



Title	Human iPS cells engender corneal epithelial stem cells with holoclone-forming capabilities
Author(s)	渡辺, 真矢
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87910
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	渡 辺 真 矢
論文題名 Title	Human iPS cells engender corneal epithelial stem cells with holoclone-forming capabilities (Holoclone形成能を有するヒトiPS細胞由来角膜上皮幹細胞の誘導)
論文内容の要旨	
<p>【目的(Purpose)】</p> <p>重篤な角膜の混濁と視力低下を来す角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、幹細胞を補充して透明性を回復させるために培養上皮細胞シート移植が有効である。本研究では、猥眼に依存することなくヒトiPS細胞から人工的に幹細胞を誘導、単離することで、幹細胞を多く含む細胞シートを作製できるか検証することを目的として研究を行った。</p>	
<p>【方法ならびに成績(Methods/Results)】</p> <p>ヒトiPS細胞から眼組織全体を含むオルガノイドを誘導する方法としてSEAM法が報告されている。SEAM法では約12週間の2次元培養により4層構造の同心円状コロニーが誘導されるが、内側から3層目に角膜上皮前駆細胞が含まれることが報告されており、本領域に角膜上皮幹細胞が誘導されているか検証した。まず、SEAM法により誘導した眼オルガノイドの3層目領域の遺伝子発現解析を経時的に行った結果、眼表面上皮細胞が分化する時期と一致して角膜上皮幹細胞マーカーABC5が発現することを確認した。次に、ABC5陽性細胞をFACSによって単離し、本細胞が角膜上皮幹細胞としての性質を有しているか自己複製試験および角膜上皮への分化試験によって検証した。Colony-forming assayによってABC5陽性細胞はABC5陰性細胞と比較して高い増殖能を有していることが示され、Holoclone assayでは自己複製能を有するHolocloneがABC5陽性細胞からのみ生じることを確認した。さらに、ABC5陽性細胞を中和抗体で処理しABC5の機能を阻害した結果、Colony-forming assayおよびHoloclone assayで細胞の増殖能、自己複製能が有意に低下することが示され、ABC5が細胞増殖に機能的に関与しているマーカーであることも示された。次にABC5陽性細胞を3週間から4週間かけて2次元培養することで細胞シートを作製し、遺伝子発現解析を行った結果、本シートが角膜上皮マーカー（K12、PAX6、p63）を発現し角膜上皮の表現型をもつことを確認した。さらに本シートは角膜上皮幹細胞マーカーABC5の発現を維持しており、幹細胞がシート内に維持されていると考えられた。</p>	
<p>【総括(Conclusion)】</p> <p>ヒトiPS細胞由来ABC5陽性細胞は幹細胞に必須の性質である自己複製能と成熟角膜上皮細胞への分化能を有することが示され、人工的に角膜上皮幹細胞を誘導することに初めて成功した。さらに、本細胞を用いて作製した細胞シート中には幹細胞マーカーの持続的な発現が認められ、角膜再生医療の治療成績向上に寄与するものと期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 渡辺 真矢

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 西田 平二
	副 査	大阪大学教授 中野 徹
	副 査	大阪大学寄附講座教授 玉井 克人

論文審査の結果の要旨

重篤な角膜の混濁と視力低下を来す角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、幹細胞を補充して透明性を回復させるために培養上皮細胞シート移植が有効である。本研究では、猥眼に依存することなく人工的に幹細胞を誘導、単離することで、幹細胞を多く含む細胞シートを作製できるか検証した。まず、ヒトiPS細胞から角膜上皮幹細胞マーカーであるABCB5を発現する細胞を誘導した。続いてABCB5陽性細胞を単離し、自己複製試験や角膜上皮への分化試験により、本細胞が幹細胞に必須の性質である自己複製能と成熟角膜上皮細胞への分化能を有することを確認した。さらに、培養した細胞シート中にはABCB5の持続的かつ広範な発現が維持されていることも示した。本研究は生体外での角膜上皮幹細胞の作製に初めて成功したものであり、角膜再生医療の治療成績向上に寄与するものと期待されている。よって本論文は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。