

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23659539

研究課題名（和文） ヒト化蛋白表皮水疱症モデルマウスに対する幹細胞療法の開発

研究課題名（英文）

Development of stem cell therapy for epidermolysis bullosa model mice expressing humanized dermo-epidermal junctional protein

研究代表者

清水 宏（SHIMIZU HIROSHI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00146672

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は栄養障害型表皮水疱症に対する根本的治療法として、骨髄由来細胞および幹細胞移植療法の臨床治療の有用性を、ヒト化蛋白モデルマウスを用いて検討するものである。VII型コラーゲンヒト化マウスに GFP+Tg マウスの骨髄細胞を経静脈移植した。創傷治癒部の皮膚を検討したところ、GFP 陽性表皮角化細胞は約 0.2% で確認された。マウス COL7 mRNA およびマウス COL7 蛋白の発現を検討したところ、発現が一部確認されたがわずかであった。そこで、骨髄細胞の皮膚への遊走・分化を促進させると考えられている HMGB1 や CCL27、CCL19 を併用した移植実験系を施行・解析中である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the project is to investigate the effect of stem cell therapy for congenital severe skin disorder, recessive dystrophic epidermolysis bullosa (EB), using protein-humanized EB model mice. We performed bone marrow transplantation from GFP Tg mice to EB model mice lacking murine type VII collagen (COL7) and expressing incomplete/complete human COL7. Epithelized skin areas showed GFP+ bone marrow-derived keratinocytes as many as 0.2%. Murine COL7 mRNA and COL7 protein were also expressed in some mice, but the expression levels were low. We are now performing and analyzing another bone marrow transplantation model using HMGB1, CCL27 and CCL19, which are known to enhance transdifferentiation and recruitment from bone marrow cells to skin component cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学、表皮水疱症

### 1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は、皮膚の中でも真皮-表皮境界部を構成する種々の蛋白の先天性欠損ないし構造異常により同部位の脆弱性を生じ、機械的刺激等によって容易に水疱・びらんおよび

潰瘍を形成する疾患である（図 1）。特に接合部型と劣性栄養障害型（RDEB）では生命予後が悪く、生後数年でほぼ全例死亡する病型も存在する。

RDEB のモデルマウスである COL7 欠損マ



図1 表皮水疱症の臨床症状

ウスは表現系が非常に重症であり、生後数日以内にほぼ全例が死亡する。そこで申請者は、分子生物学的アプローチによって蛋白欠損マウスをヒト化して救済する新規手技 (Nishie W, Shimizu H et al., Nat Med 2007) を応用し、COL7 欠損マウスに不完全なヒト COL7 を発現させた新規マウスを作成した。本マウス (以下 hCOL7-RDEB マウスと記す) は大部分が成体まで成長するという特徴を有し、ヒトにおける RDEB の臨床型に非常に類似した症状を呈する。RDEB に対する新規治療法の開発について申請者らは 17 型コラーゲン欠損マウス (接合部型先天性表皮水疱症) モデルにおいて幹細胞移植療法の有効性を見いだしている (Fujita Y, Shimizu H et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010)。本実験を試行するにあたる技術的問題および評価方法等はすべて克服・確立されている。申請者らが報告した hCOL7-RDEB マウスはヒト RDEB に非常に類似した臨床経過をたどり、成体における治療効果判定も可能な点で非常に有用である。さらに現時点で既に申請者らは、RDEB マウスに対する幹細胞移植を数匹に対して行い、COL7 の発現を確認している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、もっとも頻度の高い表皮水疱症である、栄養障害型表皮水疱症に対する根本的治療法として、骨髄由来細胞および幹細胞移植療法の臨床治療の有用性を、ヒト

化蛋白モデルマウスを用いて検討するものである。骨髄および末梢血中に含まれる幹細胞の‘分化’ transdifferentiation を解析することで、有効な治療法の確立していない先天性難治皮膚疾患に対する治療法の確立に寄与する。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄移植による COL7 発現の検討  
COL7 完全ヒト化マウスおよび COL7 不完全ヒト化マウス (hCOL7-RDEB マウス) に骨髄移植を施行し、生着後皮膚における COL7 発現の有無および程度について検討する。

(2) 骨髄移植後のドナー由来皮膚分化細胞の検討  
骨髄移植施行後のマウス皮膚中に存在する、ドナー由来の皮膚構成細胞の有無および頻度、COL7 産生能につき検討する。

(3) 骨髄中の責任細胞の同定  
効率的に COL7 産生細胞への分化をきたす骨髄中幹細胞の同定を試みる。

## 4. 研究成果

レシピエントとなる不完全 VII 型コラーゲンヒト化マウス (hCOL7-RDEB マウス、表皮水疱症モデルマウス) および COL7 完全ヒト化マウス (K14 プロモーターおよび CMV-Tg マウス) を繁殖し、放射線照射の上で GFP+Tg マウスの骨髄細胞を経静脈移植

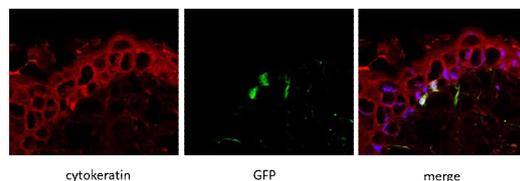


図2 COL7 完全ヒト化マウスに骨髄移植を行った。上皮化創傷部皮膚の約 0.2% で GFP 陽性かつケラチン陽性細胞 (骨髄由来角化細胞) が確認された。

した。生着を末梢血フローサイトメトリーで確認した上で、創傷治癒部の皮膚を検討したところ、わずかに GFP 陽性細胞が真皮に確認された。GFP 陽性表皮角化細胞は約 0.1% で確認された (図 2)。

定性 RT-PCR および real-time RT-PCR にてマウス COL7 mRNA の発現を検討したところ、発現が一部確認された (図 3) が、negative control と統計学的有意差を認めなかった。

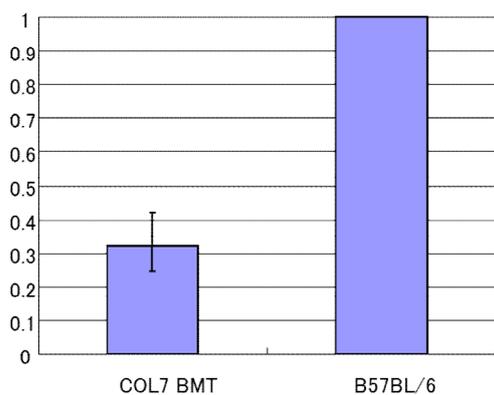


図 3 移植後のマウス COL7 mRNA 発現 (real-time PCR)。正常 B57BL/6 マウスと比較して約 30% の mCOL7 mRNA 発現がみられた。

免疫染色では 8 匹中 1 匹において、ごくわずかにマウス COL7 が基底膜部に発現しているのを確認した (図 4)。微細構造観察にて移植後皮膚において、係留線維 (COL7) の増強と捉えられる所見が観察された。以上より、通常の移植手技においては COL17 とは異なり、COL7 発現は低レベルに留まるであろうことが推測された。

そこで、COL7 完全ヒト化マウスを用いて、経静脈投与よりも生着率が高いとされる、経骨髄投与を行った。放射線照射後のマウスに  $5 \times 10^6$  個の GFP+Tg マウス骨髄細胞を、膝から脛骨髄腔に直接投与したところ、末梢血中の GFP+細胞キメリズムが早期より立ち上がり、良好な生着を認めた。しかしながら、

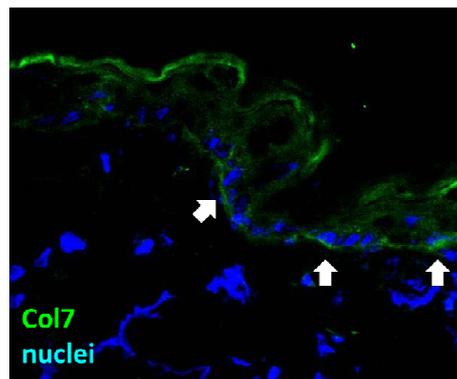


図 4 骨髄移植後に創傷を作成し、上皮化した皮膚を免疫染色したところ、マウス COL7 が基底膜部に線状に沈着していた (矢印)。

創傷治癒部における GFP+細胞の存在率や免疫染色・RT-PCR 解析では、従来の経静脈投与による移植実験で得られた結果と有意差を認めなかった。

骨髄細胞から皮膚への recruit を促進する因子として、CCL27, CCL19 を我々は報告しており (Inokuma D et al., Stem Cells 2006; Sasaki M et al., J Immunol 2008)、一方で、炎症関連因子の HMGB1 が骨髄中の間葉系細胞の皮膚への recruit に関連するという報告も存在する (Tamai K et al., PNAS 2011)。現在、骨髄移植後にこれらの因子を局所塗布・局所注射ないし全身投与した場合の創傷治癒の変化および骨髄由来角化細胞の変化を検討中である。現時点では、HMGB1 の全身投与群において創傷の治癒がコントロールと比較して促進している印象が得られているが、統計学的解析を行っているところである。

### (3) 骨髄中の責任細胞の同定

骨髄中に主に存在する幹細胞として、造血幹細胞と間葉系間質 (幹) 細胞が広く知られている。間葉系間質 (幹) 細胞は骨髄のほか、皮下脂肪組織など種々の臓器に存在していることが知られており、より低侵襲の細胞療

法を施行するにあたっては有力な候補の一つである。そこで我々は、骨髄細胞中に存在する造血幹細胞・間葉系間質細胞のそれぞれを単離ないし培養し、COL7 完全ヒト化マウスに移植を行っている。現時点では間葉系間質細胞を投与したマウスにおいて主に解析中である。

## 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 1 件)

Fujita Y, Inokuma D, et al. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clinical and Experimental Dermatology*, 査読有, 印刷中、DOI : 10.1111/j.1365-2230.2011.04312.x.

[学会発表] (計 1 件)

Fujita Y, Abe R, Nishie W, Shimizu H. Exploring stem cell therapies for junctional epidermolysis bullosa model mice. The 22nd World Congress of Dermatology, 2011/05/26, Seoul, Korea.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 00146672

### (2) 研究分担者

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 60344511

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :