

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23689053

研究課題名（和文） 表皮水疱症に対する細胞療法の開発

研究課題名（英文） Development of cell therapy for epidermolysis bullosa

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

成体表皮水疱症マウス（COL17 欠損）に対して、以下の実験を行った。①経静脈投与移植群と比較して経骨髄移植群では同等以上の末梢血生着が確認され、欠損 COL17 の回復が確認された。②移植後マウス皮膚より、骨髄由来とそれ以外の表皮角化細胞を回収し、遺伝子発現の差違を検討したところ、2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。③名古屋大学皮膚科および小児科と共同し、重症表皮水疱症患者に対する造血幹細胞移植療法の臨床試験を倫理審査委員会に提出した。

研究成果の概要（英文）：

We performed stem cell transplantation including bone marrow transplantation and mesenchymal stem/stromal cell infusion into adult epidermolysis bullosa model mice (type XVII collagen (COL17) knockout mice). 1. Intramedullary infusion/transplantation induced better engraftment in the peripheral blood than conventional intravascular infusion, and the recovery of COL17 was also observed as well. 2. Donor-derived keratinocytes and recipient-derived keratinocytes were respectively collected by flowcytometer, and investigated mRNA expression differences by microarray technique. 57 genes were detected which have different mRNA expression between the two groups. 3. In corporation with Nagoya University, clinical trials of stem cell transplantation for severe epidermolysis bullosa patients are now applying, and it is under consideration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2012 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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：XVII 型コラーゲン、造血幹細胞移植、間葉系間質細胞、経骨髄移植

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的欠損ないし構造異常により、同部位の脆弱性を生じ、機械的刺激によって容易に水疱や潰瘍を形成する疾患である。現時点で対症療法以外に確立した治療法は存在せず、特に重症型では感染症や脱水、二次的な悪性腫瘍などを生じ、生後数年以内に死亡するも存在する。

表皮水疱症などの重症遺伝性皮膚疾患において近年研究されている治療法としては、遺伝子治療、蛋白補充療法および細胞療法がある。このうち細胞療法は、正常遺伝子を有する細胞を患者に投与して欠損蛋白の産生を促す治療法である。全身性の効果が期待できること、生着により長期間の治療効果が望めること、造血幹細胞移植など現代の医療レベルで施行可能な治療法があり倫理的障壁が低いこと、などの利点が考えられる。

重症遺伝性皮膚疾患の治療開発に於いては、疾患モデルマウスの利用が必須である。申請者らの研究室では近年、新規表皮水疱症モデルマウスとして、皮膚構成蛋白の 17 型コラーゲン(COL17)欠損マウスの作成に成功した。COL17 欠損マウスは従来の表皮水疱症モデルマウスと異なり、成体まで生存する特徴を有しており、各種治療実験のモデルとして有用である。そして我々は、COL17 欠損マウスにおいて実際に骨髄移植療法が予後改善および臨床症状の改善に寄与することを示した。

2. 研究の目的

本研究は、上記表皮水疱症モデルマウスを用いて、効率的な治療効果を得るために、幹細胞移植の時期および方法の最適化検討、皮膚分化因子を併用した造血幹細胞移植の施行可能性、および骨髄移植などと比較してさらに安全に施行しうる間葉系間質細胞療法などの有用性を検討する。本研究を遂行することにより、難治性疾患である表皮水疱症への新たな治療戦略を立てる上で重要な知見が得られるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) マウス

実験動物として、Col17 欠損マウス、ヒト COL17 トランスジェニックマウス、COL17 レスキューマウス、B6Ly5.2(CD45.1)マウス、GFP トランスジェニックマウス、NOG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic, 公

益財団法人実験動物中央研究所)マウスを用いた。COL17 レスキューマウスは、Col17 欠損マウスとヒト COL17 トランスジェニックマウスを交配して作製したものであり、マウス Col17 蛋白を完全欠損するがヒト COL17 が基底膜に発現しているため、水疱などの臨床症状が出現しない。すべての動物実験において北海道大学動物実験委員会の承認を得ている。

(2) 細胞

骨髄由来細胞は骨髄由来細胞はドナーの大腿骨および脛骨より採取し、レシピエント 1 匹当たり $5-10 \times 10^7$ cells を用いた。マウス造血幹細胞は、Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec) と AutoMACS を用いて分化血球細胞を磁気分離したのちに抗 Sca-1 抗体・抗 c-kit 抗体を作用させ、FACS Aria (Becton Dickinson) を用いて Lineage-Sca-1+c-kit+ (KSL 細胞) をソーティングして得た。マウス間葉系間質細胞 (MSCs) は、骨髄由来細胞を STK1 培地 (ツーセル) で初代培養した後、 $3 \mu\text{g/ml}$ の bFGF を添加した 10%FBS 加 DMEM 培地で維持培養し、継代数 3-5 の時点で MSCs として用いた。ヒト MSCs は、健常人ボランティアの骨髄液 3ml より DMEM-10 培地で培養し、継代数 3-5 の時点で MSCs として用いた。

(3) 細胞移植

骨髄移植及び造血幹細胞移植として、ドナーとなる成体 Col17 欠損マウスに 6Gy 放射線照射を行い骨髄機能を非破壊的処置した後、 5×10^6 個の GFP+トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞ないし 5×10^3 個の造血幹細胞を経尾静脈投与した。新生仔マウスに対しては 2.5Gy 放射線照射ののちに、 5×10^6 個の骨髄由来細胞ないし 5×10^3 個の造血幹細胞を眼窩静脈叢を経由して静脈投与した。MSC 療法として、成体 Col17 欠損マウス、COL17 レスキューマウスおよび Col17 欠損新生仔マウスの背部に、手動的な水疱形成ないし 4mm パンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作製した上で、GFP+トランスジェニックマウス由来の MSC 1×10^6 個を経静脈投与、腹腔内投与ないし水疱/創傷周囲への局所投与を行った。

(4) COL17 発現解析

骨髄移植・造血幹細胞移植においては、移植 4 週間後に末梢血フローサイトメトリ解析にてドナー血球細胞の生着を確認、背部皮膚に 4mm パンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し、3 週間後に上皮化した部位の皮膚を採取して検討に用いた。MSC 療法においては細胞療法後 3 週間で皮膚を採取し、検討

した。

上記で得られた皮膚組織は①凍結切片作成後にマウス Col17 モノクローナル抗体

(1:2,500, KT4.2) による蛍光抗体法 ② total RNA 抽出および定性 RT-PCR ③電子顕微鏡によるヘミデスモソーム構造観察 ④表皮抽出物およびマウス Col17 モノクローナル抗体 (KT4.2) を用いた Western blotting を施行し、Col17 の発現を検討した。

(5) マイクロアレイ解析

造血幹細胞移植を行いドナー細胞の生着を確認した Col17 欠損マウスに対して 4mm パンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し、3週間経過して上皮化した皮膚組織を採取した。ディスパーゼ I (エーディア) を用いて真皮/表皮を分離し、さらに 0.25%トリプシンで表皮細胞を分離させた後、FACS Aria を用いて表皮角化細胞を含む非血球細胞として GFP+CD45⁻細胞 (ドナー由来) および GFP-CD45⁻細胞 (レシピエント由来) を各々ソーティングした。これら細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems) を用いて cRNA を増幅・精製した。逆転写反応により cDNA を合成し、GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array

(Affymetrix) を用いてマイクロアレイプローブとハイブリダイズさせた。GeneChip Scanner 3000 7G および GeneChip Command Console® Software (AGCC) を使用してシグナル測定、データを取得し、GeneSpring GX にて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 幹細胞移植の時期および方法の最適化検討

我々は、成体 Col17 欠損表皮水疱症マウスに対して骨髓由来細胞ないし造血幹細胞を経尾静脈的に移植し、臨床的な改善を見いだした。現実的には表皮水疱症患者は特に重症例では成長前に死亡、ないし有棘細胞癌などの発症により移植処置が困難になることが予想される。また、Col17 欠損マウスは成体まで成長するものが自然経過では全体の約 20%にとどまり、成長前に死亡する個体が多い。そのため、可能な限り生後早い段階での介入による治療可能性を検討した。生後 3 日以内の新生仔 Col17 欠損マウスに対して経眼窩静脈による骨髓移植を施行したところ、成体まで成長したマウスは 4/34 匹 (11.8%) にとどまり、皮膚における Col17 発現も免疫染色・RT-PCR・Western blotting で確認できなかった。生存した Col17 欠損マウスの末梢血フローサイトメトリ解析では、生着した

ドナー由来の GFP+血球細胞の割合は 12.8±2.2%に過ぎなかった。また、臨床症状においても生後 28 日の時点ではほぼ正常と同様であったものの、その後 1 ヶ月で急激に水疱びらんが多発するようになった。この急激な臨床症状の変化の原因として、現病の表皮水疱症の悪化や、GVHD の発症などが可能性として考えられた。

新生仔マウスに対する骨髓移植療法が困難であることが確認されたため、次に、GVHD の発症可能性が低く、容易に細胞数を得ることが可能である MSC の治療可能性を検討した。新生仔 Col17 欠損マウスに対して GFP トランスジェニックマウス由来 MSC の腹腔内投与 (n=11) および水疱内への皮内投与 (n=24) を行ったが、全例で生後 18 日以内に死亡し、未治療群との生存率に有意差を認めなかった。

先天性皮膚疾患においては、白血病など血液悪性疾患における造血幹細胞移植とは異なり、造血細胞を完全置換する必要性が高くない。その一方で、Col17 欠損表皮水疱症マウスへの骨髓移植実験において、造血系細胞の置換率 (キメラ率) とドナー由来皮膚構成細胞の出現率との間には正の相関が観察される。そのため、皮膚障害をきたさない前処置でかつ、より生着率の高い移植手技が望ましい。また、MSC 移植系においては、尾静脈投与では投与細胞の 80%が肺にトラップされるとされ、MSC から皮膚構成細胞へ分化させるにあたり効率が相当低いことが推測される。これらの背景を勘案して、次に我々は、造血幹細胞・MSC を Col17 欠損表皮水疱症マウスへ骨髓内投与する試みを行った。まず、成体 Col17 欠損表皮水疱症マウスへ 6 Gy の放射線前処置の後、GFP+骨髓細胞を骨髓内移植した。4 週間目における CD45+陽性細胞の生着キメラ率は 87.9±3.9% (n=5) であり、尾静脈投与群の 72.1±5.5% (n=12) と比較して生着率に有意差を認めた (p<0.05)。しかし、免疫染色による基底膜部 Col17 の発現割合に明らかな差を認めなかった。また、GFP 陽性 MSC を成体 Col17 欠損表皮水疱症マウスおよび野生型 C57BL/6 へ骨髓内移植した群においては、移植 4 週間後の時点でドナー GFP 由来の MSC は骨髓内に観察されず、皮膚においても GFP 陽性細胞が観察されなかった (それぞれ n=5)。以上より、成体マウスに対する造血幹細胞骨髓内投与は生着率の向上が期待されるが、目的としての基底膜蛋白産生向上に対しては明らかなメリットがみられないことが判明した。

(2) 皮膚分化関連因子の検索

我々は過去に、骨髓由来細胞や MSC に発現するケモカインレセプターおよびケモカインによる相互作用が皮膚創傷部への細胞動

員を促進し、表皮角化細胞を含むドナー由来皮膚構成細胞の出現を亢進させることを報告している。そこでより直接的に、表皮水疱症マウスへの骨髄移植後に皮膚に出現するドナー由来およびレシピエント由来の表皮細胞における遺伝子発現の差を解析し、骨髄由来細胞の表皮角化細胞への分化関連因子の検索を試みた。Col17 欠損マウスに骨髄移植を行い、生着後皮膚から GFP+CD45-細胞（ドナー由来表皮角化細胞）および GFP-CD45-細胞（レシピエント由来）を各々ソーティングし、マイクロアレイ解析で mRNA 発現の差を網羅的に検討した。合計 23446 プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。既知の遺伝子でドナー由来角化細胞で発現が亢進しているものとして、*Mmp13*, *Cxcl10*, *Cxcl19* などが検出された。

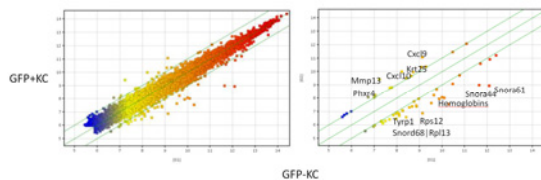
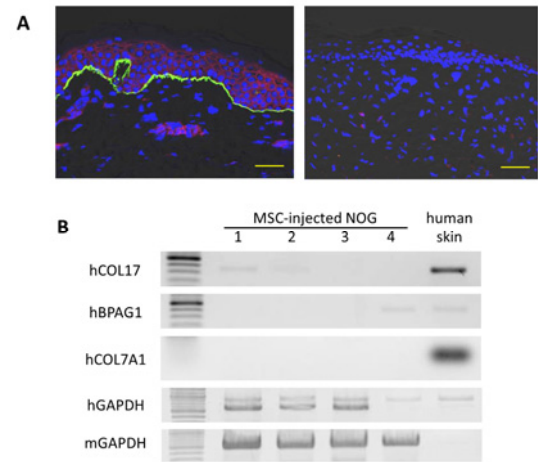


図 移植後角化細胞のマイクロアレイ解析
移植療法後の表皮水疱症マウス皮膚よりドナー由来 (GFP+) /レシピエント由来 (GFP-) の角化細胞を抽出し、遺伝子発現解析を行った。合計 23446 プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。

(3) ヒト MSCs の表皮水疱症治療への応用可能性の検討

我々は過去にマウスにおいて、MSCs が皮膚構成細胞へ分化しうることを示し、MSCs の静脈投与によって表皮水疱症マウスにおいて欠損蛋白が発現しうることを示した。ヒト MSCs においてはチリのグループで、健康人の兄弟骨髄から採取・培養した MSCs を栄養障害型表皮水疱症患者の病変皮膚に局所注射することで、治療効果を有したという報告があり、本邦でも MSC 局所投与の臨床試験が開始されている。そこで、全身的作用に期待するという観点から我々は、ヒト細胞が生着しうる免疫不全 NOG マウスにおいて、ヒト MSC の静脈投与がヒト基底膜蛋白の産生をもたらすかを検討した。NOG マウス (n=4) に全層皮膚欠損を作製し、直後に尾静脈よりヒト MSC 1×10^6 cells を投与し、上皮化した皮膚を採取して検討したところ、免疫染色で MHC class I 陽性細胞が真皮に散見され、RT-PCR にも human GAPDH mRNA が検出された。4 匹中 2 匹において human COL17, 1 匹で human BPAG1 の mRNA の発現がわずかに確認されたが、免疫染色ではこれらの蛋白発現は確認されなかった。COL7 をはじめとした他の皮膚基底膜蛋白の発現は、免疫染色・RT-PCR ともに確認

できなかった。



(A) ヒト MSC 投与後の NOG マウス皮膚の免疫組織学的検討。正常皮膚 (右) では COL17 (緑) が基底膜部に線状に観察され、表皮角化細胞および線維芽細胞等の細胞膜に HLA class I (赤) が発現している。ヒト MSC 静脈投与後の NOG マウス皮膚では、真皮に散在性に HLA class I 陽性細胞 (赤) が観察された。

(B) ヒト MSC 投与後の NOG マウス皮膚の RT-PCR 解析。4 匹中 2 匹に human COL17, 1 匹で human BPAG1 mRNA の発現が確認された。

(4) 臨床応用への取り組み

名古屋大学小児科、名古屋大学皮膚科と共同し、表皮水疱症患者に対する幹細胞移植療法の自主臨床試験を名古屋大学病院倫理審査委員会に提出した。治療対象となり得る患者の条件を規定し、新規診断手法および未知なる表皮水疱症の発症機序を探索した。当該施設に通院する若干名の患者に対して、診断確定、および罹患範囲・合併症を検討し、エントリーの適応を評価したが、現時点で該当する患者は存在しなかった。

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)

1. Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H: Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. Clin Exp Dermatol 37: 658-664, 2012. (査読有)

2. Fujita Y, Abe R, Nishie W, Shimizu H: Regenerative medicine for severe congenital skin disorders: restoration of deficient skin component proteins by stem cell therapy. Inflammation and

Regeneration 31: 282-289, 2011. (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. Fujita Y, Abe R, Hayashi-Ujiie I, Shimizu H: Circulating stem cells and wounded skin in epidermolysis bullosa - possible role of chemokines in the recruitment of cells from bone marrow to skin. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, LOISIR HOTEL NAHA (Okinawa), December 9, 2012 - December 9, 2012.

2. 藤田靖幸: 表皮水疱症の病態と治療. 第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会, ロイトン札幌 (札幌市), 2012.09.29

3. 藤田靖幸: Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. 第111回日本皮膚科学会総会 (皆見省吾記念賞受賞講演), 国立京都国際会館 (京都市), 2012.06.04

4. 藤田靖幸, 阿部理一郎, 猪熊大輔, 佐々木美香子, 守屋 歩, 西江 渉, 清水 宏: 骨髄移植は表皮水疱症モデルマウスに対する治療法となる. 第387回日本皮膚科学会北海道地方会, 大正製薬ビル (札幌市), 2011.09.03

[その他]

ホームページ

北海道大学医学部皮膚科

<http://www.derm-hokudai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし