

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670778

研究課題名(和文)ケロイド患者由来iPS細胞の樹立 - 新たな創薬の開発を目指して -

研究課題名(英文) Establishment of iPS cells derived from keloid patients for the purpose of drug discovery

研究代表者

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80343606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ケロイド患者の真皮由来線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、線維芽細胞へと分化誘導することで、ケロイド線維芽細胞の特性を有する細胞を作製し、発生メカニズム及び疾患病態を明らかにすることである。しかしながら、研究を通じ、ケロイド患者由来線維芽細胞から、iPS細胞を樹立することはできず、結果として、ケロイド線維芽細胞からiPS細胞を効率的に樹立し、線維芽細胞へと分化させる手法確立までに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish iPS cells from dermal derived fibroblasts of keloid patients and induce differentiation into keloid fibroblasts to investigate mechanisms of development and disease pathology of keloid. Through this study, however, iPS cells were not established from keloid patient-derived fibroblasts, and as a result, establishment of a method to efficiently establish iPS cells from keloid fibroblasts and to differentiate into fibroblasts could not be established.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ケロイド iPS細胞 創薬

1. 研究開始当初の背景

ケロイドとは、外傷や手術、時にはニキビや虫刺され、BCG 接種のような軽微な刺激がきっかけとなり、皮膚真皮網状層内における硝子化した膠原線維の蓄積、血管や神経線維の増勢によって増殖性に大きく盛り上がる疾患で、一般的には炎症を伴った癒痕と捉えられている。しかしながら同一の性質を有する肥厚性癒痕とは臨床像が大きく異なり、ケロイドにおいては元々存在していた創傷部位を超えて発赤浸潤傾向を示し、あたかも悪性腫瘍が増殖するかのごとく周辺の健常皮膚まで拡大し、耐え難い痛みや搔痒感などの臨床症状を有するなど、罹患患者の生活の質を著しく低下させる難治性疾患である。そしてその傾向は患者が高齢となっても継続することも多い。疫学的にも黒色人種、ついで黄色人種の順で有色人種に発生率が高いと言われており、黄色人種である我々日本人にとっても根本的な治療手段の開発が望まれるところである。

このように炎症性良性疾患でありながら臨床的には悪性腫瘍的性質を有するケロイドの根本的な治療法は、長年にわたる研究の蓄積があるにも関わらずいまだ確立されていない。現状ではアレルギー薬の一つであり、局所の肥満細胞からの脱顆粒を抑制する効果のあるトラニラストの内服療法、抗炎症作用を有するステロイド軟膏の外用や ODT 治療、あるいはケロイド組織内への直接ステロイド注入投与、シリコンシートなどによる保湿や物理的な圧迫療法などの保存的治療に加え、隆起したケロイド組織とその周辺に認められる発赤浸潤部位を含めた外科的切除手術やそれと併用することでケロイドの局所再発を有意に抑制することが知られている電子線照射治療などが開発されてきて、一定の治療成績を得るようにはなっているものの、いずれの手法においても根治させるには未だ難渋しているのが実情である。これら以外にも 5-FU 軟膏、液体窒素療法なども報告されているがエビデンスを得るには至っていない。

ケロイドの発生原因としてはこれまでもいくつかの因子が報告されており、遺伝因子としては日本人におけるゲノム上の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) の異常が報告されている。また transforming growth factor- β (TGF- β) や interleukin-6 (IL-6) などの線維化疾患、炎症性疾患で発現する遺伝子・タンパク質、活性化されるシグナル伝達系の多くが確認される。更には全身因子としては妊娠、高血圧などの要因、血中サイトカインの変化などによって癒痕の炎症が増強するとも言われている。局所因子としては創部にかかる物理的緊張がその成因に深く関与していると言われており、近年の細胞内機械シグナル伝達経路 (mechanosignaling pathway) に関する基礎研究によっても立証され始めている。ま

たケロイドの発症に関連する 4 つの 遺伝領域 (3 番染色体 FOXL2、15 番染色体 NEDD4、1 番及び 3 番染色体上の 2 つの遺伝領域) が発見され (Nat Genet, 2010)、ケロイドの発生機序の解明が進みつつある。

しかしながらケロイドの研究が進まない最も大きな理由の一つが、ケロイドはヒトにしかできないという点である。DNA が 98.5% ヒトと相同であるとされるサルでさえも見つかっていない。マウス、ラットなどのげっ歯類においても自然発生あるいは人為的な作成が困難であるため、動物実験モデルが存在しない。その結果として有効な治療手段の開発の妨げとなっている。

京都大学 iPS 細胞研究所長の山中伸弥博士によって発見・開発された人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells: iPS 細胞) は自家由来あるいは他家由来を問わず、多くの難治性疾患に対する再生医学的アプローチの際に極めて有用で、既に我が国においても網膜色素変性症治療目的に iPS 細胞より作成された網膜色素上皮細胞シート移植が実施され良好な結果を得ているところである。このような再生医療に役立つだけでなく、疾患特異的 iPS 細胞を用いて疾患の発生メカニズムや原因となる因子の特定を行い、この過程で生じる異常経過を明らかにすることで病状を未然に防ぐ、あるいは症状の進行を遅らせるなどの治療開発、更にはこれらが発展して創薬研究への道が開かれるなど、疾患特異的 iPS 細胞を用いた医学研究の発展には大いに期待が高まっている。

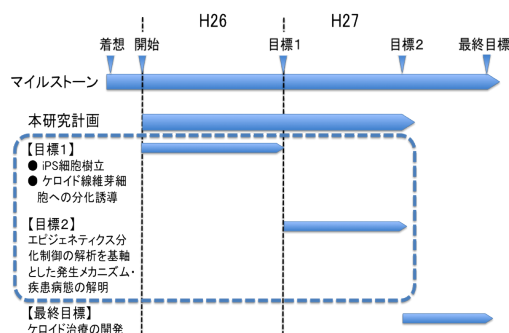
そこで申請者は、動物実験が困難なケロイド研究を前進させるため、ケロイド患者自身から獲得した細胞から iPS 細胞を樹立し線維芽細胞へ分化させてケロイド線維芽細胞を作製する着想に至った。そしてそのケロイド患者由来 iPS 細胞から線維芽細胞への分化誘導の過程において、非ケロイド患者由来線維芽細胞と異なる分子生物学的特性を見出すことにより、これまでとは全く異なるケロイドの治療方法の開発あるいは創薬研究の一助となるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイド患者から直接得られる線維芽細胞を用いて、一旦 iPS 細胞を樹立し、この iPS 細胞を再度皮膚線維芽細胞へと分化誘導させる過程において、非ケロイド患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化誘導された正常皮膚線維芽細胞と比較してどのような遺伝子発現の変化を来すのか、分子生物学的にどの段階でどのような相違を来してくるのかについて、分化の比較的初期の段階で発見することにより、ケロイド発生のメカニズムおよびエピジェネティクス制御を介した疾患病態の解明に取り組む。

そして、これらの分子生物学的特性を解明することが、ケロイドの発生を未然に防ぐこ

と、すなわちケロイド発生の予防に直接的に結びつく可能性があり、さらにケロイド患者の根治的治療にもつながると考え、将来の新たな創薬の開発に結び付けることを最終ゴールと捉える。



研究計画当初のマイルストーン

3. 研究の方法

当初予定していた研究の方法は以下のとおりである。

(1) ケロイド患者由来真皮線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

ケロイド患者の同意のもと、摘出検体にわずかに付着した正常真皮およびケロイド組織由来真皮を獲得し explant 法によって得られた真皮線維芽細胞を回収し iPS 細胞の樹立実験に供することとした。また比較実験を目的として、同様の手法により、もしくは既にセルラインとして確立されている非ケロイド患者由来真皮線維芽細胞も同様に用いて iPS 細胞の作製を計画した。iPS 細胞の樹立方法はエピソードベクターを用いたヒト iPS 細胞樹立方法(京都大学 iPS 細胞研究所, Ver. 1, 2011 年 4 月 4 日)を参考とし、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソードベクターを使用し、オンフィーダー培養を実施することとした。具体的方法として、Electroporation により、ケロイド患者由来真皮線維芽細胞にプラスミドを導入し、培養 7 日後にフィーダー細胞上での培養を開始、フィーダー細胞上での培養開始約 3~4 週間後、肉眼で確認できるコロニーを剥がし、小塊に崩した後、オンフィーダーで培養を継続することとした。

(2) 樹立された iPS 細胞の線維芽細胞への分化誘導

これまでに iPS 細胞を線維芽細胞へと分化誘導するための確立された方法はなく、間葉系幹細胞から線維芽細胞への分化誘導を試みる方法として CTGF(Connective Tissue Growth Factor)や bFGF(basic fibroblast growth factor)が関与しているとの報告がある(J Clin Invest, 2010, Int J Exp Pathol, 2014)。従ってこれらを参考にしながら得られたケロイド患者真皮線維芽細胞由来 iPS 細胞ならびに非ケロイド患者真皮線維芽細胞

由来 iPS 細胞を分化誘導し、ケロイドの発症に関連すると考えられている遺伝領域(3 番染色体 FOXL2、15 番染色体 NEDD4、1 番及び 3 番染色体上の 2 つの遺伝領域)の発現を RT-PCR を用いて解析するなどして裏付けることとした。

(3) iPS 細胞より分化誘導された線維芽細胞に対する病態解析

ケロイド患者真皮線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化誘導させた線維芽細胞がケロイドの疾患病態の解析に資する細胞かどうかを評価するため、エピジェネティクス分化制御の解析を行い、ケロイド線維芽細胞及び健常人由来線維芽細胞と比較解析することとした。具体的手法として、ケロイド患者真皮線維芽細胞由来 iPS 細胞ならびに非ケロイド患者真皮線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化誘導させた線維芽細胞、ケロイド線維芽細胞及び健常人由来線維芽細胞それぞれからメチル化 DNA を濃縮し、得られた DNA を鋳型とし、リアルタイム PCR を実施する。さらにマイクロアレイ解析として、濃縮物の whole genome amplification を行い、定法に従いラベリングする。コントロールとして濃縮前の断片化ゲノムを同様の手法にてラベリングする。その後、濃縮前/後のラベリングした DNA を DNA チップ上で競合ハイブリさせる。データ解析により、これまでに報告されているケロイド関連遺伝子の発現量を比較評価するとともに、ケロイドに関わる新規遺伝子群の候補探索につなげていく。

4. 研究成果

(1) ケロイド患者由来真皮線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

研究開始後より当初の予測に反し、ケロイド治療を受ける患者数が十分に集まらず、中には感染を併発しているなど研究検体として供与するには相応しくないものも含まれたことから、やむを得ず途中で方針転換し、市販のケロイド線維芽細胞を入手して研究を進めることとした。また比較のための非ケロイド患者由来真皮線維芽細胞は、既に当研究室が保有しているものを使用することにした。

前述したエピソードベクターを用いたヒト iPS 細胞樹立プロトコルに従う形で樹立を進めたのだが、フィーダー細胞上での培養において安定した iPS 細胞様コロニーの作成が困難であった。そのため標準プロトコルに微修正をかけ、Electroporation によるプラスミド導入時における種々の段階での細胞インキュベーション時間の増加・短縮や各種溶液の新規作り変えなど試行錯誤を繰り返した。しかしながらそれでもコロニー形成効率を上げるには至らなかった。

一方でごく僅かながらに形成を認めたケロイド患者真皮線維芽細胞由来 iPS 細胞様コ

コロニーを回収し小塊となるまで崩して培養増殖を試みたものの、その後における均質なiPS細胞様の形態を再現することは極めて困難であった。この段階においても標準プロトコールに若干の改変を加え、コロニー塊の回収のタイミングや小塊とする際の崩し方の程度などを微修正したが、改善に乏しく、結果的にケロイド線維芽細胞を用いたiPS細胞の樹立には至らなかった。

そこで、iPS細胞の樹立手法の変更が必要と考え、ウィルスベクターを用いた手法を検討したが、研究期間内に代替手法を用いた実験計画を着手するまでには至らなかった。

従ってiPS細胞樹立後に計画をしていた(2)樹立されたiPS細胞の線維芽細胞への分化誘導実験、ならびに(3)iPS細胞より分化誘導された線維芽細胞に対する病態解析については残念ながら着手することが出来なかった。

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7件)

Huang C, Orbay H, Tobita M, Miyamoto M, Tabata Y, Hyakusoku H and Mizuno H Pro-apoptotic effect of control-released basic fibroblast growth factor on skin wound healing in a diabetic mouse model Wound Repair Regen 24: 65-74, 2016

Shingyochi Y, Orbay H and Mizuno H Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration Expert Opinion on Biological Therapy 15: 1285-1292, 2015

Uysal AC, Tobita M, Hyakusoku H and Mizuno H The effect of bone-marrow-derived stem cells and adipose-derived stem cells on wound contraction and epithelization Adv Wound Care 3: 405-413, 2014

林 礼人、田中里佳、飛田護邦、西牟田ゆり、石原久子、吉澤秀和、水野博司 順天堂大学形成外科における癒痕・創傷治療研究の現状と展望 癒痕ケロイド治療ジャーナル 8: 22-27, 2014

水野博司 再生医療の実用化について 日本下肢救済・足病学会誌 6: 42-48, 2014

[学会発表](計11件)

松村耕治、梅山悠伊、市来やよい、櫛引俊宏、石原雅之、水野博司、石原美弥 ヒトiPS細胞の奇形腫を介したソーティングによる血管内皮細胞等の分化誘導細胞の単離 第16回日本再生医療学会総会(2017年 仙台)

金澤成行、藤原貴史、市堀涼子、谷川知子、富田興一、久保盾貴、田中里佳、水野博司、矢野健二、細川 互 アミノ酸(アルギニン)の線維芽細胞増殖作用 第46回日本創傷治癒学会(2016年 東京)

Mizuno H The role of stem cells and soluble factors in tissue repair/regeneration and anti-aging medicine Mae Fah Luang University International Conference 2016 & Kaleidoscope of Traditional and Complementary Medicine International Conference 2016 (Chiang Rai, Thailand, 2016)

門真起子、田中里佳、有田佳代、藤村聡、向後泰司、水野博司 細胞治療が担う創傷治癒の役割 第8回日本下肢救済・足病学会(2016年 東京)

水野博司 形成外科の最前線 - 基礎と臨床 - 第52回東部防衛衛生学会(2014年 横須賀)

[図書](計3件)

Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Orbay H, Fujimura J, Ono S, Kakudo N, Kusumoto K and Hyakusoku H (分担) Adipose-derived stem cells in regenerative medicine 「Principle of gender-specific medicine」 Editor: Legato MJ 2017; pp459-479, Elsevier, San Diego, CA

Mizuno H, Tobita M, Orbay H, Uysal AC and Lu F (分担) Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine 「Stem Cells and Cancer Stem Cells」 Editor: Hayat MA 12: pp165-174, 2014 Springer, New York, NY

[その他]

ホームページ:

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/keisei_geka/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 80343606

(2) 研究分担者

飛田 護邦 (TOBITA, Morikuni)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 10599038

(3) 研究協力者

大下 高志 (OHSITA, Takashi)
田島 聖士 (TAJIMA Satoshi)