

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689073

研究課題名(和文)皮膚潰瘍に存在する間葉系細胞からの表皮誘導法の開発

研究課題名(英文)Searching way for direct conversion of mesenchymal cells to keratinocytes

研究代表者

栗田 昌和(Kurita, Masakazu)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20424111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,300,000円、(間接経費) 2,790,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚潰瘍局所に存在する間葉系細胞から上皮細胞への直接的な転換を惹起することにより、周辺上皮細胞の遊走によらない潰瘍面からの直接的な上皮化をきたす新しい治療方法開発を目的として、直接転換候補因子の検索、候補因子の遺伝子導入によって線維芽細胞におきる変化を調べた。マイクロアレイデータ、文献検索、ハイオインフォマティクス解析によって55転写因子、30マイクロRNAを選択し、これらをヒト線維芽培養に導入し、ケラチノサイト培養条件に継代したところ、遺伝子導入後1-2週程度で、ケラチノサイトに類似の形態、増殖動態を呈する細胞群を得るにいった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop new therapeutic strategies for cutaneous ulcers, way for direct conversion of fibroblasts to keratinocytes are searched. Direct transdifferentiation to keratinocytes may enable de novo epithelialization from bottom of ulcers. Using microarrays and bioinformatic analyses, candidates factors for direct conversion to keratinocytes are selected. We picked up 55 transcription factors and 30 micro RNAs as candidates. Using lentiviral vectors, these factors are transduced to primary fibroblasts and obtained cells similar to keratinocytes in its form and proliferation kinetics.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：直接転換 ケラチノサイト 線維芽細胞 創傷治癒 リプログラミング 遺伝子導入 間葉上皮移行 上皮化

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚潰瘍は、外傷、熱傷や、褥瘡、糖尿病性潰瘍など、さまざまな外因、内因性要因で生じる。通常、潰瘍周囲に存在する上皮細胞の増殖、遊走によって周縁から上皮化し治癒するが、広い潰瘍面では治癒が遷延し、感染、低栄養、血行障害、知覚障害などの素因が加わると難治となる

(2) 一方、発生の過程で、ひとたび細胞系譜の定まった体細胞は、同一細胞系譜内で増殖、分化を継続する。対して、Davis, Weintraubらは1遺伝子(MyoD)の強制的な発現により皮膚線維芽細胞が筋細胞へ変わることを示した(Davis et al. Cell 1987;51:987-1000)。このような、生理的には認められない細胞系譜の転換を直接転換(Direct conversion)とよび、Takahashi, Yamanakaによる、人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cells :iPS細胞)誘導方法の発見(Takahashi et al. Cell 2006;126:663-76)を契機に急速に研究が進みつつある。実際、神経細胞(Vierubuchen et al. Nature 2010;463:1035-41)、心筋細胞(Ieda et al. Cell 2010;142:375-86)、肝細胞(Sekiya et al. Nature 2011;475:390-3)、血液幹細胞(Szabo et al. Nature 2010;468:521-6)など、その障害が全身状態に大きな影響を及ぼし、研究の対象とされやすい細胞系譜への直接転換についてはすでに文献的報告がなされており、各種細胞系譜間の遺伝子導入による直接転換が、技術的に可能であることを裏付けている。

(3) 生理的に「上皮は上皮からしか再生しない」ため、潰瘍の治癒促進には、通常植皮術、皮弁移植術などの外科的治療を介して、身体他部位から上皮組織を供給することが必要となるが、全身熱傷のように絶対的に自己上皮組織が不足する場合には救命すら困難である。また、褥瘡や糖尿病性潰瘍などの患者においては、外科的侵襲が全身状態に及ぼす影響によって致命的な転機をたどることもあり、外科的治療の適応になりにくい皮膚潰瘍患者数も増加しつつある。皮膚難治性潰瘍は形成外科領域において今後解決すべき大きな問題点であった。

2. 研究の目的

従来方法では治療が困難であった皮膚潰瘍患者に広く適応可能な革新的新規治療を提供し、難治性潰瘍治療に関わる問題を解決するため、皮膚潰瘍において、潰瘍底に豊富に存在する間葉系細胞の上皮細胞への直接転換を誘導し潰瘍面からの直接的な上皮化をはかる、新しい創傷治療法の開発を目的とし、in vitroにおけるヒト線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換方法の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) ヒト初代培養細胞の遺伝子発現解析による直接転換候補因子の検索

マイクロアレイ解析：網羅的遺伝子解析遺伝子導入によるヒト線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換を達成するため、同ドナー皮膚組織由来の線維芽細胞、ケラチノサイトの初代培養を確立し、マイクロアレイ(SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット Ver2.0)およびmicro RNA マイクロアレイ(SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイキット Rel.16.0)を用いて、発現遺伝子の網羅的解析を行った。

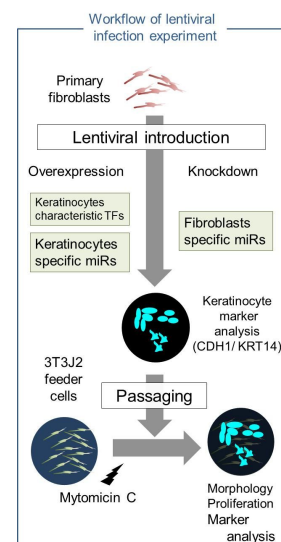
データベース解析：NCBIの既存のデータベースより、初代皮膚線維芽細胞、ケラチノサイトの発現遺伝子情報入手し、解析を行った。また、直接転換因子候補の取捨選択のため、ケラチノサイト分化に伴う網羅的遺伝子データを用いて、分化に伴って大きく変動する因子を同定した。

パイオインフォマティクス解析：上記データに加え、BIOBASE社のデータベースを用いてupstream/cascade解析を行った。また、Gene expression reversal解析(Heinaniemi M et al. Nat Methods. 2013;10:577-83.)を行い、さらに候補因子の検索を行った。

(2) 遺伝子導入実験

レンチウイルスベクターのクローニング
レンチウイルスベクター構築、レンチウイルス作成にはSystem Biosciences社のシステム(Lenti-miR precursor clone, miRZip anti-micro RNA construct)とINVITROGEN社のシステム(pLenti7.3 /V5-DEST Gateway® Vector)を用いた。導入転写因子のクローンはNBRC(Biological Resource Center, NITE)より分譲をうけた。

レンチウイルスベクターで遺伝子導入後の線維芽細胞は、線維芽細胞・ケラチノサイト双方が増殖可能で、初代培養ケラチノサイトを一時的に不死化するconditionally reprogramming conditionを使用(Chapman et al. J Clin Invest. 2010;120:2619-26))で培養した。(右図)

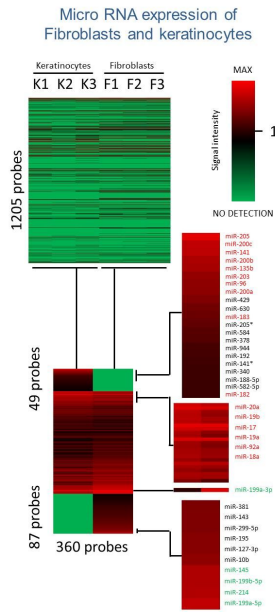


4. 研究成果

(1) micro RNA によるアプローチ

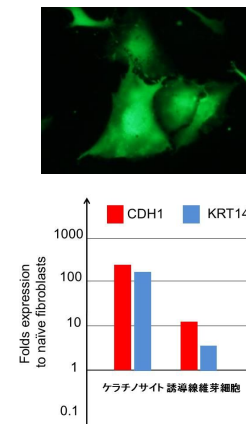
特異的 micro RNA の同定

遺伝子導入によって高発現を容易に得やすい micro RNA によるアプローチから開始した。同一皮膚検体から採取した初代培養線維芽細胞とケラチノサイトの発現 micro RNA を micro RNA マイクロアレイを用いて解析 (右図) ケラチノサイトに特異的に発現している 7cluster 17micro RNA と、線維芽細胞に特異的に発現している 9 micro RNA を同定した。



micro RNA 導入による直接転換実験

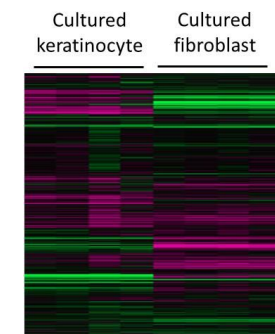
個々の micro RNA ベクター導入および複数の導入を試みた。複数の micro RNA の overexpression/knockdown によって、上皮様の形態を得ることはできたが、マーカー発現強度、増殖能に欠いた (右図は全ベクター導入時の外観像およびマーカー発現)。



(2) 発現強度で選択した転写因子を加えたアプローチ

特異的転写因子の同定

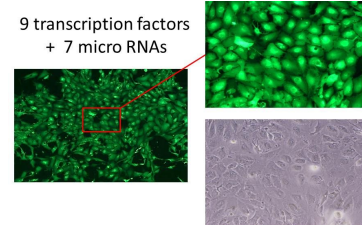
NBCI データベース上のデータ (GEO Datasets Accession: GDS1505) を用いて (右図) 線維芽細胞と比較してケラチノサイトにおいて強く発現している遺伝子 (転写因子) を選択した。



さらに、文献データ (Shalom-Fuerstein et al. Cell death and differentiation 2011;18:887-896) からマウスの胚性 11.5 日、14.5 日の表皮組織の発現遺伝子の比較を行い、ケラチノサイトへの直接転換候補因子の検索を進めた。

転写因子を加えた直接転換実験

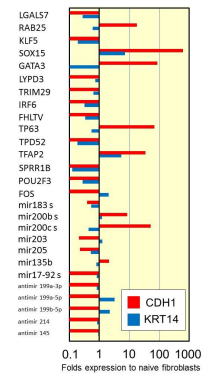
1 群の転写因子を追加することによって、かなり上皮様の形質が強く、クロナールな細胞増殖能をもつ細胞群を得ることができるようになったが、形態、培養動態からいうとケラチノサイトには遠い状態だった。



(3) 転写因子の取捨選択

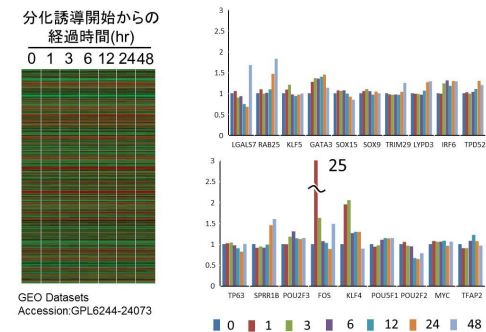
発現マーカー解析による取捨選択

iPS 作成過程同様 ((Li, et al. Cell stem cell 2010;2:51-63) ケラチノサイトへの直接転換過程においては、上皮間葉転換がボトルネックとなっているのではないかと仮説に基づき、特に CDH1 の発現に留意しながら個々の導入因子によるケラチノサイトマーカー発現を realtime PCR にて評価し (右図) 因子選択の指標とした。



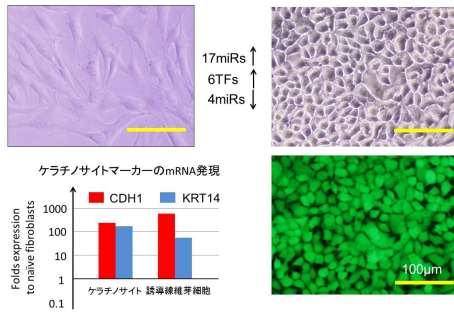
ケラチノサイト分化に伴う発現変動による取捨選択

NBCI データベース上のデータ (GEO Datasets Accession: GPL6244-24073) からケラチノサイト分化に伴う候補因子の発現変動を調べ、候補因子取捨選択の指標とした (下図)。



直接転換実験

取捨選択した候補因子をレンチウイルスベクターにて導入、継代後 10-14 日後にはケラチノサイトの類似の形態を呈する細胞のコロニーが得られるようになった (次頁図)。



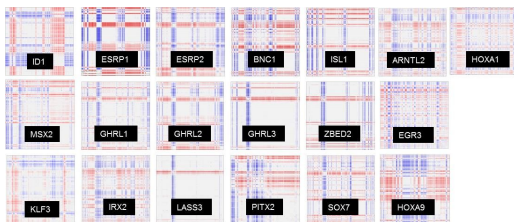
(4) バイオインフォマティクス解析によるアプローチ

UPSTREAM/CASCADE 解析

前項までの取り組みにより、十分に高いマーカー発現が得られるようになったものの、継代維持時の細胞形態、分化傾向など不足する形質が認められたため、より定量性に優れたマイクロアレイを用いた解析結果より、UPSTREAM/CASCADE解析を行い、線維芽細胞とケラチノサイトの差異の53上流遺伝子、カスケード上クロスリンクの認められる183遺伝子を同定した。

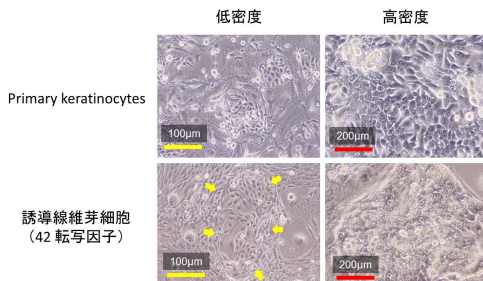
Gene expression reversal 解析

細胞系譜を特徴づける転写因子の新しい解析手法である Gene expression reversal 解析 (Heinäniemi M et al. Nat Methods. 2013;10(6):577-83.)で、あらたに17転写因子を候補因子として選択した(下図)。



直接転換実験

申請書作成現在、これらの因子を部分的に取り入れ、転換実験を行ったところである。遺伝子導入後1-2週間の間に現れてくるコロニーの中には、低密度(下図左)、高密度(下図右)、それぞれの状態においてケラチノサイトにかなり類似した形態、増殖様態の細胞群が得られるようになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

Kurita M, Eto H, Suga H, Takushima A, Harii K. Searching the way of direct conversion of fibroblasts into keratinocytes for the treatment of cutaneous ulcers. January 16, 17 and 18, 2014 Cira International Symposium 2014. Osaka, Japan. Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company, Ltd., Osaka, Japan.

栗田昌和、江藤ひとみ、佐藤卓志、菅浩隆、多久嶋亮彦、波利井清紀 皮膚潰瘍上皮化促進を目的とした線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換のころみ 平成25年11月7,8日 第22回日本形成外科学会基礎学術集会 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、新潟県

栗田昌和、江藤ひとみ、菅浩隆、多久嶋亮彦、波利井清紀 皮膚潰瘍上皮化促進を目的とした線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換のころみ パネルディスカッション1 創傷治癒の分子メカニズム 平成25年7月11,12日 第5回日本創傷外科学会総会・学術集会 ホテルグランヴィア京都、京都府

Kurita M Eto H, Suga H, Takushima A, Harii K. Searching the way of direct conversion of fibroblasts into keratinocytes for the treatment of cutaneous ulcers. 2013 May 11-12 Cira International Symposium 2013. Kyoto University, Clock tower centennial hall, Kyoto, Japan.

栗田昌和、江藤ひとみ、多久嶋亮彦、波利井清紀 ケラチノサイトに特異的な micro RNA の同定 平成24年10月4,5日 第21回日本形成外科学会基礎学術集会、ホテルリステル猪苗代、福島県

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
栗田 昌和(KURITA, Masakazu)

杏林大学・医学部形成外科学教室・助教
研究者番号：20424111

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし