

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09753

研究課題名(和文) 復帰変異モザイクを応用したiPS細胞による表皮水疱症の治療

研究課題名(英文) Treatment of epidermolysis bullosa with revertant keratinocyte-derived iPS cells

研究代表者

藤田 靖幸 (Fujita, Yasuyuki)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80374437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：表皮水疱症患者において後天的に一部皮膚で遺伝子異常が修復される現象(復帰変異モザイク)が観察される。このような部位の皮膚から正常蛋白を産生する角化細胞を採取し、iPS細胞を樹立した上で間葉系幹細胞(MSC)へ分化・培養させ、病変部皮膚へ投与することで、大量の自己由来正常細胞を投与する根本的治療が可能になると考えた。本研究では基礎的検討として、1)表皮水疱症および健常人角化細胞からのiPS細胞の樹立 2)復帰変異モザイクiPS細胞の検索 3)角化細胞由来iPS細胞から誘導されたMSC(KC-iPSC-MSC)の検証 4)KC-iPS-MSCの皮膚基底膜蛋白の発現検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Cell-based therapies such as allogeneic mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) were explored. However, some hurdles exist to come over in current MSC-based therapies; limited proliferation and limited cell survival. To solve these problems, we focused on keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). Keratinocytes from intact areas of patients might have revertant mosaicism where the pathogenic mutations are spontaneously corrected. In this study, we succeeded to develop MSCs from keratinocytes-derived iPSCs (KC-iPSC-MSCs) of normal human and a RDEB patient. Keratinocytes-derived iPSCs (KC-iPSCs) were cultured with activin A, BIO and BMP4 to induce mesoderm lineage, and then cultured with bFGF and EGF. In 14 days, spindle-shaped cells appeared which showed mesenchymal differentiation. Furthermore, the intravenous injection of the KC-iPSC-MSCs into wounded mice induced human type VII collagen.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症

## 1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症 (EB) は、表皮-真皮境界部を構成する蛋白の先天性欠損や構造異常により皮膚の脆弱性を生じ、容易に水疱や潰瘍を形成する遺伝性皮膚疾患である。確立された治療法は存在せず、重症型では感染症や脱水、悪性腫瘍などを生じ、生後数年以内に死亡する例も少なくない。

表皮水疱症に対する根本的治療のアプローチは、現時点で 遺伝子治療 蛋白補充療法 細胞療法 に大別されるが、このうち現時点で臨床応用に最も近い段階にあるのは 細胞療法である。申請者らは一貫して表皮水疱症に対する根本的な治療法として細胞療法の可能性を追究している。申請者らは、表皮水疱症マウス (Nishie W, Shimizu H et al. Nat Med 2007) において骨髓移植の有効性を見いだしている (Fujita Y et al. PNAS 2010、藤田靖幸代表：平成 25 年度科 研費若手研究(A))。また、骨髓内に含まれる幹細胞には造血幹細胞と間葉系幹/間質細胞 (Mesenchymal stem/stromal cells; MSC) が知られているが、申請者はそれらのどちらも皮膚構成細胞に分化しうることを証明している (Sasaki M, Fujita Y et al. J Immunol 2008, Fujita Y et al. PNAS 2010, Fujita Y et al. Clin Exp Dermatol 2012)。

細胞療法という観点で見たとき、表皮水疱症は遺伝子異常を伴う先天性疾患であるため、自己細胞を用いた治療は基本的に根本的治療にならない。他人の細胞 (同種) を用いた細胞療法として同種造血幹細胞移植 (Wagner JE et al, New Engl J Med 2010) が少数例において施行されているが、生着不全や拒絶反応、移植関連死が問題となり本邦での実現には至っていない。

一方、MSC は非常に容易に培養・維持することが可能であり、免疫原性が他の細胞と比較して低いことが示唆されている。そして申請者らが示したように MSC は皮膚構成細胞に分化しうるため、表皮水疱症に対する現実的な細胞療法のリソースとしてきわめて有望である。実際に同種 MSC 局所注射療法 (Conget P et al. Cytotherapy 2010, Tamai K et al. PNAS 2011) が少数例において施行されており、造血幹細胞以外にヒトで有効性が示されている唯一の細胞療法であるが、やはり他人由来であるため数ヶ月程度で体内から排除されるという問題がある。

そこで申請者は、表皮水疱症患者において後天的に一部の皮膚で遺伝子異常が修復される現象 (復帰変異モザイク) に注目した。表皮水疱症においては、臨床的に水疱を作らない小さな斑が観察されることがあるが、そのような部位の遺伝子を解析すると、一部の表皮角化細胞で遺伝子異常が正常化したアレルが観察される。この現象は 1990 年代から少しずつ報告されるようになった現象であり、皮膚疾患以外に先天性免疫不全などで

も報告されている。複数の機序の関与が示唆されているが、多くは体細胞分裂時の染色体組換えによって生じると考えられている (図 4)。申請者らの施設では成人の重症表皮水疱症患者のうち 3 名で臨床的および遺伝子学的に復帰変異モザイクを証明しているほか、申請者らは重症型魚鱗癬においても同現象が生じることを発見している (論文投稿中)。

復帰変異モザイクは、いわば自然に生じた遺伝子治療 (natural gene therapy) ということができる。すなわち、先天性疾患において復帰変異モザイクを生じた細胞は、自己由来で拒絶反応を原理的に生じず、かつ正常蛋白を産生する細胞であり、細胞療法の観点から見ると理想的な細胞リソースである。ただし現時点で復帰変異モザイクが明らかに示されているのは患者の角化細胞のみである。そこで、このような部位から正常蛋白を産生する角化細胞を採取し、iPS 細胞を作成した上で MSC へ分化・培養させ、病変部皮膚へ投与する方法を発想するに至った。この MSC は自己由来であるため、拒絶反応を起こさずに大量の正常細胞を投与することが可能になる。根本的治療に結びつけられると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) 安全な復帰変異モザイク由来 iPS 細胞の確立

患者の角化細胞から遺伝子改変フリーの iPS 細胞を作成し、復帰変異モザイクを生じたクローンを抽出する。復帰変異モザイクの有無による幹細胞としての性質の相違を解析する。

### (2) 復帰変異モザイク由来 iPS 細胞の分化能評価

iPS 細胞から MSC への分化はシンガポールのグループなどにより効率的な方法が報告されているが、復帰変異モザイク由来 iPS 細胞での挙動はこれまで検討されていない。そこで本研究では、1. で作成した安全な復帰変異モザイク由来 iPS 細胞を MSC に分化させることを試みる。

### (3) 患者 iPS 細胞由来細胞療法の有効性の検討

こうして作成された患者由来 MSC を、創傷を作成した免疫不全マウスに局所注射および静脈注射し、ヒト基底膜蛋白の発現の有無及び程度を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 安全な復帰変異モザイク由来 iPS 細胞の確立

重症表皮水疱症患者から皮膚組織を採取し、センダイウィルスベクター (CytoTune-iPS<sup>®</sup>等) を用いて患者由来 iPS 細胞を作成する。表皮角化細胞からセンダイウィルスを用いた遺伝子改変フリーの iPS 細胞を作成した報告は過去に存在しないが、申請者ら

は正常ヒト角化細胞および表皮水疱症患者由来角化細胞から iPS 細胞の作成に成功している (Matsumura W et al. J Dermatol Sci 2018)。こうして作成された iPS 細胞の妥当性を、3 胚葉への分化能および奇形腫形成実験を用いて検証する。また、複数個作成された iPS 細胞クローンの遺伝子配列を検証して、復帰変異モザイクすなわち遺伝子配列が正常化したアレルを有する iPS 細胞クローンを抽出、培養維持する。

復帰変異モザイクは臨床的に正常化した皮膚の角化細胞全てに生じているわけではなく、正常化した iPS 細胞クローン数が予想よりも少ない可能性がある。その場合は初期細胞数および iPS 細胞作成の手技を再検討し、エピソームベクターを用いた幹細胞誘導を視野に入れる。さらに、復帰変異モザイクの存在はこれまで検討されていないものの、細胞分裂および染色体組換えを生じることが予想される、患者由来末梢血や骨髄由来細胞からの導入も検討する。また、市販ヒト iPS 細胞を用いた以降の実験遂行も検討する。

### (2) 復帰変異モザイク由来 iPS 細胞の MSC への分化能の検討

iPS 細胞から MSC への分化はシンガポールのグループなどにより報告されており (Tran NT et al. Stem Cells Dev 2012) 効率的な分化方法が確立されている。で作成した iPS 細胞を、bFGF を含む MCS 用培地で 2 日間培養した上で、分化誘導因子 (AAB 法; Activin A, 6-bromoindirubin-3'-oxime, BMP-4 添加) を加えて 10 日間培養する。細胞を回収し、CD105 陽性細胞を MSC として auto MACS およびフローサイトメーターで抽出する。

こうして得られた MSC の妥当性を、フローサイトメーターによる表面マーカー解析および *in vitro* での脂肪細胞・軟骨細胞および骨細胞への分化を確認する。また、骨髄由来 MSC との増殖能や表面マーカーの相違を解析する。

### (3) 患者 iPS 細胞由来細胞療法の有効性の検討

ヒト細胞が生着し異種移植実験が可能な免疫不全 scid マウスの背部に全層創傷を作成し、上記で作成された MSC を局所注射、ないし経静脈投与する。創が上皮化した時点で皮膚組織を採取し、ヒト HLA-class I 陽性皮膚構成細胞の存在率を免疫染色やフローサイトメーター等で解析する。また、ヒト皮膚基底膜蛋白の発現について免疫染色・RT-PCR・Western blotting で確認する。

## 4. 研究成果

代表研究者らはまず、重症 EB 患者から皮膚組織を採取、角化細胞を培養し、センダイウイルスベクターを用いて患者由来 iPS 細胞の樹立を試みた。表皮角化細胞からセンダイウイルスを用いた遺伝子改変フリーの iPS 細胞

を作成した報告は過去に存在しないが、 $moi=5$  以上で山中 4 因子を導入することで、iPS 細胞に類似したコロニーを得ることができた。この細胞は RT-PCR および DNA methylation assay で幹細胞性を示し、*in vitro* 分化実験および奇形腫形成実験により多分化能を示した (Matsumura W et al. J Dermatol Sci 2018、図 1)。

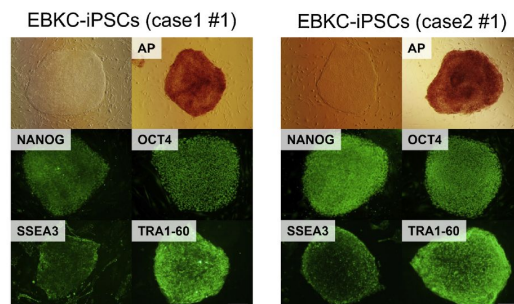


図 1 表皮水疱症患者から樹立した iPS 細胞

次に代表研究者らは、今回樹立された EB 患者由来 iPS 細胞から、Mutant Allele Specific Amplification (MASA) を用いて復帰変異モザイクを生じたクローンの選別を試みた。しかしながら、得られた 28 クローンの iPS 細胞中、復帰変異モザイクは含まれなかった。

そこで、健康人および復帰変異モザイクを生じていない EB 患者から樹立した iPS 細胞を用いて、MSC への分化誘導を試みた。AAB 法を用いて分化誘導を行い、MACS で CD105 陽性細胞を分離培養したところ、プラスチックディッシュに付着しながら増殖する紡錘形細胞を得ることができた。この細胞は間葉系分化を *in vitro* で示し、CD73+CD90+Lineage- の表面マーカーを有しており、MSC として妥当な細胞であることが確認された (図 2)。

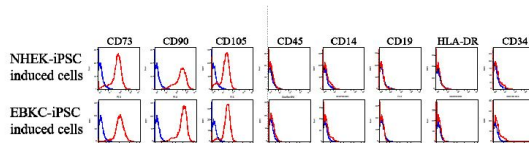


図 2 健康人 iPS 細胞および EB 患者 iPS 細胞から樹立した MSC のフローサイト解析

また、各分化段階の細胞から mRNA を抽出し、各細胞に特異性の高い遺伝子発現を RT-PCR で確認したところ、矛盾しない結果が得られ、また、別の段階の細胞が混在している可能性も否定された。さらに、マイクロアレイ解析により骨髄由来 MSC と同様の遺伝子プロファイルを有していること、iPS から誘導した MSC は骨髄由来 MSC と比較して VII 型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) を発現しやすい可能性が示唆された (図 3)。

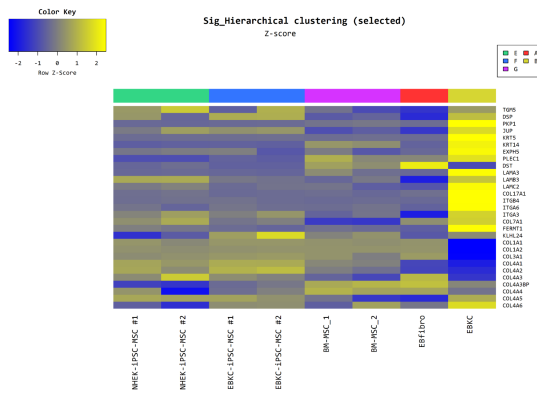


図3 各樹立細胞の皮膚関連遺伝子発現解析

次に、ヒト細胞が生着し異種移植実験が可能な免疫不全 scid マウスの背部に全層創傷を作成し、上記 MSC を局所注射、および経静脈投与したところ、前者で5匹中3匹、後者で5匹中3匹に創傷治癒部においてヒトVII型コラーゲンの発現が確認された(図4)。一方で、ヒトHLA染色やヒトゴルジ体染色、およびRT-PCR解析において、投与14日後の創傷治癒部においてヒト由来細胞は検出されなかった。

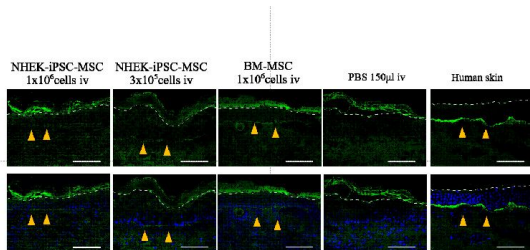


図4 健康人 iPS 細胞から誘導した MSC を scid マウスに全身投与したところ、創傷治癒部でヒトVII型コラーゲンの発現が確認された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Matsumura W, Fujita Y, Nakayama C, Shinkuma S, Suzuki S, Nomura T, Abe R, Shimizu H:

Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes.

J Dermatol Sci 89: 263–271, 2018.

doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.017.

(査読有)

[学会発表](計4件)

Chihiro Nakayama.

The development of mesenchymal stem/stromal cells from keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs).

The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017年12月15-17日, 高知市文化プラザがるぼーと(高知県高知市).

Wakana Matsumura.

Establishment of keratinocytes derived transgene-free induced pluripotent stem cells from recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients.

Asia-Pacific Combined Dermatology Research 2016 Conference. 2016年8月25-28日, Noosa Sheraton (Noosa, Australia).

Yasuyuki Fujita.

Clinical management and experimental findings in epidermolysis bullosa.

Asia-Pacific Combined Dermatology Research 2016 Conference. 2016年8月25-28日, Noosa Sheraton (Noosa, Australia).

Wakana Matsumura.

Generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from keratinocytes of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients.

The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015年12月11-13日, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 靖幸 (FUJITA YASUYUKI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 80374437

(2)研究分担者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)  
北海道大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 00146672

乃村 俊史 (NOMURA TOSHIFUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：50399911

夏賀 健 (NATSUGA KEN)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：70645457

(3)研究協力者

松村若菜 (MATSUMURA WAKANA)  
北海道大学・大学院医学院・大学院生

中山ちひろ (NAKAYAMA CHIHIRO)  
北海道大学・大学院医学院・大学院生