

京都大学	博士 (医学)	氏名	曾 根 尚 之
論文題目	Multicellular Modeling of Ciliopathy by Combining iPS cells and Microfluidic Airway-on-a-chip Technology (iPS 細胞とマイクロ流体気道チップ技術を組み合わせた多細胞での繊毛病モデルの構築)		
(論文内容の要旨)			
<p> 繊毛上皮細胞は上気道・下気道に侵入した病原体や異物を一方向性に除去する機能を担っているが、その機能を発揮する為には繊毛上皮細胞間での協調的な繊毛振動が必要となる。この繊毛振動が減弱したり協調運動が乱れたりすると、病原体や粘液が排泄されず繰り返す肺炎や気管支拡張症の原因となることが報告されてきた。ヒト iPS 細胞から気道上皮細胞への分化誘導法では、内胚葉を経て段階的に肺前駆細胞を分化誘導して単離後、三次元培養と気液界面培養を行うことで繊毛上皮細胞を多く含む気道上皮細胞に効率よく分化させられることが分かっていたが、繊毛上皮細胞の一細胞レベルでの機能は再現できても、生体内で観察されるような多細胞間の繊毛協調運動を再現できないという問題があった。そこでヒトの生体内により近い状態での培養が可能なマイクロ流体気道チップを用いて、液流による方向性のある物理的な刺激を加えながら分化誘導を行うことで、多細胞間の繊毛協調運動を制御することを試み、繊毛機能不全症の疾患モデルに役立てることを考えた。まず、マイクロ流体気道チップを用いて液流負荷をかけながら気道上皮細胞を分化誘導することで、液流負荷の方向に一致した粘液流が形成され、液流の反対側に一致して代表的な平面内細胞極性コア蛋白である Vang-like protein 1 (VANGL1) が整列して発現することを見出した。VANGL1 を欠損させると他の平面内細胞極性コア蛋白である VANGL2 の発現も大きく障害されただけでなく、VANGL1 が繊毛運動の形成にも関連している事も判明した。さらに、これまでは気道上皮細胞の分化誘導には気液界面培養が必要とされてきたが、液流負荷をかけることにより、気液界面培養を用いなくてもそれと同等以上に気道繊毛上皮細胞への分化が促進することを発見した。 </p> <p> 繊毛病の一つである繊毛機能不全症は、繊毛振動の減弱や協調運動の消失といった様々な異常に基づいて起こる遺伝性疾患として知られている疾患である。これまでに40以上もの原因遺伝子が報告され、遺伝子変異も多彩なため遺伝子診断をはじめゴールドスタンダードとなる検査がなく、約30%の症例が未診断と報告され有効な治療薬もないことが問題となっている。特に診断面ではこれまでに報告のない1アミノ酸変異が疾患原因となりえるかを証明する方法はなかった。そこで、繊毛機能不全症患者の末梢血から樹立した疾患特異的 iPS 細胞と、候補となる原因遺伝子変異を修復した iPS 細胞を作成し、それぞれの細胞から気道上皮細胞を作成して比較することで、過去に報告のない遺伝子変異が1アミノ酸変異でも繊毛機能異常の原因となる事を証明した。さらに、繊毛機能不全症で報告される様々な繊毛異常について代表的な遺伝子を欠損させた iPS 細胞株を樹立し、様々なパターンでの繊毛運動異常を再現できることも証明した。これにより、疾患特異的 iPS 細胞が繊毛病の診断や治療の研究開発を行うツールとして役立てる可能性を見出した。 </p> <p> 最後にこれらの iPS 細胞とマイクロ流体気道チップの技術を組み合わせた疾患モデルの構築を試みた。その結果、繊毛協調運動の形成には繊毛振動そのものが必要と考えられてきたが、繊毛振動がなくても細胞が液流負荷を感知して異なる細胞間で VAN </p>			

GL1 の配向性がそろい、繊毛上皮細胞への分化効率も促進されることが分かり、これらは繊毛運動とは関係なく液流負荷を感知して制御されることを見出した。これらの知見は今後の繊毛病の診断や病態解析のみならず、気道の再生医療にも役立つ可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

本論文では iPS 細胞とマイクロ流体気道チップを組み合わせて、気道上皮幹細胞を一方向性の液流刺激を加えながら14日間かけて分化誘導する事で、液流刺激を行った方向と反対側の細胞境界に、平面内細胞極性の代表的なマーカーである **VANGL1** が局在し、液流刺激の方向と一致して繊毛が拍動することを示した。また、繊毛上皮細胞への分化は培地に浸かった状態での平面培養では困難であることが知られてきたが、適切な液流刺激があれば液内培養でも繊毛上皮細胞への分化が促進される事を見出した。次に、繊毛機能不全症候群患者から樹立した iPS 細胞 (疾患特異的 iPS 細胞) と、その原因と考えられる対立遺伝子の遺伝子変異をゲノム編集で修復した細胞 (遺伝子修復 iPS 細胞) とを作製して、各 iPS 細胞由来の気道上皮細胞の繊毛機能を比較する事で、培養皿内において原因遺伝子変異と繊毛機能不全症候群との因果関係を再現性よく証明できる事を示した。さらに、繊毛協調運動には繊毛拍動そのものが必要と考えられてきたが、疾患特異的 iPS 細胞とマイクロ流体気道チップを組み合わせる事で、繊毛運動の消失した気道上皮細胞シートでも液流刺激により平面内細胞極性が細胞間で同方向に形成される事を見出した。

以上の研究は繊毛上皮細胞の平面内細胞極性の制御メカニズムや繊毛機能不全症の病態解明に貢献し、新規診断法や治療法開発の基盤構築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10月12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