

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659530

研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞動員因子を利用した皮膚機能向上医療開発

研究課題名（英文） Development of activator for skin function using bone marrow mesenchymal stem cell mobilizer

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

研究成果の概要（和文）：

GFP 骨髄移植マウスに対する皮膚移植実験系を用いて、移植皮膚に動員される間葉系幹細胞（GFP+/Lin-/PDGFR $\alpha$ +）について、flow cytometryにより定量的に解析した。その結果、皮膚移植後経時的に植皮片内 GFP+/Lin-/PDGFR $\alpha$ +細胞が増加し、皮膚移植1週後では植皮片内全細胞の約1%程度を骨髄由来間葉系幹細胞が占めていた。植皮片内に動員される間葉系幹細胞の詳細を検討した結果、特に PDGFR $\alpha$ +/SSEA3+細胞が表皮細胞分化能を持つ多能性幹細胞であることが明らかとなった。さらに、皮膚移植後に HMGB1 を投与することにより、移植皮膚片内の GFP+/Lin-/PDGFR $\alpha$ +細胞数増加効果、植皮片内の血管新生増強効果、炎症反応抑制効果を介して皮膚機能が向上することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Using skin transplantation system on GFP-transgenic bone marrow-transplanted mouse, bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in the skin graft were evaluated by flow cytometry analysis. As a result, bone marrow-derived MSCs in the skin graft increased time dependently, and reached to ~1 % of all cell population in the skin graft at day 7 after the engraftment. Further precise investigation revealed that particular cell population (PDGFR $\alpha$ +/SSEA3+) in MSCs is a pluripotent stem cells harboring keratinocyte-differentiation potential. Furthermore, intravenous administration of HMGB1, which had been shown to mobilize bone marrow MSCs into the circulation, showed potent activities to improve function of the skin graft by increasing MSC numbers, enhancing angiogenesis, and suppressing inflammation in the skin graft.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：HMGB1、間葉系幹細胞、表皮水疱症

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は長年にわたり、遺伝性水疱性皮膚疾患である表皮水疱症の病態解明、遺伝子診断、遺伝子治療研究を進めてきた。近年申請者は、平成19年～21年度の科学研究費補助金（基盤B）「骨髄由来表皮細胞による表皮再生誘導に関する基礎研究」において、栄養障害型表皮水疱症モデルマウス（VII型コラーゲンノックアウトマウス）の剥離表皮が産生するHMGB1（high mobility group box 1）によりPDGFR $\alpha$ 陽性骨髄細胞が血中を介して水疱部皮膚に動員され、再生表皮内で表皮角化細胞へと分化することにより、水疱部表皮再生に寄与していることを明らかにした（Tamai et al, PNAS2011）。PDGFR $\alpha$ 陽性骨髄細胞は間葉系幹細胞として培養され、線維芽細胞や表皮細胞のみならず、神経細胞、メラノサイト、毛包上皮細胞などの外胚葉由来皮膚構成細胞へと分化誘導可能であることが明らかとなりつつある。これらの研究結果より、HMGB1刺激により皮膚に集積した骨髄由来間葉系幹細胞が種々の刺激により種々の皮膚構成細胞へと分化して、皮膚機能の恒常性維持に寄与していることが容易に予想される。

## 2. 研究の目的

遺伝性皮膚疾患である表皮水疱症は基底膜接着分子欠損により生下時より一生涯表皮剥離を繰り返し、経過と共に表皮幹細胞を大量に消失してしまう。近年申請者は、表皮水疱症剥離皮膚から血中に放出される因子が骨髄間葉系幹細胞を皮膚へと動員し、表皮幹細胞機能を代償して水疱部皮膚の再生を誘導していることを明らかにした。さらに、骨髄から動員された間葉系幹細胞は、線維芽細胞や表皮細胞のみならず、神経細胞、メラノサイト、毛包上皮細胞への分化能を持つことが明らかになりつつある。

本研究は、皮膚に動員された骨髄由来間葉系幹細胞の皮膚再生における役割を解明し、骨髄間葉系幹細胞動員による皮膚機能向上を可能にする新たな皮膚再生誘導医療法開発を目的とする

## 3. 研究の方法

1) HMGB1刺激で皮膚に動員されるPDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞の定量的解析

2) 皮膚に集積したPDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞の皮膚内分化系譜の定量的解析

3) HMGB1刺激による皮膚内PDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞増加による皮膚機能向上程度の定量的解析

## 4. 研究成果

1) HMGB1刺激で皮膚に動員されるPDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞の定量的解析：

GFP骨髄移植マウスに対する皮膚移植実験系を用いて、移植皮膚に動員される間葉系幹細胞（GFP $^+$ /Lin $^-$ /PDGFR $\alpha^+$ ）について、flow cytometryにより定量的に解析した。その結果、皮膚移植後経時的に植皮片内GFP $^+$ /Lin $^-$ /PDGFR $\alpha^+$ 細胞が増加し、皮膚移植1週間後では植皮片内全細胞の約1%程度を骨髄由来間葉系幹細胞が占めていた。また、皮膚移植後のマウス血中HMGB1濃度を経時的に測定した結果、移植後3日目に有意な上昇が観察され、その上昇は移植4日目以降、次第に減少した。

2) 皮膚に集積したPDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞の皮膚内分化系譜の定量的解析：

植皮片内に動員される間葉系幹細胞の詳細をflow cytometryを用いて詳細に検討した結果、GFP $^+$ /PDGFR $\alpha^+$ /SSEA3 $^+$ 細胞が含まれることが明らかとなった。そこで、骨髄からPDGFR $\alpha^+$ /SSEA3 $^+$ 細胞とPDGFR $\alpha^+$ /SSEA3 $^-$ 細胞をそれぞれ分離培養して表皮分化能を解析した。その結果、PDGFR $\alpha^+$ /SSEA3 $^+$ 細胞が表皮細胞分化能を持つ多能性幹細胞であることが明らかとなった。

3) HMGB1刺激による皮膚内PDGFR $\alpha$ 陽性骨髄由来細胞増加による皮膚機能向上程度の定量的解析。

皮膚移植後にHMGB1を投与することにより、移植皮膚片内に集積する骨髄由来間葉系幹細胞（GFP $^+$ /Lin $^-$ /PDGFR $\alpha^+$ ）数

が有意に増加するとともに、植皮片内の血管新生増強効果、炎症反応抑制効果が観察され、その効果はそれぞれ *angiopoietin* および *TSG-6* を介していることが示された。即ち、*HMGB1* 投与により皮膚機能向上効果が得られることが明らかとなった。

#### 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6件)

1. Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M. Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques. *J Immunol.* 2013, 190(2), 605-612, 2012 Dec 14. [Epub ahead of print]
2. Endo M, Zoltick PW, Radu A, Qiujie J, Matsui C, Marinkovich PM, McGrath J, Tamai K, Uitto J, Flake AW. Early intra-amniotic gene transfer using lentiviral vector improves skin blistering phenotype in a murine model of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther.* 2012 May;19(5):561-9. doi: 10.1038/gt.2011.135.
3. Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. *HIG1*, a novel regulator of mitochondrial  $\gamma$ -secretase, maintains normal mitochondrial function. *FASEB J.* 2012, 26(6), 2306-2317, 2012, Feb 21. [Epub ahead of print]
4. Saga K, Tamai K, Yamazaki T, Kaneda Y. Systemic administration of a novel immune-stimulatory pseudovirion suppresses lung metastatic melanoma by regionally enhancing  $IFN-\gamma$  production. *Clin Cancer Res.* 2013, 19(3), 668-679, 2012 Dec 18. [Epub ahead of print]

5. Ohashi M, Shu E, Nagai M, Murase K, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hiroka T, Seishima M, Kitajima Y, Aoyama Y. Two cases of recessive dystrophic epidermolysis bullosa diagnosed as severe generalized. *J Dermatol* 38:893-9, 2012

6. Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Nishikawa Y, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA, Katayama I. The course of pregnancy and childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol.* 37:10-4. 2012

[学会発表] (計7件)

1. 玉井克人、教育講演 6 研究を目指す若手皮膚科医のために 臨床医にとって研究とは? 臨床と研究は皮膚科学一卵性双生児である. 第 111 回日本皮膚科学会総会・学術大会 京都 (2012.6.1)
2. 玉井克人、教育講演 49 遙かにひろがる皮膚イメージング宇宙の旅: 皮膚イメージング宇宙を旅する宇宙船皮膚号にようこそ. 第 111 回日本皮膚科学会総会・学術大会 京都 (2012.6.3)
3. 玉井克人、飯沼晋、菊池康、金田安史、損傷組織と骨髄細胞のクロストークを利用した体内再生誘導医療開発. 第 11 回日本再生医療学会総会、横浜 (2011.6.12)
4. 玉井克人、アトピー性皮膚炎に対する *NFkB* デコイ DNA 軟膏の展望. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢 (2012.7.14)
5. Katsuto Tamai, Yasushi Kikuchi, Shin Inuma, Yasufumi Kaneda. Injured tissue releases *HMGB1* to recruit bone marrow mesenchymal stem cells for inducing regeneration of the injury. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep. 20, Sapporo, 2012 Japan

6. 玉井克人、飯沼晋、菊池康、飯塚一、金田安史、片山一朗、水疱症に対する骨髄間葉系幹細胞移植治療の可能性. 第34回水疱症研究会 弘前 (2012.10.6)
7. 玉井克人、幹細胞研究の展望：末梢循環性間葉系幹細胞の皮膚集積による病態変化. 日本皮膚科学会中部支部学術大会 大阪 (2012.10.13)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：組織再生を誘導するためのペプチドとその利用

発明者：玉井克人他

権利者：大阪大学、株式会社ジェノミックス

種類：PCT 出願

番号：PCT/JP2012/059113

出願年月日：2012 年 4 月 3 日

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：