

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10176

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた再生医療による難治性皮膚疾患の治療法開発

研究課題名(英文) Development of treatments of intractable skin disease by regenerative medicine using adipose-derived stem cells

研究代表者

長谷川 敏男 (HASEGAWA, Toshio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20317019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞を、表皮基底膜構成成分であるIV型コラーゲン上で真皮由来線維芽細胞と共培養し、オールトランスレチノイン酸と骨形成因子4で刺激した後に表皮角化細胞用培地で単独培養した。その結果、各種の表皮角化細胞マーカーの発現が上昇し、中でもケラチン10の発現率で評価すると約45%の細胞が表皮角化細胞様細胞に分化誘導されたことを確認した。また、これらの細胞のうち約80%が、表皮・真皮結合部の係留線維を構成するVII型コラーゲンを発現していた。一方、未分化な脂肪組織由来幹細胞はケラチン10とVII型コラーゲンを発現していなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織由来幹細胞は、細胞作成時に遺伝子操作が不要であることから安全性が高く、抗原性が低く採取が比較的容易であることから、安全性の担保された健常人由来の同種脂肪組織由来幹細胞の臨床応用が期待される。一方、栄養障害型表皮水疱症とは、先天的な遺伝子異常によってVII型コラーゲンが減少または欠損し、表皮・真皮結合部の係留線維に異常を来すことで、全身の表皮が容易にむけて難治な皮膚潰瘍を生じる極めて重症な疾患である。本研究成果は、特定の処理を施した脂肪組織由来幹細胞を、栄養障害型表皮水疱症の治療に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) were cultured in keratinocyte serum-free medium after co-culturing with fibroblasts on type IV collagen in a medium containing all-trans retinoid acid and bone morphogenetic protein 4. As a result, approximately 45% of ADSCs were immunostained positively for anti-human cytokeratin 10, and approximately 80% were stained positively for type VII collagen, which is a major component of the anchoring fibrils at the dermoepidermal junction, although undifferentiated ADSCs showed no cytokeratin 10 and type VII collagen immunostaining.

研究分野：皮膚科学

キーワード：創傷治癒 再生医学 表皮水疱症 脂肪組織由来幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 人体の組織、臓器は組織幹細胞の制御によって、新陳代謝や恒常性維持がなされている。幹細胞は多分化能と自己複製能を有するため、人体の損傷部位に直接幹細胞を投与する方法や、生体外で細胞操作によって作成した臓器・器官を損傷部位と置換する方法など、幹細胞を用いた再生医療の研究が行われている。幹細胞は胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、成体幹細胞に大別され、成体幹細胞には骨髄幹細胞、間葉系幹細胞などが含まれる。

ほぼ全ての間葉系組織に存在する間葉系幹細胞は、その利用に倫理的な問題が少なく、細胞作成時に遺伝子操作は不要であり、臨床応用時の安全性が高い。免疫抑制作用を持つこと、抗原性が低いことなども明らかになっている。中でも、脂肪細胞のほか骨芽細胞、筋細胞、軟骨細胞など間葉系細胞への分化能を有する皮下脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ADSCs)は、他の間葉系幹細胞と比べて採取が比較的容易であり、多量の採取が可能である。そこで、安全性が担保された第三者の脂肪組織が臨床応用できれば、自家細胞だけでなく、同種(他家)細胞を用いた再生医療の実現が期待される。

(2) 栄養障害型表皮水疱症は、先天的な遺伝子異常によるVII型コラーゲンの減少または欠損が原因で、表皮・真皮結合部の係留線維に異常を来すことで、全身の皮膚が容易にむけて、しばしば難治性潰瘍となる疾患である。重症例では、全身の皮膚に多発するびらん・潰瘍からの体液・タンパク漏出による低栄養や低身長、手指・足趾の潰瘍の癒着による手足の棍棒状変形、全身に皮膚潰瘍を繰り返すことによって生じる有棘細胞癌、粘膜侵襲による食道・気道狭窄、全身皮膚の慢性的な炎症に伴うアミロイドーシスによる慢性腎不全など、深刻な問題を生じる。治療としては、繰り返し生じるびらん・皮膚潰瘍に対する外用処置を中心に、皮膚悪性腫瘍の切除、手指・足趾癒着の管理(引用文献)、慢性腎不全の管理(参考文献)などの全身管理を行うが、根本的治療は無い。

本疾患の患者では、その皮膚の脆弱性から全層・分層採皮が困難なために、植皮術が不可能であることが多く、全身各所に生じた難治性皮膚潰瘍に対して培養皮膚移植を試みるなど、再生医療を応用した様々な研究報告がなされており、われわれ自身もそれらに従事してきた(参考文献)。しかし、自家培養皮膚は構成細胞がVII型コラーゲンの減少または欠損を有することから、移植しても容易に水疱化する一方で、同種培養皮膚は一時的な創傷被覆剤となり得るが、他家由来であるため永久生着は期待できない。

(3) われわれは近年、ADSCsが上皮系細胞である表皮角化細胞への分化能を有するという事実を実験的に見出した(参考文献)。この事実より、VII型コラーゲン異常の無い同種ADSCsを栄養障害型表皮水疱症に伴う難治性皮膚潰瘍の治療に応用し、上皮化を促進できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

ADSCsから表皮角化細胞への効率の高い分化誘導法を実現し、これらの細胞がVII型コラーゲンを発現していることを明らかにして、VII型コラーゲン遺伝子異常の無い同種ADSCsを表皮角化細胞に分化誘導して移植する、栄養障害型表皮水疱症患者の新しい皮膚潰瘍治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 予め説明によって同意を得た、感染症を有さない患者の全層植皮術において、本来は廃棄すべき採皮部の余剰皮下脂肪組織を採取して、酵素処理後に遠心分離することで、細胞を抽出して培養した。フローサイトメトリーによる発現マーカーの解析と、脂肪細胞に分化誘導されることで、本細胞がADSCsであることを確認した。

IV型コラーゲンをコーティングした膜上にADSCsを播種し、2層構造の培養皿で、細胞同士が混和しない様に皮膚線維芽細胞と共培養した。その後、培地にオールトランスレチノイン酸、骨形成因子4を添加して刺激後、さらにADSCsだけを取り出して表皮角化細胞用培地で単独培養することで、ADSCsを分化誘導した。

(2) 分化誘導した細胞を、フローサイトメトリー、リアルタイムPCR、ウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色などの手法を用いて、表皮角化細胞であることを示す各種マーカーを発現しているかどうかを確認した。特に、蛍光免疫染色によってケラチン10を染色し、顕微鏡の視野中の細胞(核)数のうちケラチン10を発現している細胞数の割合を機械的に計測することで、表皮角化細胞様細胞への分化誘導率を評価した。

(3) 同様に、フローサイトメトリー、リアルタイムPCR、ウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色などの手法を用いて、分化誘導した細胞がVII型コラーゲンを発現しているかどうかを確認した。また、蛍光免疫染色によってVII型コラーゲンを染色し、顕微鏡の視野中の細胞(核)数のうちVII型コラーゲンを発現している細胞数の割合を機械的に計測することで、VII型コラーゲンの発現率を評価した。

(4) 免疫抑制マウス背部に径 20mm 大の皮膚全層欠損創を作成し、その周囲に未分化な ADSCs、または表皮角化細胞様細胞に分化誘導した ADSCs を局所注射によって投与して、投与後の創面積を継時的に測定し、非投与群と比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 未分化な ADSCs は、表皮角化細胞であることを示すマーカーであるケラチン 14、p63、デスモグレイン 3 を発現していた。一方、脂肪細胞に分化誘導した ADSCs では、これら全ての発現が低下することを、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色を用いて確認した。これらの結果より、脂肪組織由来幹細胞が表皮角化細胞の前駆細胞である可能性が高いことを示した。

(2) IV 型コラーゲン上で線維芽細胞と共培養し、オールトランスレチノイン酸と骨形成因子 4 にて刺激後に、表皮角化細胞用培地で単独培養することで分化誘導した ADSCs は、線維芽細胞に類似した紡錘形から、表皮角化細胞に近い多角形から敷石状の形態へと変化した。また、これらの細胞では、デスモグレイン 3、ケラチン 5 などの発現が上昇することを、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色を用いて確認した。この結果より、ADSCs は表皮角化細胞様細胞に分化誘導されたことを確認した。

(3) 上記の方法で ADSCs を表皮角化細胞様細胞へと分化誘導する過程で、線維芽細胞との共培養後に単独培養する期間を様々な長さとして、分化誘導を試行した。その後、ケラチン 10 の発現率を用いることで、ADSCs から表皮角化細胞様細胞への分化誘導率を評価した。その結果、未分化な ADSCs はケラチン 10 をほとんど発現していない一方で、14 日間単独培養した ADSCs のうち約 45%がケラチン 10 を発現していた。すなわち、本法で表皮角化細胞様細胞へと分化誘導した ADSCs の、表皮角化細胞様細胞への分化誘導率は約 45%であった。

(4) 本法で表皮角化細胞様細胞に分化誘導された ADSCs は、VII 型コラーゲンの発現が著明に上昇することを、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティングを用いて確認した。また、蛍光免疫染色を用いて VII 型コラーゲンの発現率を評価したところ、未分化な ADSCs では VII 型コラーゲンをほとんど発現していない一方で、表皮角化細胞様細胞に分化誘導された ADSCs のうち約 80%が VII 型コラーゲンを発現していた。

(5) 免疫抑制マウス背部に作成した皮膚欠損創の面積は、細胞非投与群と比べて未分化 ADSCs 投与群の方が速く縮小し、表皮角化細胞様細胞へと分化誘導した ADSCs を投与した群では、さらに速く縮小した。投与 7 日後の残存皮膚潰瘍面積を測定して比較したところ、いずれの群間でも有意差を認めた。

(6) 以上より、IV 型コラーゲン上で線維芽細胞と共培養し、オールトランスレチノイン酸と骨形成因子 4 で刺激して、さらに表皮角化細胞用培地で 14 日間単独培養した ADSCs は、約 80%が VII 型コラーゲンを発現し、約 45%が表皮角化細胞様細胞に分化誘導された。また、これらの細胞は、未分化な ADSCs が有する創傷治癒促進作用よりも、さらに高い創傷治癒促進作用を有することが明らかになった。

本細胞を栄養障害型表皮水疱症患者に生じた難治性皮膚潰瘍部に局所投与することで、創傷治癒が促進し、表皮と係留線維を形成する可能性が示された。また、栄養障害型表皮水疱症のみならず、難治性皮膚潰瘍全般に対する有効性も示された。

#### < 引用文献 >

- Hasegawa T, Ikeda S. Surgical management with CO2 laser for pseudosyndactyly in recessive epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 41: 767-8, 2014
- Iida H, Hasegawa T, Okuma K, Io H, Tomino Y, Ikeda S. Successfully maintained hemodialysis for the treatment of chronic renal failure in a patient with Hallopeau-Siemens type recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 39: 1088-9, 2012
- Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Ikeda S, Ogawa H, Kubo K, Matsui H, Kagawa S, Kuroyanagi Y. Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for the treatment of intractable skin ulcers in 3 patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 50: 803-804, 2004
- Hasegawa T, Mizoguchi M, Haruna K, Mizuno Y, Muramatsu S, Suga Y, Ogawa H, Ikeda S. Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: Report of three cases. *J Dermatol* 34: 328-332, 2007
- Hasegawa T, Sakamoto A, Wada A, Fukai T, Ikeda S. Keratinocyte progeny cells reside in human subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* 10:e0118402, 2015

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Maeda Y, Hasegawa T, Wada A, Fukai T, Iida H, Sakamoto A, Ikeda S. Adipose-derived stem cells express higher levels of type VII collagen under specific culture conditions. J Arch Dermatol Res 309: 843-9, 2017

Hasegawa T. Adipose-derived stromal/stem cells for the treatment of skin diseases. Juntendo Medical Journal 63: 98-103, 2017

Hasegawa T, Ikeda S. Mesenchymal stem cells for the treatment of skin diseases. AIMS Cell and Tissue Engineering 1: 104-117, 2017

〔学会発表〕(計5件)

前田 佑一郎, 長谷川敏男, 和田章乃, 池田志孝. Differentiation potential of adipose-derived stem cells into keratinocytes. 第30回表皮細胞研究会, 2016, 弘前

前田 佑一郎, 長谷川敏男, 和田章乃, 深井達夫, 坂本淳, 池田志孝. Differentiation potential of adipose-derived stromal/stem cells into keratinocytes. 日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会, 2016, 仙台

Maeda Y, Hasegawa T, Wada A, Sakamoto A, Fukai T, Ikeda S. Approximately 45% of adipose-derived stem cells can differentiate into keratinocytes and express higher type VII collagen under the specific culture conditions. The Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting, 2017, Portland OR

金宗訓, 長谷川敏男, 前田佑一郎, 和田章乃, 飯田秀雄, 小川秀興, 池田志孝. 脂肪組織由来幹細胞を用いた皮膚再生医療の可能性. 第31回表皮細胞研究会, 2017, 名古屋

Kim J, Hasegawa T, Maeda Y, Wada A, Ikeda S. The potential of adipose-derived stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. International Investigative Dermatology 2018, 2018, Orland, FL

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 栄養障害型表皮水疱症治療剤

発明者: 池田志孝、長谷川敏男

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2018-029385

出願年: 平成 30 年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 和田 章乃

ローマ字氏名: WADA, Akino

研究協力者氏名: 前田 佑一郎

ローマ字氏名: MAEDA, Yuichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。