

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249062

研究課題名(和文) 表皮水疱症に対する造血幹細胞移植療法の確立

研究課題名(英文) Investigation of hematopoietic stem cell transplantation for epidermolysis bullosa

研究代表者

清水 宏 (Shimizu, Hiroshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00146672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：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、機械的刺激によって水疱や潰瘍を形成する疾患である。このような重症な先天性皮膚疾患に対して近年、正常遺伝子を有する他者の細胞を患者に投与して欠損蛋白の産生を促す、細胞療法の有効性が検討されはじめている。本研究では、重症表皮水疱症に対する造血/間葉系幹細胞移植を目指すにあたり検討されるべき、マウスモデルによる条件検討、およびiPS細胞も含めた新規細胞療法の可能性について検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Epidermolysis bullosa (EB) is a group of genodermatoses that cause blister formations from the congenital abnormality of anchor proteins between the epidermis and the dermis. There have been several strategies for the treatment of EB, and so far, cell therapies are the most promising approach because of the potential of systemic effects. We have proved that stem cell therapies, including bone marrow transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, can ameliorate the phenotype and survival prognosis in the junctional EB model mice that lack type XVII collagen (Col17). In this study we explore more efficient approaches of stem cell therapies for EB, including intramedullary transplantation, mesenchymal stromal/stem cell infusion, and investigate factors in association with transdifferentiation from bone marrow-derived stem cells into keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 幹細胞移植 細胞療法

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は、皮膚の真皮-表皮境界部に分布する種々の構成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る。わずかな機械的刺激によって容易に水疱や潰瘍を形成する(図1)。現時点では対症療法以外に確立した治療法は存在せず、特に XVII 型コラーゲン (COL17) の欠損により生じる接合部型(JEB)と、VII 型コラーゲン (COL7) 異常により発症する栄養障害型(RDEB)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例も存在する。その著しい臨床症状と経過から、患者団体が世界的規模で構築されており(日本では表皮水疱症友の会: <http://www.debrajapan.com>), 疾患の啓蒙と治療法の開発が幅広く研究されている。



(図1 表皮水疱症の臨床像)

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が、過去報告されていた表皮水疱症モデルマウスはことごとく致死性であり、治療研究の進歩を妨げている大きな一因になっている。申請者らは近年、新規表皮水疱症モデルマウスの作成に成功した(Nishie W et al. Nat Med 2007, Ito K et al. Am J Pathol 2009, 表1)。

マウス名	マウスの説明	出典
COL17 <sup>m-/h+</sup>	XVII型コラーゲンヒト化マウス(K14-driven)	Nishie W et al. (Nat Med 2007)
COL17 <sup>m/-</sup>	JEBモデルマウス	Nishie W et al. (Nat Med 2007)
COL7 <sup>m-/h+</sup> , K14 <sup>h+</sup>	VII型コラーゲンヒト化マウス(K14-driven)	Ito K et al. (Am J Pathol 2009)
COL7 <sup>m-/h+</sup> , CMV <sup>h+</sup>	VII型コラーゲンヒト化マウス(CMV-driven)	Ito K et al. (Am J Pathol 2009)
COL7 <sup>m-/h+</sup> , col1 <sup>h+</sup>	VII型コラーゲンヒト化マウス(COL1-driven)	Ito K et al. (Am J Pathol 2009)
COL7 <sup>m-/h+</sup> , K14 <sup>Δh+</sup>	RDEBモデルマウス	Ito K et al. (Am J Pathol 2009)
COL7 <sup>m-/h+</sup> , G2028R <sup>Δh+</sup>	DDEBモデルマウス	unpublished

(表1 代表研究者の施設で作成された表皮水疱症関連モデルマウス)

これら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。このような治療実験を施行可能な表皮水疱症モデルマウスは、現時点では申請者らのグループのみが保有しており、臨床応用に向け

た基礎的治療研究を施行可能な唯一の研究施設である。そして、申請者らは実際にCOL17欠損表皮水疱症モデルマウスにおいて幹細胞移植療法が臨床的に有効であることを見だし(Fujita Y et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010), さらに有効な細胞療法の手技や添加因子などについて検討を続けている。

ごく最近米国より、RDEB患者に対する幹細胞移植の報告がなされ(Wagner JE, et al. N Engl J Med 2010), 臨床的な効果を謳うものであったが、モデル動物での検討が十分に行われないまま臨床応用に走ったものであった。また移植関連死などのリスク評価を経ずに施行されている欠点を有し、これをそのまま本邦で応用するには大きなリスクを伴う。さらに、長期的効果の検証や欠損した蛋白発現の程度については十分に検討されていない。表皮水疱症における幹細胞移植療法を本邦で臨床応用するには、十分な経験を有する小児血液内科、および表皮水疱症の専門医の共同体制はもちろんのこと、同時にモデルマウスを用いた幹細胞分化条件、安全に治療を行えるための条件設定など基礎的な検討が必須であり、これらの成果が迅速にフィードバックされる体制下で行われなければならない。

また、従来の幹細胞移植療法は、採取細胞数の不足による生着不全のリスクや再移植の困難性、拒絶反応によるGVHDなどが課題として存在するが、将来的にiPS細胞の安全性が確立された場合、これらの問題点が一挙に解決する可能性を秘めている。将来的なiPS細胞療法の応用を見据えて、疾患モデルマウス等を用いた基礎的知見の収集を平行して行うことも必須である。幹細胞移植は現時点で表皮水疱症に対して唯一の全身的・長期的な有効性を期待できる根本的治療法であり、本研究の実現は表皮水疱症だけでなく、難治性疾患一般における新たな治療戦略に光明を照らすものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 表皮水疱症モデルマウスを用いた幹細胞移植の条件検討

代表研究者らが有する表皮水疱症モデルマウスに対して幹細胞移植実験を施行し、移植前後の臨床症状と前処置、生着率と長期予後・成績を検討し、臨床的に有効性が高い条件・リスクの高い状況の評価する。角化細胞への分化誘導および遊走に関わる因子を同定し、移植時に併用投与ないし抗体投与を行い、in vivoでの有効性および安全性を検討する。

(2) iPS細胞を応用した表皮水疱症に対する幹細胞移植療法の基礎的知見の収集

iPS細胞由来造血幹細胞を表皮水疱症モデルマウスに移植し、通常の幹細胞移植と同様

の結果が得られるかどうか、そして移植細胞由来角化細胞と正常角化細胞との分子生物学的差違を検討し、将来的な治療法たり得るかを検討する。

(3) ヒト幹細胞における表皮角化細胞への分化能および幹細胞移植療法の有効性を検討

ヒト血球系細胞が生着する免疫不全 NOG マウスを用いて、ヒト幹細胞の表皮角化細胞への分化能、および関連因子を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 幹細胞移植の条件検討

モデルマウスを用いた基礎的研究として、理想的な幹細胞移植の条件検討ならびに幹細胞由来表皮細胞の促進因子、分子生物学的特性を検討する。申請者が有する表皮水疱症モデルマウスに対して幹細胞移植実験を施行し、移植前後の臨床症状と前処置、生着率と長期予後・成績を検討し、臨床的に有効性が高い状況・リスクの少ない状況を評価する。生細胞分収システムにて幹細胞由来表皮細胞を単離培養し、遺伝子発現マイクロアレイ解析等を行うことで、分化に関連した因子の同定をはかる。

#### (2) 治療対象患者の条件策定および新規診断確定手技の確立

治療対象となり得る患者の条件（年齢、疾患サブタイプ、罹患範囲、治療しなかった場合の生命予後）を規定する。現時点においては治療対象となり得る病型は、表皮水疱症の中でも重症型の接合部型（本邦で年間 10 例以下）および思春期以降に有棘細胞癌などを生じて予後不良となる劣性栄養障害型（RDEB: 本邦で年間約 50 例）が推定される。遺伝子異常が同定されない重症例に対しては次世代シーケンス技術を応用して原因遺伝子を確定し、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する。以上を含めて診断確定、および罹患範囲・合併症を個々の候補症例について検討し、エントリーの適応を評価する。

#### (3) iPS 細胞由来造血幹細胞を用いた表皮水疱症の治療

従来の幹細胞移植療法は、採取細胞数の不足による生着不全のリスクや再移植の困難性、拒絶反応による GVHD などが課題として存在するが、iPS 細胞の安全性が確立された場合、これらの問題点が一挙に解決される。同系マウス由来の正常遺伝子を有する iPS 細胞（コントロールとして ES 細胞）に対し、OP9 細胞との共培養ないし HoxB4 遺伝子導入等による血球系分化誘導を行う。それを表皮水疱症モデルマウスおよび皮膚構造蛋白ヒ

ト化マウスに対し、上記と同様に移植する。血球系分化誘導の際には、invitro で経時的にフローサイトメトリーおよびマイクロアレイ解析、エピジェネティクス解析を行い、血球系前駆細胞への分化を確認、および分化誘導に関与する因子を検討する。生着率および各血球系への分化誘導をフローサイトメトリーで確認した上で、正常部皮膚およびびらん上皮化部皮膚を採取し、RT-PCR、quantitative RT-PCR、免疫染色および Western blotting によって、欠損した皮膚構成蛋白の発現を検討する。同様に、ドナー由来角化細胞や臨床症状の変化、皮膚分化因子を併用した移植系においても検討する。

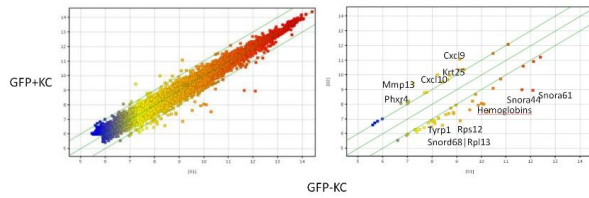
### 4. 研究成果

#### (1) 表皮水疱症モデルマウスを用いた幹細胞移植の条件検討

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、臨床的な改善を見込んでいる。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ため、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。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。

次に、造血幹細胞を 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。移植後 4 週間目における CD45+陽性細胞の生着キメラ率は  $87.9 \pm 3.9\%$  (n=5) であり、尾静脈投与群の  $72.1 \pm 5.5\%$  (n=12) と比較して生着率に有意差を認められた (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。以上より骨髓内投与は生着率向上に寄与することが判明した。

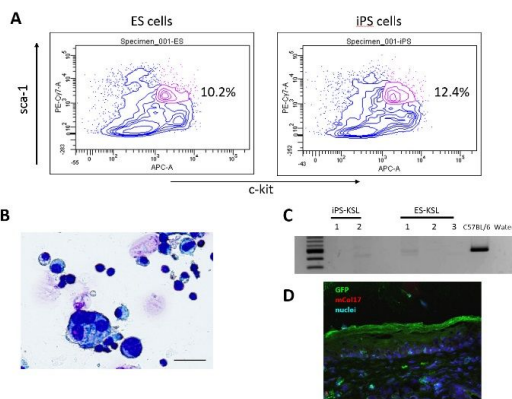
また、我々は表皮水疱症マウスへの骨髓移植後に皮膚に出現するドナー由来およびレシピエント由来の表皮細胞における遺伝子発現の差違を解析し、骨髓由来細胞の表皮角化細胞への分化関連因子の検索を試みた。マイクロアレイ解析で mRNA 発現の差違を網羅的に検討した。合計 23446 プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。既知の遺伝子でドナー由来角化細胞で発現が亢進しているものとして、Mmp13、Cxcl10、Cxcl9 などが検出された（図 2）。



(図2 移植後角化細胞のマイクロアレイ解析)

(2) iPS細胞を応用した表皮水疱症に対する幹細胞移植療法

我々は、ES および iPS 細胞の造血系細胞への分化誘導による造血幹細胞移植の治療可能性を検討した。Ly5.1 由来の ES 細胞ないし iPS 細胞に Lhx2 遺伝子を導入し、OP9 細胞と共培養することで血球系前駆細胞 (KSL 細胞) への分化を確認、さらに血球系細胞への分化を *in vitro* で確認した (図 3 A, B)。このようにして得られた細胞を成体 COL17 レスキューマウスに移植したところ、移植後 4 週間後の時点での末梢血キメラ形成率は ES 細胞移植群で  $6.32 \pm 2.53 \%$  (n=5)、iPS 細胞移植群で  $12.2 \pm 5.26 \%$  (n=10) であった。定性 RT-PCR において計 15 匹中、iPS 細胞由来造血幹細胞移植を行った 2 匹、ES 細胞由来造血幹細胞移植を行った 1 匹において mCOL17 の発現が確認された (図 3 C)。しかしながらこれらのマウス皮膚において、免疫染色で mCOL17 の基底膜への線状沈着は確認できなかった (図 3 D)。また、電子顕微鏡においてヘミデスモソームの成熟化も確認できなかった。



(図3 iPS/ES細胞の血球系誘導)

(A) 血球分化誘導後の FACS 解析。ES 細胞 (左)、iPS 細胞 (右) とともに造血系前駆細胞 (KSL) が同定された。

(B) さらに OP9 細胞と共培養することで、Giemsa 染色で分葉核を有する好中球を含む成熟血球細胞が多数出現した。

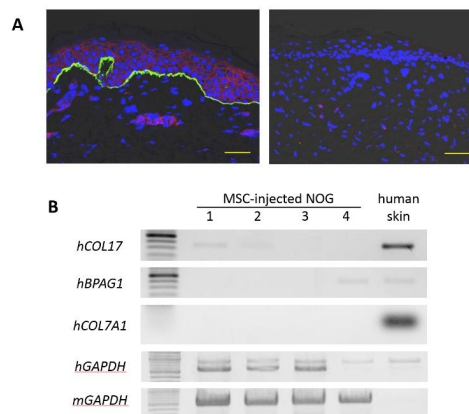
(C) ES および iPS 細胞由来 KSL 細胞を COL17 レスキューマウスに移植したところ、一部のマウスにおいて mCOL17 mRNA の発現が定性 RT-PCR にて確認された。

(D) 同移植マウス皮膚を免疫染色したが、

mCOL17 の基底膜への沈着は確認されなかった。

(3) ヒト幹細胞における表皮角化細胞への分化能および幹細胞移植療法

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  $1 \times 10^6$  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 (図 4 A)、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 (図 4 B) が、免疫染色ではこれらの蛋白発現は確認されなかった。COL17 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 とともに確認できなかった。



(図4 NOGマウスに対するMSC療法の検討)

(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 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 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) 治療対象患者の条件策定および新規診断確定手技の検討

共同研究施設である名古屋大学小児科，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 7件)

1. Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Nishimura K, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, Obuse C, Shimizu H, Abe R: An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. *Sci Transl Med* 6: 245ra295, 2014. (査読あり)  
doi: 10.1126/scitranslmed.3008227.

2. Shinkuma S, Sawamura D, Fujita Y, Kawasaki H, Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H: Long-term Follow-up of Cultured Epidermal Autograft in a Patient with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Acta Derm Venereol* 94: 98-99, 2014. (査読あり)  
doi: 10.2340/00015555-1592.

3. Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fujita Y, Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H: Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. *J Allergy Clin Immunol* 131: 434-441 e431-439, 2013. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.jaci.2012.09.014.

4. Hoshina D, Abe R, Yoshioka N, Saito N, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H: Establishment of a novel experimental model of human angiosarcoma and a VEGF-targeting therapeutic experiment. *J Dermatol Sci* 70: 116-122, 2013. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.02.008.

5. Shinkuma S, Nishie W, Jacyk WK, Natsuga K, Ujiie H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu

H: A novel keratin 5 mutation in an African family with epidermolysis bullosa simplex indicates the importance of the amino acid located at the boundary site between the H1 and coil 1A domains. *Acta Derm Venereol* 93: 585-587, 2013. (査読あり)  
doi: 10.2340/00015555-1538.

6. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H: Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts. *Am J Pathol* 181: 1659-1671, 2012. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.018.

7. 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. (査読あり)  
doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04312.x.

[学会発表](計 5件)

1. Fujita Y: Epidermolysis bullosa in Hokkaido University: from bench to bed. 12th International Symposium of Cutaneous Biology Research Institute. Younsei University (Seoul, Korea), 2014.08.30.

2. Fujita Y: Novel strategies for the treatment of epidermolysis bullosa. The 1st Beijing International Forum of Pediatric Development. Beijing International Conference Center (Beijing, China), 2013.11.7-2013.11.9.

3. 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, ロワジュールホテル 那覇(沖縄市), 2012.12.12-2012.12.14.

4. 藤田靖幸, 新熊 悟, 澤村大輔, 川崎浩之, 中村裕之, 井家益和, 西江 涉, 清水宏: 自家培養表皮移植を行い長期観察した劣性栄養障害型表皮水疱症の1例. 第42回日本創傷治療学会, かでる2・7(札幌市), 2012.12.2-2012.12.4.

5. 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），  
2012.09.29-2012.09.30.

〔その他〕

ホームページ等  
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

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

西江 渉 (NISHIE WATARU)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：20443955

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

秋山 真志 (AKIYAMA MASASHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60222551

小島 勢二 (KOJIMA SEIJI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20313992

### (3) 連携研究者

中村 秀樹 (NAKAMURA HIDEKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助手  
研究者番号：60435956