

Title	ゲノム組み込みを介さない方法を用いた劣性栄養障害型表皮水疱症ヒト表皮細胞からのiPS細胞の樹立
Author(s)	松村, 若菜
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13256号
Issue Date	2018-06-29
DOI	10.14943/doctoral.k13256
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/71253
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2421
File Information	Wakana_Matsumura.pdf



# 学位論文

ゲノム組み込みを介さない方法を用いた劣性栄養 障害型表皮水疱症ヒト表皮細胞からの iPS 細胞の 樹立

(Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes.)

2018年6月北海道大学松村 若菜

# 学位論文

ゲノム組み込みを介さない方法を用いた劣性栄養 障害型表皮水疱症ヒト表皮細胞からの iPS 細胞の 樹立

(Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes.)

2018年6月北海道大学松村 若菜

								Ē	1						次						
発表	論	文	目	録	及	び	学	会	発	表	目	録	•	•	•	•	•	•	•	•	1頁
緒言	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2 頁
略語	表	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9頁
実験	方	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	10 頁
実験	結	果	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	24 頁
考察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	42 頁
総括	お	よ	び	結	論	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	44 頁
謝辞	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	45 頁
引用	文	献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	46 頁

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

<u>Wakana Matsumura</u>, Yasuyuki Fujita, Chihiro Nakayama, Satoru Shinkuma, Shotaro Suzuki, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu

Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. Journal of Dermatological Science 89: 263-271, (2018)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

<u>Wakana Matsumura</u>, Yasuyuki Fujita, Satoru Shinkuma, Inkin Ujiie, Chihiro Nakayama, Kazuma Matsumoto, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu

Generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from keratinocytes of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015.12.9 Okayama, Japan

<u>Wakana Matsumura</u>, Yasuyuki Fujita, Satoru Shinkuma, Inkin Ujiie, Chihiro Nakayama, Kazuma Matsumoto, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu

Establishment of keratinocytes derived transgene-free induced pluripotent stem cells from recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients.

Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference, 2016.8.26 Noosa, Australia

# 緒言

# 表皮水疱症について

表皮水疱症(Epidermolysis bullosa,以下 EB と略す)は、先天的な遺 伝子異常により、生後早期よりわずかな外的刺激により全身に慢性的に水 疱、びらんの形成を繰り返す水疱性疾患である(図1).皮膚の表皮と真皮 は、表皮真皮境界部において、様々な基底膜を構成する構造タンパク質に よって接着されている(Fine et al., 2014)(図2).これらのタンパク質を コードする遺伝子変異により、表皮真皮の接着が脆弱となり EB を発症す る.EB は裂隙を形成する部位により、大きく単純型(表皮内水疱),接合 部型(表皮基底膜透明帯水疱)、栄養障害型(表皮下水疱)の3型に大別 される.旧厚生省の研究班の調査によると、国内の推定患者数は500~ 640人であり、各病型の割合は単純型32%、接合部型7%、劣性栄養障害 型33%、優性栄養障害型21%、その他7%とされている(小児慢性特定疾病 難病センター, 2018).水疱やびらん・潰瘍を繰り返すために、慢性的な疼 痛を伴い、進行性の指趾の癒着を生じることにより日常生活が困難となる ことも少なくない.さらに、難治性の患部では転移性の高い有棘細胞癌が 高率に生じることが知られている(Fine et al., 2009).

現段階で EB に対する治療法はまだ確立されていない. びらん, 潰瘍が 形成するされた部位に創傷被覆材等の処置を行う対症療法が主体であり, 長期の継続的な治療が避けられず,新しい安全かつ有効な根治的治療の開 発が望まれている.

2



# 図 1. EB の臨床像

生後より身に水疱,びらんを繰り返し,手指,足趾の癒着を認める.また 歯牙形成異常も見られる.



図 2. 表皮真皮境界部における接着タンパク質の模式図 表皮真皮境界部には様々な接着因子が存在し、これらのタンパクの先天的 遺伝子異常により表皮と真皮の接着が脆弱となる. (McMillan et al., 2003)

# 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPSC)ついて

2006 年にマウスの,2007 年にヒトの人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPSC)が樹立できることが示された(Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). *Nanog, Klf4, Oct3/4* 

(Pou5f1), Sox2, c-Myc のようなリプログラミング因子を体細胞に遺伝 子導入することにより、自己複製能や様々な自己の細胞や組織に分化でき る多分化能を有する,胚性幹細胞に類似した性質を持つ iPSC となる.受 精卵を破壊することなく多能性細胞を得られるために倫理的問題を回避可 能であること、無限の増殖能を有すること、自己体細胞由来であるために 移植する際に拒絶反応が少ないことから、様々な再生医療の分野で注目さ れている. 例えばパーキンソン病, 脊髄損傷, 変形性関節症, 虚血性心疾 患または遺伝的障害による心不全や糖尿病など多数のヒト疾患において、 再生治療の潜在的供給源とみなされている(Doulames and Plant, 2016; Ebert et al., 2015; Pagliuca et al., 2014; Wei et al., 2012; Xu et al., 2016). 患者特異的 iPSC もまた、様々な疾患を有する患者から確立されて おり、病態生理の解明、有効な薬物のスクリーニングやオーダーメイド治 療の有用なツールとなりうる.皮膚科領域では、乾癬, Hutchinson-Gilford progeria 症候群, Hermansky-Pudlak 症候群, 脂肪異栄養症など の患者特異的 iPSC が報告されている(Maguire et al., 2016; Mori et al., 2016; Ohnishi et al., 2015; Zhang et al., 2011). EB 患者の線維芽細胞由 来の iPSC や復帰変異モザイクを含む表皮角化細胞(keratinocyte, 以下 KCと略す) 由来の iPSC も報告されている(Tolar et al., 2014; Tolar et al., 2011; Umegaki-Arao et al., 2014). しかし, そのような iPSC の大部 分は Yamanaka らが最初に開発した宿主ゲノムへの組み込みを介するレト ロウィルスを使った iPSC 樹立の方法を取られていることが多い(Itoh et al., 2011; Takahashi and Yamanaka, 2006; Tolar et al., 2014; Tolar et al., 2011; Umegaki-Arao et al., 2014). iPSC を臨床応用することを検討 する上でベクターの宿主ゲノムへの組み込みを介することは、腫瘍形成の リスク(Okita et al., 2007)を伴い, 誘導された iPSC の生物学的な安全性 や適切な分化誘導を損なう危険性がある.この課題を克服するため、宿主 ゲノムへのベクター組み込みを介さない iPSC の樹立の方法が求められて いた. そこで近年センダイウイルスベクターやエピソームベクターなどが

リプログラミング技術として報告され,安全な iPSC 樹立のためのツール として期待されている(Okita et al., 2011; Zhou and Zeng, 2013).



図 3. iPSC を用いた治療戦略の模式図

自己細胞由来で拒絶反応が少ないため、多様な細胞治療の可能性がある. また遺伝子治療によって正常な遺伝子を持った iPSC を作成する事ができる.

# センダイウィルスベクターについて

センダイウイルスは、マイナス鎖 RNA ゲノムを有するパラミクソウイ ルス科のエンベロープウイルスである(Fusaki et al., 2009; Li et al., 2000). センダイウイルスのゲノム複製は、宿主 DNA と無関係に行わ れ、DNA 相を持たず宿主のゲノムに組み込まれない. それ故、センダイ ウィルスベクター (Sendai Virus Vector,以下 SVV と略す)は iPSC を 樹立する際に Yamanaka 因子 (*Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc*)を導入するた めのウィルスベクターとして、レトロウィルスなどのゲノム組み込み型の ウィルスベクターと異なり、宿主のゲノムを傷つけずに遺伝子発現を行う ことができる. その性質を利用し、安全な再生医療や忠実な疾患モデルの iPSC を作成するための最適な方法として報告され改良が重ねられてきた (Fusaki et al., 2009). これまでに 1 つのグループが SVV を用いて KC か ら iPSC を生成したことが報告されているものの(Kudva et al., 2012)、そ の誘導条件は明示されていない. KC,特に皮膚疾患 KC 由来の iPSC を確 立するための最適条件についてはほとんど検討されていない.



センダイウィルスベクター ゲノム組み込み型ベクター

図 4. センダイウィルスベクター(SVV) とゲノム組み込み 型ベクターにおける遺伝子導入の模式図

右のゲノム組み込み型ベクターでは宿主ゲノムへの組み込みを介して,目 的のタンパクの遺伝子発現を行うが,SVVは,宿主ゲノムの組み込みを介 さず目的タンパク質を発現する事ができる.図を下記のサイトを参考に作 成した。https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-

resources/research-tools/image-gallery/image-gallery-detail.19199.html

# 本研究の目的

我々の研究は、ゲノム組み込みを介さない方法の一つであるセンダイベ クター (SVV) を用いた RDEB 患者の KC から安全な iPSC を確立するこ とを目的とした.

# 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである.

bFGF: basic fibroblast growth factor

BJ-iPSC: BJ fibroblast-derived induced pluripotent stem cell

cDNA: complementary DNA

CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced palindromic

repeats/CRISPR-associated

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic acid

EB: epidermolysis bullosa

EBKC-iPSCs: epidermolysis bullosa-specific keratinocyte-derived

induced pluripotent stem cells

ES Medium: Primate ES Cell Medium

iPSC: induced pluripotent stem cell

iPSC-FB: induced pluripotent stem cell derived fibroblast

iPSC-KC: induced pluripotent stem cell derived keratinocyte

KC: keratinocyte

MEF: mouse embryonic fibroblast

MMC: mitomycin C

MOI: multiplicity of infection

NHEK: normal human epidermal keratinocyte

NHEK-iPSC: Sendai viral vector-driven induced pluripotent stem cell

from normal human epidermal keratinocyte

OCT4: octamer-binding transcription factor 4

PCR: polymerase chain reaction

PBS: phosphate-buffered saline

RDEB: recessive dystrophic epidermolysis bullosa

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SSEA-3: stage-specific embryonic antigen-3

SVV: Sendai virus vector

# 実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り,北海道大学病院倫理委員会の承認を得た(承認番号:014-0041).また参加者全てから書面による同意を得て施行した.臨床検体の取り扱いおよび臨床研究に関しては,北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け,「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した.遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した.

#### 1. 各種試料の作成

#### I. 患者および皮膚の採取

劣性栄養障害型表皮水疱症(recessive dystrophic epidermolysis bullosa,以下 RDEB と略す)の中等症汎発型 2 名の患者から皮膚を採取 した.2名の患者は c.7723G>A および c.8569G>T (症例 1)のヘテロ接 合体の変異を持つ 24 歳の日本人男性(Shinkuma et al., 2014)と c.5443G>A および c.5819delC (症例 2)のヘテロ接合体の変異を持つ 58 歳の女性である(Sawamura et al., 2005).両患者は全身に広範なびらん と潰瘍を有する (図 7).また正常コントロールとして健常人顔面の皮膚 を使用した.

皮膚採取の施行時には文章での同意を得た.皮膚はキシロカイン®注射液 1%エピレナミン(1:100000)含有(AstraZeneca)で局所麻酔し,15番 メスで切除を行い,4-0 PDS®II(ETHICON)で真皮縫合した後,4-0 NYLON(CROWNJUN)で表皮縫合した.採取した皮膚はDNA抽出, RNA抽出,初代培養にそれぞれ使用した.

#### II. 細胞と細胞培養

ヒト KC を初代培養するため,採取した皮膚は phosphate buffered saline (以下 PBS と略す, Nacalai tesque) で洗浄後に脂肪を除去し,再度 PBS で洗浄した. 1バイアルのディスパーゼ I (10,000-13,000PU/バイアル, Wako)を 10ml の KC 培養液 CnT-PR (Cellntec advanced cell systems) に溶解後,その 2ml に洗浄した皮膚を浸し,一晩 4°C で静置した. 表皮を攝子で剥離し,眼科剪刀で細かく刻み, 2ml の 0.25% Trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific) に浸し,37°C で 7 分静置した. パス ツールピペットで十分にピペッティングを行い,10% fetal bovine serum (以下 FBS と略す, Sigma-Aldrich) 含有 PBS を 6ml 加え,300×g,5

分間遠心した.上清を除き、ペレットに PBS を 5ml 加え、300×g、5 分間遠心した.上清を除き、ペレットに CnT-PR を 1ml 加えてピペッティングし、細胞を計数した上でで 5,000~10,000cell/cm<sup>2</sup>になるように CnT-PR で再混濁し、6cm ディッシュに播種した.37℃、5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーターにて培養し、培地は 2、3 日毎に培地を交換し、70~80%コンフルエントまで達した時点で継代した.以降の実験には 3~4 継代の KC を使用した.

Mitomycin C (以下 MMC と略す) 処理したマウス胚線維芽細胞 mouse embryonic fibroblasts (以下 MEF と略す) をフィーダー細胞 (ReproCell Inc.) として購入し,使用した. iPSCs のポジティブコントロールとし て,正常ヒト線維芽細胞由来 iPSCs (BJ fibroblast-derived iPSCs,以下 BJ-iPSCs と略す, RBRC-HPS0063) は,理化学研究所バイオリソースセ ンターより購入した(Takahashi et al., 2007).

#### 2. SVV の KC への感染最適化

KCから SVV を介して iPSC を樹立するための最適条件および SVV 濃度 を調べた.免疫蛍光マーカーが組み込まれた GFP-SVV (PlasmEx®-AG, ID Pharma)を multiplicities of infection (以下 MOI と略す)とし て, MOI = 1, 3, 5, 10 の条件で正常ヒト角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte,以下 NHEK と略す)に感染させる事を試みた. NHEK を CnT-PR 培地で 50,000cell/cm<sup>2</sup>の密度で 6well プレートに播種 し、37℃のインキュベーターで一晩培養した.翌日,GFP-SVV が入った らチューブの下端を 37℃の温浴に接触させ、それぞれ一部解凍後スピンダ ウンし、速やかに氷中へ移した.4本の15 ml コニカルチューブにそれぞ れ CnT-PR 1ml を入れ、GFP-SVV が MOI = 1, 3, 5, 10 となるように添加 した.数回のピペッティング後、NHEK を培養した 6well プレートに添加 し、37℃インキュベーターに静置した.GFP-SVV 曝露 24 時間後、48 時 間後に位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察し、撮影を行った(いずれも ×10).撮影した写真にて、蛍光発光している細胞および蛍光発光してい ない細胞を目視でカウントし、その割合を評価した.

#### 3. 表皮角化細胞 iPSCs の樹立

I. 遺伝子導入

リプログラミングのための 4 つの転写因子: *c-MYC*, *SOX2*, *OCT3/4 お よび KLF4* を含む SVV(Cyto-tune<sup>®</sup>-iPS2.0, ID Pharma)を用いたヒト 線維芽細胞からの iPSCs の樹立のプロトコールをヒト KC 用に一部改変し て行った. KC を CnT-PR 培地で 50,000cell/cm<sup>2</sup>の密度で 6cm ディッシュ に播種し、37℃および 5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーター中に静置して一晩 培養した.翌日, *Klf4 - Oct3/4-Sox2*, *c-Myc* および *Klf4* を搭載した 3 つ の SVV がそれぞれ入った各チューブの下端を 37℃温浴に接触させ、それ ぞれ一部解凍後スピンダウンし、速やかに氷中へ移した.15ml コニカル チューブに CnT-PR 1ml を入れ、そこに 3 種類の SVV 溶液を MOI = 5, 10 になるように Lot の力価に沿って添加した.ピペットで数回ピペッティ ングした後に KC を培養した 6cm ディッシュに添加し遺伝子導入を行っ た.その後 37℃,5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーターで 48 時間培養後 CnT-PR で培地交換し、その後も 2 日毎に培地交換した.

#### II. 培養およびクローニング

遺伝子導入の5日後に MEF を 10% FBS 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 DMEM と略す)を用いて 150,000 cells/ml 混濁液を作成 し, 10cm ディッシュに MEF 混濁液 11ml を播種した.遺伝子導入 6日 後,遺伝子導入した KC を 0.25% Trypsin-EDTA を用いて回収し, 5×10<sup>4</sup> ~1×10<sup>5</sup>cells/10mm dish になるように CnT-PR で混濁し, PBS で洗浄し た MEF 細胞上に播種した.翌日からコロニーが現れるまで、5ng/mLの basic fibroblast growth factor (以下 bFGF と略す, ReproCELL) を含む Primate ES Cell Medium (以下 ES Medium と略す, ReproCELL) で毎 日培地を交換した. 遺伝子導入後 27 日目に 24 well に 150,000 cells/mlの MEF 混濁液を 0.3ml ずつ播種して 37℃で 24 時間培養し, 培地を 5ng/ml bFGF 含有 ES Medium で培地交換した. 遺伝子導入後 28 日目に, iPSC のコロニーを 20ul マイクロピペットを用いて顕微鏡下に機械的に1コロ ニー毎に採取し、前日に MEF を播種した 24 well プレート上に1コロニー /well で播種して培養し, iPSC のクローニングを行った. さらに 5ng/ml bFGF 含有 ES Medium で毎日培地交換した. iPSC は以下の実験のため に 8~30 継代の iPSC を使用した.

#### 4. iPSC の品質評価

I. iPSC の AP 染色および免疫蛍光抗体法

#### ① アルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼ活性の確認のために、アルカリフォスファター ゼ染色(以下 AP 染色と略す)キット(AP100R-1, System Bioscience) を製品プロトコールに従って施行した.12wellディッシュで培養したコロ ニーを4%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、PBSで洗浄した.固 定したコロニーを基質溶液と共に暗所で15分間室温反応させた.基質溶 液を除去後、細胞を PBS で洗浄し、PBS で覆った.染色した細胞を光学 顕微鏡を用いて観察した.

#### ② 免疫蛍光抗体法

免疫蛍光抗体法のために培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間室温で固定した. 10%ヤギ血清 0.1%Triton X-100/PBS を用いて 1 時 間室温でブロッキングした後, 1次抗体を室温で 1 時間または 4℃で一晩 反応させた. PBS で 3 回洗浄した後, 2次抗体を室温で 1 時間反応させ た. 核染色のために, 細胞を 4',6-diamidino-2-phenylindole (以下 DAPI と略す)溶液と室温で 5 分間反応させた. 共焦点顕微鏡法を使用して, コ ロニーを観察した. 未分化性評価の実験に用いた一次抗体は, 抗 NANOG 抗体 (EPR2054, System Biosciences), 抗 OCT4 抗体 (EPR2027 (2), System Biosciences), 抗 TRA-1-60 抗体 (TRA-1-60, System Biosciences), 抗 SSEA-3 抗体 (MC-631, System Biosciences) を使用し いずれも 3%ヤギ血清 0.1%Triton X-100/PBS 100 倍希釈して反応させた た. 2 次抗体は, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-mouse IgG (H+L) (A-11001, Thermo Fisher Scientific)を使用した. いずれも 3%ヤ ギ血清 0.1%Triton X-100/PBS 1000 倍希釈して反応させた.

### II. Reverse transcription polymerase chain reaction (以下 RT-PCR と略 す)

#### ① RNA 抽出および cDNA への逆転写

全 RNA を, RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞ペレットから製品のプロトコールに従って抽出し, DNase/RNase free water に溶出させた. SuperScript<sup>®</sup> IV 逆転写酵素および Oligo dT プライマー

(Invitrogen)を使用し、製品のプロトコールに従って total RNA 100ng から cDNA を合成した. RNA 100ng, 50µM Random hexamer 1µl, 10mM dNTP mix 1µl (いずれも Thermo Fisher Scientific)を 0.2ml polymerase chain reaction (以下 PCR と略す)チューブに加え、滅菌水 を加えて合計 14.3µl になるよう調整した. 65°C 5 分で反応後,氷上で 1 分間急冷した. SuperScript<sup>®</sup> IV 逆転写酵素(200 units/µl)0.2µl, RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 0.5µl , 5×First-Strand Buffer 4µl および 0.1M dithiothreitol 1µl(いずれも ThermoFisher Scientific)を混 合し,23°C 10 分,55°C 15 分,80°C 10 分反応させた. RNase H(1 U/µl, ThermoFisher Scientific)を 1µl 加えて 37°C で 20 分反応させ, cDNA へ逆転写した.

#### 2 RT-PCR

全ての PCR 反応液は AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) の PCR 反応用に調製し Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler

(Applied Biosystems)を用いて反応させた.以下の PCR を行った:
PCR 増幅反応は、96°C 10 分×1 サイクル→(96°C 30 秒→60°C 30 秒→55°C 30 秒)×35 サイクル→72°C 7 分×1 を 30 サイクルで行った全てのプライマー配列を表1に列挙する. RT-PCR サンプルを 1.5%アガロースゲルで分析し、BioDoc-It System (UVP)で観察した.

#### III.iPSC の in vitro での分化能

#### ① 胚葉体アッセイ

既報告のプロトコール(Itoh et al., 2011)を用いて *in vitro* での三胚葉への 分化実験(胚葉体アッセイ)を行った. 培養した iPSC のコロニーを PBS で洗浄しヒト iPSC 剥離液 Dissociation Solution for human ES/iPS Cells

(ReproCELL) で 3 分間処理し, ES Medium で中和した. 15ml コニカ ルチューブにコロニーを回収し 7 分間静置後, 沈殿した細胞塊を除去しな いように上清のみを除去した. iPSCs の細胞塊を壊さないように bFGF を 含まない ES Meidum でゆっくり混濁し, 低接着性の 10cm ディッシュに 浮遊させて 37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件でにて培養した. 2日毎に培地を交換 し, 2週間後, 胚様体の形成を確認し, ゼラチンでコーティングされた 4well チャンバースライド 1 ウェルあたり 4~6 個の胚葉体を入れ, 同じ培 地でさらに 8~10 日間培養した.

#### ② 免疫蛍光抗体法

胚葉特異的マーカーの発現を調べるために,免疫蛍光抗体法を行った.こ れらの細胞を分化能を評価した実験での一次抗体は抗 beta III tubulin 抗 体 (ab18207, Abcam),抗α1 fetoprotein 抗体 (ab3980, polyclonal type I collagen),抗 vimentin 抗体 (sc-6260, Santa Cruz Biotechnology,) でいずれも 100 倍希釈で反応させた.4%パラホルムアル デヒドで 15 分間室温で固定した. 10%ヤギ血清 PBS を用いて 1 時間室温 でブロッキングした後,一次抗体を 4℃で一晩反応させた. PBS で 3 回洗 浄した後,二次抗体を室温で 1 時間反応させた. 2 次抗体は Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008), Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat antimouse IgG (H+L) (A-11001), Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-rat IgG (H+L) (A-11001)のいずれかを使用した. いずれも 3%ヤギ血清を含有した PBS で 1000 倍希釈して反応させた. 核染色のために, DAPI 溶液と室温で 5 分 間反応させた. 共焦点顕微鏡法を使用して,細胞を観察した.

#### IV. iPSCs の in vivo での分化能

#### ① テラトーマアッセイ

全ての動物の処置は承認された手順で行い,北海道大学動物衛生学利用委 員会のガイドラインに従って実施した.1,000,000 細胞の iPSC コロニー を,ヒト ES / iPSC (ReproCELL) の Dissociation Solution for human ES/iPS Cells により処理し, Matrige<sup>®</sup> (Corning) に混濁し免疫不全マウ ス (CB-17/I cr-scid/scidJcl, CLEA Japan)の皮下に注射した.注射2ヶ 月後に触診でマウスの皮下腫瘍を確認し,腫瘍を摘出しホルマリン固定を 行った.そして 皮下腫瘍パラフィン切片の HE 染色を行い,光学顕微鏡 で観察し, *in vivo* における3つの胚葉全てへの分化能力を評価した

#### V. iPSCs の DNA メチル化の評価

#### ① bisulfate 反応

NANOG プロモーター領域における CpG アイランドのメチル化状態を評価するために,既報告の DNA メチル化アッセイの方法を使用した(Itoh et al., 2011). QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen)を用いて細胞から抽出したゲノム DNA 0.4µg を EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)で処理して bisulfate 反応させた.

#### $\bigcirc$ PCR

NANOG 遺伝子のプロモーター領域は, *NANOG* methylation forward プ ライマーおよび reverse プライマー(表 1)を用いて PCR により増幅し た.

ゲノム DNA (100ng/µl) を 2µl, forward, reverse プライマー

(10µmol/l) をそれぞれ 4µl, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 25µl を 0.2ml PCR チューブに入れて, サーマルサイクラーVeriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて増幅した. PCR 増幅反 応は, 96°C 10 分→ (96°C 30 秒→56°C 30 秒→72°C 84 秒) ×35 サイクル →72°C 7 分で行った.

#### ③ クローニング

増幅された PCR 産物を QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen)を用 いて精製した. 精製した PCR 産物を pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>Vector (Invitrogen) を用いてでライゲーションし, *E. coli* HST08 Premium Competent Cells

(Takara Bio)を用いてトランスフォーメーションした後,アンピシリン プレートを用いた倒置培養にてクローニングを行った.

#### ④ コロニーPCR

0.2ml 96well プレートに forward, reverse プライマー (*NANOG* methylation) (表 1) (10µmol/l) をそれぞれ 1.6µl, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 10µl を入れて, サーマルサイクラーVeriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて増幅した. PCR 増幅反応は, 96°C 10 分→ (96°C 30 秒→60°C 30 秒→72°C 30 秒) ×35 サイクル→ 72°C 7 分で行った.

#### ⑤ シーケンス解析

増幅された PCR 産物を ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-UP

(Affymetrix)を用いて精製し、96°C 2 分→(96°C 10 秒→50°C 5 秒→ 60°C 4 分)×25 サイクルの条件でシークエンス反応を行った.精製後の PCR 産物のエタノール沈殿を行い、ABI PRISM 3130xl 遺伝子アナライザ - (Thermo Fisher Scientific)でシーケンス解析し、メチル化状態を評価 した.

#### VI. 核型解析

Quinacrine を用いた標準Qバンド染色体分析を既報告されている方法に 従い行った(Takahashi and Yamanaka, 2006; Wei et al., 2012). 10 継代 目の分裂中期の iPSC を顕微鏡を用いて 50 個評価した.

#### 5. iPSC から KC および線維芽細胞への分化誘導

#### I. KCへの分化誘導

#### ① 分化誘導

iPSC から KC への分化実験は既報告のプロトコールに従って行った (Pagliuca et al., 2014). Geltrex<sup>®</sup> (GIBCO BRL) および I 型コラーゲン (Advanced BioMatrix) でコーティングした 6well ディッシュに iPSC の 細胞塊 10ng/ml の bFGF を含む ES Medium に混濁して播種した.翌日, 最終濃度として 1mM all-trans retinoic acid (Sigma Aldrich) および 10ng/mlのbone morphogenetic protein 4(以下 BMP4と略す, R&D Systems) が含有している defined keratinocyte serum-free medium

(DKSFM) (Invitrogen) で培地交換し, iPSC 由来 KC (induced pluripotent stem cell derived keratinocyte, 以下 iPSC-KC と略す) への 分化誘導を開始し,誘導開始2日目にも同培地で培地交換を行った.誘導 開始14日目に、培地をCnT-PRに切り替えた. その後誘導開始21日目~ 28 日目に継代した.



#### 図 5. iPSC から KC への分化誘導プロトコール

② 蛍光抗体法

免疫蛍光抗体法の 分間室温で固定した 間室温でブロッキン 反応させた. PBS た. 核染色のために 点顕微鏡法(LSM 察した. KC への分 138,Convance), 抗 KR 💐 ype VII

ルデヒドで15 Sを用いて1時 たは4℃で一晩 時間反応させ 応させた.共焦 コロニーを観

collagen 抗体 (8J1054, 1:100, USBiological)を使用しいずれも 100 倍希釈 で行った. Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008), Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-mouse IgG (H+L) (A-11001), Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-rat IgG (H+L) (A-11001)のいずれかを使用した.いずれも 3%ヤギ血清 0.1% Triton X-100/PBS 1000 倍希釈して反応させた.

#### 3 RT-PCR

RNA 抽出および cDNA 合成 i.

RNA を, RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞ペレットから製品 のプロトコールに従って抽出し, DNase/RNase free water に溶出させ

17

た. SuperScript<sup>®</sup> IV 逆転写酵素および Oligo dT プライマーを使用し,製品のプロトコールに従って total RNA 100ng から cDNA を合成した. RNA 100ng, 50µM Random hexamer 1µl, 10mM dNTP mix 1µl を 0.2mlPCR チューブに加え,滅菌水を加えて合計 14.3µl になるよう調整し た. 65°C 5 分で反応後,氷上で 1 分間急冷した. SuperScript<sup>®</sup> IV 逆転写 酵素 (200 units/µl) 0.2µl, RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 0.5µl, 5×First-Strand Buffer 4µl および 0.1 M dithiothreitol 1µl (いず れも ThermoFisher Scientific) を混合し, 23°C 10 分, 55°C 15 分, 80°C 10 分反応させた. RNase H (1U/µl) (ThermoFisher Scientific) を 1µl 加えて 37°C で 20 分反応させ, cDNA へ逆転写した.

ii. RT-PCR

全ての PCR 反応液は Amplitaq<sup>®</sup> Gold Master Mix の PCR 反応用に調製 し Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler を用いて反応させた.以下の PCR 反応 を行った: PCR 増幅反応は,96°C 10 分×1 サイクル→(96°C 30 秒→ 60°C 30 秒→55°C 30 秒)×35 サイクル→72°C 7 分×1 を 30 サイクルで行 った.全てのプライマー配列を表 1 に列挙する.RT-PCR サンプルを 1.5%アガロースゲルで分析し,BioDoc-It System (UVP)で観察した.

#### II. 線維芽細胞への分化誘導

#### 線維芽細胞の分化誘導

iPSC 由来線維芽細胞(induced pluripotent stem cell derived fibroblast, 以下 iPSC-FB)は、既報告のプロトコールに若干の改変を加えて行った (Ebert et al., 2015). iPSC(継代 12)を線維芽細胞に直接分化誘導する ために、低結合性ディッシュ上で 0.3mM アスコルビン酸(Sigma Aldrich), 10ng/ml transforming growth factor-b2(以下 TGF-b2 と略 す, R&D systems)および ITS-A Supplement(Invitrogen)を含有す る bFGF を含まない Primate ES 細胞培地で胚様体を作製した. 胚様体を ゼラチンコートした 6well ディッシュに付着させ、アスコルビン酸および 20% FBS が添加された DMEM 中で 10 日間培養して、iPSC-FB への誘 導を行った. 10% FBS 添加 DMEM へ培地を変更し、週に 1 回の継代を 行い紡錘形細胞を得た.



TGF $\beta$ 2: Transforming growth factor- $\beta$ 2 ITS-A: Insulin-transferrin-selenium-A supplement

#### 図 6. iPSC から線維芽細胞への分化誘導プロトコール

#### ② 免疫染色

免疫蛍光抗体法のために 分間室温で固定した.10% ングした後,1次抗体を4 2次抗体を室温で1時間反 と室温で5分間反応させた

次抗体抗は, type I collagen 元本 (ab54710, Abcam), 元 type III collagen (ab7778, Abcam) でいずれも 100 倍希釈で施行した. 2 次抗体 は Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ab150077), Goat anti-mouse IgG (H+L) (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ab2556548), Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ab2556544)を使用し, いずれも 1000 倍希釈で施行した.

#### ③ RT-PCR

i. RNA 抽出および cDNA 合成

RNA を, RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit を用いて細胞ペレットから製品のプロトコ ールに従って抽出し, DNase/RNase free water に溶出させた. SuperScript<sup>®</sup> IV逆転写酵素および Oligo dT プライマーを使用し, 製品の プロトコールに従って total RNA 100ng から cDNA を合成した. RNA 100ng, 50µM Random hexamer 1µl, 10mM dNTP mix 1µl を 0.2mlPCR チューブに加え, 滅菌水を加えて合計 14.3µl になるよう調整した. 65°C 5 分で反応後, 氷上で 1 分間急冷した. SuperScript<sup>®</sup> IV 逆転写酵素 (200 units/µl) 0.2µl, RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 0.5µl, 5× First-Strand Buffer 4µl および 0.1M dithiothreitol 1µl を混合し, 23°C 10 分, 55°C 15 分, 80°C 10 分反応させた. RNase H (1U/µl)

(ThermoFisher Scientific)を 1µl 加えて 37°C で 20 分反応させ, cDNA へ逆転写した.

#### ii. RT-PCR

全ての PCR 反応液は Amplitaq<sup>®</sup> Gold Master Mix の PCR 反応用に調製 し Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler を用いて反応させた.以下の PCR 反応 を行った: PCR 増幅反応は,96°C 10 分×1 サイクル→(96°C 30 秒→ 60°C 30 秒→55°C 30 秒)×35 サイクル→72°C 7 分×1 を 30 サイクルで行 った.全てのプライマー配列を表 1 に列挙する.RT-PCR サンプルを 1.5% アガロースゲルで分析し,BioDoc-It System (UVP)で観察した.

#### 表 1. 本実験に用いたプライマー配列

本実験で用いたプライマーは、Cyto-tune<sup>®</sup>-iPS2.0 のプロトコールおよび 次の文献を参考に作成した。(Itoh et al., 2011; Itoh et al., 2013)

プライマー名		配列 (5´→3´)
SeV	Forward	GGATCACTAGGTGATATCGAGC
	Reverse	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
endo- cMYC	Forward	TTCGGGTAGTGGAAAACCAG
	Reverse	CAGCAGCTCGAATTTCTTCC
endo- SOX2	Forward	ACACCAATCCCATCCACACT
	Reverse	GCAAACTTCCTGCAAAGCTC
endo- OCT4	Forward	GTACTCCTCGGTCCCTTTCC
	Reverse	GTACTCCTCGGTCCCTTTCC
endo- KLF4	Forward	CCCACACAGGTGAGAAACCT-
	Reverse	TTCTGGCAGTGTGGGTCATA

DDPA4	Forward	GGGTTCACCTGCAGTTTCAT
	Reverse	TCTCCAGCTTTTCTGCCATT
ESG1	Forward	CCGAAGACCTGAAAGATCCA
	Reverse	GACTGGAGCATCCACTTGGT
LIN28	Forward	TGAGGCAGTGGAGTTCACCT
	Reverse	CTTGCATTCCTTGGCATGAT
NANOG	Forward	GATTTGTGGGCCTGAAGAAA
	Reverse	AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG
REX1	Forward	TTGGAGTGCAATGGTGTGAT
	Reverse	TCTGTTCACACAGGCTCCAG
TDGF1	Forward	ACAGAACCTGCTGCCTGAAT
	Reverse	ATCACAGCCGGGTAGAAATG
TERT	Forward	GCGTTTGGTGGATGATTTCT
	Reverse	CAGGGCCTCGTCTTCTACAG
ZIC3	Forward	CCCACACAGGTGAGAAACCT
	Reverse	TATAGCGGGTGGAGTGGAAG
KRT5	Forward	ACCGTTCCTGGGTAACAGAGCCAC

	Reverse	GCGGGAGACAGACGGGGTGATG
KRT14	Forward	GCAGTCATCCAGAGATGTGACC
	Reverse	GGGATCTTCCAGTGGGATCT
CD10	Forward	GCAAGTGGCGAAGCTTGACCG
	Reverse	AGGACCGAGAGGCTGATCTCCAGT
CD73	Forward	TGGCTCCTCTCAATCATGCCGCT
	Reverse	GGCGACCGGATACCACCTCCA
COL1A1	Forward	GTGCTCGTGGAAATGATGGT
	Reverse	CTCCTCGCTTTCCTTCCTCT
COL3A1	Forward	GCAAAGATGGAACCAGTGGA
	Reverse	AACACCACCACAGCAAGGAC
B2M	Forward	CCCAAGATAGTTAAGTGGGATCG
	Reverse	AAGCAAGCAAGCAGAATTTGG
NANOG methylation	Forward	TGGTTAGGTTGGTTTTAAATTTTTG
	Reverse	AACCCACCCTTATAAATTCTCAAT
Δ Np63	Forward	GGAAAACAATGCCCAGACTC
	Reverse	GTGGAATACGTCCAGGTGGC

ITGB4	Forward	TGGAAGTACTGTGCCTGCTG
	Reverse	TGCATGTTGTTGGTGACCTT
LAMB3	Forward	AACGGCAGAACACACAGCAAGGAAA
	Reverse	ACCGGGTCCTCCCAACAAGCA
KRT18	Forward	CTCTGTCCAGGCGCCCAGCT
	Reverse	CCCCTGAAGCTGGTGGAG

# 実験結果

#### 1. 症例の臨床像

症例1はRDEBの中等度 c.7723G>A および c.8569G>T のヘテロ接合体 の変異を持つ24歳の日本人男性である.症例2はRDEBで c.5443G>A および c.5819delC(症例2)のヘテロ接合体の変異を持つ58歳の女性で ある.(図7)





# 症例 1

# 症例 2

図7.患者の臨床像

両患者は全身に広範なびらんと潰瘍を有する.

 SVV を KC に感染させ、iPSC を樹立するために少なくとも MOI = 5 が必要である

SVV は MOI = 3 で皮膚線維芽細胞に効率的に(約 100%)遺伝子導入 されることが報告されている(Fusaki et al., 2009). NHEK に対して MOI = 3 で GFP-SVV に感染させたところ,48 時間後には約 47%の感染率にと どまっていた.そこで MOI = 5 に GFP-SVV 濃度を上げたところ,70~ 80%の細胞が感染していた(図 8,9).また MOI = 10 においてアポトー シスを示唆する膨化した細胞が散見されたが,MOI = 1,3,5 では膨化した 細胞はごく少数認めるのみであった.したがって,SVV 由来 iPSC を効率 的に樹立する際に,KC に感染させるためには MOI = 5 が必要であると結 論づけた.



図 8.GFP-SVV に感染した NHEK の蛍光顕微鏡による観察 高い MOI では GFP 陽性細胞が多いが, MOI が高値になれば, 膨化した 細胞も散見される. Scale bar = 200µm



図 9.MOI 毎の GFP-SVV 感染 NHEK の割合の評価 GFP-SVV を NHEK に MOI = 1, 3, 5, 10 で感染させ, 24 時間, 48 時 間後に観察し, SVV に感染している NHEK の割合を評価した. 高い MOI でより感染細胞が増えている. MOI = 5 では, 70%~80%の細胞が感染し ている.

3. SVV を用いた NHEK への遺伝子導入によって形態学的に iPSC 様コロニーの出現を確認した 次に我々は、4 つの Yamanaka 因子 (*Oct3/4, Sox2, Klf4* および *c*-*Myc*, CytoTune<sup>®</sup>-iPS 2.0, ID Pharma) をコードする SVV を MOI = 5, MOI = 10 で NHEK に感染させた. これらの細胞を 3T3 フィーダー細胞を 含むディッシュに播種し、翌日培地を ES 培地に変更して 6 日間培養し た. SVV 感染の 2 週間後に、小さくて辺縁の境界がはっきりした、密度 の高い iPSCs 様の細胞集団を確認した. (図 10), さらに SVV 感染後 3~ 5 週間でそれぞれのコロニーをパスツールピペットで採取し、クローニン グした (図 12). 得られた iPSC 様コロニーは、実質的な自発分化を伴わ ずに拡大し、形質導入された NHEK の 10<sup>5</sup> 細胞あたり 2~10 クローンが 出現し、その誘導効率は線維芽細胞由来 iPSCs よりわずかに低かった (Fusaki et al., 2009). これらの iPSC 様コロニーは、少なくとも 30 継代 の間、分化傾向なく培養および維持することができた.

次に、SVV 感染が一時的であることの証明、すなわち継代中に SVV が iPSC 様コロニーから消失するかどうかを調べるために、各時期の誘導細 胞から RNA を抽出し、SVV 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行っ た. NHEK 由来の iPSC 様コロニーは 1 継代目および 3 継代目で SVV RNA ゲノムを保持し、SVV RNA は継代 7 継代目で検出されなくなった (図 11).



### NHEK-iPSCs #2

図 10. 偏光顕微鏡による iPSC ようコロニーの観察 SVV の遺伝子導入後,細胞の形態変化が起こり,小さな境界明瞭な密度の 高い細胞塊を形成していることが確認できた. Scale bar = 200µm



図 11. RT-PCR を用いた継代による SVV 消失の評価 P3 までは SVV のバンドを認めるが P7 以降はバンドが消失している D/W: 蒸留水(negative control)

#### 4. NHEK から樹立した iPSC の品質評価

NHEK から樹立した iPSC (induced pluripotent stem cells from normal human epidermal keratinocyte,以下 NHEK-iPSC と略す)の性 質を免疫組織化学的に検証するために,幹細胞特異的マーカーの発現を確 認した (図 12). これらのコロニーは,多能性マーカーNANOG, octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), stage-specific embryonic antigen 3 (SSEA-3))は陽性であり,また AP 染色でも陽性で あった. これらの結果は,ポジティブコントロールとして用いた従来の線 維芽細胞由来 iPSC (BJ-iPSC) と同様であった.

また,RT-PCR による NHEK-iPSC の幹細胞マーカーの発現を調べたと ころ,iPSC の発現パターンと一致したが,KC 特異的なマーカーである *KRT5* および *KRT14* の mRNA の発現は見られなかった(図 13).さらに DNA メチル化アッセイにおいて NHEK-iPSC は,明らかに BJ-iPSC と同 様に,*NANOG* プロモーター領域の多くがメチル化されていないことを示 した(図 14).さらに,これらの細胞が正常な核型を有しており,iPSC 樹 立に際して染色体異常をきたさないことを確認した(図 15).

最終的に、NHEK-iPSCの胚様体アッセイによる分化能の評価は, in vitro で外胚葉,中胚葉および内胚葉の3つの胚葉すべてへの分化を示し,

NHEK-iPSC の免疫不全マウスへの皮下注射によって三胚葉の成分を有す る奇形腫を形成した(図16).これらの結果から我々は,SVV を介した NHEK が iPSC としての適切な特性を有することを最終的に確認した.



図 12. NHEK-iPSC の免疫蛍光抗体法による未分化マーカーの 評価

NHEK から樹立した iPSCs は AP 染色で陽性, NANOG, OCT4, SSEA3, TRA-1-60 の免疫染色で BJ-iPSC と同様に陽性を示した. Scale bar = 200µm

28



図 13. NHEK-iPSC の RT-PCR による幹細胞マーカーの評価 NHEK から樹立した iPSC は BJ-iPSC と同様に幹細胞マーカーの発現を 認め, *KRT5*, *KRT14* は消失している.



図 14.メチレーションアッセイによる NANOG プロモーター領 域 CpG のメチル化の評価

NHEK から樹立した iPSCs は SVV 感染前の NHEK と比較して, リプロ グラミングにより脱メチル化が起こっていることを示した.



図 15. NHEK-iPSC の Q バンド解析 明らかな染色体異常はみられず正常な核型を示している.



図 16. NHEK-iPSCs の多分化能の評価

NHEK-iPSCs をテラトーマアッセイと胚葉体アッセイで多分化能を評価 したところ,外胚葉・中胚葉・内胚葉に分化することを確認した. Scale bar = 200µm

# 5. RDEB 患者の KC から SVV を使って樹立した iPSC は, 適切 な iPSC であることを証明した

次に我々は、NHEK と同様に、RDEB 患者の KC から iPSCs を樹立す ることを試みた.

中等症汎発型の RDEB2 人の患者(図7)から KC をを初代培養し、 NHEK-iPSC を確立する際と同一のプロトコールを用いて, EB 特異的 KC 由来 iPSC (epidermolysis bullosa-specific keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells, 以下 EBKC-iPSC と略す)の誘導を試みた. 症例 1の50,000 個の細胞から3 個の iPSC のクローンを樹立し、ケース2の 100,000 個の細胞から 7 個のクローンを樹立した (MOI = 10). また RT-PCR により 4 継代目以降の EBKC-iPSC で SVV の消失を確認した. これ らの iPSC 様コロニーは、少なくとも 30 継代まで分化傾向を示さず維持す ることができた. これらの EBKC-iPSC は全て形態学的に BJ-iPSC と類似 しており、多能性マーカータンパク質および AP 染色陽性を示した(図 18). さらに RT-PCR 解析では, EBKC-iPSC において iPSC として適切な 幹細胞関連マーカーの遺伝子発現,および KRT5 の遺伝子発現の低下を確 認した(図 19). NANOGプロモーター領域の DNA メチル化アッセイで は、EBKC-iPSC 中のプロモーター領域が高度に非メチル化されているこ とを示した (図 20). また EBKC-iPSC の核型は正常であることを確認し た (図 21). さらに, これらの EBKC-iPSC は, *in vitro* および *in vivo* で 3つの胚葉すべてに分化できることを証明した(図22).これらの結果よ り, SVV を使用することによって正常および RDEB 患者の KC から,ゲ ノムへの遺伝子組み込みのない iPSC を樹立できることを示すことができ た.



図 17. EBKC-iPSC の継代による SVV の消失 P4 以降は SVV のバンドは消失している. D/W: 蒸留水(negative control)



図 18. EBKC-iPSC の免疫蛍光抗体法による未分化マーカー染色 EBKC から樹立した iPSC は AP 染色で陽性, NANOG, OCT4, SSEA3, TRA-1-60 の免疫染色で陽性を示した. Scale bar = 200µm



図 19. EBKC-iPSC の RT-PCR による幹細胞マーカーの評価 EBKC から樹立した iPSCs は BJ-iPSCs と同様に幹細胞マーカーの発現を 認め, *KRT5*, *KRT14* は消失している.





図 20.メチレーションアッセイによる NANOG プロモーター領 域 CpG のメチル化の評価

EBKC から樹立した iPSC は SVV 感染前の NHEK と比較して, リプログ ラミングにより脱メチル化が起こっていることを示した.

EBKC-iPSCs 症例2 #1



図 21. EBKC-iPSC の Q バンド解析 明らかな染色体異常はみられず正常な核型を示している.



図 22. 多分化能の評価

EBKC 由来 iPSCs をテラトーマアッセイと胚葉体アッセイで多分化能を 評価したところ外胚葉,中胚葉,内胚葉に分化することを確認した. Scale bar = 200µm

# 6. SVV を介して樹立した iPSC は, KC および線維芽細胞を誘導 可能である

将来の難治性皮膚疾患に対する iPSC を応用した再生医療を見据える と, iPSC を KC や線維芽細胞に分化させ,皮膚培養シート等として臨床 応用が可能かどうか,あるいはその分化誘導させた細胞が VII 型コラーゲ ンなどの皮膚基底膜蛋白質を産生するかどうかを検証することが重要であ る.そこで次に我々は,樹立した NHEK-iPSC および EBKC-iPSC が皮膚 の細胞,特に VII 型コラーゲンを産生する能力を有する線維芽細胞および KC に分化する可能性を有するかどうかを検討した.

まず我々は、樹立した iPSC の KC への分化実験を試みた(図 6).分化 誘導開始から 6 週間までにシート状に増殖する多角形の細胞が得られた (図 23). 症例 1 の EBKC-iPSC 由来 KC については、さらなる解析を行 った.この iPSC 由来 KC は免疫蛍光浅色にて KRT5, KRT14,および比 較的弱い VII 型コラーゲンを発現した(図 24). RT-PCR においては、こ の iPSC 由来 KC が、Δ Np63, IGTB4, LAMB3, KRT5 および KRT14 のような KC 特異的マーカーを発現したが、SOX2, OCT4 および NANOG のような幹細胞関連マーカーの発現が欠損していることを示した (図 25)

また我々は、以前に Itoh らが用いたプロトコールに従って、これらの iPSC を線維芽細胞に分化させることを試みた(図 6)(Itoh et al., 2013). 分化誘導開始から 4 週間までに、ディッシュ接着性に増殖する紡錘形細胞 を得た(図 23).この細胞は、免疫染色で I 型コラーゲン、III 型コラーゲ ンおよび vimentin を発現し、線維芽細胞であることが確認された(図 24). VII 型コラーゲンの免疫蛍光は比較的弱く認めたが、これは *COL7A1* 変異を有する患者由来線維芽細胞の染色パターンと一致してい た.RT-PCR 分析により、これらの iPSC 由来線維芽細胞は、*SOX2* およ び *OCT4* などの幹細胞関連 mRNA 発現を低下を認めたが、*CD10、 CD73、COL1A1* および *COL3A1* の線維芽細胞マーカーは発現が増加して いた(図 25).

結論として, 我々は, NHEK-iPSC および EBKC-iPSC がともに *in vitro* で線維芽細胞および KC に分化しうることを証明した.



図 23. iPSC から分化誘導 した **K** iPSC から KC に分化誘導した細胞を位相差顕微鏡で観察したところ,多 角形のシート状に増殖する KC 様細胞を認めた. Scale bar = 200µm



iPSC から分化誘導した KC 細胞様細胞は NHEK と同様に抗 KRT5 抗体, 抗 KRT14 抗体,抗 type VII collagen 抗体に陽性を示した. Scale bar = 100µm





図 25. 分化誘導した iPSC 由来 KC の RT-PCR による評価 iPSC 由来 KC 様細胞は iPSCs で発現を認めていた SOX2, OCT4, NANOG, TERT は発現の低下を認め, △Np63, ITGB4, LAMB3, KRT5, KRT14 の発現上昇を認めた.











iPSCs由来線維芽細胞

図 27. 分化誘導した iPSC 由来線維芽細胞の免疫蛍光抗体法に よる特異マーカーの評価

抗 type I collagen 抗体, 抗 type III collagen 抗体, 抗 type VII collagen 抗体, 抗 type VII collagen 抗体, 抗 vimentin 抗体で免疫染色したところ正常線維芽細胞と同様に陽 性を示した. Scale bar = 100µm







8. 分化誘導した iPSC 由来線維芽細胞の RT-PCR 解析 目来線維芽細胞は,分化誘導によって iPSCs で発現していた幹細胞 ・カーである SOX2, OCT4 は発現が低下し, CD10, CD73, COLA1,

*COL3A1*の発現の上昇を認めた.

# 考察

本研究では、KC からの SVV を用いて iPSC を誘導する方法を最適化した. これらの SVV を使用した KC 由来 iPSC は、iPSC としての必要な特徴をもち、また多能性を有することを証明した. さらに、我々は、RDEB 患者 KC 由来の SVV を使用した遺伝子組み込みのない iPSC を樹立した. これらの iPSC もやはり多能性をもち、線維芽細胞と KC に分化できる性質を有することを証明した.

RDEBは、表皮と真皮とを強固に結合する係留線維の主成分 VII 型コラ ーゲンをコードする COL7A1 遺伝子変異により、係留線維の機能が低下・ 喪失することで引き起こされる遺伝性皮膚疾患ある(Fine et al., 2014). 係留線維は、表皮を下層の真皮に接着させる働きをしているため、皮膚に 機能的な強靭さを与えている.したがって、先天的な VII 型コラーゲンの 欠損や異常は、生後間もなくから生涯続く皮膚の脆弱性、反復性の水疱形 成、全身のびらんを引き起こす(Shimizu et al., 1996).現段階では水疱、 びらんに対しての治療は対症療法主体で根治的な治療法は確立されていな い.

iPSC は自己複製能および多分化能を有するため、様々な先天的な疾患 において自己の細胞を用いた再生医療や疾患の病態解明のモデルとして応 用することが期待されている.これまでに疾患特異的 iPSC も多く報告さ れており、EB 患者特異的 iPSC もいくつかのグループから報告されてい る.Tolar らは、RDEB 患者の皮膚線維芽細胞由来およびの KC 由来の iPSC を世界で初めて樹立した(Tolar et al., 2011).また近年 EB 患者にお いて、病原性遺伝子変異が後天的に正常化する現象(復帰変異モザイク) が報告されており、2 つのグループが、復帰変異モザイク KC から iPSC を樹立することに成功している(Tolar et al., 2014; Umegaki-Arao et al., 2014).

一方でこれらの報告は, iPSC 誘導のためにゲノム組み込みを伴うレト ロウイルスベクターを介している.このため,特に臨床応用を見据えた際 に,宿主のゲノムを傷つけることによる潜在的な腫瘍形成のリスクを排除 できない.これを回避する方法として,SVV やエピソームベクターなど, いくつかの宿主ゲノムへの遺伝子組み込みのないリプログラミングの方法 が報告されてきた(Fusaki et al., 2009; Itoh et al., 2016; Piao et al., 2014; Yu et al., 2009).宿主ゲノムへの遺伝子組み込みのない方法を用いた EB 患者特異的 iPSC としては、Shinkuma らが、優性栄養障害型 EB 患者の 線維芽細胞からエピソームベクターを用いて iPSC を樹立し、さらに CRISPR/Cas9 で遺伝子治療することに成功している(Shinkuma et al., 2016). しかし我々の知る限りでは、EB 患者の KC からゲノム組み込みの ない方法を用いた iPSC 樹立は報告されていない.

センダイウイルスは、マイナス鎖 RNA ゲノムを有するエンベロープウ イルスであり、ライフサイクルおよび RNA 複製は DNA 相なしで宿主の細 胞質内で起こるため、ウイルスゲノムが宿主 DNA に組み込まれるリスク は原理的にない. Fusaki らは、このセンダイウィルスの特性を生かし、 SVV を用いた宿主ゲノムへの組み込みを介さない効率的なリプログラミン グの方法を開発した(Fusaki et al., 2009). その後、真皮線維芽細胞、末梢 血単核球、および骨格筋芽細胞からの iPSC の樹立が報告されている (Chen et al., 2013; Jin et al., 2012; Trokovic et al., 2013).

これまでに KC を SVV によって遺伝子導入を行った報告はほとんど存 在しない. キメラ SVV を EB モデルマウスの水疱へ投与し治療を試みた報 告がなされており, KC がセンダイウィルスの感染対象になりうることは すでに示唆されていた(Kawachi et al., 2007). また, SVV を用いた KC か らの iPSC 樹立は, これまでに 1 型糖尿病患者において報告されている (Kudva et al., 2012). しかし, この報告では iPSC を樹立するための最適 条件が検証されていない. 我々の研究結果は, SVV を用いた KC からの iPSC 誘導効率をはじめて明らかにし, SVV の消失タイミングを検証する ことでその安全性を証明した.

本研究では, iPSC の細胞源として KC を用いた. 従来 iPSC の細胞源と して最も頻用されている真皮線維芽細胞は,局所麻酔を使用した表皮,真 皮,皮下組織までの全層採取が必要であり,縫合による瘢痕を残すリスク がある. 一方で KC は皮膚最外層である表皮に存在し,表皮は麻酔を伴わ ない浅いシェーブ生検による採取も可能である. シェーブ生検は,麻酔を 必ずしも必要とせず皮膚を摘み鋏や剃刀で浅く表皮のみ削る方法で,侵襲 が少なく瘢痕も残さない.

KCを使用することのもう一つの利点は、特に RDEB および接合部型 EB のような遺伝性皮膚疾患において、復帰変異モザイクを有する iPSC を 得る機会があることである.復帰変異モザイクは、体細胞の一部において 病原性のある遺伝子変異が自発的に修復される自然発生現象であり、EB でも近年報告があり注目されている(Tolar et al., 2014; Umegaki-Arao et al., 2014).復帰変異モザイクが生じた部位から採取した細胞は、自然に遺 伝子が正常化しているため、人工的な遺伝子操作を行わずして自家細胞を 用いた根治的な細胞治療に応用されることが期待されている.これまでに パンチグラフトによる皮膚移植や表皮培養シートなどの自家細胞移植が試 みられている(Gostynski et al., 2009; Yuen et al., 2013). EB における復 帰変異モザイクは KC のみで生じ、線維芽細胞ではほとんど生じないこと が判明している(Almaani et al., 2010). 我々が樹立した EBKC-iPSC にお ける復帰変異モザイクの有無は未解析であるが、KC を iPSC のリソース として用いる本研究の結果は、病原性変異遺伝子を操作することなく、か つ宿主ゲノムを介さない方法を用いることによって安全な変異復帰 iPSC を樹立できる可能性を示唆する.

### 総括および結論

本研究では以下の新知見を得た.

・SVV を KC に感染させ、iPSC を樹立するために少なくとも MOI = 5 が 必要であると結論づけた.

・SVV を用いた NHEK への遺伝子導入によって形態学的に iPSC 様コロ ニーの出現を確認した.

・NHEK から SVV を使って作成した iPSC を品質評価したところ,適切 な性質を持つ iPSC であることを証明した.

・RDEB 患者の KC から SVV を使って樹立した iPSC は, iPSC として適切な性質を持っていることを証明した.

・SVV 介して樹立した iPSC は,適切な分化誘導で KC が作成できることを証明した.

・SVV 介して樹立した iPSC は,適切な分化誘導で線維芽細胞が作成できることをを証明した.

結論として,我々は RDEB 由来 KC からゲノム組み込みのない iPSC の樹 立が可能であることをを示した.これらの KC 由来 iPSC 細胞は,EB など の遺伝性皮膚疾患患者において,表皮シート移植や線維芽細胞の局所投与 などを介して,安全で根治的な再生医療の供給源となると考える.

### 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くの御指導と 御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水 宏教授に深甚なる謝意を表します.また直接御指導いただきました北海道 大学病院皮膚科 藤田靖幸講師に心より深謝いたします.そして本研究に ご協力いただきました表皮水疱症の患者様に深く御礼申し上げます.最後 になりましたが、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員、技 術員、秘書各位に心より御礼申し上げます.

# 引用文献

Almaani, N., Nagy, N., Liu, L., Dopping-Hepenstal, P.J., Lai-Cheong, J.E., Clements, S.E., Techanukul, T., Tanaka, A., Mellerio, J.E., and McGrath, J.A. (2010). Revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 130, 1937-1940.

Chen, I.P., Fukuda, K., Fusaki, N., Iida, A., Hasegawa, M., Lichtler, A., and Reichenberger, E.J. (2013). Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. Cell Reprogram 15, 503-513.

Doulames, V.M., and Plant, G.W. (2016). Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Cervical Spinal Cord Injury. Int. J. Mol. Sci. 17, 530.

Ebert, A.D., Diecke, S., Chen, I.Y., and Wu, J.C. (2015). Reprogramming and transdifferentiation for cardiovascular development and regenerative medicine: where do we stand? EMBO Mol. Med. 7, 1090-1103.

Fine, J.D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R.A., Bauer, E.A., Bauer, J.W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M.F., *et al.* (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. J. Am. Acad. Dermatol. 70, 1103-1126.

Fine, J.D., Johnson, L.B., Weiner, M., Li, K.P., and Suchindran, C. (2009). Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006. J. Am. Acad. Dermatol. 60, 203-211.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 85, 348-362.

Gostynski, A., Deviaene, F.C., Pasmooij, A.M., Pas, H.H., and Jonkman,

M.F. (2009). Adhesive stripping to remove epidermis in junctional epidermolysis bullosa for revertant cell therapy. Br. J. Dermatol. 161, 444-447.

Itoh, M., Kawagoe, S., Tamai, K., Okano, H.J., and Nakagawa, H. (2016). Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) carrying two compound heterozygous mutations in the COL7A1 gene. Stem Cell Res 17, 32-35.

Itoh, M., Kiuru, M., Cairo, M.S., and Christiano, A.M. (2011). Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 8797-8802.

Itoh, M., Umegaki-Arao, N., Guo, Z., Liu, L., Higgins, C.A., and Christiano, A.M. (2013). Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). PLoS One 8, e77673.

Jin, Z.B., Okamoto, S., Xiang, P., and Takahashi, M. (2012). Integrationfree induced pluripotent stem cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling. Stem Cells Transl Med 1, 503-509.

Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Kikuchi, Y., Nimura, K., Nishifuji, K., Amagai, M., *et al.* (2007). Development of tissue-targeting hemagglutinating virus of Japan envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. Hum. Gene Ther. 18, 881-894.

Kudva, Y.C., Ohmine, S., Greder, L.V., Dutton, J.R., Armstrong, A., De Lamo, J.G., Khan, Y.K., Thatava, T., Hasegawa, M., Fusaki, N., *et al.* (2012). Transgene-free disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with type 1 and type 2 diabetes. Stem Cells Transl Med 1, 451-461.

Li, H.O., Zhu, Y.F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y.S.,

Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., *et al.* (2000). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. J. Virol. 74, 6564-6569.

Maguire, J.A., Lu, L., Mills, J.A., Sullivan, L.M., Gadue, P., and French, D.L. (2016). Generation of Hermansky Pudlak syndrome type 2 (HPS2) induced pluripotent stem cells (iPSCs). Stem Cell Res 16, 287-289.

McMillan, J.R., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2003). Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. J. Dermatol. Sci. 31, 169-177.

Mori, E., Fujikura, J., Noguchi, M., Nakao, K., Matsubara, M., Sone, M., Taura, D., Kusakabe, T., Ebihara, K., Tanaka, T., *et al.* (2016). Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. Metabolism 65, 543-556.

Ohnishi, H., Kawasaki, T., Deguchi, T., and Yuba, S. (2015). Generation of Xeroderma Pigmentosum-A Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Line for Use As Future Disease Model. Cell Reprogram 17, 268-274.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germlinecompetent induced pluripotent stem cells. Nature 448, 313-317.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., *et al.* (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods 8, 409-412.

Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gurtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., and Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. Cell 159, 428-439.

Piao, Y., Hung, S.S., Lim, S.Y., Wong, R.C., and Ko, M.S. (2014). Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors. Stem Cells Transl Med 3, 787-791.

Sawamura, D., Goto, M., Yasukawa, K., Sato-Matsumura, K., Nakamura, H., Ito, K., Nakamura, H., Tomita, Y., and Shimizu, H. (2005). Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. J. Hum. Genet. 50, 543-546.

Shimizu, H., McGrath, J.A., Christiano, A.M., Nishikawa, T., and Uitto, J. (1996). Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. J. Invest. Dermatol. 106, 119-124.

Shinkuma, S., Guo, Z., and Christiano, A.M. (2016). Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 5676-5681.

Shinkuma, S., Sawamura, D., Fujita, Y., Kawasaki, H., Nakamura, H., Inoie, M., Nishie, W., and Shimizu, H. (2014). Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Acta Derm. Venereol. 94, 98-99.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676.

Tolar, J., McGrath, J.A., Xia, L., Riddle, M.J., Lees, C.J., Eide, C., Keene, D.R., Liu, L., Osborn, M.J., Lund, T.C., *et al.* (2014). Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 134, 1246-1254.

Tolar, J., Xia, L., Riddle, M.J., Lees, C.J., Eide, C.R., McElmurry, R.T., Titeux, M., Osborn, M.J., Lund, T.C., Hovnanian, A., *et al.* (2011). Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 131, 848-856. Trokovic, R., Weltner, J., Manninen, T., Mikkola, M., Lundin, K., Hamalainen, R., Suomalainen, A., and Otonkoski, T. (2013). Small molecule inhibitors promote efficient generation of induced pluripotent stem cells from human skeletal myoblasts. Stem Cells Dev 22, 114-123.

Umegaki-Arao, N., Pasmooij, A.M., Itoh, M., Cerise, J.E., Guo, Z., Levy, B., Gostynski, A., Rothman, L.R., Jonkman, M.F., and Christiano, A.M. (2014). Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. Sci. Transl. Med. 6, 264ra164.

Wei, Y., Zeng, W., Wan, R., Wang, J., Zhou, Q., Qiu, S., and Singh, S.R. (2012). Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. European cells & materials 23, 1-12.

Xu, X., Huang, J., Li, J., Liu, L., Han, C., Shen, Y., Zhang, G., Jiang, H., Lin, Z., Xiong, N., *et al.* (2016). Induced pluripotent stem cells and Parkinson's disease: modelling and treatment. Cell Prolif. 49, 14-26.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science 324, 797-801.

Yuen, W.Y., Huizinga, J., and Jonkman, M.F. (2013). Punch grafting of chronic ulcers in patients with laminin-332-deficient, non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. J. Am. Acad. Dermatol. 68, 93-97, 97 e91-92.

Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.F., *et al.* (2011). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. Cell Stem Cell 8, 31-45.

Zhou, Y.Y., and Zeng, F. (2013). Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. Genomics Proteomics Bioinformatics 11, 284-287.

小児慢性特定疾病難病センター (2018). 表皮水疱症. <<u>https://www.shouman.jp/disease/details/14\_03\_008/</u>>