



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松村, 若菜
Description	配架番号 : 2421
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13256号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71251
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Wakana_Matsumura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 松村 若菜

学 位 論 文 題 名

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.)

【背景と目的】

Induced pluripotent stem cell (iPSC) 樹立の技術によって、体細胞から自己複製能および多分化能を有する幹細胞を得ることができるようになった。疾患特異的な iPSC は、根治的な治療を含む再生医療や疾患の病態解明への応用が期待されている。劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) 患者由来の iPSC (EBKC-iPSC) は、従来はレトロウィルスベクターを介して樹立する方法が主体であったが、ウィルスベクターの宿主ゲノムへの組み込みが腫瘍発生のリスクや再現性のある分化誘導を行う上で問題であった。そこで近年は宿主ゲノム組み込みを伴わない iPSC の樹立方法が注目されているが、表皮角化細胞 (keratinocyte; KC) から樹立するための最適化された方法は確立されていない。そこで我々は、ゲノム組み込みを伴わないセンダイウィルスベクター (Sendai virus vector, SVV) を用いて、RDEB 患者の KC から安全な iPSC を樹立することを目的とした。

【材料と方法】

1. SVV の KC への感染最適化の検討

正常ヒト角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte, NHEK) に対し、免疫蛍光マーカーが組み込まれた GFP-SVV を multiplicities of infection (MOI) =1, 3, 5, 10 で感染させ、24 時間および 48 時間後における蛍光細胞の割合を評価した。

2. KC からの iPSC の樹立

ヘテロ接合体の変異を持つ RDEB 患者 2 名 (*COL7A1* 遺伝子に c.7723G>A および c.8569G>T の変異を有する 24 歳男性と、c.5444G>A および c.5818delC の変異を有する 58 歳女性) から皮膚を採取し、RDEB 患者 KC (EBKC) の初代培養を行った。

5×10^4 cell/ cm² の密度に播種した KC に対し、*Klf4*, *Oct3 / 4*, *Sox2*, *c-Myc* 遺伝子を組み込んだ SVV を感染させた (MOI=5, 10)。5 日後にフィーダー細胞上に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells /10 mm dish で播種し、翌日 basic fibroblast growth factor を含む Primate ES Cell Medium (ES Medium) に変更し、毎日培地を交換した。28 日目以降出現した iPSC 様のコロニーをピックアップし、クローニングを行った。

3. iPSC の品質評価

アルカリフォスターゼ染色、免疫蛍光抗体法、RT-PCR で幹細胞マーカーの発現の有無と、KC 特異的マーカーの発現の有無を評価した。またメチレーションアッセイで *NANOG* プロモーター領域の DNA メチル化の有無を評価した。*in vitro* および *in vivo* における分化能を胚葉体アッセイおよびテラトーマアッセイで評価した。核型解析による染色体異常の有無を確認した。

4. iPSC から KC および線維芽細胞への分化誘導

KC への分化誘導：iPSCs の細胞塊を Geltrex®および I 型コラーゲンでコーティングしたシャーレに播種し、翌日および翌々日にレチノイン酸 および bone morphogenetic protein 4 を含有する defined keratinocyte serum-free medium (DKSFM) 下で分化誘導を開始した。14 日後に KC 用培地(CnT-PR)に変更し、さらに 28 日間培養した。

線維芽細胞への分化誘導：アスコルビン酸、transforming growth factor- β 2 および ITS-A Supplement を含有する ES Medium に 14 日間浮遊させ、胚様体を作製した。胚様体をゼラチンコートしたシャーレに付着させ、アスコルビン酸および 20%FBS 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)中で 10 日間培養し、その後 10%FBS 添加 DMEM へ培地を変更して 14 日間培養した。

【結果】

1. SVV の KC への感染最適化の検討

SVV の 48 時間後の KC への感染率は MOI=3 で約 47%、MOI=5 で 70~80%であった。従って、SVV を使用した KC 由来の iPSC を樹立する際に、MOI=5 以上が必要であることがわかった。

2. KC からの iPSC の樹立

NHEK および EBKC への SVV 感染により、iPSC 様コロニーの出現を確認した。SVV で感染させた NHEK 10^5 cells から 2~10 個の、iPSC 様のコロニーが得られた。これは既報告において線維芽細胞から SVV を介して樹立した iPSC の樹立効率よりも若干低かった。

3. iPSC の品質評価

SVV を介した NHEK および EBKC 由来 iPSC は、幹細胞マーカーを発現し、KC 特異マーカーは消失していた。これらの細胞は *in vitro* および *in vivo* ともに三胚葉の分化能を有していた。また核型解析では正常な核型を示した。以上より iPSC として適切な性質を持つ細胞が樹立できたことが明らかとなった。

4. iPSC から KC および線維芽細胞への分化誘導

SVV を介した NHEK および KC 由来 iPSC は、細胞形態・免疫蛍光抗体法および RT-PCR 解析により、KC および線維芽細胞に分化誘導できることを示した。

【考察】

RDEB は、係留線維の先天的な遺伝子変異により表皮と真皮の結合が脆弱となり、全身の水疱形成、びらんを生涯繰り返す難治性の遺伝性皮膚疾患である。

RDEB 患者特異的 iPSC 樹立の方法はいくつか報告されているが、ゲノム組み込みを伴うレトロウイルスベクターによるものが主体であり、潜在的な腫瘍形成のリスクを排除できない。EB 患者特異的 iPSC の中で、KC 由来のものについては、SVV のようなゲノム組み込みのない方法を用いた iPSC 樹立の報告はない。我々が KC を iPSC の細胞源としたことには 2 つの理由がある。一つ目は、KC が皮膚最外層の表皮に存在するため、より侵襲の少ないシェーブ生検による採取が可能なことである。二つ目は、近年、体細胞の一部で病原性遺伝子変異が自発的に修復される自然発生現象（復帰変異モザイク）が報告されているが、EB においては KC のみで報告されているからである。この現象をきたした KC を応用した細胞治療を行うことで、理論的には人工的な遺伝子操作せず自家細胞による根治的な治療が可能であると考えられる。KC を iPSC のリソースとして用いる本研究の結果は、将来的に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安全な iPSC を樹立できる可能性を示唆する。

【結論】

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示した。これらの KC 由来 iPSC は、表皮水疱症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。