

# ヒト iPS 細胞を利用して、表皮角化細胞の様々な刺激に対する反応性にフィラグリン遺伝子の変異が与える影響について検討する

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野

井川 健

Previously, we have already successfully generated transgene-free and mutation-free human iPSCs (hiPSCs) from human dermal fibroblasts by using the piggyBac transposon system. Moreover, we successfully differentiated these hiPSCs into epidermal keratinocytes (iKCs; induced keratinocytes).

Incidentally, recent advances in the development of genome editing technologies based on programmable nucleases such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9) have substantially improved our ability to make precise changes in the genomes of human cells.

With our established systems of obtaining iKCs from hiPSCs and new technology of programmable nucleases, especially CRISPR/Cas9 system, we tried to clarify the precise effects of filaggrin gene (*FLG*) mutations in keratinocytes.

A guide RNA that targeted appropriate site of human *FLG* was designed by web-based tool and cloning into the backbone vector of CRISPR/Cas9 (*hFLG*-CRISPR/Cas9). We transfected *hFLG*-CRISPR/Cas9 into hiPSCs and obtained the several clones of hiPSCs which possessed random mutations in *FLG*. Then, original hiPSC and *FLG*-mutated hiPSCs were differentiated into epidermal keratinocytes using our established protocols and we obtained the normal iKCs and *FLG*-mutated iKCs. Under this condition, we can compare the phenotypes of normal and *FLG*-mutated iKCs of the same genetic background.

Thus, the results obtained from this system should be "true" meanings of *FLG* mutation in keratinocytes and should be important information for the understanding of AD pathogenesis.

## 1. 緒言

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<sup>1)</sup>。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、を、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。

ところで、2006年に京大の山中らによって、iPS細胞の確立が報告<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>。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も可能としている<sup>3)</sup>。

本研究では、我々が確立したヒト iPS 細胞作製から表皮角化細胞誘導、再構成表皮類似構造の作製というシステムと、遺伝子改変技術を組み合わせ、フィラグリン遺伝子変異があることによる表皮角化細胞の機能に関して、様々な外来性の刺激 (炎症性刺激や感染症関連の刺激など) に対する反応性への影響という面から、詳細に検討することを目的としている。

## 2. 方法

### 2.1. フィラグリン遺伝子変異の有無のみに違いのある一組のヒト iPS 細胞の作製

このためには、ヒト iPS 細胞において、ある程度の自在性をもって、遺伝子変異を導入するシステムの確立が必須である。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



Examination of 'true' meanings of filaggrin mutation in keratinocytes for various external stimuli

Ken Igawa

Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University

るようになっている(ゲノム編集)<sup>4)</sup>。本研究においては CRISPR/Cas9 を利用して遺伝子改変を行った。

導入する変異は、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べきであるが、システムの確立も同時並行で行う必要もあり、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た。フィラグリン遺伝子において、設定した標的配列を認識するガイド配列を作製し、CRISPR/Cas9 発現ベクターにクローニングする。このベクターをヒト iPS 細胞に導入し、DNA の 2 重鎖切断後の non homologous end joining (NHEJ) を利用したランダムな変異挿入がなされたヒト iPS 細胞を採取してくる。

## 2. 2. 表皮角化細胞への分化プロトコルの確認

このようにしてフィラグリン遺伝子に変異を導入した(ノックアウトした)ヒト iPS 細胞を、これまでに確立したプロトコルに従って表皮角化細胞に分化させる。さらには、変異を導入していないオリジナルの iPS 細胞も表皮角化細胞へ分化させ、この二つの表皮角化細胞をもって互いの差異を検討する。近年、表皮角化細胞への分化プロトコルは我々も含めて確立されたと考えられていたが、もう一度そのプロトコルについて検討、確認を行うこととした。

## 2. 3. ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞の誘導

確立したヒト iPS 細胞から、線維芽細胞を誘導した。既に報告されている方法<sup>5)</sup>を参照して作製した。

## 2. 4. ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞を利用した 3 次元培養皮膚モデルの確立

ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞(以前に

確立したもの)を利用して、3次元培養皮膚モデル作製を行った。カルチャーインサートにまず分化誘導された線維芽細胞を播種し、数日培養を行う。培養液を変更し、線維芽細胞が重層し、真皮部分を形成するようにする。その後、真皮部分の上部に iPS 細胞から誘導された表皮角化細胞を播種し、さらに培養液を変更。数日培養後、表面を空気暴露し、角化細胞の重層と角化を促した。

## 3. 結果

### 3. 1. フィラグリン遺伝子変異を有するヒト iPS 細胞の樹立

トランスポゾンシステムを利用して作成したヒト iPS 細胞において、CRISPR/Cas9 のシステムを使うことによって、フィラグリン遺伝子にヘテロで欠失をもつものを数種類樹立した(図 1)。iPS 細胞の状態においては、形態的な変化はみられない。

### 3. 2. 表皮角化細胞への分化プロトコルの確認

これまでに我々を含めて報告にある表皮角化細胞分化プロトコルに従って、ヒト iPS 細胞を分化させたところ、ことごとく失敗、という結果になった。そのため、ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導するプロトコルについて再確認を行った。以前確立したプロトコルを改変して(詳細は省く)検討したところ、図 2 に示すように、得られた細胞においては、表皮角化細胞の遺伝子発現が確認された。少なくとも表皮角化細胞の系に分化していることを確認した。

ただし、このプロトコルは、以前のプロトコルの半分の日程であり(2週間程度)、それ以上の継続培養を続けることが不可能であり、さらに、継代も不可能であった。



図 1

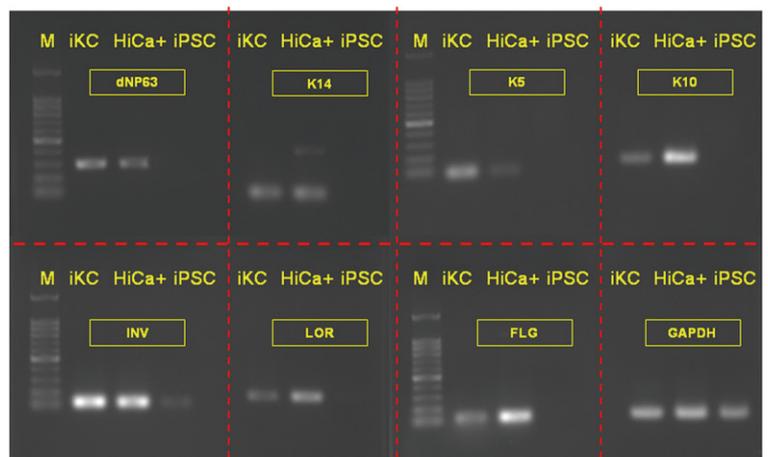


図 2

### 3.3.

ヒトiPS細胞から、すでに報告されている方法により線維芽細胞(様細胞)を誘導することができた(図3)。

### 3.4.

以前に、すでにプロトコール(フル)によって分化誘導し、保存しておいた表皮角化細胞と、今回、誘導した線維芽細胞(様細胞)を利用して、図4に示すような、真皮様構造の上に、重層化した表皮様構造をもつ構造物を作製することに成功した。

## 4. 考察／5. まとめ

本研究は、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、ということを確認に評価する、ということにつながることを期待して行ったものである。

我々が確立しているシステムとゲノム編集技術を利用した遺伝子変異挿入を組み合わせると、他の遺伝子背景は同じで、標的の遺伝子、ここではフィラグリン遺伝子を選択したが、そ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へ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。

この一組の表皮角化細胞について、様々な外来性の刺激に対する反応性の違い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ふるまいに与える影響を、本当の意味で詳細に検討することができることになる。

今回の研究では、表皮角化細胞の分化プロトコールの見直し、ならびに、研究者の所属が変わったことによる影響



図3

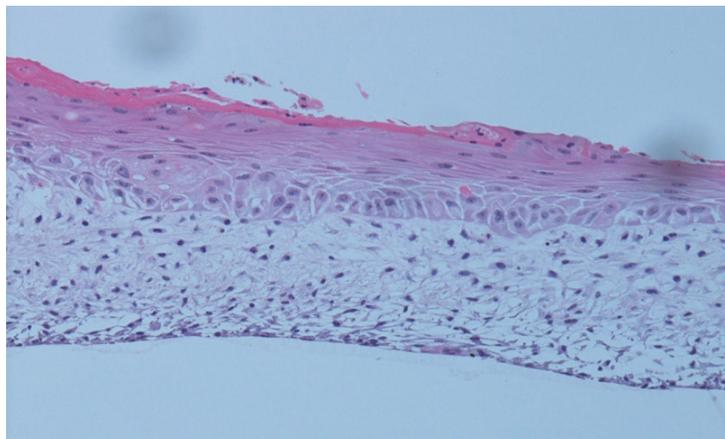


図4

もあって、フィラグリン遺伝子変異の有無による外部刺激への反応の違いについては検討することができなかったが、それを検討するための前段階までは到達することができたと考えている。

表皮角化細胞のシングルセルの状態における、細胞のふるまいを検討するのみならず、今回の研究で成功したように、より、正常の皮膚構造に近い状態（3次元培養皮膚様構造）において検討を行う用意ができたことは大きいと思われた。

ただし、先にも述べたように、表皮角化細胞への分化がうまく行われない状況がしばらく続いており、改変したプロトコルで得られた表皮角化細胞（様細胞）は、継代培養が不可能であり、3次元培養にもっていくことも不可能である。この部分においては、さらなる改変が必要であり、引き続き行う検討においては、しばらくの間は、シングルセルの状態における検討、ということになる。

このように、本研究は、アトピー性皮膚炎において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ことにつながり、さらに、その遺伝子変異が表皮角化細胞において存在することの本来の意味を知ることができると思われ、コスメトロジーにも大きな意義をもつ成果となったと考える。

#### (引用文献)

- 1) Irvine AD, McLean WH, Leung DY: Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365:1315-1327.
- 2) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- 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;3:992-1001.
- 4) Kim H, Kim JS: A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014;15:321-334.
- 5) Itoh M, Umegaki-Arao N, Guo Z, Liu L, Higgins CA, Christiano AM. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One*. 2013 Oct 11; 8 (10): e77673.