

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461681

研究課題名(和文) 胎仔期循環血液内の間葉系幹細胞を利用した遺伝性・難治性皮膚疾患の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the novel embryonic cure system for an intractable skin disease mouse model by using a mesenchymal stem cells from the circulation blood of mouse embryo

研究代表者

知野 剛直 (Chino, Takenao)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20521397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、マウス胎仔期から血液内間葉系幹細胞を回収するシステムを構築し、さらに回収した間葉系幹細胞を難治性疾患モデルマウスに投与することで、新規治療法の研究基盤を確立することである。今回、投与される側の難治性皮膚疾患モデルマウスの解析に重点を置いて研究を行った。新規に作製したDermokine / KOマウスの胎仔期・新生仔期の恒常状態の皮膚を詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish the new system which collects the mesenchymal stem cells in the blood of the mouse embryo period, and the new cure system by giving these cells to an intractable skin disease mouse model. In this study, we analyzed the embryonic and neonatal skin of the new Dermokine / knockout mouse in detail.

研究分野：皮膚遺伝子治療

キーワード：マウス胎仔治療 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

成人マウス骨髄細胞を先天性表皮水疱症モデルマウスの胎仔期に循環内に投与し、生まれる前に細胞を皮膚に生着させることにより、皮膚症状改善と生存期間の延長が得られることが過去に報告され、さらにアメリカ ミシガン大学及びチリで行われた臨床治験で、ヒト EB 患者に対して、全身性放射線照射後、骨髄間葉系幹細胞移植を行なったところ、皮膚症状の著明な改善を得たと報告された。骨髄間葉系幹細胞投与は、マウスおよびヒト EB 患者に治療効果があることが証明されたのである。

しかし、臨床で普及するには、投与前に行う全身性放射線照射により生じる致死性合併症(GVHD や感染症等)を減らすことや、さらに治療効果が得られる間葉系幹細胞を探索することが、次の重要な課題であることも判明した。と同時に表皮分化の早い段階で目的の細胞を表皮発生・分化の状況下に投与・生着させる手技の開発が急務である。

2. 研究目的

本研究の最終目的は、今回はまだ研究段階ではあるが、マウス胎仔期 E12.5-13.5 の血液内のみ存在する万能性が高い PDGFR⁺ 陽性の胎仔期血液内間葉系幹細胞 (Dorsal Aorta Mesenchymal Stem Cells(DAMSCs)(以下 PDGFR⁺DAMSCs と略す)を効率よく血液中から回収するシステムを構築する。さらに 難治性疾患のモデルマウスに、回収した DAMSCs 細胞を投与することで通常の MSC よりも高い治療効果が得られることを明らかにし、難治性疾患の新規治療法の研究基盤を確立す

ることである。

今回、投与される側(治療される側)の難治性皮膚疾患モデルマウスの解析に重点を置いて研究を行った。報告者らは、難治性皮膚疾患モデルと考えている Dermokine^{-/-} / KO マウスを新規に作製した。この胎仔期・新生仔期の恒常状態の皮膚を詳細に解析することで、DAMSCs 細胞を投与した時の治療効果を正確に検討できる。

3. 研究方法

本研究では、報告者らが独自に作製した DMKN^{-/-} / 欠損マウスの皮膚を詳細に検証した。今回は、主に生後 7-10 日の皮膚に注目して、皮膚の表現型を肉眼・光学顕微鏡・電子顕微鏡による違いを比較することで野生型と欠損型にどのような違いがみられるのかを検証した。

(1) 肉眼/実体顕微鏡による皮膚表現型を検証 生後 7-10 日の野生型と欠損型の皮膚を肉眼/実体顕微鏡で、比較し検証した。

(2) 光学顕微鏡による皮膚表現型の検証 生後 7-10 日の野生型と欠損型の皮膚で HE 染色切片を作成し、光学顕微鏡で比較し検証した。

(3) 電子顕微鏡による皮膚表現型の検証 生後 7-10 日の野生型と欠損型の皮膚で超薄切片を作成し、透過型顕微鏡で比較し検証した。

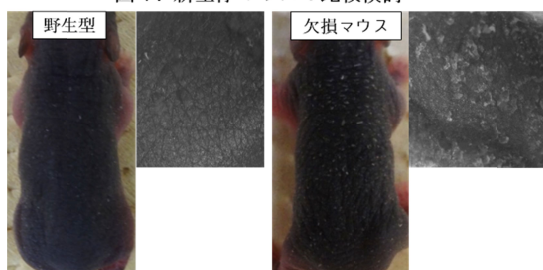
4. 研究成果

(1) 肉眼/実体顕微鏡による皮膚表現型を検証

生後 1 週間の欠損マウスの皮膚表面で、びまん性に固着した鱗屑が非常に目立った。

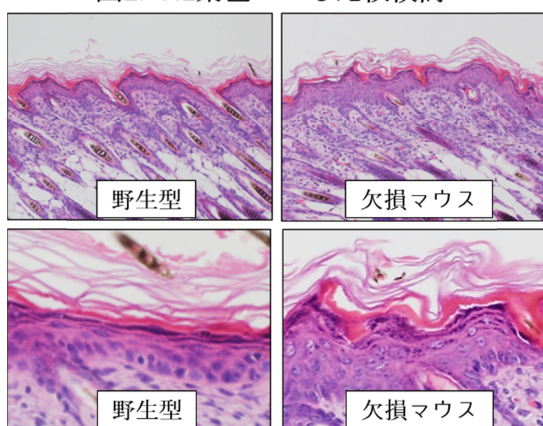
また、その後、この鱗屑は約 10 日目まで消失し、成体になっても鱗屑再燃を認めなかった。

図1. 新生仔マウスの比較検討



(2) 光学顕微鏡による皮膚表現型の検証

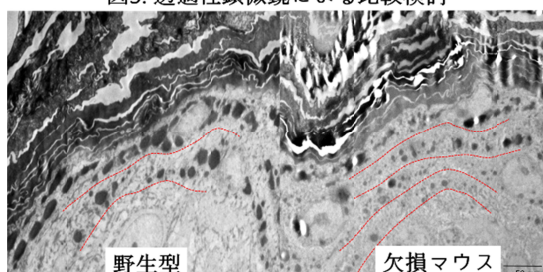
図2. HE染色による比較検討



欠損マウスの表皮と顆粒層はともに肥厚し、ケラトヒアリン顆粒の大小不同と微細化が目立った。角質層は明らかな差を認めなかった。

(3) 電子顕微鏡による皮膚表現型の検証

図3. 透過性顕微鏡による比較検討



欠損マウスでは、顆粒層が4層と肥厚していて、ケラトヒアリン顆粒の微細化が顕著であった。角質層下層の density が不均一

かつ層状構造の乱れと裂隙形成を認めた。

今後、さらに DMKN- / の成体における役割を詳細に検討するため、RNA microarray、qRT-PCR、免疫染色、TEWLなどを駆使して研究を遂行する予定である。また、この新規に作成した Dermokine / KOマウスに DAMSCs細胞を含めた多様性間葉系幹細胞を投与することで、皮膚表現型の改善を促し、その治療効果を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連帯研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産件〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表

知野 剛直(Chino Takenao)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20521397

(2) 研究分担者

なし

(3) 連帯研究者

長谷川 稔(Hasegawa Minoru)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

授

研究者番号：50283130

徳力 篤(Tokuriki Atsushi)

福井大学・学術研究院医学系部門・講

師

研究者番号：90397274