

氏名 (本籍)	知 野 剛 直 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第 774 号		
学位授与日付	平成 20 年 10 月 15 日		
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Bone Marrow Cell Transfer into Fetal Circulation Can Ameliorate Genetic Skin Diseases by Providing Fibroblasts to the Skin and Inducing Immune Tolerance		
審 査 委 員	(主査) 教授 國 貞 隆 弘		
	(副査) 教授 高 見 剛	教授 武 田 純	

論 文 内 容 の 要 旨

【目的, 緒言】

Bone marrow-derived cells (BMDCs) が, 組織再生に寄与している可能性が示され, bone marrow cells (BMCs) を利用した再生医療, 遺伝子治療が期待されつつある。最近の研究から, 皮膚損傷が引き起こされた部分での皮膚治癒過程で bone marrow-derived fibroblasts (BMDFs) が補充され, 皮膚再生に寄与していると複数報告されている。

しかし, 放射線照射を伴う骨髄移植実験では, 非損傷組織における移植骨髄細胞生着率の検討は困難である。そこで我々は, 放射線照射を行わずに, 胎生期に卵黄囊静脈 (vitelline vein) を利用した胎生マウス循環系への骨髄移植法確立をした。

今回の実験では, 胎仔循環系骨髄移植 embryonic bone marrow cell transplantation (E-BMT) を利用することで, 放射線照射を行わず, BMDFs の出現を皮膚で生理的に近い状態で検討した。

【対象と方法】

具体的には, GFP-transgenic C57BL/6 donor mouse から GFP-BMCs (GBMCs) を harvest し, 同系である C57BL/6 recipient mouse の胎仔 12-13day に E-BMT を行った。その際, 胎仔期に胎仔に直接つながっている vitelline vein を利用することで胎仔循環系に直接 GBMCs を胎仔に傷をつけることなく投与した。投与した GBMCs は胎仔 1 匹あたり, 約 100 万個であった。E-BMT を行い生後 12 週経過 (E-BMT を行ってから 13 週) した mouse の皮膚を検討した。

さらに, 7 型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) 変異により皮膚基底膜の接着が破綻し, 水疱形成をみる先天性表皮水疱症モデルマウス (COL7A1 ノックアウトマウス) の胎仔循環系に GFP 骨髄細胞を移植し, その治療効果を検討した。

【結果】

投与後、13 weeks で皮膚を含む観察したすべての臓器に GFP cells (GCs) が生着していることが確認された。特に、hematopoietic tissue (bone marrow, spleen, thymus, pavers patch, lymph node) では GCs が多数確認され、BM chimerism は約 1% 以内であった。

また、GFP に対する immunotolerance を調べた結果、humoral and cellular immunity で GFP に対する tolerance が誘導されていた。

皮膚では、fibroblastic like cells が多数確認され、IHC で fibronectin, collagen 1, vimentin 陽性、さらに GCs を皮膚から sorting し、in vitro で IHC と RT-PCR を行った結果、fibroblast marker で陽性の細胞が多数認められた。

次に、我々は 7 type collagen が欠損している Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) model mouse で E-BMT を施行した。その結果、胎児骨髄移植マウスは対照コントロール (E-BMT を施行していない knockout mice) に比較して有意に生存率の向上を得た。免疫組織学的検討により、骨髄由来皮膚線維芽細胞と、その近傍基底膜部における VII 型コラーゲンの供給が確認された。

【考察】

胎児期骨髄移植は皮膚欠損分子に対する免疫寛容誘導のみならず、骨髄由来皮膚線維芽細胞供給により先天性表皮水疱症の病態を改善することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

申請者 知野剛直は、胎生期マウス循環系へとつながる羊膜卵黄囊静脈から同系 GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移植し、移植 GFP 陽性細胞に対する免疫寛容誘導と、骨髄由来 GFP 陽性線維芽細胞の皮膚への長期生着を明らかにした。さらに、皮膚基底膜接着分子 VII 型コラーゲン欠損により表皮剥離で死亡する表皮水疱症モデルマウスに対する同様の胎生期骨髄移植により、著しい生存率の向上と、移植骨髄由来線維芽細胞を明らかにした。これらの成果は、難治性遺伝性皮膚疾患の根治的治療法開発に寄与すると認められる。

[主論文公表誌]

Takenao Chino, Katsuto Tamai, Takehiko Yamazaki, Satoru Otsuru, Yasushi Kikuchi, Keisuke Nimura, Masayuki Endo, Miki Nagai, Jouni Uitto, Yasuo Kitajima, and Yasufumi Kaneda : Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance

The American Journal of Pathology 173, 803-814 (2008).