

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 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師
研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科 教授

研究要旨 炎症性皮膚疾患は、その要因が多因子にわたり推測され、遺伝的要因もその一つと考えられる。しかしながら、その遺伝的要因が本当の意味でどのような機序をもって生体に影響を与えるのかをヒトの系で厳密に調べることは難しかった。KO マウスを作成することにより、その遺伝子の持つ意味についてある程度の理解をうることは可能であったが、種の違いは大きく、病態を完全に模倣することは難しいことが度々であった。我々はヒト iPS 細胞を利用すればこのような状況を打開できると考え、まず、アトピー性皮膚炎でその変異が大きく取り上げられているフィラグリン遺伝子をターゲットとした。前年度までに K14-eGFP-hiPS 細胞を作成した。本年度は、そのシステムが動くことを確認した上に、フィラグリン遺伝子の KO あるいは変異挿入に着手した。

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。これまでもアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異についての報告は多数なされているが、それらの変異が実際に角化細胞の振る舞いにおいて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、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒト iPS 細胞を作成し、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) あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼ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(人工ヌクレアーゼ)。

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。

本年度は、の後半ならびに、について研究をおこなった。

C. 結果

K14-eGFP のシステムが稼働することの確認

K14-eGFP ヒト iPS 細胞より表皮角化細胞を誘導し、誘導された角化細胞が eGFP が発現することを確認した。

フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認

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。作成した hFLG-TALENs をヒト iPS 細胞にトランスフェクトし、コロニーをランダムに pick した。これらの iPS 細胞から genomic DNA を採取し、TALENs の認識サイトを中心とした部分を PCR にて増幅し、direct sequence を施行した。その結果、hFLG-TALENs によっては変異あるいは KO されたコロニーを得ることはできなかった。TALENs は作成が容易であるが、DNA の切断効率はせいぜい数%にとどまるとされる。今回、TALENs で変異コロニーを得ることができなかった理由はその切断効率の低さにあると考え、より新しい人工ヌクレアーゼである

CRISPR/Cas9 のシステムを利用することとした。ヒトフィラグリンをターゲットにした CRISPR/Cas9 をデザインし、作成した。

D . 考察 ならびに E . 結論

遺伝子の変異が本当の意味でどのような影響を与えるのか、ということヒトの系で検討する場合には、現状では、iPS 細胞を利用した本研究のようなシステムを利用するほかに方法がないと考えられる。フィラグリン遺伝子と表皮角化細胞をターゲットにした本研究であるが、対象を別にしての応用を広く求めうる研究と考えられる。

F . 健康危険情報
なし

G . 論文発表

- 1: Shibama S, Igawa K, Munetsugu T, Fukuyama K, Nishizawa A, Takayama K, Yokozeki H. A case of sarcoidosis presenting as livedo. *Ann Dermatol*. 2014 Dec;26(6):773-4.
- 2: Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Diffuse disseminated lichenoid-type cutaneous sarcoidosis mimicking erythroderma. *Int J Dermatol*. 2014 Aug;53(8):e369-70.
- 3: 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.
- 4: Kato K, Hanafusa T, Igawa K, Tatsumi M, Takahashi Y, Yamanaka T, Katayama I. A rare case of annular pustular psoriasis associated with pemphigus foliaceus. *Ann Dermatol*. 2014 Apr;26(2):260-1.
- 5: Senda S, Igawa K, Nishioka M, Murota H, Katayama I. Systemic sclerosis with sarcoidosis: case report and review of the published work. *J Dermatol*. 2014 May;41(5):421-3.
- 6: Igawa K, Konishi M, Moriyama Y, Fukuyama K,

Yokozeki H. Erythroderma as drug eruption induced by intravesical mitomycin C therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Feb 25.

- 7: 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*. 2014 Mar;94(2):250-1.

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし