

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461675

研究課題名(和文) 線維芽細胞、間葉系幹細胞を用いた真皮再構築による表皮水疱症の新規治療戦略

研究課題名(英文) New treatment of epidermolysis bullosa by the dermal rearrangement with fibroblasts and mesenchymal stem cells

研究代表者

松崎 康司 (Matsuzaki, Yasushi)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50322946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、VII型コラーゲン遺伝子異常である栄養障害型表皮水疱症を、患者由来の細胞を使い外力耐性コラーゲンスポンジを病変部で再構築する新規治療法を確立することが目的である。本研究では以下の研究項目を行った。1. 毛包周囲線維芽細胞の創傷時における筋線維芽細胞としての機能の分析。2. 脂肪組織由来間葉系幹細胞の多分化能の確認、およびサイトカイン・アディポカイン分泌能の検討。3. 間葉系幹細胞由来サイトカインの線維芽細胞へ与える影響の分析。4. 毛包周囲線維芽細胞、間葉系幹細胞によって再構築されたコラーゲンスポンジが、表皮水疱症マウスの症状を軽症化するか確認。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the therapeutic possibilities of the dermal fibroblast and mesenchymal stem cells derived from patients of epidermolysis bullosa. We cultured fibroblasts and mesenchymal stem cells from the skin and fat tissue from COLVII-KO mice and injected the cells intradermally in the dorsum of COLVII-KO mice. We revealed that injected cells produced the rearrangement of the dermal condition and removed the irritated skin changes in the COLVII-KO mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 間葉系幹細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は、軽微な外力で容易に皮膚に水疱、びらんを形成する遺伝性疾患群である。その最重症型である栄養障害型は、表皮と真皮の接着に必須な線維である VII 型コラーゲンの遺伝子異常が原因である。生下時から潰瘍の形成、癒痕治癒を繰り返し、手指、足趾が棍棒状に癒着し、日常生活に大きな支障が生じる。

新規治療法として、患者の両親由来の線維芽細胞を病変部に注射する方法や骨髄移植が行われている。いずれも表皮水疱症患者の表皮真皮境界部に VII 型コラーゲンが発現し症状が軽快しており、新たな治療戦略として注目されている。しかしながら、他人の細胞を移植する場合拒絶反応が必須であり、また倫理的にも早急な実用化は困難である。



水疱 **棍棒状癒着**
VII型コラーゲンノックアウトマウス
 生下時から手足に水疱がみられ、最終的には棍棒状に癒着する。しかし、髭、体毛は維持され、有毛部位に水疱、びらん形成はみられない。

我々は、真皮内の毛包周囲線維芽細胞由来の豊富な細胞外マトリックスとその下床の脂肪組織が共同で外力の分散化に寄与すると考える。有毛部線維芽細胞の特徴は、

(1) 皮膚欠損が生じた場合、 α -smooth muscle actin (α -SMA) やビメンチンを強く発現し、筋線維芽細胞として働く、(2) 血管内皮増殖因子 (VEGF) を産生し血管の新生、創傷治癒を促進させる、である。また、真皮下の脂肪細胞はアディポカインと呼ばれる生理活性物質を産生し、真皮内線維芽細胞に細胞外マトリックス成分であるコラーゲン、ヒアルロン酸の産生を促進させる。

さらに、脂肪組織には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、脂肪細胞や線維芽細胞へ分化し、様々なサイトカイン・アディポカインを産生する。これにより、棍棒状癒着を予防でき患者の QOL 向上に著しく貢献できると強く確信する。

2. 研究の目的

栄養障害型表皮水疱症は、VII 型コラーゲンがないため一生水疱が生じる遺伝性疾患である。本研究の目的は、患者由来の細胞を使い外力に強い人工的な真皮・脂肪組織を再構築する新規治療法を確立することである。患者本人の細胞であり、拒絶反応もなく安全に行える治療である。

3. 研究の方法

(1) 真皮・皮下組織再構築に使用する細胞の確立

C57BL/6 マウスの髭、体毛から、実体顕微鏡を用い結合組織性毛包を分離、培養。

C57BL/6 マウス鼠径より脂肪を採取、コラーゲナーゼ処理後細胞を回収、培養。

FCM・ソーティングで CD31、CD45 陰性、CD105、Sca1 陽性の細胞を回収、脂肪組織由来間葉系幹細胞として培養する。

脂肪細胞誘導培地に切り替え、脂肪細胞への分化能があるか確認。

(2) 表皮水疱症発症マウスの真皮・皮下組織再構築

我々はすでにタモキシフェン誘導性のコンディショナル VII 型コラーゲン KO マウスを作成し所有している。成人発症させた表皮水疱症をそのマウス由来、つまり正常な VII 型コラーゲンを発現できない自分自身の細胞を使い、外力耐性な真皮・皮下組織を再構築できるかを調べる。

発症させる前に毛包周囲線維芽細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞を採取、培養し、その後タモキシフェンを添加、VII 型コラーゲン遺伝子を KO する。

タモキシフェン誘導で発症した表皮水疱症マウスの患部に線維芽細胞、間葉系幹細胞を 1×10^6 個ずつ局所投与する。皮下組織の再構築による症状の軽減化を経時的に観察し、適宜皮膚生検し、真皮・皮下組織の形態を組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 毛包周囲線維芽細胞

C57BL/6 マウスの髭、体毛から、実体顕微鏡を用い結合組織性毛包を分離、培養し、毛包周囲線維芽細胞の培養を確立した。

(2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞

C57BL/6 マウス鼠径より脂肪を採取、コラーゲナーゼ処理後細胞を回収、培養、継代。

FCM で CD31、CD45 陰性、CD105、Sca1 陽性の細胞を回収した (図 1)。

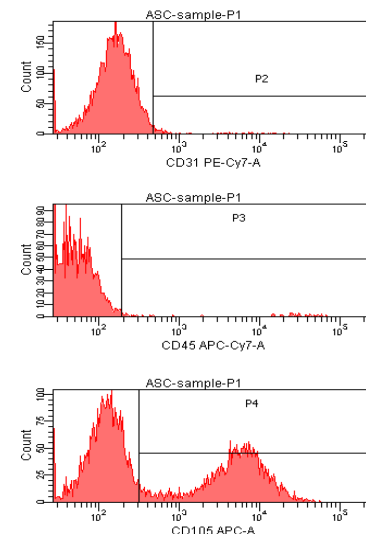


図 1

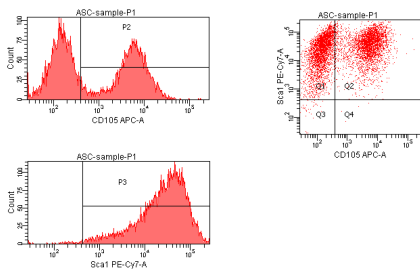


図 1

脂肪細胞誘導培地に切り替え、脂肪細胞への分化能があるか確認した(図2)

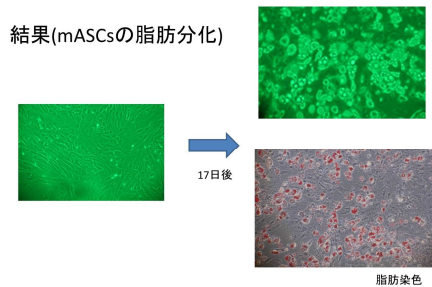


図 2

(3) 表皮水疱症発症マウスの真皮・皮下組織再構築

タモキシフェン誘導で発症した表皮水疱症マウスの患部に線維芽細胞、間葉系幹細胞を 1×10^6 個ずつ局所投与した。4 週間経時的に観察したが、臨床的には大きさ違いは見られなかった。

局所投与 4 週後の組織学解析では、培養細胞投与群では表皮突起の延長、真皮の肥厚など人工的なコラーゲン・スポンジの再構成が確認できた(図3)

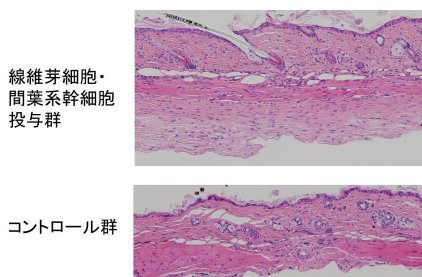


図 3

背部皮膚から RNA を回収、真皮膠原線維である I 型コラーゲン発現量を RNA レベルで確認したところ、局所投与群で有意に高値を示した(図4)

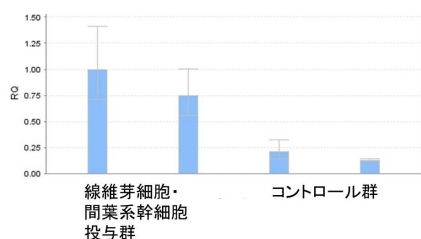


図 4

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 15 件)

- Nozaki S, Ogata Y, Yonekura M, Han C, Niwa H, Kushikata T, Hirota K, Matsuzaki Y, Tomita H, Imaizumi T, Itagaki S, Sawamura D, Murakami M. Effects of halothane anesthesia on electrocardiogram parameters. *Hirosaki Med J.* 2017; 67(2-4):129-35. 査読有
- Amagai M, Ikeda S, Hashimoto T, Mizuashi M, Fujisawa A, Ihn H, Matsuzaki Y, Ohtsuka M, Fujiwara H, Furuta J, Tago O, Yamagami J, Tanikawa A, Uhara H, Morita A, Nakanishi G, Tani M, Aoyama Y, Makino E, Muto M, Manabe M, Konno T, Murata S, Izaki S, Watanabe H, Yamaguchi Y, Matsukura S, Seishima M, Habe K, Yoshida Y, Kaneko S, Shindo H, Nakajima K, Kanekura T, Takahashi K, Kitajima Y, Hashimoto K. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2017; 85(2):77-84. 査読有
- Minakawa S, Tanaka H, Kaneko T, Matsuzaki Y, Kono M, Akiyama M, Minegishi Y, Sawamura D. Hyper-IgE syndrome with a novel mutation of the STAT3 gene. *Clin Exp Dermatol.* 2016; 41(6):687-9. 査読有
- Matsuzaki Y, Jin K, Rokunohe A, Minakawa S, Nakano H, Sawamura D. Annular leukocytoclastic vasculitis associated with essential mixed cryoglobulinemia. *Eur J Dermatol.* 2016; 26(2):186-7. 査読有
- Rokunohe A, Matsuzaki Y, Rokunohe D, Sakuraba Y, Fukui T, Nakano H, Sawamura D. Immunosuppressive effect of adipose-derived stromal cells on imiquimod-induced psoriasis in mice. *J Dermatol Sci.* 2016; 82(1):50-3. 査読有
- Han C, Tomita H, Ohba T, Nishizaki K, Ogata Y, Matsuzaki Y, Sawamura D, Yanagisawa T, Osanai T, Imaizumi T, Matsubara A, Adachi T, Ono K, Okumura K, Murakami M. Modified sympathetic nerve regulation in AKAP5-null mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 469(4):897-902. 査読有
- Akasaka E, Minakawa S, Rokunohe D, Toyomaki Y, Matsuzaki Y, Sawamura D, Nakano H. Superficial epidermolytic ichthyosis caused by a novel KRT2 mutation. *J Dermatol Sci.* 2015; 79(1):86-8. 査読有
- Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D,

- Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S, Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 458(3):584-9. 査読有
9. Kinjyo C, Kaneko T, Korekawa A, Rokunohe A, Aizu T, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D. Oral lichen planus with antibodies to desmogleins 1 and 3. *J Dermatol.* 2015; 42(1):40-1. 査読有
 10. Jin K, Matsuzaki Y, Korekawa A, Rokunohe A, Aizu T, Kinjyo C, Nakano H, Sawamura D. Pompholyx-like manifestation in Churg-Strauss syndrome. *Eur J Dermatol.* 2015; 25(2):188-9. 査読有
 11. Watanuki Y, Kageyama K, Takayasu S, Matsuzaki Y, Iwasaki Y, Daimon M. Ultraviolet B radiation-stimulated urocortin 1 is involved in tyrosinase-related protein 1 production in human melanoma HMV-11 cells. *Peptides.* 2014; 61:93-7. 査読有
 12. Shintaku T, Ohba T, Niwa H, Kushikata T, Hirota K, Ono K, Matsuzaki Y, Imaizumi T, Kuwasako K, Sawamura D, Murakami M. Effects of propofol on electrocardiogram measures in mice. *J Pharmacol Sci.* 2014; 126(4):351-8. 査読有
 13. Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Akasaka E, Mizukami H, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Mitsuhashi Y, Sawamura D. Case of oculocutaneous albinism complicated with squamous cell carcinoma, Bowen's disease and actinic keratosis. *J Dermatol.* 2014; 41(9):863-4. 査読有
 14. Minakawa S, Kaneko T, Rokunohe D, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Hashimoto T, Sawamura D. Pemphigoid gestationis with prepartum flare. *J Dermatol.* 2014; 41(9):850-1. 査読有
 15. Kinjo C, Nakano H, Korekawa A, Toyomaki Y, Matsuzaki Y, Sawamura D. Functional analysis of LEMD3 mutation in Buschke-Ollendorff syndrome. *Hiroasaki Med J.* 2014; 65:21-6. 査読有
- [学会発表](計 14件)
1. Matsuzaki Y, Rokunohe A, Rokunohe D, Makita E, Nakano H, Sawamura D. Therapeutic and immunomodulatory effects of adipose-derived stromal cells on psoriasis animal model. 第41回日本研究皮膚科学会. 2016.12.9-11. 仙台国際センター、宮城県・仙台市.
 2. 皆川智子、金子高英、松崎康司、中野 創、澤村大輔、山田真博、齋藤紀先、萱場広之. 当科通院中の乾癬患者における臨床検査的検討. 青森地方会第376回例会. 2016.12.04. ホテル青森、青森県・青森市.
 3. 神 可代、松崎康司、中野 創、澤村大輔、櫻庭裕丈、対馬史泰. 手指のチアノーゼを呈し digital subtraction angiography (DSA) により動脈閉塞性疾患を鑑別した全身性強皮症の一例. 青森地方会第375回例会. 2016.8.28. ホテルニューキャッスル、青森県・弘前市.
 4. Hagiwara C, Nakano H, Korekawa A, Toyomaki Y, Matsuzaki Y, Sawamura D. Functional analysis of LEMD3 mutation in Buschke-Ollendorff Syndrome. 13th European Society for Pediatric Dermatology. 2016.5.26-28. Paris, France.
 5. Takiyoshi N, Kaneko Y, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D. Acral pseudolymphomatous angiokeratoma of children (APACHE) : a case report with immunohistochemical study. 22nd Regional Conference of Dermatology. 2016.4.21-24. Singapore.
 6. 皆川智子、金子高英、松崎康司、中野 創、澤村大輔、平賀寛人、櫻庭裕丈、河野通浩、秋山真志. アトピー性皮膚炎(AD)と好酸球性胃腸炎患者におけるフィラグリン遺伝子 (FLG) 変異の検討. 第79回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会. 2016.2.20-21. 京王プラザホテル、東京都.
 7. 赤坂英二郎、滝吉典子、松崎康司、櫻庭裕佑、是川あゆ美、会津隆幸、豊巻由香、中野 創、澤村大輔. Richner-Hanhart 症候群(高チロシン血症 型)の1例. 日本皮膚科学会岩手地方会第373回例会. 2016.2.6-7. 盛岡市民文化ホール、岩手県・盛岡市.
 8. 松崎康司. 当科における乾癬治療の現状とご紹介頂いた患者の治療経過. 第122回弘前皮膚科専門医会. 2015.11.25. ホテルニューキャッスル、青森県・弘前市.
 9. 赤坂英二郎、中野 創、皆川智子、六戸大樹、豊巻由香、松崎康司、澤村大輔. 新規ケラチン2遺伝子変異により生じた表在性表皮融解性魚鱗癬. 第30回角化症研究会. 2015.8.1. 経団連会館、東京都.
 10. Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Akasaka E, Mizukami H, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Mitsuhashi Y, Nakano H, Sawamura D. A case of oculocutaneous albinism complicated with squamous cell carcinoma, Bowen's disease, and actinic keratosis. AAD, 73rd Annual Meeting. 2015.3.20-24. San Francisco, USA.
 11. 松崎康司、神 可代、中野 創、澤村大輔、山口公平、中村典雄. 環状紅斑、紫斑を呈したクリオグロブリン血症性血管炎の1例. 第38回皮膚脈管・膠原病研究会.

2015.1.23-24. 国際医療福祉大学、東京都。

12. 六戸亜希子、松崎康司、中野 創、澤村大輔、横山祥平、森脇真一。色素性乾皮症バリエーション群の1例。青森地方会第368回例会。2014.11.16. ホテルニューキャッスル、青森県・弘前市。
13. Matsuzaki Y, YNishikawa Y, Rokunohe A, Nakano H, Sawamura D. CHARACTERIZATION OF STIMULATOR OF INTERFERON GENES (STING) EXPRESSION IN HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES. 弘前国際移植シンポジウム2014. 2014.10.31. 弘前大学、青森県・弘前市。
14. 金子高英、会津隆幸、松井彰伸、滝吉典子、六戸大樹、松崎康司、中野 創、澤村大輔、北山眞任、橋本 浩、廣田和美。複数の神経ブロックを併用して腋窩郭清を施行した重症型表皮水疱症の1例。第29回日本皮膚外科学会。2014.9.13-14. 和歌山マリーナシティ、和歌山県・和歌山市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50322946

(2)研究分担者

澤村大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号：60196334

(3)連携研究者
なし