

骨髄由来表皮細胞の分化ならびに遊走機序の解明

北海道大学大学院医学研究科皮膚科

阿 部 理一郎

Recent studies have suggested that bone marrow (BM) cells transdifferentiate to regenerate a variety of cellular lineages. Due to the relatively small population of BM-derived cells in each organ, it is still controversial whether these BM-derived cells are really present in sufficient numbers, for effective function. Conversely, it is speculated that chemokine/chemokine receptor interactions mediate this migration of the tissue specific precursor cells from BM into the target tissue.

Here we show that cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK) /CCL27 is the major regulator involved in the migration of keratinocyte precursor cells from BM into skin. By screening various chemokine expression patterns, we demonstrated that CTACK is constitutively expressed in normal skin and upregulated in wounds and that approximately 20% of CD34+ BM cells expressed CCR10 the ligand for CTACK.

These results provide direct evidence that recruitment of BM keratinocyte precursor cells to the skin is regulated by specific chemokine/chemokine receptor interactions, which makes possible the development of new regenerative therapeutic strategies.

1. 緒 言

これまで再生医学領域の研究により、種々の体細胞成分が骨髄幹細胞から分化可能であることが明らかとなった。骨髄幹細胞から表皮細胞への分化の可能性も示唆されているが、なお確定はえられていない。一方先天性酵素欠損症（Hunter 症候群など）は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用であることが証明されている。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究はなされていない。

構造タンパク欠損症である表皮水疱症に対する根本的治療法は、主に病因である欠損タンパクを遺伝子導入することで産生させる、遺伝子治療が検討されている。しかしながら現在遺伝子治療に関しては技術的問題、安全性の問題などで、一般的な臨床応用までにはなお時間がかかると予想される。先天性酵素欠損症（Hunter 症候群など）は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用である。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究は皆無である。

一方、構造タンパク欠損症と先天性酵素欠損症の相違は、産生させるタンパクが産生されるのみならず、機能的な構

造を形成し、かつ適切な部位に留まらなければならないことである。よって、骨髄移植で、標的の臓器（皮膚）に骨髄由来表皮細胞が遊走し、かつ欠損タンパクを産生し、機能的に働くかは全く不明である。

また、組織幹細胞を用いた再生医療は、胚性幹細胞（ES 細胞）と比較し、倫理的にも ES 細胞が胎児由来であるのに対し、骨髄幹細胞は本人由来である。加えて採取が格段に容易という画期的利点があり、臨床適応が切望されている。しかしながら、現在骨髄幹細胞を用いた再生医療への応用の実現化において、乗り越えるべき大きな課題がある。これまでの検討で、各臓器において骨髄幹細胞由来の分化した臓器細胞が存在することは確認できているが、その頻度は非常に低く、生物学的機能を有しうるか疑問視されている。一方、特異的細胞遊走はケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用により起こることが知られており、他臓器細胞に分化する骨髄幹細胞においても同様の機序が予想される。我々は遊走能の観点から、すでに骨髄由来線維芽細胞の創傷部位への遊走はケモカイン（SLC）ケモカインレセプター（CCR7）interaction により起こることを明らかにしている。以上から、ケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用を用いることで、骨髄由来の表皮細胞の頻度を増加させることができ、より生物学的機能を発揮させる可能性があると考えられる¹⁾。

本研究課題において、創傷部皮膚において発現されるケモカインの同定、および骨髄細胞中のケモカインレセプター発現細胞の検索を行った。

2. 実 験

2.1 骨髄細胞からの表皮細胞への分化の同定

正常マウスに対し、GFP トランスジェニックマウス（全



Transdifferentiation and migration of bone marrow-derived keratinocytes

Riichiro Abe

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

身の細胞が GFP 産生し緑色に蛍光を発する) から骨髄移植を行う。骨髄由来細胞が置換された移植マウス (レシピエントマウス) に皮膚創傷を作成し経時的に創傷部皮膚を採取し、レシピエントマウスにおいてドナー骨髄幹細胞由来表皮細胞が分化しているか確認する。

2.2 骨髄細胞由来表皮細胞の表皮への効率的遊走機序の検討

効率的な骨髄幹細胞の皮膚への遊走を促すため、骨髄移植の際のドナー、レシピエントの条件の検討を行う。あわせて、皮膚発現のケモカイン中で特異的に骨髄由来表皮細胞の表皮への遊走を促進するケモカイン、またその候補ケモカインに対するケモカインレセプターの骨髄幹細胞における発現を検討する。具体的には、皮膚再生が強力に誘導される創傷部において、骨髄由来表皮細胞の表皮遊走誘導ケモカインの発現が亢進すると予想されるので、創傷部位におけるケモカイン発現を検討する。次に候補となるケモカインを用い、in vitro における骨髄幹細胞遊走能の検討、in vivo における骨髄由来表皮細胞誘導能の検討を行い、骨髄由来表皮細胞特異的ケモカインを同定する。

3. 結果

3.1 ドナー骨髄幹細胞由来表皮細胞の分化

GFP トランスジェニックマウス骨髄を移植した正常マウスを解析した。表皮のなかに GFP 陽性の骨髄由来細胞があり、この細胞は表皮細胞のマーカーであるケラチン

14 もともに陽性であったため、骨髄由来表皮細胞を確認できた (Fig. 1A)。またこの細胞は血球マーカーである CD45 やランゲルハンス細胞のマーカーである CD11c は陰性であった。加えてこの細胞の多くは基底層に存在し、毛包のバルジ領域に存在するものほとんど認めなかった。

創傷部の全表皮細胞中における骨髄由来表皮細胞の割合は 0.025% \pm 0.009% であり、基底細胞中の割合は 0.1% 程度であった。

3.2 骨髄細胞由来表皮細胞の表皮への効率的遊走機序の検討

再生の場である皮膚創傷における骨髄由来表皮細胞の集積は、再生現象が生じている時期にのみ特異的に起こると予想される。よって皮膚創傷部には組織特異的なケモカインが発現し、それに対するケモカインレセプターを持つ骨髄由来表皮細胞が遊走してくると思われる。

最初に創傷部におけるケモカインの発現を RT-PCR、Western blot、免疫染色で検討したところ示すように SDF-1 α 、SLC、CTACK の発現が特異的にみられた (Fig. 1)。

次にこれらのケモカインに対するケモカインレセプターの発現を、骨髄幹細胞 (CD34 陽性細胞) において FACS を用いて検討を行った。それぞれのケモカインに対するレセプターの発現を確認できた (SDF-1 α : CXCR4、SLC: CCR7、CTACK: CCR10) (Fig. 2A)。

さらにこのレセプターが機能的に発現しているか、in vitro migration assay を用いて検討した。それぞれのケモ

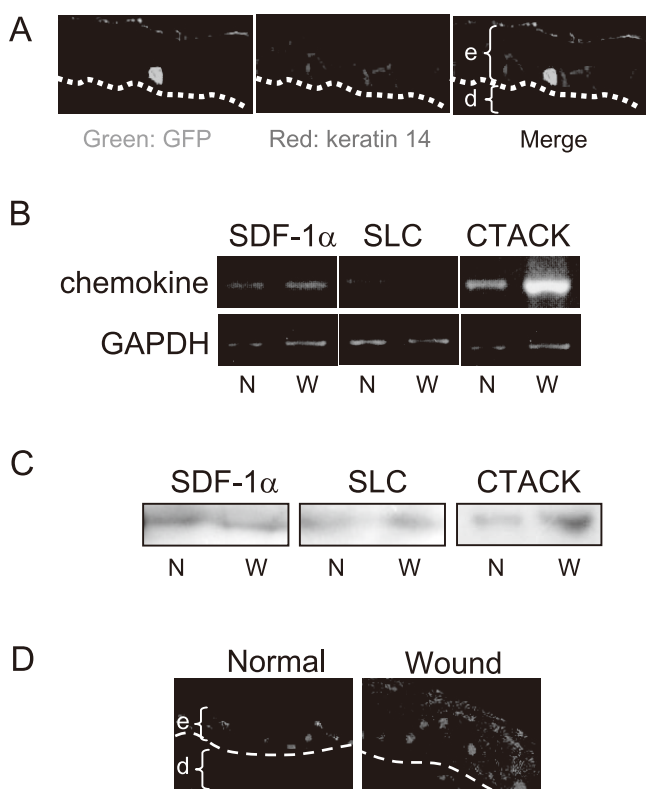


FIGURE 1

Bone marrow (BM) derived keratinocytes (BMDK) were identified and CTACK was expressed in wounded skin.

(A) Engrafted BMDK in wounded skin expressed both GFP, as a marker of bone marrow origin (green), and keratin14, as a marker of basal keratinocyte (red), (arrows) (e: epidermis, d: dermis).

(B-D) Normal (N) or wounded (W) skin tissue samples were collected and analyzed for chemokine expression as shown in Table 1. The expressions of SDF-1 α , SLC and CTACK were detected by RT-PCR (B) and Western blot analysis (C) in normal skin and also in skin 24 hours after wounding. These experiments of RT-PCR and Western blot analyses were performed in triplicate. Immunofluorescence staining in the wound edge 3 days after wounding, particularly CTACK expression was upregulated (green) (D). SDF-1 α and SLC were weakly expressed (data not shown). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red) (e: epidermis, d: dermis).

カインによって、ある程度の CD34 陽性の骨髓幹細胞は遊走することが示された (Fig. 2B, C)。

3.3 創傷皮膚における特異的骨髓由来表皮細胞の遊走能

次に創傷皮膚において特異的骨髓由来表皮細胞についてそれぞれのケモカインを創傷辺縁に局所投与することにより検討した。SDF-1 α 、SLC、CTACK それぞれ投与し、治癒した表皮における骨髓由来表皮細胞数をカウントしたところ、CTACK のみが有意に増加させた (Fig. 3A)。また中和抗体局所投与により有意に減少した (Fig. 3B)。以上から CTACK が生体内において骨髓由来表皮細胞の遊

走を特異的に誘導することが明らかになった。

さらに、二つの系を用いて骨髓幹細胞を増加させたところ (G-CSF 投与、または CD34 陽性細胞静注)、骨髓由来表皮細胞の数は有意に増加したが、同時に CTACK を投与するとさらに増加した (Fig. 3A)。

3.4 CTACK は骨髓由来表皮細胞を増加させることにより創傷治癒を促進させる

CTACK による骨髓由来表皮細胞増加の創傷治癒に対する影響に関して検討を行った。創傷辺縁に CTACK を局所投与すると、有意に創傷治癒が促進された (Fig. 4A,B)。また CTACK 投与により血管新生は促進されず (Fig. 4C)、

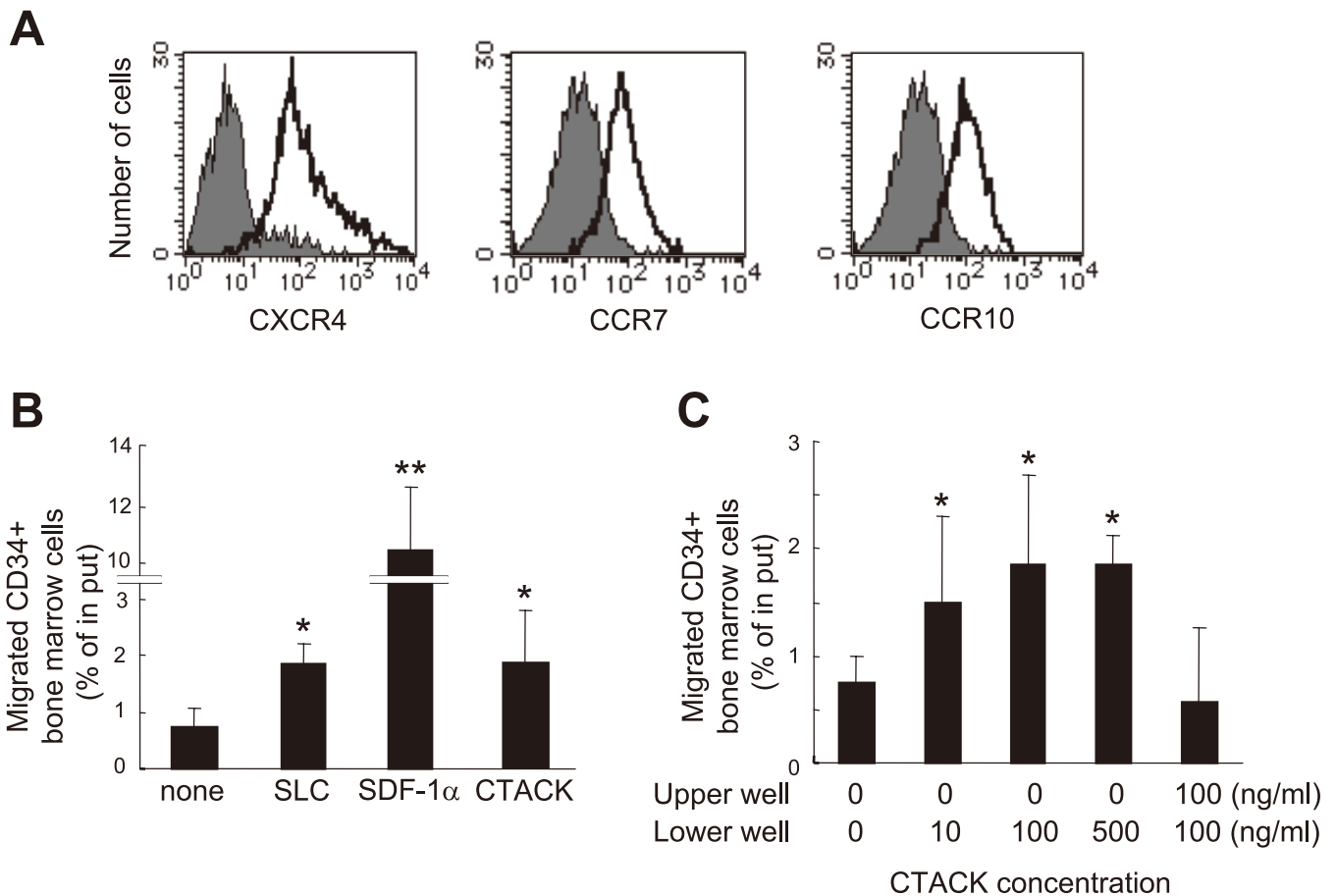


FIGURE 2

CCR10, a receptor for CTACK, was expressed in CD34+ BM cells and these CD34+ BM cells migrated in response to CTACK in vitro.

(A) CXCR4, a receptor for SDF-1 α , CCR7, a receptor for SLC, and CCR10 expression on CD34+ BM cells were analyzed by flow cytometry. The staining with a specific antibody for each chemokine receptor (solid line) and the background staining with the non-specific Ig antibody (negative isotype matched control; shaded profile) by the gated CD34-positive population. CD34+ BM cells expressed CXCR4 (97.4%), CCR7 (12.9%), and CCR10 (19.1%).

(B, C) Chemotaxis assays were undertaken in vitro. Isolated CD34+ BM cells purified by FACS were added to the upper well of a 3- μ m pore Transwell. Recombinant SLC, SDF-1 α or CTACK was added to the upper and/or lower plate. CD34+ BM cell migration rates increased in response to media containing recombinant SLC, SDF-1 α or CTACK (100ng/ml) (*P < 0.05, **P < 0.001) versus media alone (n=4) (B). CTACK (0-500ng/ml) induced CD34+ BM cell migration was in dose-dependent manner (n=4) (*P < 0.05) (C). SDF-1 α and SLC were also induced it in dose-dependent manner (data not shown).

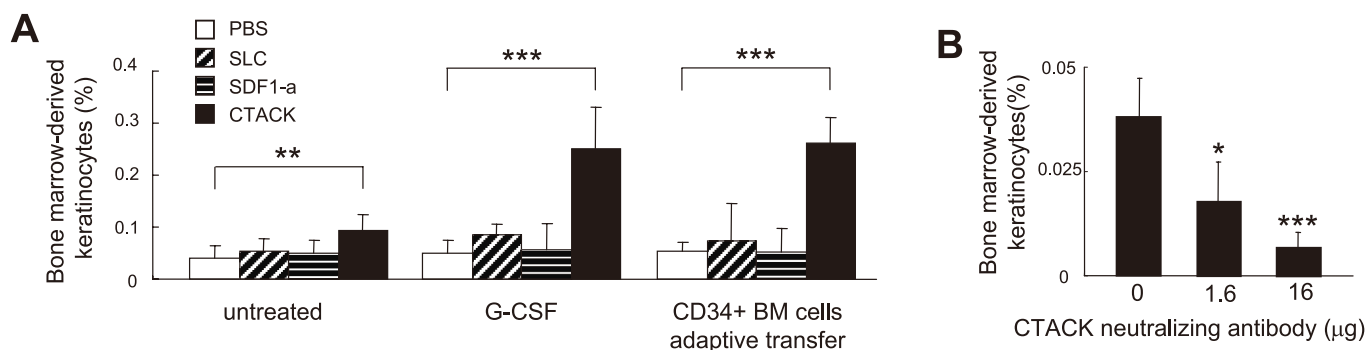


FIGURE 3

CTACK specifically accumulated BMDK in wounded skin.

(A) The number of BMDK was quantified as a percentage of the total number of keratinocytes in wounded skin from untreated mice or those treated with G-CSF for cytokine mobilization or those that received CD34+ BM cells adoptive transfer. SLC, SDF-1 α or CTACK (1 μ g in 30 μ l) were intradermally injected into the periphery of wounded skin (5 mice in each group). CTACK significantly accumulated large numbers of BMDK as compared with SLC, SDF-1 α and PBS (**P < 0.01). Furthermore, the number of BMDK increased in mice treated with G-CSF for cytokine mobilization or those that received CD34+ BM cells adoptive transfer (**P < 0.005).

(B) CTACK neutralizing antibody (0-16 μ g in 120 μ l) was injected to the periphery of wounded skin. The numbers of BMDK were decreased by CTACK neutralizing antibody in dose-dependent manner (5 mice) (*P < 0.05, **P < 0.005).

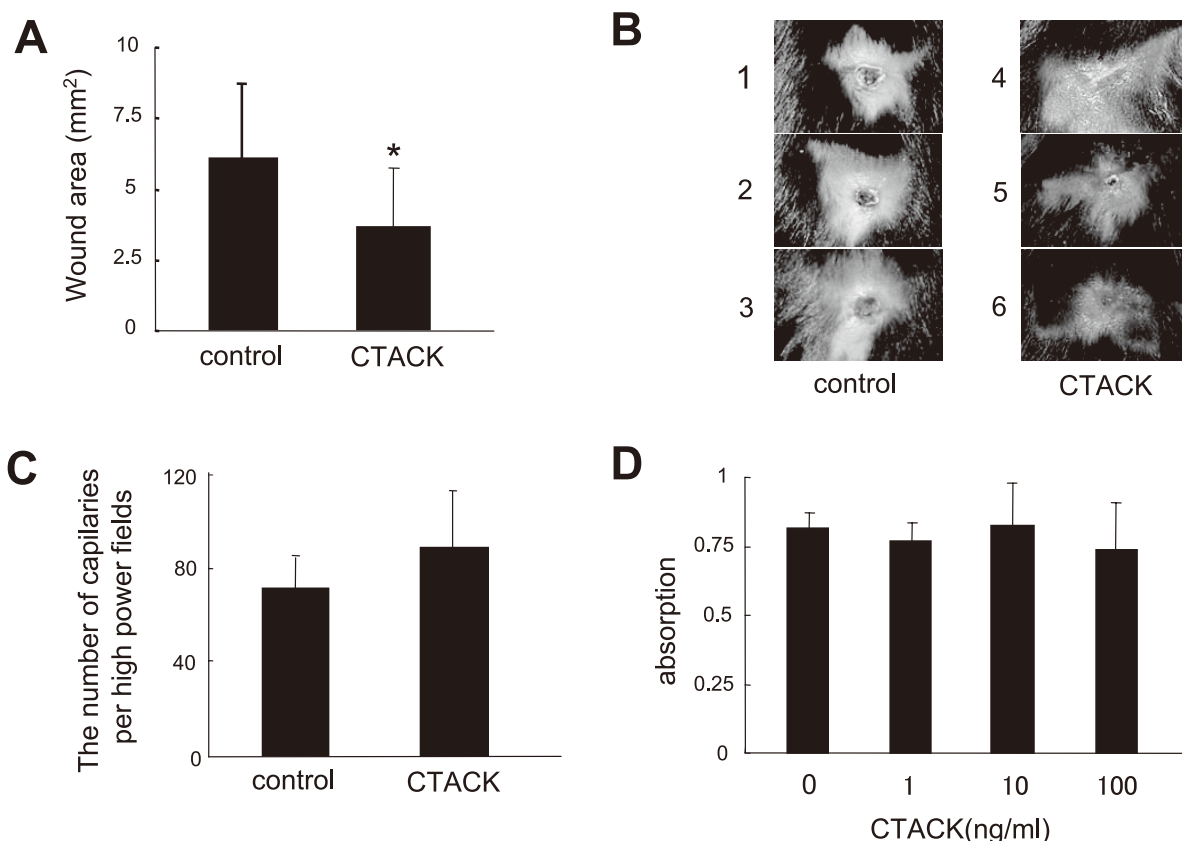


FIGURE 4

Increased BMDK by CTACK accelerated wound closure without angiogenesis or keratinocyte proliferation.

(A, B) Wound size was measured at 10 days after wounding and subsequent CTACK treatment (total 3 μ g in 100 μ l) or PBS (100 μ l), as control (6 mice in each group). Full-thickness cutaneous wounds were made and subsequently monitored daily. Intradermal injection of CTACK significantly accelerated wound closure (*P < 0.05) (A). Representative photographs of PBS, as control (mouse 1-3), or CTACK (mouse 4-6) treated wound appearance at 10 days after wounding (B).

(C) The numbers of capillaries in the dermis treated by CTACK (1 μ g in 30 μ l) or PBS (30 μ l) as control vehicle at 3 days after wounding were quantified. There was no statistical difference between CTACK and control (2 sections at each 5 mice).

(D) Keratinocytes were cultured with or without CTACK (0-100ng/ml) for 72h and viable cells were determined by proliferation assay. There was no statistical difference in proliferation of keratinocytes between the two treatment groups (9 mice).

CTACK は表皮細胞の増殖を促進しないことから (Fig. 4D)、CTACK の創傷治癒促進効果は主に骨髄由来表皮細胞誘導により惹起された。

4. 考 察

本研究課題により、骨髄由来表皮細胞の皮膚遊走機序の詳細が解明された。特定された特異的骨髄由来表皮細胞遊走因子：CTACK を用いた新たな再生医療の可能性があると考ええる。またこの本研究の手法および成果は、多くの組織細胞においても応用可能なものであり、本研究成果がブレークスルーとなり、他臓器についても解明されると予想される。さらに構造タンパク欠損を同種骨髄移植で補えることが示されれば、根本治療の全くない重症表皮水疱症への画期的治療に結びつくと思われる。あわせて、他臓器の多種の構造タンパク欠損症に対しても治癒の可能性を示すと考える。

また最近我々は間葉系幹細胞 (MSC) も同様に、特異的ケモカイン、ケモカインレセプターにより創傷皮膚に遊走することを見出した²⁾。幹細胞を用いる再生医療においてケモカイン、ケモカインレセプターを用いた治療の可能性が開かれたと期待する。

(引用文献)

- 1) Inokuma D, Abe R, Fujita Y, et al.: CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes. *Stem Cells* 24, 2810-2816, 2006.
- 2) Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al.: Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180, 2581-2587, 2008.