

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担）研究報告書

## ヒト iPS 細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響を

### in vitro で詳細に検討するシステム構築

研究協力者氏名 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師

研究責任者氏名 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎は多因子性の疾患と考えられるが、その中には遺伝的要因も含まれていると考えられている。そのような遺伝的要因のひとつにフィラグリン遺伝子の変異がある。本研究においては、その変異の有無によって角化細胞にどのような変化が生じるのかを、ヒト iPS 細胞を利用して検討することを考え、その研究を行うためのシステムを構築した。

#### A．研究目的

皮膚疾患の多くは多因子性の疾患であると考えられ、遺伝的要因もそれに含まれると考えられる。これまでアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異などの報告がなされているが、それらの変異が実際の病態形成にどのような役割を果たしているのかをヒトの系で詳細に検討できるシステムはなかった。そこで、我々は、ヒト iPS 細胞を利用して、このような遺伝子変異が実際の病態形成に与える影響について詳細に検討できるシステムの構築を考え、まず、アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行うこととした。

#### B．方法

目的を達成するために下記のような手順を踏むこととした。

ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs (TAL Effector Nucleases) を利用するシステムを構築。

ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発

現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。

上記システムを導入したヒト iPS 細胞においてフィラグリン遺伝子に変異を導入する (TALENs)。

のヒト iPS 細胞を角化細胞に分化させ、検討を行う。

なお、使用するヒト iPS 細胞は研究協力者により、piggybac トランスポゾンシステムを利用して作製し、transgene-free かつ mutation-free であることが確認されたものを使用する。

#### C．結果

TALENs を利用するシステムの構築ならびにケラチン遺伝子発現可視化システムの構築

Voytas らにより確立されている Golden Gate Methods を modify した方法を用いて、TALENs を作製するシステムを構築し、それを用いて、ヒト iPS 細胞において、K14 遺伝子の下流に eGFP 遺伝子をノックインすることに成功した。

フィラグリン遺伝子変異挿入のための TALENs の作製

同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断する TALENs を作製した。

#### D . 考察 ならびに E . 結論

本研究により、フィラグリン遺伝子変異が与える影響を検討するシステムの構築が完了した。今後、分化誘導して得られた表皮角化細胞において、フィラグリン遺伝子変異の有無のみが違う状況の比較検討をすることにより、アトピー性皮膚炎においてフィラグリン遺伝子変異が存在することの意味合いについて、これまでと違った面よりアプローチができると考えられる。

#### G. 研究発表

1: Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. Acta Derm Venereol. 2013 Aug 8.

2: Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Masuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H. Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. Clin Immunol. 2013 Oct;149(1):1-10.

3: Saeki K, Satoh T, Yokozeki H.  $\alpha(1,3)$  Fucosyltransferases IV and VII are essential for the initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. J Invest Dermatol. 2013 Sep;133(9):2161-9.

4: Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. Clin Exp Immunol. 2013 Jun;172(3):507-12.

5: Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D<sub>2</sub> : therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. Immunology. 2013 Sep;140(1):78-86.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
なし