

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09759

研究課題名(和文) フィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響についてヒトiPS細胞を利用する試み

研究課題名(英文) Examination of 'true' meanings of filaggrin mutation in human epidermal keratinocytes.

研究代表者

井川 健 (IGAWA, KEN)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：00372441

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)：我々が確立しているシステムとゲノム編集技術を利用した遺伝子変異挿入を組み合わせると、他の遺伝子背景は同じで、標的の遺伝子、ここではフィラグリン遺伝子を選択したが、その変異があるかどうかのみに違いのある、一組のiPS細胞を得ることができる。この一組のiPS細胞をこれまでに確立した方法に従って表皮角化細胞へ分化させることによって、はじめて、フィラグリン遺伝子の変異のみに違いがあり、他はすべて同じ、という表皮角化細胞を得ることができる。

この一組の表皮角化細胞を比較検討することによって、フィラグリン遺伝子の変異が表皮角化細胞の振る舞いに与える影響を、本当の意味で詳細に検討することができることになる。

研究成果の概要(英文)：With our established systems of obtaining iKCs from hiPSCs and new technology of programmable nucleases, especially CRISPR/Cas9 system, we tried to clarify the precise effects of filaggrin gene (FLG) mutations in keratinocytes. A guide RNA that targeted appropriate site of human FLG was designed by web-based tool and cloning into the backbone vector of CRISPR/Cas9 (hFLG-CRISPR/Cas9). We transfected hFLG-CRISPR/Cas9 into hiPSCs and obtained the several clones of hiPSCs which possessed random mutations in FLG. Then, original hiPSC and FLG-mutated hiPSCs were differentiated into epidermal keratinocytes using our established protocols and we obtained the normal iKCs and FLG-mutated iKCs. Under this condition, we can compare the phenotypes of normal and FLG-mutated iKCs of the same genetic background.

Thus, the results obtained from this system should be "true" meanings of FLG mutation in keratinocytes and should be important information for the understanding of AD pathogenesis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：iPS細胞 アトピー性皮膚炎 フィラグリン ゲノム編集 表皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は慢性に経過する炎症性皮膚疾患としてよく知られているが、難治であることもあり、常にその病態メカニズムの解明、治療法の開発の対象となっている疾患である。近年、このアトピー性皮膚炎の少なくない population において、フィラグリン遺伝子の変異が見いだされる (10% ~ 30%) ことが報告されている。フィラグリンが皮膚のバリア機能を構成するタンパク質の一つであることから、この遺伝子の変異とアトピー性皮膚炎の発症には大きな意味合いがあるとされており、そのことについて様々な研究がなされている。しかしながら、その遺伝子に異常があることと、個々の細胞 (ここでは標的となる細胞は表皮角化細胞である) のふるまいに異常がみられるのかどうか、ということ、を、本当の意味で詳細に検討することについては、これまで検証できるシステムがなく、行われていなかった。

ところで、2006年に京大の山中らによって、iPS細胞の確立が報告されて以降、また、2012年に山中らがこの業績によってノーベル賞を受賞して以降、このシステムを利用した研究は驚くべきスピードで発展しており、また、そのシステムを臨床に応用しようとする試みは世界中で進行している。そのような中で、我々も、リプログラミング因子を、トランスポゾンベクターを利用して細胞に導入し、ヒト iPS 細胞を作製することに成功している。また、そのヒト iPS 細胞を、表皮角化細胞に分化させ、さらには誘導された表皮角化細胞を *in vitro* において重層化させ、再構成表皮類似の構造を作ることも可能としている。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、我々が確立したヒト iPS 細胞作製から表皮角化細胞誘導、再構成表皮類似構造の作製というシステムと、遺伝子改変技術を組み合わせ、フィラグリン遺伝

子変異があることによる表皮角化細胞の機能に関して、様々な外来性の刺激 (炎症性刺激や感染症関連の刺激など) に対する反応性への影響という面から、詳細に検討することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞において keratin 遺伝子に eGFP 遺伝子をノックインする

現状で確立されている iPS 細胞から表皮角化細胞誘導システムは、未だ改善の余地がある。本研究においては、表皮角化細胞への分化誘導を厳密にチェックしながら研究を遂行していくことを考え、ヒトの iPS 細胞において、内在性の K5 あるいは K14 遺伝子に、インフレームで eGFP 遺伝子をノックインした。この際には、人工ヌクレアーゼ (TALENs) を利用した。

(2) ヒト iPS 細胞におけるフィラグリン遺伝子のターゲティング

このためには、ヒト iPS 細胞において、ある程度の自在性をもって、遺伝子変異を導入するシステムの確立が必須である。ヒト ES 細胞 / iPS 細胞における遺伝子改変は、マウス ES 細胞 / iPS 細胞におけるそれに比して困難であるとされていたが、近年の技術の進歩により、人工ヌクレアーゼを利用することによって、比較的自在に行うことができるようになってきている (ゲノム編集)。本研究においては CRISPR/Cas9 を利用して遺伝子改変を行った。

導入する変異は、本来は、実際のアトピー性皮膚炎患者でみられるフィラグリン遺伝子変異をそのまま導入するべきであるが、システムの確立も同時並行でおこなう必要もあり、また、黒白はっきりとした結果を得ることも考えて、まずはフィラグリン遺伝子をノックアウトすることを目的とした。

フィラグリン遺伝子において、設定した標的配列を認識するガイド配列を作製し、CRISPR/Cas9発現ベクターにクローニングする。このベクターをヒトiPS細胞に導入し、DNAの2重鎖切断後のnon homologous end joining (NHEJ)を利用したランダムな変異挿入がなされたヒトiPS細胞を採取してくる。

(3) 表皮角化細胞への分化プロトコールの再確認

このようにしてフィラグリン遺伝子に変異を導入した(ノックアウトした)ヒトiPS細胞を、これまでに確立したプロトコールに従って表皮角化細胞に分化させる。さらには、変異を導入していないオリジナルのiPS細胞も表皮角化細胞へ分化させ、この二つの表皮角化細胞をもって互いの差異を検討する。近年、表皮角化細胞への分化プロトコールは我々も含めて確立されたと考えられていたが、もう一度そのプロトコールについて検討、確認を行うこととした。

(4) ヒトiPS細胞由来の線維芽細胞の誘導

確立したヒトiPS細胞から、線維芽細胞を誘導した。既に報告されている方法を参照にして作製した。

(5) ヒトiPS細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞を利用した3次元培養皮膚モデルの作製

ヒトiPS細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞(以前に確立したもの)を利用して、3次元培養皮膚モデル作製を行った。カルチャーインサートにまず分化誘導された線維芽細胞を播種し、数日培養を行う。培養液を変更し、線維芽細胞が重層し、真皮部分を形成す

るようにする。その後、真皮部分の上部にiPS細胞から誘導された表皮角化細胞を播種し、さらに培養液を変更。数日培養後、表面を空気に暴露し、角化細胞の重層と角化を促した。

4. 研究成果

(1) ヒトiPS細胞においてkeratin遺伝子にeGFP遺伝子をノックインする

TALENsを用いておこなった。スクリーニングでGFPが理想的な位置に挿入されたiPS細胞が数クローン確認された。本iPS細胞をプロトコールに従って表皮角化細胞に分化させると、GFPの蛍光が確認された。

(2) ヒトiPS細胞におけるフィラグリン遺伝子のターゲティング

トランスポゾンシステムを利用して作成したヒトiPS細胞において、CRISPR/Cas9のシステムを使うことによって、フィラグリン遺伝子にヘテロで欠失をもつものを数種類樹立した。iPS細胞の状態においては、形態的な変化はみられない。

(3) 表皮角化細胞への分化プロトコールの再確認

これまでに我々を含めて報告にある表皮角化細胞分化プロトコールに従って、ヒトiPS細胞を分化させたところ、ことごとく失敗、という結果になった。そのため、ヒトiPS細胞から表皮角化細胞を誘導するプロトコールについて再確認を行った。以前確立したプロトコールを改変して(詳細は省く)検討したところ、得られた細胞においては、表皮角化細胞の遺伝子発現が確認された。少なくとも表皮角化細胞の系に分化していることを確認した。ただし、このプロトコールは、以前のプロトコールの半分の日程であり(2週間程度)それ以上の継続培養を続けることが不可能であり、さらに、継代も不可能であ

った。

(4) ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞の誘導

ヒト iPS 細胞から、すでに報告されている方法により線維芽細胞(様細胞)を誘導することができた。

(5) ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞を利用した3次元培養皮膚モデルの作製

以前に、すでにプロトコール(フル)によって分化誘導し、保存しておいた表皮角化細胞と、今回、誘導した線維芽細胞(様細胞)を利用して、真皮様構造の上に、重層化した表皮様構造をもつ構造物を作製することに成功した。

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 0件)

[学会発表](計 4件)

井川 健 iPS細胞の基礎と臨床
第117回日本皮膚科学会総会 2018

Igawa K A trial to clarify the effect of the filaggrin gene mutation to keratinocytes biology by using CRISPR/Cas9 system and human induced pluripotent stem cells.

The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2016

Igawa K A trial to clarify the effect of the filaggrin gene mutation to keratinocytes biology by using CRISPR/Cas9 system and human induced pluripotent stem cells. European Society for Dermatological Research 2015

Igawa K REMOVAL OF REPROGRAMMING TRANSGENES IMPROVES THE TISSUE RECONSTITUTION POTENTIAL OF KERATINOCYTES GENERATED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. World Congress of Dermatology 2015

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 健 (IGAWA, KEN)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00372441