

氏名	清水 達也		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10375 号		
学位授与年月	令和 4 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた新規 ADPKD 病態モデルの作製		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	家田 真樹
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	西村 健
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	根来 宏光
副査	筑波大学講師	博士（医学）	岩淵 敦

論文の内容の要旨

清水達也氏の博士学位論文は、疾患特異的ヒト iPS 細胞由来の腎臓オルガノイドを用いて、新規の常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の病態モデルを作製したものである。さらに本研究のモデルが薬効評価研究にも応用できることを示し、ADPKD の創薬スクリーニングとして使用できる可能性を明らかにしている。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

ADPKD は、進行性に発生・増大する両側の多発腎嚢胞と腎腫大を特徴とする末期腎不全に至る最多の遺伝性腎疾患である。本疾患では、従来主に動物モデルを用いた病態解析が行われてきたが、原因遺伝子である *PKD1* または *PKD2* の変異から腎嚢胞形成に至るメカニズムが解明されておらず、現時点で根治的治療が存在しない。近年、患者と同様の遺伝的背景を有する疾患特異的ヒト多能性幹細胞から腎臓オルガノイドを作製し腎疾患の病態モデリングを行った報告がなされているが、ADPKD の疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた病態モデリングの報告はない。そこで著者は、ゲノム編集により ADPKD の原因遺伝子である *PKD1* に変異を導入したヒト iPS 細胞株、および *PKD1* 遺伝子に変異を有する ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドを作製し、新規の ADPKD 病態モデルとして病態解析や創薬研究への応用が可能か明らかにすることを研究の目的とした。

(材料と方法)

著者は、健常者由来ヒト iPS 細胞株に対して CRISPR-Cas9 法を応用した既存のゲノム編集技術を用いて、非相同末端結合により *PKD1* exon34 上流の 3' スプライス部位にヘテロ接合性またはホモ接合性変異を導入し、*PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株を樹立した。その後、これらの株と既報で樹立されていた *PKD1* 変異を有する ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株の両者から、選択的分化誘導により腎臓オルガノイドを作製した。著者は次に、cAMP シグナルの活性化が ADPKD の重要な細胞内病態であると報告されていることから、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である forskolin の投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞が再現できないか検討を行った。さらに、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイドを用いて、ADPKD の治療薬候補として報告のある薬剤の嚢胞増大抑制効果を評価することで、創薬研究への応用の可能性を検証した。

(結果)

著者はまず、CRISPR-Cas9法を応用したゲノム編集により *PKD1* 遺伝子にヘテロ接合性またはホモ接合性のフレームシフト変異を有する *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株を樹立し、これらの株から腎臓オルガノイドを作製して *PKD1* 変異が腎臓オルガノイドの分化状態に影響しないことを免疫染色やフローサイトメトリーを用いて明らかにしている。*PKD1* 変異を有する腎臓オルガノイドにおいても自発的な嚢胞形成は認めなかったが、forskolin 投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞構造が再現されることを報告し、光学顕微鏡画像の定量評価を行って *PKD1* の遺伝子型に応じて有意に嚢胞面積率が增大することを明らかにしている。また、免疫染色を行ってこれらの嚢胞が主に LTL 陽性の近位尿細管由来であることを報告している。著者は次に、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドを作製し、さらに forskolin 投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞を再現することも報告し、健常者由来ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイドと比較して有意に嚢胞面積率が增大することを示している。最後に著者は、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイドにおいて forskolin と既存薬剤を併用した場合に、バソプレシン V2 受容体拮抗薬の tolvaptan は腎臓オルガノイドの嚢胞増大を抑制しないが、CFTR 阻害薬や mTOR 阻害薬の投与は嚢胞増大を抑制することを明らかにしている。

(考察)

本研究により著者は、ゲノム編集により樹立した *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株、および *PKD1* 遺伝子に変異を有する ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株の両者から腎臓オルガノイドへ分化誘導し、forskolin 投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞を再現することで、新規の ADPKD 病態モデルを作製している。腎臓オルガノイドにおける forskolin 投与後の嚢胞形成が *PKD1* の遺伝子型に関連した表現型であることを明らかにし、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイドにおいても疾患の表現型が再現されることを示している。著者は、本研究の ADPKD モデルが薬効評価研究にも使用できることを示し、多能性幹細胞の特性を生かした創薬スクリーニングへの応用の可能性を明らかにしている。

審査の結果の要旨

(批評)

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は末期腎不全の重要な原疾患であるが、その根治的治療法が未だ開発されていない。清水達也氏は、ADPKD の疾患特異的ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドを作製し、薬剤処理により新規の ADPKD 病態モデルを開発した。さらに本研究のモデルを用いた創薬研究への応用の可能性についても検証を行っている。本研究成果は、ヒトにおける ADPKD の病態解明や治療薬候補探索のための創薬スクリーニングの実現に有益な貢献をもたらすものである。

令和4年1月4日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。