

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24591651  
 研究課題名(和文) iPS細胞を利用してアトピー性皮膚炎におけるフィラグリンの関わりを評価する試み  
  
 研究課題名(英文) A trial for the clarification of the precise relationship between filaggrin gene mutation and atopic dermatitis by using human pluripotent stem cell  
  
 研究代表者  
 井川 健 (Igawa, Ken)  
  
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
  
 研究者番号：00372441  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎でその関与が報告されているフィラグリン遺伝子について、まず、ヒトiPS細胞においてノックアウト(KO)することを目標とした。TALENsを利用してフィラグリン遺伝子のKOを試みたが失敗に終わったため、CRISPR/Cas9システムを利用することとした。作成したCRISPR/Cas9ベクター(hFLG-CRISPR)をヒトiPS細胞にリポフェクションにより導入し、短期間の抗生剤選択の後、残存したコロニーをランダムに20個ピックアップした。20個のうち、5個程度で片アレルにランダムに塩基のdeletionを認め、フィラグリン遺伝子に変異が挿入されたヒトiPS細胞を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：A filaggrin is one of important proteins which consist skin barrier and the mutations of this gene are reported to be essential precipitating factor of atopic dermatitis. In this study, we try to knock-out filaggrin gene (FLG) in human iPS cells and keratinocytes will be differentiated from FLG-KO hiPS cells and their parental hiPS cells. Then, finally, we will get isogenic (only FLG-KO or FLG-normal) keratinocytes. In this situation, we can evaluate the precise effect of FLG mutation (KO) to keratinocytes physiology. In order to KO FLG in hiPS cells, we decided to use engineered nucleases mediated gene targeting. First, we made FLG specific transcription activator-like effector nuclease (FLG-TALENs), but we failed. Then, we switched to use CRISPR/Cas9 system and finally we succeeded and we got several clones of hiPS cells which possessed FLG-mutations (KO).

研究分野：皮膚科

キーワード：iPS細胞 人工ヌクレアーゼ アトピー性皮膚炎 フィラグリン 角化細胞

### 1. 研究開始当初の背景

2006年に京大の山中らによって、iPS細胞の確立が報告されて以降、また、2012年に山中らがこの業績によってノーベル賞を受賞して以降、このシステムを利用した研究は驚くべきスピードで発展しており、また、そのシステムを臨床に応用しようとする試みは世界中で進行している。そのような中で、我々も、リプログラミング因子を、トランスポゾンベクターを利用して細胞に導入し、ヒト iPS 細胞を作製することに成功している。また、そのヒト iPS 細胞を、表皮角化細胞に分化させ、さらには誘導された表皮角化細胞を *in vitro* において重層化させ、再構成表皮類似の構造を作ることにも可能としている。

ところで、アトピー性皮膚炎は慢性に経過する炎症性皮膚疾患としてよく知られているが、難治であることもあり、常にその病態メカニズムの解明、治療法の開発の対象となっている疾患である。近年、このアトピー性皮膚炎の少なくない population において、フィラグリン遺伝子の変異が見いだされる(10%~30%)ことが報告されている。フィラグリンが皮膚のバリア機能を構成するタンパク質の一つであることから、この遺伝子の変異とアトピー性皮膚炎の発症には大きな意味合いがあるとされており、そのことについて様々な研究がなされている。しかしながら、その遺伝子に異常があることと、個々の細胞(ここでは標的となる細胞は表皮角化細胞である)のふるまいに異常がみられるのかどうか、ということ、本当の意味で詳細に検討することについては、これまで検証できるシステムがなく、行われていなかった。

### 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞を用いて、フィラグリン遺伝子に変異があることが、アトピー性皮膚炎にどのような意味合いをもつのか、ということ、これを正確に評価することを最終の目的とした。

すなわち、iPS 細胞を用いることによって、フィラグリン遺伝子の変異があるかどうかのみに違いのある、一組の iPS 細胞を得ることができる。この一組の iPS 細胞をこれまでに確立した方法に従って表皮角化細胞分化させることによって、はじめて、フィラグリン遺伝子の変異のみに違いがあり、他はすべて同じ、という表皮角化細胞を得ることができるのである。この一組の表皮角化細胞を比較検討することによって、フィラグリン遺伝子の変異が表皮角化細胞の振る舞いに与える影響を、本当の意味で詳細に検討できることになり、ひいてはアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異がもつ本当の意味に迫ることが可能となるであろう。

### 3. 研究の方法

まず、ヒト iPS 細胞において、フィラグリン遺伝子に変異を導入するシステムを確立することとした。本来は、実際のアトピー性皮膚炎患者でみられるフィラグリン遺伝子変異をそのまま導入するべきであるが、システムの確立も同時並行でおこなう必要もあり、また、黒白はっきりとした結果を得ることも考えて、まずはフィラグリン遺伝子をノックアウトすることを目的として研究をすすめることとした。遺伝子変異導入の方法については、最初は、マウスシステムと同様な、自然におこる相同組み換えを利用する方法を検討していたが、今回はノックアウトすることが目的でもあり、また、現実的にはその方法では難しいと判断したため、現在、急速に発展している方法である、人工ヌクレアーゼを利用することとした。ノックアウトを目的としたため、ドナーベクターは用意せず、DNA の 2 重鎖切断後の non homologous end joining (NHEJ) を利用してのランダムな変異挿入による遺伝子ノックアウトを期待した。

このようにして遺伝子変異を導入したヒト iPS 細胞を、これまでに確立したプロトコールに従って表皮角化細胞に分化させて、変異の入っていないオリジナルの iPS 細胞由来の表皮角化細胞との差異を検討する。この差異については、形態学的なものがあればそれも含めて、無刺激増殖状態時における発現遺伝子パターンや、炎症刺激時の発現遺伝子パターンなどについては single cell gene expression の形で各系統の細胞、数十個単位について検討を行うこととする。

さらに、ケラチン遺伝子のモニタリングシステムを構築することとした。本研究を推進していく時に、ケラチン遺伝子の on/off を正確にモニタリングしながら検討を行えることは非常にメリットがあると考えた。そこで、表皮角化細胞に発現してくるケラチン遺伝子(K14)の下流に eGFP 遺伝子をノックインしたヒト iPS 細胞を作製することとし、上記のシステム構築と並行して行うこととした。このためにも確立した人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変システムを使った。この場合は、DNA の 2 重鎖切断のための人工ヌクレアーゼの作製と、ノックインするレポーター遺伝子を含んだドナーベクターの作製を並行して進め、出来上がった両者をヒト iPS 細胞にリポフェクションをもって導入した。さらに、このようにして作製したシステムがしっかり稼働するかどうかを、iPS 細胞を表皮角化細胞に分化させることにより確認した。

### 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞における遺伝子変異挿入システムの確立(人工ヌクレアーゼを利用する方法)

ヒト ES 細胞/iPS 細胞における遺伝子改変は、マウス ES 細胞/iPS 細胞におけるそれに比して困難であるとされていたが、近年の技術の進歩により、人工ヌクレアーゼを利用することによって、比較的自在に行うことができるようになってきている。本研究においても、当初は、マウスのシステムで行われるように、自然におこる相同組み換えに期待したターゲティングによる遺伝子改変を想定していたが、結果的にそれは不可能ということになり、transcription activator-like effector nucleases (TALENs) あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼを利用して遺伝子改変を行う方向へと変更した。

我々の研究の最終目標は、アトピー性皮膚炎において実際にみられるフィラグリン遺伝子変異を iPS 細胞の段階で挿入して、そこから分化誘導された表皮角化細胞と、オリジナルの iPS 細胞から誘導された表皮角化細胞の比較において、はたしてなんらかの機能異常を示すのか(示さないのか)あるいは、角化細胞としての振る舞いに違いがあるのか(ないのか)ということを検討することである。しかしながら、そこへたどり着く前に、実験系の確立をする必要があり、今回の研究においては、まず、フィラグリン遺伝子を単純にノックアウトすることによる角化細胞への影響について検討を行うこととした。遺伝子のノックアウトは、人工ヌクレアーゼの導入により惹起される DNA の 2 重鎖切断の修復機構としての NHEJ をもってランダムに挿入される変異によっておこることを期待することとした。

まず、Goldengate 法の改変法によってフィラグリン遺伝子の特定部位を標的とした TALENs を作製し(hFLG-TALENs)、これを利用してフィラグリン遺伝子のノックアウトをこころみた。hFLG-TALENs をトランスフェクトし、そのベクターがもつ耐性抗生剤遺伝子を利用して、短期間の抗生剤選択をしたのち、残存したコロニーをランダムに 50 個程度 pick up した。それぞれの genomic DNA を採取し、シーケンスで確認したが、DNA が切断され、変異が入っているようなコロニーは検出されなかった。数回繰り返すも失敗に終わった。

TALENs の DNA 切断効率が、数%程度という報告もあり、失敗の理由は切断効率の低さにあった可能性を考えた。そこで、切断の効率の面ではアドバンテージのある、CRISPR/Cas9 システムを利用することとした(ものによっては、20-30%と報告あり)。web base で標的とする配列(guide RNA)をデザインし、CRISPR/Cas9 を一括で発現するベクターにクローニングした(hFLG-CRISPR)。hFLG-CRISPR をヒト iPS 細胞にリポフェクションにより導入し、短期間の抗生剤選択を施行したのち、残存し

たコロニーをランダムに 20 個ピックアップした。それぞれのゲノム DNA を採取し、シーケンスによって変異挿入の有無を確認した。そうすると、今度は、20 個のうち 5 個程度で片アレルにランダムに塩基が deletion しているのがみつかり(数 bps ~ 10bps 程度)、フィラグリン遺伝子に変異が挿入された(片アレルでノックアウトされた)ヒト iPS 細胞を得ることができた。

ケラチン遺伝子の下流に eGFP 遺伝子をノックインしたヒト iPS 細胞を樹立した。

本研究を進展させていくとき、最終的には iPS 細胞から表皮角化細胞への分化のタイミングなどを正確にモニタリングできるシステムがあればより役に立つと思われ、そのために、表皮角化細胞に特異的に発現するケラチン遺伝子(K14)をターゲットとし、その下流に eGFP 遺伝子をノックインすることを考えた。

人工ヌクレアーゼを作製し(K14-TALENs)、ノックインするドナーベクターとともにヒト iPS 細胞にトランスフェクトした。この場合はしっかりとした抗生剤セレクションを行った結果、残存したコロニーも少数であり、ピックアップしたものの多くのクローンにおいて、eGFP がノックインされていることが確認された。このようにして、K14 遺伝子の下流に eGFP がノックインされた hiPS 細胞を得ることができた。

さらに、今回作成したシステムが稼働するかどうかを確認するため、この hiPS 細胞を、プロトコルに従って表皮角化細胞に分化させたところ、予想通りに eGFP が発現することを確認した。

こののち、 のシステムと のシステムを統合することによって、より詳細に表皮角化細胞の分化に FLG の変異が与える影響について検討できることと思われる。

## 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 1 件)

1. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Sep;3(9):992-1001. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. 井川 健. Efficient keratinocytes differentiation from transgene-free human induced pluripotent stem cell line: implication for therapeutic application. 第八回箱根カンファレンス、淡路島、日本、2013年8月24日 25日。
2. Ken Igawa, et al. Efficient keratinocytes differentiation from transgene-free human induced pluripotent stem cell line: implication for therapeutic application. International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, Scotland, 2013 May 8-11.
3. Ken Igawa, et al. induced keratinocytes from transgene-free but not transgene-residual human induced pluripotent stem cells phenotypically resemble primary human keratinocytes. The 42nd Annual meeting of the European Society for Dermatological Research, Venice, Italy, 2012 Sep 19-22.
4. Ken Igawa, et al. A trial of in vitro reconstitution of human skin using transgene-free induced pluripotent stem cells. 10th annual meeting of ISSCR, Yokohama, Japan, 2012 Jun 13-16.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
とくになし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井川 健 (IGAWA Ken)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00372441