altered viral sensitivity from genome-edited rhesus macaque iPSCs to model human disease (非ヒト霊長類疾病モデル作成を目的としたゲノム編集アカゲザル iPSC からのウイルス感受性を変化させたマクロファージの再生)		
(論文内容の要旨) 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPSC) は、無制限の自己複製能力とあらゆる細胞および組織に分化し得る potential を持ち、またゲノム編集技術との相性も良いことから、iPSC 技術とゲノム編集技術を組み合わせることで、再生医療/遺伝子治療のさらなる発展が期待されている。 iPSC ベースの細胞療法や再生臓器移植療法などの臨床応用を目指すにあたって in vivo での検証は必須となるが、マウスはヒトとは免疫系など生理学的に大きく異なるため、ヒト iPSC 由来細胞を免疫不全マウスを用いた異種移植の系で正確に評価することは困難である。 非ヒト霊長類は、系統学的にヒトに非常に近く、また size、寿命、さらに免疫系もヒトと非常に近いものを持っているため、上記のマウスモデルの問題を解決するために非ヒト霊長類モデルは非常に有用なものである。しかしながら非ヒト霊長類、なかでもアカゲザル細胞からの iPSC (Rh-iPSC) の樹立および分化誘導法と遺伝子改変に関する知見は限られている。将来の移植実験を念頭に、本論文ではアカゲザル末梢血から iPSC (Rh-iPSC) の樹立および Rh-iPSC のゲノム編集法を確立し、ゲノム編集 Rh-iPSC 由来血液細胞、特にアカゲザルにおける HIV の counterpart である Simian Immunodeficiency Virus (SIV) に対するマクロファージの機能を評価した。 ヒト iPSC の樹立に使用する培地に 2i (GSK-3 inhibitor (CHIR 99021) と ERK1/2 inhibitor (PD0325901)) を加えることでアカゲザル末梢血からの iPSC 樹立に成功し、機能的な Hematopoietic progenitor cell(HPC)、マクロファージへの分化誘導法を確立した。誘導されたマクロファージは SIV の感染受容体でもある CCR5 の発現も認めており、実際にこれらのマクロファージは一時的に SIV に感染しウイルス産生を認めた。 次に CRISPR/Cas9 を用いた Rh-iPSC に対するゲノム編集の効率改善のため sgRNA と Cas9protein を用いる ribonucleoprotein(RNP)でのゲノム編集を行った。gain of function の target として本研究では種特異的 HIV 抵抗因子の一つである TRIM5 遺伝子を選択し HIV 感受性を獲得するか否かを評価した。約 30% (7/24 株) と比較的良好な効率で TRIM5 遺伝子の KO iPSC を作成することに成功し、KO iPSC は元株と同等の分化能を有していた。さらに TRIM5 KO iPSC から分化誘導したマクロファージの HIV 感受性を評価する目的に VSV-G-pseudotyped lentivirus vector expressing luciferase (NL43-Luci/VSV-G)と TRIM5 KO iPSC 及び元株から分化誘導したマクロファージを共培養したところ、TRIM5 KO iPSC 由来マクロファージで感染効率が有意に上昇していた。このことから Rh-iPSC のゲノム編集による gain of function を確認することができた。 アカゲザル末梢血からの iPSC の樹立、血液細胞への分化法、さらには Rh-iPSC に対する CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の系を確立した。本論文で示したゲノム編集 Rh-iPSC 技術は他の遺伝子に応用できるため、様々な gene therapy モデルの作成に貢献できる技術であると考ええる。			

(論文審査の結果の要旨)

induced pluripotent stem cell(iPSC)技術と遺伝子編集技術を組み合わせた再生医療/遺伝子治療の評価系として、非ヒト霊長類を用いた動物モデルは非常に有用である。将来の移植実験の前段階として、申請者はアカゲザル細胞からの iPSC の樹立、分化誘導法と遺伝子編集法の確立を目的に本研究を行った。

申請者はヒト iPSC のプロトコールを改変することで、アカゲザル末梢血からの iPSC 樹立に成功し、多分化能を有する造血前駆細胞と、貪食能と炎症性サイトカインである IL-6 と TNF 産生能を有し、さらには Simian Immunodeficiency Virus に対する感受性を有するマクロファージへの分化誘導法を確立した。

次に申請者は CRISPR/Cas9 を用いたアカゲザル iPSC に対する遺伝子編集法を確立した。申請者は本研究で遺伝子編集の標的遺伝子として、種特異的 HIV 抵抗因子の一つである TRIM5 遺伝子を選択した。TRIM5 α をノックアウトした iPSC から分化誘導したマクロファージが HIV 感受性を獲得したことから、遺伝子編集によりアカゲザル iPSC のウイルス感受性を変化させることができることが示された。

本研究で示された遺伝子編集アカゲザル iPSC 技術は他の遺伝子に応用できるため、様々な再生医療/遺伝子治療アカゲザル iPSC モデルの作製に寄与するところが多い。

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、令和 3 年 5 月 21 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