

## 最新のゲノム編集技術をヒト表皮細胞に適用して、 三次元表皮モデルを作製することに成功 機能性化粧品の開発をさらに推進

平成 29 年 3 月 23 日

富士フイルム株式会社（社長：助野 健児）は、東京医科歯科大学 難波大輔准教授との共同研究により、ゲノム※1 編集技術「CRISPR-Cas9（クリスパー キャスナイン）」を用いて、ヒト表皮細胞のゲノムを編集し、その細胞を三次元培養した表皮モデルの作製に成功しました（図1、4）。

当社はこれまで、化粧品の研究開発ツールとして、ヒト表皮細胞を培養して作製した、生体の構成により近い三次元表皮モデルの活用を進めてきました。今回開発した技術を活用し、加齢による肌の乾燥やシワなどと関連する特定の遺伝子を欠損させることで、加齢による皮膚状態の変化を三次元表皮モデルで再現できます。当社は、本技術を活用して、表皮形成における個々の遺伝子の機能に関する研究をさらに推し進め、その研究成果を今秋発売するエイジングケア領域の機能性化粧品に活用する予定です。

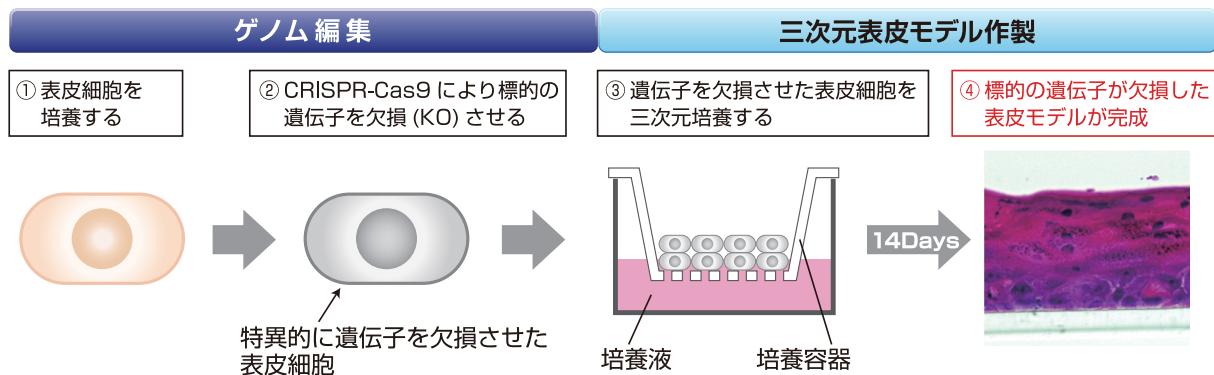
### <研究成果の概要>

CRISPR-Cas9で編集する対象を、細胞の増殖に広く関与している重要な成長因子の1つであるインスリン様成長因子1「IGF-1」の受容体「IGF-1R」遺伝子とし、下記2つの成果を得ました。

- ① IGF-1R を完全に欠損（ノックアウト：以下 KO）させた、ヒト表皮細胞（以下、IGF-1R KO細胞）の作製に成功
- ② IGF-1R KO細胞を三次元培養し、細胞の分化が低下するなど IGF-1R の欠損が表皮層の形成に重要な役割を果たすことを確認

なお、本研究成果を、3月24日から27日まで宮城県仙台市で開催される日本薬学会年会にて発表します。

【図1】表皮細胞におけるゲノム編集と三次元表皮モデル作製の流れ



通常の細胞から作製した表皮モデルと、特定の遺伝子を完全に欠損させた細胞から作製した表皮モデルを比較することで、欠損した遺伝子の機能が確認できる。

### 研究の背景

これまで、培養した細胞を用いて遺伝子の機能を調べるには、標的となる遺伝子の発現を弱めた細胞を作製し、通常の細胞と比較する方法が用いられてきました。一般的に、標的となる遺伝子の発現を弱めるには、RNA干渉法※2 や薬剤が使われますが、遺伝子の発現を完全に止められるわけではなく、また薬剤には標的以外の遺伝子にも影響を及ぼすなどの課題がありました。この課題を解決するために、今回当社は、最新のゲノム編集技術「CRISPR-Cas9」を活用し、標的の遺伝子を完全に欠損（KO）させたヒト表皮細胞を用いて表皮モデルを作製する技術開発に取り組みました。

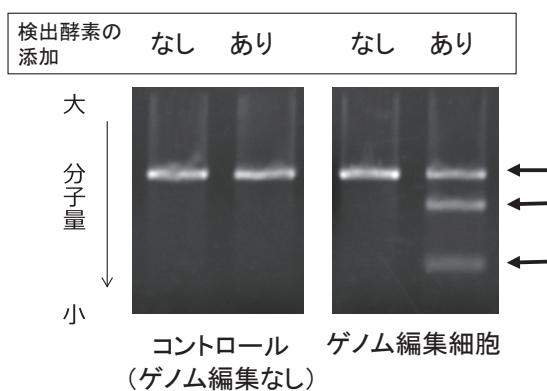
## 研究の成果

### 1. ヒト表皮細胞の特定の遺伝子を「CRISPR-Cas9」により欠損させることに成功

今回の研究では、「CRISPR-Cas9」を用いて編集する標的の遺伝子を、表皮細胞の増殖に関与することが知られている成長因子の1つであるインスリン様成長因子1「IGF-1」の受容体「IGF-1R」としました。この受容体「IGF-1R」は、IGF-1を受け取って、表皮細胞に増殖シグナルを送る役割を担っています。この機能を停止させる遺伝子編集を行うことで、表皮形成時に増殖シグナルがもたらす影響を確認しました。

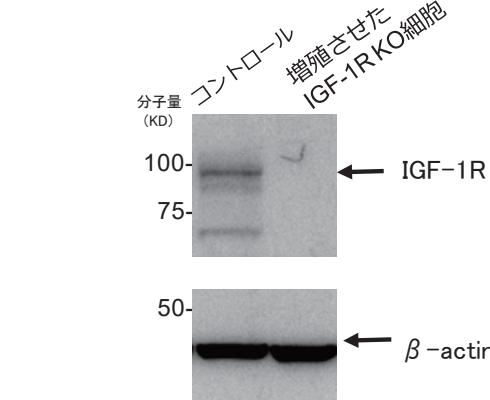
IGF-1Rを狙って編集できるように調整したCRISPR-Cas9を使って、培養したヒト表皮細胞のゲノムを編集し、ゲノム編集の有無を電気泳動法<sup>※3</sup>で検証したところ、目的通りにゲノムが編集できていることが確認できました(図2)。その後、ゲノム編集した細胞を増殖させ、ウェスタンプロット法<sup>※4</sup>でIGF-1Rタンパク質の有無を調べたところ、増殖した細胞において同タンパク質が完全に欠損していることが確認できました(図3)。

【図2】ゲノムが編集されていることを確認



遺伝子の欠損に伴って遺伝子情報が壊れた部位（遺伝子の修正エラーが起きた部位）を検出し切断する酵素を添加したところ、表皮細胞のゲノムが編集されたことを示す特徴的な3本のバンドが確認できた（矢印部分）。一方、ゲノム編集していない通常の細胞（コントロール）では、酵素を添加してもバンドが1本のままで変化がなかった。

【図3】IGF-1Rのタンパク質が欠損していることを確認



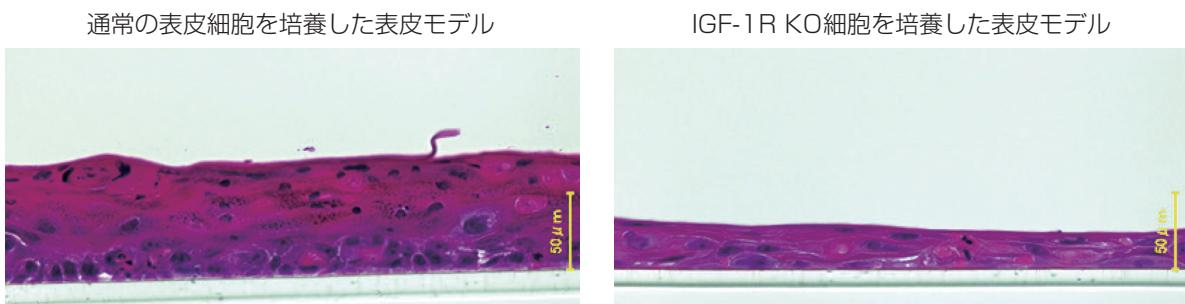
IGF-1Rを示す100K近く分子量をもつバンド（矢印部分）が完全に消失しており、IGF-1Rが欠損していることが確認できた（上）。

一方で、今回のゲノム編集の標的ではないタンパク質「 $\beta$ -actin」<sup>※5</sup>は、同細胞内において減少が見られなかつた（下）。

### 2. 「IGF-1R」が表皮層の形成に重要な役割を果たすことを、三次元表皮モデルを作製して確認

IGF-1R KO細胞と通常の表皮細胞の三次元表皮モデルを作製しました。培養開始から14日後にそれぞれの切片を観察したところ、IGF-1R KO細胞を用いた表皮モデルは、通常の表皮細胞の表皮モデルに比べて、表皮厚が約半分程度になり、また細胞の分化も低下することが明らかになりました(図4)。これは、IGF-1Rが欠損したことにより、インスリン様成長因子1「IGF-1」がIGF-1Rに受け取られることで生じていた細胞増殖を促すシグナルが細胞内に伝達されなくなったためと考えられます。このことから、IGF-1Rが発する増殖シグナルが表皮層の形成に重要な役割を果たすことがヒト由来細胞で確認できました。

【図4】各表皮モデルの厚みの比較



IGF-1R KO細胞を培養して作製した表皮モデルは、通常細胞のそれと比較して、表皮厚が半分程度になった。

CRISPR-Cas9 により作製した、特定の遺伝子を欠損させた表皮細胞は、細胞分裂後も永久に変異が引き継がれるため、欠損した状態を安定的に維持した長期培養が可能となります。また、本技術により遺伝子を欠損させて、意図的に疾患を持った皮膚モデルを作製することも可能になります。

富士フィルムは、本研究成果や株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングなど当社グループ会社が推進する再生医療分野で得られた皮膚のメカニズムに関する研究成果を、積極的に機能性化粧品の開発に応用していきます。

- ※ 1 生物におけるすべての遺伝子情報。
- ※ 2 細胞に二本鎖 RNA を導入し、それに対応する配列を持つ特定遺伝子の発現（タンパク質の合成）を抑制する方法。
- ※ 3 分子の荷電状態を利用して、DNA やタンパク質を分子量ごとに分離する方法。
- ※ 4 細胞から抽出した全タンパク質を電気泳動により分離後、特異的抗体により特定のタンパク質を検出・定量する実験手法。
- ※ 5 細胞内に一定量発現していることから、一般的にタンパク質量の比較定量の基準として用いられる。

本件に関するお問い合わせは、下記にお願いいたします。

＜報道関係＞

富士フィルム株式会社 コーポレートコミュニケーション部

TEL 03-6271-2000

＜今回の研究に関するお問い合わせ＞

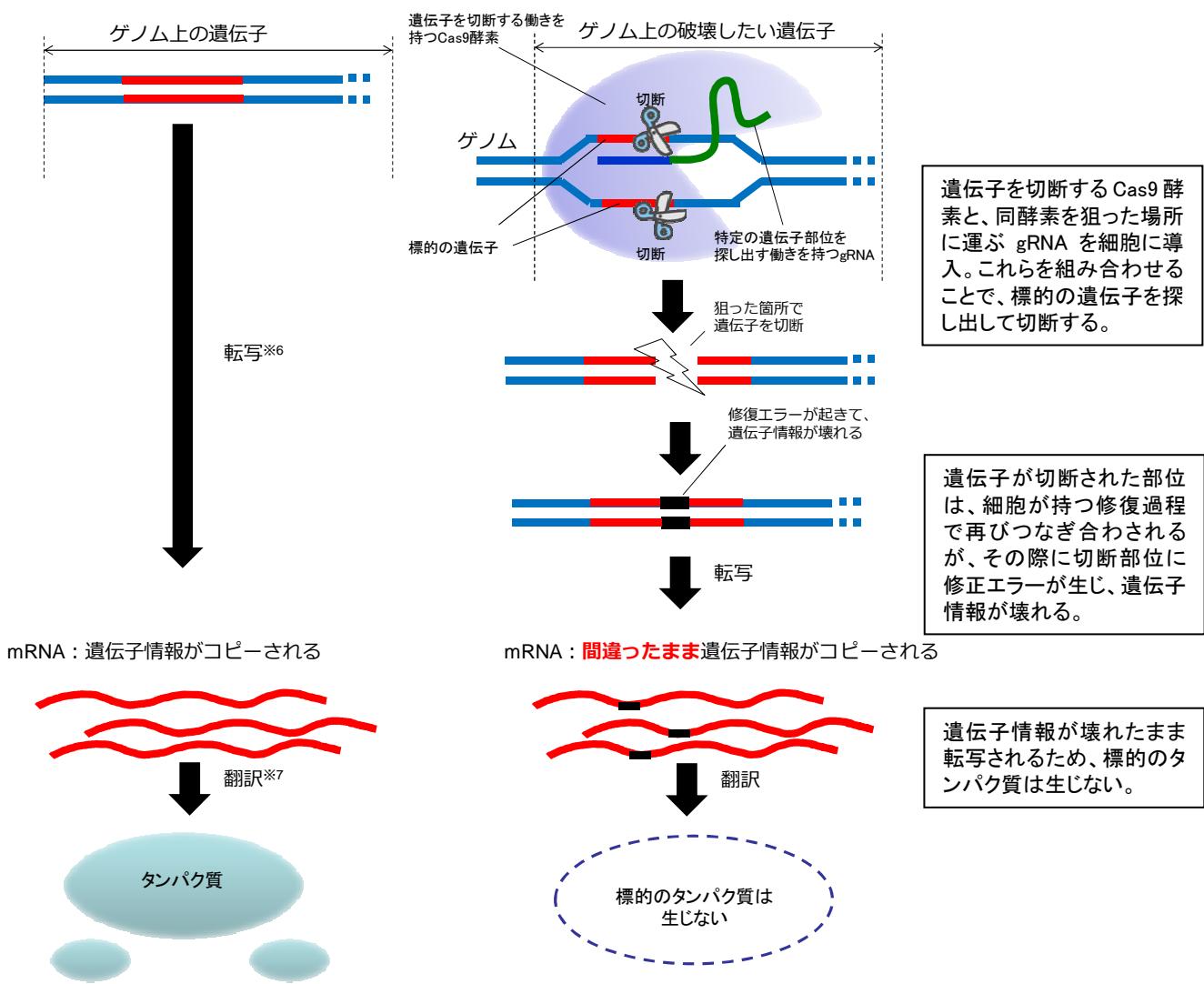
株式会社 富士フィルム ヘルスケア ラボラトリー ブランドマネージメント部 ☎ 0120-186-833

## <参考資料>

### ■CRISPR-Cas9について

平成25年(2013年)に哺乳類細胞への応用が報告された最新のゲノム編集技術(参考文献1、2)。膨大なゲノム(約30億塩基)の中から特定の遺伝子のみを認識し、削除、置換、挿入といった編集が正確かつ簡単に実現できる技術として活用が広まっています。遺伝子を切断する「はさみ」の機能を持つCas9酵素と、この酵素を遺伝子の狙った場所に運ぶ「ガイド役」のgRNA(ガイドRNA)を使用。これらを組み合わせることで、同酵素が標的の部位に結合し、遺伝子を切断します。遺伝子が切断された部位は、細胞が持つ修復過程で再びつなぎ合わされますが、その際に切断部位に修復のエラーが生じます。これにより、タンパク質を作製するのに必要な遺伝子情報が失われてしまい、その結果、標的のタンパク質が生じなくなります(図5)。

【図5】CRISPR-Cas9によるゲノム編集の流れ



※6 ゲノムの遺伝子配列を、タンパク質合成の遺伝情報を写しつけて伝える働きを持つ mRNA に置き換える反応。タンパク質合成の第一段階。

※7 mRNA が指定するアミノ酸を配列し、タンパク質を生成する過程。

参考文献 1 Mali, Prashant, et al. Science 339.6121 (2013): 823–826.

参考文献 2 Cong, Le, et al. Science 339.6121 (2013): 819–823.

## ■IGF-1 と IGF-1R について

インスリン様成長因子1(IGF-1)は、インスリンによく似た構造を持つ増殖因子で、成長ホルモン(GH)の刺激により生体内で作られます。IGF-1 は、人体を構成する多くの組織や細胞に影響を与えることが報告されています。また、加齢による発現低下が報告されており、老化にも関与している重要なシグナルのひとつとして考えられています。IGF-1 は、細胞の膜に発現する IGF-1 受容体(IGF-1R)に結合して、細胞内に増殖を促すシグナルを伝達します。IGF-1R は、表皮細胞が増殖する最下層の基底層で強く発現することが知られています(図 6)。

【図 6】IGF-1R のヒト皮膚での発現(イメージ図)

