

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2014

課題番号：25713041

研究課題名(和文) iPS細胞を応用した表皮水疱症の根本的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of induced stem cells treatment for epidermolysis bullosa

研究代表者

藤田 靖幸 (Fujita, Yasuyuki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80374437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：表皮水疱症は、真皮-表皮境界部を構成する蛋白の先天性欠損や構造異常により皮膚の脆弱性を生じ、容易に水疱や潰瘍を形成する疾患である。近年造血幹細胞移植を始めとした細胞療法が注目されているが、生着不全のリスクなどが課題として存在する。そこで、近年本邦で開発された人工多能性幹細胞(iPS細胞)の知見を応用して、大量の細胞を造血系細胞へ分化誘導させることでその問題を解決する発想に至った。正常マウスiPS細胞を血球系前駆細胞へ分化させ、17型コラーゲン欠損マウスや17型コラーゲンヒト化マウスに移植したところ、一部で欠損17型コラーゲンのわずかな発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：Epidermolysis bullosa (EB) is a group of genodermatoses that cause blister formations from the congenital abnormality of anchor proteins between the epidermis and the dermis. There have been several strategies for the treatment of EB, and so far, cell therapies are the most promising approach because of the potential of systemic effects. We have proved that stem cell therapies, including bone marrow transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, can ameliorate the phenotype and survival prognosis in the junctional EB model mice that lack type XVII collagen (Col17). In this study we explore the possibility of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the treatment of EB, via induction of hematopoietic cell lineages. We performed iPSCs-derived hematopoietic stem cell transplantation to Col17 knockout / Col17 humanized mice, and some of them showed slight expression of the lacked murine Col17 in the re-epithelized skin injuries.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 iPS細胞 人工多能性幹細胞 造血系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚は人体最大の臓器である。皮膚における先天的な遺伝子異常による疾患は、全身に様々な皮膚変化をきたす上、罹患面積が大きいため根本的な治療が著しく困難である。表皮水疱症は、真皮-表皮境界部を構成する蛋白の先天的欠損や構造異常により皮膚の脆弱性を生じ、容易に水疱や潰瘍を形成する(図1)。現時点で確立した治療法は存在せず、特に重症型では感染症や脱水、悪性腫瘍などを生じ、生後数年以内に死亡する例も少なくない。



(図1 表皮水疱症の臨床)

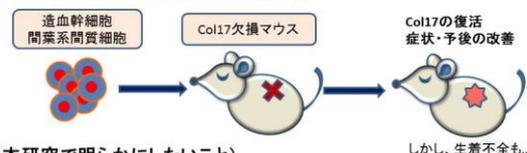
このような重症遺伝性皮膚疾患において近年研究されている治療法として、遺伝子治療、蛋白補充療法および細胞療法が現在考えられている。いずれも何らかの形で欠損蛋白を獲得する治療法であるが、前二者については全身の治療が困難であり、遺伝子改変による倫理的課題や注入蛋白の精度などの側面において、臨床応用への障壁は高い。一方、根本的な治療法となりうる細胞療法として、正常遺伝子を有する他者の細胞を、たとえば造血幹細胞移植のように患者に全身投与することで、欠損蛋白の産生を促す治療法が考えられる。全身性の効果が期待できること、生着により長期間の治療効果が望めること、現代の医療レベルで施行可能な治療法が存在し倫理的障壁が低いこと、などの利点が考えられる。

代表者らは、マウス骨髄由来の造血幹細胞・間葉系間質細胞の皮膚構成細胞への分化可能性について先駆的な研究を行い (Inokuma D, Fujita Y et al., Stem Cell 2006, Sasaki M, Fujita Y et al., J Immunol 2008)、これらの知見を踏まえて、表皮水疱症モデルマウス (Nishie W et al., Nat Med 2007) において骨髄移植療法が臨床的に有効であることを見いだした (Fujita Y et al. PNAS 2010)。また、ヒト造血幹細胞が表皮角化細胞へ分化する事実およびその促進因子の存在可能性を明らかにした (Fujita Y et al, Clin Exp Dermatol, 2012)。

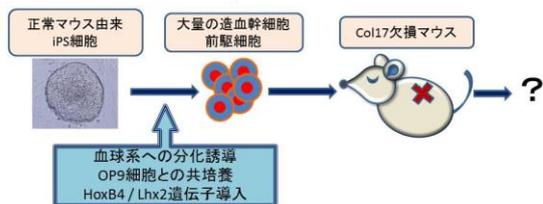
ヒトへの臨床応用については、米国のグループが栄養障害型表皮水疱症患者に対して施行し、臨床的な効果を示している (Wagner JE et al., NEJM 2010) が、モデル動物でのリスク評価も含めた検討が十分に行われないうまま臨床応用に走ったものであった。実際に生着不全を含めた移植関連死が9人中3人で生じていると報告されており (Tolar J et al., World Congress of Dermatology (2011) 講演より)、本邦で臨床研究を行うには課題が残っている現状である。

このように、造血幹細胞移植、特に臍帯血幹細胞移植においてはしばしば採取細胞数の不足による生着不全のリスクや再移植の困難性、拒絶反応による GVHD などが課題として存在する。そこで、近年本邦で開発された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の知見を応用して、大量の細胞を造血系細胞へ分化誘導させることでその問題を解決する発想に至った (図2)。本研究は、モデルマウスで有効性が確認された、表皮水疱症への造血幹細胞移植療法をさらに発展させたものとして、iPS 細胞の応用可能性をモデルマウスを用いて検討するものである。幹細胞移植は現時点で表皮水疱症に対して唯一の全身的・長期的な有効性を期待できる根本的な治療法であり、本研究の実現は表皮水疱症だけでなく、難治性疾患一般における新たな治療戦略に光明を照らすものとする。

(今までの研究により判明していること)



(本研究で明らかにしたいこと)



(図2 本研究の概略)

2. 研究の目的

iPS 細胞由来造血幹細胞を表皮水疱症モデルマウスに移植し、通常の幹細胞移植と同様の結果が得られるかどうか、そして移植細胞由来角化細胞と正常角化細胞との分子生物学的差違を検討し、将来的な治療法たり得るかを検討する。

3. 研究の方法

同系マウス由来の正常遺伝子を有する iPS 細胞に対し、OP9 細胞との共培養ないし HoxB4、Lhx2 遺伝子導入による血球系分化誘導を行う (Kitajima K et al., Blood 2011)。血球系幹細胞および前駆細胞への分化をフローサイトメトリー、RT-PCR で確認し、さらに *in vitro* で各血球系への分化誘導を行い、形態学的・フローサイトメトリーなどで確認する。こうして得られた iPS 細胞由来造血幹細胞・前駆細胞を、17 型コラーゲン欠損表皮水疱症マウスに移植する。生着および各血球系の確立をフローサイトメトリーで確認した上で、正常部皮膚およびびらん上皮化部皮膚を採取し、RT-PCR, quantitative RT-PCR, 免疫染色および Western blotting によって、欠損した皮膚構成蛋白の発現を検討する。また、GFP+Tg マウス由来 iPS 細胞から誘導した造血幹細胞を移植することで、ドナー由来血球系細胞および表皮角化細胞の同定をはかる。表皮水疱症マウスへの移植系においては、実際の皮膚の強度への関与を評価するため、電子顕微鏡での微細構造の変化および臨床的な変化を観察する。同時に、移植群と非移植群との間での生命予後の変化を検討する。また、皮膚構成細胞を単離し、フローサイトメトリー解析・分離によってドナー由来細胞の profile を細胞培養・RT-PCR にて解析する。移植モデルのコントロールとして、ES 細胞由来造血幹細胞移植群、GFP+Tg マウス造血幹細胞移植群、および COL17 欠損マウス同士での移植群を作成し、同様に検討する。

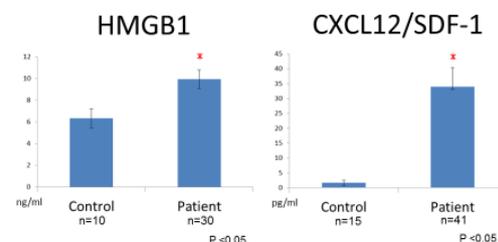
iPS 細胞由来幹細胞移植群と、従来の骨髄移植群で出現するドナー由来表皮角化細胞の分子学的差違を検討するため、各々の細胞をフローサイトメトリーないし laser capture microdissection で GFP 陽性角化細胞を分離抽出し、マイクロアレイ法で解析を行う。差違が見られた蛋白についてその機能を検討するとともに、リコンビナント蛋白・モノクローナル抗体を併用した移植モデルを作成し、角化細胞への分化率などの変化を検討する。

17 型コラーゲン欠損表皮水疱症マウスは成体まで成長する確率が約 12% と低く、実験遂行に十分な個体数が確保されにくい可能性も予想される。その場合は、移植レシピエントを、17 型コラーゲンヒト化マウス (マウス 17 型コラーゲンは欠損しているものの、ヒト 17 型コラーゲンを発現しているマウス (繁殖が容易かつ、移植細胞由来のマウス 17 型コラーゲンの発現を検討することが可能である) に設定して同様に検討を進める。

4. 研究成果

我々は過去に、骨髄由来細胞や MSC に発現するケモカインレセプターおよびケモカインによる相互作用が皮膚創傷部への細胞動員を促進し、表皮角化細胞を含むドナー由来皮膚構成細胞の出現を亢進させることを報告している。そこでより直接的に、表皮水疱症マウスへの骨髄移植後に皮膚に出現するドナー由来およびレシピエント由来の表皮細胞における遺伝子発現の差違を解析し、骨髄由来細胞の表皮角化細胞への分化関連因子の検索を試みた。Col17 欠損マウスに骨髄移植を行い、生着後皮膚から GFP+CD45-細胞 (ドナー由来表皮角化細胞) および GFP-CD45-細胞 (レシピエント由来) を各々ソーティングし、マイクロアレイ解析で mRNA 発現の差違を網羅的に検討した。合計 23446 プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。既知の遺伝子でドナー由来角化細胞で発現が亢進しているものとして、*Mmp13*, *Cxc110*, *Cxc19* などが検出された。

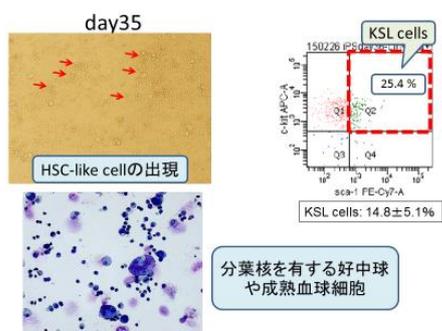
これを踏まえて我々は、実際の EB 患者血清を用いて、血清中のケモカイン類の測定を行い、健常者と比較した。研究者の施設および関連施設の倫理審査委員会の承認を得た上で、患者団体の協力の下、全国より 45 名の表皮水疱症患者から血清および臨床情報を入力した上で、上記候補ケモカインを中心に血清濃度を ELISA 法で測定した。表皮水疱症患者血清において、健常者群と比較して CCL21 の有意な低下 (89.1 ± 32.7 pg/ml VS 1916.0 ± 515.3 pg/ml, $P < 0.05$) および HMGB1 の有意な上昇 (9.9 ± 0.9 ng/ml VS 6.3 ± 0.9 ng/ml, $P < 0.05$)・SDF-1 の有意な上昇 (34.0 ± 6.3 pg/ml, 1.7 ± 0.7 pg/ml, $P < 0.05$) が認められた。一方、CCL19・CCL27・CCL28 については、患者群と健常者群とで有意差を認めなかった (図 3)。



(図 3 表皮水疱症患者におけるケモカイン濃度の解析結果。HMGB1 および CXCL12/SDF-1 の有意な差を示す)

次に我々は、ES および iPS 細胞の造血系細胞への分化誘導による造血幹細胞移植の治

療可能性を検討した。Ly5.1 由来の ES 細胞ないし iPS 細胞に Lhx2 遺伝子を導入し、OP9 細胞と共培養することで血球系前駆細胞 (KSL 細胞) への分化を確認、さらに血球系細胞への分化を *in vitro* で確認した (図 4)。このようにして得られた細胞を成体 COL17 ヒト化マウスに移植したところ、移植後 4 週間後の時点での末梢血キメラ形成率は ES 細胞移植群で $6.32 \pm 2.53 \%$ (n=5)、iPS 細胞移植群で $12.2 \pm 5.26 \%$ (n=10) であった。定性 RT-PCR において計 15 匹中、iPS 細胞由来造血幹細胞移植を行った 2 匹、ES 細胞由来造血幹細胞移植を行った 1 匹において mCol17 の発現が確認された。しかしながらこれらのマウス皮膚において、免疫染色で mCOL17 の基底膜への線状沈着は確認できなかった。また、電子顕微鏡においてヘミデスモソームの成熟化も確認できなかった。



(図 4 iPS 細胞より作成した造血幹細胞 (KSL 細胞: lineage^{c-kit}^{sca-1}))

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 5 件)

1. Nakayama C, Fujita Y, Watanabe M, Shimizu H: Development of bullous pemphigoid during treatment of psoriatic onycho-pachydermo periostitis with ustekinumab. *J Dermatol*, in press. (査読あり)

2. Hata H, Abe R, Suto A, Homma E, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H: MMP13 can be a useful differentiating marker between squamous cell carcinoma and benign hyperkeratotic lesions in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 172: 769-773, 2015. (査読あり)
doi: 10.1111/bjd.13302.

3. 藤田靖幸: 先天性表皮水疱症の治療. *MB Derma* 222: 39-44, 2014. (査読なし)

<http://www.zenniti.com/f/b/show/b01/670/zc01/2.html>

4. Shinkuma S, Sawamura D, Fujita Y, Kawasaki H, Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H: Long-term Follow-up of Cultured Epidermal Autograft in a Patient with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Acta Derm Venereol* 94: 98-99, 2014. (査読あり)
doi: 10.2340/00015555-1592.

5. Yoshioka N, Suto A, Abe R, Saito N, Murata J, Hayashi-Ujiie I, Hoshina D, Fujita Y, Shimizu H: Disturbed balance in three subpopulations of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis patients. *Clin Immunol* 148: 89-91, 2013. (査読あり)

doi: 10.1016/j.clim.2013.04.002.

[学会発表] (計 6 件)

1. Muramatsu K, Fujita Y, Inokuma D, Tsukinaga I, Ito K, Nishiura Y, Shimizu H: GVHD-like manifestation in Thymoma: Thymoma-associated multiorgan autoimmunity.

The 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver Convention Centre (Vancouver, Canada), 2015.06.08-2015.06.13.

2. Takashima S, Fujita Y, Suzuki S, Saito N, Shinkuma S, Nomura T, Shimizu H: RNA recognition motif of LEMD3 as a key player in the pathogenesis of Buschke-Ollendorff syndrome. The 71st Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Hilton Atlanta Hotel (Atlanta, USA), 2015.05.06-2015.05.09

3. Fujita Y: Epidermolysis bullosa in Hokkaido University: from bench to bed. 12th International Symposium of Cutaneous Biology Research Institute. Yonsei University (Seoul, Korea), 2014.08.30.

4. 藤田靖幸: 表皮水疱症の最新診断法と治療法. 第5回難治性皮膚ケア学習会、北海道大学医学部第3講堂 (札幌市)、2014.07.13.

5. Fujita Y: Novel strategies for the treatment of epidermolysis bullosa. The

1st Beijing International Forum of
Pediatric Development. Beijing
International Convention Center (Beijing,
China), 2013. 11. 07-2013. 11. 09.

6. 藤田靖幸、新熊 悟、澤村大輔、川崎浩
之、中村裕之、井家益和、西江 涉、清水
宏：自家培養表皮移植を行い長期観察した劣
性栄養障害型表皮水疱症の 1 例. 第 112 回
日本皮膚科学会総会、パシフィコ横浜（横浜
市）、2013. 06. 14-2013. 06. 16.

〔その他〕

北海道大学医学部皮膚科ホームページ
<http://www.derm-hokudai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 靖幸 (FUJITA YASUYUKI)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：80374437

(2) 研究分担者

なし