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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	西村, ちひろ
Description	配架番号：2474
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13460号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74724
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Chihiro_Nakayama-Nishimura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　西村（中山）　ちひろ

学 位 論 文 題 名

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）

【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 EB 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，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，これら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，初代培養した KC 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 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. NHEK-iPSC-MSC（MSC derived from NHEK-iPSC）の *in vivo* での評価

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-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 NHEK-iPSC-MSC と EBKC-iPSC-MSC（MSC derived from EBKC-iPSC）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 と類似することが分かった．

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】

同種骨髄由来 MSC 移植は，RDEB の治療に非常に有望である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 から SVV を用いて樹立した 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可能である．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み，さらに復帰変異モザイクの観点からも大きな意義をもつ．「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 では主に KC において生じるとされる．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り行われた．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 の樹立に成功しており，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可能性を高めたと考える．

【結論】

本研究では，NHEK-iPSC と EBKC-iPSC より MSC を樹立できた．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．