

令和元年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05369

研究課題名(和文)皮膚の恒常性維持機能における末梢血間葉系細胞の役割解明とその制御法開発

研究課題名(英文) Investigation of in vivo function of mesenchymal blood cells on maintenance of cutaneous homeostasis and application for therapeutics

研究代表者

玉井 克人 (Tamai, Katsuto)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20236730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血間葉系細胞(mesenchymal blood cell, MBC)は皮膚損傷組織に集積後、表皮細胞、毛包細胞、メラノサイト、真皮線維芽細胞、皮膚末梢神経に分化すると共に、再生末梢神経における異常髄鞘形成を抑制し、TGF- β 放出を抑制して癒痕形成を抑制し、機能的組織再生を誘導していることが明らかとなった。さらに、MBCは神経堤由来のectomesenchymeを発生学的起源に持つ間葉系細胞であることが示され、外胚葉性組織再生に寄与する発生学的妥当性が明らかとなった。外胚葉性間葉系細胞であるMBCを血中に増加させるHMGB1ペプチドは皮膚恒常性制御技術開発の可能性が開かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、これまで詳細が知られていなかった末梢血間葉系細胞の存在意義が初めて明らかとなり、またその発生学的起源が外胚葉であることが明らかとなったことが大きな学術的進展である。社会的には、HMGB1ペプチドが外胚葉性末梢血間葉系細胞を血中に動員する活性を持つことが明らかとなったこと、壊死を伴う種々の難治性皮膚疾患において、非癒痕性機能的組織再生を誘導する医薬開発の根拠がえられたことが創薬の実現という点において極めて社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：In the 3 year study, we clarified that mesenchymal blood cells (MBCs) accumulated into the injured skin to differentiate into the epidermal and follicular keratinocytes, melanocytes, dermal fibroblasts, and peripheral nerves, in which the TGF- β secreting abnormal myelin formation was suppressed not to induce scar formation. Moreover, MBC was shown to be originated from ectomesenchyme, which generate by delamination of neural crest epithelia, indicating developmental identity of the MBCs for regenerating ectodermal epithelia. HMGB1 peptide induced increase of the ectodermal MBCs, suggesting future therapeutic activity of the peptide to regulate cutaneous homeostasis in various skin diseases.

研究分野：皮膚科学

キーワード：間葉系血液細胞 HMGB1 神経堤 非癒痕性機能的組織再生

1. 研究開始当初の背景

骨髄は全身を隈無くめぐる血管網を介して生体内すべての臓器・組織に血液細胞を供給し、その恒常性を維持している。近年、骨髄内には酸素供給細胞としての赤血球、炎症・免疫機能細胞としての白血球、止血・凝固機能細胞としての血小板の他に、間葉系分化能を有する間葉系細胞が存在することが明らかにされている。骨髄内間葉系細胞の生体内機能については、造血幹/前駆細胞の未分化性維持や増殖をサポートするニッチ細胞機能や、培養条件において骨、軟骨、脂肪へと分化する能力を持つことが良く知られているものの、生体組織・臓器の恒常性維持における末梢血間葉系細胞の存在意義については未だ明らかになっていない。我々は、皮膚基底膜接着分子の先天異常により生直後から生涯にわたり全身熱傷様表皮剥離を繰り返す遺伝性皮膚難病「表皮水疱症」の病態解明研究の過程で、骨髄内PDGFR (platelet-derived growth factor : 血小板増殖因子受容体) 陽性間葉系細胞が末梢血単核球分画中0.1~1.0%程度存在すること、表皮水疱症剥離表皮から放出されるHMGB1 (high mobility group box 1) により末梢血中PDGFR 陽性細胞数は増加し、壊死組織周囲の血管内皮細胞が放出するケモカインSDF-1 (stromal cell-derived factor-1) により損傷部皮膚特異的に集積すること、皮膚に集積したPDGFR 陽性細胞は強い抗炎症分子であるTSG-6 を産生・放出して炎症を抑制的に制御するとともに、線維芽細胞や表皮細胞へと分化して損傷組織を再生へと誘導していることを明らかにした (PNAS2011, J Immunol2015, Scientific Report2015)。さらに我々は、骨髄間葉系細胞にはCD44 陰性細胞とCD44 陽性細胞が存在し、CD44 陰性細胞はPDGFR を強く発現し、幹細胞としての性質を示す一方、CD44 陽性細胞は前駆細胞としての性質を有すること、いずれの細胞も末梢組織の損傷刺激に应答して末梢血を介して損傷組織に集積し、骨芽細胞や線維芽細胞などへの分化能を示しつつ、TSG-6 による炎症抑制、組織幹細胞の活性化により組織再生を促進していることを明らかにした (Stem Cells2008, Stem Cells2015)。上述したように、壊死組織から血中に放出されるHMGB1 はPDGFR 陽性CD44 陰性間葉系細胞を骨髄から血中に動員すると同時に細胞表面にケモカインSDF-1 に対する受容体CXCR4 発現を誘導し、壊死組織周囲の血管内皮で発現するSDF-1 との反応性を増強して末梢血間葉系細胞の損傷組織特異的集積を誘導する (Scientific Report2015)。我々は、HMGB1 の骨髄間葉系細胞血中動員活性ドメインK012 を同定した (PCT/JP2012/059113)、このK012 ドメインを含む化学合成ペプチドをVII 型コラーゲン低形成表皮水疱症モデルマウスに投与した結果、生存率の著明な向上と組織再生促進効果が得られたことから、K012 ペプチドを血中間葉系細胞数増加による損傷組織再生誘導医薬として開発を進め、医師主導治験第I相臨床試験を進めた。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚恒常性維持機構における末梢血間葉系細胞の存在意義を明らかにするとともに、その制御機構を利用した皮膚難病治療の可能性について検討することを目的とする。具体的には、(1)皮膚の上皮構造・機能再生における末梢血間葉系細胞の役割解明、(2)皮膚の間葉構造・機能再生における末梢血間葉系細胞の役割解明、(3)皮膚の炎症反応における末梢血間葉系細胞の役割解明、(4)末梢血間葉系細胞による皮膚恒常性制御機構を利用した皮膚病態制御法開発、を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 末梢循環性間葉系細胞MBCによる皮膚再生促進効果の検証

マウス背部皮膚に皮膚損傷(全層皮膚欠損)を作成したのち、MBC血中増加因子HMGB1を静脈内投与し、MBC増加による皮膚再生促進効果を組織学的に検証した。特に、非瘢痕性機能的組織再生に不可欠な瘢痕抑制効果、および皮膚の重要な機能である知覚装置(知覚神経およびメルケル細胞)の再生効果について定量的解析を進めた。

(2) 皮膚壊死によるMBC出現動態及びMBC機能解析

PDGFR^{-Cre}; flox-tdTomatoマウス背部皮膚に皮弁を作成し、壊死性刺激によるMBC血中動員活性をtdTomatoの発現を指標としてフローサイトメトリーを用いて解析した。また、壊死性刺激で血中に動員されたMBCの遺伝子発現パターンを、単一細胞RNAシーケンスを用いて網羅的に解析した。さらに、MBCの自己複製能力および多分化能を、それぞれ末梢血培養によるコロニーアッセイ(colony-forming unit-fibroblast; CFU-F)および単一コロニー由来細胞の骨、脂肪、軟骨、表皮、血管への分化能アッセイにより評価した。

(3) 生体内における末梢血間葉系細胞の皮膚構成細胞への寄与評価

末梢血間葉系細胞を生体内で追跡可能なPDGFR^{-Cre}; flox-YFPマウスまたはPDGFR^{-Cre}; flox-tdTomatoマウスを野生型マウスと側腹部皮膚を切開・縫合して末梢循環を共有する共生マウス(parabiosis)モデルを作成し、その野生型マウス背部皮膚に正常マウス新生児皮膚、VII

型コラーゲン完全欠損マウス皮膚を移植して、それぞれ新生児皮膚成熟過程における末梢血間葉系細胞 (mesenchymal blood cell; MBC) の表皮細胞、真皮線維芽細胞および末梢神経細胞への寄与、剥離表皮再生過程への寄与を評価した。

(4) MBC 血中動員による皮膚病態制御法の確立

外胚葉性間葉系細胞の系譜マーカー遺伝子である P0 の系譜追跡マウス、中胚葉性間葉系細胞の系譜マーカー遺伝子である Prrx1 の系譜追跡マウスを利用して、MBC 血中動員活性を持つ HMGB1 ペプチド投与により血中に動員された MBC の発生学的起源を探索し、MBC の多能性を規定する発生学的起源を同定することにより、HMGB1 ペプチド投与によりどのような皮膚病態の制御が可能かについて評価した。

4. 研究成果

平成 28 年度

HMGB1 ペプチド投与により皮膚損傷部に骨髄由来間葉系細胞 (mesenchymal blood cell, MBC) の集積が誘導される結果、皮膚末梢神経の再生が促進される可能性が示された。具体的には、マウス背部皮膚に全層皮膚欠損を作成した皮膚潰瘍モデルに対して、HMGB1 ペプチド投与により誘導される組織学的変化を検討した。その結果、HMGB1 ペプチド非投与群ではシュワン細胞による髄鞘を持った異常な有髄神経が再生皮膚に形成されること、シュワン細胞から TGF- β が産生される結果、異常有髄神経周囲に線維化が生じ、瘢痕治癒が誘導されること、一方 HMGB1 ペプチド投与群では異常有髄神経形成が抑制される結果、正常皮膚組織と同様の正常神経再生が誘導され、その結果瘢痕形成が抑制的に制御されることが明らかとなった。さらに、表皮内のメルケル細胞が形成する知覚受容装置タッチドーム (touch dome) が瘢痕部では著明に減少することが明らかとなり、HMGB1 ペプチド投与により非瘢痕性皮膚再生を誘導することによりタッチドームの喪失が抑制的に制御され、潰瘍部皮膚の知覚再生を促進し得ることが予想された。HMGB1 ペプチドにより末梢血中に増加する MBC の潰瘍部皮膚集積により正常神経再生が誘導され、非瘢痕性機能的組織再生促進が可能となることが期待される。

平成 29 年度

平成 28 年度の研究において、マウス全層皮膚欠損モデルにおける皮膚再生プロセスで、血小板増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor- α ; PDGFR) 陽性間葉系細胞による末梢神経再生メカニズムが存在すること、この末梢神経再生プロセスは骨髄間葉系幹細胞血中動員活性を持つ核内クロマチン結合蛋白 HMGB1 の投与により促進されることが明らかとなった。MBC の皮膚再生プロセスをより詳細に解明することを目的として、特定の細胞で PDGFR が一度でも発現すれば、それ以降は PDGFR の発現が消失しても緑や赤の蛍光を発する細胞から成るマウス (PDGFR^{-Cre}; flox-stop-tdTomato マウス; P⁻-tdTomato マウス) と野生型マウスの末梢循環を共有させた共生マウス (parabiosis マウス) を作成し、その野生型マウス背部皮膚に皮膚基底膜接着分子 VII 型コラーゲンの機能不全により表皮剥離を繰り返す栄養障害型表皮水疱症モデルマウスの新生仔皮膚を移植し、その再生プロセスにおける MBC の寄与を検討した。その結果、MBC は移植皮膚片内で間葉組織のみならず、表皮、毛包、末梢神経の再生に寄与していることが明らかとなった。さらに、MBC の遺伝子発現を、次世代シーケンズを用いて網羅的に解析した結果、神経堤由来間葉系細胞と類似の遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。即ち、生体内組織損傷時には、末梢循環を介した神経堤由来間葉系幹細胞の損傷組織への集積による組織再生誘導メカニズムが存在する可能性が初めて明らかとなった。

平成 30 年度

平成 28、29 年度の研究で、末梢循環を介して神経堤由来 MBC の損傷組織集積による組織再生誘導メカニズムの存在が示された。そこで平成 30 年度は、骨髄内における神経堤由来 MBC の起源細胞を探索した。神経堤上皮細胞から間葉細胞への形質転換により間葉系細胞 (ectomesenchyme) が形成されることが知られており、その特異発現蛋白として Protein-zero (P0) が知られている。そこで、生体内で P0 系譜細胞を追跡可能な P0-Cre; flox-stop-tdTomato マウス背部に皮膚壊死 (皮弁) を形成し、末梢血中に動員された MBC を培養してコロニーを形成したのち、tdTomato 蛍光を指標に MBC の P0 系譜コロニーの有無を追跡した。その結果、皮膚壊死刺激により血中に動員された MBC コロニーは基本的に全て P0 系譜陽性コロニーであったことから、MBC は神経堤由来 ectomesenchyme を起源に持つ可能性が初めて示された。さらに、HMGB1 ペプチド血中投与により末梢血中に動員された MBC 由来コロニーも全て P0 系譜コロニーであったことから、HMGB1 ペプチドは外胚葉性 ectomesenchyme 由来 MBC を血中動員し、損傷部皮膚に表皮、毛包、メラノサイト、真皮線維芽細胞、末梢神経の再生を誘導する、いわゆる再生誘導医薬として寄与していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) Okada A, Shimbo T, Endo M, Iwai S, Kitayama T, Ouchi Y, Yamamoto R, Takaki E, Yamazaki S, Nishida M, Wang X, Kikuchi Y, Tomimatsu T, Kaneda Y, Kimura T, Tamai K. Transcriptionally distinct mesenchymal stem/stromal cells circulate in fetus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Apr 30;512(2):326-330. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.033. Epub 2019 Mar 16.
- 2) Yen-Ting Ho, Takashi Shimbo, Edward Wijaya, Yuya Ouchi, Eiichi Takaki, Ryoma Yamamoto, Yasushi Kikuchi, Yasufumi Kaneda & Katsuto Tamai. Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins. *Sci Rep*. 2018 Dec 10;8(1):17765. 査読有
doi: 10.1038/s41598-018-36057-0.
- 3) Kido T, Miyagawa S, Goto T, Tamai K, Ueno T, Toda K, Kuratani T, Sawa Y. The administration of high-mobility group box 1 fragment prevents deterioration of cardiac performance by enhancement of bone marrow mesenchymal stem cell homing in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *PLoS One*. 2018 Dec 5;13(12):e0202838. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0202838. eCollection 2018.
- 4) Nakagami H, Yamaoka T, Hayashi M, Tanemura A, Takeya Y, Kurinami H, Sugimoto K, Nakamura A, Tomono K, Tamai K, Katayama I, Rakugi H, Kaneda Y. Physician-initiated first-in-human clinical study using a novel angiogenic peptide, AG30/5C, for patients with severe limb ulcers. *Geriatr Gerontol Int*. 2017 May 10;17(11):2150-2156. 査読有
doi: 10.1111/ggi.13051.
- 5) Aikawa E, Fujita R, Asai M, Kaneda Y, and Tamai K. Receptor for Advanced Glycation End Products-Mediated Signaling Impairs the Maintenance of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Diabetic Model Mice. *Stem Cells and Development*, 2016 Nov 15;25(22):1721-1732. 査読有
- 6) Itoh M, Kawagoe S, Tamai K, Okano HJ, Nakagawa H2. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) carrying two compound heterozygous mutations in the COL7A1 gene. *Stem Cell Res*. 2016 May 17;17(1):32-35. 査読有
doi: 10.1016/j.scr.2016.05.003.

〔学会発表〕(計 33 件)

- 1) 玉井克人 末梢循環性間葉系幹細胞による組織幹細胞補充メカニズムとその臨床応用、第 124 回 日本解剖学会総会、2019
- 2) 玉井克人 重症劣性栄養障害型表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹/間質細胞移植、第 18 回 日本再生医療学会総会、2019
- 3) 玉井克人 生体内組織幹細胞補充メカニズムを利用した幹細胞再生誘導医薬開発、第 18 回 日本再生医療学会総会、2019
- 4) 玉井克人 末梢循環性間葉系幹細胞誘導医薬による抗加齢医療の可能性、第 3 回日本抗加齢協会フォーラム、2018
- 5) 玉井克人 壊死細胞と骨髄間葉系幹細胞のクロストークメカニズムを利用した表皮水疱症治療薬開発、第 82 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2018
- 6) 玉井克人 壊死表皮と骨髄間葉系幹細胞のクロストークによる表皮再生メカニズム、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- 7) 玉井克人 表皮水疱症の少年との出会い：難病治療の夢を追いかけて、第 82 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2018
- 8) Tamai K. Investigator initiated clinical trial for the novel peptide drug mobilizing mesenchymal stem cells from bone marrow to accelerate tissue regeneration, 5th TERMIS World Congress 2018, 2018
- 9) Tamai K. Circulating mesenchymal stem cells: their function and possibility as a target of gene therapy, The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, Tokyo, 2018
- 10) 玉井克人 表皮水疱症に対する再生医療および遺伝子治療の展望、第 42 回日本小児皮膚科学会学術大会、2018
- 11) 玉井克人 表皮水疱症の再生医療、第 39 回日本炎症・再生医学会、2018
- 12) 玉井克人 骨髄間葉系幹細胞の基礎と臨床、第 117 回日本皮膚科学会総会、2018
- 13) 玉井克人 皮膚臓器の広がり：皮膚から骨髄へ、骨髄から皮膚への時空的広がり、第 117 回日本皮膚科学会総会、2018
- 14) 玉井克人 他家骨髄由来間葉系幹細胞を利用した表皮水疱症治療の可能性、第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会、2018

- 15) Tamai K. Tissue regeneration-inducing medicine for EB, JEFFERSON MATRIX SYMPOSIUM, Philadelphia, PA, USA, 2018
- 16) 玉井克人 骨髄間葉系幹細胞を標的とした体内再生誘導医療開発、第 72 回日本口腔科学会学術集会、2018
- 17) 玉井克人 表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞製品の開発、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
- 18) 玉井克人 皮膚再生過程における骨髄間葉系幹細胞の役割、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
- 19) 玉井克人 Mesenchymal stem cells in bone marrow as a target for treating epidermolysis bullosa、日本研究皮膚科学会 (JSID) 第 42 回年次学術大会・総会、2017
- 20) 玉井克人 骨髄間葉系幹細胞と損傷組織のクロストークによる生体組織再生誘導メカニズムを利用した筋ジストロフィー治療の可能性、ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発 平成 29 年度 研究班会議、2017
- 21) 玉井克人 間葉系血液細胞誘導剤の開発と皮膚難病治療への応用、第 68 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2017
- 22) Tamai K. HMGB1-derived peptide drug to reduce inflammation and fibrosis, EB2017 Research & EB-CLINET Conferences 2017, 2017
- 23) Tamai K. Systemic administration of HMGB1 peptide drastically improves survival of the RDEB model mice by mobilizing multipotent stem/progenitor cells from bone marrow, The 47th Annual Meeting of the ESDR, 2017
- 24) Tamai K. Systemic administration of HMGB1 peptide drastically improves survival of the RDEB model mice by mobilizing multipotent stem/progenitor cells from bone marrow, The 47th Annual Meeting of the ESDR, 2017
- 25) 玉井克人 Systemic administration of HMGB1 peptide safely and specifically increases mesenchymal cells in human peripheral blood: outcomes from phase I clinical study、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会、2017
- 26) 玉井克人 骨髄由来間葉系細胞による表皮水疱症治療、第 38 回日本炎症・再生医学会、2017
- 27) 玉井克人 間葉系幹細胞を利用した表皮水疱症治療戦略、第 39 回水疱症研究会年次学術集会、2017
- 28) Tamai K. Subcutaneous transplantation of allogenic mesenchymal stromal cells ameliorates intractable ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients, 76th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, 2017
- 29) 玉井克人 骨髄間葉系幹細胞を標的とした再生医学の新しいストラテジー、第 16 回日本再生医療学会総会、2017
- 30) 玉井克人 表皮水疱症患者を対象とした他家骨髄間葉系幹細胞移植治療の開発、第 16 回日本再生医療学会総会、2017
- 31) 玉井克人 表皮水疱症の再生医学 基礎から臨床へ、第 67 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 2016
- 32) 玉井克人 骨髄間葉系細胞集団の多様性と生体内機能、第 6 回細胞再生医療研究会、2016
- 33) 玉井克人 骨髄由来間葉系幹細胞による体内再生誘導メカニズム、第 115 回日本皮膚科学会総会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。