

京都大学	博士（工学）	氏名	YADAV SACHIN
論文題目	Comprehending viral pathogenesis through isogenic hiPSC-derived airway and alveolus-on-chip models (アイソジェニックな hiPSC 由来の気道および肺胞オンチップモデルを用いたウイルス病態の解明)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、ヒト気道および肺胞の上皮－内皮界面を再現したオンチップモデルを開発し、SARS-CoV-2 およびインフルエンザ A ウイルス（IAV）のウイルス疾患メカニズムについて、組織およびウイルス種依存的な違いを理解することを目指している。このための実験系として、アイソジェニックなヒト iPS 細胞（hiPSC）を用いて呼吸器の異なる部位をマイクロ流体デバイス（チップ）上に作製する技術開発し、ウイルス感染による組織応答を明らかにしたものであり、5 章から構成されている。 第 1 章は緒論であり、研究背景、研究目的、論文全体の構成について述べている。ヒト呼吸器系の重要臓器である肺を対象とし、ウイルス感染に対する細胞応答を解析する in vitro モデルの開発を目的とする理由について説明している。従来の動物モデルは種差や倫理的問題を抱え、2D 培養系は in vivo 環境を再現できないことから Microphysiological systems（MPS）の利用を提案している。しかし、多くの MPS は不死化細胞株や初代細胞を用いているため、遺伝型や表現型を一致させることが難しいと共に細胞リソースが不足していることが課題である。本研究では、アイソジェニックな iPS 細胞由来の気道および肺胞 MPS モデルを構築し、ウイルス特異的応答を解析している。さらに、単一細胞源から多臓器システムへの展開を目指し、将来的な個別化医療や多臓器相互作用研究への貢献を目指すことが目的であると述べている。 第 2 章では、ヒト気道および肺胞 MPS モデルの構築について述べている。使用したチップは、多孔質膜で分離された 2 つのマイクロチャネルを備えており、上部チャネルに hiPSC 由来肺前駆細胞を播種し気道あるいは肺胞細胞へと分化を誘導した。それぞれの至適培地を用いることで、気道細胞は 28 日間、肺胞細胞は 7 日間で分化した。その後、下部チャネルに血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、ヒト気道および肺胞の上皮組織と血管内皮組織の界面を再現した。気道モデルでは、上皮は主に繊毛細胞で構成され、一部に杯細胞、クラブ細胞、基底細胞が含まれていた。繊毛細胞マーカーである SNTN および FOXJ1 は、培養開始から 28 日目までに段階的に発現が増加した。肺胞モデルでは、上皮は主に AT2 細胞から構成され、一部 AT1 様細胞も含まれていた。AT2 細胞マーカーである SFTPC、SFTPB、SLC34A2 は、培養開始から 10 日目までに段階的に増加した。また、気道および肺胞の上皮および内皮細胞間にはタイトジャンクションがそれぞれ形成され、上皮および内皮組織の構築が確認された。さらに、RT-qPCR 解析により、SARS-CoV-2 の主要受容体の発現が気道および肺胞上皮で段階的に増加することが確認され、ウイルス疾患研究への応用可能性が示されている。 第 3 章では、SARS-CoV-2 感染が hiPSC 由来気道および肺胞モデルに与える影響について、細胞障害および宿主自然免疫応答に着目して解析している。In vivo におけるウイルス曝露を模倣するため、上皮組織側の上部チャネルに SARS-CoV-2 を導入し感染をウイルス力価により評価したところ、両モデルの上皮においてウイルス量が増加したものの、内皮においては感染後 3 日目までウイルスは検出されなかった。感染後			

の上皮組織における細胞障害を評価したところ、気道モデルでは繊毛細胞マーカーの発現に大きな変化は見られなかったが、肺胞モデルでは AT2 細胞マーカー SFTPC の発現がわずかに低下した。さらに、感染 3 日目のトランスクリプトーム解析により、宿主自然免疫応答の差異が明らかになった。気道モデルでは、1 型インターフェロン (IFN1) 依存性応答が強く誘導されたのに対し、肺胞モデルでは 1 型 IFN 活性化が相対的に抑制されていた。肺胞上皮の免疫応答および炎症経路は、主にケモタキシスおよびケモカイン関連経路によって駆動され、ケモカイン関連遺伝子の顕著な発現上昇が観察された。これらの結果は、遠位肺が SARS-CoV-2 に対して 1 型 IFN 依存的な強い免疫応答を示さず、後のサイトカインストームの一因となり得るという先行研究と一致する。

第 4 章では、hiPSC 由来の気道および肺胞モデルを用いて、SARS-CoV-2 と IAV 感染の影響を比較している。IAV を SARS-CoV-2 と同様に上部チャネルから導入したところ、感染後 3 日目までに急速なウイルス増殖が確認された。上皮組織に対する細胞障害においては両ウイルス間で顕著な差が見られ、IAV は気道および肺胞モデルの両方で上皮組織の損傷を引き起こした。具体的には、気道モデルでは繊毛細胞数および繊毛細胞マーカー SNTN および FOXJ1 の発現が大幅に減少し、全体の細胞数も著しく低下した。肺胞モデルでは、AT2 細胞マーカーである SFTPC の遺伝子発現および陽性細胞数が大きく減少し、肺胞上皮の組織構造が乱れ、肥大化した細胞が観察された。両モデルともに上皮細胞数が大幅に減少し、広範なアポトーシスが確認された。免疫応答に関する遺伝子発現の上昇は両モデルにおいて同じ傾向であったが、IAV は SARS-CoV-2 よりもはるかに強い IFN1 経路の活性化がみられた。また、アポトーシス経路およびウイルスゲノムの抑制経路も増強された。さらに、それぞれのモデルにおける血管内皮細胞のトランスクリプトーム解析を実施したところ、いずれのモデルにおいても強い自然免疫応答を示し、上皮組織における自然免疫応答および組織損傷が内皮組織に影響した可能性が示唆された。

第 5 章では、結論および今後の展望について述べている。本研究は、hiPSC 由来の細胞を用いて、ヒト肺の気道および肺胞を再現する *in vitro* モデルをチップ上に構築した点に大きな意義がある。これらのモデルでは、アイソジェニックな hiPS 細胞を用いたことで、さまざまなウイルスに対する呼吸器の異なる領域における宿主自然免疫応答を解析することを可能にした。さらに、本研究で構築した MPS モデルは、ウイルス疾患の病態研究のみならず、他のヒト臓器モデルや遺伝性疾患モデルへの応用も期待される。特に、hiPSC 由来モデルは、単一細胞から多様な臓器や疾患モデルを再現できるため、個別化医療や遺伝子異常を伴う疾患のメカニズム解明に貢献する可能性が高い。本研究の成果が、呼吸器疾患研究の新たな基盤を築くとともに、MPS を用いた多臓器相互作用研究や創薬研究への応用を広げる重要な一步となることが述べられている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、hiPSC 由来の肺前駆細胞を用いて、ヒト呼吸器の 2 つの領域（気道および肺胞）をマイクロ流体デバイス上に構築し、これらのモデルを用いて SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルス（IAV）感染時の宿主自然免疫応答を解析した。主な成果は以下の通りである。

1. ヒト気道および肺胞 MPS モデルの構築：hiPSC 由来肺前駆細胞から気道および肺胞上皮細胞への分化培養法を最適化した。気道モデルでは、肺前駆細胞が繊毛細胞へ分化し、一部に杯細胞や基底細胞なども含まれた。肺胞モデルでは、主要な細胞タイプは AT2 細胞であり、一部 AT1 細胞が観察された。さらに、多孔質膜を介して、hiPSC 由来上皮細胞と血管内皮細胞（HUVEC）の共培養系を確立した。両モデルにおいて、上皮組織および内皮組織がタイトジャンクションを形成し、ヒト気道および肺胞の *in vivo* 界面を再現したことを示した。
2. モデルを用いた SARS-CoV-2 および IAV 感染形態の評価：両ウイルスは、気道および肺胞上皮において複製が確認されたが、内皮細胞には感染を引き起こさないことを明らかにした。SARS-CoV-2 は、両モデルにおいて細胞組織構造を維持したまま、軽度の細胞障害を引き起こした。一方、IAV は顕著な細胞障害を示し、気道モデルでは繊毛細胞マーカー SNTN と FOXJ1、肺胞モデルでは AT2 細胞マーカー SFTPC などの発現が大幅に減少し、ウイルス依存的な感染形態をチップ上で表現した。
3. トランスクリプトーム解析による自然免疫応答の比較：感染後の宿主自然免疫応答を解析することで、SARS-CoV-2 は気道および肺胞上皮で異なる自然免疫応答を引き起こすことが明らかとなった。一方、IAV は両モデルにおいて 1 型インターフェロン（IFN）経路を中心とする免疫応答が類似していた。

本論文は、気道および肺胞における上皮と内皮の界面を MPS モデルとして *in vitro* 再構成する手法を提案し、SARS-CoV-2 と IAV のウイルス感染による組織応答を実験的に評価したものである。本論文で得られた知見は、生体模倣システムの開発と応用において、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 7 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：令和 7 年 6 月 23 日以降