HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト表皮角化細胞由来iPS細胞からの間葉系幹/間質細胞の樹立
Author(s)	西村, ちひろ
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13460号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13460
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74725
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2474
File Information	Chihiro_Nakayama-Nishimura.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

ヒト表皮角化細胞由来 iPS 細胞からの

間葉系幹/間質細胞の樹立

（The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from human epidermal keratinocytes）

2019 年 3 月

北海道大学

西村（中山）　ちひろ

学位論文

ヒト表皮角化細胞由来 iPS 細胞からの

間葉系幹/間質細胞の樹立

（The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from human epidermal keratinocytes）

2019 年 3 月

北海道大学

西村（中山）　ちひろ

目　　次

発表論文目録及び学会発表目録・・・・・・・・　1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　43 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・　46 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　47 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　48 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　49 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.

Chihiro Nakayama, Yasuyuki Fujita, Wakana Matsumura, Inkin Ujiie, Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu
The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from normal human and RDEB epidermal keratinocytes.
Journal of Dermatological Science 91: 301-310, 2018.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

Chihiro Nakayama, Yasuyuki Fujita, Wakana Matsumura, Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu
The development of mesenchymal stem/stromal cells from keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs).
The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017.12.15 Kochi, Japan.

要旨

【背景と目的】

表皮水疱症（epidermolysis bullosa，EB）は真皮表皮結合部（dermal-epidermal junction，DEJ）を構成する蛋白の変異により生じる遺伝性疾患である．出生時より全身に水疱，びらんの出現を繰り返すため，感染症や脱水を生じ，重篤な場合には死に至ることもあるが，治療法は対処療法のみであるため，有効な治療法が望まれている．近年，同種間葉系幹/間質細胞（mesenchymal stem/stromal cell，MSC）を投与する細胞療法が重症の表皮水疱症である劣性栄養障害型表皮水疱症（recessive dystrophic EB，RDEB）に対して応用されている．しかしながら，現在行われている MSC を用いた細胞療法には単一の供給源からの細胞増殖の限界の問題や拒絶反応のために効果が持続しないといった課題がある．そこで，可塑性と無限の増殖能をもつ人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell，iPSC）を介在することで，この問題を解決する発想に至った．

本研究では，表皮角化細胞（epidermal keratinocyte，KC）由来 iPSC（KC-derived iPSC，KC-iPSC）からの MSC（MSC derived from KC-iPSC，KC-iPSC-MSC）の樹立を試み，皮膚疾患の治療におけるにおける応用性を検討する．

【材料と方法】

1．KC-iPSC から MSC の樹立

RDEB 患者 1 名（*COL7A1* 遺伝子に c.5443G>A および c.5819delC のヘテロ接合体の変異を有する 58 歳女性）と健常人（67 歳女性）の皮膚を採取し，KC を初代培養した．この細胞から，山中因子：*c-MYC*, *SOX2*, *OCT3/4* および *KLF4* を含む Sendai Virus Vector（SVV）を用いた方法により KC-iPSC を樹立した．その後，健常人の KC-iPSC（normal human epidermal keratinocyte-derived iPSC, NHEK-iPSC）と RDEB 患者の KC-iPSC（epidermolysis bullosa patient epidermal keratinocyte-derived iPSC，EBKC-iPSC）に対して，Activin A，6-bromoindirubin-3’-oxime，bone morphogenetic protein 4 を用いて，間葉系への誘導を行った．その後，basic fibroblast growth factor，epidermal growth factor を含む培地に変更し，10 日間培養を継続し，MSC への誘導を行った．誘導後，magnetic-activated cell sorting にて $CD105^{+}$細胞を抽出し，プラスチックディッシュで培養，観察し，フローサイトメトリー法により表面マーカーを調べた．また，間葉系細胞（脂肪細胞，骨芽細胞，軟骨細胞）への分化誘導を試みた．

2．KC-iPSC-MSC の *in vitro* での評価

KC-iPSC-MSC と分化前の KC や KC-iPSC より RNA を抽出し，RT-PCR，マイクロアレイ解析を行い，発現する遺伝子を調べた．

3. iPSC-MSC の EB に対する治療可能性の検討

背部に全層皮膚欠損の創傷を作成した免疫不全マウスに対して，NHEK-iPSC から誘導した MSC（MSC derived from NHEK-iPSC，NHEK-iPSC-MSC）を創周囲へ皮内投与，ならびに，尾静脈投与した．細胞投与から 14 日目に上皮化した皮膚を採取し，ヒト VII 型コラーゲンの免疫染色と RNA を抽出し，RT-PCR を行った．

【結果】

1. KC-iPSC から MSC の樹立

KC-iPSC からの分化誘導中に細胞の形態の変化を認めた．$CD105^+$の KC-iPSC から樹立した細胞をプラスチックディッシュで培養したところ，接着しながら増殖することが観察された．フローサイトメトリー法により表面マーカーを調べたところ，$CD73^+$，$CD90^+$，$CD105^+$であり，lineage negative であることが分かった．また，脂肪細胞，骨芽細胞，軟骨細胞への分化ができたことを免疫染色で確認した．以上より，KC-iPSC から樹立した細胞が MSC であることを確認できた．

2. KC-iPSC-MSC の *in vitro* での評価

RT-PCR により，KC-iPSC-MSC の中に分化前の KC や KC-iPSC のコンタミネーションがないことを確認した．また，NHEK-iPSC-MSC では，mRNA レベルで *COL7A1* 遺伝子の発現を認めた．マイクロアレイ解析により KC-iPSC-MSC の遺伝子発現パターンは骨髄由来 MSC に類似することが判明した．

3. NHEK-iPSC-MSC の *in vivo* での評価

NHEK-iPSC-MSC の投与により早期の創傷治癒促進効果が認められ，上皮化した皮膚組織の免疫蛍光抗体法では，DEJ にヒト VII 型コラーゲンの沈着を認めた．

【考察】

同種 MSC 移植は，RDEB の治療に非常に有望と考えられているが，いくつかの課題が残っている．1 点目としては，単一の細胞供給源からの MSC の増殖には限界があるということである．また，同種 MSC への潜在的な免疫学的拒絶反応によってレシピエントからの排除が引き起こされることがある．これらの問題を解決するために，我々は，無限に増殖し，多能性を維持できる iPSC に焦点を当てた．本研究では，KC 由来の iPSC を使用し，MSC を樹立した．SVV を使用することで，遺伝子挿入を行わずに，体細胞を安全にリプログラムすることができている．また，由来とする細胞を KC とすることは，MSC を得るための一般的な方法である骨髄からの採取よりも侵襲性が低く済

むことになり，さらに，復帰変異モザイクの観点からも意義がある．「自然遺伝子治療」とも呼ばれる復帰変異モザイクは，体細胞における病原性変異の自発的な修正を認める自然発生現象であり，RDEB では，KC において復帰変異モザイクが起きていると報告されている．そのような復帰変異 KC は，先天性疾患に対して根本的な自己細胞療法を実現するための有望な手掛かりであると考えられる．さらに本研究では，KC-iPSC-MSC の樹立はフィーダーフリー条件下でシグナル調整のみによって行われた．したがって，我々のプロトコールは侵襲性や安全性の観点から，再生医療に適した MSC の樹立方法と考える．本研究では，EBKC-iPSC からの MSC（MSC derived from EBKC-iPSC, EBKC-iPSC-MSC）を確立することに成功しており，このことは，復帰変異 EBKC-iPSC-MSC を用いた，RDEB に対する自己細胞による全身療法の確立に大きな一歩となったと考える．

【結論】

本研究では，NHEK-iPSC と EBKC-iPSC より MSC を樹立することができた．また，NHEK-iPSC-MSC は，創傷治癒促進効果を認め，*in vivo* において VII 型コラーゲンを供給した．我々は，KC-iPSC-MSC が RDEB の有効な細胞療法の供給源になり得ると考える．

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.

α-MEM: alpha minimum essential medium
bFGF: basic fibroblast growth factor
BIO: 6-bromoindirubin-3'-oxime
BM-MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cell
BMP4: bone morphogenetic protein 4
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEJ: dermal-epidermal junction
EB: epidermolysis bullosa
EB-fibroblast: fibroblast derived from epidermolysis bullosa patient
EBKC: epidermal keratinocyte derived from epidermolysis bullosa patient
EBKC-iPSC: epidermolysis bullosa patient epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
EBKC-iPSC-MSC: mesenchymal stem/stromal cell derived from epidermolysis bullosa patient epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
EGF: epidermal growth factor
ES Medium: Primate ES Cell Medium
FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4
FACS: fluorescence-activated cell sorting
FBS: fetal bovine serum
FITC: fluorescein isothiocyanate
HLA: human leucocyte antigen
iPSC: induced pluripotent stem cell
i.v.: intravenous injection
KC: epidermal keratinocyte
KC-iPSC: epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
KC-iPSC-MSC: mesenchymal stem/stromal cell derived from epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
LPE: local pooled error
MACS: magnetic-activated cell sorting
MEF: mouse embryonic fibroblast
MEF-CM: mouse embryonic fibroblast-conditioned medium
MHC: major histocompatibility complex

MMC: Mitomycin C
MOI: multiplicities of infection
MSC: mesenchymal stem/stromal cell
NHEK: normal human epidermal keratinocyte
NHEK-iPSC: normal human epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
NHEK-iPSC-MSC: mesenchymal stem/stromal cell derived from normal human epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell
NOD/SCID: NOD/ShiJic-*scid*Jcl
PBS: phosphate buffered saline
PE: phycoerythrin
RDEB: recessive dystrophic epidermolysis bullosa
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
s.c.: subcutaneous injection
SVV: Sendai Virus Vector

緒言

表皮水疱症

（epidermolysis bullosa：EB）について

皮膚は，表皮，真皮および皮下脂肪組織から構成され，表皮と真皮は真皮表皮結合部（dermal-epidermal junction，以下 DEJ と略す）において多数の蛋白により接着されている（図 1，2）．それらの接着蛋白に先天的に異常をきたすと，出生時より全身に水疱形成を生じる遺伝性皮膚疾患である表皮水疱症（epidermolysis bullosa，以下 EB と略す）を発症する（図 3）．重症例では生後数年以内に死亡することもあり，感染症や脱水，悪性腫瘍を繰り返す．旧厚生省の稀少難治性皮膚疾患調査研究班の全国調査によると，国内の推定患者数は 500～640 人とされており，指定難病となっている．異常を認める蛋白の違いにより，表皮内水疱を生じる単純型 EB，表皮基底膜部透明帯水疱を生じる接合部型 EB，表皮下水疱を生じる栄養障害型 EB の 3 型に大きく分類される（図 4，5）．このうち，DEJ の下で係留線維を形成する主な蛋白である VII 型コラーゲンをコードする *COL7A1* 遺伝子の変異によって引き起こされる重症型が，劣性栄養障害型表皮水疱症（recessive dystrophic epidermolysis bullosa，以下 RDEB と略す）である(Fine et al., 2014；Watanabe et al., 2018；Shinkuma, 2015)．EB に対して，現時点で確立された治療法はないため，びらん，潰瘍部に創傷被覆材を貼付するなどの対症療法が主体となっている．したがって，有効な治療法を見つけるためにさまざまな研究が行われてきている．

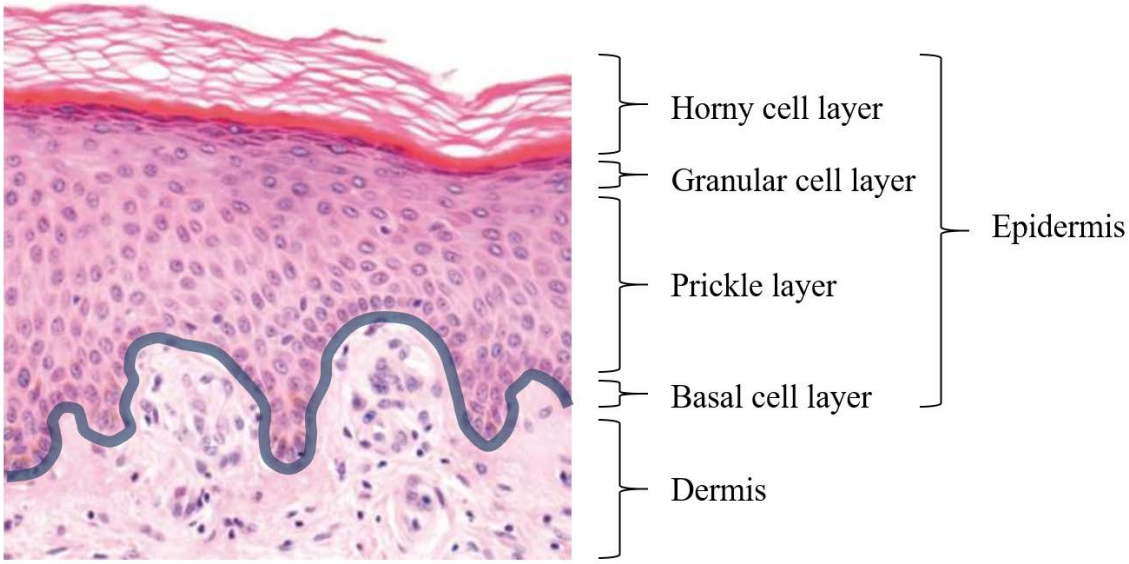

図 1. 皮膚の構造

（清水　宏「あたらしい皮膚科学第 3 版」より抜粋，改変）(清水宏., 2018)
青色線は DEJ を示す.

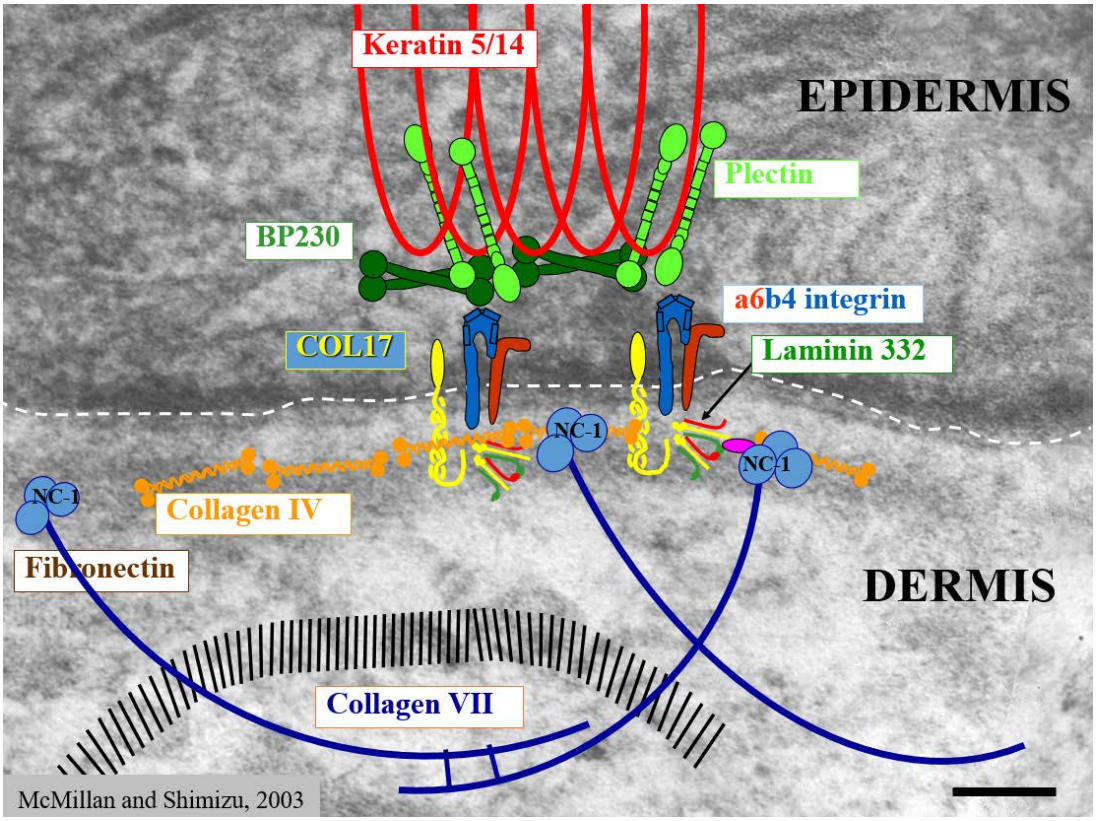

図 2. DEJ 関連蛋白の電子顕微鏡による観察(McMillan et al., 2003)

図 3. EB の臨床像

生後より全身に水疱，びらんを繰り返す．手指，足趾の癒着も伴う．

大分類	小分類	遺伝形式	標的蛋白
単純型（EBS）	限局型	AD	ケラチン 5, ケラチン 14
	中等症汎発型	AD	ケラチン 5, ケラチン 14
	重症汎発型	AD	ケラチン 5, ケラチン 14
	筋ジストロフィー合併型	AR	プレクチン
	幽門閉鎖合併型	AR	プレクチン
	外胚葉形成不全・皮膚脆弱性症候群	AR	プラコフィリン 1
接合部型（JEB）	重症汎発型	AR	ラミニン 332
	中等症汎発型	AR	17 型コラーゲン, ラミニン 332
	幽門閉鎖合併型	AR	α_6/β_4 インテグリン
栄養障害型（DEB）	優性型		Ⅶ型コラーゲン
	劣性中等症汎発型	AR	Ⅶ型コラーゲン
	劣性重症汎発型	AR	Ⅶ型コラーゲン
Kindler 症候群	―	AR	キンドリン-1

AD（autosomal dominant）：常染色体優性，AR（autosomal recessive）：常染色体劣性

図 4. EB の分類

（清水　宏「あたらしい皮膚科学第 3 版」より抜粋）（清水宏., 2018）

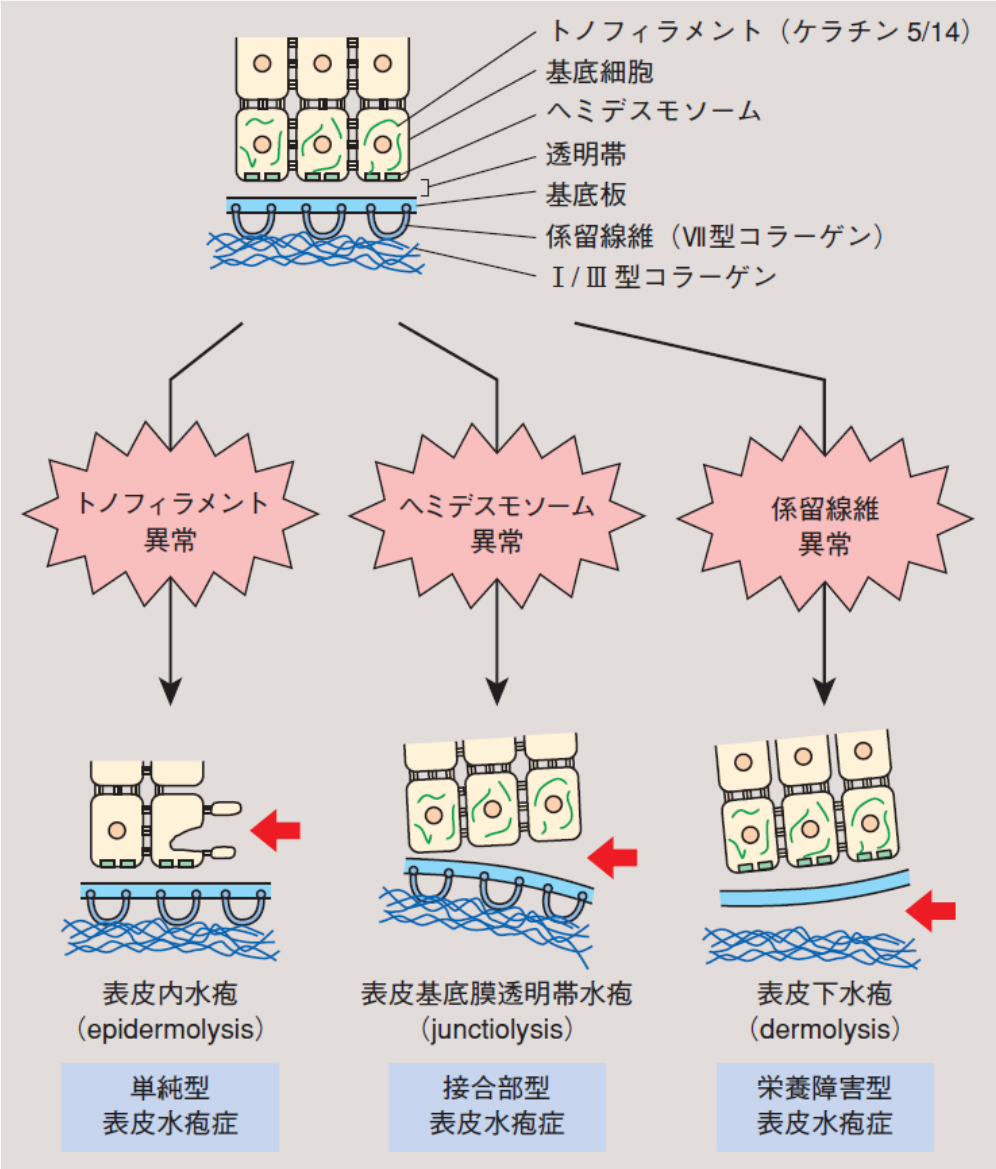

図 5. EB を生じる機序

（清水　宏「あたらしい皮膚科学第 3 版」より抜粋）（清水宏., 2018）

間葉系幹/間質細胞

（mesenchymal stem/stromal cell：MSC）について

EB に対する有効な治療法の探索として，多くの研究や臨床試験が実施されている．代表的なものとしては，遺伝子治療，蛋白質補充療法および細胞治療等が行われている(Hirsch et al., 2017；Urnov et al., 2010；Woodley et al., 2004；Shinkuma et al., 2016)．現在，RDEB の有力な治療法の候補として，同種の間葉系幹/間質細胞（mesenchymal stem/stromal cell，以下 MSC と略す）を用いた治療を含む細胞療法が注目されており，すでにいくつかのグループによって報告されている(Conget et al., 2010；Petrof et al., 2015；El-Darouti et al., 2016)．

MSC は非造血系の前駆細胞であり，間葉系幹細胞を含むヘテロな集団である(Uccelli et al., 2008)．MSC は，中胚葉系だけでなく，外胚葉および内胚葉系の細胞に分化しうることが示されており(Sasaki et al., 2008；Petersen et al., 1999)，特に表皮角化細胞（epidermal keratinocyte，以下 KC と略す）にも分化する可能性が示されている(Sasaki et al., 2008)．また複数の研究において，monocyte chemoattractant protein-1 や interleukin-6 の分泌による炎症性サイトカインの調整および vascular endothelial growth factor，basic fibroblast growth factor（以下 bFGF と略す），epidermal growth factor（以下 EGF と略す），keratinocyte growth factor，insulin-like growth factor-1，platelet derived growth factor-BB などの細胞増殖因子の放出によって，MSC が創傷治癒に寄与することが示されている(Chen et al., 2008；Kinnaird et al., 2004；Maxson et al., 2012；Hocking and Gibran, 2010；Fujita et al., 2010)．さらに，骨髄由来 MSC（bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cell，以下 BM-MSC と略す）は，*in vivo* で VII 型コラーゲンを供給することが報告されているため，RDEB の治療可能性が期待されている(Iinuma et al., 2015)．

これらを背景として，同種 BM-MSC を用いた RDEB の治療が実施されつつある．同種 BM-MSC を 2 名の RDEB 患者の潰瘍周囲に皮内投与した報告では，欠損していた VII 型コラーゲンが DEJ に発現していることが確認され，臨床的にも水疱新生が抑制され，創傷治癒が促進された(Conget et al., 2010)．この効果は，2 名の患者ともに皮内投与の 1 週間後に観察され，4 か月間持続した．また Petrof らは，同種 BM-MSC を静脈投与した RDEB の小児患者 10 名において，6 か月間創傷治癒が促進され，紅斑が減少したことを報告した(Petrof et al.,

2015). さらに別の報告では，14 名の RDEB 患者に同種 BM-MSC を静脈投与したところ，臨床的に水疱新生の数が減少し，電子顕微鏡での観察において係留線維の数が増加した(El-Darouti et al., 2016).

このように，RDEB に対する MSC を用いた治療法は期待されているが，一方で現状の MSC による治療法にはいくつかの課題が存在する．第一には，単一の細胞供給源からでは MSC の増殖に限界があることである．また，現時点で MSC は骨髄から採取されたものであることが多く，ドナーへの侵襲性が高いということがある．さらに，先天性疾患の治療では他人由来の細胞を用いることになるため，効果が持続せず長期的には排除される可能性が高い．

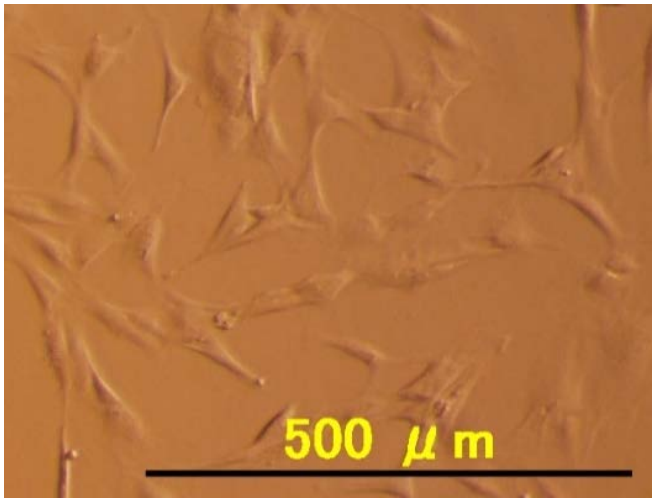

図 6. MSC の形態

紡錘形の線維芽細胞様細胞である．

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

RDEB に対する MSC を用いた細胞療法の問題を克服するために，我々は，人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell，以下 iPSC と略す）に焦点を当てた．iPSC は多能性を維持しながら無限に増殖する能力を有する(Takahashi et al., 2007)．よって，iPSC を介して MSC を樹立することにより，単一リソースからの細胞数の限界やドナーへの侵襲性の高さなどの問題が解決できると考えた．

一方，我々は最近，センダイウイルスベクター（Sendai Virus Vector，以下 SVV と略す）を用いて，健常人および RDEB 患者の KC 由来の iPSC（epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell，以下 KC-iPSC と略す）を樹立することに成功した（Matsumura et al., 2018）．線維芽細胞由来の iPSC を MSC に分化させた報告は過去に存在するが(Tran et al., 2012)，KC-iPSC からの MSC の樹立はこれまでに報告されていない．iPSC の分化の方向性は，由来する体細胞に大きく依存することが報告されており(Nishizawa et al., 2016)，iPSC の epigenetic memory として説明されている(Kim et al., 2010)．したがって，由来となる体細胞が異なる場合，iPSC の多能性に差を生じる可能性がある．すなわち，KC-iPSC を MSC へ誘導することが困難な可能性があり，将来の iPSC を応用した治療を考慮するにあたって，特に EB においては，KC-iPSC の MSC への誘導可能性を評価することが重要と考えられた．

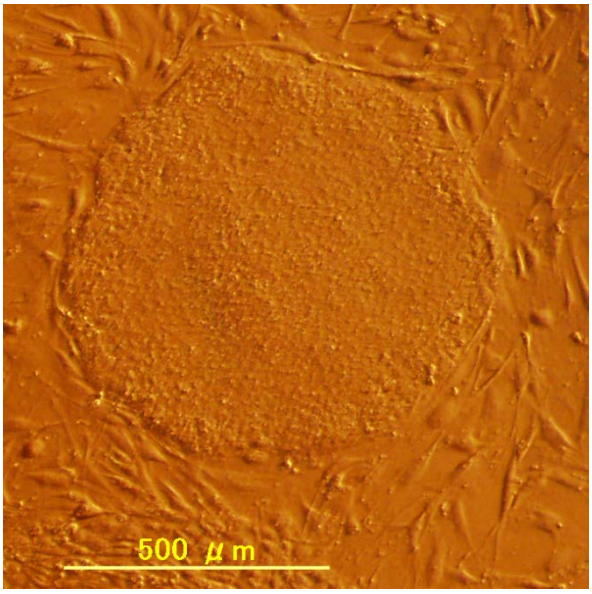

図 7. iPSC の形態

本研究の目的

本研究では，KC 由来 iPSC からの MSC（mesenchymal stem/stromal cell derived from epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell，以下 KC-iPSC-MSC と略す）の樹立を試み，皮膚疾患における応用性を検討する．

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．

1. 各種試料

Ⅰ．患者

中等症汎発型 RDEB 患者 1 名から皮膚を採取した．患者は，*COL7A1* 遺伝子に c.5443G>A および c.5819delC のヘテロ接合体の変異を有する 58 歳女性である（Sawamura et al., 2005）．患者は全身に広範なびらんと潰瘍を有する（図 8）．一方，健常人の KC は 67 歳女性の健常人顔面の皮膚から採取した．また，蛍光抗体法でのコントロールとして 3 名の健常人皮膚を使用した．皮膚採取の施行時には文章での同意を得た．

図 8．患者の臨床像

患者は全身の広範にびらん，潰瘍を有する．

Ⅱ．マウス

動物実験は，承認されたプロトコールの下，北海道大学動物実験委員会のガイドラインに従って行った（承認番号：15-0158）．C57BL/6 マウスと NOD/ShiJic-*scid*Jcl（以下 NOD/SCID と略す）マウスを CLEA Japan（Tokyo，Japan）よ

り購入し，使用した．

Ⅲ．患者細胞

皮膚からの KC の培養，ならびに，KC からの iPSC の樹立に関しては，松村らの実施したプロトコールに準じた(Matsumura et al., 2018).

健常人と EB 患者から KC を得るために, 局所麻酔下で全層皮膚を採取した．採取した皮膚は脂肪を除去し, ディスパーゼ I（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US）に 4°C，16 時間静置後，表皮だけを剥離し，眼科剪刀で細断した．0.25% Trypsin-EDTA（ThermoFisher Scientific，Waltham，MA，US）を加えて，37°C で 7 分静置した後，ピペッティングを行い，10% fetal bovine serum（以下 FBS と略す，Sigma-Aldrich）含有の phosphate buffered saline（以下 PBS と略す, Nacalai tesque, Kyoto, Japan）を加え, 遠心した. CnT-PR（CELLnTEC, Bern，Switzerland）で懸濁し，5,000～10,000cell/cm^2 になるようにディッシュに播種し，37°C，5% CO_2 の加湿インキュベーター内で培養を開始した．培地交換は 2, 3 日毎に行った．以降の実験には 3～4 継代の KC を使用した．

KC-iPSC の樹立方法は, 既に松村らが報告した通り, 山中因子 : *c-MYC*, *SOX2*, *OCT3/4* および *KLF4* を含む SVV（Cyto-tune®-iPS2.0, ID Pharma, Tsukuba, Japan）を用いた方法に準じた（Matsumura et al., 2018）．以降本稿では，健常人と EB 患者から樹立した KC-iPSC をそれぞれ NHEK-iPSC（normal human epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell），EBKC-iPSC（epidermolysis bullosa patient epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell）とする．KC を 50,000cell/cm^2 の密度で CnT-PR 培地に播種し，翌日，multiplicities of infection（以下 MOI と略す）が 5 の *c-MYC*, *SOX2*, *OCT3/4* および *KLF4* を含んだ SVV の溶液を添加し，KC に遺伝子導入を行った．6 日後に誘導した細胞を事前に 30,000 cells/cm^2 の濃度で播種していた mitomycin C（以下 MMC と略す）処理したマウス胚線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast，以下 MEF と略す，ReproCELL，Yokohama，Japan）の上に播種した．翌日，培地を Primate ES Cell Medium（以下 ES Medium と略す，ReproCELL）に交換した．

SVV 導入から 2 週間後に iPSC 様のコロニーが出現したときに個々のコロニーを採取し，5ng/mL の bFGF（ReproCELL）を含む ES Medium に変更し，37°C，5% CO_2 の加湿インキュベーター内で培養を行った．培地は連日交換した．10^5 個の KC あたり 2～10 クローンの iPSC 様のコロニーが得られた．以降の実験では 8～25 継代の KC-iPSC を使用した．

MSC のポジティブコントロールとして使用した BM-MSC は Lonza（Basel, Switzerland）より購入し，10% FBS を含んだ Dulbecco's Modified Eagle

Medium（以下 DMEM と略す，Thermo Fisher Scientific）で培養し，4～6 継代までのものを使用した．iPSC のポジティブコントロールとして用いた，正常ヒト線維芽細胞由来 iPSC（RBRC-HPS0063）は，理化学研究所バイオリソースセンター（Tsukuba, Japan）より購入した（Takahashi et al., 2007）．形態学的観察は DP Controller and DP Manager (Olympus，Tokyo，Japan)を使用した．

1．KC-iPSC-MSC の樹立

Ⅰ. KC-iPSC から MSC への誘導

我々は，過去に Tran らが線維芽細胞由来 iPSC から MSC を樹立した方法を応用し，KC-iPSC から MSC への誘導を行った(Tran et al., 2012)（図 9）．KC-iPSC-MSC の樹立には，21～25 継代の NHEK-iPSC と 8～10 継代の EBKC-iPSC のうちそれぞれ 2 つの異なるセルラインを使用した．これらの iPSC は MMC 処理した MEF をフィーダー細胞とし，5ng/mL の bFGF を含む ES Medium で 37°C, 5% CO_2 の加湿インキュベーター内で培養を行った. KC-iPSC-MSC の樹立にあたり KC-iPSC のフィーダーフリーで培養する際には，過去に報告されている mouse embryonic fibroblast-conditioned medium（以下 MEF-CM と略す）を使用した(Xu et al., 2001).

初めに，KC-iPSC を Matrigel®（Corning，Corning，NY，US）でコーティングされたディッシュ上に播種し，10ng/mL bFGF を含む MEF-CM 下で 5% CO_2, 37°C の加湿インキュベーター内で 2 日間培養した. 次に, 5ng/mL Activin A（Peprotech，Rocky Hill，NJ，US），2mM 6-bromoindirubin-3'-oxime（以下 BIO と略す，Sigma-Aldrich），20ng/mL bone morphogenetic protein 4（以下 BMP4 と略す，Peprotech）を含む ES medium で 3 日間培養し，間葉系細胞への誘導を行った．その後，10% Knockout™ Serum Replacement（Life Technologies, Carlsbad, CA, US), 10ng/mL bFGF, 10ng/mL EGF (Peprotech) を含む alpha minimum essential medium（以下 α-MEM と略す, Thermo Fisher Scientific）に変更し，10 日間培養し，MSC への誘導を行った.

誘導後，樹立した細胞に microbead-conjugated anti-human CD105 antibody（Miltenyi Biotech，Bergisch Gladbach，Germany）を結合させ，magnetic-activated cell sorting（以下 MACS と略す）にて $CD105^+$細胞を抽出し，抽出した KC-iPSC から樹立した細胞を 10% FBS を含む α-MEM にて培養した．この KC-iPSC から樹立した細胞は 2～6 継代まで形態学的な変化を認めず，培養することができた.

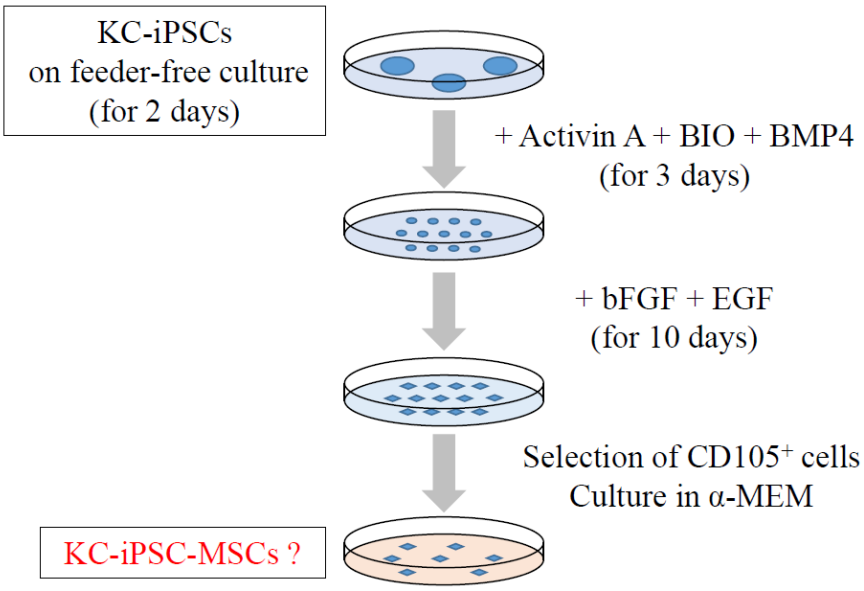

図 9. KC-iPSC-MSC 樹立のプロトコール

Ⅱ. MSC であることの検証

①フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析では，細胞を 0.05% trypsin-EDTA によりディッシュから剥離し，PBS を fluorescence-activated cell sorting（以下 FACS と略す） buffer（0.5% FBS と 2mM EDTA を含む PBS）により洗浄し，よくピペッティングした後，蛍光標識された抗体を結合させた.

使用した抗体は以下の通りである.

Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD73 antibody (AD2, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, US)

PE-conjugated anti-human CD90 antibody (5E10, BD Pharmingen)

PE-conjugated anti-human CD105 antibody (266, BioLegend, San Diego, CA, US)

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD45 antibody (HI30, BioLegend)

FITC-conjugated anti-human CD14 antibody (HCD14, BioLegend)

PE-conjugated anti-human CD19 antibody (HIB19, BD Pharmingen)

FITC-conjugated anti-human HLA (human leucocyte antigen)-DR antibody (LN3, BioLegend)

FITC-conjugated anti-human CD34 antibody (561, BioLegend)

上記の抗体を結合させ，4°C の暗所で 20 分間静置させた後，細胞を FACS buffer で 2 回洗浄し，100μm のセルストレーナーを通過させた．その後，FACSAria III instrument（BD Bioscience，Franklin Lakes，NJ，US），BD FACSDiVa software（BD Bioscience），FlowJo software（Tree Star Inc.，Ashland，KY，US）により解析を行った．

②間葉系細胞への *in vitro* での分化

Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit（R&D Systems，Minneapolis，MN，US）を用いて，KC-iPSC から樹立した細胞の脂肪細胞，骨芽細胞，軟骨細胞へ分化を試みた．BM-MSC をポジティブコントロールとして使用し，同時に分化実験を行った．

脂肪細胞への分化では，細胞をチャンバースライド（Thermo Fisher Scientific）に 2.1×10^4 cells/cm^2 の濃度で播種し，10% FBS を含む α-MEM で培養した．その後，100%コンフルエントになったところで adipogenic supplements を含む培地に変更し，形態学的に脂肪細胞様細胞が出現するまで 7～21 日間培養した．骨芽細胞への分化では，細胞を 4.2×10^3 cells/cm^2 の濃度で播種し，10% FBS を含む α-MEM で培養し，50～70%コンフルエントになったところで osteogenic supplements を添加し，形態学的に骨芽細胞様細胞が出現するまで 2～3 週間培養した．軟骨細胞への分化においては，2.5×10^4 個の細胞を 15ml のコニカルチューブ（Thermo Fisher Scientific）内で chondrogenic supplements を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12（Thermo Fisher Scientific）で 2～3 週間培養した．上記の脂肪細胞，骨芽細胞，軟骨細胞へ分化させた細胞は蛍光免疫染色により観察した．

3. KC-iPSC-MSC の *in vivo/vitro* での評価

Ⅰ．蛍光抗体法

5μm の厚さの凍結皮膚切片を作成し，直接蛍光抗体法を行った．間葉系細胞に分化した細胞は 4% パラホルムアルデヒドで固定したが，マウスおよびヒト皮膚試料は固定をせずに処理した．0.1% Triton X-100 を含む PBS に 10%のヤギまたはウサギ血清を用いて 1 時間ブロッキングした後，一次抗体を結合させ，37°C で 1 時間，または，4°C で一晩インキュベートした．PBS で 3 回すすいだ後，二次抗体を結合させ，37°C で 30 分間インキュベートした．核染色のために，4',6-diamidino-2-phenylindole（以下 DAPI と略す）溶液と共に室温で 5 分間インキュベートした．共焦点顕微鏡（FV1000，Olympus，Tokyo，Japan）

を使用して，免疫染色された試料を高分解能で視覚化し，観察した．

使用した一次抗体は以下の通りである．
Goat anti-mouse Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP-4, 1:5, R&D Systems)
Mouse anti-human osteocalcin (1:5, R&D Systems)
Goat anti-human aggrecan (1:100, R&D Systems)
Mouse anti-type VII collagen monoclonal antibody (LH7.2, 1:10, Sigma-Aldrich)

使用した二次抗体は以下の通りである．
Secondary antibodies were Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (1:100, Life Technologies)
Alexa Fluor® 488-conjugated rabbit anti-goat IgG (H+L) antibody (1:100, Life Technologies)

Ⅱ．RNA 抽出ならびに reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNeasy Mini Kit（Qiagen，Hilden，Germany）を用いて，細胞ペレットおよびマウス皮膚検体から全 RNA を抽出した．皮膚検体では，初めに組織を破砕し，均質化した後に RNA の抽出を行った．ついで DNase 処理を RNase-free DNase Set（Qiagen）を用いてオンカラムで行った．各 RNA の検体は，ランダムヘキサマーおよび SuperScript® IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いて逆転写した．次に，各 cDNA 検体に対して，AmpliTaq Gold 360 Master Mix（Thermo Fisher Scientific）および Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems，Foster City，CA，US)を用いて PCR を行った．PCR は，以下のプロトコールで行った：95°C 10 分×1 サイクル→（95°C 30 秒→60°C 30 秒→72°C 45 秒）×30～35 サイクル→72°C 7 分×1．本研究で用いたプライマー配列を表 1 に示す. すべての PCR 産物を 2% アガロースゲルでの電気泳動により分析し，BioDoc-It System（UVP，Upland，CA，US）により観察した．

表 1. 本実験に用いたプライマー配列

KRT5	Forward	ACCGTTCCTGGGTAACAGAGCCAC

	Reverse	GCGGGAGACAGACGGGGTGATG
KRT14	Forward	GCAGTCATCCAGAGATGTGACC
	Reverse	GGGATCTTCCAGTGGGATCT
POU5F1	Forward	CTGGAGCAAAACCCGGAG
	Reverse	AAATAGAACCCCCAGGGTGA
LIN28A	Forward	TGAGGCAGTGGAGTTCACCT
	Reverse	CTTGCATTCCTTGGCATGAT
PDGFRB	Forward	CCTGCAATGTGACGGAGAGT
	Reverse	GGTGCGGTTGTCTTTGAACC
ENG	Forward	TCCCCAAGACCCAGATCC
	Reverse	GCATGCAGAAGGACAGTGAC
NT5E	Forward	TATCCGGTCGCCCATTGATG
	Reverse	TCTGGAACCCATCTCCACCA
CD44	Forward	AGTCACAGACCTGCCCAATG
	Reverse	AACCTCCTGAAGTGCTGCTC
COL17A1	Forward	CCACTTCCACAGCATATGGG
	Reverse	AGGAACTTGCAGTCCTTGTG
COL7A1	Forward	CCCAGTACCGCATCATTGTG
	Reverse	CACAGTGTAGCTAAGCCCAG
LAMA3	Forward	ACTGCGGAACAGGAACTTTG
	Reverse	CCCGGATACTGTTAGCAAGC

LAMB3	Forward	AGAACACACAGCAAGGAAAGG
	Reverse	GGTCCCCAACAGGTGGATAG
LAMC2	Forward	ACACATTAGACGGCCTCCTG
	Reverse	TTGATCTGGGTCTTGGCTCG
COL4A1	Forward	CCGGGAGAAATAGGTTTCCCAG
	Reverse	GCCTATCAGCCCTGGTGTACC
ITGB4	Forward	TCCCTGACATCCCTATCGTG
	Reverse	TCGAACTTCCAGCCGCA
B2M	Forward	CCCAAGATAGTTAAGTGGGATCG
	Reverse	AAGCAAGCAAGCAGAATTTGG
18SrRNA	Forward	GCAATTATTCCCCATGAACG
	Reverse	GGCCTCACTAAACCATCCAA
mouse-Gusb	Forward	CAGGGTTTCGAGCAGCAATG
	Reverse	ACCCAGCCAATAAAGTCCCG

Ⅲ. RNA マイクロアレイ解析

Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip（Illumina, Inc., San Diego, CA，US）によりマイクロアレイ解析を行った．標識としてビオチンを用いた．ビオチンで標識された cRNA は，Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit（Ambion，Austin，TX，US）を用いて 0.55μg の全 RNA から作成した．断片化した 0.75μg の cRNA を，製造元のプロトコールに従って，Illumina Expression BeadChip にハイブリダイズさせた．アレイは，Illumina Bead Array Reader Confocal Scanner を用いてスキャンされた．アレイデータの出力処理および解析は，Illumina GenomeStudio v2011.1（Gene Expression Module v1.9.0）を用いて行った．RNA マイクロアレイ解析は以下の細胞を対象に行っ

た：EB 患者由来の線維芽細胞（fibroblast derived from epidermolysis bullosa patient，以下 EB-fibroblast と略す），EB 患者由来の KC（epidermal keratinocyte derived from epidermolysis bullosa patient, 以下 EBKC と略す），NHEK-iPSC，EBKC-iPSC，NHEK-iPSC 由来の MSC（mesenchymal stem/stromal cell derived from normal human epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell, 以下 NHEK-iPSC-MSC と略す），EBKC-iPSC 由来の MSC（mesenchymal stem/stromal cell derived from epidermolysis bullosa patient epidermal keratinocyte-derived induced pluripotent stem cell, 以下 EBKC-iPSC-MSC と略す），および BM-MSC.

Ⅳ. NHEK-iPSC-MSC のマウスへの皮内ならびに静脈投与

最初に，NOD/SCID マウスの背部の毛を剃毛し，麻酔下でそれぞれのマウスの背部皮膚に 5mm のパンチメスを用いて全層皮膚欠損の創傷を作成した. 皮内投与（subcutaneous injection，以下 *s.c.*と略す）実験では，マウスの創傷周囲 4 箇所に 200µl PBS で希釈した NHEK-iPSC-MSC 1.8×10^6 個を *s.c.*した（n=5）. ポジティブコントロールとして，200µl PBS で希釈した BM-MSC 1.8×10^6 個（n = 3）を，ネガティブコントロールとして 200µl PBS（n=5）を *s.c.*した（図 20）.

尾静脈からの静脈投与（intravenous injection，以下 *i.v.*と略す）実験では，NOD/SCID マウス（各々n=5）を 4 つの群に割り当てた：150µl の PBS 中に NHEK-iPSC-MSC 1×10^6 個を含む群，NHEK-iPSC-MSC 3×10^5 個を含む群，BM-MSC 1×10^6 個を含む群，および 150µl PBS 投与群. 各マウスの背部皮膚に直径 5mm の全層皮膚欠損の創傷を作成した後，尾静脈から *i.v.*を行った（図 23）. 創傷作成日（day0）および 1，6，8 および 14 日後にデジタルカメラ（Stylus TG-4 Tough，Olympus）で創傷領域の写真を撮り，Image J ソフトウェア (Schneider et al., 2012)を用いて潰瘍の面積を測定し，day0 と比較した上皮化率を算出し，上皮化の経過を観察した.

*s.c.*群，*i.v.*群ともに各種細胞の投与 2 週間後にマウスを安楽死させ，創傷部位を含む上皮化皮膚を採取し，以降の実験を行った.

Ⅴ. 統計学的解析

創傷治癒マウスモデルにおける上皮化の経過のデータを Dunnett の多重比較試験で分析し，平均±標準誤差として表した. *P* 値が 0.05 未満のものを有意な結果とした. この統計解析は，Excel2016（Microsoft，Redmond，WA，US）および Statcel4（OMS，Tokyo，Japan）を用いて行った. マイクロアレイ解析では，比較サンプル間で差異を認めた遺伝子プローブを fold change および local-pooled-error（以下 LPE と略す）試験で処理した. 比較のためのカットオフは

fold change の絶対値で 2 以上，LPE の P 値で 0.05 未満，fail count は 6 未満とした．ピアソンの相関を用いて，試料間の再現性の程度を調べた（範囲：-1≦r≦1）．階層クラスタリングは，ユークリッド法と完全連鎖法を用いて行った．マイクロアレイの統計解析は，R 3.1.2 を用いて行った(Ihaka and Gentleman, 1996).

実験結果

（1） KC-iPSC-MSC の樹立

はじめに，異なる NHEK-iPSC のコロニーから MSC への分化が可能であるかを調べた（図 9，10）(Tran et al., 2012). 分化誘導から 15 日後では，$CD105^+$ 細胞が 19.1±3.2%を占め，それらを MACS でソーティングし，以降の実験を行った．まず初めに，我々は NHEK-iPSC から樹立した細胞が MSC であるかどうかの検証を行った. International Society for Cellular Therapy によって MSC であるための 3 つの最低条件が示されており，樹立した細胞がこれらの基準を満たすかどうかを検証した. その基準は以下の通りである : ①プラスチックディッシュに接着しながら増殖すること，②CD73，CD90 および CD105 が陽性であり, Lineage negativity（$CD45^-$, $CD14^-$または $CD11b^-$, $CD19^-$または $CD79\alpha^-$, $HLA\text{-}DR^-$，$CD34^-$）であること，③*in vitro* で少なくとも骨芽細胞，脂肪細胞，および軟骨細胞に分化すること(Horwitz et al., 2005)．抽出された細胞は α-MEM 下でプラスチックディッシュに接着しながら増殖する紡錘形細胞であり，6 継代目まで形態変化を伴わずに培養できることを確認した（図 11）．また，細胞表面マーカーをフローサイトメトリー法によって調べたところ $CD73^+$, $CD90^+$，$CD105^+$であり，lineage negative であることを確認した（図 12）．次に，*in vitro* において NHEK-iPSC から樹立した細胞の間葉系細胞への分化を試み，その後，免疫染色を行った．免疫染色において，脂肪細胞の細胞質で陽性となる FABP4，骨芽細胞の細胞質で陽性となる osteocalcin，軟骨細胞の細胞質で陽性となる aggrecan がそれぞれ陽性となったことから，樹立した細胞は，脂肪細胞，骨芽細胞，軟骨細胞へ分化しうることを確認した（図 13）．以上より，NHEK-iPSC から誘導した細胞は MSC であることが示された．また，EBKC-iPSC からも同様に MSC への分化を試み, 同様の検証を行うことで EBKC-iPSC から樹立した細胞が MSC であることを確認した（図 10, 12, 13）．よって，本実験において，NHEK-iPSC と EBKC-iPSC から MSC を樹立することができた（それぞれ，NHEK-iPSC-MSC，EBKC-iPSC-MSC とする）.

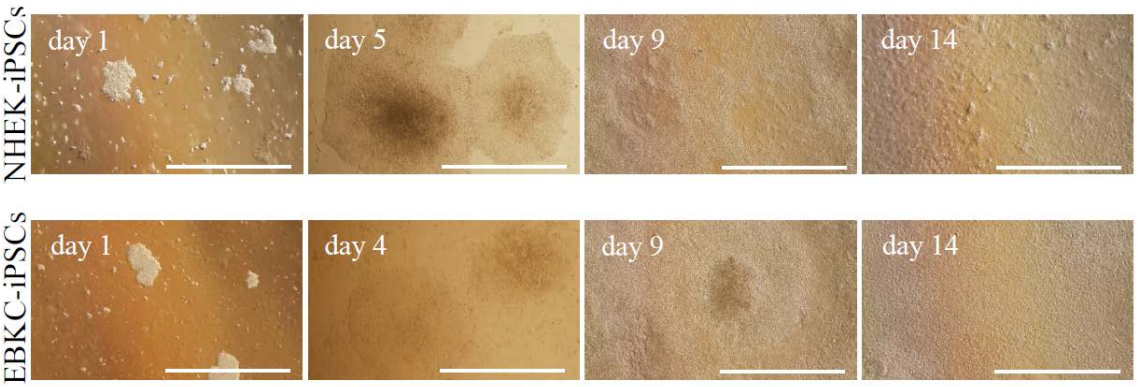

図 10. KC-iPSC からの MSC の樹立までの経過

NHEK-iPSC および EBKC-iPSC コロニーの形態は，15 日間にわたって変化し，プラスチック接着性の細胞塊に変化した．スケールバー= 1mm.

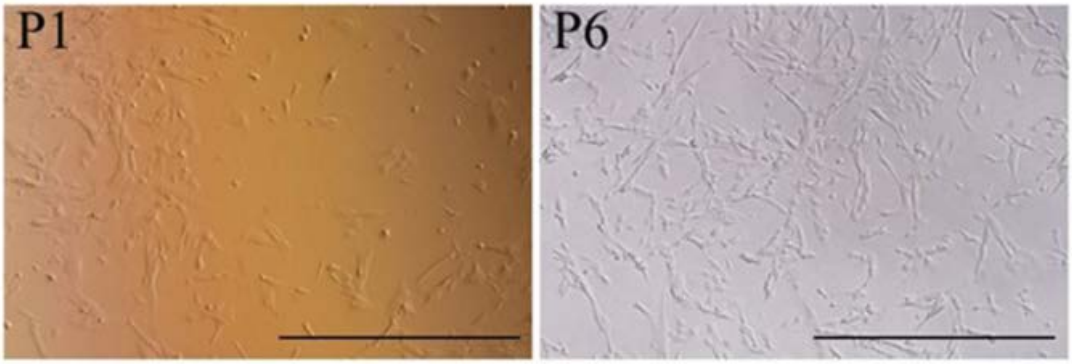

図 11. NHEK-iPSC-MSC の培養

NHEK-iPSC-MSC はプラスチックディッシュに接着しながら増殖し，形態学的な変化を認めずに 6 継代目まで培養できた．スケールバー= 1mm.

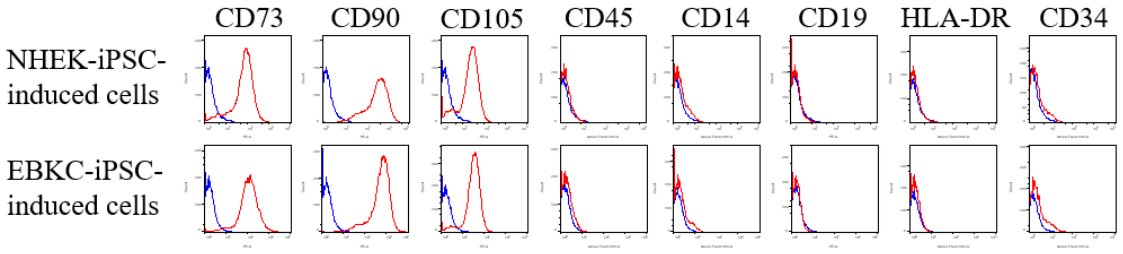

図 12. フローサイトメトリー解析

KC-iPSC 誘導細胞（=KC-iPSC-MSC）が lineage-negative（$CD45^-$，$CD14^-$，$CD19^-$，$HLA\text{-}DR^-$，$CD34^-$）であり，CD73，CD90 および CD105 を発現することを確認した．青色のヒストグラム：アイソタイプコントロール．

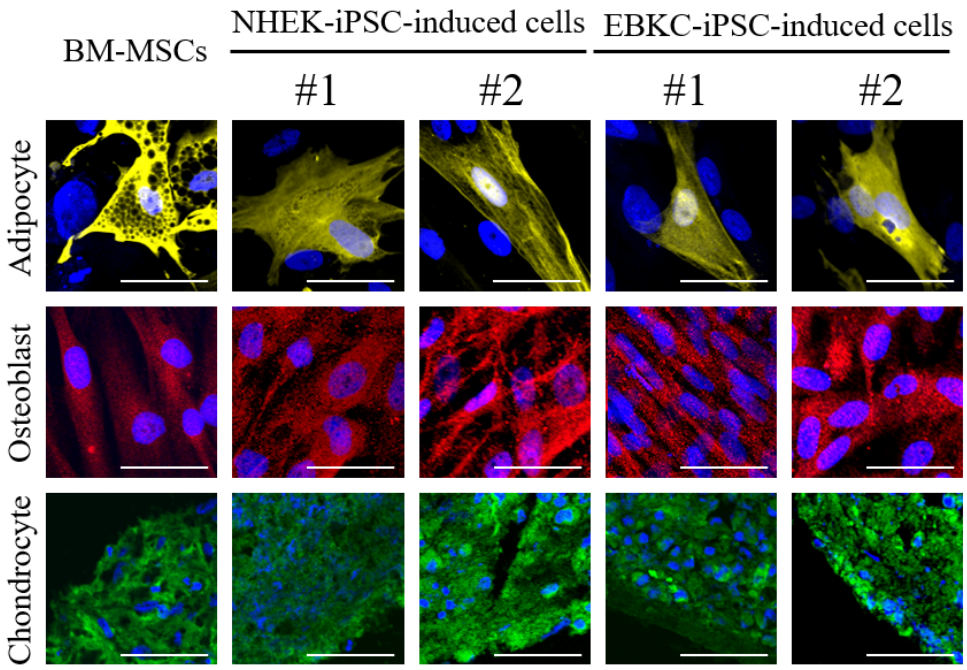

図 13. 免疫染色

KC-iPSC 誘導細胞（=KC-iPSC-MSC）および BM-MSC は，脂肪細胞（FABP4：黄色），骨芽細胞（osteocalcin：赤色）および軟骨細胞（aggrecan：緑色）に分化した．青色：DAPI．スケールバー=50μm．．

（２） KC-iPSC-MSC の *in vitro* での特徴

次に我々は，樹立した NHEK-iPSC-MSC と EBKC-iPSC-MSC における，由来となる iPSC や KC のコンタミネーションの有無を検証した. RT-PCR により樹立した細胞は，KC に特異的に発現する *KRT5* や *KRT14* および iPSC マーカーである *POU5F1* や *LIN28A* が陰性である一方で，間葉系細胞マーカー（*PDGFRB*, *ENG*, *NT5E*, *CD44*）が陽性であり，樹立した細胞の中には，他の種類の細胞はコンタミネーションしていないことを確認した（図 14）．また，コントロールとした BM-MSC と同様の遺伝子発現を示した（図 14）．次に，網羅的に遺伝子発現の差異を調べるために，各 mRNA からマイクロアレイ解析を行った（Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip）．コントロールとして，KC-iPSC，EBKC，EB-fibroblast，BM-MSC を用いた．47,213 probes が検出され，遺伝子発現パターンにおいて NHEK-iPSC-MSC と EBKC-iPSC-MSC が BM-MSC と正の相関を持つことが示された，（図 15，16）．一方で，NHEK-iPSC-MSC と EBKC-iPSC-MSC が KC-iPSC との間に負の相関関係を認め，両者の遺伝子発現パターンは異なる傾向を示した（図 15，16）．遺伝子発現の差異が大きいプローブ数を調べると，iPSC-MSC と original iPSC では，およそ 3,700/47,213 であった一方で, iPSC-MSC と BM-MSC との間では, 1,013～1,416/47,213 と少なかった（fold change ≧ 2.0, $P < 0.05$，図 17）．また，EBKC-iPSC-MSC は EB-fibroblast に近い遺伝子発現パターンを示し（288～292/47,213，data not shown），これは過去の報告と同様であった（Denu et al., 2016）.

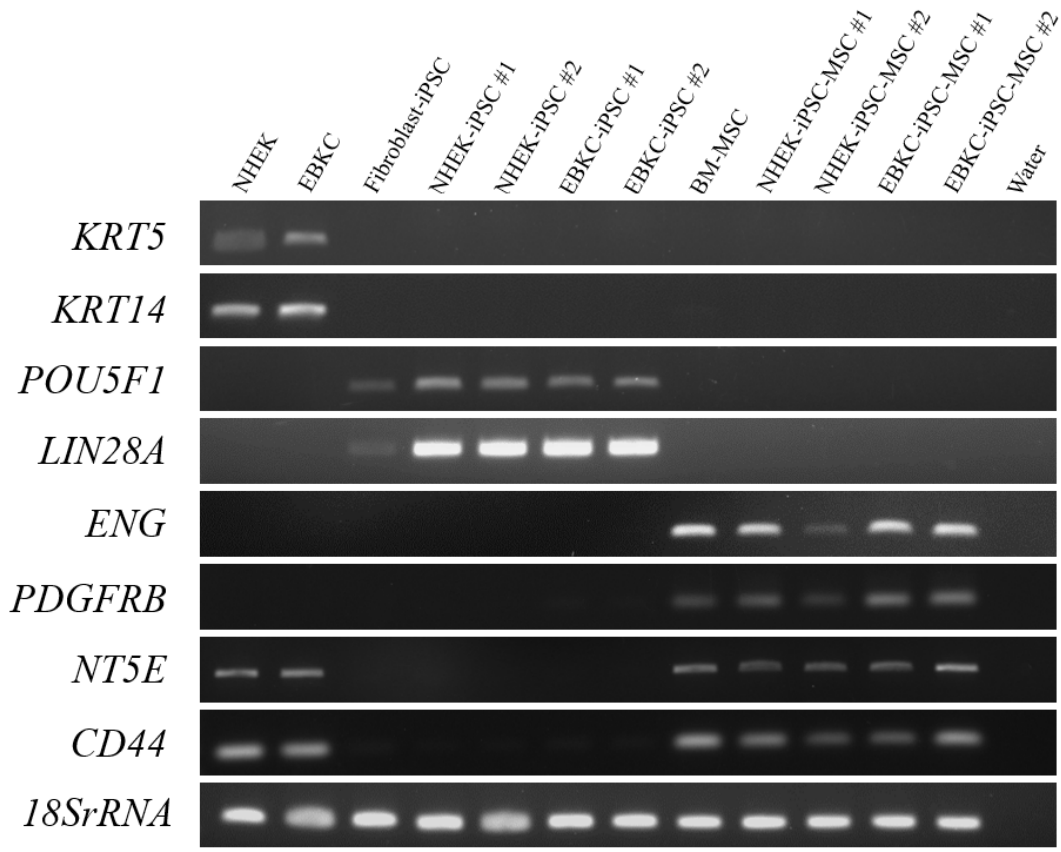

図 14. 分化の各段階における細胞の RT-PCR 解析

KC-iPSC-MSC は KC 関連マーカー（*KRT5* および *KRT14*）または多能性マーカー（*POU5F1* および *LIN28A*）を発現しないが，MSC 関連マーカー（*PDGFRB*, *ENG*, *NT5E* および *CD44*）を発現していた．

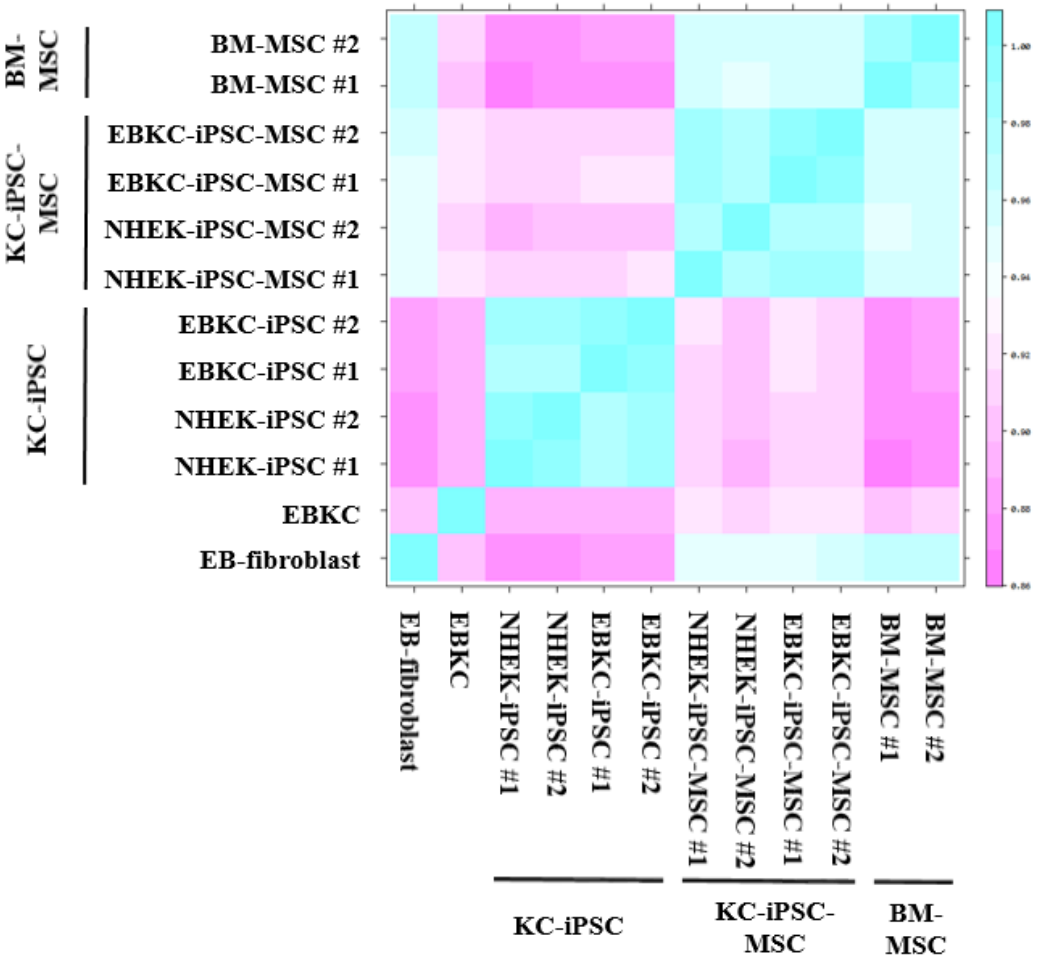

図 15. 遺伝子発現に関するマイクロアレイ解析

KC-iPSC-MSC と BM-MSC には正の相関あることが示された．青色が濃いほど正の相関が強いことを示し，桃色が濃いほど負の相関が強いことを示す（範囲：$-1 \leqq r \leqq 1$）．

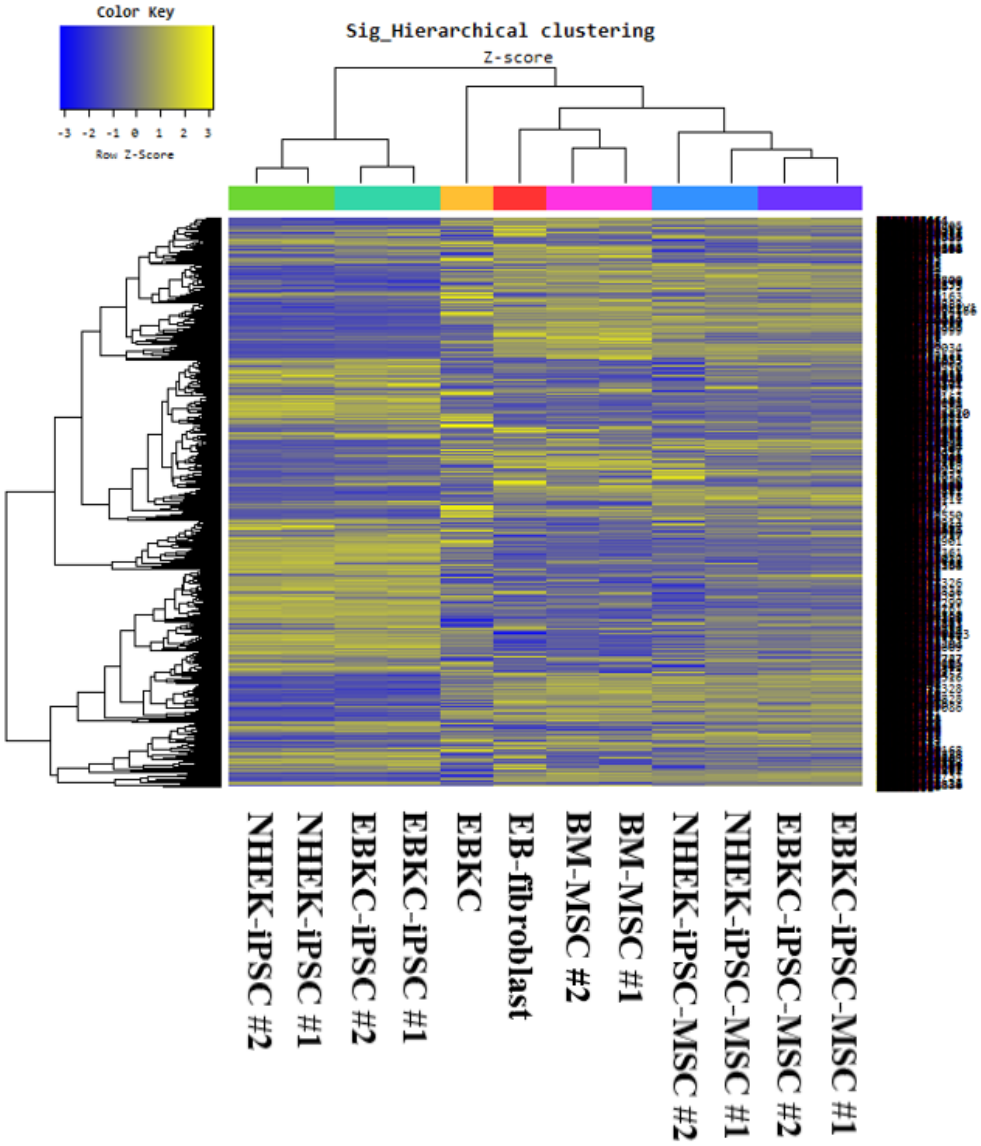

図 16. ヒートマップ

マイクロアレイ解析により作成したヒートマップでは，KC-iPSC-MSC の遺伝子発現パターンが KC-iPSC とは大きく異なるが，BM-MSC および EB-fibroblast の遺伝子発現パターンとは類似していることを示している．

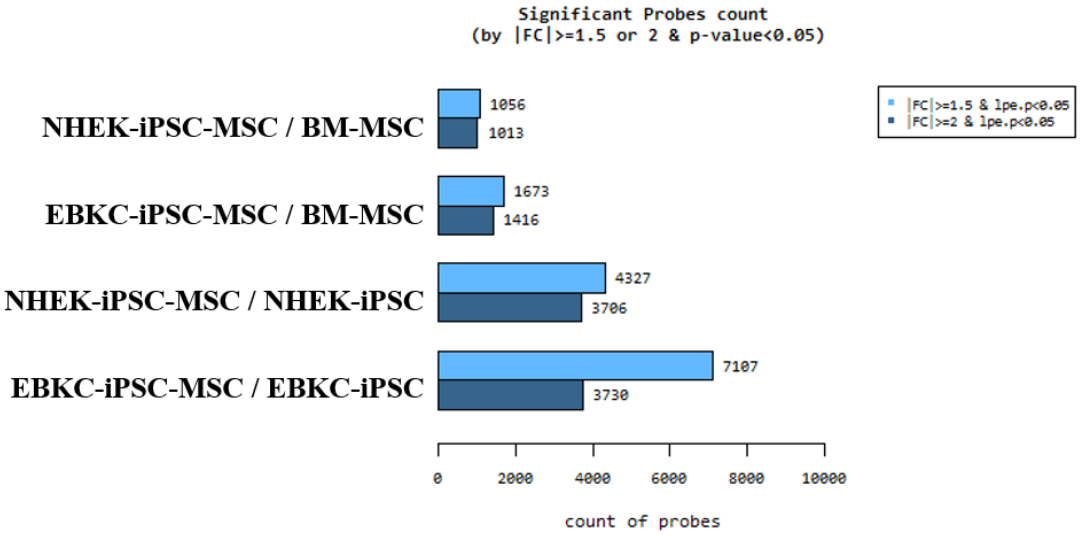

図 17. マイクロアレイ解析における有意差のあるプローブについて

有意な差のあるプローブ数は，KC-iPSC-MSC と KC-iPSC との間よりも KC-iPSC-MSC と BM-MSC との間の方が少なかった.

（3）KC-iPSC-MSC の EB の細胞療法への応用性

我々は，同種 BM-MSC の有用性を踏まえ，KC-iPSC-MSC も EB に対する細胞療法のリソースとして有用であるかどうかを検証した．まず初めに，KC-iPSC-MSC が mRNA レベルで DEJ 関連蛋白を発現するかどうかを調べた. RT-PCR において NHEK-iPSC-MSC が *COL7A1*，*LAMA3*，*LAMB3*，*LAMC2*，*COL4A1* を発現し，*KRT5*，*KRT14*，*COL17A1*，*ITGB4* を発現しないことを確認した（図 14，18）．マイクロアレイ解析においても DEJ 関連蛋白遺伝子の発現パターンは，NHEK-iPSC-MSC，EBKC-iPSC-MSC，BM-MSC，EB-fibroblast では同様の傾向を示していた（図 19）．特に注目すべき点としては，NHEK-iPSC-MSC では BM-MSC よりも *COL7A1* 遺伝子を 4.1 倍発現していることであった．これらの結果は，KC-iPSC-MSC が EB に対して，DEJ 関連蛋白を産生する可能性を示した.

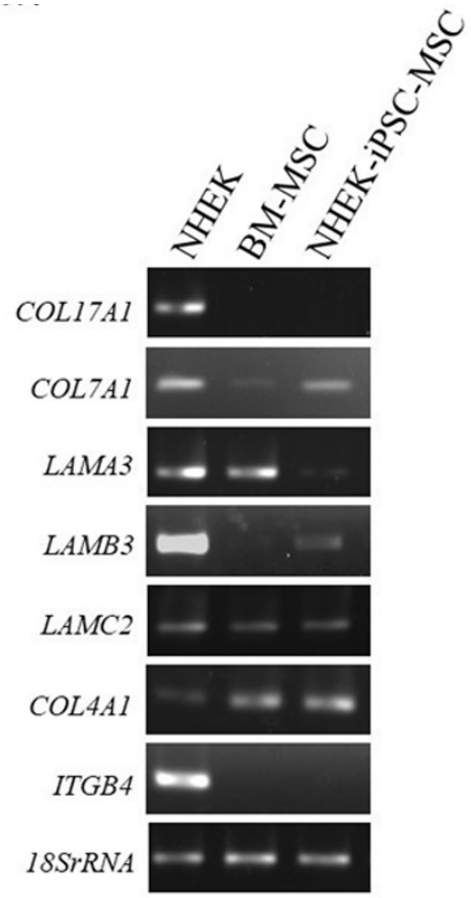

図 18. RT-PCR による DEJ 関連蛋白遺伝子発現の解析

RT-PCR の結果，NHEK-iPSC-MSC において，*COL7A1*，*LAMA3*，*LAMB3*，*LAMC2* および *COL4A1* は mRNA レベルでは発現しているが，*COL17A1* および *ITGB4* は発現してなかった.

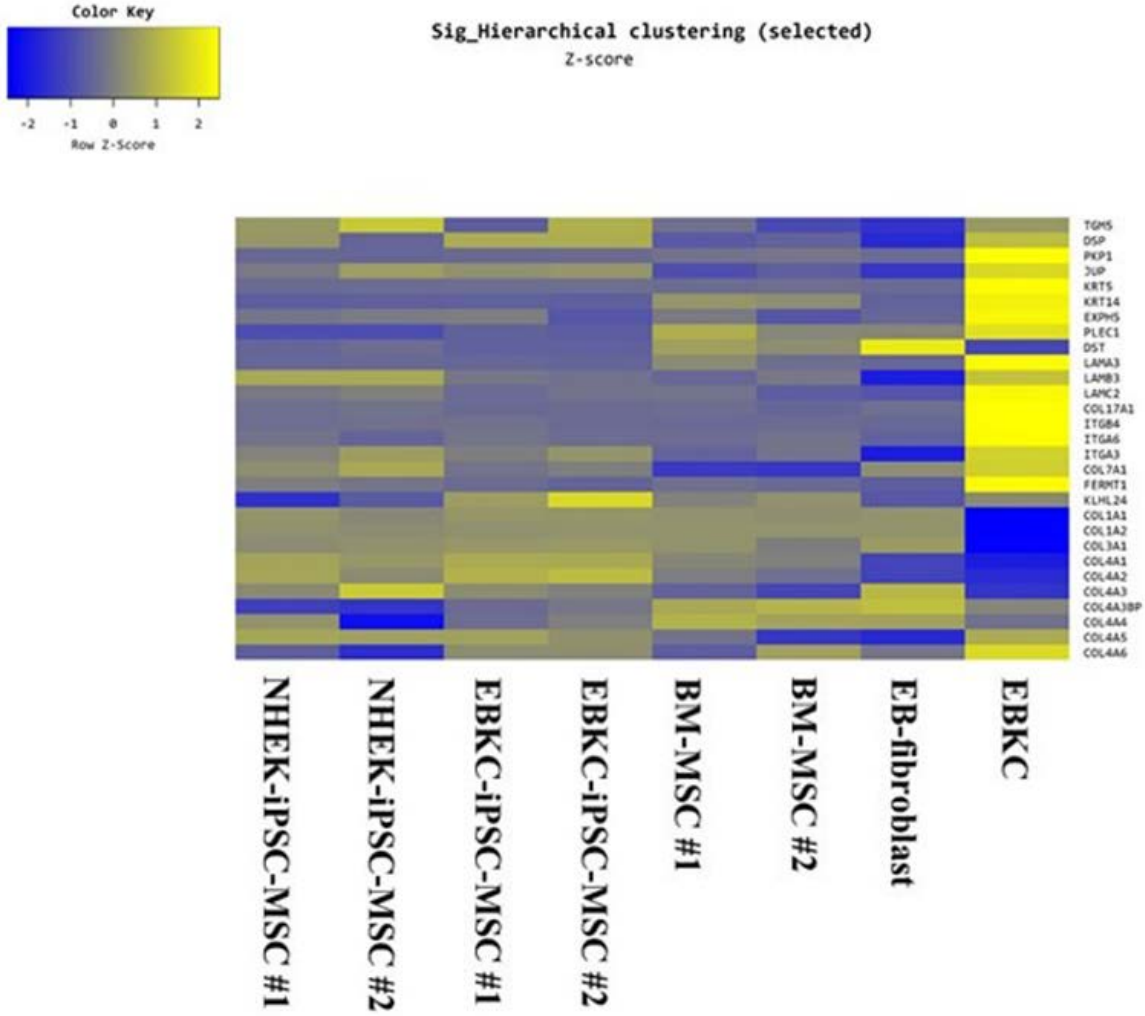

図 19. マイクロアレイ解析による DEJ 関連蛋白遺伝子発現の解析

DEJ 関連蛋白遺伝子のマイクロアレイ解析により作成したヒートマップでは，NHEK-iPSC-MSC，EBKC-iPSC-MSC，BM-MSC および EB-fibroblast が類似の発現パターンを示した．

（4）KC-iPSC-MSC が創傷治癒を促進し，*in vivo* でヒト VII 型コラーゲンを供給する

KC-iPSC-MSC が *in vivo* でヒト VII 型コラーゲンを供給できるかを検証するために，我々は背部皮膚に 5mm のパンチメスを用いて全層皮膚欠損の創傷を作成した NOD/SCID マウス に NHEK-iPSC-MSC を異種移植し，上皮化部位にヒト VII 型コラーゲンが発現するかどうかを調べた．

初めに，我々は 1.8×10^6 個の NHEK-iPSC-MSC を NOD/SCID マウスの全層皮膚欠損部位の周囲に *s.c.* した（図 20）．上皮化皮膚のサンプルは投与から 2 週間後に採取した．ヒト VII 型コラーゲンに反応する一次抗体（LH7.2）を用いた直接蛍光抗体法を行ったところ，NHEK-iPSC-MSC 投与群では 5 匹中 3 匹で DEJ にヒト VII 型コラーゲンの線状沈着を認めた．一方で，BM-MSC 投与群では 3 匹中 2 匹が陽性であり，ネガティブコントロールである PBS 投与群では 5 匹中すべてが陰性であることを確認した（図 21）．一方で，採取した上皮化部位の皮膚サンプルから RNA を採取し，RT-PCR を行ったところ，いずれのサンプルからも *COL7A1* もハウスキーピング遺伝子である *B2M* も検出されなかった（図 22）．

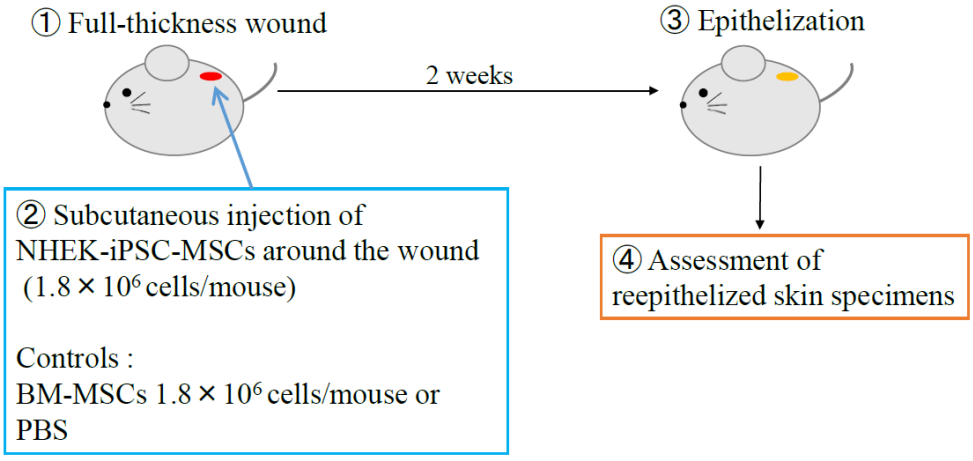

図 20. NHEK-iPSC-MSC の皮内注射（*s.c.*）実験の手順

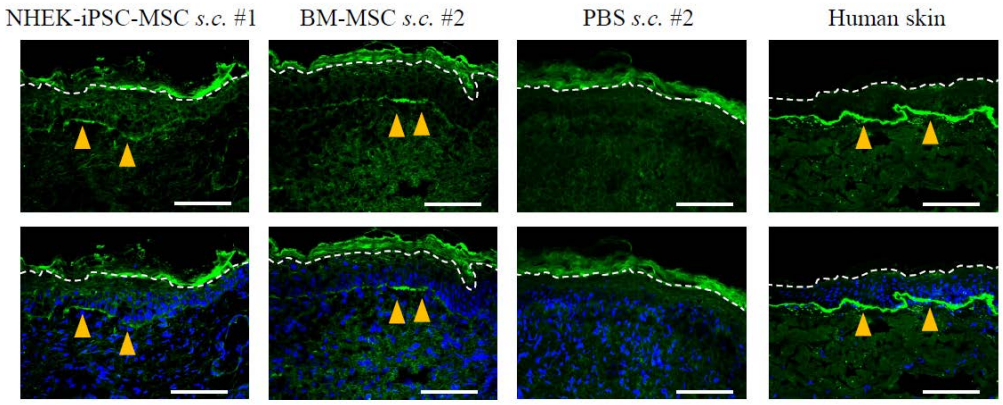

図 21. NHEK-iPSC-MSC の皮内注射（*s.c.*）実験での免疫染色

NHEK-iPSC-MSC を *s.c.*した 5 匹のマウスのうち 3 匹において DEJ にヒト VII 型コラーゲン（LH7.2，緑色）の線状沈着を示す（黄色の矢印）．青色：DAPI. 白色の点線：角層との境界線．スケールバー=100μm.

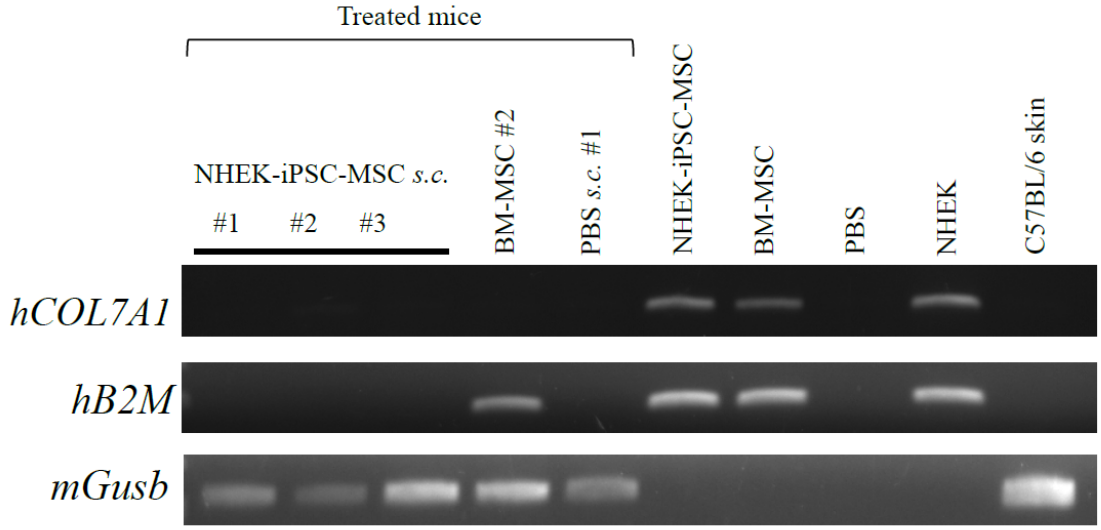

図 22. NHEK-iPSC-MSC の皮内注射（*s.c.*）実験での RT-PCR

NHEK-iPSC-MSC 自体はヒト *COL7A1* を mRNA レベルで発現したが，NHEK-iPSC-MSC を *s.c.*し，上皮化したマウス皮膚標本においてヒト *COL7A1* および *B2M* は mRNA レベルで検出されなかった.

次に，我々は，同様の方法で創傷を作成した NOD/SCID マウスに NHEK-iPSC-MSC を尾静脈より *i.v.*した（図 23）．上皮化の経過を観察したところ，1×10^6個の NHEK-iPSC-MSC を *i.v.*した群が PBS を投与したネガティブコントロール群と比較し，創傷作成時の day0 から day6 までの期間で創傷治癒が促進していることが判明した（図 24, 25）．平均上皮化率は PBS 投与群では，day 1 で 9.57±2.9%，day6 で 44.4±10.2%である一方で，1×10^6 個の NHEK-iPSC-MSC を投与した群では，day 1 で 34.8±7.8%，day6 で 73.4±4.9%であった（$P < 0.05$, 図 25）．上皮化後の皮膚組織に対する蛍光抗体法では，NHEK-iPSC-MSC を 1×10^6個投与した群, 3×10^5個投与した群ともに 5 匹中 4 匹でヒト VII 型コラーゲンの線状沈着を DEJ に認めた（図 26）．その一方で，上皮化皮膚から RNA を抽出して行った RT-PCR ではヒト *COL7A1* や *B2M* の発現は確認できなかった．以上から，*i.v.*後 2 週間の時点において，ヒト VII 型コラーゲンは DEJ に沈着しているものの，NHEK-iPSC-MSC 自体は創傷治癒部位から排除されていることが示唆された（図 27）．

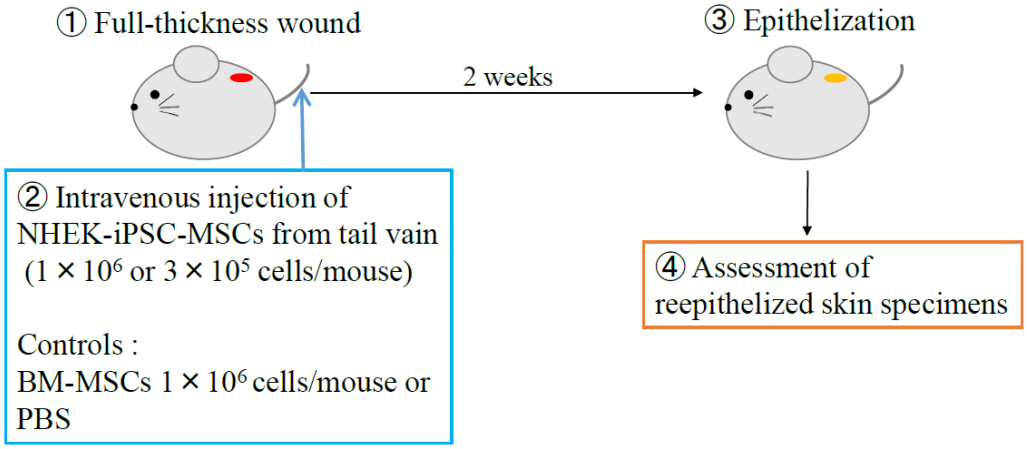

図 23. NHEK-iPSC-MSC の静脈内注射（*i.v.*）実験の手順

各群につき 5 匹の NOD/SCID マウスに 1×10^6 または 3×10^5 個の NHEK-iPSC-MSC を *i.v.*した．

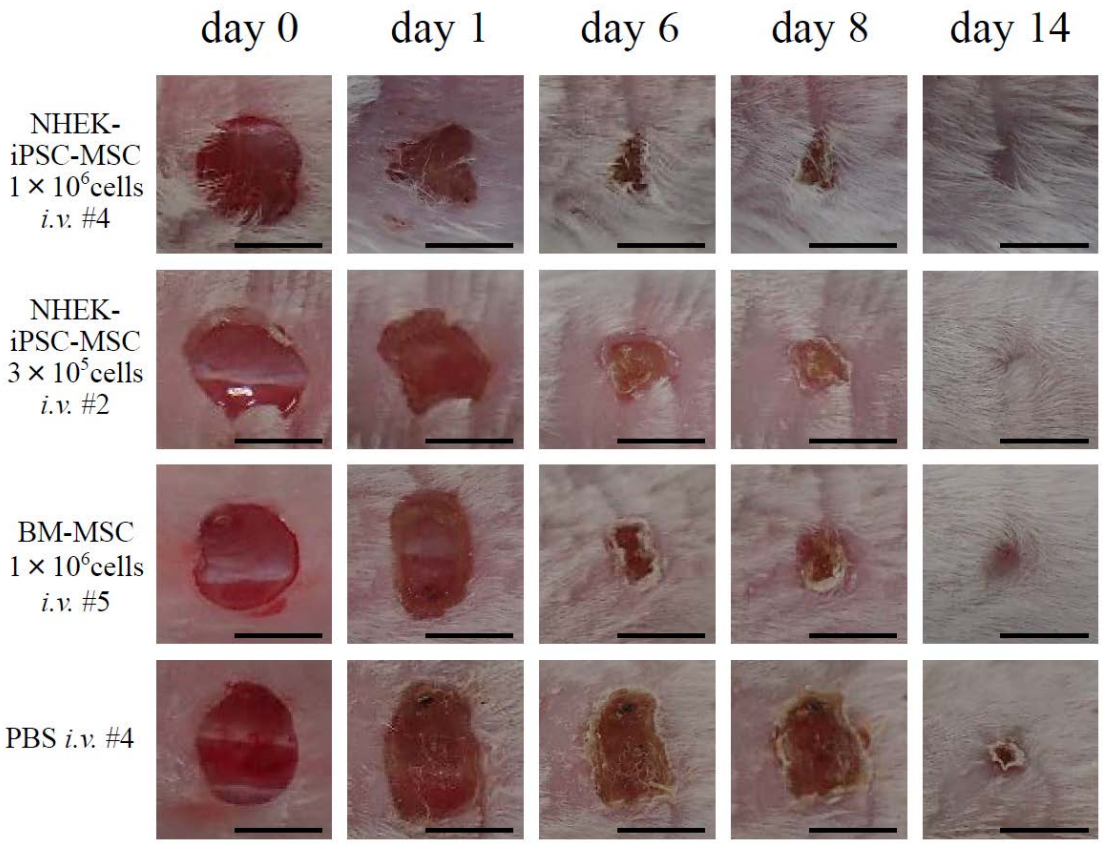

図 24. NHEK-iPSC-MSC の *i.v.*後の創傷治癒の経過

NHEK-iPSC-MSC および BM-MSC を *i.v.*したマウスは，PBS 投与群と比較し，創傷治癒が促進していた．スケールバー= 5mm.

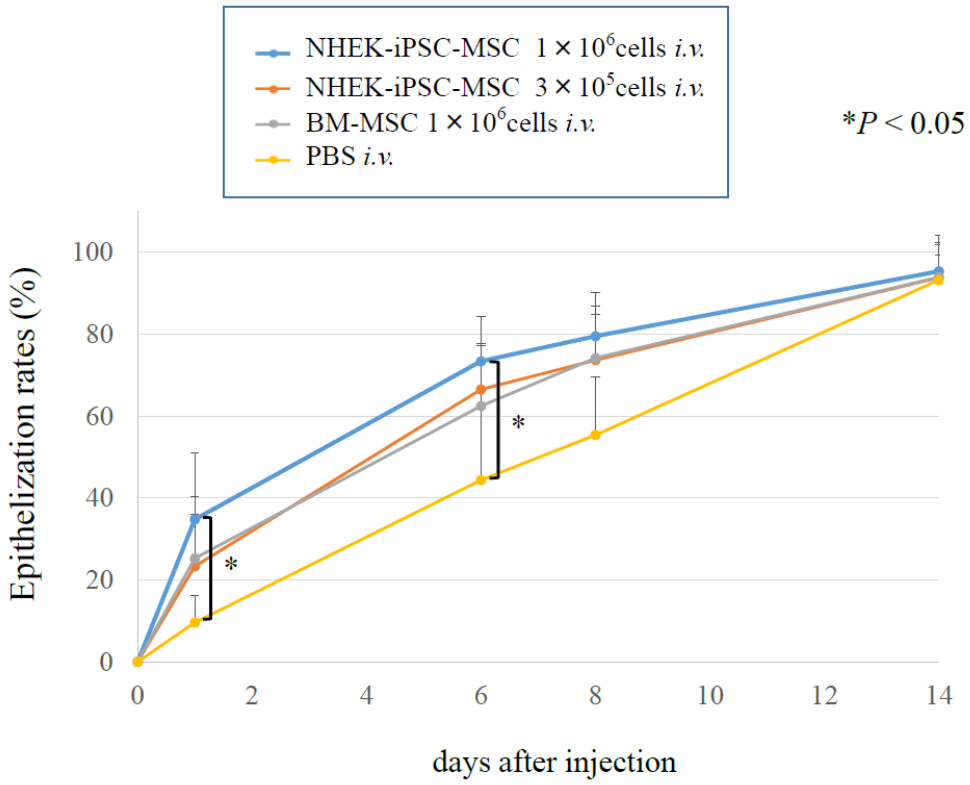

図 25. NHEK-iPSC-MSC の *i.v.*後の創傷部の上皮化率の経過

1×10⁶ 個の NHEK-iPSC-MSC を *i.v.*したマウスの創部の上皮化率は，day6 までネガティブコントロール群と比較して有意差をもって高かった（各群：n＝5，＊ $P < 0.05$）.

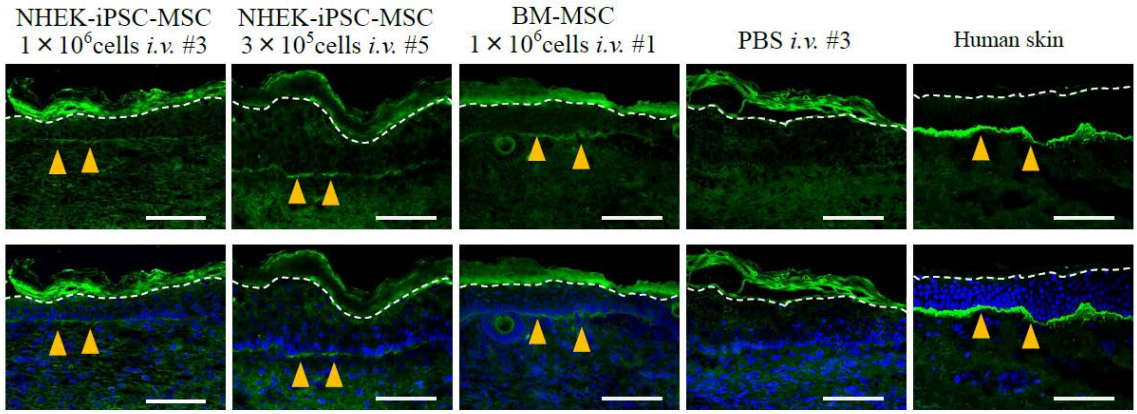

図 26. NHEK-iPSC-MSC の静脈内注射（*i.v.*）実験での免疫染色

NHEK-iPSC-MSC を *i.v.*されたマウスのうち 5 匹中 4 匹において，免疫染色で DEJ にヒト VII 型コラーゲン（LH7.2：緑色）が線状に沈着していた（黄色の矢頭）．青色：DAPI．白色の点線：角層との境界線．スケールバー=100μm.

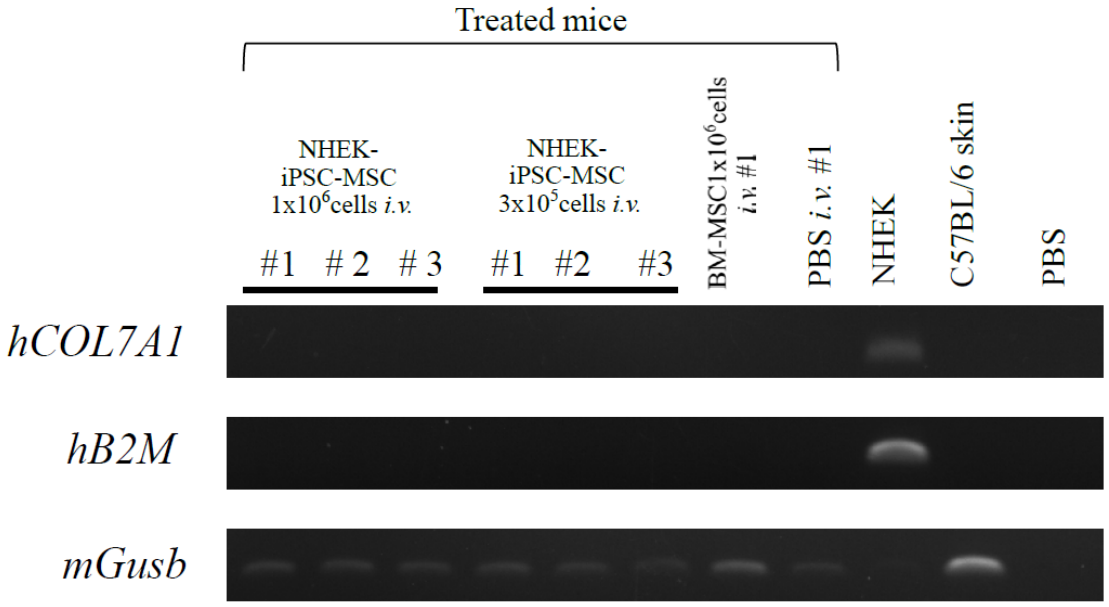

図 27. NHEK-iPSC-MSC の静脈内注射（*i.v.*）実験での RT-PCR

NHEK-iPSC-MSC および BM-MSC を *i.v.*したマウスの上皮化部位の皮膚標本では，RT-PCR においてヒト *COL7A1* または *B2M* 遺伝子を mRNA レベルで認めなかった（各群：n = 5）.

考察

本研究では，NHEK および EBKC 由来の iPSC から MSC を樹立することに成功した．我々は，この KC-iPSC-MSC が International Society for Cellular Therapy によって確立された MSC の 3 つの最低基準を満たすことを確認した(Horwitz et al., 2005)．本実験では，iPSC から誘導された細胞のうち MSC は約 19%を占めており，さらに 6 継代目まで変化なく培養できることを確認した．また，樹立した KC-iPSC-MSC の遺伝子発現プロファイルは BM-MSC と類似していることが判明した．注目すべきことに，NHEK-iPSC-MSC の *COL7A1* 遺伝子の発現は mRNA レベルで BM-MSC の 4.1 倍であった．さらに，NHEK-iPSC-MSC は，創傷治癒を促進し，皮内および静脈内への異種移植モデルにおいてヒト VII 型コラーゲンを産生する能力を有していた．

先に述べたように，同種 BM-MSC 移植は，重症 RDEB の治療に有望であると考えられている．しかしながら，同種 MSC を用いた治療が実用化されるには，いくつかの課題が残っている．1 点目としては，単一の細胞供給源からの MSC の増殖には限界があるということである．また，MSC は免疫原性が低いと報告されているが，MSC における major histocompatibility complex （以下 MHC と略す）クラス I の発現は潜在的にレシピエントからの排除をもたらし，臨床効果はドナー細胞の供給源によって左右され，特に同種 MSC の反復投与では問題となる可能性がある(Le Blanc et al., 2003；Eliopoulos et al., 2005；Lohan et al., 2017)．実際，RDEB 患者に対する同種 MSC の皮内投与では，治療効果の持続期間は約 4 か月間であった(Conget et al., 2010)．レシピエントからの排除は，同種 MSC に対する拒絶反応によって引き起こされるため，各患者に対して免疫原性の低い単一の供給源からの MSC の存在は，EB のような先天性疾患に対する反復治療に対して有用であると考える．

これらの問題を解決するために，我々は無限に増殖し，多能性を維持できる iPSC に焦点を当てた．さらに，近い将来，iPSC バンクが実現されると，HLA 適合 iPSC を誘導することも可能と考えられる(Taylor et al., 2012)．iPSC-MSC の確立は，MSC を使用する細胞療法において，多数の細胞を確保することを可能にし，理論的には，単一の供給源からの反復治療を無期限に行うことができる(Sabapathy and Kumar, 2016)．実際に，糖尿病性ポリニューロパチーおよび四肢虚血のマウスモデルにおける iPSC-MSC の有用性が他のグループによって報告されている(Himeno et al., 2013；Lian et al., 2010)．さらに最近 Webber らは，*in vitro* で RDEB 患者の線維芽細胞から iPSC を樹立し，遺伝子修復した上で MSC を樹立することに成功している(Webber et al., 2016)．

我々は本研究においてKCを用い，SVVを用いてリプログラムを行った．本

研究におけるポイントは，由来とする細胞をKCとすることにより，MSCを得るための一般的な方法である骨髄からの採取よりも侵襲性が低く済むことである(Wu et al., 2010)．また，SVVを使用することで，遺伝子挿入をもたらすことなく，体細胞を安全にリプログラムすることが可能となる．さらに本研究では，KC-iPSC-MSCの樹立においてフィーダーフリー条件下でシグナル調整のみによって行われた．したがって，我々のプロトコールは侵襲性や安全性の観点から，従来に比してヒト再生医療に適したMSCの樹立方法と考える．

KC から MSC を誘導することは，復帰変異モザイクの観点からも意義がある．「自然遺伝子治療」とも呼ばれる復帰変異モザイクは，相同組換えなど複数の機序によって，一部の体細胞における病原性変異が消失する自然現象である(Jonkman et al., 1997)．RDEB では，KC において復帰変異モザイクが起きていると報告されており，そのような部位では皮膚の脆弱性が改善している(Jonkman et al., 1997)．そして，そのような復帰変異 KC は，先天性疾患に対して根本的な自己細胞療法を実現するための有望な手掛かりである．本研究では，EBKC-iPSC から MSC を確立することに成功した．残念ながら現時点で，我々は復帰変異した EBKC-iPSC をまだ得ることはできていない（data not shown）．しかしながら，これまでに複数のグループが復帰変異した EBKC-iPSC の樹立に成功している(Osborn et al., 2013；Umegaki-Arao et al., 2014)．本研究は，復帰変異 EBKC-iPSC-MSC を用いた，RDEB に対する自己細胞による全身療法への道を開くと考える．

NHEK-iPSC-MSC は，*COL7A1* だけでなく，*LAMA3*，*LAMB3*，および *LAMC2* の mRNA も発現することを確認した．MSC による細胞療法が接合部型 EB に有効であるかどうかは解明されていないが，我々の結果および以前の報告では，MSC および KC-iPSC-MSC がラミニン 332 を産生しうることを示している（Kaipe et al., 2015）．さらに，*LAMB3* に変異を有する接合部型 EB 患者では，KC における復帰変異モザイクが報告されている(Pasmooij et al., 2007；Jonkman and Pasmooij, 2009)．したがって，本研究で誘導された KC-iPSC-MSC は，一部の接合部型 EB に対しても有用である可能性がある．

我々は，免疫不全マウスに対して NHEK-iPSC-MSC を異種移植し，移植後 14 日後の皮膚 DEJ においてヒト VII 型コラーゲンを検出した．しかし，RT-PCR においてヒト *COL7A1* および *B2M* を mRNA レベルでいずれの皮膚にも確認できなかった．原因としては，NOD/SCID マウスに残存する免疫能によって，ヒト MSC が早期に排除された可能性が考えられる．一方、ヒト VII 型コラーゲンの *in vivo* での半減期は，特異的抗体によって除去されない限り，約 1 か月とされている(Kuhl et al., 2016)．したがって，NHEK-iPSC-MSC 自体は異種移植後早期に排除されたものの，ヒト VII 型コラーゲンが長期に DEJ に沈着

したと推測される．

我々の研究の 1 つの課題は，今回のプロトコールにおいて培地中に FBS を含んでおり，未知のウイルスやプリオンの混入の恐れが排除しきれないことである．Webber らによる MSC 誘導においても FBS が使用されている(Webber et al., 2016)．また，同種 MSC 移植を受けた接合部型 EB 患者において，血清中に MSC に結合する抗 FBS 抗体が認められたという報告も存在する(Kaipe et al., 2015)．さらに，健常人の約 50%は，明らかな誘因なしに抗 FBS 抗体を有するともされている(Mogues et al., 2005)．抗 FBS 抗体の臨床的意義は未知であるが，臨床的現場において FBS は細胞療法の潜在的なリスク因子である．細胞培養時には，動物由来成分を含まない培地や自己血清を利用することも考慮されるべきである．

結論として，本研究において我々は，RDEB に対する KC-iPSC-MSC の潜在的な治療効果を示すことができた．現在，さまざまな分野で iPSC を用いた治療法が臨床応用されつつあり，RDEB もその例外ではない．KC-iPSC-MSC は低侵襲かつ安全であり，復帰変異モザイクの観点からも優れた方法になりうると考える（図 28）．

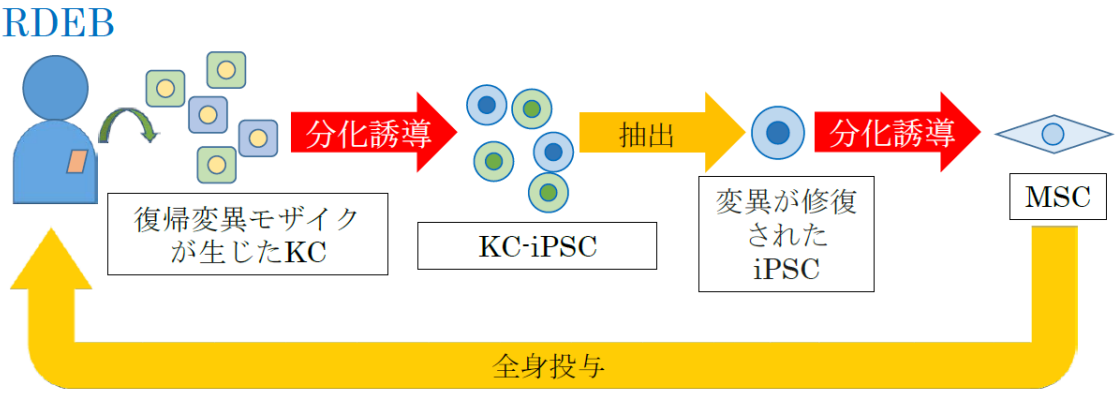

図 28. 将来的な RDEB の治療戦略

本研究では，NHEK-iPSC と変異のある EBKC-iPSC から MSC を樹立することに成功した．将来的に肉眼的に復帰変異モザイクが生じた KC を採取し，そこから樹立した iPSC の中から実際に変異が修復されている iPSC を抽出することに成功できれば，本研究の方法を用いて，変異が自然に修復された患者由来の EBKC-iPSC-MSC を樹立することができ，本来，遺伝性疾患においては困難とされている MSC の自家移植が可能になると考える．

総括および結論

本研究では以下の新知見を得た.

・NHEK-iPSC と EBKC-iPSC より MSC を樹立した.
・KC-iPSC-MSC と BM-MSC の遺伝子発現パターンは類似している.
・NHEK-iPSC-MSC では，mRNA レベルで *COL7A1* 遺伝子の発現を認めた.
・NHEK-iPSC-MSC を免疫不全マウスに異種移植したところ，早期の創傷治癒促進効果が認められ，DEJ にヒト VII 型コラーゲンの沈着を認めた.

結論として，我々は，KC-iPSC-MSC が RDEB の有効な細胞療法の供給源になり得ると考える.

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，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．

利益相反

開示すべき利益相反状態はない.

引用文献

Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. ,Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS One. 3, e1886.

Conget, P., Rodriguez, F., Kramer, S., Allers, C., Simon, V., Palisson, F., Gonzalez, S. ,Yubero, M. J. (2010). Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Cytotherapy. 12, 429-431.

Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F. ,Hematti, P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. Acta Haematol. 136, 85-97.

El-Darouti, M., Fawzy, M., Amin, I., Abdel Hay, R., Hegazy, R., Gabr, H. ,El Maadawi, Z. (2016). Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with bone marrow non-hematopoeitic stem cells: a randomized controlled trial. Dermatol. Ther. 29, 96-100.

Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S. ,Galipeau, J. (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. Blood. 106, 4057-4065.

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.

Fujita, Y., Abe, R., Inokuma, D., Sasaki, M., Hoshina, D., Natsuga, K., Nishie, W., McMillan, J. R., Nakamura, H., Shimizu, T., et al. (2010). Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 14345-14350.

Himeno, T., Kamiya, H., Naruse, K., Cheng, Z., Ito, S., Kondo, M., Okawa, T., Fujiya, A., Kato, J., Suzuki, H., et al. (2013). Mesenchymal stem cell-like cells derived from

mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. Biomed Res. Int. 2013, 259187.

Hirsch, T., Rothoeft, T., Teig, N., Bauer, J. W., Pellegrini, G., De Rosa, L., Scaglione, D., Reichelt, J., Klausegger, A., Kneisz, D., et al. (2017). Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. Nature. 551, 327-332.

Hocking, A. M. ,Gibran, N. S. (2010). Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. Exp. Cell Res. 316, 2213-2219.

Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S. ,Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 7, 393-395.

Ihaka, R. ,Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. J. Comput. Graph. Stat. 5, 299-314.

Iinuma, S., Aikawa, E., Tamai, K., Fujita, R., Kikuchi, Y., Chino, T., Kikuta, J., McGrath, J. A., Uitto, J., Ishii, M., et al. (2015). Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFRalpha+ cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. J. Immunol. 194, 1996-2003.

Jonkman, M. F. ,Pasmooij, A. M. (2009). Revertant mosaicism--patchwork in the skin. N. Engl. J. Med. 360, 1680-1682.

Jonkman, M. F., Scheffer, H., Stulp, R., Pas, H. H., Nijenhuis, M., Heeres, K., Owaribe, K., Pulkkinen, L. ,Uitto, J. (1997). Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. Cell. 88, 543-551.

Kaipe, H., Carlson, L. M., Erkers, T., Nava, S., Mollden, P., Gustafsson, B., Qian, H., Li, X., Hashimoto, T., Sadeghi, B., et al. (2015). Immunogenicity of decidual stromal cells in an epidermolysis bullosa patient and in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients. Stem Cells Dev. 24, 1471-1482.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H.,

Ehrlich, L. I., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature. 467, 285-290.

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S. ,Epstein, S. E. (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. Circulation. 109, 1543-1549.

Kuhl, T., Mezger, M., Hausser, I., Guey, L. T., Handgretinger, R., Bruckner-Tuderman, L. ,Nystrom, A. (2016). Collagen VII Half-Life at the Dermal-Epidermal Junction Zone: Implications for Mechanisms and Therapy of Genodermatoses. J. Invest. Dermatol. 136, 1116-1123.

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. ,Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic propertiesof differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp. Hematol. 31, 890-896.

Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H. K., Wu, X., Zhang, Y., Lam, F. F., Kang, S., Xia, J. C., Lai, W. H., et al. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. Circulation. 121, 1113-1123.

Lohan, P., Treacy, O., Griffin, M. D., Ritter, T. ,Ryan, A. E. (2017). Anti-Donor Immune Responses Elicited by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Their Extracellular Vesicles: Are We Still Learning? Front. Immunol. 8, 1626.

Matsumura, W., Fujita, Y., Nakayama, C., Shinkuma, S., Suzuki, S., Nomura, T., Abe, R. ,Shimizu, H. (2018). Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. J. Dermatol. Sci. 89, 263-271.

Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A. ,Leroux, M. A. (2012). Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. Stem Cells Transl. Med. 1, 142-149.

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

169-177.

Mogues, T., Li, J., Coburn, J. ,Kuter, D. J. (2005). IgG antibodies against bovine serum albumin in humans--their prevalence and response to exposure to bovine serum albumin. J. Immunol. Methods. 300, 1-11.

Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Nomura, M., Tanaka, A., Nakamura, M., Inagaki, A., Nishikawa, M., Takei, I., Oishi, A., Tanabe, K., et al. (2016). Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. Cell Stem Cell. 19, 341-354.

Osborn, M. J., Starker, C. G., McElroy, A. N., Webber, B. R., Riddle, M. J., Xia, L., DeFeo, A. P., Gabriel, R., Schmidt, M., von Kalle, C., et al. (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. Mol. Ther. 21, 1151-1159.

Pasmooij, A. M., Pas, H. H., Bolling, M. C. ,Jonkman, M. F. (2007). Revertant mosaicism in junctional epidermolysis bullosa due to multiple correcting second-site mutations in LAMB3. J. Clin. Invest. 117, 1240-1248.

Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. ,Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science. 284, 1168-1170.

Petrof, G., Lwin, S. M., Martinez-Queipo, M., Abdul-Wahab, A., Tso, S., Mellerio, J. E., Slaper-Cortenbach, I., Boelens, J. J., Tolar, J., Veys, P., et al. (2015). Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. J. Invest. Dermatol. 135, 2319-2321.

Sabapathy, V. ,Kumar, S. (2016). hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. J. Cell. Mol. Med. 20, 1571-1588.

Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. ,Shimizu, H. (2008). Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. J. Immunol. 180, 2581-2587.

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

Schneider, C. A., Rasband, W. S. ,Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. 9, 671-675.

Shinkuma, S. (2015). Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 8, 275-284.

Shinkuma, S., Guo, Z. ,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.

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

Taylor, C. J., Peacock, S., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A. ,Bolton, E. M. (2012). Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. Cell Stem Cell. 11, 147-152.

Tran, N. T., Trinh, Q. M., Lee, G. M. ,Han, Y. M. (2012). Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. Stem Cells Dev. 21, 1165-1175.

Uccelli, A., Moretta, L. ,Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 8, 726-736.

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

Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. ,Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat. Rev. Genet. 11, 636-646.

Watanabe, M., Natsuga, K., Shinkuma, S. ,Shimizu, H. (2018). Epidermal aspects of type VII collagen: Implications for dystrophic epidermolysis bullosa and epidermolysis bullosa acquisita. J. Dermatol. 45, 515-521.

Webber, B. R., Osborn, M. J., McElroy, A. N., Twaroski, K., Lonetree, C. L., DeFeo, A. P., Xia, L., Eide, C., Lees, C. J., McElmurry, R. T., et al. (2016). CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. NPJ Regen. Med. 1, 16014.

Woodley, D. T., Keene, D. R., Atha, T., Huang, Y., Lipman, K., Li, W. ,Chen, M. (2004). Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nat. Med. 10, 693-695.

Wu, Y., Zhao, R. C. ,Tredget, E. E. (2010). Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. Stem Cells. 28, 905-915.

Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D. ,Carpenter, M. K. (2001). CytotherapyFeeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 19, 971-974.

清水宏. (2018). あたらしい皮膚科学　第 3 版. (東京, 日本: 中山書店).