

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
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 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。これまで、遺伝的要因の関与が推測されている炎症性皮膚疾患においても、その遺伝子変異の保有率が有意に高い頻度で見られることや、in vitro での間接的な evidence の積み重ねのみでしか論ずることは不可能であった。KO マウスを作成することにより、より近い evidence を得ることはできるが、種の違いという厳然とした壁が存在し、この方面での直接的な evidence を得ることはこれまで不可能とあって差し支えない状況であった。この状況を打開するためにヒト iPS 細胞を利用することを考えた。これまで報告された遺伝子変異を挿入することにより、遺伝子変異を挿入しない細胞との厳密な比較が可能となり、その遺伝子変異がもつ意味を正確にとらえることが可能である。我々がこの方法をアトピー性皮膚炎でその変異が報告されているフィラグリン遺伝子に適用することとした。

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。

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。

上記システムが稼働することの確認

上記のヒト iPS 細胞より表皮角化細胞を誘導し 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 の切断効率はいずれの数%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

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.

8: Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3+ 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.

9: Hanafusa T, Igawa K, Kotobuki Y, Kitaba S, Tani M, Katayama I. Systemic lymphadenopathy with systemic sclerosis and Sjögren's syndrome: a case report. *J Dermatol*. 2013 Feb;40(2):124-5.

10: 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.

11: 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.

12: Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2 : therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. *Immunology*. 2013 Sep;140(1):78-86.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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