



Title	Generation of Functional Conjunctival Epithelium, Including Goblet Cells, from Human iPSCs
Author(s)	能美, 君人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/81921
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 N a m e	能美 君人
論文題名 Title	Generation of Functional Conjunctival Epithelium, Including Goblet Cells, from Human iPSCs (ヒトiPS細胞からの杯細胞を含有する機能的結膜上皮の作製)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 結膜上皮は角膜上皮、涙液層と合わせてオキュラーサーフェス（眼表面）と総称され、眼の表面の健康維持のためには不可欠である。結膜上皮の役割としてはMUC5ACなどのムチン産生が重要であり、結膜疾患によるムチン分泌機能低下はドライアイの原因の一つとして注目されている。一方で研究用のヒト結膜上皮は入手が困難であり、眼表面の中でも結膜研究は進捗が乏しい。本研究では多能性幹細胞から結膜上皮を作製することを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 我々はヒトiPS細胞を用いた様々な眼の細胞を含む多層上のコロニー（SEAM, self-formed ectodermal autonomous multi-zone）の誘導法を確立しており、さらにSEAMから機能的な角膜上皮組織の作製に成功しているが、結膜細胞の存在は明確に確認されていない。また過去の報告でEGF（epidermal growth factor）は結膜上皮の表現系維持や増殖に関与することが示唆されている。そこで本研究ではEGFが結膜上皮の発生にも影響を与えると仮説を立て、SEAMを応用し結膜上皮作製を試みた。 まずiPS細胞からSEAM形成後にEGFを添加した際の変化を解析すると、EGF添加時には角膜上皮への分化が抑制されることがわかった。続いてセルソーティングで目的細胞の単離を試みたところ、CD200陰性/SSEA-4強陽性/ITGB4陰性の細胞集団中に分化結膜細胞（結膜上皮細胞および杯細胞）が、CD200陰性/SSEA-4弱陽性/ITGB4陽性の細胞集団中に結膜前駆細胞が濃縮されることが明らかとなった。この単離した結膜前駆細胞をさらに成熟培養したところ、杯細胞を含む結膜上皮組織へと分化させることに成功した。この際、特に杯細胞へと成熟させる重要な成長因子として、iPS細胞から分化させる時に使用したEGFではなく、KGF（keratinocyte growth factor）が必要であることが明らかとなった。さらに、この作製した結膜上皮組織は培養上清中へのMCU5AC分泌能を有していることが確認され、機能的な結膜上皮であることが示唆された。 SEAMから結膜細胞を誘導する際のEGF受容体シグナル伝達の関与を検証したところ、分化誘導第4-6週では、EGFを添加したSEAMでのみEGF受容体のリン酸化が確認された。一方で分化誘導第10週では、KGFを添加したSEAMでもEGF添加時と同じ程度のEGF受容体リン酸化が確認された。KGF添加SEAMからは結膜上皮を作製することはできなかったことから、SEAMから結膜上皮前駆細胞を誘導させる際には分化誘導初期である第4-6週におけるEGF受容体活性化が重要であることが示唆された。さらに他のEGF受容体リガンドであるTGF（transforming growth factor）- α やamphiregulinをSEAMに添加した際でも、EGF添加時と同様に結膜上皮を作製することが可能であった。以上の結果から、SEAMから結膜細胞を誘導する際にはEGF受容体シグナル伝達の活性化が重要であることが強く示唆された。	
〔総 括(Conclusion)〕 本研究により、iPS細胞から結膜前駆細胞を分化させる際にはEGFなどのEGF受容体リガンド、さらにその成熟（特に杯細胞）にはKGFが重要な役割を果たすことが示唆された。本研究により、これまで入手が困難であったヒト結膜細胞を入手することが可能となり、結膜や角膜を含む、眼表面上皮の発生過程を解明するための研究ツールとして利用することが可能となった。将来的には、結膜細胞をターゲットとしたドライアイなどの眼疾患に対する創薬研究への応用や、眼表面疾患を治療するための再生医療ツールとして知見を提供でき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) 能美 君人		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 西田 幸二
	副 査	大阪大学教授 山田 隆二
	副 査	大阪大学寄付講座教授 玉井 秀人

論文審査の結果の要旨

本研究ではヒトiPS細胞からムチン分泌能を有する機能的な結膜上皮を作製する方法を新たに確立した。眼球の表面は角膜と結膜からなり、結膜は涙液層の維持を担っているが、その機能が低下するとドライアイなどの疾患になる。過去にヒトiPS細胞から角膜上皮の誘導法は報告されていたが、結膜上皮については明らかとなっていなかった。本研究ではヒトiPS細胞から誘導した二次元の眼オルガノイドを用い、EGF受容体シグナルを活性化することで結膜細胞を選択的に誘導できることを見出した。さらにセルソーターを用いて単離したiPS細胞由来の結膜上皮前駆細胞の成熟培養により、結膜上皮および杯細胞への分化にはKGFが必要であることを明らかにした。

本研究成果によりこれまで困難であったヒト結膜細胞の入手が可能となり、結膜や角膜を含む眼表面上皮の機能解析や発生過程を解明するための研究ツールとしての利用が可能となった。さらには結膜細胞をターゲットとした眼疾患に対する創薬研究への応用や、眼表面の再生治療法開発のための知見を提供できることも期待される。

上記の理由より、本研究は学位授与に値するものと認める。