

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670531

研究課題名(和文)末梢循環性間葉系幹細胞の炎症抑制作用を利用した新しい皮膚疾患治療法開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic strategy for skin diseases by utilizing anti-inflammatory activity of circulating mesenchymal stem cells

研究代表者

玉井 克人(Tamai, Katsuto)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1のもつ骨髄間葉系幹細胞(MSC)血中動員効果およびMSCの持つ抗炎症作用を利用した新たな皮膚炎治療法開発を目的として研究を進めた。具体的には、接触性皮膚炎マウスモデルに対してHMGB1を静脈内投与し、皮膚炎症部位へのMSC集積および抗炎症効果を評価した。その結果、HMGB1投与により接触性皮膚炎病態が著明に改善すること、その作用機序として、炎症部皮膚血管内皮細胞が発現するケモカインSDF-1とMSC表面に発現するSDF-1受容体CXCR4の相互作用によるMSCの皮膚炎特異的集積作用およびHMGB1による間葉系幹細胞表面CXCR4発現増強効果が寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a novel anti-inflammatory therapy for allergic contact dermatitis by utilizing anti-inflammatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), which were mobilized from bone marrow into the circulation by high mobility group box 1 (HMGB1). Systemic administration of HMGB1 to contact hypersensitivity model mouse showed significant anti-inflammatory effect by inducing accumulation of bone marrow-derived MSCs in the skin lesion. We further elucidated that CXCR4/SDF-1 axis was involved in the accumulation of circulating MSCs into the lesion, and that inoculated HMGB1 induced expression of CXCR4, a receptor for chemokine SDF-1, on the MSC surface. These results indicate that systemically administered HMGB1 suppresses inflammatory reactions not only by inducing mobilization of MSCs from bone marrow into circulation, but also by accelerating accumulation of the circulating MSCs into the inflammatory/injured tissues by enhancing CXCR4/SDF-1 axis.

研究分野：皮膚科学、再生医療学、遺伝子治療学

キーワード：HMGB1 間葉系幹細胞 接触性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

多くの皮膚疾患において、炎症は病態形成の中心的機序を担う。それ故、皮膚疾患研究の多くは、それぞれの疾患特異的皮膚炎発症メカニズムの解明に注力されている。一方、組織壊死などにより生じた急性炎症は経過と共に抑制的に制御され、壊死組織の修復と共に自然終息するが、生体内における炎症抑制・終息制御メカニズムに関する研究は皮膚炎発症メカニズム研究と比較すると殆どなされていないのが現状であり、皮膚炎終息制御機構の詳細は未だ不明なままである。しかし、炎症抑制・終息制御メカニズムの破綻は炎症の遷延化を引き起こし、慢性炎症性皮膚疾患の発症へと至ることが容易に予想される。即ち、生体内における炎症抑制・終息制御メカニズム解明研究は、従来の研究で未解決の難治性炎症性皮膚疾患の病態解明・治療法開発に向けた新たな道筋を提供すると期待する。

これまで我々は、皮膚基底膜領域の接着構造遺伝子異常により日常生活の軽微な外力で表皮剥離が生じ、生直後から一生涯全身熱傷様症状が持続する遺伝性水疱性皮膚難病「表皮水疱症」の病態解明、治療法開発研究を進めてきた。その過程で我々は、1) 末梢循環血液中には PDGFR α (platelet-derived growth factor- α) 陽性 MSC が循環している、2) 剥離表皮の壊死組織から血中に大量放出される HMGB1 が骨髄内 PDGFR α 陽性 MSC を刺激して血中動員する、3) 血中動員された MSC は壊死組織周囲の皮膚炎により産生・放出される炎症性サイトカインやケモカインにより損傷皮膚特異的に集積し、炎症を抑制的に制御しつつ組織再生を誘導する、4) 移植骨髄由来 MSC は表皮水疱症マウス皮膚内で線維芽細胞や表皮細胞へと分化し、皮膚基底膜領域に VII 型コラーゲンを供給して病態を改善することを報告した (Stem Cells2007、AJP2008、PNAS 2011)。これらの研究成果を基にして、現在我々はヒト幹細胞移植臨床研究として「表皮水疱症に対する他家骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究」を進めている。

胞移植臨床研究」を進めている。

一方、MSC は IL-10、プロスタグランジン E2、TSG-6 (TNF- α stimulating gene/protein 6) などの分子を放出して炎症・免疫反応を抑制的に制御することが明らかになりつつある。現在これら MSC の炎症抑制作用を利用して、GVHD、クローン病、肝炎、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に対する MSC 移植臨床試験が世界中で進められている。

以上の学術的背景から、生体内において末梢循環性 MSC は種々の急性炎症性皮膚疾患において皮膚炎領域特異的に集積し、炎症を抑制的に制御して組織再生を誘導させることにより皮膚炎を終息させる役割を担い、そのメカニズムの破綻は慢性炎症性皮膚疾患の病態と深く関わっていると予想する。

2. 研究の目的

アレルギー、自己免疫、感染、外傷、いずれの原因であれ難治性皮膚疾患の病態において末梢血白血球の皮膚浸潤、すなわち“皮膚炎”が病態形成の中心的役割を担う。一方、末梢循環血液中には炎症を抑制的に制御する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) の存在が知られているが、その生体内機能の詳細については未だ不明である。近年我々は、損傷皮膚から血中放出される high mobility group box1 (HMGB1) が骨髄内 MSC を血中動員すること、血中 MSC は種々のケモカインにより損傷/炎症部皮膚に集積し、炎症抑制・再生導機能を発揮していることを明らかにしつつある。本研究は、末梢循環性間葉系幹細胞による炎症抑制機能を利用した新しい皮膚疾患治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

末梢循環性 MSC の皮膚炎制御法として、アレルギー性接触皮膚炎モデルマウスを利用した。具体的には、2% oxazolone 溶液をマウス腹部に 4 日間塗布し、5 日目に同マウス

耳に 1% oxazolone 溶液を塗布することによりアレルギー性接触性皮膚炎を惹起した。その 24 時間後に、組み換え HMGB1 蛋白 10 μ g または生理食塩水 (PBS) を血中投与し、骨髄 MSC の皮膚炎部位への集積程度、抗炎症効果、炎症性サイトカイン発現程度を評価した。

さらに、HMGB1 による皮膚炎抑制作用における骨髄 MSC の寄与を確認する目的で、骨髄内の MSC を減少させるモデルマウスを作製した。具体的には、FACS ソーターを用いてマウス骨髄から MSC マーカーである血小板増殖因子受容体 陽性細胞を可能な限り除き、造血幹細胞マーカーである c-kit 陽性細胞を集めた骨髄細胞集団を、致死量放射線照射後マウスに移植することにより、骨髄内 MSC 減少マウス (c-kit BMT マウス) を作製した。この c-kit BMT マウスに HMGB1 を投与し、皮膚炎抑制効果を全骨髄移植マウス (total BMT マウス) に HMGB1 投与した場合と比較検討した。

4 . 研究成果

HMGB1 投与群は、PBS 投与群と比較して有意にアレルギー性接触性皮膚炎を抑制することが明らかとなった。その機序として、HMGB1 投与群では PBS 投与群と比較して骨髄由来 MSC の著明な集積が誘導され、その結果として炎症部皮膚での TNF- α 、IL-1 β の発現が抑制され、耳介浮腫の軽減が認められた。

さらに、炎症部位への MSC 集積は炎症部皮膚の放出するケモカイン SDF-1 α と、末梢循環 MSC 表面に発現する SDF-1 α 受容体 CXCR4 の相互作用によること、さらに MSC 表面の CXCR4 発現は HMGB1 により増強することが明らかとなった。

以上の結果から、HMGB1 投与による炎症抑制、再生誘導効果は、骨髄からの MSC 血中動員効果に加えて、SDF-1 α /CXCR4 系の強化による炎症部位特異的集積増強効果が重要な作用機序であることが明らかとなった。

一方、c-kit BMT マウスは total BMT マウスと比較して HMGB1 投与による抗炎症作用が有意に減弱することが明らかとなり、HMGB1

投与による抗炎症作用は骨髄 MSC の皮膚炎部位への集積が主たる作用機序であることが確認された。

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 2 件)

Linuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R, Kikuchi Y, Chino T, Kikuta J, McGrath J, Ishii M, Iizuka H, Kaneda Y. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. *J Immunol*, 2015; 194: 000-000.

doi:10.4049/jimmunol.1400914

Fujita R, Tamai K, Aikawa E, Kikuchi Y, Kaneda Y. Endogenous mesenchymal stromal cells in bone marrow are required to preserve muscle function in mdx mice. *Stem Cells*, 2015; 33: 962-975.

[学会発表](計 4 件)

Katsuto Tamai、Update on EB Clinical Traial:(Mini-Symposium)on Epidermolysis Bullosa, International EB meeting (招待講演) 2014 年 5 月 7 日、Albuquerque, USA

玉井克人、表皮水疱症の患者さんから学んだ皮膚とこころの再生メカニズム: 皮膚は地球を救う、日本創傷・オストミー・失禁管理学会 (招待講演) 2014 年 5 月 16 日、大宮

玉井克人、表皮水疱症 update: 基礎と臨床、教育講演 1: 皮膚難病への挑戦 ~ 厚労省皮膚難病研究班からの報告を含めて、第 113 回日本皮膚科学会総会・学術大会 (招待講演) 2014 年 5 月 30 日、京都

玉井克人、骨髄間葉系幹細胞を利用した表皮水疱症治療、第 14 回日本再生医療学会総会 (招待講演) 2015 年 3 月 21 日、

横浜

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

玉井 克人 (TAMAI, Katsuto)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座

教授

研究者番号：20236730