

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19665

研究課題名(和文) 羊水由来iPS細胞を用いた新しい胎児治療モデルの創成

研究課題名(英文) Fetal therapy model using amniotic fluid-derived iPS cells

研究代表者

梶原 一紘 (Kazuhiro, Kajiwara)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40569521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は治療困難な胎児疾患の治療法を開発するためiPS細胞に着目した。iPS細胞の高い分化能力を用いることで羊水由来iPS細胞を角化能力を持ったケラチノサイトに分化誘導した。さらにケラチノサイトを3次元培養することで積層化した人工皮膚を作成することができた。このiPS細胞由来人工皮膚を胎児脊髄髄膜瘤モデルラットの妊娠中に移植したところ、皮膚の再生所見が得られた。これは低侵襲でかつ子宮内で成長する胎児に応用できる画期的治療法になり得る。現在はこのラットモデルの胎盤解析を行い、レチノイン酸と胎盤形成との関連を見出している。この結果を元にラットの生存期間が延長すればさらなる長期予後の検討が可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄髄膜瘤は皮膚や皮下組織が欠損するため脊髄が体表に露出し神経が障害される。iPS細胞は体の様々な細胞に分化する能力を持っている。我々はこの特徴を利用して、ヒト羊水から樹立されたiPS細胞をケラチノサイトに分化誘導した。さらにiPS細胞由来ケラチノサイトから人工皮膚を作成し、脊髄髄膜瘤ラットモデルに移植した。人工皮膚移植部では、ラットの皮膚が再生してくる所見が得られた。この結果から、羊水中であってもiPS細胞由来人工皮膚を移植することで脊髄髄膜瘤が治療できる可能性が見出された。これは侵襲が少なく、胎児にとって自分の細胞であることから胎児の成長に合わせた治療が可能になる画期的な治療法である。

研究成果の概要(英文)：We focused on iPS cells to develop novel treatments for fatal fetal diseases. By using the high differentiation ability of iPS cells, amniotic fluid-derived iPS cells successfully differentiated into functional keratinocytes with keratinizing ability. Furthermore, we could generate iPS cell-derived artificial skin with multilayered epidermis by three-dimensional culture. Then, we transplanted iPS cell-derived artificial skin into fetus of myelomeningocele rat model. Two days after transplantation, we detected elongation of rat epidermis at the skin defect site. Our treatment can become an innovative treatment that are minimally invasive and can apply to growing fetus in utero. Currently, we are performing placental analysis of the rat model and found the association between retinoic acid and placental development. Based on this result, we may improve the survival period of the rat model, leading to further analysis of long-term neurological prognosis.

研究分野：産婦人科

キーワード：iPS細胞 分化誘導 ケラチノサイト 3次元培養 人工皮膚 脊髄髄膜瘤 レチノイン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

脊髄髄膜瘤は神経管閉鎖不全によって脊髄周辺組織が欠損するため脊髄が外界に露出する先天性疾患である。生後に修復手術が行われるが、出生時にはすでに不可逆性の神経障害が存在する。Two hit theory が提唱されており、脊髄髄膜瘤の発生(1st hit)に続く子宮内での羊水による化学的障害と子宮壁との接触による物理的障害(2nd hit)が子宮内での進行性かつ不可逆的神経障害をきたし、歩行障害や膀胱直腸障害が生じる。また脳脊髄液の持続的な流出により、キアリ奇形および水頭症をきたし生命の危険が生じる可能性がある。このため胎児期の欠損部の修復手術が施行されるようになり、一定の治療効果を認めているが、子宮内での胎児手術は子宮の切開創が大きくなるため早産や破水、子宮破裂のリスクの増加が問題となり、神経学的予後の改善が得られても早産による新生児の未熟性が治療成績を低下させている。このため、より低侵襲に髄液の漏出を防止でき、神経組織露出部を覆うことができる被覆材や代用組織の開発が今後の胎児手術の一番の目的となっている。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は羊水由来細胞から iPS 細胞を樹立しケラチノサイトに分化誘導することによって、胎児細胞由来の人工皮膚を作製し、これを脊髄髄膜瘤モデルラットの胎仔に移植することで人工皮膚による胎児治療の有効性を検討し、脊髄髄膜瘤の新たな胎児治療法を開発することとした。

#### 3. 研究の方法

##### 羊水由来細胞への遺伝子導入

継代が 3-4 回になった羊水由来細胞を回収し、 $6 \times 10^5$  個の細胞に対して、プラスミド 3 $\mu$ g (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL 各 1 $\mu$ g)を electroporation (Voltage: 1650 V、Width: 10 ms、Pulse Number: 3)で遺伝子導入した。遺伝子導入後の細胞はゼラチンコートをした 6well プレートに播種しインキュベーター (37°C、CO<sub>2</sub> 5%) で培養した。ES 細胞様のコロニーが確認されたら、コロニーをピックアップし継代した。

##### iPS 細胞のケラチノサイトへの分化誘導

樹立した iPS 細胞をビトロネクチン上で feeder free の状態で培養し、継代後よりレチノイン酸 1 $\mu$ M、及び Bone morphogenetic protein 4(BMP4) 10ng/ml を 4 日間添加することでケラチノサイト系列への分化誘導を行った。培地は Defined keratinocyte serum free medium (DKSFM)を用いた。4 日後より 20ng/ml の epithelial growth factor (EGF)を添加し、さらに 10 日間培養した。ケラチノサイト様の細胞を確認後、collagen type I 0.03 mg/ml とフィブロネクチン 0.01 mg/ml でコートされた培養皿にトリプシンを用いて継代した。継代後は DKSFM に 20ng/ml EGF と 10 $\mu$ M の Y-27632 を添加し、1 週間ごとに継代を行った。

##### iPS 細胞由来ケラチノサイトの 3D 培養

##### 脊髄髄膜瘤ラットの作成および胎児治療

妊娠 10 日目の SD ラットにレチノイン酸 60mg/kg を経口投与し、脊髄髄膜瘤ラット胎仔を作製した。妊娠 20 日にイソフルランで麻酔後に開腹手術を行い、子宮外から皮膚欠損部を確認し、同部の直上の子宮壁を切開した。切開は最小限にとどめ、同部位に 3D 培養した iPS 細胞由来ケラチノサイト(人工皮膚)を移植し、子宮壁を縫合した。移植 2 日後に帝王切開し、移植部の組織切片を作成した。

#### 4. 研究成果

## 羊水由来細胞の初代培養

双胎間輸血症候群及びダウン症候群の羊水由来細胞の初代培養によって、培養 6 日頃より線維芽細胞様の羊水由来細胞の接着が確認できた。羊水由来細胞は 6 日頃より cell cluster を形成し、約 10 日でコンフルエントになった。フローサイトメトリー解析では、既存の報告同様に間葉系のマーカーが陽性であり、造血系のマーカーは陰性であった

## 羊水由来 iPS 細胞の樹立

継代 3 回目の羊水由来細胞に対して遺伝子導入を行った。遺伝子導入翌日に EGFP で導入を確認し、17-40 日目より ES 細胞様のコロニーを確認し継代した。樹立効率は TTTS 患者由来羊水細胞(amniotic fluid cells derived from patient with TTTS: TTTS-AFC): 0.1%, ダウン症候群患者由来羊水細胞(amniotic fluid cells derived from patient with T21: T21-AFC): 0.4%であった。VTN で培養した feeder free の条件で iPS 細胞が樹立できたため以後の実験には feeder free の iPS 細胞を用いた。iPS 細胞の形態学的に状態を判断し、未分化状態が維持できる細胞株を選び、継代を続けた。

## iPS 細胞の特性解析

継代 5 回目以降で iPS 細胞(TTTS 及びダウン症候群由来の iPS 細胞を AF-TTTS-iPSC (iPSC derived from TTTS-AFC)及び AF-T21-iPSC(iPSC derived from T21-AFC)と表記する)の特性解析を行った。アルカリフォスファターゼ染色、免疫染色(OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81)で未分化マーカーの発現を確認した。またリアルタイム PCR 法を用いて未分化マーカー(OCT4, SOX2, NANOG, TERT, DNMT3B)の発現 (positive control はヒト ES 細胞(SEES-2)、negative control は羊水由来細胞)を確認した。さらに in vitro での分化多能性の評価のため胚様体の形成を行った。胚様体をマトリゲル上で 10 日間培養することで 3 胚葉 (AFP : 内胚葉、 SMA : 中胚葉、 Anti- III Tubulin : 外胚葉)への分化を確認した。さらに in vivo での分化多能性の評価のため、奇形腫形成実験を行い、HE 染色にて 3 胚葉の分化(神経上皮組織(外胚葉)、軟骨組織(中胚葉)、肝細胞様集団(内胚葉))を確認した。染色体検査では AF-TTTS-iPSC は正常核型であり AF-T21-iPSC は 21 番染色体がトリソミーであった。

## ケラチノサイトへの分化誘導法の確立

iPS 細胞由来ケラチノサイト(iPSC-derived keratinocytes: iPSC-KC)を効率的に作製するため、Retinoic acid (RA)と BMP4 を用いた 3 つの分化誘導法を比較した。プロトコール A と B は Direct differentiation 法であり、A と B は器材が異なっている。プロトコール C は胚様体経由法である。プロトコール A、B および C において、最初の継代後にケラチノサイト様細胞を認めたが、これらの細胞は増殖せず、さらなる継代に必要な iPSC-KC を得ることができなかった。そこでケラチノサイトの増殖を促進すると報告されている Y-27632(Rho キナーゼ阻害剤)を培地に添加した。Y-27632 の存在下で増殖させた iPSC-KC は細胞増殖が改善されたので、2 回継代した iPSC-KC を用いて分化誘導効率を比較した。表皮基底層のマーカーである Keratin 14 (KRT14)の免疫染色の比較の結果、KRT14 を発現している細胞はプロトコール A、B および C で 48.08%、39.24%、および 23.62%であり、

プロトコル A の分化誘導効率が高いことが分かった。この結果より、以後の検討はプロトコル A を用いて行った。

Y-27632 の添加によって iPSC-KC の細胞増殖は改善したが、継代に必要な細胞数を得るのに 2 週間以上を要し、KRT14 の遺伝子発現量も不十分であった。そこで、細胞増殖をさらに促進し KRT14 の発現を亢進させるため、epithelial growth factor (EGF) を培地に添加した。EGF と Y-27632 を添加した培地で培養した iPSC-KC は Y-27632 単独の場合と比較して細胞増殖(開始細胞数は  $1 \times 10^5$  /well)が著しく改善された。興味深いことに EGF 単独では iPSC-KC は増殖しなかったことから、EGF と Y-27632 の両方の存在が iPSC-KC の細胞増殖にとって重要であることが分かった。培地の比較では Keratinocyte serum free medium (KFSM) と Defined keratinocytes serum free medium (DKFSM) の比較を行い、KFSM でより高い iPSC-KC の細胞増殖を示した。しかし KFSM は牛由来下垂体抽出物を含むため分化誘導に大きな影響を与えることから組成に動物由来成分を含まない DKFSM を用いて培養を行った。継代 1 回目の iPSC-KC における KRT14 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で解析し、EGF および Y-27632 で処理された iPSC-KC が最も高いレベルで KRT14 を発現していることを確認した。しかし分化誘導の 4 日目-14 日目(初回継代前)に Y-27632 で処理すると未分化マーカーである OCT3/4 と Nanog の遺伝子発現が高くなったため、Y-27632 は 4 日目-14 日目は添加しないようにした。

## iPS 細胞由来ケラチノサイトの特性解析

我々の開発したプロトコルで培養した iPSC-KC は少なくとも 5 回以上継代することが可能であった。4 回継代を行った AF-TTTS-iPSC 由来ケラチノサイト (TTTS-iPSC-KC) および AF-T21-iPSC 由来ケラチノサイト (T21-iPSC-KC) はヒト不死化ケラチノサイト (HDK1-K4DT) と同様な細胞形態を示した。継代 4 回目の TTTS-iPSC-KC および T21-iPSC-KC の表皮マーカーである KRT14、KRT18、p63 及び未分化マーカーである OCT3/4 および NANOG の遺伝子発現量は HDK1-K4DT と同等であった。興味深いことに、T21-iPSC-KC は終末分化のマーカーであるインボクリンとフィラグリンの遺伝子発現が TTTS-iPSC-KC よりも高くなっていた。この結果は、ダウン症候群患者で頻繁に観察される過角化症の臨床的特徴と一致している。また蛍光免疫染色により、TTTS-iPSC-KCs および T21-iPSC-KCs の両方における KRT14、p63 およびラミニン 5 の発現を確認した。さらにカルシウム濃度を高濃度に調整することで keratin 10 (KRT10) およびインボクリンを誘導できたことから、これらの iPSC-KC は機能的であることが証明された。毛包幹細胞のマーカーである keratin 15 (KRT15) は、ほとんど検出されず、より成熟したケラチノサイトケラチノサイトであることが示唆された。フローサイトメトリー解析によって KRT14 陽性細胞は 95.9% に達した。

## iPS 細胞由来ケラチノサイトの 3D 培養

HDK1-K4DT は不死化されているため長期に渡り表皮マーカーを高発現し、増殖能力も維持されているが、iPSC-KC は継代数が増加する毎に細胞増殖能が低下し、それに伴って表皮マーカーの発現が徐々に増加していった。iPSC-KC の細胞形態は、継代初期は紡錘状であるが、継代が進行するにつれてヒトケラチノサイト様になった。しかし 5 回以上継代を行うと空胞変性が見られ増殖しなくなった。ケラチノサイトの 3D 培養には十分な KRT14 の発

現と増殖能力が必要であるため、HDK1-K4DT と同様の方法では iPSC-KC 由来の人工皮膚を構築できなかった。そのため、3D 培養時の iPSC-KC の播種細胞数を  $2 \times 10^5$  から  $1 \times 10^6$  に増加させ、代用真皮上での空気暴露までの期間を通常の 1 日から 2 日間に増加させた。この条件で iPSC-KCs の継代 3-4 回目を用いて 3D 培養を行うと表皮様に積層化した組織が確認できた。この 3D 培養皮膚(人工皮膚)では基底層に KRT14 が確認でき、基底膜部にラミニン 5 が存在していた。さらに基底層より上層では終末分化のマーカである KRT10、ロリクリンおよびフィラグリンの発現を認めた。iPSC-KC から作製した人工皮膚は正常な皮膚と同様の表皮マーカーの発現を示したことから、TTTS-iPSC-KC および T21-iPSC-KC は完全に機能的なケラチノサイトであることが証明された。iPS 細胞由来ケラチノサイトの 3D 培養組織に腫瘍形成や悪性転化の所見は認めなかった。

#### 4-7. 脊髄髄膜瘤モデルラットの作製及び胎児治療

SD ラットの妊娠 10 日目にレチノイン酸を経口投与することで、帝王切開後 97 匹中、脊髄髄膜瘤は 83.5% (81 匹) に確認できた。脊髄髄膜瘤ラット新生仔は、皮膚および脊椎が欠損し、脊髄が露出していた。合計で 20 匹の胎仔ラットに対して妊娠 20 日目に胎児治療を行った。iPSC-KC より作製した人工皮膚を最小限の子宮切開層を通じて胎仔の皮膚欠損部に移植した。妊娠 22 日目に帝王切開で分娩し新生仔ラットを解析した。新生仔ラットの生存率は胎児治療をしなかった群 (61 例中 61 例; 100%) と比較して胎児治療群で低かった (20 例中 15 例、80%)。新生仔ラットの皮膚欠損部は人工皮膚で完全または部分的に覆われていた。移植した人工皮膚は人細胞質特異的抗原である Stem121 の発現により確認され、生後も表皮マーカーである KRT14 と Pan-CK の発現が持続していた。さらに新生仔ラットの皮膚欠損部ではラット表皮組織の伸長(elongation)が認められ、皮膚が再生している可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Autonomous trisomic rescue of Down syndrome cells

Inoue M, Kajiwara K, Yamaguchi A, Kiyono T, Samura O, Akutsu H, Sago H, Okamoto A, Umezawa A.

Lab Invest. 2019 Feb 13. doi: 10.1038/s41374-019-0230-0.

Fetal Therapy Model of Myelomeningocele with three-dimensional skin using amniotic fluid cell-derived induced pluripotent stem cells

Kajiwara K, Tanemoto T, Wada S, Karibe J, Ihara N, Ikemoto Y, Kawasaki T, Oishi Y, Samura O, Okamura K, Takada S, Akutsu H, Sago H, Okamoto A, Umezawa A.

Stem Cell Reports. 2017 Jun 6;8(6):1701-1713. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.013.

〔学会発表〕(計 6 件)

第 69 回日本産科婦人科学会: Oral presentation, Congress award (Best award)受賞

Fetal therapy model of myelomeningocele with three dimensional skin using amniotic fluid derived iPS cells

第 15 回日本胎児治療学会: シンポジスト  
羊水細胞由来 iPS 細胞の胎児治療への応用

第 25 回日本胎盤学会: 口頭発表

レチノイン酸投与ラットにおける PTCH1 発言を介した胎盤および胎児発育への影響: 口頭発表

第 16 回日本再生医療学会

iPS 細胞由来培養皮膚を用いた脊髄髄膜瘤の新規胎児治療法の開発

International Federation of Placenta Association (2018) : Oral presentation

Retinoic acid-induced placental vascular hypoplasia with Patched-1 up-regulation in rats

第 37 回周産期シンポジウム: シンポジスト

iPS 細胞由来培養皮膚を用いた脊髄髄膜瘤の新規治療戦略

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者: なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者:

研究協力者氏名: 和田誠司、川崎知之、大石芳江、阿久津英憲、左合治彦、岡本愛光、梅澤明弘

ローマ字氏名: Seiji Wada, Tomoyuki Kawasaki, Yoshie Oishi, Hidenori Akutsu, Haruhiko Sago, Aikou Okamoto, Akihiro Umezawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。