

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09739

研究課題名(和文) 末梢血白血球で発現する VII型コラーゲンの意義はなにか？

研究課題名(英文) COL7A1 expression in the peripheral blood mononuclear cells

研究代表者

中野 創 (NAKANO, Hajime)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90281922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：VII型コラーゲンを発現する末梢血中の細胞を特定するために末梢血単核細胞を培養したところ、紡錘形の細胞が接着して増殖していた。これらの細胞から得た核酸を用いてRT-PCRを行ったところ、VII型コラーゲンの発現とともにCD45の発現がわずかにみられ、CD105は強い発現がみられた。免疫染色を行い蛍光顕微鏡で観察したところ、紡錘形の細胞では VII型コラーゲンとCD105の発現が同時にみられた。これらの細胞はCD29+、CD45-、CD34-であり、ヒト間葉系幹細胞の発現パターンと同一であった。従って、末梢血単核細胞中には間葉系幹細胞が存在し、培養系で生着し、VII型コラーゲンを発現していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We performed the isolation of COL7A1-expressing cells in the peripheral blood mononuclear cells. Culture of the peripheral blood mononuclear cells revealed that proliferation of the fusiform cells attached to the culture dish was observed. RT-PCR using total RNA extracted from the fusiform cells demonstrated that these cells expressed not only moderate COL7A1 expression but also weak CD45 and strong CD105 expressions. Immunofluorescence examinations showed that the fusiform cells were COL7A1+, CD29+, CD45-, CD34-, the same expression pattern as the mesenchymal stem cells. These findings strongly suggest that the mesenchymal stem cells circulate in the peripheral blood, which can be cultured as fusiform cells expressing COL7A1.

研究分野：皮膚科学

キーワード：末梢血単核細胞 VII型コラーゲン 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

栄養障害型先天性表皮水疱症 (DEB) は表皮と真皮の結合に必要な型コラーゲン (COL7A1) をコードする COL7A1 の先天的な異常によって生じる遺伝性疾患であり、軽微な外力で容易に水疱やびらんを生じる疾患である¹⁾。診断は主に末梢血由来白血球から抽出したゲノム DNA を用いた遺伝子診断で決定されるが、スプライシング異常が推定される変異が同定された場合は²⁾、COL7A1 メッセンジャー RNA の一次構造を調べるために、さらに侵襲的な観血的皮膚採取を行う必要があった。以前の研究で我々および他施設の研究からは末梢血単核細胞 (PBMC) が COL7A1 を発現していることを明らかにしている³⁾。従って、PBMC を用いれば皮膚採取を行う必要が無いが、どの細胞が COL7A1 を発現しているのかは、これまで不明であった。

2. 研究の目的

今回の研究では、末梢血単核球 (PBMC) 中のいかなる細胞が COL7A1 を発現しているのかを明らかにし、そのような細胞が末梢血にどの程度の細胞数で存在するのか、また、培養することが可能であるのかを調べることを目的としている。これまでの研究結果⁴⁾から、末梢血中に存在するとされる間葉系幹細胞 (MSC) がひとつの有力な候補と考えられるため、MSC の分離に的を絞って実験を行った。临床上の有用性から単純型表皮水疱症 (EBS) および接合部型表皮水疱症 (JEB) の原因遺伝子の発現も併せて検討した。

3. 研究の方法

比重勾配法でヒト末梢血より単核球を分離し、抗 CD45 抗体、抗 CD105 抗体を用いて FACS を行った。また、末梢血より抗体カクテルを用いて MSC 以外の細胞を可及的に除去し、得られた細胞 (MSCrich) を MSC 専用培地で培養した。ディッシュ底面に付着した細胞か

ら全 RNA を抽出し、RT-PCR で COL7A1, CD45, CD105 メッセンジャー RNA の発現を調べた。また、抗 COL7A1, CD29, CD34, CD45, CD105 抗体を用いてスライドカルチャーで培養した MSCrich の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。PBMC における EBS および JEB の原因遺伝子 (KRT5, KRT14, ITGA6, ITGB4, PLEC, LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL17A1) の発現の有無を RT-PCR で調べた。

4. 研究成果

FACS を用いて MSC と考えられる CD45-/CD105+細胞が PBSC 中に存在するかどうかを調べたが、同定されなかった。MSC は PBMC 中に存在しないか、あっても極めてわずかな可能性が示唆された。次に、PBMC を培養し、MSC が分離培養できるかどうかを検討した。プラスチックディッシュに MSCrich を直接培養したところ、紡錘形の細胞が接着して増殖していることが確認された (図 1)。

抗体カクテルを用いて MSC増殖培地で培養 11日目

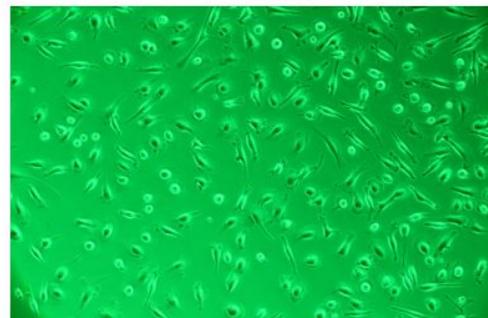


図 1. MSCrich から培養された紡錘形細胞

これらの細胞から得られた核酸を用いて RT-PCR を行ったところ、COL7A1 メッセンジャー RNA の中等度の発現がみられると同時に CD45 の発現がわずかにみられ、CD105 は強い発現がみられた。培養で得られた細胞は MSC の性質を有するものが大多数を占めると考えられるが、白血球系の細胞が除去されていない可能性が高い。さらに、MSCrich をスラ

イドカルチャーで培養し、免疫染色を行い蛍光顕微鏡で観察したところ、紡錘形の細胞では COL7A1 の発現と同時に CD105 の発現がみ

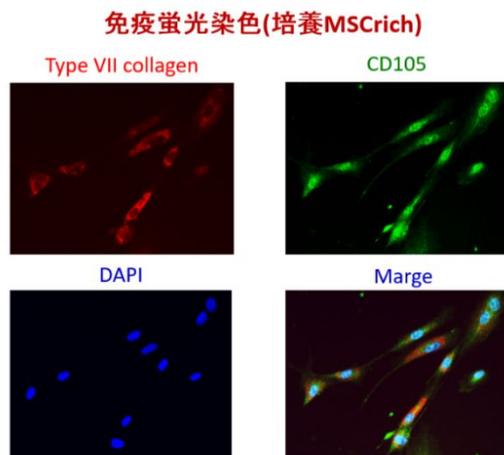
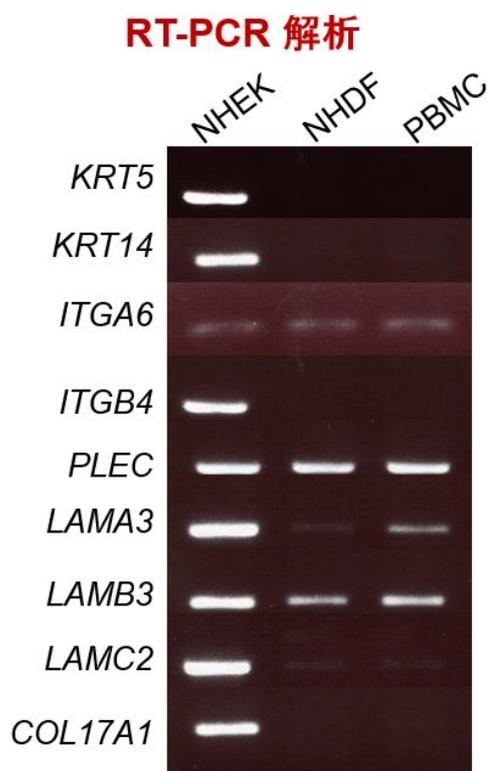


図 2 . COL7A1 と CD105 の共染色

られた (図 2) .

これら紡錘形の細胞は CD29+ , CD45- , CD34- であり、ヒト MSC の発現パターンと同一であった . 以上の結果から、PBMC 中には MSC が存在し、培養系で生着し、COL7A1 を発現していることが示された .

これらの結果は、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子診断において、皮膚組織が必要な場合でも、より侵襲が少ない PBMC を用いて、メッセンジャーRNA の解析を行うことができるこ



NHEK: normal human epidermal keratinocytes
 NHDF: normal human dermal fibroblasts
 PBMC: peripheral blood mononuclear cells

とを示している . さらに、PBMC は EBS および JEB の原因遺伝子のうち、*ITGA6*, *PLEC*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* のメッセンジャーRNA を発現していることが RT-PCR で明らかになった (図 3) . このことは、JEB の一部の症例においても PBMC 由来 RNA を用いて、遺伝子変異がメッセンジャーRNA の構造に及ぼす影響を調べることが可能であることを示している . PBMC 中の MSC の役割は未だ不明であるが、骨髄由来 MSC が DEB の臨床症状改善に寄与していることから⁵⁾⁶⁾、末梢血中の MSC も同様の機能を有していると考え、今後の研究課題としたい .

<引用文献>

- 1) Kern JS, Kohlhasse J, Bruckner-Tuderman L, Has C. Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 2006;126:1006-12.
- 2) Masunaga T, Saito M, Sasaki T, Kubo A, Amagai M, Ishiko A. Japanese recurrent mutation c.6216+5G>T in COL7A1 leads to a mild phenotype of dystrophic epidermolysis bullosa. J. Dermatol. Sci. 2015;80:220-3.
- 3) Jiang W, Sun T-T, Lei P-C, Zhu X-J. Genotype-Phenotype Correlation in Chinese Patients with Dystrophic Epidermolysis Bullosa Pruriginosa. Acta Derm. Venereol. 2011;92:50-3.
- 4) Wu G, Pan M, Wang X, Wen J, Cao S, Li Z, et al. Osteogenesis of peripheral blood mesenchymal stem cells in self assembling peptide nanofiber for healing critical size calvarial bony defect. Sci. Rep. 2015; 5:16681.
- 5) Chino T, Tamai K, Yamazaki T, Otsuru S, Kikuchi Y, Nimura K, et al. Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology; 2008; 173:803-14.
- 6) Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R, Kikuchi Y, Chino T, et al.

Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. J. Immunol. 2015; 194:1996-2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) Akasaka E, Nakano H, Takagi Y, Toyomaki Y, Sawamura D: Multiple Milia as an Isolated Skin Manifestation of Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Evidence of Phenotypic Variability. *Pediatr Dermatol*. 査読有, 2017; 34(2):e106-e108. Doi: 10.1111/pde.13047.
- 2) Hattori M, Shimizu A, Oikawa D, Kamei K, Kaira K, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Sawamura D, Tokunaga F, Ishikawa O: Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of pretibial dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 査読有, 2017; 177(4):e92-e93. Doi: 10.1111/bjd.15342.
- 3) 赤坂英二郎, 滝吉典子, 中野 創, 澤村大輔: 優性栄養障害型表皮水疱症(痒疹型) VS 結節性痒疹. *Visual Dermatol*, 査読有, 2016; 15(7): 715-717.
- 4) Takahashi T, Mizutani Y, Ito M, Nakano H, Sawamura D, Seishima M: Dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa successfully treated with immunosuppressants. *J Dermatol*. 査読有, 2016; 43(11): 1391-1392. Doi: 10.1111/1346-8138.13406.
- 5) 新井 円, 高山かおる, 中野 創: 足趾の爪病変で診断し, 足底板使用にて管理良好な栄養障害型表皮水疱症. *皮膚科の臨床*, 査読有, 2016年

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 赤坂英二郎, 中野 創, 神田由紀, 鷹木

由里子, 豊巻由香, 澤村大輔: 末梢血間葉系幹細胞における型コラーゲン発現について. 第24回分子皮膚科学フォーラム, 2017年

- 2) 中野 創: 遺伝性皮膚疾患の遺伝子診断. 函館皮膚科医学会学術講演, 2017年
- 3) Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Mutational analysis of dystrophic epidermolysis bullosa. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016年
- 4) 赤坂英二郎, 中野 創, 神田由紀, 鷹木由里子, 豊巻由香, 澤村大輔: 「栄養障害型表皮水疱症における末梢血単核球から分離した mRNA を用いた COL7A1 変異検索. 第23回分子皮膚科学フォーラム, 2016年
- 5) 赤坂英二郎, 中野 創, 神田由起, 鷹木由里子, 豊巻由香, 澤村大輔: 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子診断における末梢血単核球の型コラーゲン発現についての検討. 第38回水疱症研究会, 2016年
- 6) 赤坂英二郎, 中野 創, 神田由起, 鷹木由里子, 豊巻由香, 澤村大輔: 末梢血単核球由来 mRNA を用いた COL7A1 変異検索の有用性について. 日本皮膚科学会青森地方会第376回例会, 2016年
- 7) 赤坂英二郎, 中野 創, 鷹木由里子, 豊巻由香, 澤村大輔: 優性栄養障害型表皮水疱症の遺伝カウンセリング~G2251E変異について~. 第39回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2015年
- 8) 伊藤 満, 安達裕子, 水谷陽子, 周 円, 加納宏行, 中野 創, 清島真理子: シクロスポリンが奏功した優性栄養障害型表皮水疱症痒疹型の2例. 第114回日本皮膚科学会総会, 2015年
- 9) 服部麻衣, 清水 晶, 加藤円香, 天野博雄, 山本明美, 中野 創, 澤村大輔, 亀井希代子, 徳永文稔, 石川 治: 型コ

ラーゲン沈着が見られた優性栄養障害型
表皮水疱症（前脛骨型）の1例.第22回
分子皮膚科学フォーラム，2015年

〔図書〕(計1件)

- 1) 中野 創：皮膚科研修ノート．佐藤伸一
ら編．診断と治療社．p388-389，2016年

6．研究組織

(1)研究代表者

中野 創 (NAKANO, Hajime)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：9 0 2 8 1 9 2 2

(2)研究分担者

赤坂 英二郎 (AKASAKA, Eijiro)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：3 0 4 3 6 0 3 4

六戸 大樹 (ROKUNOHE, Daiki)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：5 0 4 3 6 0 3 6

澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号：6 0 1 9 6 3 3 4