

京都大学	博士 (医学)	氏名	玉井 浩二
論文題目	iPSC-derived mesenchymal cells that support alveolar organoid development (肺泡オルガノイドの発生を支える iPS 細胞由来間葉細胞)		
(論文内容の要旨)			
<p>間葉細胞は、細胞外基質や様々な分泌タンパク質を産生して組織微小環境を構築し、正常な器官発生や恒常性維持をもたらしている。オルガノイドでは生体内の上皮間葉相互作用を再現できることからヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞とヒト胎児肺線維芽細胞 (Human fetal lung fibroblasts, HFLF)の共培養による肺泡オルガノイド (HFLF-dependent alveolar organoids, HFLF-AOs)が疾患モデルに利用されてきた。しかしながら、上皮細胞と間葉細胞において、異なるゲノム背景の細胞が混在することになり、個人の生体環境を正確に反映できていない可能性があった。今回、この問題点を解決するために、HFLF の代用となる iPS 細胞由来間葉細胞 (iPS cell-derived mesenchymal cells, iMES)を開発し、同一個人由来 iPS 細胞から誘導した肺前駆細胞と iMES による肺泡オルガノイド (iMES-AOs) を確立した。iMES は 2 段階に分けて分化誘導した。まずヒト iPS 細胞を Activin A、BMP4、CHIR99021 を含む培地で Day 0 から Day 2 まで培養し、TBXT 陽性細胞を経た後に PDGFRA と KDR が陽性の中胚葉へ分化誘導した。その後、Activin A、KGF、BMP4、FGF2、FGF10 を含む培地に切り替えて Day 3 から Day 7 まで培養し、間葉細胞に分化誘導した。抗 EPCAM 抗体を用いて単離された EPCAM 陰性細胞を iMES と定義した。同一ドナー由来の HFLF と iMES の遺伝子発現パターンを比較するため、HFLF から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞から iMES を分化誘導して遺伝子発現解析を行ったところ、iMES では、線維芽細胞マーカーである、<i>COL1A1</i>、<i>COL1A2</i>、<i>FN1</i> の発現が高く、その他の筋、脂肪、内皮、免疫細胞の遺伝子マーカーは低かった。また、古典的 Wnt シグナル伝達経路のリガンドである <i>RSPO2</i> と <i>RSPO3</i> が高発現であった。間葉細胞を用いない肺泡オルガノイドの分化誘導では、以前の研究で用いられた CHIR99021 に替えて <i>RSPO2</i> と <i>RSPO3</i> の添加でも 2 型肺泡上皮細胞を分化誘導することが可能であり、iMES-AOs では <i>RSPO2</i> と <i>RSPO3</i> が 2 型肺泡上皮細胞の分化誘導を担うことが示唆された。一細胞遺伝子発現解析を行ったところ、iMES-AOs と HFLF-AOs では共に、1 型および 2 型肺泡上皮細胞、肺神経内分泌細胞が分化誘導され、加えて、2 回継代培養した iMES-AOs (P2)では、線毛細胞も存在していた。また、1 型および 2 型肺泡上皮細胞、肺神経内分泌細胞のマーカー遺伝子は HFLF-AOs (P2)より iMES-AOs (P2)の方が高い発現レベルを示していた。HFLF と iMES は複数の細胞集団に分類され、<i>CXCL12⁺FOXF1⁺TCF21⁺</i> 細胞と <i>IRX3⁺FOXO1⁺TCF21⁺FOXF1</i>細胞は iMES に特異的であった。最後に、iMES-AOs を用いてインフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 の感染症モデルをそれぞれ確立した。両ウイルスともそれぞれ iMES-AOs で増殖し、インターフェロン応答遺伝子である <i>MX1</i> が肺泡上皮細胞に発現していた。今回開発した iMES は、同一ドナー細胞を用いての肺泡上皮-間葉相互作用を実現できることから呼吸器疾患モデルの構築や肺の再生研究に役立つ可能性が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、まず、ヒト iPS 細胞由来の新規の間葉細胞(iMES)を開発し、iPS 細胞由来肺前駆細胞と共培養することで肺泡オルガノイドの作成に成功した。これにより、従来のヒト胎児肺線維芽細胞を用いた場合には達成できなかった同一個人由来の上皮と間葉細胞からなる肺泡オルガノイド作成の可能性が開けた。次に、iMES による分化機序を調べるため、胎児肺と皮膚由来の初代線維芽細胞からそれぞれの iPS 細胞を樹立し、分化誘導した iMES と元となった線維芽細胞の遺伝子発現を比較検討した。その結果、iMES は、肺線維芽細胞に特徴的な多くの発現遺伝子を共有しており、皮膚線維芽細胞よりも胎児肺線維芽細胞に類似していた。また、iMES を用いて作成した肺泡オルガノイドのシングルセル RNA シークエンス解析を実施したところ、1 型及び 2 型肺泡上皮細胞だけでなく、線毛細胞、神経内分泌細胞などの異なる細胞クラスターを形成していることを見出した。さらに iMES で作成した肺泡オルガノイドを、インフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 に曝露したところ、ウイルスの増幅、免疫染色で同定可能な感染細胞、インターフェロン応答が確認され、感染症モデルとして利用できることが分かった。

以上の研究は、肺泡形成機序の解明に貢献し、肺泡オルガノイドを用いた疾患モデルをはじめ、将来の再生医療に寄与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、令和 5 年 2 月 9 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