

201126010A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

細胞遊走・ケモカインを標的として
生体イメージングと数理シミュレーションを
駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 優

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授)

平成24年4月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

細胞遊走・ケモカインを標的とした
生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 優

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと
数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発 ----- 1
石井 優

II. 分担研究報告

1. 細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと
数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発 ---- 7
石井 優
2. 細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと
数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発 ---- 10
佐伯 行彦

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（総括）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究代表者 石井 優 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授

研究要旨

近年、生物学的製剤が関節リウマチ(RA)の治療に革命的变化を齎したが、一方で次世代治療法開発のため、小分子化合物によるRA治療薬の開発が進められている。本研究では、特に免疫細胞の遊走およびそれを制御するケモカインに焦点を当て、小分子による新規RA治療薬の開発・臨床応用を目指している。特に最近、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)を標的とした免疫抑制薬が注目を集めており、研究代表者は、米国での共同研究によりS1P作動薬であるFTY720が強力な骨吸収抑制作用を併せ持ち、自己免疫と骨破壊を主徴とするRAに対する治療薬として極めて有用であることを示した。本研究では、FTYのようなS1PR1アゴニストのみならず、S1PR2アンタゴニストなどのその他のS1P作動薬など、RA発症・病態形成を標的とした薬剤開発を行うため、従来の疾患モデルマウスを用いた解析に加え、生体内での複雑な細胞遊走制御を実体的に把握するため、「生体二光子励起顕微鏡イメージング」(実験動物を生かしたままで組織内での細胞の遊走・機能を観察する方法)の技術を駆使し、またこれらのデータを元に、薬効をin silicoでシミュレーションすることが可能な「細胞遊走ネットワークの数理モデル」を作成する。これらのデータを元に、RAに対する有効性が示された化合物については、健常人および患者より採取したヒト破骨前駆細胞を用いて臨床応用に向けての準備を行う。なお、臨床研究に際しては、関連諸法令を順守し、当施設の倫理審査委員会の承認の下、研究参加者から文書によるインフォームド・コンセントを得た上で遂行する。

研究分担者

佐伯行彦
国立病院機構大阪南医療センター
臨床研究部長

A. 研究目的

本研究では、今後の展開が期待される「細胞遊走を標的とした創薬」に注目し、新しい関節リウマチ治療薬の開発、および生体イメージングや数理シミュレーションといった新しい研究技術を用いたその評価法の開発を目的としている。この目的のために、関節炎発症モデル動物を使った治療薬実験に加えて、本研究代表者が

独自の開発・改良した生体2光子励起イメージング実験系を薬効評価システムとして活用し、より迅速かつ正確な評価が可能なシステムの構築を目指している。また、イメージングによって得られた詳細な時空間データを元に、関節リウマチにおける破骨細胞機能・骨破壊機構に関する数理シミュレーターを作成し、新規薬剤のin Silicoでの薬効評価系の開発を目指す。これらの新規の研究手法を用いた検索と合わせて、本研究成果をヒト関節リウマチ治療へと応用するための臨床研究に向けての環境整備を行う。

B. 研究方法

①関節リウマチ疾患モデルマウスの生体イメージングによる薬効評価系の確立：

本研究者はこれまでに生体 2 光子励起イメージングを駆使して、生きた個体の骨組織内部をリアルタイムで観察・解析する実験系を独自の開発を行ってきた。平成 23 年度の本研究では、これらの成果を元に、(1)骨破壊の生体イメージング系の確立 と (2)関節炎局所のイメージング系の開発 を行った。また、平成 22 年度までの本研究により、脂質メディエーターS1P を標的とした治療が、関節炎での抗炎症・骨破壊の抑制の双方にとって効果的であることが示された。平成 23 年度では上記の評価法を用いて、これらの薬効評価について検討を行った。

②薬効評価のための数理シミュレーターの作成：

脂質メディエーターS1P を標的とした新規 RA 治療薬候補化合物を、まず in Silico で迅速にスクリーニングするシステムを構築するため、これまで生体イメージングや in vitro での細胞遊走アッセイにて得られた数値データを元に、簡便な数理シミュレーターを開発した。

③ヒト病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明：

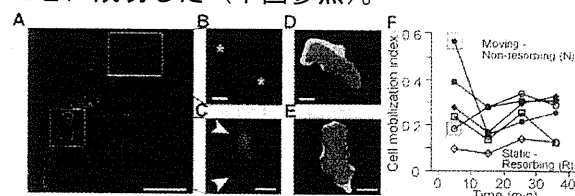
実際のヒト関節リウマチにおける脂質メディエーターS1P などを標的とした創薬にむけての効果検討のため、ヒト末梢血単球系細胞より破骨細胞前駆細胞を分取し、薬剤評価について検討を行う。平成 23 年度では、特にこれらの評価を、上記の生体骨イメージング系と組み合わせて in vivo の環境で行う方法論の開発を目指した。

C. D. 研究結果と考察

①関節リウマチ疾患モデルマウスの生体イメージングによる薬効評価系の確立：

(1) 骨破壊の生体イメージング系の確立：前年度より引き続き、生体 2 光子励起イメージン

グを駆使して、骨組織内部を生きたままで観察する方法論の開発・改良に取り組んだが、今年度は特に、関節リウマチにおける病態形成において重要な骨破壊過程をリアルタイムで可視化する系の開発を行った。まずは骨吸収能を持つ成熟破骨細胞を蛍光標識した遺伝子改変マウスを作出したが、具体的には、骨破壊の際に吸収面に向かって大量の酸を分泌するために必要なプロトンポンプ (V-type H⁺ ATPase) に GFP を融合したタンパク質を発現させたノックインマウス (H⁺ pump-GFP マウス) や、成熟破骨細胞のマーカーである TRAP のプロモーター下に RFP を発現させたトランスジェニックマウス (TRAP-RFP マウス) をそれぞれ作成した。これらを用いて、生きた骨組織内での成熟破骨細胞による骨破壊をリアルタイムで可視化することに成功した (下図参照)。



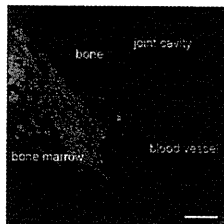
この生体イメージングにより、成熟破骨細胞のうち、実際に骨破壊を行っているものと、そうでないものを区別することが可能となり、ビスフォスフォネートなどの種々の薬剤の効果を実際の破骨細胞の活動を観察しながら評価することができた。その結果、RANKL などのより骨破壊を誘導すると、破骨細胞の総数だけでなく、骨破壊を行う細胞数が大きく増加した。一方で、ビスフォスフォネートなどで骨破壊を抑制すると、総数の減少のみならず、残っている細胞も骨破壊には関与せず、骨破壊には破骨細胞の総数のみならず、個別の細胞での骨破壊機能も厳密に制御されていることが分かった。

さらに本方論を用いて、関節リウマチでの骨破壊の際に、活性化した免疫細胞が破骨細胞を活性化させる過程を可視化することに成功した。この結果、活性化した T 細胞のうち Th17 細胞が、細胞膜上に RANKL を発現し、これが細胞間直接相互作用によって成熟破骨細胞を活性化させることが分かった。RANKL の中和抗体

などはこの過程を阻害することにより、成熟破骨細胞の動態・骨破壊を抑制することが証明できた。本実験系は、生きた骨組織内で実際に働く破骨細胞の機能を解析することができ、種々の骨吸収抑制薬の効果を解析するために極めて強力なツールとなることが期待される。

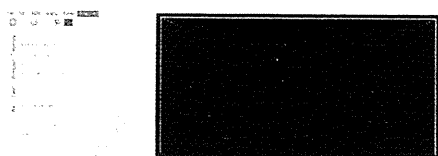
(2) 関節炎局所のイメージング系の開発：これまで破骨細胞による骨破壊についても、主には頭頂骨などの比較的観察しやすい骨組織を対象として行ってきた。関節リウマチにおける骨破壊をより実体的に解析するために、本研究では炎症関節の生体2光子励起イメージング系の確立に取り組んだ。

CAIAにて関節炎を誘導したマウス足関節を還流ステージに固定し、靭帯・筋をより分けて注意深く視野を出し、正立の多光子励起システムにて観察した(右図)。まだ発症初期の状態であったが、骨髄から関節間隙に炎症細胞が浸潤していく様子が観察された。本研究者は、さらにこのイメージング実験系においてS1P作動薬などの薬効を評価することができるように開発を行っている。



②薬効評価のための数理シミュレーターの作成：

S1Pなどの細胞遊走を調節する分子を標的とした新規薬物候補化合物のin Silicoスクリーニングのための数理シミュレーターを作成した。この目的のために、破骨細胞遊走の基本的数理モデルを確立し、血中・組織の脂質メディエーター濃度、アゴニスト/アンタゴニスト、破骨前駆細胞数などのパラメーターを入れることにより、骨表面での成熟破骨細胞数、骨破壊を再構成するシステムを構築した(下図)。これはFTY720などのS1P作動薬の破骨細胞制御に対する薬効を評価するには非常に有効な系となる。



③ヒト病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明：前年度までに、ヒト末梢血単球細胞から破骨細胞を分化させ、これを用いてin vitroで骨破壊抑制薬の薬効を評価する系を確立させた。これを用いて、従来のビスホスホネート製剤のみならず、FTY720などのS1P作動薬が、ヒト破骨細胞における骨破壊を抑制することが証明された。本年度はこの成果を元に、生きた実験動物内のin vivoにおいて、イメージング技術を用いてヒト破骨細胞の機能評価を行う系の確立を目指した。具体的には、ヒト末梢血単球細胞を蛍光標識して、免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)に養子移入してヒト破骨細胞の分化を誘導して「破骨細胞ヒト化マウス」の作成を行った。しかしながら、ヒト破骨細胞のマウス骨髄への生着頻度は非常に低く、末梢血単球をRANKL+M-CSFで軽度の前処理をしておく、生着率が若干改善する結果が得られた。一方で、S1Pを標的とした初めての薬剤FTY720(fingolimod)が平成23年9月に本邦で製造販売承認がされ、多発性硬化症に対する保険診療が可能となった。本研究では、当初の目的であったS1P標的薬を用いた骨破壊抑制薬の臨床応用に向けて、FTY720の関節リウマチに対する適応外使用の臨床研究を立ち上げつつある。

E. 結論

①関節リウマチ疾患モデルマウスの生体イメージングによる薬効評価系の確立：イメージングにより破骨細胞による骨破壊を(一般骨組織と関節炎局所の両方で)リアルタイムで可視化する、薬効評価のための画期的な実験系を確立した。

②薬効評価のための数理シミュレーターの作成：S1Pなどの細胞遊走制御因子を標的とした骨破壊抑制薬のin Silicoスクリーニングのためのシミュレーターを作成した。これにより、各種のS1P作動薬の薬効をシミュレーションで評価することができ、本標的に対する新規創薬開発に有用な系となることが期待される。

③ヒト病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明：ヒト破骨細胞に対する効果を *in vivo* で検討するための、破骨細胞ヒト化マウスについては開発途上であるが、発展性が見込まれるデータを得ている。また、最近承認された S1P 作動薬 FTY720 については、骨破壊に対する治療効果について今後臨床研究を行っていく計画としている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath J, Uitto J, Kaneda Y. (2011) PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(16): 6609-6614.
- 2) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2011) S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* 31: 967-969.
- 3) Kowada T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. (2011) *In vivo* fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(44):17772-17776.
- 4) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M*, Mochizuki N* (2012) The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.*, 122(4): 1416-1426 (*corresponding author).
- 5) Kayama H, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, Kubo A, Ishii M, Okazaki T, Murakami M, Yamamoto M, Yagita H, Takeda K. (2012) Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(13): 5010-5015.
- 6) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2011) The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol. Cells*, 31(5): 399-403.
- 7) Ishii M. (2012) How do contemporary imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology? *Ann. Rheum. Dis.*, 71 (Suppl 2): i67-9.
- 8) Ishii T, Kawamura S, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2012) Use of intravital microscopy and *in vitro* chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis. *Methods Mol. Biol.*, 2012; 874: 129-139.
- 9) Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Matsushita M, Tsuji SI, Maeda YI, Yoshimura M, Watanabe A, Katada Y, Harada Y, Ichikawa K, Suenaga Y, Ohta Y, Tohma S; NHO iR-net Study Group. (2012) Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA). *Rheumatol Int.* published online.
- 10) 石井 優
「二光子励起顕微鏡による生きた組織の観察」
Medical Science Digest 第 37 巻・第 5 号 p 7-8 (2011.5.25)
- 11) 菊田順一, 石井 優
「破骨細胞のイメージングと RANKL シグナル」
Clinical Calcium 第 21 巻・第 8 号 p 73-78 (2011.7.28)
- 12) 石井 優
「概論—生体 4 D イメージングの最前線：見えないものを見て、新しい概念を切り拓く研究者

の飽くなき挑戦」

実験医学 第 29 巻・第 16 号 p 2582-2589
(2011.10.1)

13) 菊田順一, 久保厚子, 島津 裕, 石井 優
「免疫・血液系の多光子励起イメージング
—“soft-wired network”の実体的解明」

実験医学 第 29 巻・第 16 号 p 2602-2606
(2011.10.1)

14) 石井 優

「生体イメージングとスフィンゴ脂質」セラミ
ド—基礎と応用— p 201-206 (2011.10.1)

15) 小林久隆, 石井 優, 瀬藤光利

「分子イメージング医学応用の近未来」

最新医学 第 66 巻・第 10 号 p 7-22
(2011.10.10)

16) 島津 裕, 菊田 順一, 久保 厚子, 石井
優

「骨・免疫系の細胞動態イメージング」

最新医学 第 66 巻・第 10 号 p 65-69
(2011.10.10)

17) 小谷真奈斗, 菊田順一, 石井 優

「蛍光イメージングで観察する破骨前駆細胞
のトラフィッキング」

Clinical Calcium 第 21 巻・第 12 号 p 85-92
(2011.11.28)

18) 賀川義規, 森 正樹, 石井 優

「がん幹細胞と細胞周期の生体イメージング」

実験医学・増刊号 第 29 巻・第 20 号 p 75-80
(2011.12.15)

19) 石井 優

「骨組織の生体ライブイメージング」

リウマチ病セミナー XXII p 155-161
(2011.12.20)

20) 石井 優

「生体多光子励起イメージング」細胞 第 44
巻・第 1 号 p 44-46 (2012.1.20)

21) 菊田順一, 石井 優

「破骨細胞のイメージング」

リウマチ科 第 47 巻・第 2 号 p 195-199
(2012.2.28)

2. 学会発表

1) Masaru Ishii, Osteoclast Migration, Differentiation and Function visualized by Multiphoton Imaging, Advances in Targeted Therapies Meeting 2011, April 7, 2011, Dubrovnik/Croatia.

2) 石井 優, 2光子励起による骨髄・免疫組織イメージング, 第 28 回・日本医学会総会学術講演会, シンポジウム, 2011 年 4 月 10 日, 東京都 (大震災の影響でウェブ上のみの開催となる)

3) 石井 優, バイオイメージングによる生物の「生きたまま」での観察への挑戦: 内分泌学研究への応用, 第 84 回・日本内分泌学会学術総会, 教育講演, 2011 年 4 月 22 日, 兵庫県神戸市

4) 石井 優, 骨組織のライブイメージングによる破骨細胞動態の解析, 第 6 回・日本分子イメージング学会学術集会, シンポジウム, 2011 年 5 月 27 日, 兵庫県神戸市

5) Masaru Ishii, Live imaging of bone cell dynamics, 第 32 回・日本炎症・再生医学会, シンポジウム, 2011 年 6 月 3 日, 京都府京都市

6) 石井 優, 生体多光子励起イメージングによる骨・免疫組織での細胞動態の解明: その実際と今後の展開, 京都大学・ライカマイクロシステムズイメージングセンター開設記念セミナー, 2011 年 6 月 7 日, 京都府京都市

7) 石井 優, 骨組織の蛍光イメージング解析: その進歩と今後の展開, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, カレントコンセプト, 2011 年 7 月 29 日, 大阪国際会議場, 大阪

8) 石井 優, 骨転移巣など種々の組織でのがん細胞動態の intravital imaging, 平成 23 年度文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 2011 年 8 月 9 日, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪

9) Masaru Ishii, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone remodeling, 2011 FASEB Summer Research Conference “Lysophospholipid Mediators in Health & Disease, August 18th, 2011, Il Ciocco, Barga

(Lucca), Italy.

10) Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone-resorbing osteoclasts in situ. 8th Bone Biology Forum, Lecture, August 19st, 2011, Shizuoka/Japan.

11) 石井 優, 生体多光子イメージングで見る骨組織内部の世界: 骨代謝・骨免疫研究の新展開, 第13回なにわ骨代謝・骨腫瘍研究会, 2011年8月27日, 大阪

12) 石井 優, 生体多光子励起イメージングによる骨髄・免疫細胞の動態解析, 平成23年度生理研研究会・神経活動の光操作, 2011年9月29日, 自然科学研究機構岡崎カンファレンスセンター, 愛知県岡崎市

13) 石井 優, Live imaging of bone marrow cavity by using 2-photon microscopy, 第70回・日本癌学会学術総会, シンポジウム, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

14) Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone cell biology, immunology and more. CSB Science Talk, MGH Center for Systems Biology, November 3rd, 2011, Boston, MA, USA

15) Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone cell dynamics, immune systems and cancers. Special Lecture, Harvard School of Dental Medicine, November 4th, 2011, Boston, MA, USA

16) 石井 優, 最新のバイオイメージングによる免疫炎症・骨破壊の解析とそのリウマチ臨床応用への可能性, Infliximab Topics Meeting in ACR2011, November 6th, 2011, Chicago, IL, USA

17) 石井 優, 生体多光子励起イメージングによる炎症細胞動態と微小環境の可視化, 第61回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポジウム6「免疫細胞と組織構成細胞の接点」, 2011年11月11日, 東京都

18) 石井 優, 菊田順一, 骨組織の生体多光子励起イメージングによる破骨細胞動態の解

析, 第61回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポジウム2「イメージング技術による免疫・アレルギーの新展開」, 2011年11月12日, 東京都

19) 石井 優, 菊田順一, Imaging of bone-resorbing osteoclast function regulated by interactions with immune cells in situ, 第40回・日本免疫学会学術集会, 国際シンポジウム, 2011年11月28日, 幕張メッセ, 千葉県千葉市

20) 石井 優, 菊田順一, 生体骨組織イメージングによる破骨細胞機能の生理的調節機構の解明, 第34回・日本分子生物学会年会, ワークショップ, 2011年12月14日, 横浜

21) 石井 優, 生体多光子励起イメージング～生命現象の「生きたまま」での観察とその医療への応用～, 2011年度東京大学医学部基礎統合講義, 2012年1月17日, 東京大学

23) Masaru Ishii, Junichi Kikuta, Yoshinori Kagawa, Intravital multiphoton imaging of bone cell dynamics, immune systems, and cancers. IFRc-SIgN Winter School on Advanced Immunology, January 19th, 2012, Awaji Island, Hyogo, Japan.

24) 石井 優, From cartoon to real biology: intravital multiphoton imaging of cellular dynamics in bone resorption, inflammation and cancers. 熊本大学グローバル COE リエゾンラボ研究会, 2012年2月8日, 熊本大学

25) 石井 優, 菊田順一, 生体多光子励起イメージングで観察する骨組織・骨髄内の世界: 破骨細胞の遊走を調節する新規骨吸収抑制薬の開発, 第85回日本薬理学会年会シンポジウム, 2011年3月14日, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（分担）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究代表者 石井 優 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授

研究要旨

近年、生物学的製剤が関節リウマチ(RA)の治療に革命的变化を齎したが、一方で次世代治療法開発のため、小分子化合物による RA 治療薬の開発が進められている。本研究では、特に免疫細胞の遊走およびそれを制御するケモカインに焦点を当て、小分子による新規 RA 治療薬の開発・臨床応用を目指している。特に最近、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を標的とした免疫抑制薬が注目を集めており、研究代表者は、米国での共同研究により S1P 作動薬である FTY720 が強力な骨吸収抑制作用を併せ持ち、自己免疫と骨破壊を主徴とする RA に対する治療薬として極めて有用であることを示した。本研究では、FTY のような S1PR1 アゴニストのみならず、S1PR2 アンタゴニストなどのその他の S1P 作動薬など、RA 発症・病態形成を標的とした薬剤開発を行うため、従来の疾患モデルマウスを用いた解析に加え、生体内での複雑な細胞遊走制御を実体的に把握するため、「生体二光子励起顕微鏡イメージング」(実験動物を生かしたままで組織内での細胞の遊走・機能を観察する方法)の技術を駆使し、またこれらのデータを元に、薬効を *in silico* でシミュレーションすることが可能な「細胞遊走ネットワークの数理モデル」を作成する。

A. 研究目的

研究代表者は最近、リンパ球などの免疫細胞の遊走を調節する脂質メディエーター(ケモカイン)である S1P を標的とした薬剤が、骨吸収に関与する破骨細胞の遊走・位置決めを制御することにより骨吸収をも抑制することを示し、本治療薬が免疫異常と骨破壊を併存する RA の病態の治療に極めて有用であることを示した。本研究の目的は、これら S1P 受容体作動薬を始めとして、脂質メディエーターを標的とした新規の RA 治療薬の開発、およびその迅速かつ正確な薬効評価系の確立である。

B. 研究方法

①関節リウマチ疾患モデルマウスの生体イメージングによる薬効評価系の確立：本研究者がこれまで立ち上げた生体 2 光子励起イメージングを駆使して、骨破壊の生体イメージング系の確立、と関節炎局所のイメージング系の開発、

を行う。また、平成 22 年度までの研究で有効性が示された、脂質メディエーター S1P を標的とした治療を上記の評価法を用いて、これらの薬効評価について検討を行う。

②薬効評価のための数理シミュレーターの作成：脂質メディエーター S1P を標的とした新規 RA 治療薬候補化合物を、*in Silico* で迅速にスクリーニングするシステムを構築するため、これまで生体イメージングや *in vitro* での細胞遊走アッセイにて得られた数値データを元に、簡便な数理シミュレーターを開発する。

C. 研究結果

①関節リウマチ疾患モデルマウスの生体イメージングによる薬効評価系の確立：関節リウマチで問題となる骨破壊の過程をリアルタイムで可視化する系の開発を行った。破骨細胞の骨破壊を特異的に可視化する蛍光リポーターマウスを作成し、生体骨イメージング

系により生きた骨組織内での成熟破骨細胞による骨破壊をリアルタイムで可視化することに成功した。さらにこの系を用いて、活性化したT細胞による骨破壊制御機構を解析し、種々の骨吸収抑制薬の効果を解析するために極めて強力なツールを完成した。また、炎症関節の生体2光子励起イメージング系を確立し、S1P作動薬などの薬効を評価することができるように開発を行った。

②薬効評価のための数理シミュレーターの作成：

S1Pなどの細胞遊走を調節する分子を標的とした新規薬物候補化合物の in Silico スクリーニングのための数理シミュレーターを作成した。

D. E. 考察と結論

関節リウマチにおける破骨細胞の骨破壊をリアルタイムで評価する画期的なイメージング解析系を開発した。また、本解析法や in silico 評価系を用いて、S1P作動薬による破骨細胞の遊走制御は、新しいRA治療薬として極めて有望であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath J, Uitto J, Kaneda Y. (2011) PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(16): 6609-6614.

2) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2011) S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* 31: 967-969.

3) Kowada T, Kikuta, J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. (2011) In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 33(44):

17772-17776.

4) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M*, Mochizuki N* (2012) The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.*, 122(4): 1416-1426 (*corresponding author).

5) Kayama H, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, Kubo A, Ishii M, Okazaki T, Murakami M, Yamamoto M, Yagita H, Takeda K. (2012) Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(13): 5010-5015.

6) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2011) The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol. Cells*, 31(5): 399-403.

7) Ishii M. (2012) How do contemporary imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology? *Ann. Rheum. Dis.*, 71 (Suppl 2): i67-9.

8) Ishii T, Kawamura S, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2012) Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis. *Methods Mol. Biol.*, 2012; 874: 129-139.

2. 学会発表

1) Masaru Ishii, Osteoclast Migration, Differentiation and Function visualized by Multiphoton Imaging. Advances in Targeted Therapies Meeting 2011, April 7, 2011, Dubrovnik/Croatia.

2) 石井 優, バイオイメージングによる生物の「生きたまま」での観察への挑戦：内分泌学研究への応用, 第84回・日本内分泌学会学術総

会, 教育講演, 2011年4月22日, 兵庫県神戸市

3) 石井 優, 骨組織のライブイメージングによる破骨細胞動態の解析, 第6回・日本分子イメージング学会学術集会, シンポジウム, 2011年5月27日, 兵庫県神戸市

4) Masaru Ishii, Live imaging of bone cell dynamics, 第32回・日本炎症・再生医学会, シンポジウム, 2011年6月3日, 京都府京都市

5) 石井 優, 骨組織の蛍光イメージング解析: その進歩と今後の展開, 第29回日本骨代謝学会学術集会, カレントコンセプト, 2011年7月29日, 大阪国際会議場, 大阪

6) Masaru Ishii, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone remodeling, 2011 FASEB Summer Research Conference "Lysophospholipid Mediators in Health & Disease, August 18th, 2011, Il Ciocco, Barga(Lucca), Italy.

7) Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone-resorbing osteoclasts in situ. 8th Bone Biology Forum, Lecture, August 19st, 2011, Shizuoka/Japan.

8) 石井 優, Live imaging of bone marrow cavity by using 2-photon microscopy, 第70回・日本癌学会学術総会, シンポジウム, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

9) Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone cell biology, immunology and more. CSB Science Talk, MGH Center for Systems Biology, November 3rd, 2011, Boston, MA, USA

10) 石井 優, 最新のバイオイメージングによる免疫炎症・骨破壊の解析とそのリウマチ臨床応用への可能性, Infliximab Topics Meeting in ACR2011, November 6th, 2011, Chicago, IL, USA

11) 石井 優, 生体多光子励起イメージングによる炎症細胞動態と微小環境の可視化, 第61回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポ

ジウム6「免疫細胞と組織構成細胞の接点」, 2011年11月11日, 東京都

12) 石井 優, 菊田順一, 骨組織の生体多光子励起イメージングによる破骨細胞動態の解析, 第61回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポジウム2「イメージング技術による免疫・アレルギーの新展開」, 2011年11月12日, 東京都

13) 石井 優, 菊田順一, Imaging of bone-resorbing osteoclast function regulated by interactions with immune cells in situ, 第40回・日本免疫学会学術集会, 国際シンポジウム, 2011年11月28日, 幕張メッセ, 千葉県千葉市

14) 石井 優, 菊田順一, 生体骨組織イメージングによる破骨細胞機能の生理的調節機構の解明, 第34回・日本分子生物学会年会, ワークショップ, 2011年12月14日, 横浜

15) 石井 優, 菊田順一, 生体多光子励起イメージングで観察する骨組織・骨髄内の世界: 破骨細胞の遊走を調節する新規骨吸収抑制薬の開発, 第85回日本薬理学会年会シンポジウム, 2011年3月14日, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（分担）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究分担者 佐伯 行彦 国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部長

研究要旨

ヒト関節リウマチ（RA）の発症および病態形成におけるケモカインの役割についてはほとんど明らかにされていない。一方で最近、脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸（S1P）を標的とした免疫抑制薬であるFTY720などケモカインを標的とした治療が、RAを始めとする自己免疫疾患に対して有効であることが示されてきている。本研究では、これら脂質メディエーターS1Pを標的とした治療薬をヒトRA治療への臨床応用に向けての基礎的検討を行うために、健常人および患者よりヒト破骨前駆細胞を分離し、候補化合物の有効性を検討する実験系を確立することを目的とする。3年計画の2年目である当該年度には、健常人ヒト末梢血より破骨前駆細胞を分離し、薬剤評価のシステム構築を行った。これらヒトサンプルを使用した臨床研究に際しては、関連諸法令を順守し、当施設の倫理審査委員会の承認の下、研究参加者から文書によるインフォームド・コンセントを得た上で遂行する計画としている。

A. 研究目的

ヒト関節リウマチ（RA）の発症および病態形成におけるケモカインの役割についてはほとんど明らかにされていない。一方で最近、FTY720などケモカインを標的としたRAを始めとする自己免疫疾患に対する治療の有効性が示されてきている。本研究では、動物疾患モデルやイメージング・シミュレーションを用いて得た基礎的研究成果を、ヒトRA治療へとつなげるための研究を目的とする。

B. 研究方法

ヒト病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明：実際のヒト関節リウマチにおける脂質メディエーターS1Pなどを標的とした創薬にむけての効果検討のため、健常人およびRA患者より採取した末梢血単球系細胞より破骨細胞・前駆細胞などを分化させ、上記

でスクリーニングを行った薬剤の効果について検討を行う。平成23年度では、特にこれらの評価を、in vivoの環境で行う方法論の開発を目指した。

C. 研究結果

前年度までに、ヒト末梢血単球細胞から破骨細胞を分化させ、これを用いてin vitroで骨破壊抑制薬の薬効を評価する系を確立させた。これを用いて、従来のビスフォスホネート製剤のみならず、FTY720などのS1P作動薬が、ヒト破骨細胞における骨破壊を抑制することが証明された。本年度はこの成果を元に、生きた実験動物内のin vivoにおいて、イメージング技術を用いてヒト破骨細胞の機能評価を行う系の確立を目指した。具体的には、ヒト末梢血単球

細胞を蛍光標識して、免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) に養子移入してヒト破骨細胞の分化を誘導して「破骨細胞ヒト化マウス」の作成を行った。しかしながら、ヒト破骨細胞のマウス骨髄への生着頻度は非常に低く、末梢血単球を RANKL+M-CSF で軽度の前処理をしておく、生着率が若干改善する結果が得られた。

一方で、S1P を標的とした初めての薬剤 FTY720 (fingolimod) が平成 23 年 9 月に本邦で製造販売承認がされ、多発性硬化症に対して保険診療が可能となった。本研究では、当初の目的であった S1P 標的薬を用いた骨破壊抑制薬の臨床応用に向けて、FTY720 の関節リウマチに対する適応外使用に向けての臨床研究を立ち上げつつある。

D. E. 考察と結論

ヒト破骨細胞に対する効果を in vivo で検討するための、破骨細胞ヒト化マウスについては開発途上であるが、発展性が見込まれるデータを得ている。また、最近承認された S1P 作動薬 FTY720 については、骨破壊に対する治療効果について今後さらに臨床研究を行っていく計画としている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Matsushita M, Tsuji SI, Maeda YI, Yoshimura M, Watanabe A, Katada Y, Harada Y, Ichikawa K, Suenaga Y, Ohta Y, Tohma S; NHO iR-net Study Group. (2012) Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA). *Rheumatol Int.* published online.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出現・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石井 優, 他	PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	108・16	6609-6614.	2011
石井 優, 佐伯行彦, 他	S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis.	Rheumatol. Int.	31	967-969	2011
石井 優, 他	In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts.	J. Am. Chem. Soc.	33・44	17772-6	2011
石井 優, 他	The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice.	J. Clin. Invest.	122・4	1416-1426	2012
石井 優, 他	Intestinal CX3C chemokine receptor 1 ^{high} (CX3CR1 ^{high}) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA,	109・13	5010-5015	2012
石井 優, 他	The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy.	Mol. Cells	31・5	399-403	2011

石井 優、他	How do contemporary imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology?	Ann. Rheum. Dis.	71・S2	167-9	2012
石井 優、他	Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis.	Methods Mol. Biol.	874	129-139	2012
佐伯 行彦、他	Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA).	Rheumatol Int.	Published online		2012
石井 優	二光子励起顕微鏡による生きた組織の観察	Medical Science Digest	37・5	7-8	2011
石井 優、他	破骨細胞のイメージングとRANKLシグナル	Clinical Calcium	21・8	73-78	2011
石井 優	概論—生体4Dイメージングの最前線：見えないものを見て、新しい概念を切り拓く研究者の飽くなき挑戦	実験医学	29・16	2582-2589	2011
石井 優、他	免疫・血液系の多光子励起イメージング—”soft-wired network” の実体的解明	実験医学	29・16	2602-2606	2011
石井 優	生体イメージングとスフィンゴ脂質	セラミド—基礎と応用—		201-206	2011
石井 優、他	骨・免疫系の細胞動態イメージング	最新医学	66・10	65-69	2011
石井 優、他	蛍光イメージングで観察する破骨前駆細胞のトラフィック	Clinical Calcium	21・12	85-92	2011
石井 優、他	がん幹細胞と細胞周期の生体イメージング	実験医学	29・20	75-80	2011
石井 優	骨組織の生体ライブイメージング	リウマチ病セミナー	XXII	155-161	2011

石井 優	生体多光子励起イメージング	細胞	44・1	44-46	2012
石井 優, 他	破骨細胞のイメージング	リウマチ科	47・2	195-199	2012

PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia

Katsuto Tamai^{a,1}, Takehiko Yamazaki^a, Takenao Chino^a, Masaru Ishii^b, Satoru Otsuru^a, Yasushi Kikuchi^a, Shin Inuma^a, Kotaro Saga^a, Keisuke Nimura^a, Takashi Shimbo^a, Noriko Umegaki^c, Ichiro Katayama^c, Jun-ichi Miyazaki^d, Junji Takeda^e, John A. McGrath^f, Jouni Uitto^g, and Yasufumi Kaneda^{a,1}

^aDivision of Gene Therapy Science, and Departments of ^dDermatology, ^dNutrition and Physiological Chemistry, and ^eEnvironmental Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan; ^bLaboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; ^cSt. John's Institute of Dermatology, King's College London, Guy's Hospital, London SE1 9RT, United Kingdom; and ^fDepartment of Dermatology and Cutaneous Biology, Jefferson Medical College, Philadelphia, PA 19107

Edited by Darwin J. Prockop, Texas A&M Health Science Center, Temple, TX, and approved March 18, 2011 (received for review November 10, 2010)

The role of bone marrow cells in repairing ectodermal tissue, such as skin epidermis, is not clear. To explore this process further, this study examined a particular form of cutaneous repair, skin grafting. Grafting of full thickness wild-type mouse skin onto mice that had received a green fluorescent protein-bone marrow transplant after whole body irradiation led to an abundance of bone marrow-derived epithelial cells in follicular and interfollicular epidermis that persisted for at least 5 mo. The source of the epithelial progenitors was the nonhematopoietic, platelet-derived growth factor receptor α -positive (Lin⁻/PDGFR α ⁺) bone marrow cell population. Skin grafts release high mobility group box 1 (HMGB1) in vitro and in vivo, which can mobilize the Lin⁻/PDGFR α ⁺ cells from bone marrow to target the engrafted skin. These data provide unique insight into how skin grafts facilitate tissue repair and identify strategies germane to regenerative medicine for skin and, perhaps, other ectodermal defects or diseases.

epidermolysis bullosa | skin injury | stem cells | keratinocyte | tissue regeneration

Bone marrow (BM) cells contribute a substantial proportion of cells, both inflammatory and noninflammatory, that have roles in tissue homeostasis, repair, and regeneration. Such cells may be derived from either hematopoietic or mesenchymal stem cell populations, and subpopulations thereof can differentiate into both hematopoietic and mesenchymal lineage cells (for review, see refs. 1 and 2).

In skin, studies have shown that BM provides fibroblast-like cells in the dermis (of hematopoietic and mesenchymal lineages) and that the number of these cells increases after skin wounding (3, 4). BM can also generate epithelial cells, i.e., keratinocytes, in the epithelia, although the precise derivations and mechanisms to raise BM-derived keratinocytes are not fully known (3, 5–16). Human/mouse studies involving transplantation of sex-mismatched or genetically tagged BM cells have shown that keratin-positive bone marrow-derived cells can be found in skin epidermis, hair follicles, and sebaceous glands (6, 8, 9, 11, 12, 14, 16), sites that harbor skin stem cell niches (17). Moreover, in humans who have undergone BM transplantation (BMT), donor cells that have differentiated into keratinocytes can be detected in the epidermis for at least 3 y (8).

BM cells also contribute to skin development: Infusion of green fluorescent protein (GFP) BM cells in utero in mice leads to accumulation of a subpopulation of GFP-positive cells in nonwounded skin dermis, particularly in association with developing hair follicles (18). With regard to skin injury, both embryonic and postnatal transplantation of BM cells into mice lacking the skin protein, type VII collagen (Col 7) as well as postnatal studies in mice lacking type XVII collagen, basement membrane components that normally help secure adhesion between the epidermal and dermal skin layers, have demonstrated the capacity of BM to promote skin wound healing and to correct

the intrinsic basement membrane defect (18–20). Most recently, a clinical trial of allogeneic whole BMT in humans lacking Col 7 (who have the inherited blistering skin disorder, recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB; OMIM226600) (21) has demonstrated that BM cells can repair fragile skin and restore Col 7 expression in skin basement membrane (22).

Collectively, however, these animal and human studies have shown that BM-derived keratinocytes are an extremely rare finding in the epidermis. Indeed, analyses in two different murine models have shown that BM-derived keratinocytes comprise only ≈ 0.0001 – 0.0003% of all keratinocytes in the new epidermis (13). The relative scarcity of such cells therefore raises questions about their biological significance. For example, it is not known whether these cells have a physiological role in epithelial regeneration and, if they do, under what circumstances? Moreover, it is not clear which particular cells in BM contribute to the epithelial repair. Furthermore, there is little awareness of the mechanism(s) through which the damaged epithelium signals to invoke mobilization and recruitment of the key BM cells. In this study, we have begun to address these questions, and here report identification of a specific subset of BM cells with epithelial differentiation potential as well as a unique in vivo mechanism through which these cells contribute to epithelial regeneration and maintenance.

Results

We first examined the contribution of BM-derived cells to epithelial regeneration in murine skin wounds. The wounds were created by using a scalpel and involved excision of a piece of full-thickness skin (i.e., including epidermis and dermis) thus creating an ulcer. The mice selected for wounding had received lethal dose irradiation followed by GFP-BMT, thereby allowing us to evaluate the contribution of GFP-BM cells to skin regeneration after injury (Fig. 1A). At 4 wk after the injury, GFP-positive keratinocytes were not obvious (Fig. 1B), indicating a minimal, if any, contribution of BM cells to epithelial regeneration, findings consistent with previous data (13). We then used the same

Author contributions: K.T. designed research; K.T., T.Y., T.C., M.I., S.O., Y. Kikuchi, S.I., K.S., K.N., T.S., and N.U. performed research; J.-i.M. and J.T. contributed new reagents/analytic tools; K.T., I.K., and Y. Kaneda analyzed data; and K.T., J.A.M., J.U., and Y. Kaneda wrote the paper.

Conflict of interest statement: K.T., T.Y., and Y. Kaneda have filed patents relating to the use of HMGB1 for bone marrow cell mobilization and recruitment to damaged tissue. These individuals also hold stock in Genomix plc, a bio-tech company involved in HMGB1 translational research.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: tamai@gts.med.osaka-u.ac.jp or kaneday@gts.med.osaka-u.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1016753108/-DCSupplemental.

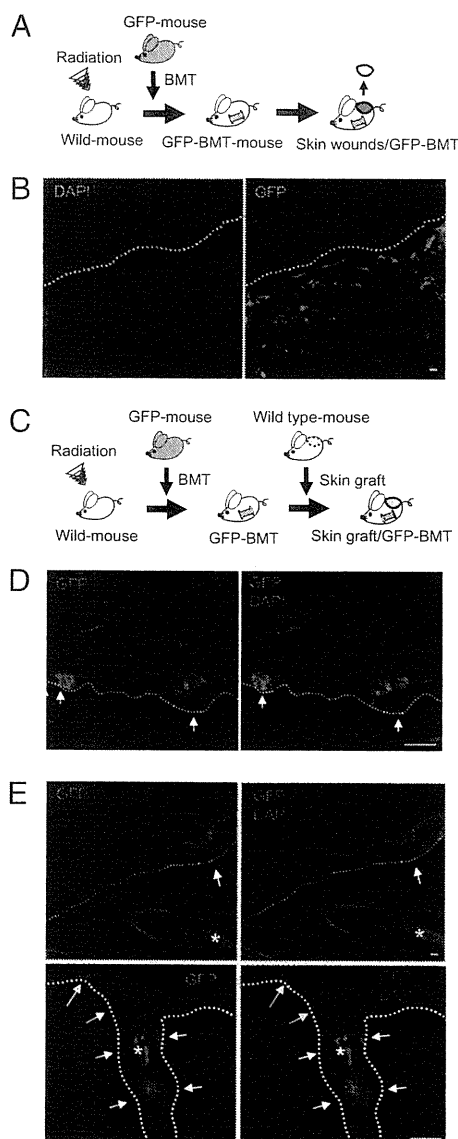


Fig. 1. BM-derived cells contribute to epidermal and follicular renewal in skin grafts, but not in skin wounds. (A) Schematic outlining details of the skin wound model on GFP-BMT mice. (B) Confocal-laser microscopy of skin sections from the reepithelialized wounds. Green fluorescence in the dermis represents BM-derived cells. Note that there is no GFP fluorescence within the regenerated epithelia. (C) Schematic outlining details of the skin engraftment of GFP-BMT mice. (D) Confocal-laser microscopy of skin sections from the 4-wk skin graft. Green fluorescence in the epidermis and the dermis represent BM-derived cells. Arrows indicate EPU-like structures that are composed of BM-derived epithelial cells emanating from the basal layer (white arrows) within the epidermis to the horny layer (red arrowheads). (E) Confocal-laser microscopy pictures of skin sections from the 5-mo skin graft. Green fluorescence in the epidermis, the hair follicles, and the dermis represent BM-derived cells. Arrows in *Upper* indicate sustained BM-derived epithelial cells emanating from the basal layer (white arrows) to the horny layer (red arrows). White arrows in *Lower* indicate sustained BM-derived follicular cells. Note that hair shafts show nonspecific auto-fluorescence (asterisks). White dotted lines indicate the dermal-epidermal and dermal-follicular junctions. (Scale bars: 50 μ m.)

mouse model to examine a different form of skin repair, skin grafting, to further explore the potential contribution of BM cells (Fig. 1C). Surprisingly, we noted that significant numbers of GFP-positive cells expressing skin-specific keratin 5 formed epidermal proliferative unit (EPU)-like clusters in the epidermis

of the skin graft in biopsies taken 4 wk after the engraftment (Fig. 1D and Fig. S14). Furthermore, the BM-derived GFP-positive keratinocytes were maintained in the epidermis and hair follicles 5 mo after the engraftment (Fig. 1E and Fig. S1B). Given that mouse epidermis is renewed every 2–3 wk by epithelial stem cell-derived keratinocytes, those long-residing GFP BM-derived epithelial cells in the 5-mo-old graft are likely to contain epithelial progenitor/stem cells.

To assess whether the BM-derived epidermal cells might have functional significance, we then searched for BM-derived cells in the skin of Col 7-null mice engrafted onto the GFP-BMT mice (Fig. 2A). Because these mice have complete detachment of the epidermis after birth due to extensive skin and mucous membrane fragility (Fig. 2A) (23), we anticipated a potentially greater contribution of BM-derived cells in the regenerating epithelia of the engrafted Col 7-null mouse skin. The engrafted Col 7-null mouse skin initially showed extensive subepidermal detachment, similar to the skin pathology seen in human patients with RDEB (21). At 4 wk after the engraftment, we noted an even greater contribution of GFP-positive cells expressing keratinocyte-specific keratins in the regenerating epidermis and hair follicles of the engrafted Col 7-null mouse skin (Fig. 2B–D and Fig. S2). Moreover, new Col 7 protein was present at the cutaneous basement membrane zone in the engrafted Col 7-null mouse skin (Fig. 2E). Notably, Col 7 labeling was maximal in the basement membrane adjacent to GFP-BM-derived epithelial cells. Evidence for BM-derived epithelial cells was further confirmed by demonstration of GFP-positive individual keratinocytes from the grafted skin by means of both flow cytometric analysis and cell culture (Fig. 2F and G).

Collectively, these data showed that a subpopulation of BM cells contribute to epithelial regeneration and maintenance in these murine skin graft models. Analyses of sex chromatin numbers and fusion-dependent enhanced GFP expression in BM-derived epithelial cells in the grafted skin did not show any evidence for cell fusion, suggesting differentiation of the BM-derived cells as the likely mechanism for raising BM-derived keratinocytes in the skin graft (Figs. S3 and S4). Reverse wild-type BMT in a GFP mouse, followed by engrafting Col 7-null mouse skin onto the back of this mouse, excluded other possible extrinsic sources of keratinocytes in the skin graft besides the BM (Fig. S5).

We then investigated the subpopulation of BM cells that has the potential for epithelial differentiation. Recent studies have shown that the PDGFR α -positive nonhematopoietic BM cell population contains ectoderm-derived mesenchymal stem cells (MSCs) (24–26), indicating that perhaps PDGFR α ⁺ BM cells might be a putative source of BM-derived keratinocytes in the skin graft. To test this hypothesis, we examined BM from a heterozygous knock-in mouse in which a histone H2B-GFP fusion gene was inserted into the locus of the PDGFR α gene (PDGFR α -H2BGFP mouse); this knock-in results in accumulation of GFP fluorescence within the nuclei of PDGFR α -expressing cells. We found that the PDGFR α ⁺ BM cells were exclusively enriched in the Lineage-negative (Lin[−]) cell population from the knock-in mouse BM (Fig. S6) and that the Lin[−] population provided proliferating PDGFR α ⁺ fibroblastic cells in culture (Fig. 3A). Lin[−] indicates negativity for the cell surface antigens CD5, B220, CD11b, Gr-1, 7–4, and Ter-119 and excludes mature hematopoietic cells, such as T cells, B cells, monocytes/macrophages, granulocytes, and erythrocytes/their committed precursors from BM. Flow cytometric analysis indicated that the Lin[−] and PDGFR α ⁺ (Lin[−]/PDGFR α ⁺) cells were independent from the Lin[−]/c-kit⁺ cell population, which includes a hematopoietic stem cell pool (Lin[−]/c-kit⁺/Sca-1⁺) in BM (Fig. 3B and Fig. S7). We found that Lin[−] cell populations collectively accounted for \approx 5.6% of the total number of BM cells (Fig. 3B). The Lin[−]/PDGFR α [−]/c-kit⁺ and Lin[−]/PDGFR α [−]/c-kit[−] BM cells comprised \approx 2.28% and \approx 3.11% of total BM cells, respectively. We observed that the Lin[−]/PDGFR α ⁺ BM cells (\approx 0.22% of the total BM cells) could exclusively generate BM-derived epithelial cells expressing keratin 5 in culture after supplementation with skin soaked buffer (SSB),

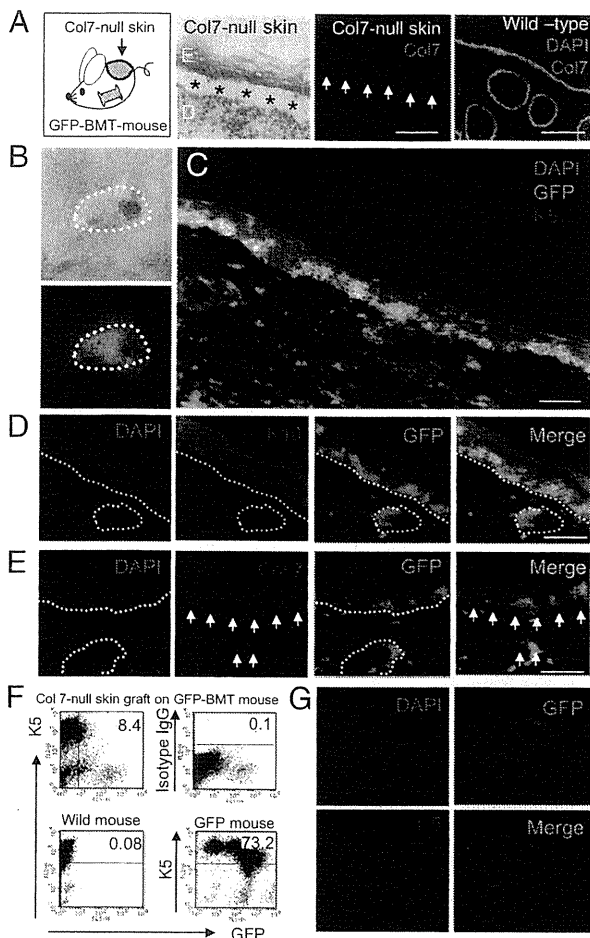


Fig. 2. BM cells substantially contribute to the repair of grafted Col 7-null epidermis. (A) Schematic picture of the Col 7-null skin engraftment on GFP-BMT mice (Left); hematoxylin-eosin staining of Col 7-null mouse skin (Left Center). Asterisks indicate separation of the epidermis (E) from the dermis (D); Col 7 immunostaining in the Col 7-null skin (Right Center). (Right) Arrows indicate dermal-epidermal junction, Col 7 staining of wild-type mouse skin. Green color indicates Col 7 staining. (B) Accumulation of GFP fluorescence (Lower) within the region of the Col 7-null skin graft (Upper). The white dotted line indicates the margins of the skin graft. (C and D) Confocal-laser microscopy pictures of sections from the Col 7-null mouse skin that had been surgically grafted. Blue color indicates DAPI staining. Green fluorescence in the epidermis and the dermis represents BM-derived cells. Red labeling indicates keratin 5 (K5; C) or keratin 10 (K10; D) immunofluorescence. Yellow color image represents BM-derived cells that express both GFP (green) and K5 (red; C) or K10 (red; D). (E) Col 7 expression in grafted Col 7-null mouse skin. White dotted lines indicate dermal-epidermal and dermal-follicular junctions. White arrows indicate immunofluorescence for Col 7 (red) at the basement membrane zone. (Scale bars: 50 μ m.) (F) Flow cytometric analysis for K5 and GFP in the epidermal cell suspension of Col 7-null skin engrafted onto a GFP-BMT mouse (Upper Left), wild-type mouse skin (Lower Left), and the GFP-transgenic mouse skin (Lower Right). Upper Right shows isotype control for K5 in the epidermis of the grafted Col 7-null skin. (G) Confocal-laser micrographs of cultured BM-derived epithelial cells isolated from the epidermis of the Col 7-null skin graft labeled with GFP or K5.

in which excised newborn mouse skin had been soaked in phosphate buffer saline (PBS) for 24 h (Fig. 3C and Fig. S8). The $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{-}$ cell population also contained adherent and proliferative cells in culture, but none of these cells showed differentiation into keratin 5-positive keratinocytes with SSB supplementation (Fig. S8). These data suggest that the BM-derived keratinocytes are not of hematopoietic origin, but instead are derived from a specific subpopulation of $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM

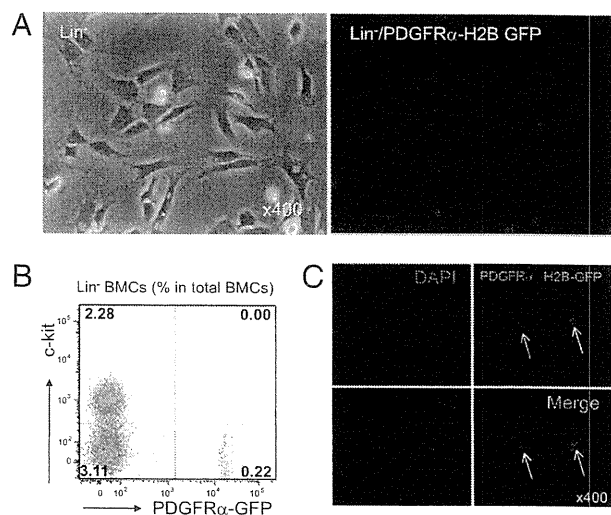


Fig. 3. Characterization of BM cells of the $PDGFR\alpha$ knock-in mouse demonstrates that $PDGFR\alpha^{+}$ subpopulation give rise to epithelial progenitors. (A) Phase-contrast (Left) and GFP-fluorescent (Right) micrographs of the Lin^{-} BM cells in culture. All adherent and proliferating Lin^{-} cells were positive with $PDGFR\alpha$ -GFP labeling in their nuclei. (B) Flow cytometry analysis for $PDGFR\alpha$ -GFP and c-kit expression on the Lin^{-} cells in total BM cells of the $PDGFR\alpha$ knock-in mice. The number (%) in the chart represents the population of each fraction in the total number of BM cells. Note that there is no population in the $PDGFR\alpha$ -positive and c-kit-positive fraction (upper right corner) in BM. (C) Confocal-laser micrographs of cultured bone marrow cells (BMCs) from a heterozygous knock-in mouse with a histone H2B-GFP fusion gene inserted into the $PDGFR\alpha$ gene locus. $PDGFR\alpha$ promoter-dependent H2B-GFP expression was noted by accumulation of GFP fluorescence in the nuclei ($PDGFR\alpha/H2B$ -GFP, indicated by white arrows; Upper Right) of cells expressing K5 (Lower Left).

cells. In this context, additional flow cytometry analysis of the $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cells did not show expression of CD146 or CD271 (Fig. S9), both of which are established markers of human BM MSCs (27), indicating different cell surface molecule profiles for human BM MSCs and mouse $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cells.

We then investigated the mechanism through which the transplanted skin graft is able to recruit $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ cells from the BM. First, we established a Boyden chamber migration assay to demonstrate that $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cells migrate toward one or more chemoattractants in SSB (Fig. 4A). We then assessed which molecules in the SSB have the capacity to induce migration of $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cells. We noted that a heparin-binding fraction of SSB was able to induce robust migration of the $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cells (Fig. 4B). This finding supports the notion that the excised skin graft can release heparin-binding molecules capable of attracting these particular BM cells. To find the precise molecules involved, we fractionated SSB by heparin-affinity chromatography and obtained several fractions with strong activity for inducing $Lin^{-}/PDGFR\alpha^{+}$ BM cell migration (Fig. S10). Some fractions had strong cell-migrating activity but comparatively less protein expression: These fractions were then subjected to SDS/PAGE analysis (Fig. 4C). Three prominent silver-stained proteins were observed in the gel, which were then further analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. They were identified as nucleolin, anti-thrombin III (AT-III), and high mobility group box 1 (HMGB1) (Fig. 4C). Nucleolin is a eukaryotic nucleolar phosphoprotein that is involved in the synthesis and maturation of ribosomes in nucleoli (28). AT-III is a well-characterized anticoagulant molecule generated in the liver, and which exists in blood plasma (29). HMGB1, also known as amphoterin, is a nuclear protein that can regulate chromatin structure and gene expression (30). It is also released from necrotic cells and some apoptotic cells and acts