

学位論文題名

Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice.

(骨髄移植は皮膚基底膜蛋白の発現を回復させ、
表皮水疱症モデルマウスの治療法となる)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

表皮水疱症(epidermolysis bullosa, EB)は、皮膚の構造蛋白遺伝子異常により生じる先天性皮膚疾患である。わずかな外力によって容易に水疱やびらんを形成し、重症型では生後数年以内に死亡する。現在までに根本的な治療法は確立されていないが、候補として①遺伝子治療、②蛋白補充療法、③細胞療法 の研究が進められており、このうち全身性に作用が期待できるものは細胞療法のみである。

我々のグループでは、マウスでの骨髄移植(BMT)モデルにおいて、骨髄由来細胞が皮膚の角化細胞へ分化しうることを示した(Inokuma et al, Stem Cells 2007)。また、骨髄に含まれる間葉系間質細胞(MSC)が角化細胞を含む種々の皮膚構成細胞へ分化しうることを示した(Sasaki et al, J Immunol 2008)。そこで、これら骨髄由来の角化細胞が正常角化細胞と同様に機能し、構成蛋白を発現するのであれば、幹細胞移植がEBの全身的な根本的治療になりうるのではないかと考えた。

これまで作成されたEBのモデルマウスはすべてが致死性であったが、近年我々が作成した接合部型EBモデルマウスは成体まで成長する確率が高く、種々の治療実験に用いることが可能である(Nishie et al., Nat Med 2006)。本マウスはヘミデスモソームを構成する膜貫通型蛋白である17型コラーゲン(COL17)ノックアウトマウスである。本研究では、骨髄由来細胞がCOL17のような皮膚構造蛋白を産生しうるか、また、BMTが本モデルマウスの治療法となり得るかについて検討した。

【材料と方法】

骨髄のドナーとして、主にGFPトランスジェニックマウスを用いた。骨髄由来細胞はドナーの大腿骨および脛骨より採取し、 $5-10 \times 10^7$ cells を経静脈的にX線照射済みのレシピエントマウスに移植した。4週間後に生着を確認した後に背部皮膚に創傷を作成し、上皮化した部分を採取して蛋白の発現を検討した。

欠損蛋白の発現については、COL17モノクローナル抗体を用いた皮膚切片からの免疫蛍光抗体法、RT-PCRによるCOL17 mRNAの検出、およびWestern blot法を用いて検討した。

BMTによる治療効果の検討として、移植60、90日後の臨床所見、自然発生びらんの範囲および移植後の生存率検討を行った。また移植60日後において、背部皮膚に人為的に外力を加え、生じたびらんの範囲を検討した。

BMTによる治療効果をもたらした細胞を同定するため、正常マウス由来の造血幹細胞(HSC)とMSCをそれぞれ採取し移植した。HSCはフローサイトメトリーで

c-Kit+Sca-1+Lineage-細胞をソートし、MSCは専用培地で骨髄細胞を培養し、フローサイトメトリーおよび *in vitro* 分化実験でMSCに矛盾しないことを確認した。これらと、支持細胞としてのCOL17ノックアウトマウス骨髄由来細胞とを混合し、放射線照射済みのレシピエントCOL17ノックアウトマウスに移植した。

また、ヒト造血幹細胞移植がEBの治療となりうるかを検討するため、ヒト臍帯血由来CD34+細胞を免疫不全NOGマウスに移植した。移植12週間後にヒト造血系の生着を確認し、背部に創傷を作成、上皮化した部分を採取して蛋白の発現を検討した。

【結果】

ドナー細胞由来角化細胞が皮膚構造蛋白を産生するか否かを検討するため、C57BL/6マウスにヒトCOL17トランスジェニックマウス(COL17^{tm+/h+})をドナーとする骨髄移植を施行したところ、8匹中4匹において上皮化皮膚においてヒトCOL17の発現が認められた。また、GFPマウスをドナーとし、レシピエントをCOL17ヒト化マウス(COL17^{tm+/h+})としたBMTにおいても、5匹中4匹で上皮化皮膚においてマウスCOL17の発現を認めた。移植後9ヶ月経過した時点でも3匹中2匹においてドナー由来マウスCOL17の発現を確認した。

次に、成体COL17ノックアウトEBモデルマウス(COL17^{tm/-})に対して、GFPマウスをドナーとするBMTを施行した。生着後の上皮化皮膚において、0.26% ± 0.08%のGFP+CD45-cytokeratin+細胞、すなわち骨髄由来の角化細胞が認められた。免疫蛍光抗体法、RT-PCRおよびWestern blot法においてCOL17の発現が確認された。電子顕微鏡観察において、移植群ではヘミデスモソームの成熟化および内側版の正常化がみられた。移植後60,90日後において、移植群は未治療群と比較して自然発生びらんや脱毛の程度が軽く、背部皮膚に人為的外力を加えた際に生じるびらんも減少した。Kaplan-Meier法において、移植後200日におけるBMT施行マウスの生存率は73.7%、未治療マウスは27.5% (n=17)であり。有意な生存率の向上がみられた(P=0.015)。

上記実験で移植された骨髄由来細胞にはHSCやMSCが含まれており、どちらが主にCOL17発現に寄与しているかを検討した。GFPマウス由来のHSCとMSCをそれぞれ、支持細胞とともにCOL17^{tm/-}マウスに移植したところ、どちらの移植マウスにおいてもCOL17が確認され、HSC、MSCともにCOL17発現に寄与している可能性が示された。

ヒト造血幹細胞移植がEBの治療となりうるかを検討するため、ヒト臍帯血由来CD34+細胞をNOGマウスに移植したところ、上皮化皮膚においてHLA class I陽性、ヒトcytokeratin陽性細胞が確認された(0.39 ± 0.15%, n=4)。免疫蛍光抗体法でわずかにヒトCOL17の基底膜への発現が確認され、RT-PCRではCOL17のほか、BPAG1, plectin, α6 integrinなど他のヒト皮膚基底膜構成蛋白のmRNA発現が確認された。

【考察】

BMTをはじめとする幹細胞移植療法は、血液疾患に対して広く臨床応用されているが、近年はムコ多糖症などの先天性代謝異常に対しても有効性が示されており、重篤な遺伝疾患に対して有望な治療法の一つとなりうる。EBは時に重篤な経過をとる遺伝性皮膚疾患であるが、幹細胞移植療法は、遺伝子治療など他の新規治療法と比較して大きく3つの利点が挙げられる。①幹細胞が生着することで、全身性かつ長期間の治療効果が期待できる ②現在血液疾患に対して行われている幹細胞療法の治療手技が応用可能であり、現実的な治療法となり得る ③それゆえ、遺伝子治療などと比較して倫理的障壁が低い。

今回の研究により、BMTが欠損した皮膚構成蛋白を産生し、EBモデルマウスに対する治療法となり得ることが示された。BMTのみならず、造血幹細胞移植やMSC輸注療法なども治療法になる可能性が示唆された。また、ヒト造血幹細胞がCOL17以外にも含む皮膚基底膜構成蛋白を産生しうることも示された。

【結論】

BMTをはじめとする幹細胞移植療法は皮膚基底膜蛋白の発現を回復させ、表皮水疱症の根本的治療法のひとつとなり得る。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 田 晋
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 野々村 克 也

学 位 論 文 題 名

Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice.

(骨髄移植は皮膚基底膜蛋白の発現を回復させ、
表皮水疱症モデルマウスの治療法となる)

表皮水疱症(epidermolysis bullosa, EB)は、皮膚の構造蛋白遺伝子異常により生じる先天性皮膚疾患である。わずかな外力によって容易に水疱やびらんを形成し、重症型では生後数年以内に死亡する。現在までに根本的な治療法は確立されていないが、候補として遺伝子治療、蛋白補充療法、細胞療法の研究が進められており、このうち全身性に作用が期待できるものは細胞療法のみである。近年、骨髄中に含まれる造血幹細胞(HSC)や間葉系間質細胞(MSC)が他の臓器の細胞へ分化する、すなわち多能性を有することが判明しており、角化細胞などの皮膚を構成する細胞への分化可能性も示唆されている。そこで本研究では、これらの幹細胞由来の表皮細胞が実際に機能し、正常な構造蛋白を産生するのであれば、骨髄移植がEBの根本的治療になり得るという発想の下で、EBモデルマウスを用いた治療可能性について検討を行った。

本研究では皮膚構造蛋白として、17型コラーゲン(COL17)に着目して検討を進めた。まず、ドナー細胞由来角化細胞が皮膚構造蛋白を産生するか否かを検討するため、C57BL/6マウスにヒトCOL17トランスジェニックマウス(COL17^{tg/+})をドナーとする骨髄移植を施行したところ、8匹中4匹において上皮化皮膚においてヒトCOL17の発現が認められた。また、GFPマウスをドナーとし、レシピエントをCOL17ヒト化マウス(COL17^{tg/+})とした移植実験においても、5匹中4匹で上皮化皮膚においてマウスCOL17の発現を認めた。

次に、成体COL17ノックアウトEBモデルマウス(COL17^{ko/+})に対して、GFPマウスをドナーとする骨髄移植を施行した。生着後の上皮化皮膚において、0.26%±0.08%の骨髄由来角化細胞が認められた。免疫蛍光抗体法、RT-PCRおよびWestern blot法においてCOL17の発現が確認された。電子顕微鏡観察において、移植群ではヘミデスモソームの成熟化および外側板の正常化がみられた。移植後60, 90日後において、移植群は未治療群と比較して自然発生びらんや脱毛の程度が軽く、背部皮膚に人為的外力を加えた際に生じるびらんも減少した。移植後200日におけるBMT施行マウスの生存率は73.7%、未治療マウスは27.5%であり、有意な生存率の向上がみられた(P=0.015)。

上記実験で移植された骨髄由来細胞にはHSCやMSCが含まれており、どちらが主にCOL17発現に寄与しているかを検討した。GFPマウス由来のHSCとMSCをそれぞれ、支持細胞とともにCOL17^{ko/+}マウスに移植したところ、どちらの移植マウスにおいても

COL17が確認され、HSC, MSCともにCOL17発現に寄与している可能性が示された。

ヒト造血幹細胞移植がEBの治療となりうるかを検討するため、ヒト臍帯血由来CD34+細胞をNOGマウスに移植したところ、上皮化皮膚においてHLA classI陽性、ヒトcytokeratin陽性細胞が確認された(0.39 ± 0.15%, n=4)。免疫蛍光抗体法でわずかにヒトCOL17の基底膜への発現が確認され、RT-PCRではCOL17のほか、BPAG1, plectin, α6 integrinなど他のヒト皮膚基底膜構成蛋白のmRNA発現が確認された。

野々村教授から、ヒトへ臨床応用する際の課題として考えられる、移植前処置の決定方法やドナーの選定、供給方法についての質問があった。また、今回のモデルマウスでの実験において全例で欠損蛋白が発現したのか、発現しない例では経過や予後がどうなったのかについて質問があった。次いで今村教授から、ミニ移植など他の幹細胞移植の有効性、および移植後に生じるGVHDの評価および対処方法について質問があった。最後に石田教授から、EBに対する免疫抑制剤使用の問題点について、また他の蛋白質が欠損したEBへの治療可能性について質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、現在の医療で施行されている代謝異常症患者への幹細胞移植療法に関する知見、米国で進められている7型コラーゲン欠損患者への幹細胞移植に関する報告、MSCを用いたEBの治療可能性およびGVHD抑制効果に関する知見、これまでの研究で明らかになった表皮への遊走分化因子に関する結果および論文等を引用し、おおむね適切に回答した。

この論文は、難治性の先天性皮膚疾患に対する幹細胞移植療法の可能性を開いた点で高く評価され、今後さらなる分子生物学的検討や新規治療法の発見および開発に繋がっていくものと期待される。

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。