

間葉系細胞からケラチノサイトへの直接転換による皮膚潰瘍治療法の開発

栗 田 昌 和

杏林大学医学部形成外科

従来方法では治療が困難であった皮膚潰瘍患者に広く適応可能な革新的新規治療を提供し、難治性潰瘍治療に関わる問題を解決するため、皮膚潰瘍において、潰瘍底に豊富に存在する間葉系細胞の上皮細胞への直接転換を誘導し潰瘍面からの直接的な上皮化をはかる、新しい創傷治療法の開発を目的とし、in vitroにおけるヒト線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換方法の開発に取り組んだ。

【方 法】

ヒト初代培養細胞の遺伝子発現解析による直接転換候補因子の検索を目的として、以下の解析を行った。

- ①マイクロアレイ解析：網羅的遺伝子解析遺伝子導入によるヒト線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換を達成するため、同一ドナー皮膚組織由来の線維芽細胞、ケラチノサイトの初代培養を確立し、マイクロアレイ（SurePrint G3 Human GEマイクロアレイキット Ver2.0）およびmicro RNAマイクロアレイ（SurePrint G3 Human miRNAマイクロアレイキット Rel. 16.0）を用いて、発現遺伝子の網羅的解析を行った。
- ②データベース解析：NCBIの既存のデータベースより、初代皮膚線維芽細胞、ケラチノサイトの発現遺伝子情報を入手し、解析を行った。また、直接転換因子候補の取捨選択のため、ケラチノサイト分化に伴う網羅的遺伝子データを用いて、分化に伴って大きく変動する因子を同定した。
- ③バイオインフォマティクス解析：上記データに加え、BIOBASE社のデータベースを用いてupstream/cascade解析を行った。また、Gene expression reversal解析（Heinäniemi M et al. Nat Methods. 2013; 10: 577-83.）を行い、さらに候補因子の検索を行った。

上記により、候補とした因子について以下のように遺

伝子導入実験を行った。

- ①レンチウイルスベクターのクローニング：レンチウイルスベクター構築、レンチウイルス作成にはSystem Biosciences社のシステム（Lenti-miR precursor clone, miRZip anti-micro RNA construct）とINVITROGEN社のシステム（pLenti7.3/V5-DEST Gateway® Vector）を用いた。導入転写因子のクローンはNBRC（Biological Resource Center, NITE）より分譲をうけた。
- ②遺伝子導入：レンチウイルスベクターで遺伝子導入後の線維芽細胞は、線維芽細胞・ケラチノサイト双方が増殖可能で、初代培養ケラチノサイトを一時的に不死化するconditionally reprogramming conditionを使用（Chapman et al. J Clin Invest. 2010; 120: 2619-26）で培養した。

【結 果】

(1) micro RNAによるアプローチ

① 特異的micro RNAの同定

遺伝子導入によって高発現を容易に得やすいmicro RNAによるアプローチから開始した。同一皮膚検体から採取した初代培養線維芽細胞とケラチノサイトの発現micro RNAをmicro RNAマイクロアレイを用いて解析、ケラチノサイトに特異的に発現している7cluster 17micro RNAと、線維芽細胞に特異的に発現している9 micro RNAを同定した。

②micro RNA 導入による直接転換実験

個々のmicro RNAベクター導入および複数の導入を試みた。複数のmicro RNAのoverexpression/knockdownによって、上皮様の形態を得ることはできたが、マーカー発現強度、増殖能に欠いた。

(2) 発現強度で選択した転写因子を加えたアプローチ

①特異的転写因子の同定

NBCIデータベース上のデータ（GEO DatasetsAccession:

GDS1505)を用いて、線維芽細胞に比較してケラチノサイトにおいて強く発現している遺伝子(転写因子)を選択した。さらに、文献データ(Shalom-Fuerstein et al. Cell death and differentiation 2011; 18: 887-896)からマウスの胚性11.5日、14.5日の表皮組織の発現遺伝子の比較を行い、ケラチノサイトへの直接転換候補因子の検索を進めた。

②転写因子を加えた直接転換実験

1群の転写因子を追加することによって、かなり上皮様の形質が強く、クロナールな細胞増殖能をもつ細胞群を得ることができるようになったが、形態、培養動態からいうとケラチノサイトには遠い状態だった。

(3) 転写因子の取捨選択

①発現マーカー解析による取捨選択

iPS作成過程同様((Li, et al. Cell stem cell 2010; 2: 51-63)ケラチノサイトへの直接転換過程においては、上皮間葉転換がボトルネックとなっているのではないかという仮説に基づき、特にCDH1の発現に留意しながら個々の導入因子によるケラチノサイトマーカー発現をrealtime PCRにて評価し、因子選択の指標とした。

②ケラチノサイト分化に伴う発現変動による取捨選択

NBCIデータベース上のデータ(GEO Datasets Accession: GPL6244-24073)からケラチノサイト分化に伴う候補因子の発現変動を調べ、候補因子取捨選択の指標とした。

③直接転換実験

取捨選択した候補因子をレンチウイルスベクターにて導入、継代後10-14日後にはケラチノサイトの類似の形態を呈する細胞のコロニーが得られるようになった。

(4) バイオインフォマティクス解析によるアプローチ

①UPSTREAM/CASCADE解析

前項までの取り組みにより、十分に高いマーカー発現が得られるようになったものの、継代維持時の細胞形態、分化傾向など不足する形質が認められたため、より定量性に優れたマイクロアレイを用いた解析結果より、UPSTREAM/CASCADE解析を行い、線維芽細胞とケラチノサイトの差異の53上流遺伝子、カスケード上クロスリンクの認められる183遺伝子を同定した。

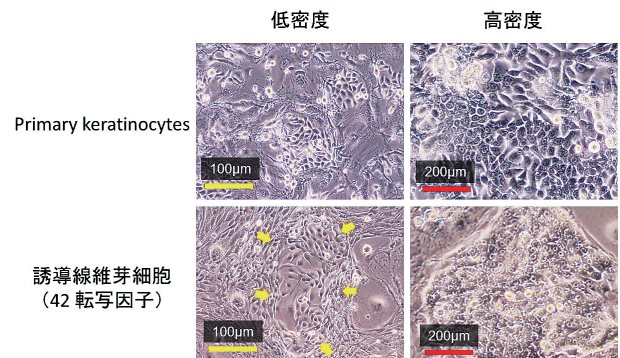
②Gene expression reversal解析

細胞系譜を特徴づける転写因子の新しい解析手法であるGene expression reversal解析(Heinäniemi M et al. Nat Methods. 2013; 10(6): 577-83.)で、あらたに17転写因子を候補因子として選択した。

③直接転換実験

申請書作成現在、これらの因子を部分的に取り入れ、転換実験を行ったところである。遺伝子導入後1-2週間の間に現れてくるコロニーの中には、低密度(下図左)、高密度(下図右)、それぞれの状態においてケラチノサイトにかなり類似した形態、増殖様態の細胞群が得られ

るようになった。



講演記録

- ① 栗田昌和, 江藤ひとみ, 菅浩隆, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 皮膚潰瘍上皮化促進を目的とした線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換のこころみ パネルディスカッション1 創傷治癒の分子メカニズム 平成25年7月11, 12日 第5回日本創傷外科学会総会・学術集会 ホテルグランヴィア京都, 京都府
- ② 栗田昌和, 江藤ひとみ, 佐藤卓志, 菅浩隆, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 皮膚潰瘍上皮化促進を目的とした線維芽細胞からケラチノサイトへの直接転換のこころみ 平成25年 11月7, 8日 第22回日本形成外科学会基礎学術集会 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター, 新潟県
- ③ Kurita M, Eto H, Suga H, Takushima A, Harii K. Searching the way of direct conversion of fibroblasts into keratinocytes for the treatment of cutaneous ulcers. January 16, 17 and 18, 2014 Cira International Symposium 2014. Osaka, Japan. Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company, Ltd., Osaka, Japan.

List of publications

- 1) Kurita M, Takushima A, Shiraishi T, Kinoshita M, Ozaki M, Harii K. Recycle of temporal muscle in combination with free muscle transfer in the treatment of facial paralysis. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013; 66(7): 991-5.
- 2) Kurita M, Yamazaki K, Eto H, Seike S, Takushima A, Harii K. Reinnervation of segmented latissimus dorsi muscle with the distal stump of the thoracodorsal nerve: A preliminary experimental study in rats. Microsurgery. 2013; 33(7): 545-550.
- 3) Nakasone H, Terasako-Saito K, Yamazaki R, Sato M, Tanaka Y, Sakamoto K, Kurita M, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Machishima T, Ashizawa M, Kimura S, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Yamada S, Kanda Y. Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts. Exp Hematol. 2014; 42(4): 261-73.