



Title	Investigation of Exon Skipping Therapy in Kidney Organoids from Alport Syndrome Patients Derived iPSCs
Author(s)	籐内, 研佑
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101448">https://hdl.handle.net/11094/101448</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	斎内 研佑
論文題名 Title	Investigation of Exon Skipping Therapy in Kidney Organoids from Alport Syndrome Patients Derived iPSCs (アルポート症候群患者由来iPSCsを用いて作製した腎臓オルガノイドに与えるエキソンスキッピング技術の作用に関する研究)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>アルポート症候群はCOL4A5遺伝子の変異を原因とする遺伝性疾患であり、聴覚障害や慢性腎不全を引き起こす。ヒトを含む多様な動物や細胞を用いて病態の研究がなされているが、特異的治療法の開発に至っていない。しかし、近年、アルポート症候群のマウスモデルにおいて、anti-sense oligo (ASO) を用いたエキソンスキッピング療法が病態を一部改善することが示された。本研究では、エキソンスキッピング療法がヒトのアルポート症候群に与える影響を検討するために、ヒト induced pluripotent stem cells(iPSCs)由来のオルガノイドを用いてエキソンスキッピング実験を行った。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>最初に、アルポート症候群患者由来のiPSCsを用いた腎臓オルガノイドの誘導を行い健常体由来のiPSCsのものと比較を行った。健常体由来のものと同様に腎臓オルガノイドの誘導条件により、ネフロン構造である糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、間質の各種マーカー (NPHS1, LRP2, SCL12A1, FOXD1) が増加した。さらにネフロンマーカーによる免疫染色により、患者由来の腎臓オルガノイドはネフロン構造の形成することが確認された。しかし、健康体由来の腎臓オルガノイドでは確認できたCOL4A5タンパク質のC末端側の発現が、患者由来の腎臓オルガノイドでは認められなかった。このことから、患者由来iPSCsはネフロンを形成することはできるが、COL4A5のC末端を形成しないことが示された。</p>	
<p>続いて、患者由来の腎臓オルガノイドに対するASOの効果をin vitroで検証した。患者由来のオルガノイドにASOを非投与したものと高濃度のASOを投与したもののRNA発現量を比較した、誘導開始後ネフロンマーカー (NPHS1, LRP2, SCL12A1) については大きな変化が認められなかった。また、ASOのターゲット領域であるCOL4A5のexon 24のRNA発現量はASO投与により有意に低下を示した。さらに、免疫染色でCOL4A5タンパク質のC末端側の発現を調べたところ、ASO非投与で認められなかった患者由来のオルガノイドはASO投与により発現の回復が観察された。このことからASOは患者由来iPSCsの持つネフロン形成能へは大きな影響を及ぼさず、COL4A5に対して作用することが示された。</p>	
<p>最後に、ASOの作用をin vivoで比較するために、患者由来オルガノイドをマウス体内に移植し培養を試みた。これまでのオルガノイドの移植培養と同様に患者由来オルガノイドでも糸球体の血管化が引き起こされた。また、電子顕微鏡下で糸球体基底膜構造を観察、定量したところ、糸球体のpodocyteの特徴的な構造であるスリット膜の形成が患者由来オルガノイドでは健康体由来のオルガノイドと比較して有意に低下を示した。移植培養中に、移植したマウスASO～ASOの投与を試みたが、投与群と非投与群の間で有意な変化は観察されなかった。これらのことから、今回の実験のASOの投与方法では、in vivoのオルガノイドに対しASOを作用させることはできないことがわかった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>本研究では、初めてASOが患者由来iPSCsから作製した腎臓オルガノイドに対してin vitroで作用することを示し、根治療法がないASに対する新規の治療方法としての可能性を示した。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 篠内 研佑		
論文審査担当者	主 査	(職) 大阪大学招へい教授 氏名 高里 実
	副 査	大阪大学教授
	副 査	大阪大学教授

## 論文審査の結果の要旨

エキソンスキッピング療法は、遺伝病に対して、anti-sense oligo (ASO) を用いて特定のエキソンをmRNA上からスプライスアウトすることで、異常タンパク質の機能を回復することを目的とした新規の治療法である。本論文は、このエキソンスキッピング療法が、ヒトのアルポート症候群の治療に使えるかどうかを検討するために、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）から作製したオルガノイドで、その効果を解析したものである。アルポート症候群は、コラーゲン遺伝子（COL4A5遺伝子）の変異を原因とする遺伝性疾患であり、腎臓においては糸球体基底膜の構造上の異常とスリット膜の形成異常を呈し、慢性的な腎疾患を伴う。本論文で用いられたアルポート症候群患者のCOL4A5遺伝子には、エキソン24に挿入変異が生じており、その結果、エキソン24以降のC末端部位のタンパク質翻訳がストップしている。

本論文ではまず、アルポート症候群患者の血球から樹立されたiPS細胞を用いて、ヒトの腎臓オルガノイドを作製した。iPS細胞に対して、WNTシグナルを促進する化合物（CHIR99021）とFGF9タンパク質を順次与え、中間中胚葉を誘導した後に、CHIR99021の刺激を短時間与えて、ネフロン上皮組織を誘導した。作製された腎臓オルガノイド内には実際にネフロン組織が発生しており、糸球体構造が確認された。更に、糸球体基底膜でCOL4A5タンパク質の発現を免疫染色により調べたところ、C末端部位の発現が見られないことを確認した。この結果は、アルポート症候群患者由来の腎臓オルガノイドが作製できること、そして、疾患の原因遺伝子であるCOL4A5のタンパク質が実際に糸球体基底膜に適切に発現できていないことを示す結果であった。

次に本論文では、この患者由来腎臓オルガノイドに対してASOを用いて、COL4A5タンパク質のC末端部位の欠損が回復するかを確認した。用いたASOは、COL4A5のエキソン24をスキップすることでストップコドンの出現を回避し、糸球体基底膜におけるC末端部位の翻訳可能にする設計であった。実際に腎臓オルガノイドに12日間、100nMのASOを与えた結果、C末端部位の発現が回復したこと免疫染色により確認した。更に、定量的RT-PCR法により、COL4A5のmRNAからエキソン24がスプライスアウトされていることを確認した。この研究成果は、ヒト腎臓オルガノイドでASOが効果を発揮することを証明した重要な知見と言える。

最後に、患者由来腎臓オルガノイドをマウスの体内に移植し、*in vivo*におけるASOの効果を検証した。移植後の腎臓オルガノイドを電子顕微鏡にて観察したところ、糸球体にマウス由来の血管が侵入し、糸球体基底膜の形成が確認された。そこで、ASOを腹腔内に注射することで、COL4A5タンパク質のC末端部位の発現の回復を試みたが、*in vitro*で見られたような明らかな回復は確認されなかった。今後、注射方法や移植部位に関する、詳細な検討を要すると考えられる。この様に、本論文で明らかになった知見は今後、*in vivo*におけるASOの使用方法の開発に活かされることが期待される。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、発生再生分野における優れた研究能力、そして医科学の理解・発展に寄与する新しい手法や概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士（医学）の授与に値するものと認める。