

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17317

研究課題名(和文) 羊水由来iPS細胞を用いた体表欠損の治療法の開発-脊髄髄膜瘤・腹壁破裂への応用-

研究課題名(英文) Fetal therapy model for fetal abnormal body defects using amniotic fluid-derived iPS cells -application to myelomeningocele and gastroschisis-

研究代表者

田沼 有希子(Tanuma, Akiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：40595328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脊髄髄膜瘤や腹壁破裂といった胎児の体表が欠損し臓器障害を引き起こす疾患に対する治療法を開発するために、ヒト羊水中の細胞から樹立したiPS細胞に着目した。人工皮膚を移植する技術を確認するため、羊水由来iPS細胞を用いて表皮を構成する細胞であるケラチノサイトに分化誘導した。iPS細胞から分化誘導した細胞は、培養過程でケラチノサイトと形態の異なる細胞も増殖する。より機能的なケラチノサイトを維持するために、培養方法を改良した。このケラチノサイトを3次元培養することで積層化した人工皮膚を作製し、表皮特有の層構造を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

罹患した胎児の羊水中の細胞から樹立したiPS細胞は胎児にとって自己であり、そこから特定の細胞に分化誘導し移植片を作製する技術を開発することは、胎児治療の進展に大きく貢献するものである。本研究では、iPS細胞由来ケラチノサイトを選択的に継代し機能的なケラチノサイトを維持する培養方法を開発し、人工皮膚を作製した。今後、この人工皮膚の患部への生着や胎児の成長に応じた移植片の変化を胎児モデルを用いて検証し、ヒトへの臨床応用につなげていく。

研究成果の概要(英文)：This study focused on amniotic fluid-derived iPS cells in order to develop a fetal therapy for fetal diseases such as myelomeningocele and gastroschisis, which cause organ damage due to a defect in the fetal body surface. To develop a technique for transplanting artificial skin, amniotic fluid-derived iPS cells were induced to differentiate into keratinocytes, which are cells that constitute the epidermis. After long-term cultivation, differentiated cell cultures contained both keratinocytes and non-keratinocytes. To maintain functional keratinocytes, the culture method was improved. The multilayered artificial skin was produced by three-dimensional culture of the keratinocytes derived from iPS cells, which was confirmed to have a layer structure specific to epidermis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：iPS細胞 分化誘導 ケラチノサイト 三次元培養 人工皮膚 胎児治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎児腹壁破裂や脊髄髄膜瘤といった体表を欠損する胎児形態異常は、臓器が羊水に露出しており、胎児期から進行性の臓器障害をきたす。従来、このような胎児疾患に対し、妊娠中は経過観察にとどまり出生直後に修復術を行っていた。その後、欧米では胎児期の修復手術が施行されるようになり一定の成果を得ているが、子宮内での胎児手術は子宮の切開創が大きくなるを得ず、早産や破水、子宮破裂のリスクの増加による母体への侵襲が問題となり、ヒトでの臨床研究や臨床応用の実現を困難にしている。一方、日本ではヒトの皮膚組織から作製した自家培養表皮が臨床応用されている。重症熱傷や先天性巨大色素性母斑に保険収載されているが、高価であること、作製に時間を要することが課題である。胎児治療が検討される症例において、羊水は胎児に侵襲なく採取可能であり、羊水中に存在する間葉系幹細胞は初期化率が高いという特徴があり、iPS 細胞を樹立するのに適した細胞の一つである。申請者らは、ヒト羊水中の細胞から iPS 細胞を樹立し分化誘導したケラチノサイトから皮膚組織を作製し、脊髄髄膜瘤の動物モデルに移植を行った (Kajiwara K, et al. *Stem Cell Reports*, 2017)。この研究での成果は、

羊水由来 iPS 細胞から機能的な培養表皮を作製したこと、毎回一定の基準を満たす脊髄髄膜瘤モデルが再現できたこと、移植片も機能的に生着していたことから、今後の脊髄髄膜瘤の胎児治療への大きな一歩となった。一方で、脊髄髄膜瘤のモデルラットはレチノイン酸を内服しているため、正常より小さく生後約 1 時間で死亡するため、この動物モデルを用いた長期予後や神経学的所見の改善を評価することはできないという課題がある。さらに 3D 培養で作製した皮膚をヒトへ応用できるように改良する必要がある。そこで本研究では、羊水中の細胞から樹立した iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトの培養方法を改良することでより機能的な培養表皮を作製し、胎児の臓器露出部を低侵襲に被覆する技術を開発することで児の予後改善を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、羊水由来 iPS 細胞から作製する培養表皮の作製効率と機能性を向上させること、腹壁欠損や脊髄髄膜瘤などの体表が欠損した胎児動物モデルに移植し、生後の発育や予後などを評価することで、体表欠損を認める胎児に対する治療の実現を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ケラチノサイトへの分化誘導

羊水中に存在する細胞から樹立した iPS 細胞を継代翌日からレチノイン酸と bone morphogenetic protein 4 (BMP4) を添加した Defined keratinocyte serum free medium (DKSFM) で 4 日間培養した。Day 5 より epithelial growth factor (EGF) を添加した DKSFM に培地交換し、その後 10 日間培養しケラチノサイトへ分化誘導を行った。Day 14 にケラチノサイト様の細胞を確認後、type I collagen とフィブロネクチンをコートした培養皿に継代した。継代は  $0.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。37℃ で 15 分間インキュベートし細胞が培養皿へ接着したことを確認し、EGF と Rho kinase inhibitor を添加した DKSFM に培地交換することで、早期に培養皿に接着した細胞を選択的に継代培養した。

#### (2) iPS 細胞由来ケラチノサイトの培養法の比較検討

移植用 3D 皮膚を作製するために、iPS 細胞由来ケラチノサイトをさらに分化させ、長期に継代培養することを目的として、feeder layer 法と、血清及び Y-27632 を添加した ESTEM-EP medium

を用いた培養方法を導入した。

### (3) Dispase を用いたケラチノサイトの純化处理

継代前に dispase 処理を行い、培養皿から細胞が剥離するまでの時間差を利用してケラチノサイトを選択的に培養した。10 mg/mL dispase を添加し 5-8 分間 37 °C でインキュベートした。ケラチノサイトと形態が異なる細胞（非ケラチノサイト）が剥離し始めたら、フィーダー細胞と共に培養皿から除去した。顕微鏡で積層化したケラチノサイト様のコロニーが培養皿に接着していることを確認し、DPBS で洗浄後 trypsin-EDTA solution で 3 分間 37 °C でインキュベートした。剥離した細胞を回収し、feeder を播種した新たな培養皿に継代した。

### (4) 3D 培養

ヒト新生児由来不死化線維芽細胞 (human foreskin fibroblast 2: HFF2) と type I collagen を混合し、10% FBS を添加した DMEM で 1 週間培養することで代用真皮を作製した。この代用真皮をトランスインサート上に移し、代用真皮上に設置したクローニングリング内に iPS 細胞由来ケラチノサイトを  $1 \times 10^6$  cells / リングで播種し、2 週間空気曝露法で培養した。この間、培地は EGF と Y-27632 を添加した DKSFM と、10% FBS を添加した DMEM を 1:1 で混合し 0.9 mM  $Ca^{2+}$  に調整して使用した。

## 4. 研究成果

### (1) iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導

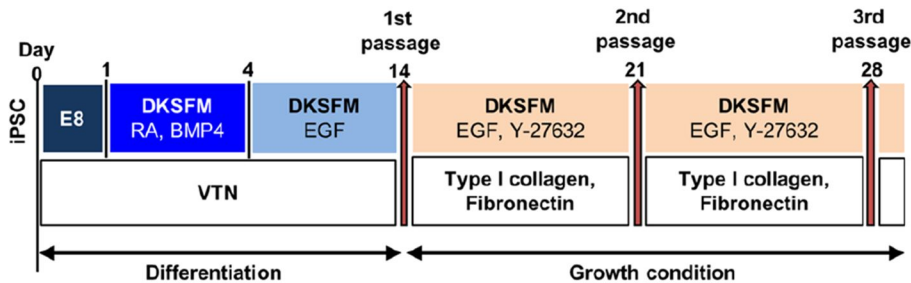


図 1. ケラチノサイトの分化誘導及びその後の培養プロトコール（培養方法 A）

DKSFM, defined keratinocyte serum-free medium; RA, retinoic acid; BMP4, bone morphogenetic protein 4; VTN, vitronectin; E8, Essential 8 medium; EGF, epidermal growth factor

iPS 細胞から上記プロトコールで分化誘導した細胞は、共に正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) 様の形態を示した。ケラチノサイトに分化誘導した細胞における蛍光免疫染色では、上皮系マーカー (KERATIN 14 (KRT14), KRT10, involucrin, loricrin) の発現を確認した。遺伝子発現解析では、*OCT3/4* および *NANOG* の発現が有意に抑制された。また iPS 細胞由来ケラチノサイトの継代を重ねることで、基底細胞マーカー (*KRT14*) と上皮前駆細胞マーカー (*TP63*) の発現量が増加した。

### (2) iPS 細胞由来ケラチノサイトの培養方法の検討

分化誘導後のケラチノサイトは、培養方法 A で継代を重ねることで表皮幹細胞の機能を有する細胞が増加したが、第 4, 5 継代で増殖が停止した。移植片を作製するためには、iPS 細胞由来ケラチノサイトを安定的に維持することが必要であることから、より長期に培養可能で細胞シ

ートを作製できる条件へと培養方法を変更した(図2)。数種類の feeder と培地条件を検討した結果、feeder の種類によるケラチノサイトの増殖の差は少なからずあるものの、feeder はケラチノサイトとしての機能を促進しつつ長期培養を可能とすることが明らかとなった。最終的にマウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) をフィーダーとし、血清と Y-27632 を添加した ESTEM-EP medium (培養方法 B) に変更したところ、細胞はコロニーを形成しながら増殖能力を回復し、160 日以上に渡り培養することができた。

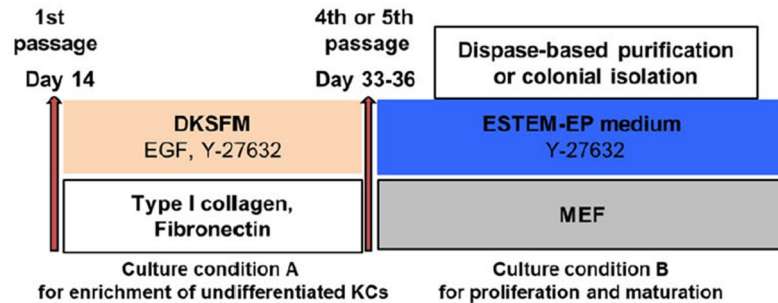


図 2. iPS 細胞由来ケラチノサイトの培養方法 A から培養方法 B への変更

DKFSM, defined keratinocyte serum-free medium; EGF, epidermal growth factor; KCs, keratinocytes; MEF, mouse embryonic fibroblast

### (3) iPS 細胞由来ケラチノサイトの選択的培養

iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトは、培養過程でケラチノサイトとは形態の異なる細胞 (非ケラチノサイト様細胞) を含むことが少なくない。そこで dispase 処理を行い、ケラチノサイト様細胞を選択的に継代した。これにより表皮幹細胞で発現する *KRT14* の発現量が継代ごとに増加し、終末分化マーカーである *involucrin* の発現量の増加は抑制された (図 3A)。また、この選択的培養を行った細胞を用いて細胞シートを作製することができた (図 3B)。



図 3A. iPS 細胞由来ケラチノサイトにおける選択的培養後の遺伝子発現の推移 (RT-qPCR)

P, passage

図 3B. iPS 細胞由来ケラチノサイトで作製した細胞シート

### (4) 3D 皮膚の作製と機能評価

これまでの成果から、iPS 細胞から分化誘導した細胞は、選択的にケラチノサイトを継代することでケラチノサイトの細胞シートを形成した。この細胞を用いて移植片を作製するために、3D 培養を用いて人工皮膚を作製した (図 4)。免疫組織化学染色では、基底細胞マーカー (*KRT14*)、上皮分化マーカー (*KRT10*)、基底膜マーカー (*integrin β4*)、有棘層および顆粒層マーカー (*involucrin*、*loricrin*) が層別に発現し、表皮様構造を示した。

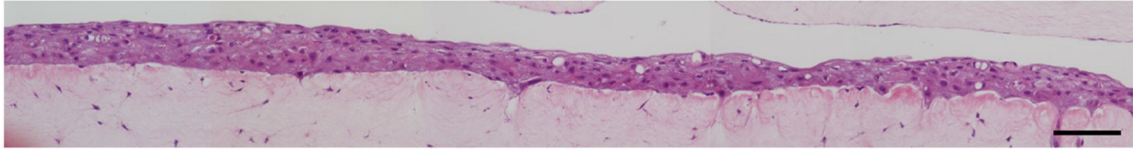


図 4. iPS 細胞由来ケラチノサイトから作製した 3D 皮膚の組織切片 (HE 染色)

Scale bars, 200  $\mu\text{m}$ .

本研究では、iPS 細胞からケラチノサイトへ分化誘導した細胞を 160 日以上に渡り培養することができた。またケラチノサイトの選択的培養を併用することで効率的に人工皮膚を作製し、表皮特有の層構造を確認した。羊水中の細胞から樹立した iPS 細胞は胎児にとって自己であり、そこから特定の細胞に分化誘導し移植片を作製する技術を開発することは、胎児治療の進展に大きく貢献するものである。今後、動物モデルを用いて移植片を胎児に移植した際の生着率や、胎児の発育に応じた移植片の変化を検証し、ヒトでの臨床応用につなげていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanuma-Takahashi Akiko, Inoue Momoko, Kajiwara Kazuhiro, Takagi Ryo, Yamaguchi Ayumi, Samura Osamu, Akutsu Hidenori, Sago Haruhiko, Kiyono Tohru, Okamoto Aikou, Umezawa Akihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Restoration of keratinocytic phenotypes in autonomous trisomy-rescued cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-021-02448-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Ryo, Tanuma-Takahashi Akiko, Akiyama Saeko, Kaneko Wakana, Miura Chika, Yamato Masayuki, Shimizu Tatsuya, Umezawa Akihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Laminin-511-derived recombinant fragment and Rho kinase inhibitor Y-27632 facilitate serial cultivation of keratinocytes differentiated from human embryonic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 242 ~ 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------