

京都大学	博士（医学）	氏名	北田 有史
論文題目	Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Airway Epithelia with a Collagen Scaffold into the Nasal Cavity ( 鼻腔へのコラーゲンを足場とした iPSC 由来気道上皮の移植 )		
( 論文内容の要旨 )			
<p><b>【背景】</b>          鼻腔は線毛細胞を含む呼吸上皮で覆われ、異物排除の機能を有する。原発性線毛機能不全症候群などの遺伝性疾患では、この機能が不可逆的に障害されるが、根本的な治療法は確立されていない。細胞移植による治療を目指し、先行研究ではコラーゲンビトリゲル膜上で分化誘導したヒト人工多能性幹細胞由来気道上皮 (human induced pluripotent stem cell-derived epithelia: hiPSC-AE) を免疫不全ラット鼻腔粘膜搔把部に貼り付ける方法で移植したが、移植細胞は線維化組織内に嚢胞を形成した状態で生着し、機能再生に寄与しうる鼻腔粘膜には見られなかったため、本研究で移植法の改良を行った。</p> <p><b>【方法】</b>          ヒト iPS 細胞から内胚葉を介し腹側前方腸細胞へ分化させた細胞を、表面マーカーに対する抗体を用いた磁気活性化細胞選別法により精製し、マトリゲル内で包埋培養し、気道オルガノイドを形成させた。これらを酵素処理により単細胞化して、コラーゲンビトリゲル膜上に播種し、気層液相界面培養により、線毛上皮細胞を含む hiPSC-AE を誘導した。コラーゲン足場をこの hiPSC-AE で被覆して移植複合体を形成し、ヌードラットの鼻腔上部開創部に移植する方法で、8匹のヌードラットへ移植を行った。移植後 1 週間で組織を回収して凍結切片を作製し、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> <p><b>【結果】</b>          免疫染色法による検討から、分化誘導各過程の hiPSC 由来細胞で内胚葉マーカー FOXA2、前方腸細胞マーカー NKX2-1、hiPSC-AE で線毛マーカー Acetylated-<math>\alpha</math>-tubulin、上皮細胞マーカー E-cadherin の発現が確認された。さらに hiPSC-AE の電子顕微鏡観察から、運動線毛特有の構造が確認された。移植組織サンプルの凍結切片の免疫染色では、8 匹中 4 匹で鼻腔管腔面の上皮層に抗ヒト核抗体陽性の hiPSC-AE の生着が確認された。次に生着細胞の細胞種を検討したところ、8 匹中 2 匹で Acetylated-<math>\alpha</math>-tubulin 陽性の線毛細胞が確認され、また、SOX2、CK5 陽性の基底細胞も確認された。移植領域での全上皮細胞に対する hiPSC-AE の生着率は各ラットで 3.8%、11.7%、1.6%、4.1%であった。</p> <p><b>【考察】</b>          本研究では薄いコラーゲンビトリゲル膜上で分化誘導された hiPSC-AE を用い、コラーゲンスポンジと鼻腔組織との間に hiPSC-AE を挟み込み固定されるように移植を行ったことで、細胞シートがずれる可能性を軽減し、周辺上皮との連続性を担保することが可能になり、機能再生に寄与し得る鼻腔粘膜へ hiPSC-AE を生着させることに成功したと考えられる。しかしながら、生着率は低く、移植時の薬剤添加、より免疫抑制されたレシピエント動物の使用などによる生着効率向上が必要である。さらに、移植 hiPSC-AE 内の目的外細胞の除去、線毛運動の同調、含まれる分化細胞種の割合の調節、移植後長期間での腫瘍化の検討も今後の課題である。</p> <p><b>【結語】</b>          コラーゲンビトリゲル上で誘導した hiPSC-AE でコラーゲン足場を被覆し、ヌードラット鼻腔欠損部に移植し生着させた。移植細胞は鼻腔管腔面の粘膜上皮に生着し、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。本研究で確立された移植法は疾患モデル作製や移植治療法の開発に寄与するものである。</p>			

( 論文審査の結果の要旨 )

原発性線毛機能不全症候群などの遺伝性疾患では鼻腔呼吸上皮の機能が不可逆的に障害される。移植細胞による機能回復を目指した先行研究ではヒト人工多能性幹細胞由来気道上皮 (human induced pluripotent stem cell-derived airway epithelia: hiPSC-AE) を免疫不全ラット鼻腔粘膜搔把部に貼付する方法で移植したが、移植細胞は線維化組織の嚢胞内に生着するに留まったため、本研究では粘膜部への生着を目的として移植法の改良を行った。先行研究における気管への移植と同様に、既報の方法で分化誘導された hiPSC を用いて市販のコラーゲンビトリゲル上で hiPSC-AE シートを作製し、コラーゲンスポンジを hiPSC-AE で被覆して組織欠損部へ留置する方法で 8 匹のヌードラットの鼻腔上部開創部に移植した。移植後 1 週間で組織を回収し、凍結切片の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。移植された 8 匹中 4 匹で鼻腔管腔面の上皮層に hiPSC-AE の生着が確認された。このうち 2 匹で hiPSC 由来の線毛細胞が確認され、基底細胞も確認された。長期間での観察や生着効率向上は今後の課題ではあるが、鼻腔の管腔面に気道上皮の移植細胞を生着させることに成功した。以上の成果は移植治療法の開発や疾患モデル作成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 6 年 1 月 30 日実施の論文内容とに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、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