

皮膚線維化過程における骨髄由来細胞の動員と そのコラーゲン産生能に関する研究

東海大学医学部臓器線維症研究ユニット

稲垣 豊

Skin fibrosis is characterized by an excessive deposition of type I collagen and other components of extracellular matrix. Several recent studies have shown that bone marrow (BM)-derived cells migrating into wounded skin produce type I collagen and may contribute to accelerating wound healing. It is unknown, however, whether BM-derived cells also participate in the progression of pathological skin fibrosis. In the present study, we utilized a transgenic mouse strain that harbors a tissue-specific strong enhancer sequence of $\alpha 2(I)$ collagen gene (COL1A2) linked to its proximal promoter and an enhanced green fluorescence protein (EGFP) reporter gene (COL/EGFP). Following a subcutaneous bleomycin injection, there were a large number of EGFP-expressing mesenchymal cells observed in the thickened dermis. BM cells obtained from COL/EGFP transgenic mice were transplanted into lethally irradiated syngeneic animals to replace their BM with COL/EGFP-positive cells. In those recipient mice, only a limited number of EGFP-positive BM-derived collagen-producing cells were observed in the fibrotic skin tissue following a bleomycin injection. These results therefore indicate that skin resident cells, but not BM-derived cells, are the major players producing collagen during skin fibrogenesis.

1. 緒言

コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの発現は、組織や臓器形態の保持に必須であるのみならず、創傷治癒や組織の修復過程などの生理的条件下において重要な役割を演じている。しかしながら、慢性炎症の結果この産生調節機構が破綻をきたすと、コラーゲンが組織に過剰沈着し、皮膚・肝・肺・腎など諸臓器の線維化を引き起こす。これら臓器線維症のうち、強皮症は皮膚をはじめとする全身諸臓器へのコラーゲンの過剰沈着を特徴とする、原因も未だに不明の難治性疾患である。また、手術後瘢痕や熱傷後の皮膚のケロイド形成もコラーゲンの過剰産生によってもたらされ、美容上また精神面で患者に与える影響は深刻である。したがって、これら皮膚のコラーゲン産生過剰をきたす病態を系統的に研究して、その予防と治療法を確立することは、医学的にまたコスメトロジー上も重要な研究課題と言える。

近年、骨髄から皮膚の創傷部位に動員されて生着した細胞が、I型コラーゲンを産生することで創傷治癒の促進に関与する可能性が報告された^{1, 2)}。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定方法やコラーゲン産生の評価方法は報告によりまちまちで、感度および特異性に乏しいため、骨髄由来細胞がどの程度創傷治癒に寄与しているかは十分に解明されていない。また、病的な皮膚線維

化進展に骨髄由来細胞がどの程度に関わっているかは全く解明されておらず、そのメカニズムも不明であった。

そこで今回、I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (COL1A2) の組織特異的エンハンサー・プロモーターとEGFP (緑色蛍光タンパク) を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (COL/EGFP Tg) を用いて、皮膚線維化過程における骨髄由来細胞の線維化組織への動員とコラーゲン産生能を検討した。

2. 実験

線維化組織において増加する細胞外マトリックスの主要成分であるI型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードするCOL1A2遺伝子の転写開始部位の上流-17.0から-15.5 kb間には、胎児の発生過程を含めてI型コラーゲンの産生細胞においてのみ活性が見られ、強い組織特異性を示すエンハンサー配列が存在する³⁾。このエンハンサーを近位部プロモーター、さらにEGFPに連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (COL/EGFP Tg) が、本研究者らにより樹立・継代されている (図1)。

このCOL/EGFP Tgの背部皮下に、プレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアを単回注射して皮膚の線維化を誘導した。注射21日目に皮膚組織を採取して、COL1A2プロモーターの活性化をEGFP蛍光の共焦点レーザー顕微鏡観察により検出した。次に、COL/EGFP Tgの骨髄細胞 5×10^6 個を、致死照射を行った同系マウスの静脈内に投与して、骨髄を置換した。骨髄置換後8週を経過したこれらレシピエントマウスの背部に、同様にプレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの単回注射を行い、COL1A2プロモーターの活性化をCOL/EGFP Tgの場合と比較することで、骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与の程度を評価した。さらに、コラーゲン産生細



Migration of Bone Marrow-Derived Cells and their Contribution to Collagen Production during Skin Fibrogenesis

Yutaka Inagaki

Research Unit for Tissue Remodeling and Regeneration, Tokai University School of Medicine

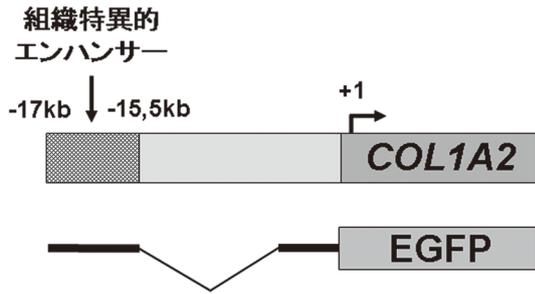


図1 COL1A2エンハンサー・プロモーター／EGFP融合遺伝子
COL1A2遺伝子の転写開始部位の上流-17.0 kbから-15.5 kb間に存在する組織特異的エンハンサーを近位部プロモーター、さらにEGFPに連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)を用いることで、共焦点レーザー顕微鏡下にコラーゲン産生細胞を高感度かつ特異的に検出することが可能である。+1：転写開始部位。

胞の筋線維芽細胞への分化の有無を、抗 α -smooth muscle actin (α SMA)抗体ならびにAlexa660結合ストレプトアビジンを用いた免疫蛍光染色により検討した。この際に共焦点レーザー顕微鏡観察の妨げとなる線維化組織内の自家蛍光は、EGFPとAlexa660の蛍光波長を特異的に検出するEmission Fingerprinting法⁴⁾を用いて除外した。

3. 結果

3.1 ブレオマイシン投与による皮膚線維化の誘導とCOL1A2プロモーターの活性化

ブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアを皮下注射したCOL/EGFP Tgでは、投与21日目において局所の真皮に線維性の肥厚が認められた(図2A)。この真皮内にEGFP陽性、すなわちCOL1A2プロモーターが活性化

した間葉系細胞が多数認められ(図2B)、その約半数が α SMA陽性のmyofibroblastsであった。

3.2 COL/EGFPレシピエントマウスにおけるCOL1A2プロモーターの活性化

次に、COL/EGFPレシピエントマウスの背部皮下にブレオマイシン注射を行うと、COL/EGFP Tgの場合と同程度の皮膚線維化が誘導された。この際に、線維性に肥厚した真皮内にごく少数のEGFP陽性細胞、すなわち骨髄由来のコラーゲン産生細胞が検出され間葉系細胞の形態を示していたが、 α SMAとの共発現は認められなかった。また、骨髄由来のコラーゲン産生細胞数はCOL/EGFP Tgで認められた皮膚組織に存在する全コラーゲン産生細胞数の1%以下と、きわめて少数であった。

4. 考察

骨髄には、高い自己複製能とともに全血球細胞への多分化能を有する幹細胞が存在する。加えて近年では、血球以外の細胞への分化能も証明され、再生医学の分野で注目されるに至った。実際、移植された骨髄細胞が様々な皮膚の構成細胞に分化することで、欠損した皮膚組織が再生することが実験的に証明されている^{5,6)}。加えて最近では、骨髄由来細胞が皮膚の創傷部位に生着し、I型コラーゲンを産生することで創傷治癒の促進にも関与する可能性が報告された^{1,2)}。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定はFACS・Y-FISH・骨髄細胞の遺伝的ラベリングなど、研究者により様々な方法が用いられており、コラーゲン産生の評価にも感度および特異性に優れた方法がないのが大きな欠点となっていた。また、病的な皮膚の

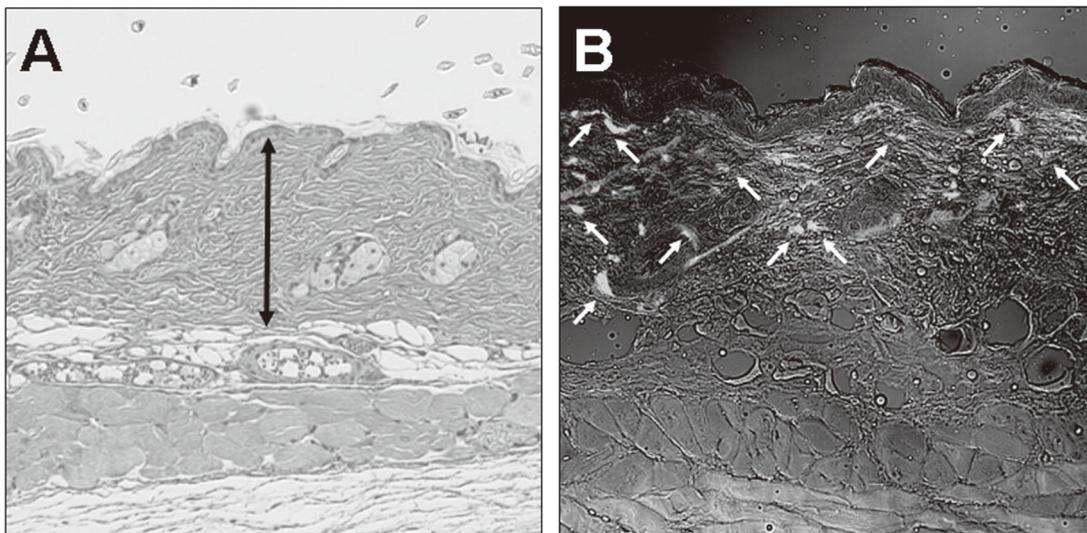


図2：ブレオマイシン皮下投与による皮膚線維症の誘導とI型コラーゲンプロモーターの活性化
COL/EGFP Tgの背部にブレオマイシンを含有したポリ乳酸マイクロスフェアを単回皮下注射すると真皮が線維性に肥厚し(A、両矢印)、同部にEGFP陽性、すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められた(B、矢印)。

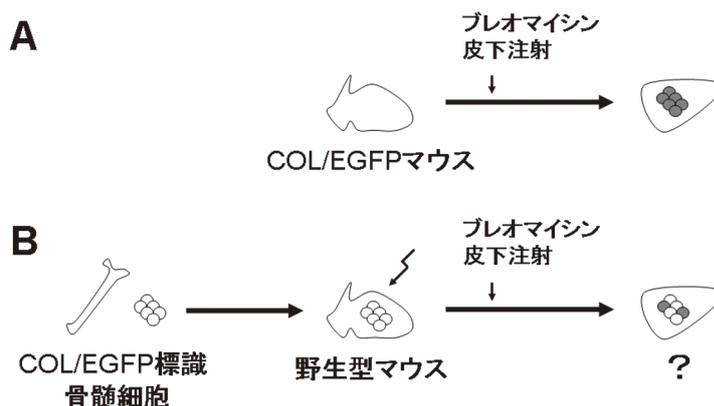


図3 皮膚線維化過程におけるコラーゲン産生細胞の解析

COL/EGFP Tg に実験的皮膚線維症を誘導すると、線維化組織における全てのコラーゲン産生細胞が、その起源とは無関係に、EGFP 発現細胞として検出される (A)。これに対して、COL/EGFP Tg の細胞により骨髄置換されたレシピエントマウスでは、コラーゲンを産生する骨髄由来細胞のみが肝組織内でEGFP を発現する (B) ため、両者を比較することで皮膚組織固有細胞と骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与を比較することが可能になった。

線維化過程に骨髄由来細胞がどの程度に関わっているかは全く不明で、骨髄由来細胞が果たす生理的あるいは病因的役割は十分に解明されていなかった。

今回、I 型コラーゲン遺伝子の組織特異的エンハンサー・プロモーターと EGFP を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (COL/EGFP Tg) を樹立し、個々の細胞におけるコラーゲン産生を高感度かつ特異的に検出することが可能となった。この COL/EGFP Tg ならびにその骨髄細胞を移植されたレシピエントマウスの背部皮下にプレオマイシン注射による皮膚線維症を誘導して、両者における EGFP 発現細胞を比較したところ、皮膚線維化の進展には皮膚組織固有の (myo) fibroblasts が重要な役割を果たし、骨髄由来細胞の関与はあってもきわめて限定的であることが初めて明らかにされた (図3)。

皮膚は全身諸臓器の中でも、コラーゲン含量が最も多い組織のひとつである。その適切な発現制御は皮膚の生理機能の維持や創傷治癒過程において重要であるが、過剰な発現はケロイド形成や皮膚の線維化・硬化を引き起こす。コラーゲン発現の調節機序を解明する上で、骨髄由来細胞の創傷治癒や線維化進展への関与を詳細に研究することは、生理的・病的条件下における皮膚の病態を明らかにし、創傷治癒の促進や皮膚線維症の新たな治療戦略の構築に直接的に結びつくものである。健康な皮膚を維持する上でも多くの情報を与え、コスメトロジーの進歩にも寄与するところが大きいと考えられる。

5. 総括

I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子上の組織特異的エンハンサー・プロモーターと EGFP とを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを樹立した。このトラ

ンスジェニックマウス、もしくはその骨髄細胞を移植したレシピエントマウスを用いることで、皮膚組織固有あるいは骨髄由来コラーゲン産生細胞を特異的に検出することが可能となり、皮膚線維化の進展や骨髄由来細胞によるコラーゲン産生の機序を解明する上で有用な手段になりうると考えられた。

(引用文献)

- 1) Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, et al: Multiple organ engraftment by bone marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone marrow transplanted mice. *Stem Cells* 21: 514-520, 2003
- 2) Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, et al: In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrous lesions. *Stem Cells* 23: 699-706, 2005
- 3) Bou-Gharios G, Garrett LA, Rossert J, et al: A potent far-upstream enhancer in the mouse pro $\alpha 2(I)$ collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J Cell Biol* 134: 1333-1344, 1996
- 4) Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45: 213-222, 2007
- 5) Kataoka K, Medina RJ, Kageyama T, et al: Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. *Am J Pathol* 163: 1227-1231, 2003
- 6) Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al: Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 196: 245-250, 2003