

関西学院大学 研究成果報告

2020年 4月 2日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学部生命医化学科
職名：教授
氏名：平井洋平

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input checked="" type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	次世代の薬効評価モデルを用いた皮膚塗布薬の作用機序解明
研究実施場所	関西学院大学 理工学部V号館3F 平井研究室
研究期間	2019年 4月 1日 ~ 2020年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

本研究は、細胞近傍でのBMP4発現を自由に調節できるES/iPS細胞から調製した表皮前駆細胞や分化誘導能を持つとされる表皮モデル細胞HaCaTを出発材料に用い、これらに遺伝子加工を施し、皮膚疾患治療薬の評価系確立につなげることを目指している。本研究で実施した内容は以下の通り。

(1) 表皮分化に伴って蛍光を発する細胞調製の試み

表皮細胞が未分化状態時に発現するケラチン5 (KRT5) 並びに、分化(角化)を開始すると発現するフィラグリン(FGL)のプロモーターを、それぞれGeneCopoeia(長さ1.4Kb)並びに、Riken Gene Bank(6.2kb)から購入し、レンチウイルスベクターpEZX-LvPF02のGFP遺伝子上流に組み込んだものを作製した。これらをレンチウイルスのエンベロープをコードする遺伝子が組み込まれたベクター(pCMV-VSV-G-RSV-Rev, pCAG-HIVgp)と共にパッケージング細胞に導入してウイルス粒子を産生させ、これをHaCaT細胞に感染させて評価を行った。ウイルスによる細胞への遺伝子感染が確認され、また、qRT-PCRやwestern blot等の複数の手法で内在性KRT5(分化誘導前)、FLG(分化誘導後)の十分な発現が確認できたものの、HaCaT細胞の蛍光はいずれも全く検出できなかった。用い

た（購入した）プロモーター領域が不十分であった、もしくは、その活性化に他の補因子が必要である可能性が考えられる。

（2）表皮モデル細胞HaCaTの分化状態調節と皮膚疾患治療薬の評価系への応用

・(2-1)HaCaT細胞は、正常のヒト表皮細胞の特徴を保持しカルシウム刺激により表皮分化が誘導できるとされているが、通常の培養条件下において未分化状態時に特異的に発現するマーカー、ならびに分化後初めて発現する多くのマーカーを同時に大量に発現しているため、分化状態の正確な把握が困難であった。また、分化誘導を十分に行っても表皮上層部（分化が十分に進んだ状態）に形成されるべき細胞間バリア構造（タイトジャンクション;TJ）が誘導できないことが以前から指摘されていた。これらの原因を調べるために、初代培養の未分化な表皮角化細胞と系統的に比較・検討したところ、HaCaT細胞は炎症反応を仲介する因子HMGB1を大量に産生・分泌していることが判明した。そこで、HMGB1と直接結合しその炎症作用を阻害するとされるグリチルリチン酸の可溶化変異体GK2を作用させて培養したところ、HaCaT細胞は分化誘導刺激に高感度に反応し、数日でTJを形成するようになることがわかった。

・(2-2)上述のように、HaCaT細胞は安定した継代操作が可能で遺伝子操作も行いやすい一方、未分化マーカーと分化マーカーの両方を同時に発現しており、分化の状態が明確でない。そこで、(2-1)の試みと並行してHaCaT細胞を（高感度に分化誘導できるように）完全な未分化状態に脱分化させる方法を検討した。まず、カルシウムイオン濃度（通常1.5mM程度）を0.1mMまで低下させるとHaCaT細胞の形態が未分化の初代表表皮角化細胞と同様のものに変化することが判明したが、この場合でも分化に伴って発現するマーカー分子の発現は低下しなかった。そこで、細胞挙動の正常化を支持するとされる高分子多糖グリコサミノグリカンを複数種類用いて状況改善を試みたところ、硫酸基で人工的に修飾したコンドロイチン硫酸（通称へパリノイド：医薬品として使われている）に分化マーカーの発現停止を促す作用が検出された。これにより、HaCaT細胞はへパリノイドを添加した低カルシウムの培養液で培養すると、細胞形態ならびにマーカー発現共に未分化状態の表皮へと脱分化することが分かった。また、（脱分化させて）未分化状態にしたHaCaT細胞は、培養液からへパリノイドを除去しカルシウム濃度を2～5mMまで上昇させると速やかに表皮分化を開始することも確認できた。上述のように、HaCaT細胞は遺伝子操作も行いやすく、安定した継代操作が可能で細胞ストックの調製も容易であり、予め表皮疾患の原因遺伝子を加工した細胞を大量保存することができる。したがって、必要に応じて播種した細胞を培養下で脱分化させ、それを分化誘導させると皮膚疾患を持つ細胞のふるまいを呈するため、皮膚疾患治療薬の評価系への応用が可能となる。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。