

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10136

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎患者由来iPS細胞を用いた病態解析および治療法の研究

研究課題名（英文）Pathological study for new treatment using iPS cells derived from patients with atopic dermatitis

研究代表者

沼田 早苗（NUMATA, SANAE）

久留米大学・その他部局等・講師

研究者番号：40599312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：まず保存中のiPS細胞の品質を、ウエスタンブロット法、染色体分析にて確認した。その後のケラチノサイトへの分化では、培養条件に若干の変更を加えて従来法を改良し、効率の良い分化をコンスタントに行えるようになった。患者に侵襲の少ない血液を用いたiPS細胞樹立からケラチノサイト分化まで終了し、効率的な分化方法も確立できた。今後も継続して実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞からの表皮細胞への分化方法はいくつかの報告があるものの、安定して品質の良い表皮細胞を得るスタンダード法はまだまだ確立していない。

今回、特殊な設備や試薬が無くても、安定して表皮細胞が得られる方法を確立した。

この方法を用いることは、アトピー性皮膚炎だけでなく、今後の皮膚科分野の研究の発展に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：First, the quality of the iPS cells in storage was confirmed by Western blotting and chromosome analysis.

In the subsequent differentiation into keratinocytes, the conventional method was improved by slightly changing the culture conditions, and efficient differentiation can now be performed constantly.

We have completed the steps from iPS cell establishment using blood that is less invasive to patients to keratinocyte differentiation, and we have also established an efficient differentiation method. We plan to continue the experiment in the future.

研究分野：皮膚科

キーワード：アトピー性皮膚炎 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は今や日本人の5人に1人に認められる慢性炎症性湿疹である。その病態は複雑で、遺伝的素因と環境因子の両方が関連して発症すると考えられている。ADの原因遺伝子としては、フィラグリン(*FLG*)遺伝子およびセリンプロテアーゼインヒビター(*SPINK5*)などが報告されており、*FLG*遺伝子は、欧米AD患者の50%、日本人ADの27%に変異を認めるとされている。しかし、病態解明の研究においては、患者の皮膚細胞や組織が必要不可欠であるにもかかわらず、小児や女性からの皮膚生検は困難な場合も多く、採取の同意が得られても、採取量が限られており、研究にまで使用できていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまで行ったAD患者における*FLG*異常と臨床症状との関連性の研究データより、皮膚バリア機能やアレルギー性炎症に関わる新規遺伝子やタンパク分子などを同定し、その機能と治療への応用についての研究を行う。

研究に使用する材料としては、患者に侵襲の少ない血液から樹立したiPS細胞を用い、皮膚細胞に分化させて病態解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 保存iPS細胞の品質確認

AD患者及び健常人の血液より樹立したiPS細胞を再培養し、ウエスタンブロット法による未分化の維持状況および染色体異常の有無を調べる。

#### (2) 表皮細胞への分化

品質を確認したiPS細胞を用いて、フィーダー培養からフィーダーフリー培養へ移行し、胚様体(Embryoid body)を作成する。その後、レチノイン酸(retinoic acid)と骨発生成蛋白(bone morphogenetic protein 4)を用いて表皮細胞を誘導する。

### 4. 研究成果

#### (1) 保存iPS細胞の品質確認

液体窒素に保存していた患者及び健常人由来のiPS細胞(図1)は、未分化もよく保たれており(図2)、染色体異常も認めなかった(図3)。

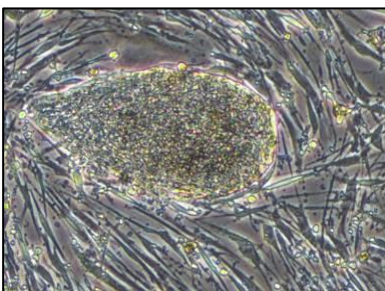


図1：AD患者由来iPS細胞

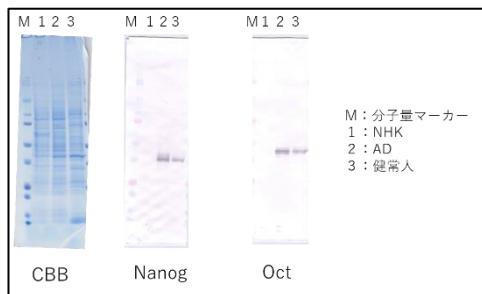


図2：ウエスタンブロット

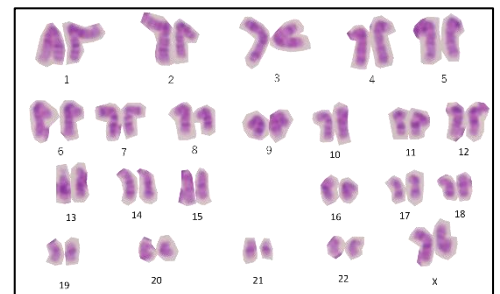


図3：染色体核型 (AD)

#### (2) 表皮細胞への分化

安定した結果がでなかった従来法を改善したところ、コンスタントに効率よく、表皮細胞への分化ができるようになった。(図4～6)

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

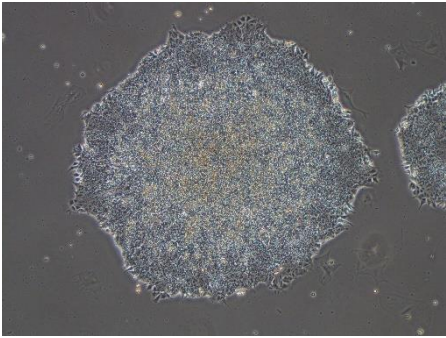


図4: フィーダーフリー培養 (AD)

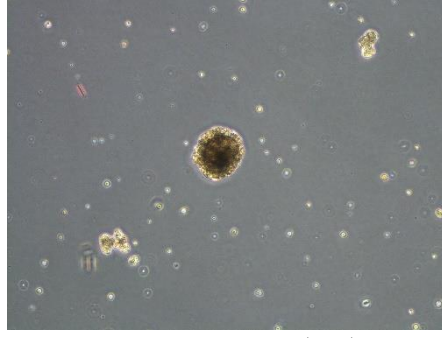


図5: Embryoid body (AD)

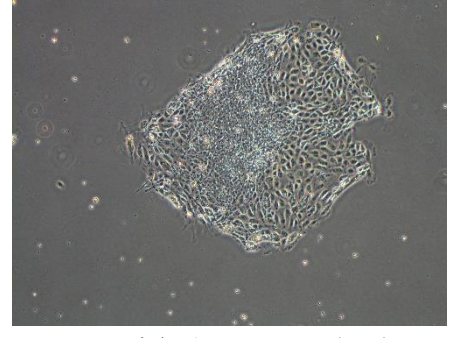


図6: 表皮細胞への分化 (AD)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Numata S, Teye K, Krol RP, Okamatsu Y, Hashikawa K, Matsuda M, Fortugno P, Di Zenzo G, Castiglia D, Zambruno G, Hamada T, Hashimoto T.	4. 巻 Jul;25(7)
2. 論文標題 A compound synonymous mutation c.474G>A with p.Arg578X mutation in SPINK5 causes splicing disorder and mild phenotype in Netherton syndrome.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 568- 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Teye K, Numata S, Ishii N, Krol RP, Tsuchisaka A, Hamada T, Koga H, Karashima T, Ohata C, Tsuruta D, Saya H, Haftek M, Hashimoto T.	4. 巻 Aug 9;11(8):e0160952.
2. 論文標題 Isolation of All CD44 Transcripts in Human Epidermis and Regulation of Their Expression by Various Agents.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0160952	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 該当する
1. 著者名 Teye K, Suga Y, Numata S, Soejima M, Ishii N, Krol RP, Ohata C, Matsuda M, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Hamada T, Koda Y, Hashimoto T.	4. 巻 May;82(2)
2. 論文標題 A founder deletion of corneodesmosin gene is prevalent in Japanese patients with peeling skin disease: Identification of 2 new cases.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 134-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2016.01.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Teye K, Numata S, Krol RP, Ishii N, Matsuda M, Lee JB, Hamada T, Hashimoto T.	4. 巻 May;86(2)
2. 論文標題 Prevalence of filaggrin gene mutations in patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris in Kyushu area of Japan and South Korea.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 174-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2017.01.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 沼田早苗
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎患者由来iPS細胞を用いた病態解析および治療法の研究
3. 学会等名 日本皮膚科学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Teye K, Numata S, Ishii, N, Koga H, Tsuruta D, Saya H, Haftek M, Hashimoto T.
2. 発表標題 Identification of CD44 transcripts that segregate with proliferation, redox and differentiation activities in human keratinocytes.
3. 学会等名 43rd Annual SCUR Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Teye K, Ishii, N, Numata S, Koga H, Tsuruta D, Nakama T. Hashimoto T.
2. 発表標題 Extracellular agents differently regulate expression of CD44 transcripts in normal and malignant keratinocytes.
3. 学会等名 第24回分子皮膚科学フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Teye K, Koga H, Nagai A, Ohata C, Numata S, Ishii, N, Nakama T.
2. 発表標題 Unusual Filaggrin gene (FLG) promoter polymorphisms are associated with atopic dermatitis but not ichthyosis vulgaris in Japan.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teye K, Koga H, Ishii, N, Numata S, Hashimoto T, Haftek M, Nakama T.
2. 発表標題 Unusual CD44 form in epidermal differentiation.
3. 学会等名 Golden Research Conference (GRC) on Barrier Function of Mammalian Skin. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	橋本 隆  (HASHIMOTO Takashi)  (20129597)	久留米大学・皮膚細胞生物学研究所・教授    (37104)	
研究分担者	TEYE KWESI  (TEYE Kwesi)  (30599303)	久留米大学・皮膚細胞生物学研究所・助教    (37104)	
研究分担者	夏秋 洋平  (NATSUAKI Yohei)  (40389309)	久留米大学・医学部・助教    (37104)	
研究分担者	石井 文人  (ISHII Norito)  (80330827)	久留米大学・医学部・准教授    (37104)	