

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670500

研究課題名(和文) 線維芽細胞から直接に表皮角化細胞を誘導する試み

研究課題名(英文) induction from fibroblast to keratinocyte

研究代表者

佐藤 仁美 (SATO, HITOMI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00648090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終的な目標は、体細胞(線維芽細胞)から直接に表皮角化細胞を分化させるシステムの構築であるが、まず、細胞が表皮角化細胞に分化したことを的確にとらえるための仕組みを作ること为目标とした。表皮角化細胞のマーカーとして、ケラチン14遺伝子を選択し、ケラチン14遺伝子のon/offが視覚的にモニタリングできるシステムを構築した。このシステムを、ヒトiPS細胞に導入し、実際に表皮角化細胞に分化させたときに稼働することを確認した。このシステムを利用し、ヒト線維芽細胞がさまざまな条件下でK14がonとなってくる条件を検討していくことになる。

研究成果の概要(英文)：In order to archive our final purpose, "Establish the direct conversion system of keratinocytes from dermal fibroblasts in human", first, we tried to establish the "better" detection system for keratinocytes differentiation in human. For this purpose, keratin 14 (K14) gene that is one of major genetic markers for epidermal keratinocytes was selected and we tried to detect the on/off of this gene by visually.

With using transcription activator-like effector nucleases (TALENs), one of engineered nucleases, gene targeting for eGFP gene knock-in into the downstream of K14 gene in human iPS cells was performed. After antibiotics selection, colonies were picked up and checked transgene existences, and revealed several clones were succeeded to be targeted. Then, we differentiated these hiPS cells (K14-eGFP hiPSCs) into epidermal keratinocytes with our-established protocols and confirmed that this system works well.

研究分野：皮膚科学

キーワード：iPS細胞 ヒト 人工ヌクレアーゼ 表皮角化細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2006年、京都大学の山中らはマウス皮膚線維芽細胞に4つの転写因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)を導入することによってiPS細胞を樹立することに成功した(Takahashi K, Cell, 2006)。当然のことながらヒトiPS細胞も樹立された(Takahashi K, Cell, 2007)。連携研究者の井川らも、すでに、マウス(Yusa K, Nat Methods, 2009)、ヒト(Igawa K, submitted data)の皮膚線維芽細胞にトランスポゾンを利用して5つのリプログラミング遺伝子(*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *LIN28*)を導入することによるiPS細胞作製に成功している。

iPS細胞の臨床応用で期待される分野の一つに再生医療の分野がある。iPS細胞から目的とする細胞あるいは組織を分化、再生させる試みには大きな期待がある。しかしながら、将来的な発癌の可能性やiPS細胞の樹立から目的とする細胞への分化という経路に要する手間と時間の問題、といったことは常について回る、しかも無視できないハードルであると考えられる。

2010年、WernigらはiPS細胞樹立法を参考にして、マウス皮膚線維芽細胞に3つの転写因子(*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*)を導入することによって直接に神経細胞を樹立することに成功した(Vierbuchen T, Nature, 2010)。神経細胞の樹立は、転写因子導入12日後のことであり、また潜在的な発癌因子を含まない遺伝子導入による成功はiPS細胞を介しての神経細胞分化に比して明らかかな優位性をもつと考えられる。その後同様のコンセプトによって様々な細胞が線維芽細胞から直接誘導されることが報告されている。

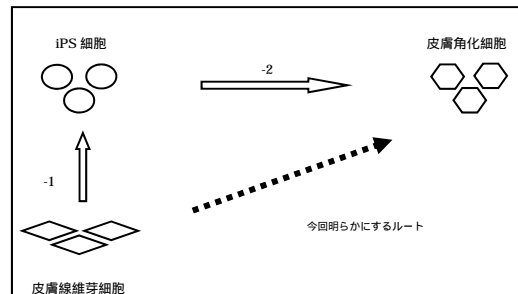
## 2. 研究の目的

我々はすでにヒトiPS細胞を樹立することに成功しているが、まず、これを利用して、ヒト表皮角化細胞の分化に必要な、あるいは分化促進にむかうような一連の遺伝子群の選定・抽出を行う。その後は上述したWernigらの方法を参考にして、得られた遺伝子群を、ヒト皮膚線維芽細胞に導入することによって、iPS細胞を介さないヒト表皮角化細胞樹立を目指す。

iPS細胞を利用した再生医療の試み自体はすでに多くの試みがなされており、あるいはもう斬新とは言えない状況かもしれない。現況では下図に示した-1、-2のルートを介して、iPS細胞をさまざまな目的細胞に分化させて臨床応用をしようという考え方が主流である(我々の場合は表皮角化細胞である)。

本研究においては、下図における点線のル

ートがあることを予想して、これを明らかにして、よりよい臨床応用システムを確立することを目標としている。これは斬新であり、またチャレンジ性に富んだ研究と考えられる。



ある体細胞から異なる lineage の細胞を誘導するという研究そのものを考える場合には、今回の研究が成功した際には、iPS細胞を介する経路で必要となる時間(iPS細胞作製に2-4週間、目標の細胞に分化させるために数週間が最低限必要と考えられる)と手間を大幅に縮小できるであろう。また、未分化を誘導する転写因子のもつ潜在的な発癌性という危険を考える必要がなくなるというメリットがある。

表皮角化細胞はいわゆる terminal differentiated cell に近いものであり、正常組織から培養状態にもっていき、それを継代していくことは可能ではあるが、臨床応用に耐える細胞の質を考えれば、せいぜい数代程度の継代が限界ではないかと思われる。現在、すでに培養細胞を利用した表皮シートが臨床に供与されているが、上記の理由で限界があると思われる。

一方、皮膚線維芽細胞は、比較的未分化な細胞集団であり、また絶対的な母集団も角化細胞に比べて圧倒的に多い。そのためもあるのか、培養自体も容易であり、継代も最低限10代程度まではある程度の質を保持した状態で可能である。

皮膚の大欠損が起こる状態(一過性には広範囲熱傷、持続的には先天性表皮水疱症に属する一群の疾患等)に対応する、あるいはこれからの社会でおそらくクローズアップされてくるであろう、anti-aging、あるいは美容的な面から、表皮角化細胞を比較的容易に、大量に、恒常的に供給できるシステムは必要と考えられ、本研究の成功は、このような目的を考える時に、それに寄すること大であると考えられる。

## 3. 4. 研究の方法ならびに成果

本研究の目的を達成するために、最終的には線維芽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、それをマーカーとして、さまざまな条件を検討することが可能

になると考えられた。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。

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。

上述のように、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が、まずは iPS 細胞を使ってそのシステムを構築することとした。

具体的には、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、K14 の on/off が可視化できるようにすることを考えた。当科ですでに樹立しているヒト iPS 細胞を利用して研究を遂行した。まず、K14 の遺伝子挿入部位の近傍に DNA の 2 重鎖切断を挿入するための人工ヌクレアーゼをデザインし、その作製を行うと同時に、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た。

人工ヌクレアーゼは、TALENs を利用することとした。広島大学理学部の山本教授らのグループが報告した Goldengate 法の変法を用いてヒト K14 遺伝子の特定部位を標的にした TALENs を作製した (hK14-TALENs)。ノックインするドナーベクターの作製も終了し、K14-TALENs と、作製したドナーベクターをともにヒト iPS 細胞にリポフェクションをもってトランスフェクトした。およそ 1 週間の抗生剤セレクションを行ったところ十数個程度のコロニーが残存した。それらコロニーを、ピックアップし、ゲノム DNA を採取し、PCR 法により挿入遺伝子の有無、位置などを確認したところ、ピックアップした多くのクローンにおいて、想定通りの位置に eGFP の構築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 細胞を複数個得ることができた。

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、プロトコー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。

以上により、表皮角化細胞に分化していく時にそれを経時的にチェックできる方法を確立することができた。

本システムを皮膚線維芽細胞に導入し、さまざまな条件を検討することにより、当初に設定した最終目標である、線維芽細胞より表皮角化細胞を直接誘導するシステムを確立することが可能となると思われる。

## 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 4 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)

2. 骨髄露出療法で治療した難治性糖尿病性潰瘍

石川 貴裕, 佐藤 仁美, 西澤 綾, 福山 國太郎, 高山 かおる, 井川 健, 横関 博雄  
皮膚病診療 36 巻 9 号  
Page837-840(2014.09)  
査読あり

3. 乳頭の微小なびらんより診断に至った乳房 Paget 病の 1 例

佐藤 仁美, 湊原 一哉  
皮膚科の臨床 56 巻 4 号  
Page605-609(2014.04)  
査読あり

4. 老人性血管腫の生検により診断した血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫の 1 例

佐藤 仁美, 湊原 一哉  
皮膚科の臨床 55 巻 6 号  
Page783-787(2013.06)  
査読あり

[学会発表](計 12 件)

1. 皮下に残存する虫体口部からの PCR 法により確定診断に至った Lyme 病の 1 例

小林 圭介, 佐藤 仁美, 志村 智恵子, 片桐 一元, 日谷 明裕  
日本皮膚科学会 第 858 回東京地方会、平成 26 年 12 月 20 日、東京

2.皮膚限局性ムチン沈着症の1例  
伊藤 算昭, 山崎 奈央, 佐藤 仁美, 片桐 一元, 上田 善彦  
日本皮膚科学会 第 854 回東京地方会、平成 26 年 6 月 21 日、東京

3.多発性色素性 Bowen 病の 1 例  
小林 圭介, 近澤 咲子, 佐藤 仁美, 上野 真紀子, 片桐 一元, 田中 勝  
第 77 回日本皮膚科学会 東京支部学術大会、平成 26 年 2 月 15 日、16 日、東京

4.慢性リンパ球性白血病を合併した悪性黒色腫の一例  
小林 圭介, 上野 真紀子, 伊藤 算昭, 佐藤 仁美, 片桐 一元, 佐藤 美樹, 池田 博生  
第 113 回日本皮膚科学会総会、平成 26 年 5 月 30 日-6 月 1 日、京都

5.アスピリン、ロキソプロフェンの前投与によりタクロリムス軟膏の灼熱感が緩和され外用可能となる  
片桐 一元, 近澤 咲子, 小林 圭介, 結束 怜子, 伊藤 算昭, 佐藤 仁美, 上野 真紀子  
第 113 回日本皮膚科学会総会、平成 26 年 5 月 30 日-6 月 1 日、京都

6.ミノサイクリンが奏功し肥満を伴う融合性細網状乳頭腫症の 1 例  
佐藤 仁美, 伊藤 算昭, 小林 圭介, 上野 真紀子, 片桐 一元  
日本皮膚科学会 第 853 回東京地方会、平成 26 年 1 月 18 日、千葉

7.トラニラスト内服と UVA 療法が奏功した乾酪壊死を伴う皮膚サルコイドの 1 例  
伊藤 算昭, 小林 圭介, 佐藤 仁美, 上野 真紀子, 片桐 一元, 大竹 節美  
日本皮膚科学会 第 853 回東京地方会、平成 26 年 1 月 18 日、千葉

8.肺小細胞癌を合併した Bazex 症候群の 1 例  
小林 圭介, 伊藤 算昭, 近澤 咲子, 佐藤 仁美, 上野 真紀子, 片桐 一元, 塩田 剛章  
日本皮膚科学会 第 850 回東京地方会、平成 25 年 9 月 28 日、東京

9.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。

10.蜂窩織炎として加療中に血球貪食症候群を併発した皮膚腺病の 1 例

松浦 友紀, 佐藤 仁美, 西澤 綾, 井川 健, 横関 博雄  
日本皮膚科学会 第 848 回東京地方会、平成 25 年 5 月 18 日、東京

11. 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

12. 骨髄露出療法で治療した難治性糖尿病性潰瘍の 2 例  
石川 貴裕, 佐藤 仁美, 宗次 太吉, 福山 國太郎, 西澤 綾, 高山 かおる, 井川 健, 横関 博雄  
日本皮膚科学会 第 847 回東京地方会、平成 25 年 1 月 19 日、東京

〔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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
佐藤 仁美 (SATO Hitomi)  
獨協医科大学越谷病院・助教  
研究者番号：00648090

(2)連携研究者  
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