

図 6: GFP 骨髄移植マウス背部皮膚に移植した表皮水疱症マウス皮膚表皮細胞のフローサイトメトリー解析

(4) 骨髄由来表皮角化細胞による再生皮膚基底膜領域への VII 型コラーゲン供給の有無について、GFP 陽性骨髄由来角化細胞が存在する植皮部皮膚基底膜領域を免疫組織学的に検討した結果、GFP 陽性骨髄由来角化細胞の局在とほぼ一致して、欠損していた VII 型コラーゲンが供給されていることが確認された(図 7)。

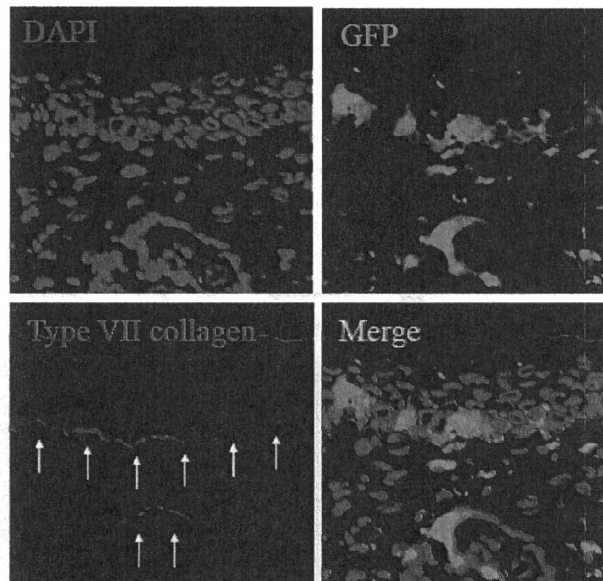


図 7: 骨髄由来表皮細胞による皮膚基底膜部への VII 型コラーゲン供給

3) 結論

以上の結果から、表皮水疱症皮膚再生機序に骨髄由来表皮細胞が寄与すること、

骨髄由来表皮細胞は皮膚基底膜部に VII 型コラーゲンを供給し得ることが明らかとなった。

5.1.2. マウスモデルを用いた骨髄由来表皮細胞の骨髄内起源探索

1) 方法

表皮水疱症皮膚に骨髄由来角化細胞を供給している骨髄内細胞起源を探索するために、新生仔マウス皮膚を生理食塩水 1mL に 24 時間浸した溶液をシリコンチューブ(長さ: 8mm、内径: 3mm) に充填後、GFP 骨髄移植マウス背部皮下に移植し、表皮水疱症における水疱部と類似した溶液環境を作成した。移植 7 週間後にシリコンチューブを回収し、チューブ内溶液中に集積した GFP 陽性骨髄由来細胞の性質を検討した。

2) 結果

(1) 回収したシリコンチューブ内に多数の GFP 陽性骨髄由来細胞が存在することが明らかとなった(図 8)。また、チューブ内に集積した骨髄由来細胞 (tube-entrapped cells: TECs) をプラスチックシャーレ上で培養した結果、付着性増殖細胞は、殆どすべてが GFP 陽性骨髄由来細胞であることが確認された (図 8)。

(2) 移植チューブより回収した GFP 骨髄由来付着細胞の培養上清中に新生マウス皮膚抽出液を添加した結果、GFP 陽性/ケラチン 5 陽性細胞の表皮角化細胞への分化が確認された。すなわち、表皮角化細胞への分化能を有する骨髄由来表皮前駆細胞が皮膚抽出液を含むチューブ内に集積していることが確認された (図 9)。

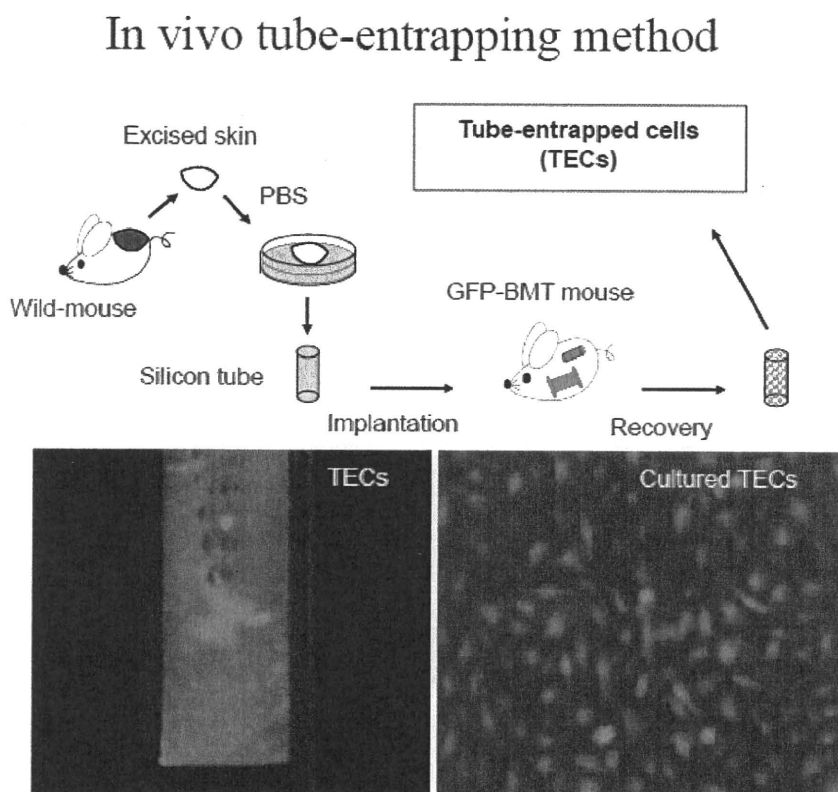


図 8 : 新生仔マウス皮膚抽出液含有チューブ内に集積する GFP 骨髄由来付着細胞

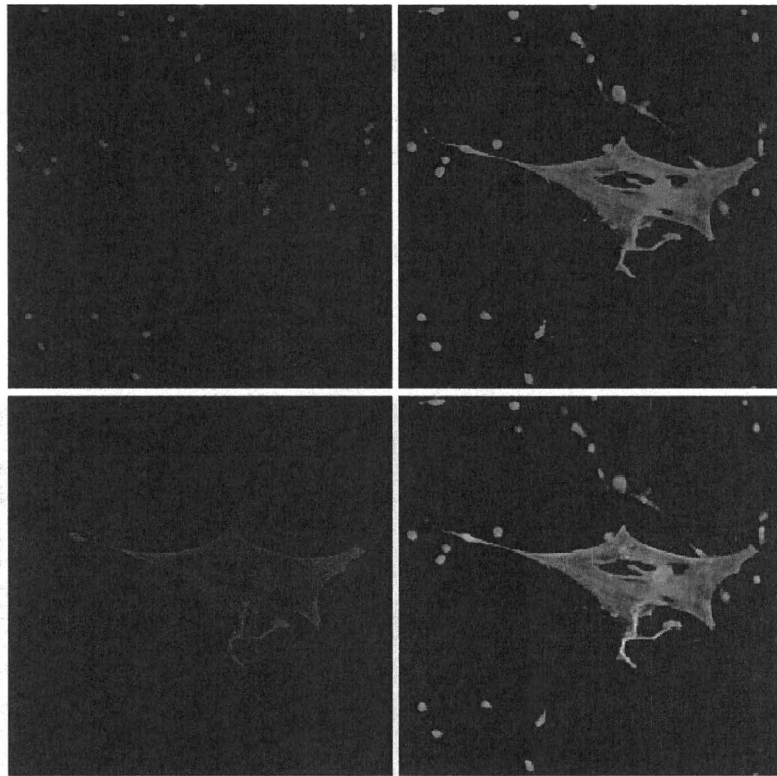


図9：TECs中に存在する骨髄由来培養表皮前駆細胞

(3) チューブ内に動員された細胞分画をフローサイトメトリーにより検討した結果、チューブ内細胞の約20%が間葉系幹細胞のマーカーであるPDGFR α 陽性骨髄由来細胞である事が認められた(図10)。一方、骨髄内細胞(bone marrow cells: BMCs)ではPDGFR α 陽性細胞は0.1%未満であった(図10)。これらの結果から、チューブ内に遊走した骨髄由来表皮前駆細胞が骨髄間葉系幹細胞由来である可能性を仮定した。

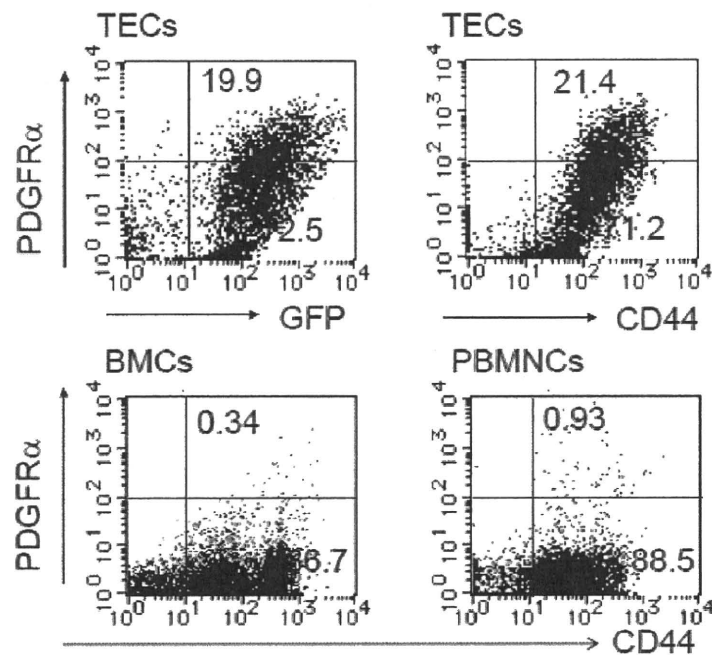


図10：TECsのフローサイトメトリー解析結果

(4) PDGFR α 陽性骨髄細胞が骨髄由来表皮細胞の起源であることを確認する目的で、PDGFR α 陽性/GFP 陽性骨髄細胞と PDGFR α 陰性/GFP 陰性骨髄細胞のキメラ骨髄細胞を移植した P+G+/P-G-骨髄移植マウスを作成し、その背部に表皮水疱症マウス皮膚を移植した。その結果、再生した表皮内に PDGFR α 陽性骨髄細胞由来である GFP 陽性表皮細胞が多数存在することが示され、骨髄由来表皮細胞は骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を起源とすることが明らかとなった (図 11)。

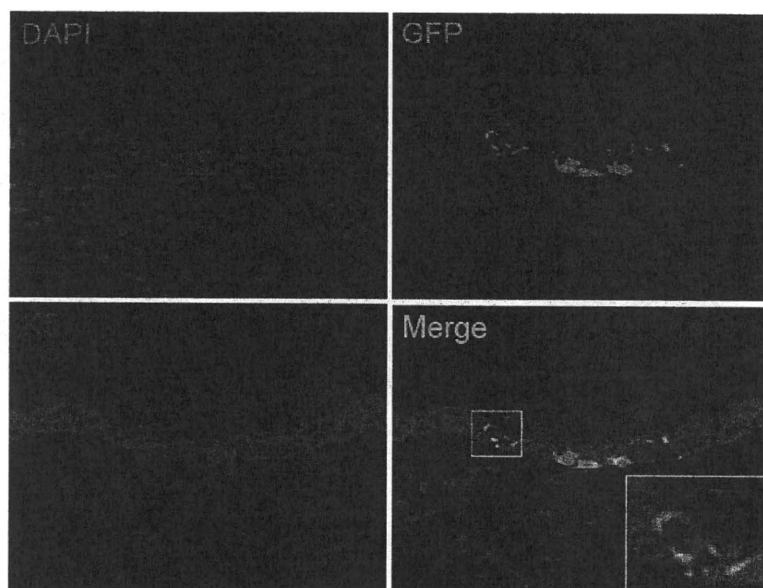


図 11: 表皮水疱症マウス再生表皮内の PDGFR α 陽性/GFP 陽性骨髄細胞由来表皮細胞の同定

3) 結論

以上の結果から、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞が骨髄由来表皮細胞の起源であることが明らかとなった。

5.1.3. マウスを用いた骨髄内 PDGFR α 陽性細胞の性質検討

1) 方法

PDGFR α 遺伝子のプロモーター下流にヒストン H2B 遺伝子と GFP 遺伝子の融合遺伝子 (H2B-GFP) をノックインした PDGFR α -H2BGFP マウスから骨髄細胞を採取し、核内 GFP 陽性細胞の性質について、フローサイトメトリーにより解析した。また、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を培養し、間葉系細胞および表皮細胞への分化能を検討した。

2) 結果

(1) 骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は、血球系分化マーカーである Lineage および未分化造血幹細胞マーカーである c-kit がいずれも陰性であることが明らかとなり、造血系細胞では無いことが示された (図 12)。

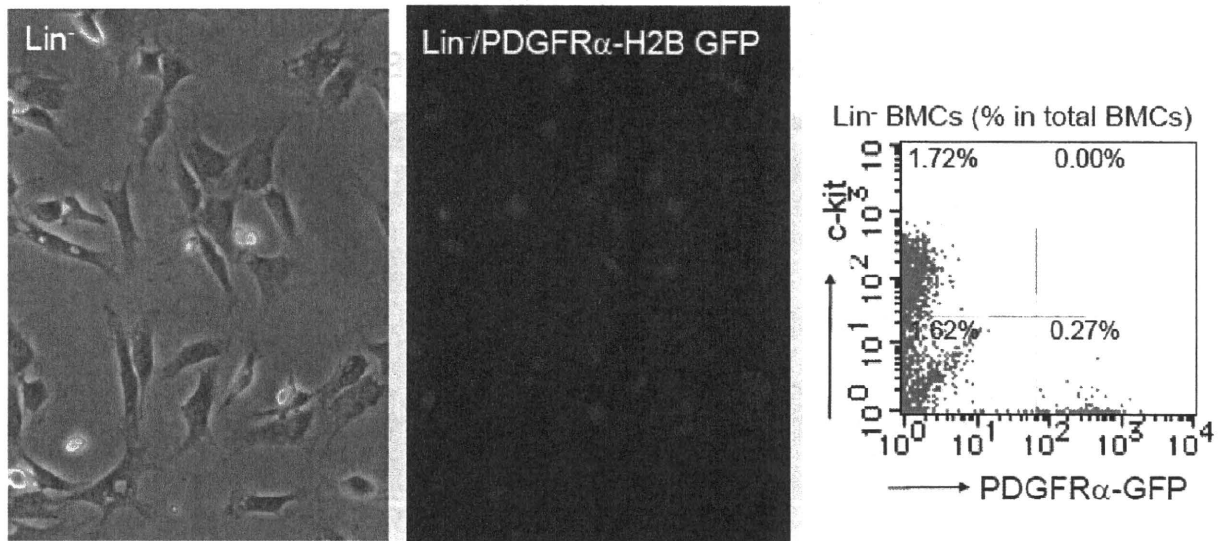


図 12 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来骨髄細胞の培養およびフローサイトメトリー解析

(2) 骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺陽性細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を有することが明らかとなり、間葉系幹細胞としての性質を有することが示された (図 13)。さらに、表皮細胞分化誘導培地で培養を行った結果、ケラチン5 陽性細胞の出現を確認し、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は間葉系のみならず外胚葉由来である表皮角化細胞へと分化し得る、多能性幹細胞であることが示唆された (図 14)。

Lin⁻/PDGFR α ⁺ bone marrow cells

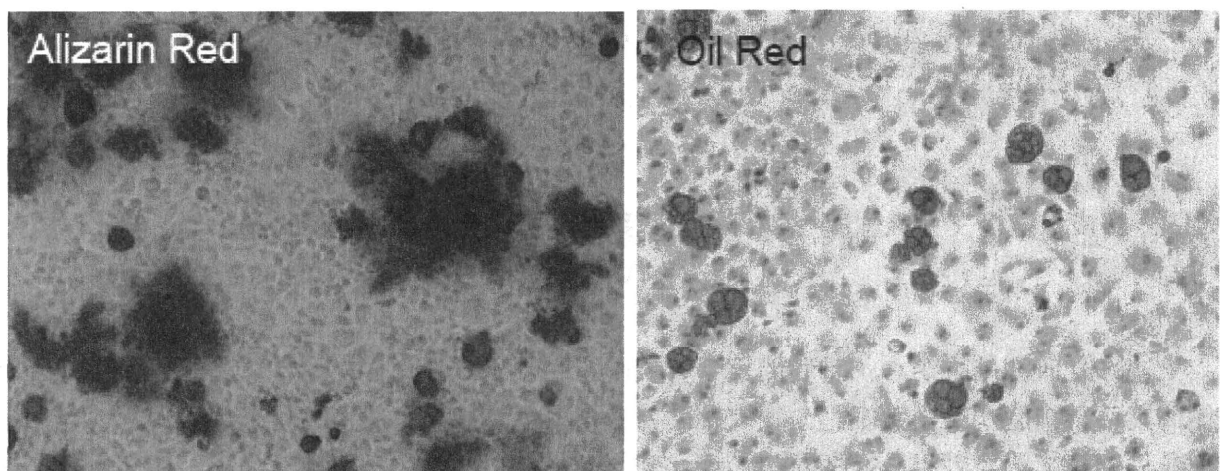


図 13 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄細胞の間葉系細胞への多分化能。(左 : alizarin red 陽性骨芽細胞、右 : oil red 陽性脂肪細胞)、

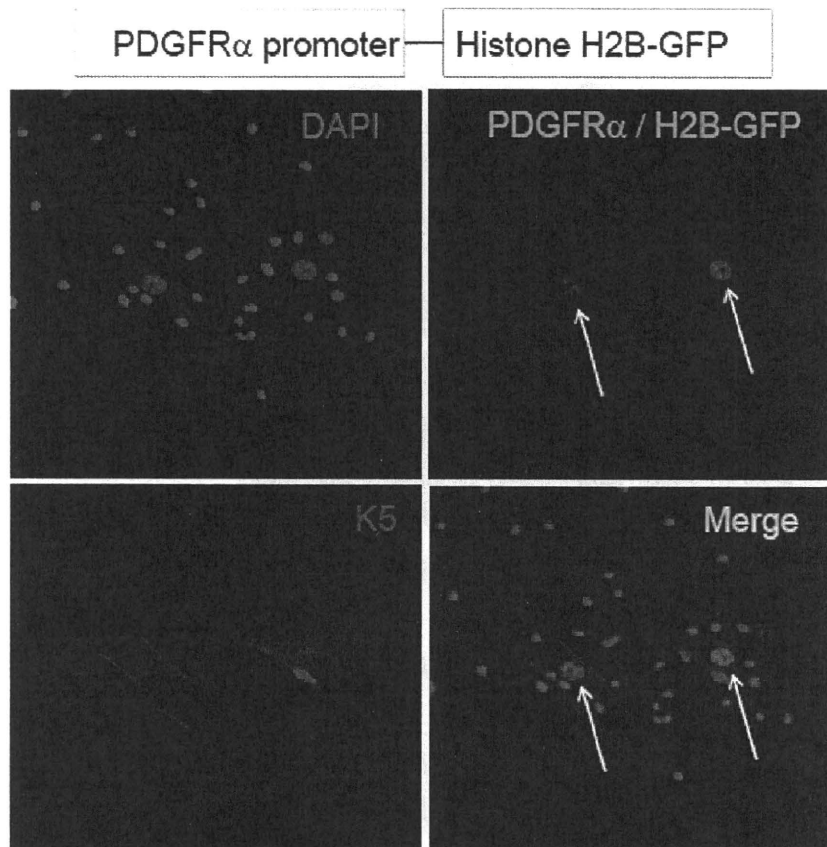


図 13 : PDGFR α -H2BGFP マウス由来 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄細胞の表皮細胞分化能

3) 結論

以上の結果から、骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺骨髄間葉系幹細胞が表皮細胞の起源であることが明らかとなった。

5.1.4 表皮水疱症マウス皮膚への骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果検討

(Alexeev V and Uitto J *et al.* *Cytherapy* 2011;13:30-45)

上述した研究結果から、骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症皮膚に移植することにより、移植間葉系幹細胞が線維芽細胞や表皮細胞に分化し、皮膚基底膜領域に欠損している接着分子を供給して治療効果を発揮することが予想された。我々の共同研究者で、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲンノックアウトマウスを開発して我々に提供してくれた米国フィラデルフィア、ジェファーソン医科大学皮膚科主任教授の Jouni Uitto 博士は、我々の研究成果を基にして、VII 型コラーゲンノックアウトマウス背部にマウス間葉系幹細胞 (5×10^5 個) を皮下移植し、その治療効果を検討した。その結果、移植した間葉系幹細胞は皮膚に生着し、基底膜部位に欠損していた VII 型コラーゲンを供給し、皮膚の病態を著明に改善することを明らかにした (図 14)。

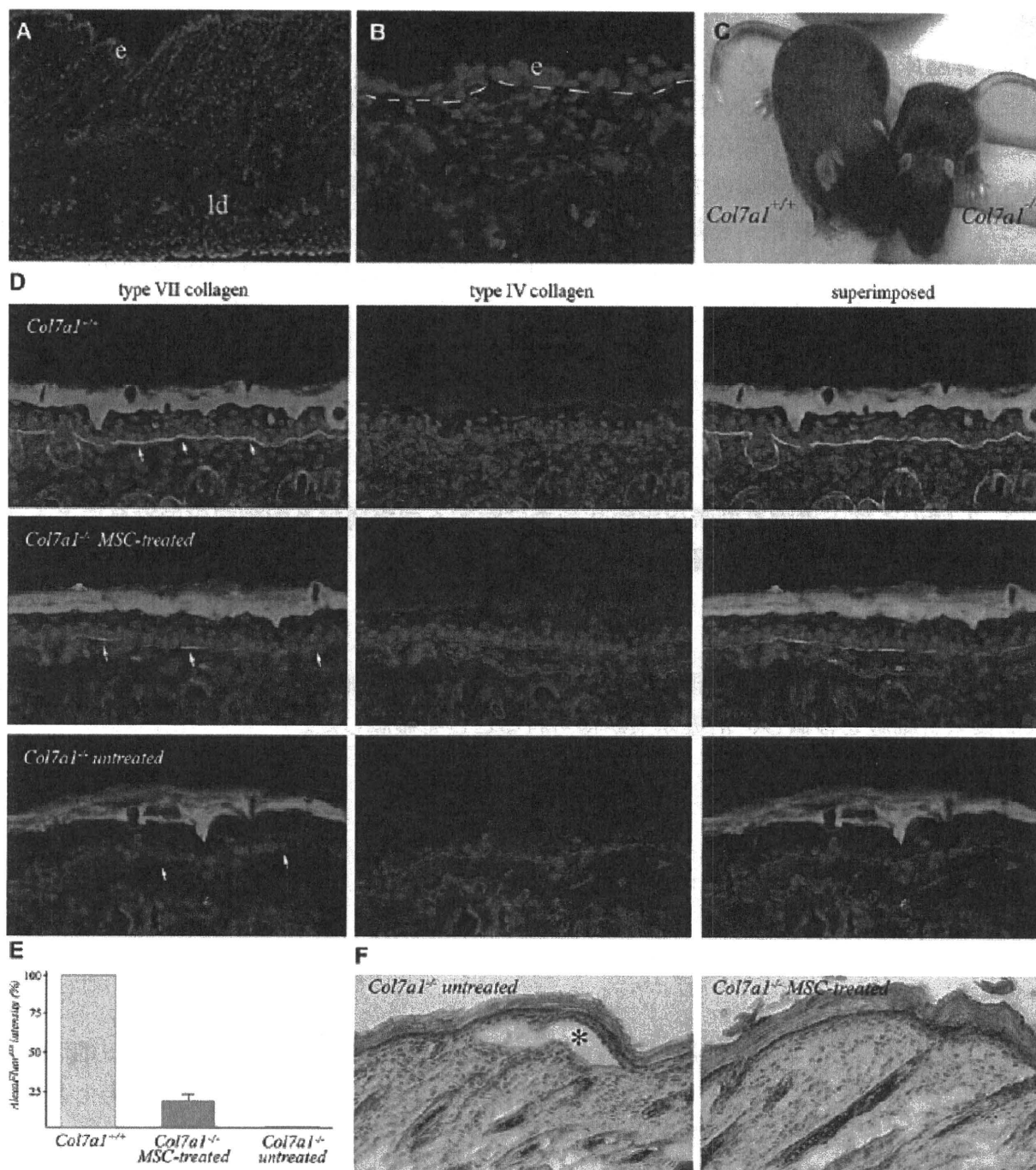


図 14：栄養障害型表皮水疱症モデルマウス皮膚への間葉系幹細胞移植治療効果

A, B: 皮下移植した間葉系幹細胞 (赤色蛍光) の生着、C: 移植後のマウス (左; 野生型、右; VII 型コラーゲンノックアウトマウス)、D: 間葉系幹細胞移植治療効果 (上段; 野生型マウス皮膚、中段; 間葉系幹細胞移植後の VII 型コラーゲンノックアウトマウス、下段; 未治療の VII 型コラーゲンノックアウトマウス、左列; VII 型コラーゲン、中列; IV 型コラーゲン、右列; Merge)、E: 基底膜部の VII 型コラーゲン発現量定量 (左; 野生型 100%、中; 骨髄間葉系幹細胞移植後 VII 型コラーゲンノックアウトマウス 20%、右; 未治療 VII 型コラーゲンノックアウトマウス 0%)、F: 骨髄間葉系幹細胞移植による表皮水疱症マウス皮膚水疱形成抑制 (左; 移植前、右; 移植後、* 水疱)

5.1.5 非臨床試験のまとめ

上述した基礎研究により、骨髄内 Lin⁻/PDGFR α ⁺/c-kit⁻ 細胞は造血幹細胞とは独立して骨髄内に間葉系幹細胞として存在し、表皮水疱症における皮膚損傷に応答して骨髄内から流血中へと動員され、表皮剥離部で角化細胞へと分化して表皮再生に寄与していることが明らかとなった。これらの結果を基に骨髄間葉系幹細胞（ 5×10^5 個）を栄養障害型表皮水疱症モデルマウス（VII 型コラーゲン欠損マウス）皮下に移植した結果、移植間葉系幹細胞が皮膚構成細胞に分化して基底膜部に VII 型コラーゲンを供給し、表皮水疱症の病態を改善することが明らかとなった。

5.2. 臨床成績

5.2.1. 2 例の劣性栄養障害型表皮水疱症患者に対する同種間葉系幹細胞皮内投与による VII 型コラーゲンの補充と慢性潰瘍の再上皮化

(Conget P, Rodriguez F, *et al.* Cytotherapy 2010;12:429-431)

VII 型コラーゲンが完全欠損した劣性栄養障害型表皮水疱症患者に培養他家骨髄細胞由来間葉系幹細胞を移植し、治療効果が得られることを確認した。

詳細を以下に示す。

1) 対象患者

1 例目：25 歳の女性

2 例目：13 歳の男性

2) 方法

背部の健常部皮膚と四肢の慢性創傷周囲の潰瘍部皮膚に対し、 0.5×10^6 個の間葉系幹細胞（治療部）とコントロールとして賦形剤（コントロール部）を皮内投与した。

間葉系幹細胞は、非血縁者の成人健常人女性の骨髄から採取した。

3) 結果

1 例目での移植 1 週後のコントロール部では水疱の形成が認められた。免疫組織化学検査による VII 型コラーゲンの発現はほとんどなく、ケラチン生成細胞と線維芽細胞の細胞質が染色されていた。一方、治療部では連続した真皮-表皮結合が認められ、免疫組織学検査によって基底膜部位が認められた。

治療部において移植 1 週後から創傷の再上皮化が認められ、12 週後にはほぼ治癒した。再生された表皮は真皮と強固に結合し、痒みや機械的応力による水疱形成を起さず、移植 4 カ月後まで治療効果が持続していた。一方、コントロール部では創傷の治癒は認められなかった。

本試験を通じて、急性の有害事象はみられなかった。

2 例目においても、1 例目と同様の結果が得られた。

4) 考察

同種間葉系幹細胞を皮内投与することにより、真皮-上皮結合部の VII 型コラーゲンの補充、水疱形成の防止、創傷治癒の改善が認められた。また、この治療による急性の有害事象は認められず、安全に行えるものと考えられる。

再生医療
Regenerative
Medicine

日本再生医療学会雑誌

医療

2011

5

Vol.10 No.2

別刷

メディカルレビュー社

〒541-0045 大阪市中央区道修町1-5-18 朝日生命道修町ビル TEL 06-6223-1469 FAX 06-6223-1245
〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 湯島ファーストビル TEL 03-3835-3049 FAX 03-3835-3075

患者まで届いている

再生医療

骨髄細胞による 生体内皮膚再生メカニズムを利用した 表皮水疱症の再生医療開発

*Development of regenerative medicine for epidermolysis bullosa
based on bone marrow-dependent epithelial regeneration mechanism*

玉井 克人

Tamai, Katsuto

大阪大学大学院医学系研究科 再生誘導医学

Department of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University

E-mail: tamai@gts.med.osaka-u.ac.jp

Key words

表皮水疱症／皮膚基底膜／骨髄移植／間葉系幹細胞／HMGB1

Summary

Heritable blistering skin disease, ie, epidermolysis bullosa (EB), comprises of a group of disorders caused by mutations in genes expressed in the cutaneous basement membrane zone. Previous studies have demonstrated that both embryonic and postnatal transplantation of bone marrow cells in EB model mice promote skin wound healing and correct the intrinsic basement membrane defect. A recent clinical trial of allogeneic whole BM transplantation in recessive dystrophic EB (RDEB) patients has demonstrated that BM cells can repair the skin and restore the defected type VII collagen in skin basement membrane. Similar therapeutic effect was also obtained by intradermal administration of cultured allogeneic mesenchymal stromal cells in RDEB patients. Most recently, we reported that detached EB epithelia was shown to release high mobility group box 1 (HMGB1) to mobilize the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α)-positive cells from bone marrow to target and regenerate the blistered epithelia of EB mice.

はじめに

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa : EB) は、皮膚基底膜領域の接着構造遺伝子の異常により表皮・真皮間の接着機能が破綻し、日常生活の軽微な外力で表皮が基底膜レベルで剥離して全身熱傷様の水疱、潰瘍を

形成する遺伝性水疱性皮膚難病である¹⁾ (図1)。遺伝子異常を正常化する安全かつ確実な方法論が確立していないため、表皮水疱症の根治的治療法はいまだない。しかし、近年骨髄幹細胞が皮膚構成細胞へと分化する能力をもつこと、生体内で骨髄由来細胞が表皮再生に寄与していることが明らかとなり^{2)・4)}、骨髄移植、骨

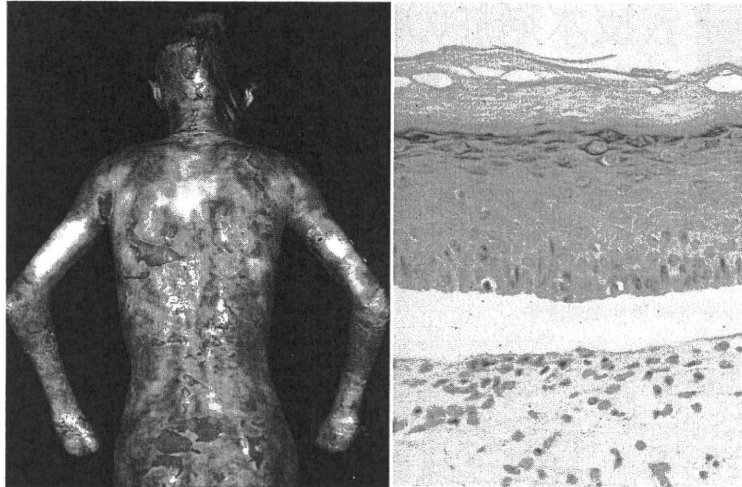


図1 表皮水疱症の臨床像(劣性栄養障害型)と水疱部の組織像
(→巻末Color Gravure 参照)

髄幹細胞移植による表皮水疱症の再生医療が開発されつつある⁵⁾⁻¹⁰⁾。本稿では、表皮水疱症に対する再生医療について最近の基礎および臨床研究状況をまとめ、将来の新たな治療法開発の可能性を展望する。

表皮水疱症の病態

皮膚基底膜領域の接着は、表皮(epidermis)から真皮(dermis)に連続する一連の接着構造で維持されている。電顕レベルでは、表皮細胞の細胞骨格であるトノフィラメント(tonofilament)が表皮基底細胞膜底面でヘミデスモゾーム(hemidesmosome)と連結し、ヘミデスモゾームは細胞外で係留細線維(anchorin filament)を介して基底膜(basement membrane)と連結し、さらに基底膜は係留線維(anchorin fibril)により真皮と連結している(図2)。分子レベルでは、トノフィラメントはケラチン5(keratin 5: K5)とケラチン14(keratin 14: K14)のヘテロダイマーで構成され、ヘミデスモゾームはケラチンを結合するアンカー蛋白であるプレクチン(plectin)およびBP230(230kDa bullous pemphigoid antigen), 細胞膜貫通蛋白である $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン($\alpha 6 \beta 4$ integrin)およびXVII型コ

ラーゲン(180kDa bullous pemphigoid antigen: BP180)で構成される。これら膜貫通蛋白の細胞外ドメインは係留細線維を構成し、基底膜構成蛋白であるラミニン332(laminin332)およびIV型コラーゲン(type IV collagen)と結合する。基底膜を真皮に繋ぐ係留線維はVII型コラーゲン(type VII collagen)で構成される。VII型コラーゲンはN末端でラミニン332と基底膜内で結合し、C末端ではもう1つのVII型コラーゲンと結合しており(アンチパラレルダイマー)、真皮マトリックスの主成分であるI型コラーゲンを縫うように基底膜に繋げている。

表皮水疱症は、前述した蛋白分子いずれかの遺伝子変異によりその分子の欠損ないし機能異常が生じ、その分子が機能しているレベルで外力による表皮剥離が生じて水疱や潰瘍が形成される¹⁾。トノフィラメントやヘミデスモゾームの異常で表皮内水疱を認めた場合は単純型(EB simplex: EBS), 係留細線維や基底膜の異常で表皮・基底膜間(接合部)水疱を認めた場合は接合部型(junctional EB: JEB), 係留線維の異常で基底膜下に真皮内水疱を認めた場合は栄養障害型(dystrophic EB: DEB)に分類される。わが国の表皮

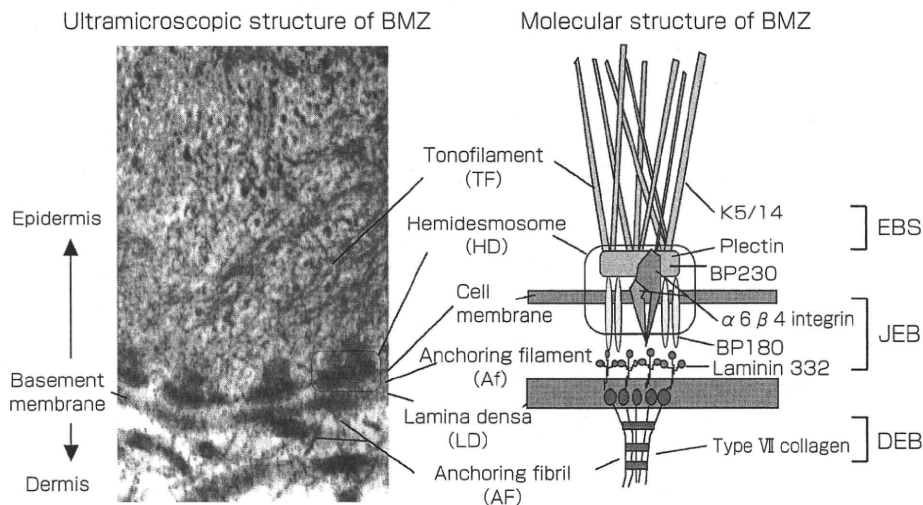


図2 皮膚基底膜領域の接着構造と表皮水疱症の関係 (→巻末 Color Gravure 参照)

水疱症症例数はおおよそ700例程度と推定され、単純型、接合部型、栄養障害型の比率はおおよそ4:1:5で栄養障害型が最も多い。

前述した表皮水疱症の病態に関わる基底膜蛋白群はいずれも表皮細胞により産生され、基底膜領域に供給されている。唯一、Ⅶ型コラーゲンのみ線維芽細胞も産生し得ることが知られているが、生体皮膚での主要供給源は表皮細胞であると考えられている。すなわち、表皮水疱症を根治的に治療するためには、遺伝子異常により破綻している表皮細胞の基底膜分子産生機能を正常化しなくてはならない。

骨髄由来細胞による 剥離表皮再生メカニズム

表皮水疱症では基底層から角層まで表皮全層が剥離するため、基底層に存在する表皮幹細胞は剥離表皮と共に喪失してしまう(図1)。表皮剥離による潰瘍面積が小さい場合は周囲の表皮幹細胞から潰瘍面に供給される表皮細胞により欠損表皮は再生すると思われる。しかし、広範囲に及ぶ表皮剥離を繰り返し生じる重症劣性栄養障害型の場合(図1)、経過と共に大量

の表皮幹細胞を喪失するにもかかわらず表皮再生機序が保たれていることから、表皮外組織から剥離表皮部へ表皮幹/前駆細胞を供給する生体内メカニズムが存在することが予想される。皮膚外組織から皮膚構成細胞へと分化可能な多能性幹細胞供給システムが存在すれば、表皮水疱症における剥離表皮再生機序の解明のみならず、他家幹細胞移植による表皮水疱症治療が可能になる。

これまで我々は、表皮水疱症における剥離表皮再生機序として、表皮細胞への分化能をもつ多能性幹細胞が骨髄内に存在し、剥離表皮が産生する因子により血中動員され、末梢循環を介して損傷部皮膚に集積し、皮膚環境で表皮細胞へと分化して剥離表皮再生に寄与している可能性を予想して研究を進めてきた。はじめに我々は、緑色蛍光蛋白GFP (green fluorescent protein) 遺伝子トランスジェニックマウスから骨髄細胞を採取し、Ⅶ型コラーゲン欠損マウス(栄養障害型表皮水疱症モデルマウス)の胎仔循環に移植して、移植骨髄細胞の再生皮膚への寄与を検討した。胎生期は免疫寛容が維持されており、外来抗原であるGFPを発現する移植骨髄細胞に対する免疫反応を回避できた

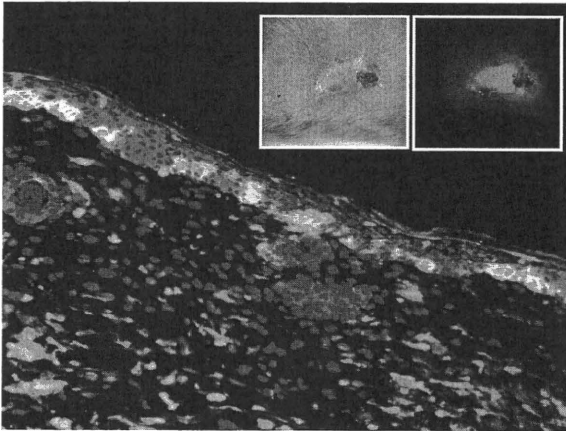


図3 GFP 骨髄移植マウス背部に移植したⅦ型コラーゲン欠損マウス皮膚(枠内)とその組織像
(→巻末 Color Gravure 参照)
多数の骨髄由来表皮細胞や骨髄由来間葉系細胞(線維芽細胞?)が観察される (文献8より引用)

め、放射線照射や免疫抑制剤投与なしに、より生理的環境に近い状況で移植細胞の動態を観察できる。その結果、胎生循環に移植したGFP陽性骨髄細胞は末梢循環を介して皮膚に遊走し、線維芽細胞に分化して基底膜部にⅦ型コラーゲンを供給すること、その結果Ⅶ型コラーゲン欠損マウスの皮膚病態は改善し、新生マウスの生存率を向上させることが明らかとなった⁵⁾。興味深いことに、野生型マウス胎生循環に移植したGFPトランスジェニック骨髄細胞も末梢循環を介して正常皮膚に集積し、線維芽細胞に分化して出生後長期間皮膚に生着していた⁵⁾。このことは、末梢循環に骨髄由来間葉系細胞が存在すれば、少なくとも胎生期には生理的環境下でも皮膚に遊走し、線維芽細胞に分化して皮膚の発生、恒常性維持に寄与している可能性を示唆している。

しかし、胎生期骨髄細胞移植実験では、移植骨髄細胞由来表皮細胞の存在は確認し得なかった。それでは、移植骨髄細胞は表皮水疱症における剥離表皮再生に寄与しないのであろうか。この疑問を解決する目的で、次に我々は致死量放射線照射した成熟マウスにGFP

トランスジェニック骨髄細胞を移植した後、その背部皮膚に生後数日で死亡するⅦ型コラーゲン欠損マウスの新生仔皮膚を移植し、生着後に生じる剥離表皮の再生機序における移植GFP骨髄細胞の寄与を検討した⁸⁾。その結果、驚いたことに移植皮膚片における剥離表皮再生過程で、約10%の表皮細胞が骨髄由来表皮細胞で置換され、皮膚基底膜部に欠損していたⅦ型コラーゲンを供給していることが明らかとなった⁸⁾(図3)。

以上の一連の研究結果により、骨髄移植により栄養障害型表皮水疱症の治療が可能であることが初めて示された。さらに我々は骨髄細胞由来表皮再生メカニズム解明研究を進めた結果、Ⅶ型コラーゲン欠損マウス剥離表皮から循環血液中に放出されるHMGB1 (high mobility group box 1) が骨髄内PDGFR α 陽性細胞を刺激して血中に動員すること、血中動員された骨髄由来PDGFR α 陽性細胞は剥離表皮部に集積すること、剥離表皮部に集積したPDGFR α 陽性細胞は真皮内では線維芽細胞に、表皮内では表皮細胞に分化して皮膚再生を誘導していることが明らかとなった⁸⁾(図4)。さらに、重症劣性栄養障害型表皮水疱症患者の血液中のHMGB1濃度は健康人に比較して数十倍の高濃度であったことから⁸⁾、患者皮膚においても骨髄由来細胞による表皮再生機序が機能している可能性が示唆される。

マウス骨髄内PDGFR α 陽性細胞には間葉系幹細胞が含まれることが報告されている。近年、わが国の研究者らにより、これらPDGFR α 陽性間葉系幹細胞には外胚葉由来と中胚葉由来の2種類が存在し、前者は後者に比較して外胚葉由来組織である神経への分化能を保持していることが相次いで報告された¹¹⁾¹²⁾。表皮細胞は神経細胞と同様に外胚葉由来であることから、我々が観察した表皮細胞への分化能をもつPDGFR α 陽性細胞は外胚葉由来間葉系幹細胞であると予想される。

一方、北海道大学清水教授のグループは、接合部型

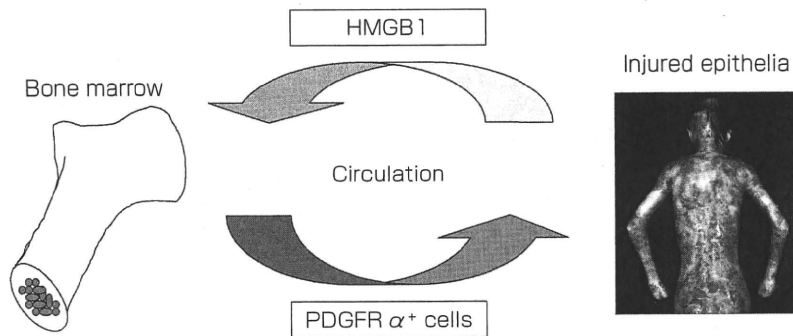


図4 損傷皮膚と骨髓のクロストーク

表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲン欠損マウスに致死量放射線照射をした後に GFP トランスジェニック骨髓細胞を移植することにより、骨髓由来 GFP 陽性細胞による表皮再生と皮膚基底膜部への VII 型コラーゲン供給を確認し、骨髓移植による接合部型表皮水疱症治療の妥当性を明らかにしている⁷⁾。

最近、東北大学出澤教授のグループは、ヒトおよびマウスの骨髓および皮膚組織内に外胚葉、中胚葉、内胚葉のいずれの組織にも分化可能な多能性幹細胞が存在することを見出し、ミューズ細胞 (Muse cell) と命名した¹³⁾。骨髓内ミューズ細胞と間葉系幹細胞の関係は不明であるが、三胚葉由来組織に分化可能なミューズ細胞は骨髓内で造血幹細胞や間葉系幹細胞を供給している可能性もある。表皮水疱症剥離表皮再生に寄与する骨髓内細胞起源として、ミューズ細胞は極めて興味深い。

表皮水疱症に対する骨髓移植

米国ミネソタ大学の研究グループは、昨年世界で初めて栄養障害型表皮水疱症に対する骨髓移植実施例 (7 例) を報告した⁹⁾。具体的には、15 ヶ月～14.5 歳まで (平均 5.9 歳) の栄養障害型表皮水疱症に罹患した小児患者を選択し、化学療法 (busulfan 0.8mg/kg) により骨髓細胞を減少させた後、HLA の完全一致した兄弟姉妹由来骨髓細胞 (1 例のみ非血縁者由来、HLA-B

遺伝子ミスマッチ) を移植した。1 例は、移植直前に合併症 (拡張型心筋症) で死亡したが、他の 6 例はいずれも皮膚症状の有意な改善 (水疱数および潰瘍面積の減少、外力に対する抵抗性増強) を認めた。また移植 100～200 日目前後で生検した皮膚組織では基底膜部の VII 型コラーゲン発現増強が全例で確認され、10～30% 程度 (平均約 20%) のドナー/レシピエント・キメラ率が確認された。性ミスマッチドナー由来骨髓を移植した症例の生検皮膚組織で行った性染色体 FISH による解析では、ドナー由来造血系細胞 (CD45 陽性) は真皮内血管周囲に多く局在しており、一方 CD45 陰性かつ CD31 陰性ドナー細胞 (非造血系かつ非血管系細胞) は真皮乳頭部 (表皮との境界部) と表皮内に存在していた。これらの細胞の詳細な性質は不明である。なお、HLA-B 遺伝子ミスマッチの症例では次第に移植骨髓細胞は拒絶され、移植 183 日目に敗血症により死亡した。

この臨床研究では、エントリーした症例はいずれも VII 型コラーゲン完全欠損症例ではなく、変異 VII 型コラーゲンを基底膜部に発現している症例を選択している。そのため骨髓移植後に基底膜部で増加している VII 型コラーゲンが患者由来かドナー細胞由来かについて結論は出ていない。ドナー骨髓細胞由来 VII 型コラーゲンが臨床症状の改善に寄与しているかどうかについては、VII 型コラーゲン完全欠損である重症例に対する骨

髄移植が有効であった場合に証明される。しかし、全身広範囲皮膚に潰瘍をもつ重症表皮水疱症では免疫抑制剤使用により敗血症の合併率が高くなることが予想される。表皮水疱症に対する骨髄移植治療がスタンダードな治療法として定着するためには、より安全な骨髄移植治療プロトコルの検討が必要である。

表皮水疱症に対する 骨髄間葉系幹細胞移植

南米チリの研究グループは、Ⅶ型コラーゲンが完全欠損している重症劣性栄養障害型表皮水疱症の2症例に対して、血縁関係のない健常者由来の培養骨髄間葉系幹細胞を潰瘍部周囲に皮下移植した¹⁰⁾。その結果、極めて難治であった皮膚潰瘍の再上皮化が促進され、また間葉系幹細胞移植1週間後には移植部皮膚の基底膜部にⅦ型コラーゲンが供給されていることが明らかとなった¹⁰⁾。しかし、移植5ヵ月目頃から徐々に移植部皮膚に水疱形成が再燃し、同時に皮膚基底膜部のⅦ型コラーゲン発現が減弱していることが確認された¹⁰⁾。これらの研究結果は、他家骨髄間葉系幹細胞移植が栄養障害型表皮水疱症の治療に有効であること、その治療効果は少なくとも数ヵ月間持続すること、しかし移植間葉系幹細胞は数ヵ月で次第に減少する可能性を示している。また、チリの臨床研究では、表皮水疱症患者皮膚に移植した間葉系幹細胞が患者皮膚内で表皮角化細胞に分化しているのか真皮線維芽細胞に分化しているのかについては明らかにされていない。前述したように基底膜構成蛋白は表皮細胞から産生されるが、唯一Ⅶ型コラーゲンは真皮線維芽細胞からも産生される。骨髄間葉系幹細胞移植で皮膚基底膜部に供給されたⅦ型コラーゲンは間葉系幹細胞が分化した線維芽細胞由来である可能性は否定できない。しかし、PDGFR α 陽性骨髄細胞がⅦ型コラーゲン欠損マウスの剥離表皮再生に寄与すること⁸⁾、PDGFR α 陽性骨髄細胞は間葉系幹細胞を豊富に含む細胞分画であること¹¹⁾¹²⁾から、骨髄間葉系幹細胞は移植環境によっては

表皮細胞へ分化し得ると思われる。とすれば、栄養障害型表皮水疱症のみならず、単純型や接合部型表皮水疱症に対しても有効な骨髄間葉系幹細胞移植治療が可能になると期待する。

表皮水疱症に対する HMGB1 を 利用した再生誘導医療の可能性

最近我々は表皮水疱症における剥離表皮の壊死過程から大量に放出されるHMGB1が末梢血液を介して骨髄PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を刺激して血中に動員し、さらに血中動員されたPDGFR α 陽性間葉系幹細胞は次第に剥離表皮部皮膚に集積して真皮線維芽細胞や表皮角化細胞に分化することにより、損傷皮膚再生を強く誘導していることを明らかにした⁹⁾。また、組み換えHMGB1蛋白を静脈内投与することにより、マウス骨髄内PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を人為的に血中動員することが可能であった⁸⁾。表皮水疱症患者の血液中にHMGB1を投与した場合、患者骨髄から動員される間葉系幹細胞も基底膜分子の遺伝子異常を有するため、たとえ線維芽細胞や表皮細胞に分化したとしても表皮水疱症の根治的治癒に繋がることは期待できない。しかし、近年間葉系幹細胞それ自体に抗炎症・癒痕抑制効果、組織再生誘導効果があることが明らかとなり、脳梗塞や心筋梗塞など、種々の難治性組織壊死の治療に間葉系幹細胞移植が有効であることが示されている¹⁴⁾。さらに、間葉系幹細胞の抗炎症・免疫抑制作用を利用した移植片対宿主病 (graft versus host disease : GVHD) や自己免疫疾患への間葉系幹細胞移植臨床試験が進められつつある¹⁵⁾。これらの事実は、水疱形成後の強い炎症反応や癒痕形成が臨床症状を悪化させ、日常生活におけるQOLを著しく低下させている表皮水疱症において、HMGB1投与により生体内で骨髄間葉系幹細胞を水疱・潰瘍部皮膚に動員することができれば、皮膚に集積した間葉系幹細胞の抗炎症作用、癒痕抑制作用、再生促進作用により臨床症状が改善し、QOLの向上が得られる可能性を期待させる。

おわりに

現在進行している表皮水疱症に対する再生医療の現状と、骨髄間葉系幹細胞動員因子HMGB1を利用した新しい表皮水疱症治療の可能性について述べた。これまで全く治療法がなかった表皮水疱症に対し、再生医療研究は確実に有効な治療法を提供しつつある。しかし、いずれの治療法も表皮水疱症を安全かつ根治的に治療することはいまだ困難である。患者本人の骨髄幹細胞を採取し、遺伝子異常部位を安全に正常復帰させた後に生体骨髄内に再移植するなど、さらなる新しい再生医療技術開発が必要である。あきらめることなく基礎研究、臨床研究を続けていかななくてはならない。

● 文 献

- 1) Tamai K, Kaneda Y, Uitto J : Molecular therapies for heritable blistering diseases. *Trends Mol Med* **15** : 285-292, 2009
- 2) Wu Y, Zhao RC, Tredget EE : Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells* **28** : 905-915, 2010
- 3) Krauze DS, Theise ND, Collector MI, et al : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105** : 369-377, 2001
- 4) Korbling M, Katz RL, Khanna A, et al : Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells. *N Engl J Med* **346** : 738-746, 2002
- 5) Chino T, Tamai K, Yamazaki T, et al : Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. *Am J Pathol* **173** : 803-814, 2008
- 6) Tolar J, Ishida-Yamamoto A, Riddle M, et al : Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood* **113** : 1167-1174, 2009
- 7) Fujita Y, Abe R, Inokuma D, et al : Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** : 14345-14350, 2010
- 8) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, et al : PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** : 6609-6614, 2011
- 9) Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, et al : Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med* **363** : 629-639, 2010
- 10) Conget P, Rodriguez F, Kramer S, et al : Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy* **12** : 429-431, 2010
- 11) Takashima Y, Era T, Nakao K, et al : Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* **129** : 1377-1388, 2007
- 12) Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al : Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206** : 2483-2496, 2009
- 13) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al : Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** : 8639-8643, 2010
- 14) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al : Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* **5** : 54-63, 2009
- 15) Nauta AJ, Fibbe WE : Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110** : 3499-3506, 2007

