

京都大学	博士（医学）	氏名	桑田 文彦
論文題目	Transplantation of human iPS cell-derived airway cells on vitrigel membrane into rat nasal cavity (コラーゲンビトリゲル膜を用いたヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞のラット鼻腔への移植)		
(論文内容の要旨)			
<b>【背景】</b>			
<p>鼻腔粘膜は吸気中の様々な有害物質を排除するという生体防御機能を担っている。鼻腔粘膜の大部分を占める気道上皮細胞 (airway epithelial cell: AEC) は、線毛上皮細胞、杯細胞、クラブ細胞、基底細胞など様々な細胞で構成されており、中でも線毛上皮細胞は線毛運動による異物排出の機能を担っている。</p> <p>鼻腔の気道上皮細胞障害は、化学物質による損傷、機械的損傷、アレルギー反応による炎症、感染症などによるものがあり、通常は治癒後機能回復する。一方、原発性線毛機能不全症候群や嚢胞性線維症など遺伝性疾患による機能障害は不可逆的であり、根治的治療法が確立されていない。遺伝性疾患などの難治性鼻腔粘膜障害による気道上皮細胞機能障害に対する治療法の一つとして、ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell: hiPSC) 由来 AEC 移植が考えられる。そこで、本研究では hiPSC-AEC 移植による治療法を確立するための基礎的検討として、免疫不全ラット鼻腔への移植を行い、生着細胞について検討を行った。</p>			
<b>【方法】</b>			
<p>hiPSC から内胚葉細胞を介した段階的分化誘導法により腹側前方前腸細胞へと分化誘導した。腹側前方前腸細胞の表面マーカーである Carboxypeptidase M に対する抗体を用いた磁気活性化細胞選別法によって目的細胞を精製し、マトリゲル中に包埋培養してスフェロイドを形成させ、AEC へと分化させた。この気道上皮オルガノイドを酵素処理により単一細胞化し、ブタアテロコラーゲンビトリゲル膜上に播種し、気液界面培養により AEC シートを作製した。作製した hiPSC 由来 AEC シートを、7-8 週齢の雄ヌードラット 13 匹の左鼻腔に移植した。一週間後に組織を回収し、固定・脱灰後凍結切片を作製し、蛍光免疫染色法により、生着細胞の有無と細胞種の同定を行った。</p>			
<b>【結果】</b>			
<p>hiPSC 由来中胚葉細胞、前方前腸細胞を免疫染色法で検討した結果、各細胞マーカーである、SOX17、NKX2-1 の発現が確認された。hiPSC 由来 AEC では繊毛マーカー Acetylated-<math>\alpha</math>-tubulin 及び上皮細胞マーカー E-cadherin の発現が確認され、電子顕微鏡観察により、運動線毛特有の構造が確認された。</p> <p>移植部組織凍結切片の免疫染色により、13 匹中 4 匹 (30.7%) に抗ヒト核抗体で標識される移植細胞がラット鼻腔内の肉芽組織内に嚢胞状に存在することが確認できた。</p>			

<p>免疫染色によるさらなる検討の結果、抗ヒト核抗体標識細胞には線毛上皮細胞マーカー Acetylated-<math>\alpha</math>-tubulin、クラブ細胞マーカー SCGB1A1、基底細胞マーカー SOX2 および Keratin5 陽性の細胞が含まれることが確認され、移植細胞が生着部位で気道上皮構成細胞として存在していることが示唆された。</p> <p><b>【考察】</b></p> <p>本研究では生着細胞は移植部位で嚢胞を形成しており、ラット鼻腔粘膜との連続性は確認できなかった。今後の課題として、移植細胞による機能回復のため鼻腔管腔面へ移植細胞を生着させる必要がある。そのためには移植部周辺の肉芽組織形成の抑制や、手術手技の改善、移植細胞の足場材料の最適化、免疫反応の制御などの検討が必要である。</p> <p><b>【結語】</b></p> <p>hiPSC をブタアテロコラーゲンビトリゲル膜上で AEC に分化させ、ヌードラット鼻腔に移植し生着させた。移植後の生着細胞は気道上皮を構成する各種細胞のマーカーを発現していた。本研究成果は難治性の鼻腔気道上皮細胞機能障害に対する移植治療の技術開発の基盤となるものである。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>原発性線毛機能不全症候群や嚢胞性線維症などの遺伝性疾患による難治性鼻腔上皮障害に対する根治的治療法は確立されておらず、申請者らは上皮移植による移植治療法を検討した。本研究は human induced pluripotent stem cell (hiPSC) 由来の airway epithelial cell (AEC) 移植による鼻腔粘膜再生を目標とした。既存の段階的分化誘導法を用いたブタアテロコラーゲン膜上で hiPSC から線毛マーカー陽性細胞を含む hiPSC-AEC シートを作製した。hiPSC-AEC シートは電子顕微鏡観察により運動線毛特有の微細構造も確認された。hiPSC-AEC シートをヌードラット鼻腔に移植し、一週間後に組織を回収し蛍光免疫染色法による解析を行った。移植した 13 例中 4 例で鼻腔内に抗ヒト核抗体陽性の移植細胞の生着が確認された。上皮細胞層には線毛細胞、クラブ細胞、基底細胞が確認され、移植細胞が鼻腔内で気道上皮構成細胞として存在していた。生着効率に課題はあるものの、鼻腔への hiPSC-AEC 移植の可能性を初めて示した。</p> <p>以上の研究は、難治性鼻腔気道上皮障害に対する新しい治療を目指した、鼻腔への hiPSC-AEC 移植方法の基盤となる研究に寄与するものと考えられる。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 5 月 13 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。</p>
<p>要旨公開可能日： 年 月 日以降</p>