

毛髪由来 iPS 細胞による表皮水疱症の新規治療法開発

北海道大学病院 皮膚科

西江 渉

1. はじめに

表皮水疱症 (Epidermolysis bullosa, EB) は、皮膚基底膜タンパクをコードする遺伝子異常により発症し、皮膚が極めて脆弱となり容易に水疱形成を生じる遺伝病である。これまで種々の治療法開発が行われてきたが、未だ確立されたものはないため、近年、山中らにより樹立された多分化能を有する人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell ; iPS細胞) を用いた、EBを含む遺伝病への臨床応用が期待されている。患者自身の細胞からiPS細胞を樹立し、遺伝子修復後に治療へ応用することが出来れば、拒絶免疫反応の回避が可能となるなど多くの利点がある。しかし、通常iPS細胞を作成するには、培養線維芽細胞や表皮角化細胞が必要であり、局所麻酔を用い皮膚組織の採取を行うが、EB患者皮膚は、びらんや水疱が多発しており極めて脆弱であるため、皮膚採取が困難である。もしEB患者の抜毛した毛髪から、表皮角化細胞の培養とiPS細胞の樹立が可能であれば、極めて有用な手法となる。本研究の目的は、日々の疼痛や創傷処置、瘢痕に伴う機能障害など多くの問題を抱えた生活を余儀なくされているEB患者に対する根拠的治療法開発を目指し、毛髪からのiPS細胞の樹立を目的としたものである。

2. 方法

10~20本、後頭部より抜毛し、毛根部とバルジ領域を含む毛髪を、マトリゲルでコーティングしたプラスチック上へ直接載せ、Epilife培地を用い直接毛包から角化細胞を遊走させる(1)。角化細胞を樹立後、山中4因子をレトロウイルスを用い導入しiPS細胞を樹立する。幹細胞マーカー発現の有無は、樹立した細胞からmRNAを抽出しPCR法で、あるいは免疫組織学的にタンパクレベルでも発現を確認する。

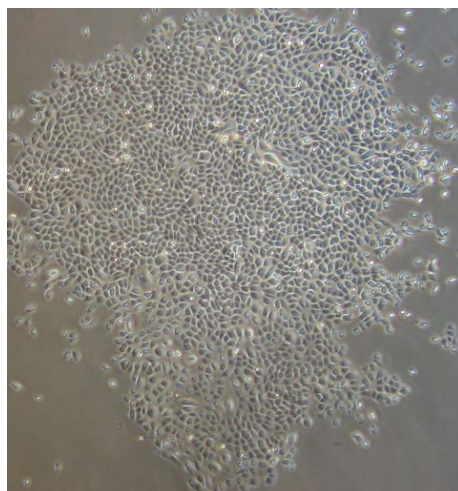


図1 毛髪由来正常角化細胞

3. 結果

健常人の抜毛した毛髪から角化細胞の樹立は報告通りに確立できた(図1)。しかし、患者細胞のiPS化には倫理申請を要するため、実験当初は、毛髪由来角化細胞を詳細に観察することとした。すると、多数の細胞を観察する過程で、毛髪由来細胞は、スフェロイド形成し易い点に気付いた(図2)。スフェロイド形成した細胞は、ネスチン陽性であり(図3)、ウェスタ

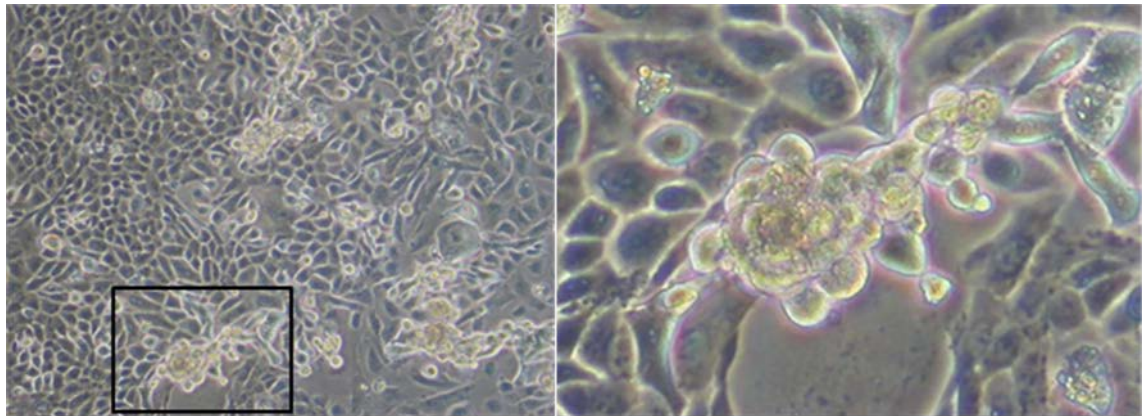


図2 抜毛した毛髪由来角化細胞から生じたスフェロイド

ンブロットにより、神経特異的 β IIIチューブリンを発現していることが確認できた（図4）。これらの結果から、毛髪由来角化細胞は、多分化能を有する組織幹細胞を有していることが示唆された。現在は、iPS化に加え、遺伝子導入させずに直接スフェロイド形成させた細胞の多分化能について検討中である。

上記のように、健常人の抜毛した毛髪から正常来角化細胞を樹立できた。次に、EB患者の抜毛した毛髪より角化細胞の培養を試みた。患者は、VII型コラーゲン遺伝子に8068del17insGA変異を有する32歳の男性であり、インフォームドコンセントのもと20本の抜毛から細胞樹立を試みた。しかし予想に反し、角化細胞樹立は出来なかった。

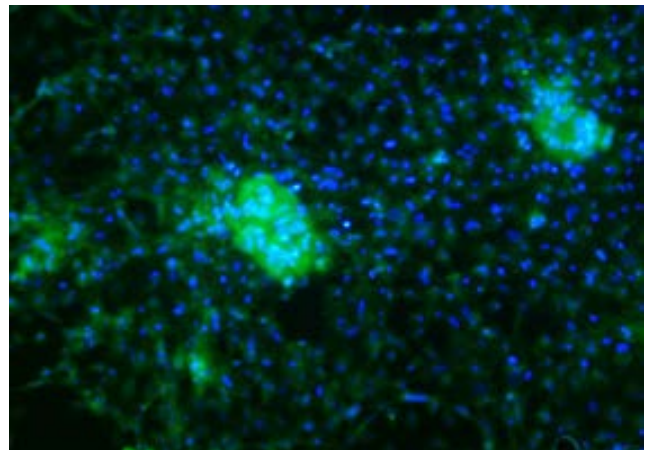


図3 スフェロイド細胞（緑：ネスチン）

4. 考察

毛包幹細胞は、立毛筋付着部のバルジ領域に存在することが知られており、これまでの研究によって、角化細胞のみならず、神経系や内胚葉系へ分化可能であることが報告されている（2）。本研究により、毛髪由来角化細胞中には、スフェロイド形成し神経系への分化能を持つ細胞の存在が明らかとなった。神経系以外の分化能の有無については今後の検討を要するが、毛髪由来培養角化細胞には、多分化能を有する組織幹細胞が生じている可能性は否定出来ない。スフェロイド形成させることにより多分化能を有する組織幹細胞を誘導することが可能となった場合は、必ずしも初期化を要さない

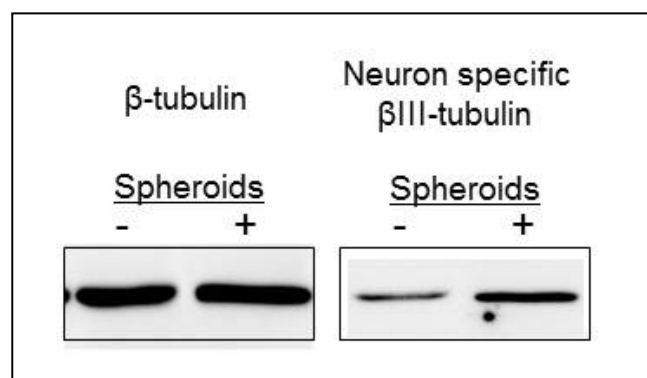


図4 神経マーカーの発現

ことも考えられる。従って、今後、さらに詳細に検討を行う予定である。また、1名のみの検討ではあるが、EB患者から抜毛した毛髪由来角化細胞の樹立は困難であった。その原因として、EB患者では、表皮～真皮間接合が脆弱となるように毛包上皮においても同様の機序が生じ、組織幹細胞が抜毛の過程で脱落してしまう可能性が考えられた。今後は、極少数の幹細胞でも培養可能なより高効率なプロトコル樹立が必要と思われる。

5. 参考文献

1. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells.
Aasen T, Izpisua Belmonte JC.
Nat Protoc. 2010 ;5:371-82.
2. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons.
Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 ;102:5530-4.