

学位論文題名

CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration
via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes

(CTACK/CCL27による骨髄由来の表皮細胞の皮膚への誘導の促進)

学位論文内容の要旨

目的

重症型遺伝性疾患の多くは、遺伝子変異により正常な生体の維持に必要な分子の機能が損なわれ発症する。例えば皮膚科領域における遺伝性疾患として表皮水疱症があるが、この疾患では表皮・真皮結合に必須なタンパクを先天的に欠損するため、皮膚が脆弱で、弱い外力でも表皮・真皮結合部が解離し、皮膚に容易に水疱をきたす。そして、これらの疾患に対する有効な治療戦略として遺伝子治療の開発が待たれているが、実際に臨床応用するために克服すべき壁は多いことから、より汎用性の高い、新しい治療法が開発が望まれている。

近年、多くの臓器で骨髄幹細胞が個々の臓器細胞へ分化し、その可塑性が報告されている。皮膚においても、骨髄幹細胞の一部が表皮に遊走し、正常な表皮細胞へと分化することが予想される。すなわち表皮水疱症などの皮膚構成タンパク欠損症に正常骨髄を移植することで、正常な骨髄由来の正常な表皮細胞が患者において欠損したタンパク質を産生し、根本的治療となる可能性があると考えられる。

今回、骨髄幹細胞を誘導するには何らかの特定の因子があると考え、白血球遊走因子で創傷治癒に重要な役割を果たすとされるケモカインに着目し、骨髄幹細胞の表皮細胞への誘導、分化について検討した。

方法・結果

マウス正常皮膚および創傷皮膚におけるケモカインの発現を、RT-PCR、Western-blot、免疫染色にて検討したところ SDF (stromal cell-derived factor、別名 CXCL12)、SLC (secondary lymphoid tissue chemokine、別名 CCL21)、CTACK (cutaneous T-cell attracting chemokine、別名 CCL27) の発現を認めた。次に造血幹細胞であるマウスの骨髄 CD34 陽性細胞において、それぞれのケモカインに対するケモカインレセプター (CXCR4、CCR7、CCR10) の発現を FACS で解析したところ、それぞれのレセプターを発現している population が認められた。またマウスの骨髄を FACS で sorting した CD34 陽性細胞を用いたマイグレーションアッセイにおいても、それぞれのケモカインの細胞遊走能が認められた。さらに生体内における検討において、以下の3つの群について解析した：①骨髄のみを GFP-Tg マウス由来の細胞に置き換えた骨髄移植マウス、②その骨髄移植マウスに G-CSF 投与 (これにより骨髄 CD34 陽性細胞が循環血液中に多く動員される)、および③GFP-Tg マウスの骨髄を sorting した CD34 陽性細胞を正常マウスに静注投与。その後、①-③群のそれぞれのマウスに皮膚創傷を作成し、さら

にケモカインを創傷部に皮内投与し検討した。①群に比べ②③群において、表皮内に GFP 陽性かつケラチン（表皮細胞特異マーカー）を発現する細胞の増加が見られ、中でも CTACK 投与で、より増加していた。また、抗 CTACK 中和抗体を創傷皮膚へ投与したところ、骨髓由来の GFP 陽性細胞の数は減少した。以上より、CTACK は骨髓幹細胞をより多く、表皮へと誘導させ、分化誘導された骨髓由来の表皮細胞を増加させることが示された。

一方、大きなダメージを受けた組織は、修復する過程で骨髓由来の組織幹細胞が誘導されることで正常な組織として機能することが予想されている。従って皮膚においても同様に、大きな創傷部には骨髓由来の表皮細胞が多く誘導され、組織再生が促進すると考えられ、CTACK がその創傷治癒を促進する可能性について検討した。マウスに大きめの皮膚創傷を作成し、その周囲に CTACK を投与したところ、創傷治癒は有意に促進した。また、マウスの表皮細胞の増殖アッセイでは、CTACK 投与による表皮細胞の増殖は見られず、創傷皮膚の血管の増生は CTACK を投与しない群とは有意な差はなかった。以上より、CTACK 投与により、骨髓由来の表皮細胞がより多く誘導されることで創傷治癒が促進することが確認された。

結論

CTACK を骨髓幹細胞移植と組み合わせることで、健常人からの骨髓移植による先天性皮膚疾患治療に際して、皮膚に健常な骨髓由来表皮細胞が多く分化誘導され、根本的治療も可能となり得ることが期待される。また他臓器においても、それぞれのケモカインを同定することにより、より効率的な骨髓幹細胞を用いた再生医療が可能になると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes

(CTACK/CCL27による骨髄由来の表皮細胞の皮膚への誘導の促進)

目的

重症型遺伝性疾患の多くは、遺伝子変異により正常な生体の維持に必要な分子の機能が損なわれ発症する。例えば皮膚科領域における遺伝性疾患として表皮水疱症があるが、この疾患では表皮・真皮結合に必須なタンパクを先天的に欠損するため、皮膚が脆弱で、弱い外力でも表皮・真皮結合部が解離し、皮膚に容易に水疱をきたす。そして、これらの疾患に対する有効な治療は見つかっていない。

近年、多くの臓器で骨髄幹細胞が個々の臓器細胞へ分化し、その可塑性が報告されている。皮膚においても、骨髄幹細胞の一部が表皮に遊走し、正常な表皮細胞へと分化することが予想される。すなわち表皮水疱症などの皮膚構成タンパク欠損症に正常骨髄を移植することで、正常な骨髄由来の正常な表皮細胞が患者において欠損したタンパク質を産生し、根本的治療となる可能性があると考えられる。

今回、骨髄幹細胞を誘導するには何らかの特定の因子があると考え、白血球遊走因子で創傷治癒に重要な役割を果たすとされるケモカインに着目し、骨髄幹細胞の表皮細胞への誘導、分化について検討した。

方法・結果

マウス正常皮膚および創傷皮膚におけるケモカインの発現を、RT-PCR、Western-blot、免疫染色にて検討したところ SDF (stromal cell-derived factor、別名 CXCL12)、SLC (secondary lymphoid tissue chemokine、別名 CCL21)、CTACK (cutaneous T-cell attracting chemokine、別名 CCL27) の発現を認めた。次に造血幹細胞であるマウスの骨髄 CD34 陽性細胞において、それぞれのケモカインに対するケモカインレセプター (CXCR4、CCR7、CCR10) の発現を FACS で解析したところ、それぞれのレセプターを発現している population が認められた。またマウスの骨髄を FACS で sorting した CD34 陽性細胞を用いたマイグレーションアッセイにおいても、それぞれのケモカインの細胞遊走能が認められた。さらに生体内における検討において、以下の3つの群について解析した：①骨髄のみを GFP-Tg マウス由来の細胞に置き換えた骨髄移植マウス、②その骨髄移植マウスに G-CSF 投与 (これにより骨髄 CD34 陽性細胞が循環

血液中に多く動員される)、および③GFP-Tg マウスの骨髄を sorting した CD34 陽性細胞を正常マウスに静注投与。その後、①-③群のそれぞれのマウスに皮膚創傷を作成し、さらにケモカインを創傷部に皮内投与し検討した。①群に比べ②③群において、表皮内に GFP 陽性かつケラチン (表皮細胞特異マーカー) を発現する細胞の増加が見られ、中でも CTACK 投与で、より増加していた。また、抗 CTACK 中和抗体を創傷皮膚へ投与したところ、骨髄由来の GFP 陽性細胞の数は減少した。以上より、CTACK は骨髄幹細胞をより多く、表皮へと誘導させ、分化誘導された骨髄由来の表皮細胞を増加させることが示された。最後に、CTACK によって誘導された骨髄由来の表皮細胞が生理的に機能しているかを、創傷治癒の面から検討した。マウスに直径 1cm の皮膚創傷を作成し、その周囲に CTACK を投与したところ、創傷治癒は有意に促進した。また、マウスの表皮細胞の増殖アッセイでは、CTACK 投与による表皮細胞の増殖は見られず、創傷皮膚の血管の増生は CTACK を投与しない群とは有意な差はなかった。以上より、CTACK 投与により、骨髄由来の表皮細胞がより多く誘導されることで創傷治癒が促進することが確認された。

結論

CTACK を骨髄幹細胞移植と組み合わせることで、健常人からの骨髄移植による先天性皮膚疾患治療に際して、皮膚に健常な骨髄由来表皮細胞が多く分化誘導され、根本的治療も可能となり得ることが期待される。

主査の山本有平教授からは、SDF の *in vivo* と *in vitro* での結果の違い、CTACK の創傷治癒への影響の意義、副査の野々村克也教授からは、CTACK 分泌における上流の機序、CTACK とその他のケモカインによる相乗効果の期待、副査の清水 宏教授からは、今後の表皮水疱症の治療の期待などの質問などがあったが、申請者は大概適切な回答をした。

この論文は、再生医療の分野において、骨髄由来の表皮細胞が特定のケモカインにより、多く誘導されることで、創傷治癒が促進することが証明され、現在、有効な治療方法が無いとされる遺伝性皮膚疾患に対し根本的治療が可能となり得ると期待される点が評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。