

骨髄間葉系幹細胞と損傷組織のクロストーク

玉井克人

Cross-talk between bone marrow mesenchymal stem cells and injured tissue

Katsuto Tamai, MD, PhD

はじめに

生体骨髄組織内には、赤血球、白血球、血小板へと分化し血液細胞を供給する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) に加えて、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞への分化能力を示す間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) が存在すると考えられている。しかし、HSCはその特異的遺伝子が同定され、その発現を手掛かりとした分化系譜の追跡 (lineage tracing) 研究がすすめられた結果、生体内におけるHSCの役割については詳細が解明されている一方、MSCについては未だ特異的遺伝子が不明であるため、その生体内における役割については不明な点が多い。さらに、骨髄血から得られた付着性線維芽細胞様増殖細胞を間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell) と呼び、これも“MSC”と略記されているため (ここでは便宜的に間葉系幹細胞をMSC、間葉系間質細胞をMStroCと別記する)、再生医学分野内でさえMSCとMStroCを混同して議論されていることが多く、生体内でのMSCとMStroCの異同、生体内におけるこれら間葉系細胞の役割解明は再生医学領域における極めて重要なテーマの一つである。

我々は、皮膚基底膜領域の接着分子遺伝子異常により生直後から基底膜レベルで表皮剥離を繰り返し、全身熱傷様皮膚症状をきたす遺伝性水疱性皮膚疾患「表皮水疱症」の病態研究から、表皮水疱症皮膚の再生過程で骨髄由来細胞が表皮細胞及び線維芽細胞の再生に寄与していること、そのメカニズムに剥離表皮内壊死

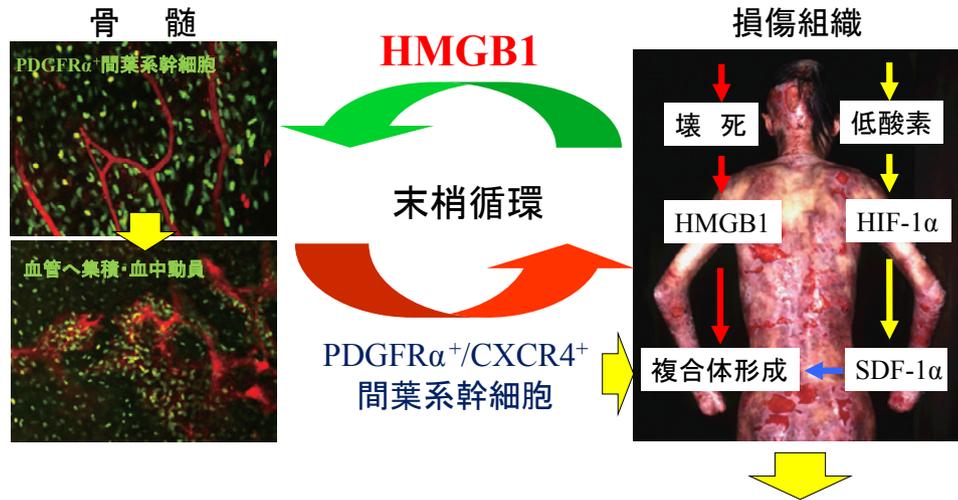
組織由来因子を介した損傷皮膚と骨髄内間葉系細胞のクロストークメカニズムが存在することを明らかにしつつある。

1. 表皮水疱症皮膚再生過程における骨髄由来間葉系細胞の寄与

表皮水疱症は、生直後から生涯、日常生活の軽微な外力で表皮が真皮から剥離して水疱・潰瘍を形成し、全身熱傷様皮膚症状が持続する極めて重篤な遺伝性水疱性皮膚疾患である^{1,2)}。繰り返す表皮剥離とその結果生じる真皮の線維性瘢痕形成により、表皮水疱症患者皮膚では表皮幹細胞、真皮内毛包幹細胞を共に大量喪失することを余儀なくされる。にもかかわらず、皮膚の再生機序は維持されているという臨床的観察との矛盾から、我々は表皮水疱症患者皮膚の再生過程で皮膚外組織からの幹細胞補充メカニズムの存在を想起し、血流を介した骨髄由来幹細胞による皮膚再生メカニズム仮説を提唱してその証明研究を続けている。

皮膚基底膜と真皮を接着するVII型コラーゲン (Col7) の遺伝的欠損により、表皮水疱症の中でも重症病型である栄養障害型表皮水疱症が発症する。栄養障害型表皮水疱症は、経過中に皮膚や食道に瘢痕形成を繰り返す結果、手指の瘢痕性癒着、開口障害、食道狭窄など瘢痕形成に起因する重篤な合併症をきたし、重症例では30歳台以降に瘢痕癌を多発して致死性となる。現在有効な治療法は全く無く、有効な治療法の開発が切望されている。

我々は、Col7ノックアウトマウスに対するGFPトランスジェニック骨髄移植実験から、移植骨髄由来細



抗炎症作用, 線維化抑制作用, 幹細胞活性化作用, 組織再生誘導作用

図1 組織損傷時に大量壊死が生じると、核内クロマチン蛋白 HMGB1 が細胞外に大量放出され、末梢循環を介して骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を刺激して血中へと動員する。また、HMGB1 は末梢循環性 PDGFR α 陽性細胞表面にケモカイン SDF-1 α の受容体 CXCR4 発現を誘導する。一方、壊死組織周囲の低酸素環境では血管内皮細胞からの SDF-1 α 放出が誘導される。SDF-1 α は壊死組織周囲で HMGB1 と結合すると安定化してケモカイン活性が増強し、その結果、末梢循環性 PDGFR α 陽性細胞は SDF-1 α /CXCR4 の作用により壊死組織周囲特異的に集積し、その抗炎症作用、瘢痕抑制作用、幹細胞活性化作用などにより壊死組織の再生を誘導する。

胞の表皮水疱症皮膚への遊走・分化による表皮角化細胞や真皮線維芽細胞の生体内供給メカニズムを明らかにしつつある。その過程で、これら骨髄由来表皮角化細胞、骨髄由来真皮線維芽細胞の骨髄内起源を探索し、骨髄内 PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha) 陽性細胞集団内にその起源があることを明らかにした³⁾。骨髄内 PDGFR α 陽性細胞集団には中胚葉由来 MSC に加えて、外胚葉由来 MSC が存在することが報告されており、表皮水疱症における剥離表皮由来因子が外胚葉由来 PDGFR α 陽性 MSC を活性化し、損傷組織へと誘導している可能性が示唆される。また、末梢循環へと動員された骨髄由来 PDGFR α 陽性細胞はその表面にケモカイン CXCL12 (別名 SDF-1 α : stromal cell-derived factor 1 α) の受容体 CXCR4 を発現しており、表皮水疱症皮膚内壊死組織周囲の阻血性血管内皮細胞から放出される SDF-1 α との相互作用により、壊死組織周囲特異的に集積することが明らかとなった⁴⁾。

2. 表皮水疱症皮膚と骨髄内 PDGFR α 陽性細胞のクロストークメカニズム

骨髄内 PDGFR α 陽性細胞集団の性質およびその生体内挙動を観察するために、PDGFR α プロモーター/

GFP ノックインマウスを入手し、このマウス骨髄内における GFP 陽性細胞の分化能を培養系で検討した結果、骨、脂肪、軟骨への分化能に加えて、表皮細胞への分化能を持つ細胞が含まれることが明らかとなった。さらに、GFP トランスジェニックマウスから PDGFR α 陽性細胞を分離後、致死量放射線照射マウスに野生型マウス由来骨髄細胞と共に移植して骨髄を置換し、さらにその背部に Col7 ノックアウトマウス皮膚を移植することにより、表皮水疱症モデルマウス皮膚の再生過程における骨髄由来 PDGFR α 陽性細胞の寄与および皮膚における分化系譜の追跡実験を実施した。その結果、移植骨髄由来 PDGFR α -GFP 陽性細胞の表皮水疱症マウス植皮片への特異的集積とケラチン 5 陽性表皮細胞への分化が確認された。これらの観察結果から、表皮水疱症皮膚内壊死組織から PDGFR α 陽性骨髄細胞を血中へと動員し、さらに損傷組織への集積を促進する因子が放出されている可能性を予想し、その因子の同定を試みた。その結果、すべての生体細胞が核内に持つ非ヒストン性クロマチン結合蛋白 high mobility group box 1 (HMGB1) が壊死表皮から血中へ大量放出され、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を活性化して血中動員すること、同時に HMGB1 は血中動員された骨髄由来 PDGFR α 陽性細胞

胞表面にケモカイン SDF-1 α の受容体 CXCR4 の発現を誘導し、表皮水疱症皮膚内壊死組織周囲の血管内皮細胞が放出する SDF-1 α との相互作用による末梢循環性 PDGFR α 陽性細胞の損傷皮膚特異的集積を誘導していることが明らかとなった^{3,4)}。表皮水疱症皮膚に集積した骨髄由来 PDGFR α 陽性細胞は強い抗炎症分子 TNF-a stimulating gene-protein 6 (TSG-6) を放出して表皮水疱症皮膚を炎症フェーズから再生フェーズへと転換させつつ、自身は真皮線維芽細胞や表皮角化細胞へと分化して機能的組織再生を促進していることが明らかとなった (図 1)。

3. HMGB1 による生体恒常性維持メカニズムをもとにした体内再生誘導医薬開発

HMGB1 は、二つの DNA 結合ドメイン (A-box および B-box) を介してクロマチン DNA と結合し、そのクロマチン構造を弛緩させることにより遺伝子発現や遺伝子修復を促進する核内シャペロンタンパクである⁵⁻⁷⁾。近年、HMGB1 は壊死組織から受動的に、あるいはマクロファージや樹状細胞から能動的に細胞外へと放出され、DNA やヒストン等の壊死組織由来因子、あるいは LPS やウイルス RNA 等の病原体由来因子と結合した状態で壊死組織内免疫細胞表面の Toll-like receptor (TLR) と結合すると、これら壊死組織由来因子や病原体由来因子単独と比較して有意に強く自然免疫を活性化し、病変部への好中球やマクロファージ浸潤を強く誘導することにより壊死組織や感染組織除去反応を促進するという、いわゆる自然免疫強化機能が明らかにされている^{8,9)}。一方、これら壊死性因子、感染性因子と結合しない遊離 HMGB1 は TLR 刺激を抑制的に制御し、炎症反応の周囲組織への波及をブロックする¹⁰⁾。

上述したように、我々は HMGB1 血中濃度が上昇すると、骨髄内 PDGFR α 陽性細胞を活性化して血中へと動員し、さらに CXCR4 発現誘導を介して CXCR4/SDF-1 α システムによる骨髄由来末梢循環 PDGFR α 陽性細胞の炎症・壊死組織特異的集積を促進し、その抗炎症作用、多分化能により組織再生を促進するという、HMGB1 のあらたな生体内恒常性維持メカニズムを明らかにした^{3,4)}。すなわち、HMGB1 は核内レベル、局所レベル、全身レベルのそれぞれで生体組織の恒常性を維持する極めて重要な分子であり、その機能は表皮水疱症皮膚のみならず、あらゆる生体損傷組織の再生に寄与していると予想される。

一方で HMGB1 は、敗血症後期反応の喚起や脳梗塞炎症の遷延に関与していることが示されるなど、病

態によっては炎症反応と再生反応のバランスを炎症側に傾けることが知られている。最近我々は、骨髄 PDGFR α 陽性細胞血中動員活性ドメイン (KOI2 ドメイン) が自然免疫活性化ドメイン (TLR あるいは RAGE 結合ドメイン) と異なることを見出した (特許出願中)。現在我々は、KOI2 ドメインペプチドを利用した骨髄間葉系幹細胞血中動員医薬開発を進行中である。

おわりに

表皮水疱症患者皮膚の再生メカニズム解明研究から損傷組織と骨髄細胞のクロストークメカニズムが明らかとなり、さらに HMGB1 を利用した体内再生誘導医薬開発へと発展しつつある。HMGB1 医薬は、最初に表皮水疱症の治療薬として開発される予定である。しかし、損傷組織と骨髄細胞のクロストークメカニズムの詳細はいまだ不明な部分が多く、今後この領域研究の進展により、より有効かつ安全な体内再生誘導医療の開発が可能になると期待する。

文 献

- 1) Tamai K, Kaneda Y, Uitto J. Molecular therapies for heritable blistering diseases. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15: 285-292.
- 2) 玉井克人. 表皮水疱症. 疾病対策研究会編, 難病の診断と治療指針. 東京: 六法出版社; 2001.
- 3) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y 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* 2011; 108: 6609-6614.
- 4) Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R, Kikuchi Y, Chino T et al. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR α + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. *J Immunol* 2015; 194: 1996-2003.
- 5) Javaherian K, Liu JF, Wang JC. Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 change the DNA helical structure. *Science* 1978; 199: 1345-1346.
- 6) Baxevanis AD, Landsman D. The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1604-1613.
- 7) Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10320-10325.
- 8) Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group

- box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 35-46.
- 9) Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid mediated innate immune responses. *Nature* 2009; 462: 99-103.
- 10) Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 2009; 323: 1722-1725.
-

著者連絡先：玉井 克人

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

Tel: 06-6210-8396

Fax: 06-6210-8399

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