

京都大学	博士 (工学)	氏名	馬 成 (Cheng Ma)
論文題目	High Functionality of Proximal Tubule Microphysiological Systems (MPS) Using Human iPSCs and Its Application to a Disease Model (ヒト iPSC を用いた近位尿細管生体模倣システム (MPS) の高機能化と疾患モデルへの応用)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) を活用し、腎近位尿細管オンチップ (Proximal Tubule-on-a-Chip, PToC) モデルの開発とその機能評価を通じて、薬物動態研究や疾患モデル構築への応用を目指したものであり、5 章から構成されている。 第 1 章は序論であり、背景、目的、論文全体の構成について述べている。創薬プロセスにおいて、薬剤性腎毒性は第 III 相臨床試験における主要な失敗原因の一つとされている。しかし、従来の <i>in vitro</i> モデルでは腎臓の複雑な生理機能を忠実に再現することが難しく、特に 2 次元培養モデルや Transwell モデルでは輸送体の不活性化や細胞極性の欠如といった課題が指摘されている。その結果、薬剤性腎毒性の予測精度が不十分であり、新たな薬物スクリーニングのために、腎臓の生理機能を忠実に模倣し、薬剤応答を正確に予測できる新しい <i>in vitro</i> モデルの開発が求められている。動物モデルにおいてもヒトの腎機能や薬物応答を完全に模倣することは困難であり、ヒト由来細胞を基盤とした先進的なモデルの開発が強く求められている。このような背景を踏まえ、生体模倣システム (MPS) は、マイクロ流体技術を活用して腎臓の動的環境を再現し、生理機能を忠実に模倣する有望な手法として注目されている。さらに、iPSC 由来腎臓オルガノイドを組み合わせることで、ヒト腎臓細胞に近いモデルを構築できる可能性が大幅に向上すると期待されている。本研究では、iPSC 由来腎臓オルガノイドを基盤にした MPS モデルを開発し、その機能性と応用可能性を検証した。具体的には、iPSC 由来腎臓オルガノイドを基盤にした MPS モデルを開発し、腎臓特有の輸送体機能の評価と腎毒性解析への応用可能性を検討した。また、MPS 技術を応用して、患者由来 iPSC を基盤にした常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) モデルを構築し、生体内に近い環境での疾患特有の表現型再現を実現した。 第 2 章では、ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを使用して、近位尿細管オンチップ (iPSC-derived PToC) モデルの開発と評価について述べている。本研究では、腎臓オルガノイドから近位尿細管上皮細胞に特徴的に発現する LTL 陽性細胞 (LTL+細胞) を、磁気細胞分離法 (MACS) を用いて効率的に分離した。ラミニン (iMatrix-511) をチップ内の多孔質膜上に塗布し、LTL+細胞を播種することで均一な上皮組織を作製することに成功した。本研究では、2 つの分化プロトコルを用いて誘導した LTL+細胞を用いて iPSC-derived PToC モデルを作製し、それぞれ #1-LTL+ PToC および #2-LTL+ PToC と定義し、不死化細胞 RPTEC/TERT1 を用いて作製した RPTEC PToC モデルと比較した。培養 5 日後、いずれの iPSC-derived PToC も上皮マーカーである EpCAM、LTL、LRP2 (megalin) を高発現し、密着結合タンパク質 ZO-1 の発現も確認された。また、FITC-イヌリンの透過性試験の結果、iPSC-derived PToC で形成された上皮細胞層が低い透過性を示し、密着結合タンパク質の発現に基づく強固な上皮バリア機能を有することが明らかになった。 第 3 章では、オルガノイド由来の細胞を用いた近位尿細管オンチップモデルの薬物輸送と腎毒性評価における有用性を検証した成果について述べている。#1-LTL+ PToC では、OAT1 および OAT3 が明確な基底側局在を示し、高い輸送活性を有していた。一方、#2-LTL+ PToC では OAT1 および OAT3 が基底側と頂端側の両方で発現し、RPTEC PToC では極性が不完全で輸送活性が限定的であった。作製した MPS を用いて、トラ			

ンスポーターによる基底膜側から頂端膜側への輸送と、基底膜側から細胞内への取り込みを評価した。フルオレセインおよび OAT を介した薬剤（アデフォビル、PAH、ロスバスタチン）の取り込みおよび輸送の評価では、特に#1-LTL+ PToC で高い輸送活性が観察された。また、阻害剤プロベネシドを用いた阻害実験では、OAT1 および OAT3 を介した基底膜側から頂端膜側への薬物輸送が抑制されることを確認し、#1-LTL+ および #2-LTL+ PToC がこれらの輸送機能を正確に再現していることが示された。さらに、MRPs を阻害する MK571 の効果を調べたところ、OAT の基質の細胞内蓄積が増加し、OAT を介した輸送メカニズムにおける MRPs の重要性が示された。また、OCT2 および P-gp の評価では、#1-LTL+ および #2-LTL+ PToC が RPTEC PToC に比べて高い輸送活性を示した。特に、#1-LTL+ PToC はメトホルミンおよびキニジンの輸送において優れた性能を示した。腎毒性試験では、OAT1/3 によって基底側から輸送される腎毒素アリストロキア酸および OCT2 によって基底側から輸送される腎毒素シスプラチンの影響を検証し、いずれにおいてもオルガノイド由来細胞を用いた場合（#1-LTL+ および #2-LTL+）暴露後 24 時間で腎毒性が表れた。さらに、OCT2 阻害薬であるシメチジンを導入すると、シスプラチン毒性が低下することが実証できた。以上により第 3 章では、開発した iPSC-derived PToC は、トランスポーターを介した薬剤の排泄と取り込みだけでなく、阻害剤の効果も適切に評価できる新たな MPS であることが示された。

第 4 章では、PToC の基盤技術を用いて ADPKD 疾患モデルの構築およびその病態解析を行った。まず、静置培養法を用いて ADPKD 患者由来腎オルガノイドモデルを再現し、疾患特有の表現型を解析した。その結果、ADPKD 患者由来腎オルガノイドでは、cAMP 刺激を伴わない条件下ではシスト形成が確認されなかった。さらに、RNA-seq 解析により、静置培養モデルでは cAMP 産生量の増加や一次繊毛の退縮など、ADPKD 特有の重要な表現型が十分に再現されないことが判明した。次に、患者由来ヒト iPS 細胞を使用し、灌流培養環境下で ADPKD 近位尿細管モデル（ADPKD PToC）を構築した。このモデルを用いて、ADPKD 特有の一次繊毛の退縮、せん断応力刺激による細胞内カルシウム応答の低下、cAMP 産生量の増加、および CFTR 依存的 Cl⁻輸送量の増加といった病態を評価した。その結果、健常モデル（WT PToC）と比較して、ADPKD PToC では一次繊毛の発達が著しく抑制されていることが明らかになった。また、WT PToC ではせん断応力刺激による細胞内カルシウム応答が正常に確認されたのに対し、ADPKD PToC ではその応答が大幅に低下していることが示された。RNA-seq 解析の結果、ADPKD PToC では cAMP 産生、細胞増殖、Cl⁻輸送に関連する経路が活性化していることが明らかになった。また、灌流培養環境下で CFTR 活性を評価した結果、ADPKD 細胞では CFTR 依存的 Cl⁻輸送量が増加しており、ADPKD 特有の病態が確認された。さらに、灌流培養環境が ADPKD 細胞の遺伝子発現およびシグナル伝達経路に与える影響を解析した結果、WT 細胞と比較して、ADPKD 細胞では流体刺激に対する特異的な応答が顕著であることが示された。特に、*mTOR* や *LRP5* などの病態関連遺伝子における発現変化が確認された。灌流培養は WT PToC において一次繊毛形成を促進し、流体誘導性 Ca²⁺シグナル応答を増強した一方で、ADPKD PToC ではこれらの効果が確認されなかった。以上の結果から、第 4 章では、患者由来ヒト iPS 細胞を使用した灌流培養環境下の ADPKD 近位尿細管モデルが、せん断応力および間質流を再現することで、従来の静置モデルでは観察が困難だった ADPKD 特有の病態を忠実に再現できることを示した。

第 5 章はまとめであり、本論文における研究の成果とその意義について示すとともに、今後の展望について述べている。