



Title	PAX6-dependent differentiation landscape of ocular surface epithelium via single-cell RNA sequencing in hiPSC-derived ocular developmental organoid
Author(s)	家室, 怜
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105737
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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	家室 怜
論文題名 Title	PAX6-dependent differentiation landscape of ocular surface epithelium via single-cell RNA sequencing in hiPSC-derived ocular developmental organoid (シングルセルRNAシーケンスを用いたヒトiPS細胞由来眼オルガノイドにおける眼表面上皮のPAX6依存的分化系譜解析)
論文内容の要旨 〔目的(Objective)〕 初期の眼発生過程において眼胞と相互作用した表面外胚葉は、眼表面の角膜、輪部、結膜の上皮細胞へと分化する。このとき、表面外胚葉はPAX6と重層上皮幹細胞マーカーp63を共発現し、眼表面外胚葉とも呼ばれる。PAX6は眼発生のマスター制御遺伝子であり、正常な表面外胚葉の分化においても重要な役割を担っている。しかしながら、表面外胚葉から眼表面上皮へ分化する細胞系譜や、関与する転写因子ネットワークは十分には解明されていない。我々は、ヒト多能性幹細胞(iPS細胞)より誘導される眼オルガノイド(SEAM)を用いることで、ヒト多能性幹細胞から角膜上皮前駆細胞や結膜上皮前駆細胞を誘導できることを報告した。本研究では、このSEAMから角結膜上皮前駆細胞を誘導する過程の細胞をscRNA-Seq解析を実施し、眼表面上皮の系譜解析と転写因子ネットワークを明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ゲノム編集によって作製したPAX6-EGFP/p63-tdTomatoレポーターヒトiPS細胞をSEAM法によって角結膜上皮細胞に分化誘導した。それぞれ分化誘導開始後2週、4週、8週においてp63陽性細胞をFACSにより単離し、それぞれscRNA-Seqによる解析を行った。RNA velocityを併用することで、表面外胚葉から眼表面外胚葉への分化や、表面外胚葉から胎生角膜上皮および胎生結膜上皮への分化系譜が示された。また、single-cell regulatory network inference and clustering (SCENIC)により各発生段階における転写因子の活性を算出し、各細胞クラスター特異的な転写活性に基づいた転写因子ネットワークを構築した。誘導2週および4週では、PAX6は眼表面外胚葉内の転写因子群とネットワークを形成していた。一方、誘導8週では、角膜上皮でPAX6の活性が高く、輪部上皮の転写因子群と相関ネットワークを形成していたが、結膜上皮の転写因子群とは相関が見られなかった。さらに、分化誘導2週、4週、8週の統合データにおけるpseudotime trajectory解析から、胎生結膜上皮は輪部上皮および結膜上皮に分化することが推測された。同様に、角膜上皮が胎生角膜上皮および輪部上皮の両者から分化していることが推測された。これらの眼表面上皮細胞におけるPAX6の関与をさらに解析するために、誘導した眼表面上皮細胞をPAX6発現量に基づいて単離し、上皮シートの作製を行った。PAX6の発現レベルに応じて、表皮と結膜の双方の性質を示す上皮シート、MUC5ACを特異的に発現する結膜上皮シート、およびKRT12を特異的に発現する角膜上皮シートの3種のシートが形成された。 〔総括(Conclusion)〕 本研究により、眼発生の初期段階における眼表面上皮細胞の分化系譜が明らかになり、PAX6と関連する細胞種特異的転写因子ネットワークが推測された。これにより、眼表面上皮の遺伝性疾患ならびに再生医療の発展にもつながることが期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 家室 怜				
論文審査担当者	(職)	氏	名	
	主 査	大阪大学教授	西田 幸二	西田 幸二
	副 査	大阪大学教授	妻木 範行	妻木 範行
	副 査	大阪大学教授	妻木 範行	辻川 元一

論文審査の結果の要旨

初期の眼発生過程において表面外胚葉は、眼表面の角膜、輪部、結膜の上皮細胞へと分化するが、これらの分化系譜は十分に解明されていない。これを明らかにするために、本研究では眼オルガノイド(SEAM)を角結膜上皮細胞に分化誘導する過程でp63陽性細胞を単離し、シングルセルRNA-Seqによる解析を行った。これにより表面外胚葉から眼表面上皮への分化系譜と、その細胞種特異的転写因子ネットワークが示された。さらに胎生結膜上皮は輪部上皮および結膜上皮に、胎生角膜上皮と輪部上皮は角膜上皮に分化していることが推測された。また、誘導した眼表面上皮細胞をPAX6発現量に基づいて単離し、上皮シートの作製を行うと、PAX6の発現レベルに応じて、角膜上皮、結膜上皮、皮膚粘膜移行部上皮が形成されることが示唆された。本研究から、眼発生の初期段階における眼表面上皮細胞の分化系譜とPAX6の寄与が明らかになり、関連する転写因子ネットワークが推測された。眼表面発生に新たな知見をもたらすものであり、学位に値すると考える。