

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591332

研究課題名 (和文)：骨髄由来表皮細胞を用いた再生医療

研究課題名 (英文)：Regenerative medical therapy using bone marrow derived cells

研究代表者

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60344511

研究成果の概要 (和文)：

骨髄幹細胞由来の分化した臓器細胞を用いた臨床応用に向け、種々の分野で疾患モデルマウスを用いた研究も行われている。本研究課題において、有効な治療方法の無い表皮水疱症の治療の開発として、骨髄幹細胞を用いた方法の基礎研究を行った。

骨髄由来の細胞が皮膚の細胞へと分化するには表皮細胞が分泌する因子が重要な役割を果たしていることが確認でき、実際に表皮水疱症モデルマウスの1つであるBP180 (XVII型コラーゲン) ノックアウトマウスに対し、正常マウスから骨髄移植を行ったところ皮膚において欠損タンパクの産生が認められ、またBP180 ノックアウトマウスの皮膚の症状など臨床経過は改善を認められた。以上から骨髄移植は有効な治療方法の無い表皮水疱症の治療の一つになり得ると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Recent studies have suggested that bone marrow cells transdifferentiate to a variety of cellular lineages including skin. Investments for regenerative medicine have been used respective model mouse as a preclinical step. In our study, we conducted basic research to achieve radical cure for epidermolysis bullosa to which there is no effective therapy.

First as a basic research step, we demonstrated the existence of the factors secreted from keratinocytes that induces transdifferentiation from bone marrow derived cells into keratinocyte. Next as a preclinical step, bone marrow transplantation from normal mouse to type XVII collagen knock out mouse, one of the epidermolysis bullosa model mouse, induced production of the defect protein (XVII type collagen) and improvement of clinical manifestation of the mouse. So we suggested that the bone marrow transplantation from normal mouse to model mouse can be one of the effective therapies for epidermolysis bullosa..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症、再生学

1. 研究開始当初の背景

これまで再生医学領域の研究により、種々の体細胞成分が骨髄幹細胞から分化可能であることが明らかとなった。骨髄幹細胞から表皮細胞への分化の可能性も示唆されているが、なお確定はえられていない。一方先天的酵素欠損症 (Hunter 症候群など) は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用であることが証明されている。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究はなされていない。

本研究課題が対象とする構造タンパク欠損症である表皮水疱症に対する根本的治療法は、主に病因である欠損タンパクを遺伝子導入することで産生させる、遺伝子治療が検討されている。しかしながら現在遺伝子治療に関しては技術的問題、安全性の問題などで、一般的な臨床応用までにはなお時間がかかると予想される。一方、構造タンパク欠損症と先天的酵素欠損症の相違は、産生させるタンパクが産生されるのみならず、機能的な構造を形成し、かつ適切な部位に留まらなければならないことである。よって、骨髄移植で、標的の臓器 (皮膚) に骨髄由来表皮細胞が遊走し、かつ欠損タンパクを産生し、機能的に働くかは全く不明である。

また、組織幹細胞を用いた再生医療は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と比較し、倫理的にも ES 細胞が胎児由来であるのに対し、骨髄幹細胞は本人由来である。加えて採取が格段に容易という画期的利点があり、臨床適応が切望されている。しかしながら、現在骨髄幹細胞を用いた再生医療への応用の実現化において、乗り越えるべき大きな課題がある。これまでの検討で、各臓器において骨髄幹細胞由来の分化した臓器細胞が存在することは確認できているが、その頻度は非常に低く、生物学的機能を有しうるか疑問視されている。一方、特異的細胞遊走はケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用により起こることが知られており、他臓器細胞に分化する骨髄幹細胞においても同様の機序が予想される。以上から、ケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用を用いることで、骨髄由来の表皮細胞の頻度を増加させることができ、より生物学的機能を発揮させる可能性があると考えられていた。研究代表者は文部科学省科学研究費・若手 (A) (平成 18 年 - 19 年度) の助成を受け、解明した成果を報告している (Inokuma, Abe et al. *Stem Cells* 2006)。骨髄細胞からの表皮細胞への分化の同定として正常マウスに対し、GFP トランスジェニックマウス (全身の細胞が GFP 産生し緑色に蛍光を発する) から骨髄移植を行い、移植マウスに皮膚創傷を作成することによ

りドナー骨髄由来表皮細胞の存在を明らかにし、骨髄細胞からの表皮細胞への分化の同定をした。この研究成果を発展するために本研究を行った。

2. 研究の目的

先天性構造タンパク欠損症 (表皮水疱症など) の治療は遺伝子治療や欠損タンパク補充療法などが検討されているが、いまだ臨床応用の段階まで至っていない。本研究の目的は、文部科学省科学研究費・若手 (A) (平成 18 年 - 19 年度) の助成にて得られた成果を継続し、骨髄細胞由来表皮細胞を用いた皮膚再生医療の臨床応用の手がかりを得ることである。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来表皮細胞の表皮細胞特異的機能の確認

骨髄由来表皮細胞は、骨髄由来マーカーと表皮特異的細胞内タンパク発現により同定されるが、実際に表皮細胞特異的機能 (特異的分泌タンパク産生など) を有するか詳細な検討が必要である。しかしながら、検出された分泌タンパクが骨髄由来表皮細胞由来か通常の表皮細胞由来かを鑑別することは非常に困難である。よって我々は表皮細胞特異的 (ケラチン 14) プロモーターを用いたヒト基底膜 (BP180) トランスジェニックマウスを作成し (未発表)、この骨髄を正常マウスに骨髄移植し、骨髄由来表皮細胞の表皮細胞特異的機能の確認をする実験系を施行する。この系では表皮細胞特異的プロモーターを用いているので、表皮細胞にのみヒト基底膜 (BP180) が発現される。つまりドナー由来の骨髄由来細胞が表皮細胞に分化して初めてヒト BP180 が産生される。移植マウスに創傷作成し、同部位への骨髄由来表皮細胞の遊走の確認と同時に、ヒト基底膜の発現を検討する。

(2) 表皮構成タンパク欠損マウスにおける骨髄幹細胞由来表皮細胞の分化の同定

本研究課題は表皮水疱症を研究対象としているが、特に重症型で生命予後も悪い、接合部型・栄養障害型を対象とする。当教室において表皮水疱症モデルマウスとして、BP180 ノックアウトマウス (接合部型)、VII 型コラーゲンノックアウトマウス (栄養障害型) を作成している (未発表)。これらのモデルマウスは、表皮水疱症における臨床症状と同様の症状、またはより重症の症状を呈し、長期に生存できず、アダルトマウスにまで成長しないものが多い。そのため 1) と同様にこれらのモデルマウスに GFP トランスジェニックマウスから骨髄移植を施行し、正常マウスのように骨髄由来表皮細胞が創傷部にみ

られるか検討する。またアダルトマウスに成長する前に骨髄移植する方法を確立する。

(3) 表皮構成タンパク欠損マウスにおける骨髄幹細胞由来表皮細胞の分化の同定

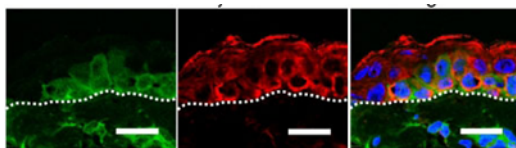
本研究課題は表皮水疱症を研究対象としているが、特に重症型で生命予後も悪い、接合部型・栄養障害型を対象とする。当教室において表皮水疱症モデルマウスとして、BP180 ノックアウトマウス（接合部型）、VII型コラーゲンノックアウトマウス（栄養障害型）を作成している（未発表）。これらのモデルマウスは、表皮水疱症における臨床症状と同様の症状、またはより重症の症状を呈し、長期に生存できず、アダルトマウスにまで成長しないものが多い。そのためこれらのモデルマウスにGFPトランスジェニックマウスから骨髄移植を施行し、正常マウスのように骨髄由来表皮細胞が創傷部にみられるか検討する。またアダルトマウスに成長する前に骨髄移植する方法を確立する。

(4) 表皮構成タンパク欠損マウスにおける骨髄由来表皮細胞からの欠損タンパク産生能の検討

表皮水疱症モデルマウスであるBP180 ノックアウトマウス、VII型コラーゲンノックアウトマウスに対し、正常マウスから骨髄移植を行う。表皮水疱症モデルマウスは皮膚にびらん・潰瘍を容易に生じるため、病変部が再生を要する部位として骨髄由来表皮細胞がもっとも集積すると予想される。よってレシピエントマウスの病変部（皮膚欠損部）において、ドナー骨髄幹細胞から分化した表皮細胞が欠損タンパク（BP180、またはVII型コラーゲン）を実際に皮膚にて産生しているかを確認する。

4. 研究成果

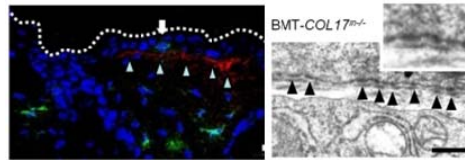
疾患モデルマウスであるBP180 ノックアウトマウスに正常マウスから骨髄移植し皮膚において欠損タンパクの検討を行ったところ、上図のように分化した細胞がケラチンタンパクを発現しているのが確認できた。また欠損タンパクの発現も確認できた（中央図の免疫染色、電子顕微鏡、下図の mRNA）。以上から、正常な骨髄由来細胞が疾患モデルマウスにおいて骨髄移植されることで表皮細胞に分化し正常なタンパクを産生することが確認できた。



骨髄由来細胞

ケラチン
タンパク

合成
(青は核)



免疫染色(左)、電子顕微鏡(右)
疾患モデルマウスに骨髄移植したマウスで
欠損タンパクの発現を確認

また疾患モデルマウスに正常マウスから骨髄移植することで、皮膚のびらんの面積は減少し、生存率の改善も認め、臨床症状の改善も認められた。

以上から *in vivo* においても骨髄由来の細胞が表皮細胞へと分化し機能的なタンパクを産生していることが確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件) (すべて査読あり)

1. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H.

Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice.

Proc Natl Acad Sci USA 107. 14345-50. 2010.

2. Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H.

Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis.

Hum Mutat 31. 602-10. 2010.

3. Qiao H, Shibaki A, Long HA, Wang G, Li Q, Nishie W, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, McMillan JR.

Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling.

J Invest Dermatol 129. 2288-95. 2009.

4. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H.

Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type.

J Immunol 180. 2581-7. 2008.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 第 109 回日本皮膚科学会総会. 大阪,
2010.04.17

阿部理一郎

骨髄細胞を用いた表皮水疱症治療

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学医学部皮膚科ホームページ：

<http://www.derm-hokudai.jp/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60344511

(2) 研究分担者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00146672

(3) 連携研究者

なし