iPS細胞の造血幹細胞への分化能を応用した先天性皮膚疾患の治療

北海道大学病院皮膚科
藤田　靖幸

Epidermolysis bullosa (EB) is a group of genodermatoses that cause blister formations from the congenital abnormality of anchor proteins between the epidermis and the dermis. There have been several strategies for the treatment of EB, and so far, cell therapies are the most promising approach because of the potential of systemic effects. We have proved that stem cell therapies, including bone marrow transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, can ameliorate the phenotype and survival prognosis in the junctional EB model mice that lack type XVII collagen (Col17). In this study we explore more efficient approaches of stem cell therapies for EB, including intramedullary transplantation, mesenchymal stromal/stem cell infusion, application of induced pluripotent stem cells (iPSCs), and investigate factors in association with transdifferentiation from bone marrow-derived stem cells into keratinocytes.

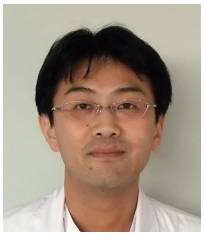
1．緒　言

表皮水疱症は，皮膚の表皮-真皮境界部を構成する蛋白に先天的な欠損ないし構造異常が生じることで同部位の脆弱性を生じ，機械的刺激によって容易に水疱や潰瘍を形成する疾患である．現時点で対症療法以外に確立した治療法は存在せず，特に重症型では感染症や脱水，二次的な悪性腫瘍などを生じ，生後数年以内に死亡するものも存在する．

表皮水疱症などの重症遺伝性皮膚疾患において近年研究されている治療法としては，遺伝子治療，蛋白補充療法および細胞療法がある．このうち細胞療法は，正常遺伝子を有する細胞を患者に投与して欠損蛋白の産生を促す治療法である．全身性の効果が期待できること，生着により長期間の治療効果が望めること，造血幹細胞移植など現代の医療レベルで施行可能な治療法があり倫理的障壁が低いこと，などの利点が考えられる．

重症遺伝性皮膚疾患の治療開発に於いては，疾患モデルマウスの利用が必須である．我々の研究室では近年，新規表皮水疱症モデルマウスとして，皮膚構成蛋白の17型コラーゲン（COL17）欠損マウスの作成に成功した[1]．COL17欠損マウスは従来の表皮水疱症モデルマウスと異なり，成体まで生存する特徴を有しており，各種治療実験のモデルとして有用である．そして我々は，COL17欠損マウスにおいて実際に骨髄移植療法が予後改善および臨床症状の改善に寄与することを示した[2]．

本研究は，上記表皮水疱症モデルマウスを用いて，効率的な治療効果を得るために，幹細胞移植の時期および方法の最適化検討，皮膚分化因子を併用した造血幹細胞移植，骨髄内投与などのより効率の高い投与方法，および安全に施行しうる間葉系間質細胞療法や，iPS細胞を応用した幹細胞療法の有用性を検討する．本研究を遂行することにより，難治性疾患である表皮水疱症への新たな治療戦略を立てる上で重要な知見が得られるものと考える．



Treatment of congenital severe skin disorders with hematopoietic stem cells obtained from induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Yasuyuki Fujita
Department of Dermatology, Hokkaido University Hospital

2．実　験

2. 1. 分化誘導

ES/iPS細胞の分化誘導はKitajimaらのプロトコールに準じて行った[3]．*Lhx2*遺伝子を組み込んだレトロウィルスベクターをPLAT-E細胞にtransfectionし，培養後に上清を濃縮して*Lhx2*レトロウィルス液を調製した．ES/iPS細胞をOP9細胞と10cmディッシュ内で5日間共培養し，mesodermal clustersを作製した時点で*Lhx2*遺伝子を形質導入させた．さらに10日間OP9細胞と共培養を続け，血球系前駆細胞であるc-kit+, sca-1+, lineage-population（KSL細胞）の出現をフローサイトメトリーにて確認した．

2. 2. 細胞移植

骨髄移植及び造血幹細胞移植として，ドナーとなる成体Col17欠損マウスに6Gy放射線照射を行い骨髄機能を非破壊的処置した後に，5×10^6個のGFP+トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞ないし5×10^3個の造血幹細胞を経尾静脈投与した．新生仔マウスに対しては2.5Gy放射線照射ののちに，5×10^6個の骨髄由来細胞ないし5×10^3個の造血幹細胞を眼窩静脈叢を経由して静脈投与した．

MSC療法として，成体Col17欠損マウス，COL17レスキューマウス（マウス由来Col17（以下mCol17）を欠損するが、ヒト由来COL17（以下hCOL17）を発現することで表皮水疱症発症を回避したマウス[1]）およびCol17欠損新生仔マウスの背部に，用手的な水疱形成ないし4mmパン

チ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作製した上で，GFP+ トランスジェニックマウス由来のMSC 1×10^6 個を経静脈投与，腹腔内投与ないし水疱/創傷周囲への局所投与を行った．

ES/iPS細胞移植として，ドナーとなる成体COL17 レスキューマウスおよびCol17 欠損マウスに放射線照射を行った後に，1×10^4 個のLy5.1 由来の造血系誘導済みES/iPS細胞を，サポーター細胞として成体Col17 欠損マウス由来の全骨髄細胞 5×10^5 個とともに経静脈投与した．

2. 3. COL17 発現解析

骨髄移植・造血幹細胞移植においては，移植 4 週間後に末梢血フローサイトメトリー解析にてドナー血球細胞の生着を確認，背部皮膚に 4 mm パンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し，3 週間後に上皮化した部位の皮膚を採取して検討に用いた．MSC 療法においては細胞療法後 3 週間で皮膚を採取し，検討した．

上記で得られた皮膚組織は①凍結切片作成後にマウスCol17 モノクローナル抗体（1：2,500, KT4.2）による蛍光抗体法　②total RNA 抽出および定性RT-PCR　③電子顕微鏡によるヘミデスモソーム構造観察　④表皮抽出物およびマウスCol17 モノクローナル抗体（KT4.2）を用いたWestern blotting　を施行し，Col17 の発現を検討した．

2. 4. マイクロアレイ解析

造血幹細胞移植を行いドナー細胞の生着を確認したCol17 欠損マウスに対して 4 mm パンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し，3 週間経過して上皮化した皮膚組織を採取した．ディスパーゼⅠ（エーディア）を用いて真皮／表皮を分離し，さらに 0.25％トリプシンで表皮細胞を分離させた後，FACS Aria を用いて表皮角化細胞を含む非血球細胞としてGFP+CD45− 細胞（ドナー由来）およびGFP−CD45− 細胞（レシピエント由来）を各々ソーティングした．これら細胞からRNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いてtotal RNA を抽出し，Ambion WT Expression Kit（Applied Biosystems）を用いてcRNA を増幅・精製した．逆転写反応によりcDNA を合成し，GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array（Affymetrix）を用いてマイクロアレイプローブとハイブリダイズさせた．GeneChip Scanner 3000 7G およびGeneChip Command Console® Software（AGCC）を使用してシグナル測定，データを取得し，GeneSpring GX にて解析を行った．

3．結　果

3. 1. 幹細胞移植の時期および方法の最適化検討

我々は，成体Col17 欠損表皮水疱症マウスに対して骨髄由来細胞ないし造血幹細胞を経尾静脈移植し，臨床的な改善を見いだしている[2)]．現実的には表皮水疱症患者は特に重症例では成長前に死亡，ないし有棘細胞癌などの発症により移植処置が困難になることが予想される．また，Col17 欠損マウスは成体まで成長するものが自然経過では全体の約 20％にとどまり，成長前に死亡する個体が多い．そのためまず我々は，可能な限り生後早い段階での介入による治療可能性を検討した．生後 3 日以内の新生仔Col17 欠損マウスに対して経眼窩静脈による骨髄移植を施行したところ，成体まで成長したマウスは 4/34 匹（11.8％）にとどまり，皮膚におけるCol17 発現も免疫染色・RT-PCR・Western blottingで確認できなかった（図 1A）．生存したCol17 欠損マウスの末梢血フローサイトメトリー解析では，生着したドナー由来のGFP+ 血球細胞の割合は 12.8±2.2％に過ぎなかった．また，臨床症状においても生後 28

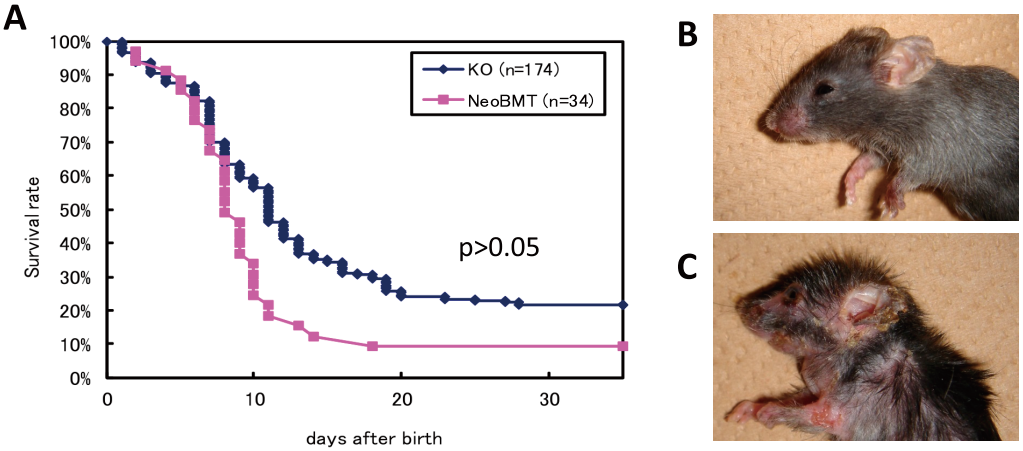


図 1　Col17 欠損表皮水疱症マウス新生仔に対する造血幹細胞移植
(A) Col17 欠損表皮水疱症マウス新生仔に対する造血幹細胞移植療法の治療成績
(B, C) 新生仔移植療法成功例．
生後 1 ヶ月の時点(B) では正常マウスとほぼ同様の臨床像であり，極めて良好な治療効果が得られたが，生後 2 ヶ月より急激にびらんの形成が強くなった(C)．

日の時点ではほぼ正常と同様であったものの，その後１ヶ月で急激に水疱びらんが多発するようになった（図 1B,C）．この急激な臨床症状の変化の原因として，現病の表皮水疱症の悪化や，GVHD の発症などが可能性として考えられた．

新生仔マウスに対する骨髄移植療法が困難であることが確認されたため，次に，GVHD の発症可能性が低く，容易に細胞数を得ることが可能である MSC の治療可能性を検討した．新生仔 Col17 欠損マウスに対して GFP トランスジェニックマウス由来 MSC の腹腔内投与（n=11）および水疱内への皮内投与（n=24）を行ったが，全例で生後 18 日以内に死亡し，未治療群との生存率に有意差を認めなかった（図 2）．

先天性皮膚疾患においては，白血病など血液悪性疾患における造血幹細胞移植とは異なり，造血細胞を完全置換する必要性が高くない．その一方で，Col17 欠損表皮水疱症マウスへの骨髄移植実験において，造血系細胞の置換率（キメラ率）とドナー由来皮膚構成細胞の出現率との間には正の相関が観察される（data not shown）．そのため，皮膚障害をきたさない前処置でかつ，より生着率の高い移植手技が望ましい．また，MSC 移植系においては，尾静脈投与では投与細胞の 80% が肺にトラップされるとされ，MSC から皮膚構成細胞へ分化させるにあたり効率が相当低いことが推測される．これらの背景を勘案して，次に我々は，造血幹細胞・MSC を Col17 欠損表皮水疱症マウスへ骨髄内投与する試みを行った．まず，成体 Col17 欠損表皮水疱症マウスへ 6 Gy の放射線前処置の後，GFP+ 骨髄細胞を骨髄内移植した．4 週間目における CD45+ 陽性細胞の生着キメラ率は 87.9 ± 3.9%（n=5）であり，尾静脈投与群の 72.1 ± 5.5%（n=12）と比較して生着率に有意差を認めた（$p<0.05$）．しかし，免疫染色による基底膜部 Col17 の発現割合に明らかな差を認めなかった．また，GFP 陽性 MSC を成体 Col17 欠損表皮水疱症マウスおよび野生型 C57BL/6 へ骨髄内移植した群においては，移植 4 週間後の時点でドナー GFP 由来の MSC は骨髄内に観察されず，皮膚においても GFP 陽性細胞が観察されなかった（それぞれ n=5）．以上より本実験系においては，骨髄内投与は移植方法としてメリットが少なく，妥当性に乏しいことが判明した．

3. 2. 皮膚分化関連因子の検索

我々は過去に，骨髄由来細胞や MSC に発現するケモカインレセプターおよびケモカインによる相互作用が皮膚創傷部への細胞動員を促進し，表皮角化細胞を含むドナー由来皮膚構成細胞の出現を亢進させることを報告している．そこでより直接的に，表皮水疱症マウスへの骨髄移植後に皮膚に出現するドナー由来およびレシピエント由来の表皮細胞における遺伝子発現の差違を解析し，骨髄由来細胞の表皮角化細胞への分化関連因子の検索を試みた．Col17 欠損マウスに骨髄移植を行い，生着後皮膚から GFP+CD45− 細胞（ドナー由来表皮角化細胞）および GFP−CD45− 細胞（レシピエント由来）を各々ソーティングし，マイクロアレイ解析で mRNA 発現の差違を網羅的に検討した．合計 23446 プローブが解析可能であり，そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された．既知の遺伝子でドナー由来角化細胞で発現が亢進しているものとして，*Mmp13*, *Cxcl10*, *Cxcl9* などが検出された（図 3）．

3. 3. ヒト MSCs の表皮水疱症治療への応用可能性の検討

我々は過去にマウスにおいて，MSCs が皮膚構成細胞へ分化しうることを示し，MSCs の静脈投与によって表皮水疱症マウスにおいて欠損蛋白が発現しうることを示した．ヒト MSCs においてはチリのグループで，健常人の兄弟骨髄から採取・培養した MSCs を栄養障害型表皮水疱症患者の病変皮膚に局所注射することで，治療効果を有したという報告があり，本邦でも MSC 局所投与の臨床試験が開始されている．そこで，全身的作用に期待するという観点から我々は，ヒト細胞が生着しうる免疫不全 NOG マウスにおいて，ヒト MSC の静脈投与がヒト基底膜蛋白の産生を

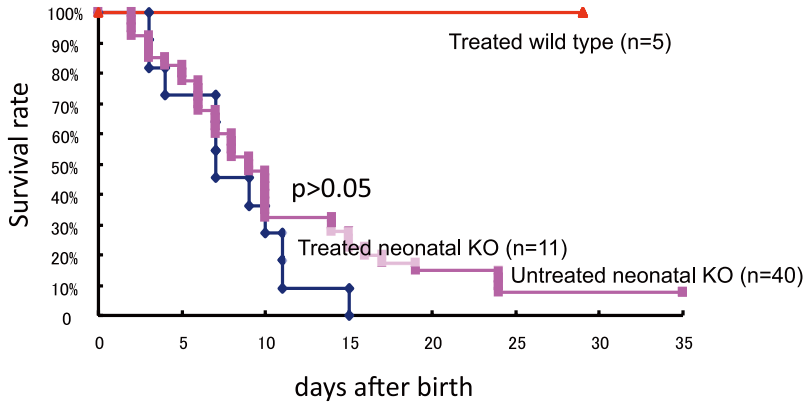


図 2　Col17 欠損新生仔マウスに対する間葉系間質細胞（MSC）腹腔投与療法の治療成績

もたらすかを検討した．NOGマウス（n=4）に全層皮膚欠損を作製し，直後に尾静脈よりヒトMSC 1×10^6cellsを投与し，上皮化した皮膚を採取して検討したところ，免疫染色でMHC class I 陽性細胞が真皮に散見され（図4A），RT−PCRにても *human GAPDH* mRNAが検出された．4匹中2匹において *human COL17*，1匹で *human BPAG1* のmRNAの発現がわずかに確認された（図4B）が，免疫染色ではこれらの蛋白発現は確認されなかった．COL7をはじめとした他の皮膚基底膜蛋白の発現は，免疫染色・RT−PCRともに確認できなかった．

3. 4. ES/iPS細胞による治療の検討

次に我々は，ESおよびiPS細胞の造血系細胞への分化誘導による造血幹細胞移植の治療可能性を検討した．

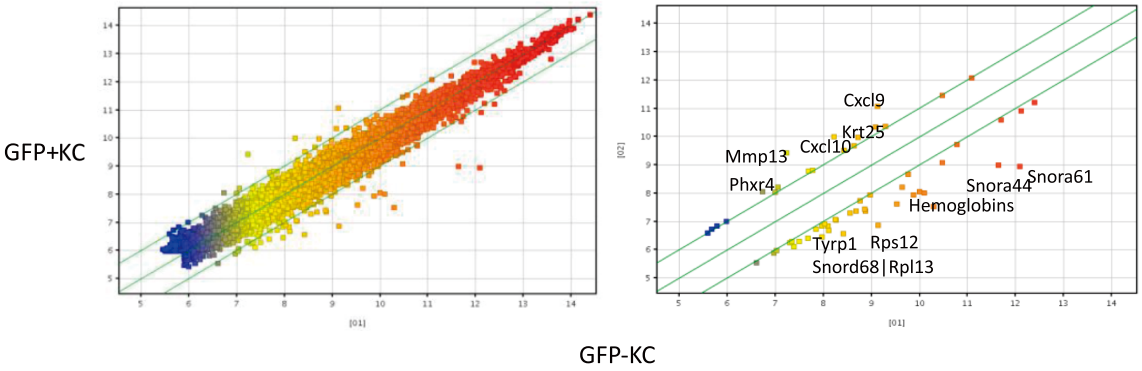


図３　移植後角化細胞のマイクロアレイ解析

移植療法後の表皮水疱症マウス皮膚よりドナー由来（GFP+）/ レシピエント由来（GFP-）の角化細胞を抽出し，遺伝子発現解析を行った．合計23446プローブが解析可能であり，そのうち遺伝子発現に2.0倍差以上を認めたプローブが57同定された．

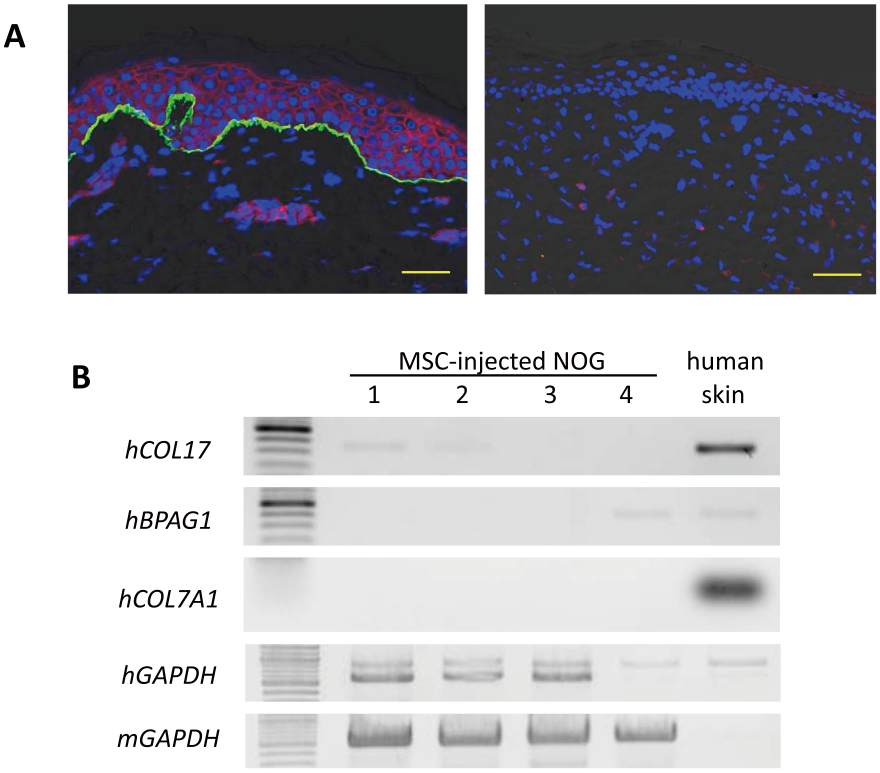


図４　NOGマウスに対するMSC療法の検討

（A）ヒトMSC投与後のNOGマウス皮膚の免疫組織学的検討．正常皮膚（右）ではCOL17が基底膜部に線状に観察され，表皮角化細胞および線維芽細胞等の細胞膜にHLA classIが発現している．ヒトMSC静脈投与後のNOGマウス皮膚では，真皮に散在性にHLA classI陽性細胞が観察された．

（B）ヒトMSC投与後のNOGマウス皮膚のRT-PCR解析．4匹中2匹に *human COL17*，1匹で *human BPAG1* mRNAの発現が確認された．

Ly5.1 由来のES細胞ないしiPS細胞に*Lhx2*遺伝子を導入し，OP9 細胞と共培養することで血球系前駆細胞（KSL細胞）への分化を確認，さらに血球系細胞への分化を*in vitro*で確認した（図 5A, B）．このようにして得られた細胞を成体COL17 レスキューマウスに移植したところ，移植後 4 週間後の時点での末梢血キメラ形成率はES細胞移植群で 6.32 ± 2.53 %（n=5），iPS細胞移植群で 12.2 ± 5.26 %（n=10）であった．定性RT-PCRにおいて計 15 匹中，iPS細胞由来造血幹細胞移植を行った 2 匹，ES細胞由来造血幹細胞移植を行った 1 匹において*mCol17*の発現が確認された（図 5C）．しかしながらこれらのマウス皮膚において，免疫染色でmCol17の基底膜への線状沈着は確認できなかった（図 5D）．また，電子顕微鏡においてヘミデスモソームの成熟化も確認できなかった．

4．考　察

表皮水疱症は生下時より全身皮膚に異常をきたし，感染症や慢性貧血，悪性腫瘍など種々の合併症を併発して予後不良となることも多い重症先天性皮膚疾患である．今回我々は，骨髄移植をはじめとした造血幹細胞移植療法が疾患モデルマウスにおいて治療法になり得るという知見を背景として，より有用な細胞療法の可能性を検討した．

表皮水疱症に対する骨髄移植療法（造血幹細胞移植療法）は，移植された造血幹細胞，あるいは間葉系間質細胞やそれらの細胞から分化した前駆細胞等が，何らかの機序により皮膚構成細胞へと変化し，機能性を有する角化細胞として欠損蛋白を補充するという発想を基礎に置く．この角化細胞への変化においては，幹細胞ないし前駆細胞が自身の持つ可塑性を介して角化細胞へ分化するtransdifferentiationという考え方と，幹細胞ないし前駆細胞，あるいはマクロファージなどの成熟細胞が角化細胞と融合（fusion）することで，既存の角化細胞が欠損蛋白の産生能を獲得するという二つの機序が考えられる．我々が検討した範囲では，疾患モデルマウスに性別の異なるドナー骨髄細胞を移植した実験系においてFISHで角化細胞のX/Y染色体を検討したところ，fusionした細胞は観察されなかった[2]．また，マウスPAM212細胞をフィーダーとしてヒト造血幹細胞を共培養したところ，皮膚基底細胞に特

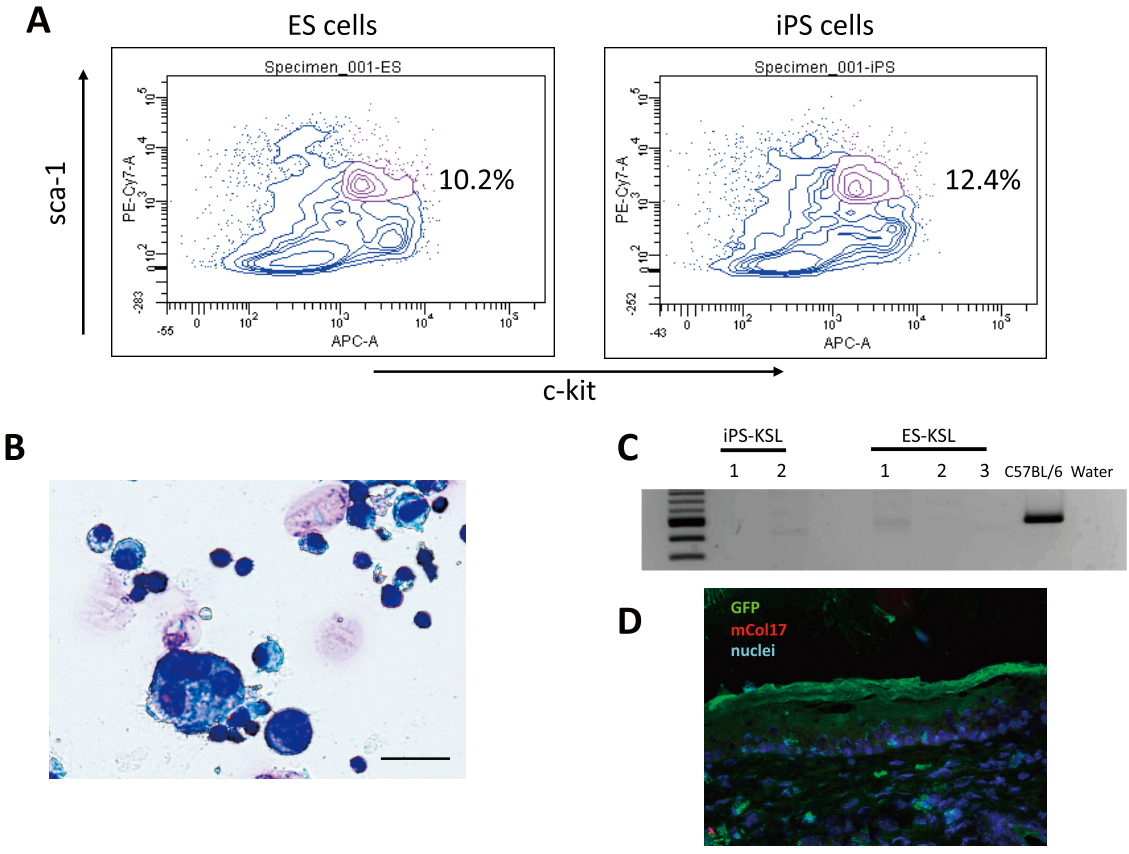


図 5　iPS/ES 細胞の血球系誘導
（A）血球分化誘導後の FACS 解析．ES 細胞（左），iPS 細胞（右）ともに造血系前駆細胞（KSL）が同定された．
（B）さらに OP9 細胞と共培養することで，Giemsa 染色で分葉核を有する好中球を含む成熟血球細胞が多数出現した．
（C）ES および iPS 細胞由来 KSL 細胞を COL17 レスキューマウスに移植したところ，一部のマウスにおいて *mCol17* mRNA の発現が定性 RT-PCR にて確認された．
（D）同移植マウス皮膚を免疫染色したが，mCol17 の基底膜への沈着は確認されなかった．

異的に発現するK14陽性細胞，すなわちヒト角化細胞へ，fusionを介さずに分化した[4]．同様の検討は，ヒト表皮水疱症患者へ造血幹細胞移植を行った例においても示されている．これらの知見からは少なくとも，造血幹細胞から角化細胞へ直接分化した経路が存在すると考えられるが，現実的にはfusionの経路を介して機能性角化細胞へ変化した細胞も少なからず含まれると考えられる．

今回我々は，より効率的な移植時期・方法を目指して新生仔疾患マウスへの骨髄移植・MSC移植および骨髄内投与による造血幹細胞移植を検討したが，いずれも通常の成体マウスへのconventionalな骨髄移植療法と比較して優位性を見いださなかった．しかしながら，骨髄内投与においては移植後4週の早期の時点で生着キメラ率が高く，臨床効果に有意差は無かったものの注目すべき知見であると考える．キメラ率の高い個体ほど骨髄細胞由来の皮膚構成細胞の出現割合は高くなる傾向が示唆されており，患者への臨床応用という観点からは，小児例で施行されている骨髄内移植は通常の静脈投与による造血幹細胞移植と比較して表皮水疱症の治療においても成績が向上する可能性が示唆される．

MSCを含む骨髄由来細胞の皮膚への遊走を促進し，皮膚構成細胞への分化を促進させる因子として，我々はケモカインの一種であるCTACK/CCL27やSLC/CCL21の可能性を示している[5, 6]．また，TamaiらはMSCの皮膚構成細胞への促進因子としてHMGB-1が重要な役割を果たしていると報告している．我々はさらにcriticalな因子の存在を検討するべく，*in vivo*において，マイクロアレイ法を用いて骨髄由来とドナー由来の角化細胞における遺伝子発現パターンを比較したところ，*Mmp13*, *Cxcl10*, *Cxcl9*などが検出された．MMP13は創傷皮膚において血管新生や角化細胞増殖に関わることが知られており，またCXCL9/10は炎症性ケモカインとして生理的意義が検討されつつある．表皮水疱症マウスや患者に置ける，これらの因子の関与を今後検討することで，表皮水疱症に対する細胞療法に新たな知見が加えられることが期待される．

また，造血幹細胞移植においては時に移植細胞数の低下による生着不全や，MHC mismatchによる治療困難例が存在するが，iPS細胞を応用した造血幹細胞移植はこれらの問題点を克服できる可能性がある．本研究ではその端緒として，*Lhx2*遺伝子導入を併用したES/iPS細胞の血球系分化誘導を行い，*in vitro*で造血系前駆細胞（KSL細胞）および分化血球細胞を確認した．これらの細胞をCOL17レスキューマウスに移植したところ，一部のマウスにおいてmRNAレベルでの欠損皮膚基底膜蛋白の発現が確認されたものの，免疫染色や電子顕微鏡レベルでの回復は確認されなかった．これはいくつかの理由が考えられるが，その1つとして，conventionalな骨髄/造血幹細胞移植モデルと比較して，移植において十分な末梢血キメラ形成を得られていないことが挙げられる．血球誘導の効率的な方法の検討や，移植細胞数の検討などをさらに重ねていく予定である．

iPS細胞の重症先天性皮膚疾患への応用は，正常遺伝子を有するiPS細胞を角化細胞へ分化，表皮シートを作製しそれを植皮と同様に貼布する方法や，毛組織およびそれに含まれる毛幹細胞・表皮幹細胞へ誘導して病変部皮膚へ移入する方法などが考慮されるが，我々は重症先天性皮膚疾患が全身皮膚を侵すという観点から，全身性の効果が少ない治療回数で期待できる造血幹細胞移植の可能性を検討している．これら再生医療の分野においては，臨床応用に繋がる安全性・効率を備えた新規治療戦略を考慮し検討を継続する必要がある．

（参考文献）

1）Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H. Humanization of autoantigen. Nat Med 13:378-383, 2007.

2）Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H. 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.

3）Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. Blood 117:3748-3758, 2011.

4）Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. Clin Exp Dermatol 37:658-664, 2012.

5）Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, McMillan JR, Shimizu T, Shimizu H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes. Stem Cells 24: 2810-2816, 2006.

6）Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. 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.