

## 学位論文の要旨

|  |    |    |      |
|--|----|----|------|
| 学位の種類  | 博士 | 氏名 | 飯沼 晋 |
| 学位論文題目   |    |    |      |
| Skin grafts recruit bone marrow-derived PDGFR $\alpha$ + cells through CXCL12/CXCR4 interaction to enhance tissue regeneration<br>(移植皮膚は CXCL12/CXCR4 を介して PDGFR $\alpha$ 陽性細胞を動員し組織再生を誘導する)   |    |    |      |
| 共著者名   |    |    |      |
| 金田安史、玉井克人、飯塚 一   |    |    |      |
| 未公表  |    |    |      |
| 研究目的   |    |    |      |
| <p>骨髄内には多分化能を有する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) が存在する。近年、組織損傷時に MSC が組織再生のために骨髄から末梢血を介して損傷組織に動員されることが示されている。</p> <p>皮膚において骨髄由来の細胞が損傷時に表皮のケラチノサイトや真皮の線維芽細胞に分化することが明らかになっている。最近われわれは皮膚損傷モデルとして皮膚移植モデルを用いて、骨髄由来のケラチノサイトが移植皮膚片内に多数認められ、皮膚再生に寄与することを明らかにした (参考文献 1)。また骨髄由来のケラチノサイトは、骨髄に存在する platelet-derived growth factor <math>\alpha</math> (PDGFR<math>\alpha</math>) 陽性細胞に由来することを明らかにした。PDGFR<math>\alpha</math>は骨髄における MSC のマーカーの一つとして知られている (引用文献 1)。</p> <p>しかし骨髄 PDGFR<math>\alpha</math>陽性細胞が損傷組織に特異的に集積するメカニズムについては明らかにされていなかった。ケモカインの中で CXCL12 とそのレセプターである CXCR4 は幹細胞の遊走に寄与することが明らかになっている (引用文献 2)。これらの報告は骨髄 PDGFR<math>\alpha</math>陽性細胞が CXCL12/CXCR4 によって損傷組織へ遊走することを示唆するが、生体内においてこのメカニズムが機能しているという直接的な証拠はなかった。</p> <p>今回われわれは、皮膚移植モデルを用いて骨髄 PDGFR<math>\alpha</math>陽性細胞が CXCL12/CXCR4 を介して損傷組織に集積するか検討した。さらに骨髄 PDGFR<math>\alpha</math>陽性細胞の損傷組織における</p> |    |    |      |

役割を劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) の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用いて検討した。

## 材 料 ・ 方 法

### 骨髄移植

骨髄移植のドナーとして CAG プロモーター下に green fluorescent protein (GFP) を強発現するトランスジェニックマウス (C57BL/6 系統) を用いた。レシピエントとして野生型マウス (C57BL/6 系統) を用いた (以下 GFP 骨髄移植マウスとする)。

### 皮膚移植

野生型マウス (C57BL/6 系統) またはⅦ型コラーゲンノックアウトマウス (C57BL/6 系統) の新生仔から皮膚を採取し、移植皮膚片とした。GFP 骨髄移植マウスまたは野生型マウス (C57BL/6 系統) の背部皮膚を切除後、移植皮膚片を縫着した。

### 蛍光免疫染色

移植皮膚片を固定、包埋、薄切し、切片を作成した。一次抗体として抗マウス PDGFR $\alpha$  抗体、抗マウス CXCL12 抗体、抗マウス CD31 抗体を用いた。二次抗体で染色後、4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で核染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影した。

### フローサイトメトリー

移植皮膚片を細切、酵素処理し、細胞懸濁液を作成した。細胞は蛍光ラベルされた抗マウス PDGFR $\alpha$ 抗体、抗マウス CXCR4 抗体、またはアイソタイプコントロール抗体で染色し、FACS を用いて解析した。

### リアルタイム PCR

移植皮膚片を破碎し、全 RNA を回収した。逆転写反応を行い、リアルタイム PCR を行った。CXCL12、Ⅶ型コラーゲンの発現量は TATA box binding protein (TBP) の発現量によって標準化した。

### CXCR4 アンタゴニストの投与

CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 を一定の速度 (10mg/kg/day) で投与するために浸透圧ポンプを用いた。ポンプには AMD3100 もしくは PBS を充填し皮膚移植の 1 時間前に皮下に移植した。

## 成 績

### 骨髄由来 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は移植皮膚片内に集積する

GFP 骨髄移植マウスに野生型マウスの皮膚を移植し、移植皮膚片を回収して蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーによる解析を行った。蛍光免疫染色で皮膚移植後 7 日目に

GFP 陽性かつ PDGFR $\alpha$ 陽性細胞すなわち、骨髄由来の PDGFR $\alpha$ 細胞を真皮内に認めた。フローサイトメトリーでも皮膚移植部で GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞を認め、その割合は皮膚移植後、継時的に増加し、7日目に全細胞中 1.3%に達した。一方で非皮膚移植部ではこのような増加は認められなかった。

#### 移植皮膚片において CXCL12 の発現は増加する

皮膚移植後、移植皮膚片の組織から RNA を回収してリアルタイム PCR により CXCL12 の発現量を定量した。皮膚移植部では移植後 4 日目をピークに CXCL12 の発現量の増加を認めた。一方で非皮膚移植部ではこのような増加を認めなかった。

#### CXCR4 が移植皮膚片への骨髄由来 PDGFR $\alpha$ 細胞の遊走に寄与する

フローサイトメトリーで骨髄細胞を解析したところ、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は細胞表面に CXCR4 を発現していた。さらに移植皮膚片においても GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は細胞表面に CXCR4 を発現していた。CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 を GFP 骨髄移植マウスに投与し、皮膚移植を行った。皮膚移植後 4 日目に移植皮膚片を回収し、フローサイトメトリーで解析したところ、移植皮膚片内の GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞の割合は PBS 投与群と比較して AMD3100 投与群において有意に抑制された。

#### PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は CXCL12/CXCR4 を介して VII 型コラーゲンノックアウト移植皮膚片に VII 型コラーゲンを供給する

VII 型コラーゲンは表皮真皮境界部の基底膜に存在し表皮真皮間の接着に寄与している。VII 型コラーゲンノックアウトマウスは水疱形成により生後すぐに死亡する。われわれは過去に野生型マウスに VII 型コラーゲンノックアウトマウスの皮膚を移植することにより、骨髄細胞によって VII 型コラーゲンが供給されることを示した。

AMD3100 の投与下に、野生型マウスに VII 型コラーゲンノックアウトマウスの皮膚を移植した。14 日後に移植皮膚片を回収し、VII 型コラーゲンの蛍光免疫染色で解析したところ、PBS 投与群では基底膜部に線状の VII 型コラーゲンの沈着を認めたが、AMD3100 投与群ではこの沈着は減少していた。さらに HE 染色において PBS 投与群と比較して、AMD3100 投与群では表皮下水疱が多数認められた。またリアルタイム PCR で骨髄 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞と PDGFR $\alpha$ 陰性細胞の VII 型コラーゲンの発現量を比較したところ、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞が VII 型コラーゲンをより多く発現していた。

### 考 案

われわれは PDGFR $\alpha$ 陽性細胞が CXCL12/CXCR4 を介して集積することにより、VII 型コラーゲンノックアウトマウス皮膚に VII 型コラーゲンを供給し、水疱形成を抑制することを示した。VII 型コラーゲンはケラチノサイトおよび線維芽細胞によって産生されている。われわれは過去に骨髄細胞がケラチノサイトや線維芽細胞に分化することを証明している。さらに近年 RDEB 患者に対して同種骨髄移植を行うことにより、VII 型コラーゲンが供給さ

れ、臨床症状が改善することが報告されている（引用文献 3）。しかし、どの骨髄細胞集団がⅦ型コラーゲンを供給するかについては明らかでなかった。われわれの結果は PDGFR $\alpha$ 陽性細胞がⅦ型コラーゲンの供給に重要であることを証明した。骨髄 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞または MSC を用いた治療が、新規の RDEB 治療につながる可能性があると考えられた。

#### 結 論

骨髄 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は CXCL12/CXCR4 の相互作用で移植皮膚片へ集積する。CXCL12/CXCR4 を介して集積した骨髄 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞はⅦ型コラーゲンノックアウトマウス皮膚にⅦ型コラーゲンを供給し、皮膚再生に寄与する。




#### 引 用 文 献

1. Morikawa, S., et al., Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, 2009. 206(11): p. 2483-96.
2. Askari, A.T., et al., Effect of stromal cell-derived factor 1 on stem cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 2003. 362(9385): p. 697-703.
3. Wagner, J.E., et al., Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med*, 2010. 363(7): p. 629-39.

#### 参 考 文 献

1. Tamai, K., et al., PDGFR $\alpha$ -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(16): p. 6609-14.

## 学位論文の審査結果の要旨

|   |        |     |      |
|---|--------|-----|------|
| 報告番号  | 第 号    |     |      |
| 学位の種類   | 博士(医学) | 氏 名 | 飯沼 晋 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員長</p> <p>飯沼 晋</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>古川 博之</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>斎藤 一</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> |        |     |      |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin-top: 20px;">Skin grafts recruit bone marrow-derived PDGFR<math>\alpha</math>+ cells through CXCL12/CXCR4 interaction to enhance tissue regeneration.<br/>(移植皮膚はCXCL12/CXCR4を介してPDGFR<math>\alpha</math>陽性細胞を動員し組織再生を誘導する)</p>   |        |     |      |
| <p>皮膚において骨髄由来の細胞が損傷時に表皮のケラチノサイトや真皮の繊維芽細胞に分化することが示唆されていた。飯沼氏らは、マウス骨髄細胞をX線照射して除去後に、全身細胞にGFPを発現するマウスから骨髄移植し、骨髄をGFPでラベルした。そのマウスに皮膚移植を施行すると、GFP陽性の骨髄細胞が移植皮膚に生着しケラチノサイトに分化すること、さらに骨髄細胞が血液中に遊走するにはHMGB1が寄与することを先行実験で明らかとした (Tamai, Iinuma et al. Proc Natl Acad Sci USA)。しかし、(1) 血液中に遊走した骨髄由来の細胞が、どのような分子機序で移植皮膚に移動するのは不明であった。(2) また、皮膚に移動した</p>   |        |     |      |

骨髄由来の細胞が皮膚で機能するかどうか十分解明されていなかった。これらの課題に対して、以下の2つを目的として研究をすすめています。

- (1) 血液中に遊走した骨髄さいぼうが移植皮膚へ移動する過程で機能する分子機序としてCXCL12/CXCR4システムが働いているか。
- (2) Collagen type VII欠失マウスの皮膚を移植すると、骨髄由来の細胞が皮膚に生着して機能することで移植皮膚にCollagen type IIの発現を回復できるか。

(1)の目的に対して、X線照射後、GFPマウスから骨髄移植を施行したマウスに皮膚移植を施行すると、PDGFR $\alpha$ 陽性GFP $^{+}$ の骨髄由来の細胞が移植皮膚に集積することを示した。皮膚移植をした血液中および移植皮膚にCXCL12が誘導されるかを解析し、蛋白質レベルおよびmRNAレベルでともに移植後時間経過と共にレベルが上昇することを見いだした。さらに移植皮膚ではCXCL12の受容体であるCXCR4のmRNAの発現が上昇することを明らかとした。以上から、マウス皮膚移植の系でCXCL12/CXCR4のシステムが機能していることが、示唆された。さらに、CXCL12/CXCR4のcontributionを以下の実験で検証した。GFPマウスからあらかじめ骨髄移植を受けたマウスに皮膚移植を行い、そこに持続的にCXCR4アンタゴニスト (AMD3100) を投与するとGFP陽性PDGFR $\alpha$ 陽性細胞への移植皮膚への集積が抑制されたことから、骨髄由来GFP陽性PDGFR $\alpha$ 陽性細胞の移植皮膚への集積に確かにCXCL12/CXCR4がcontributionしていることをスマートに示すことに成功した。また、(2)の課題に対しては、Collagen type VII-KOマウスの皮膚を、予めX線照射後にGFPマウスから骨髄移植を施行したマウスに移植すると、骨髄由来PDGFR $\alpha$ 陽性細胞が移植皮膚に集積することに加えて、Collagen type VIIの発現が移植皮膚で実証された。以上から、骨髄由来PDGFR $\alpha$ 陽性細胞がCollagen type VII産生に寄与することをはじめて明らかとした。

本研究成果は、骨髄細胞由来PDGFR $\alpha$ 細胞の移植皮膚への集積の分子機序を基礎的に解明したことに加えて、将来的にCollagen type VII欠損症等皮膚に以上を来す疾患への治療法開発への重要な基盤を提供する研究成果である。研究方法、倫理面も問題ない、また、質疑応答についても丁寧かつ真摯に科学的に対応した。したがって、本研究は旭川医科大学学位 (博士)の研究としてふさわしいものである。