

表 1 当科における遺伝性表皮水疱症の 9 例

症例	初診時 年齢(歳)	性別	発症	経過	部位	粘膜病変	爪病変	診断 (病型*)
1	49	男	2歳	軽快	両手足	-	-	EBS(W-C?)
2	13	男	11歳	不変	両足	-	-	EBS(W-C?)
3	26	男	8歳	不変	四肢、顔	+	-	EBS(Köbner 型?)
4	26	男	4歳	増悪	両下肢	-	+	EBDD(前脛骨型)
5	16	男	1歳半	軽快	両下肢	-	+	EBDD(前脛骨型)
6	56	女	6歳	軽快	略全身	不明	+	EBD
7	1	女	3ヶ月	不変	四肢	-	+	EBDD(C-T?)
8	27	男	生直後	軽快	略全身	+	+	EBDD(C-T?)
9	26	男	出生時	増悪	略全身	+	+	EBDD(H-S)

※EBS：単純型表皮水疱症、EBDD：劣性栄養障害型表皮水疱症、EBD：栄養障害型表皮水疱症、EBDR：劣性栄養障害型表皮水疱症、W-C：Weber-Cockayne 型、C-T型：Cockayne-Touraine 型、H-S型：Halo peau-Siemens 型

### 3) 栄養障害型表皮水疱症本邦症例における DNA 診断のまとめ — 高頻度変異の種類とその地域性に関する考察 —

分担研究者：玉 井 克 人（弘前大学皮膚科）

共同研究者：間 山 真美子、橋 本 功（弘前大学皮膚科）

小 川 秀 興（順天堂大学皮膚科）

#### はじめに

栄養障害型表皮水疱症（Dystrophic epidermolysis bullosa、DEB）は、優性型（dominant DEB、DDEB）および劣性型（recessive DEB、RDEB）のいずれも VII 型コラーゲン遺伝子（COL7A1）の変異が原因である<sup>1)</sup>。われわれは、これまで本邦 DEB 症例における DNA 診断を通じて、多くの COL7A1 変異を同定してきた。本邦症例に同定された変異の中で、遺伝的に異なる背景を有する家系間で複数回同定された変異を高頻度変異と定義し、それぞれの変異の出現頻度と地域性について検討したので報告する。

#### 対象及び方法

〔対象〕 栄養障害型表皮水疱症の DNA 診断目的に依頼された本邦 DEB75 症例（DDEB24 例、RDEB51 例）。〔方法〕患者及びその両親より末梢血10mlを採取、これより常法<sup>2)</sup>に従って DNA を抽出し、800ml の TE 緩衝液（10mM Tris-Cl、pH8.0/1mM EDTA）に溶解。次にこの DNA 溶液 4ml を鋳型 DNA、COL7A1 の塩基配列を基に作成された 20bp のオリゴ DNA40pmol をプライマーとし、PCR を行った。68 種類のプライマーセットを用いて行った PCR により産生された 68 個の各々約 300bp からなる DNA 断片は、全体で COL7A1 の 118 個のすべてのエクソン及びその周囲のイントロンをカバーした。これらの PCR 産物を 95°C 10 分間インキュベートして一本鎖にした後、室温にて徐々にアニーリングさせ、さらに CSGE ゲル上で電気泳動（600V、16 時間）して変異を含む DNA 断片を検索した。検索した DNA 断片中の変異を DNA 塩基配列自動決定装置（ABI）を用いた塩基配列の決定により同定した。同定し得た COL7A1 変異中、異なる家系間に複数回同定された変異を高頻度変異と定義し、その出現頻度および出現地域を比較検討した。

#### 結 果

〔本邦 DEB における COL7A1 高頻度変異の同定〕 解析した 75 症例中に同定された高頻度変異は 10 変異で、頻度順に列挙すると、8 家系に同定されたのが 6573+1GtoC（エクソン 19）および E2857X（エクソン 116）、6 家系が 5818delC（エクソン 70）、3 家系が R 2063W（エクソン 74）、2 家系が Q1212X（エクソン 27）、G2028R（エクソン 73）、G2242E（エクソン 85）、G2392D（エクソン 94）、G2670S（エクソン 108）、G2716E（エクソン 110）であった。（図 1）。

〔高頻度変異の出現と地域性の検討〕 同定された高頻度変異と患者の在住地域との関係を検討した。2 家系に同定された 6 種の変異は、東北と九州に同定された G2242E を除き、いずれも同じ、あるいは近傍の地域に同定された。すなわち、Q1212X は北海道と東北に、G2392D は近畿と山陽に、G2670S は九州に、G2028R は中部に、G2716E は九州に同定された。3 家系で同定

された R2063W は東北の 1 家系と九州の 2 家系であった。6 家系で同定された 5818delC は東北、中部でそれぞれ 2 家系、関東、近畿で 1 家系であった。8 家系で同定された 2 つの変異のうち、6575+1GtoC は東北・関東に 2 家系、北海道、中部、近畿、四国に 1 家系ずつで、一方 E2857X は四国、近畿、東北にそれぞれ 2 家系ずつ、北海道と関東に 1 家系ずつであった (図 2)。

## 考 察

今回われわれは、本邦 DEB75 症例の解析を通じて同定された 10 種類の高頻度変異について、その出現頻度及び地域性について検討した。既に報告した<sup>3)</sup> 3 種の高頻度変異 5818delC、6573+1GtoC E2857X は、それぞれ 6 家系、8 家系、8 家系と、やはり高頻度に見出された。これら的高頻度変異はいずれも九州には同定されておらず、特に 5818delC および 6573+1GtoC は東北、関東、中部で多く検出された。近畿、九州地方からの解析依頼がそれぞれ 10 症例および 12 症例で、東北と関東のそれぞれ 12 症例および 16 症例と比較しても特に少なくないこと、これらの変異がいずれも本邦症例にのみ同定されていることを考えると、これら変異の最初の出現地域が中部・関東から北であった可能性が示唆される。G2242E を除くその他の変異も出現頻度が低いものは同じ地域に分布しており、創始者効果によることを示唆していると考えられる。G2242E が東北と九州に分布しており、この変異が同じ創始者由来か、あるいは hot spot であるかは今のところ不明である。この変異が優性痒疹型由来<sup>4)</sup> であり、この位置の変異が台湾の優性痒疹型症例にも同定されていることから、hot spot である可能性があり興味深い。また、各項頻度変異の出現頻度や地域分布の検討により、各変異の出現時期やその地域が推定できる可能性があり、遺伝子の進化を考える上でも貴重なデータであるため、今後も同様の検討を続けていく予定である。

## 参考文献

- 1) Fine JD, Bauer EA, Briggaman RA et al.: Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Am Acad Dermatol* 1991;24:119-135
- 2) Sambrook J, Fritsch, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 3) Katsuto Tamai, Takaya Murai, Makiko Mayama et al.: Recurrent COL7A1 Mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. *J Invest Dermatol* 1999, 112:991-993
- 4) 玉井 克人: Dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB) Pruriginosa における特異的 VII 型コラーゲン遺伝子変異の同定. 厚生省特定疾患、皮膚・結合組織疾患調査研究班稀少難治性皮膚疾患分科会 平成 9 年度研究報告 12-18 頁

## 本邦 DEB 症例における高頻度 COL7A1 変異

頻 度	エクソン	変 異	検出法
8	19	6573+1GtoC	MspI
8	116	E2857X	MaeI
6	70	5818delC	MspI
3	74	R2063W	Mismatch
2	27	Q1212X	XbaI
2	73	G2028R	StuI
2	85	G2242E	HinfI
2	94	G2392D	AvaI
2	108	G2670S	Cfr13I
2	110	G2716E	Mismatch

図1 本邦 DEB 症例に同定された高頻度の COL7A1 変異  
各変異の頻度、エクソン、変異の種類とともに、検出のための制限酵素名を記した。

## 高頻度変異と地域との関係

地域	総数	RDEB						DDEB			
		e27	e70	e74	e81	e94	e108	e116	e73	e85	e110
北海道	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
東北	12	1	2	1	2	0	0	2	0	1	0
関東	16	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0
中部	7	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0
近畿	10	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0
山陽	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
四国	7	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0
九州	12	0	0	2	0	0	2	0	0	1	2
海外	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	75	2	6	3	8	2	2	8	2	2	2

RDEB; e27:Q1212X, e70:5818delC, e74:R2063W, e81:6573+1GtoC, e94:G2392D, e108:G2670S, e116:E2857X,  
DDEB; e73:G2028R, e85:G2242E, e110:G2716E

図2 高頻度 COL7A1 変異と検出地域との関係  
検出頻度が少ないほど分布地域が狭い傾向を示した。

## 4) 栄養障害型表皮水疱症に対するトラネキサム酸による 治療効果の検討

分担研究者：玉 井 克 人（弘前大学皮膚科）  
共同研究者：橋 本 功（弘前大学皮膚科）  
小 川 秀 興（順天堂大学皮膚科）

### はじめに

栄養障害型表皮水疱症 dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) は、VII型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) の変異による係留線維の消失ないしは未発達が原因の遺伝性水疱性皮膚疾患である<sup>1)</sup>。症状の進行とともに手指の棍棒状癒着、食道狭窄、開口障害など、水疱治癒後の癒痕形成に伴う変化が本症の患者における QOL を著しく低下させる<sup>2)</sup>。また、一度癒痕形成された皮膚では表皮突起が消失し、表皮真皮の接着面積が著しく低下するため、軽度の外力により容易に水疱形成するようになる<sup>3)</sup>。しかしその一方で、栄養障害型表皮水疱症では水疱は基底膜直下の真皮側で生じるため、水疱形成直後は水疱蓋表皮細胞は変性していない。そのため、新鮮な水疱では水疱蓋が破れる前に内容液を十分に除去し、圧迫固定をすることにより、水疱蓋の再接着が可能がある。その際の接着は、組織内に生じるフィブリン網により形成されると考えられる。すなわち、フィブリン網の形成を促進、あるいは分解を抑制する事により、水疱蓋の真皮への再接着を誘導する事が可能と思われる。今回われわれは、重症型表皮水疱症症例に対し、フィブリン網を分解するプラスミン活性の抑制効果を有するトラネキサム酸を投与し、その効果を検討したので報告する。

### 対象及び治療方法

症例は20歳、男性。家族歴に特記すべきことなし。生下時より四肢、体幹に水疱、潰瘍、癒痕形成を繰り返し、手指は癒着して棍棒状変化を呈す。電顕的水疱形成部位は基底膜直下の真皮側で、係留線維は全く消失していたため、重症型 RDEB と診断。トラネキサム酸（トランサミン）を1日1500mg 投与（1回500mg、分3）。その治療効果は、難治性潰瘍部位における治療前と治療開始後4週間後の臨床症状を比較して判定した。

### 結 果

四肢関節部の難治性潰瘍において、トラネキサム酸投与4週間後に著名な潰瘍面積の縮小が観察された（図1）。また、水疱新生数の減少と皮膚の張りの増強を自覚するとの訴えがあった。

### 考 察

繰り返す癒痕治癒の結果、栄養障害型表皮水疱症患者の癒痕部では表皮突起が消失し、表皮・真皮間の接着面積が著しく減少する。そのため軽度の外力で容易に表皮・真皮間にずれが生じ、水疱が形成される。しかしこの際に表皮が完全に剥離していなければ、よく水疱内容液を除去し圧迫固定すると、数日以内に表皮・真皮間が再接着することをしばしば経験する。これは、組織液中のフィブリノーゲンからトロンビンによりフィブリンが生じ、さらに重合・架橋によりフィ

ブリン網が形成されて接着剤として機能するためと考えられる(図2)。このフィブリン網をより強固にして表皮・真皮の接着を促進するには、フィブリンの供給促進と分解抑制の2つの方法が考えられる。今回われわれは、劣性栄養障害型表皮水疱症の重症例に対し、フィブリンを分解する蛋白分解酵素であるプラスミンの阻害剤、トラネキサム酸を経口投与し、治癒促進と水疱新生数の減少を観察した。トラネキサム酸はプラスミノゲンアクチベーターとプラスミンの両者の作用を阻害し、キニンなどの炎症性ペプチド産生を抑制して抗炎症作用を発揮するため、皮膚科領域でも古くから抗炎症剤として湿疹・皮膚炎の治療に用いられてきた。しかし、水疱形成後のフィブリン網形成損しによる水疱蓋・水疱底の再接着を目的としてトラネキサム酸が利用されたという報告は無い。これは、殆どの水疱性疾患では水疱蓋は変形・壊死して脱落してしまうため、再接着が期待できないからと思われる。しかし栄養障害型表皮水疱症では水疱形成直後は炎症症状はほとんどなく、基底膜下の真皮側での水疱形成であるから表皮の変性もない。そのため、トラネキサム酸によりフィブリン網形成を促進した結果、自験例における水疱治癒の促進、水疱新生抑制が得られたものと考えられる(図2)。現在、他の複数の栄養障害型表皮水疱症症例に対して同様の治療を行っている。まだそれらの症例の多くは効果を判定する段階では無いが、その殆どの症例で治癒促進効果の自覚が得られている。今後、より多くの症例における治療効果の検討が必要で、できれば二重盲検による効果判定が望ましい。しかし有効な治療法のない本症に対し、治療に苦慮した際には試みるべき治療法の1つと思われる。

#### 参考文献

- 1) Christiano AM, Uitto J: Molecular diagnosis of inherited skin diseases: the paradigm of dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* 1996;5:1-11
- 2) Fine JD et al.: Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Am Acad Dermatol* 1991;24:119-135
- 3) 玉井克人他: 重症型 recessive dystrophic epiderimolysis bullosaの病態に関する考察、厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班 稀少難治性皮膚疾患分科会、平成10年度研究報告書 26-29頁

## 治療前

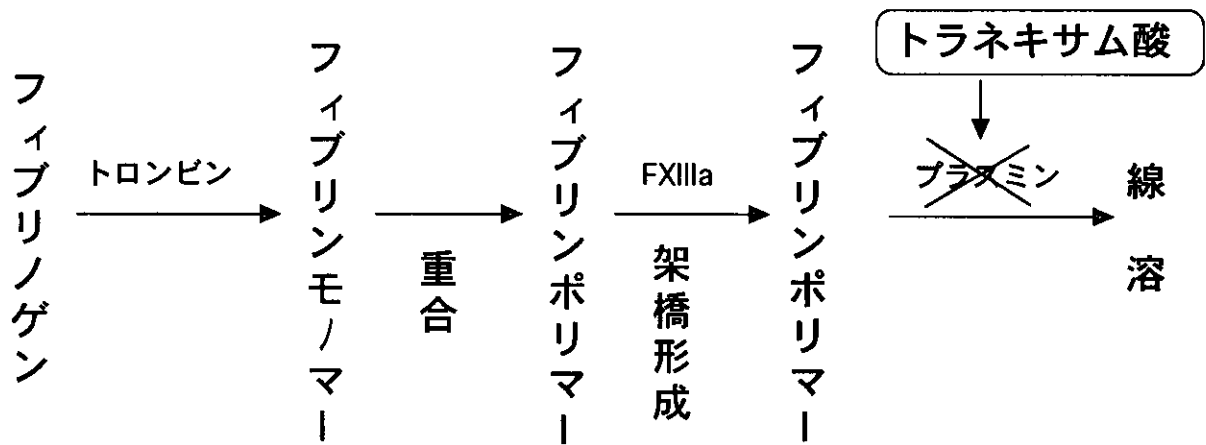


## 治療 4 週後



図1 治療前後の臨床像。左は治療前、右は治療4週間後の左肩甲部。

# 基 底 膜



# 真 皮

図2 フィブリン網形成過程とトラネキサム酸の作用点。プラスミン阻害によりフィブリン分解が抑制される。



## 5) VII型コラーゲタンパク質 (COL7A1) の機能解析と遺伝子発現

分担研究者：吉 伸 由 之 (東京医科歯科大学疾患遺伝子実験センター)

### はじめに

劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB)) は上皮間葉の基底膜 (basement membranes) のアンカリングフィブリルに存在するVII型コラーゲンの機能欠損によることが明らかとされている<sup>1)</sup>。VII型コラーゲン遺伝子の変異は多様で、変異の特徴と病型の分類が広く進められており、診断と予後の治療に役立てられつつある<sup>2)</sup>。本疾患は、遺伝子の変異が原因であるので、根本的な治療法としては遺伝子治療、または遺伝子産物 (VII型コラーゲン) の適切な投与が可能性として考えられる。本研究の目的は根本的な治療をめざし、遺伝子治療を含む新しい治療法の開発の基盤となる情報、手法を得ることにある。そのような方向性に基ずき、一昨年来 RDEB 患者皮膚組織由来繊維芽細胞 (fibroblasts) の試験管内における増殖性、伸展性が正常細胞と比べ悪いこと、ファイブロネクチンなどの幾つかの細胞外基質タンパク質 (Exstra Cellular Matrix protein, ECM protein) の発現が亢進していることなどを観察した。昨年度、ヒト胎盤より調整したプロコラーゲンVII/コラーゲンVII画分を添加した培地による細胞培養を行いVII型コラーゲンの RDEB 患者由来培養細胞における機能について検討し、増殖性、伸展性の改善を認めた。これらの結果より、VIIコラーゲタンパク質は単に構造タンパク質として存在する以上に、機能タンパク質として存在する可能性が考えられた。今回、正常培養細胞のVII型コラーゲン由来皮繊維芽細胞における TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  で活性化されると言う報告<sup>3, 4, 5)</sup>に基ずき、RDEB 由来皮繊維芽細胞における TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  の培養性状に及ぼす効果について検討した。同時に、より精製度の高いVII型コラーゲタンパク質の入手法の可能性について検討した。

### 方 法

RDEB の皮膚組織は順天堂大学・医学部・皮膚科より分与を受けた。この RDEB はVII型コラーゲン遺伝子のエクソン70 とエクソン81 の変異がそれぞれ 5818delC/8569G to T (E2857X) と決定されている (弘前大・皮膚科)。細胞 (fibroblasts) の培養は常法によりプラスチックディッシュまたはカバーガラス上で10%、FBS (fetal bovine serum) 添加 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて行い、継代数4-6のものを使用した。

KB (oral epidermoid carcinoma)、FL (FL aminion) 細胞の培養上清は10% FBS (fetal bovine serum) 添加 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) で培養、単相培養が形成された後、血清を含まない DMEM (100ng/ml ascorbic acidを含む) で2日間培養したものをを用いた。

培養上清よりVII型コラーゲンの調製は Lunstrum 等<sup>6)</sup>、Burgeson 等<sup>7)</sup> の方法により、硫酸 (300mg/ml) による塩析、NaCl による塩析を用い行った。各画分のタンパク質組成は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 法、タンパク質の検出はイミュノブロット法により行った。

TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ を用いた実験は必要量を培地に添加し培養後、SDS-PAGEによる分析、イミューブロット法によるタンパク質の同定を行った。培養細胞の形態学的観察は通常の光学顕微鏡により、細胞骨格成分やECMタンパク質の発現状態はファロイジン（アクチンストレスファイバーの検出）染色、およびI、III、IV、V、VII型コラーゲン、ビトロネクチン、ファイブネクチン、ラミニン抗体を用いた間接法により共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した<sup>8,9</sup>。

## 結 果

昨年までの結果でRDEB患者由来繊維芽細胞（RDEB細胞）は単層形成時における細胞密度が健康人包皮由来の繊維芽細胞（FS細胞）と比べ圧倒的に低いことを示した（図1、上段）。その原因が完全長のVII型コラーゲンの欠損である可能性を調べるために、RDEB細胞をKB細胞の培養上清より部分精製したVII型コラーゲン画分で前処理した（VII型コラーゲン画分-10 $\mu$ g VII型コラーゲンを含む）で24時間静置した後、培地で洗浄したもの）ディッシュ上で培養したところ、細胞増殖が未添加のものとは比べ、3-5倍促進された（図1、下段）。FS細胞では細胞増殖に影響は見られなかった。この結果におけるVII型コラーゲンの作用を詳細に調べるため、VII型コラーゲン精製に好都合な材料について検索した。

胎盤羊膜よりVII型コラーゲン画分の部分精製について昨年度検討したが、材料のペプシン処理による低分子化、夾雑物が多いことなどの問題点があった。更にKB細胞培養上清より精製を試みたが、得られたVII型コラーゲンの収量は $3 \times 10^8$ 細胞当たり1 $\mu$ gと低かった（図2、左）。純度の高い画分を得るために、より多量のVII型コラーゲンを産生する培養細胞が必要とされた。FS細胞にTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ を添加することによりVII型コラーゲン遺伝子の転写が増強されるとの報告に基づき、収量を上げる目的でKB、FL、FS細胞、RDEB細胞の培養に対するこれらの因子の影響を検討した。KB、FL細胞はTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ （3-50ng/ml）の存在下で細胞増殖の阻害が見られ、VII型コラーゲンの発現増強は見られなかった。FS細胞、RDEB細胞をTNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ （3-50ng/ml）の存在下で培養すると、細胞接着の増強と共にファイブネクチンの合成が3-5倍増強された（図2、右）。TNF- $\alpha$ （50ng/ml）、TGF- $\beta$ （10ng/ml）存在下でFS細胞、RDEB細胞の細胞形態が扁平となり、見かけ上接着性が増加することと関連すると思われる（図3）。TGF- $\alpha$ （10ng/ml）の存在下で得た培養上清より部分精製したVII型コラーゲン含量はFS細胞では低く、殆ど検出限界以下であった（図2、右）。しかしながら、RDEB細胞では低分子VII型コラーゲン（約230kDa）の発現が増強されていた（図2、右）。同様の結果は、VII型コラーゲンのC末端アミノ酸配列を認識する抗体による蛍光抗体法によっても確認され、FS細胞とRDEB細胞でVII型コラーゲンの発現に相違が見られた（図4）。FS細胞でVII型コラーゲンが検出できない理由として、代謝回転が早い、複合体形成により精製過程で失われることなどが考えられ、検討を要する。

以上の結果より、現時点ではVII型コラーゲンの入手材料として、収量は低いがKB細胞のみが使用可能である。VII型コラーゲンの細胞増殖、細胞接着に対する直接的、間接的な作用を調べるためにVII型コラーゲンの入手法を更に検討する必要がある。

## 考 察

VII型コラーゲンが含まれているKB細胞の培養上清および羊膜より調製した4.0 MNaCl画分を添加することによりRDEB細胞の増殖性、接着性、伸展性の促進とECM系タンパク質の発

現に変化が見られた。このことはⅦ型コラーゲタンパク質が細胞増殖の制御に直接的、間接的に関与していることを示している。Ⅶ型コラーゲンを培地中に増加させる方法として、外部より添加すること、細胞に遺伝子導入を行い発現させることが考えられる。完全な機能を持つⅦ型コラーゲン遺伝子は現時点で利用出来ないので、外部より添加する方法について検討した。純度の高いⅦ型コラーゲタンパク質の入手について、精製に用いる材料、精製法の再検討やスケールアップした方法で行う必要がある。

更に、Ⅶ型コラーゲンの RDEB 患者由来の上皮細胞の培養、培養細胞に及ぼす影響に興味を持たれる。

## 謝 辞

本研究は皮膚・結合組織疾患調査研究班、稀少難治皮膚疾患分科会の分担として進められており、材料や資料・情報を提供して頂きました池田志孝、小川秀興（順天堂）、玉井克人、橋本功（弘前大）の諸先生に深くお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Uitto J and Christiano AM: Molecular genetics of the cutaneous basement membrane zone. Perspectives on epidermolysis bullosa. *J. Clin. Invest.* 90: 687-692, 1992.
- 2) Tamai K, Ishida-Yamamoto A, Matsuo S et al.: Compound heterozygosity for a nonsense mutation and a splice site mutation in the type VII collagen gene (COL7A1) in recessive epidermolysis bullosa. *Lab. Invest.* 76: 209-217, 1997.
- 3) Vindevoghel L, Kon A, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, and Mauviel A.: Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 273: 13053-13057, 1998.
- 4) Vindevoghel L, Lechleider RJ, Kon, A, de Caestecker MP, Uitto J, Roberts AB and Mauviel A: SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor  $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14769-14774, 1998.
- 5) Kon A, Vindevoghel L, Kouba D, Fujimura Y, Uitto J, and Mauviel A : Cooperation between SMAD and NF- $\kappa$ B in growth factor regulated type VII collagen gene expression. *Oncogene* 18: 1837-1844, 1999.
- 6) Lunstrum GP, Sakai LY, Keene DR, Morris NP and Burgeson RE : Large complex globular domains of type VII procollagen contribute to the structure of anchoring fibrils. *J. Biol. Chem.* 261: 9042-9048, 1996.
- 7) Bentz H, Morris NP, Murray LW, Sakai LY, Hollister DW and Burgeson R : Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3168-3172, 1983.
- 8) Yoshinaka Y, Katoh I et al. : Alterations of the cytoskeletal organization in tumor cell lines by a cardiotonic drug, vesnarian, through protein tyrosine phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 219: 21-28, 1995.
- 9) Haralson MA and Hassell JR eds. : *Extracellular matrix* (IRL Press), 1995.

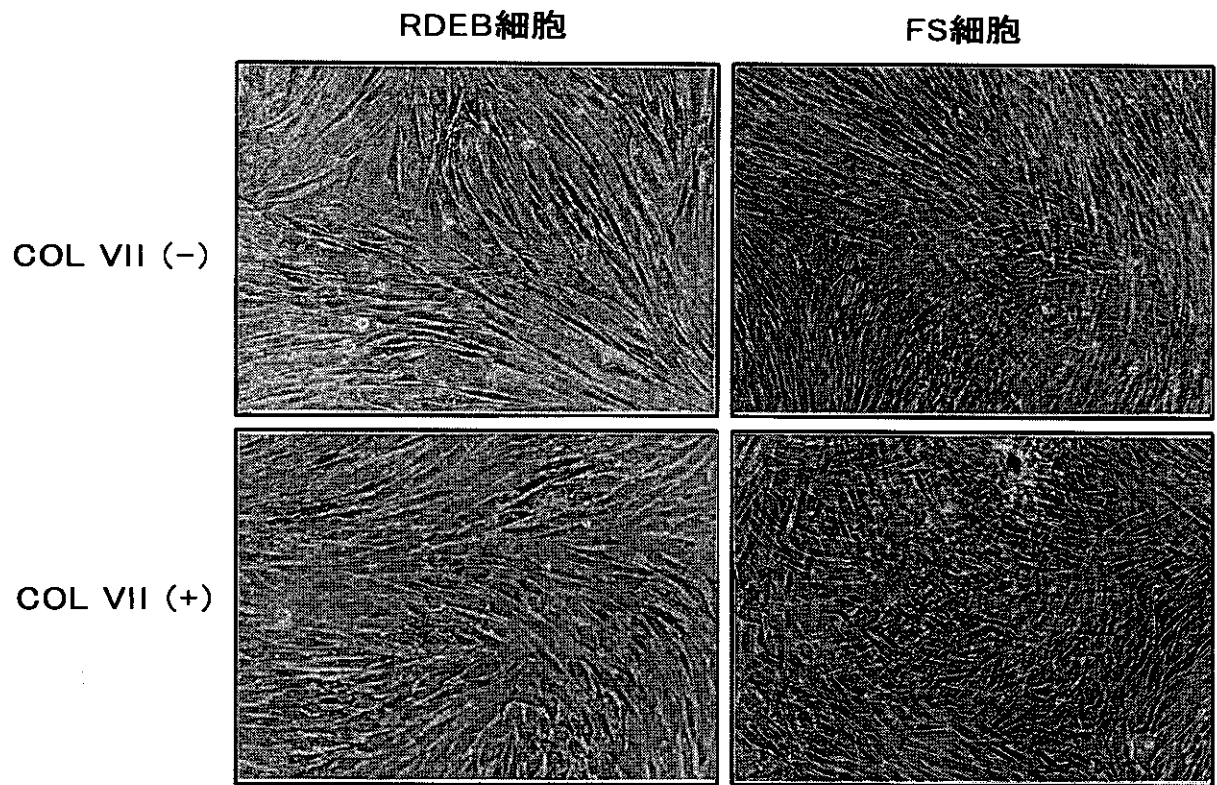


図1 RDEB 患者由来繊維芽細胞（RDEB 細胞）と健常人包皮由来の繊維芽細胞（FS 細胞）の培養。（上段）、培養後2週目の増殖状態。（下段）、KB 細胞から得たVII型コラーゲン添加後2週目の増殖状態。撮影倍率×100。

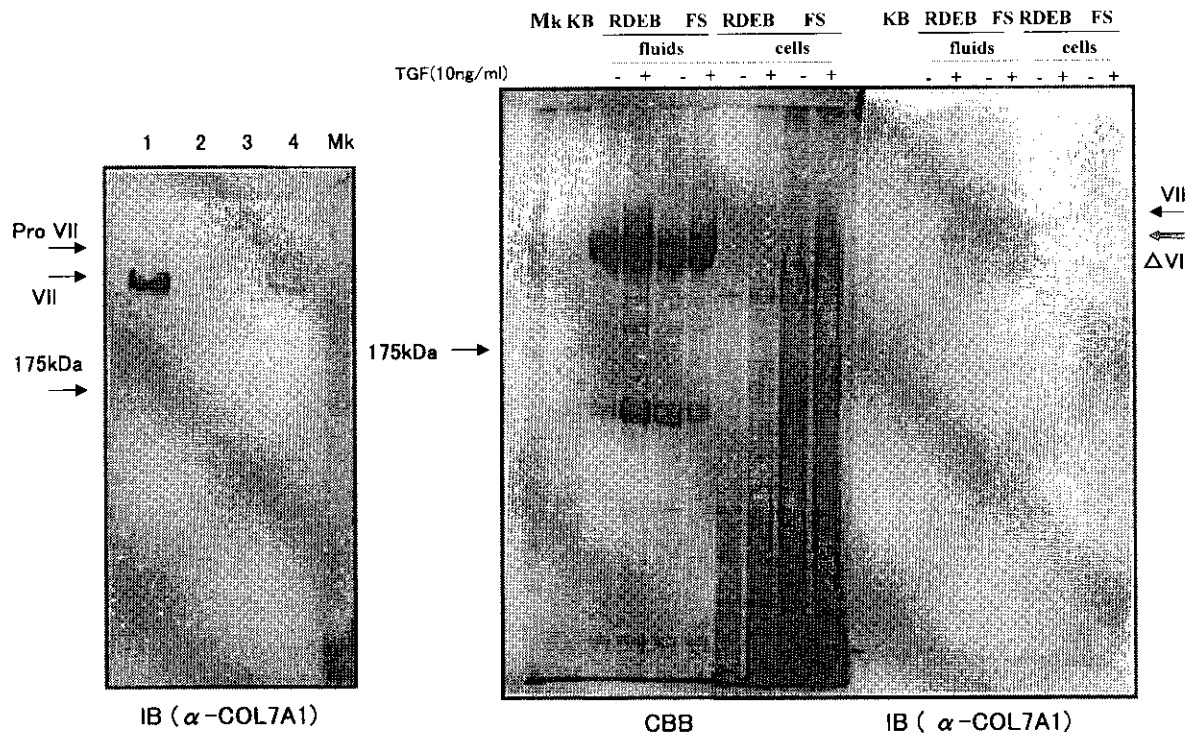


図2 KB細胞、RDEB細胞およびFS培養上清より得たVII型コラーゲン画分。

(左図)：KB細胞培養上清より得たVII型コラーゲン画分の抗VII型コラーゲン抗体による同定。2-4は精製中間分画を示す。

(右図)：TGF-β存在下におけるRDEB細胞およびFS細胞のVII型コラーゲンの産生。fluids：培養上清より得たVII型コラーゲン画分、cells：全細胞成分、KB：KB細胞培養上清より得たVII型コラーゲン画分。

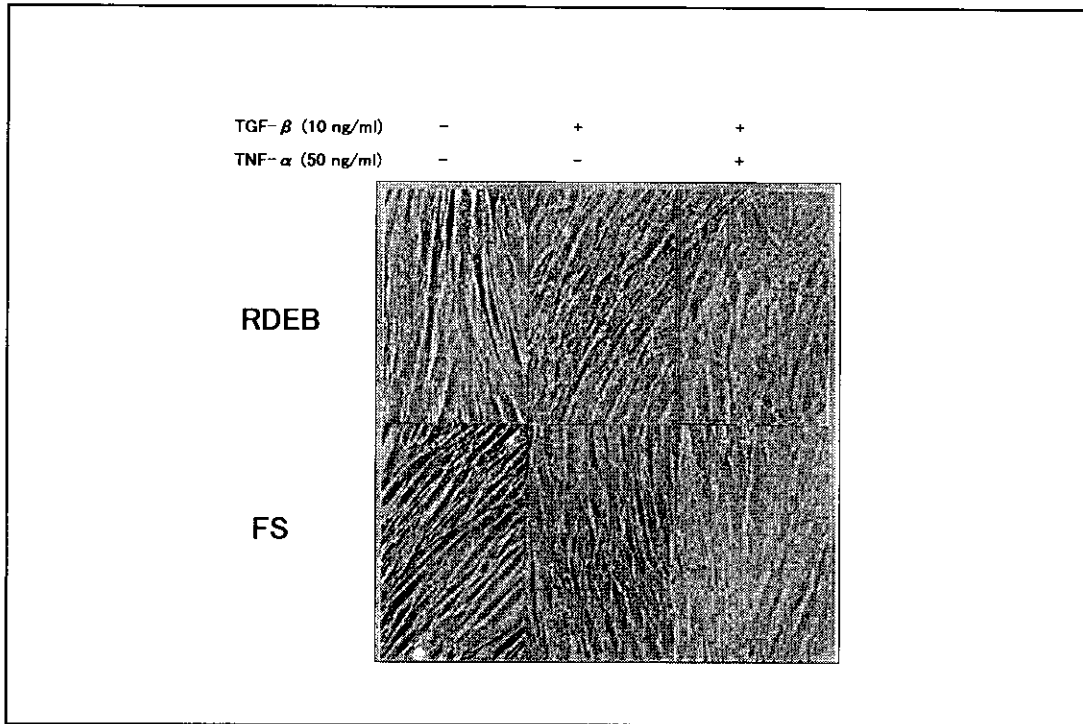


図3 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ のRDEB細胞およびFS細胞の培養性状に対する影響。

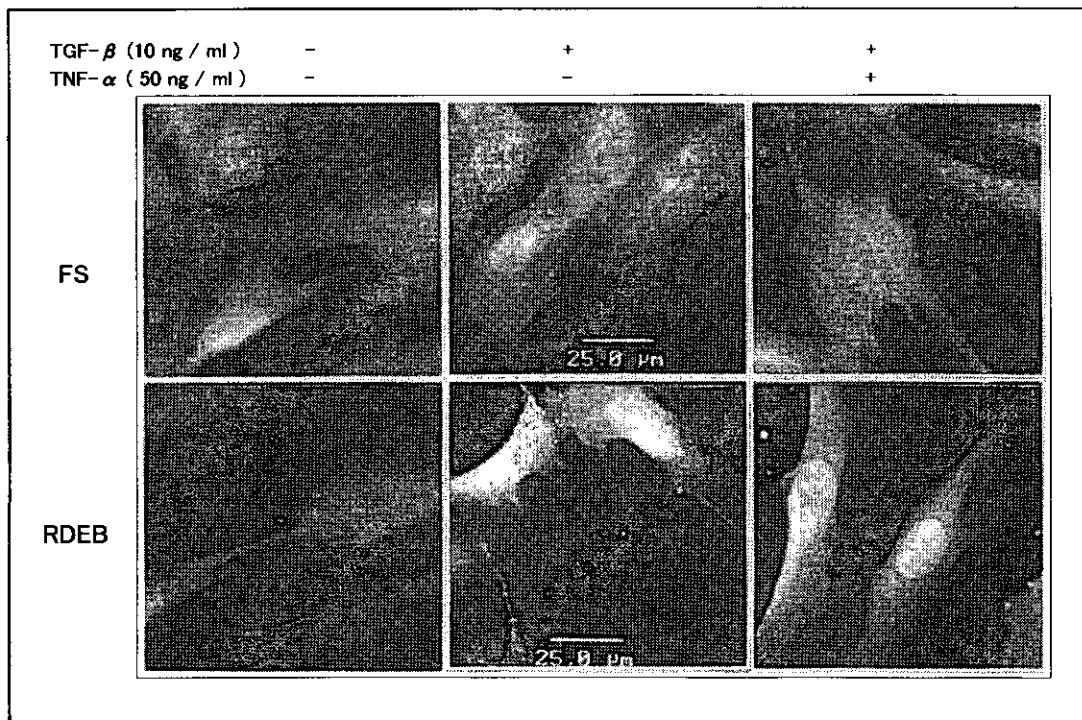


図4 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ によるRDEB細胞およびFS細胞におけるVII型コラーゲンの発現誘導。

## 6) 遺伝子治療のための導入遺伝子発現増強技術の開発

分担研究者：金 田 安 史（大阪大学大学院医学研究科遺伝子治療学）

### 研 究 目 的

難治性疾患の遺伝子治療のためには導入遺伝子発現を治療に十分なレベルで維持する必要がある。我々はすでに妊娠ラットの羊水中に HVJ-liposome を注入することにより主として皮膚での遺伝子発現がラット新生仔におこるが、遺伝子発現が徐々に低下し、生後1週間以内で消失することを報告している。また培養ヒトケラチノサイトにおいても1-3週間で導入遺伝子発現が消失することを観察している。その解決のために前年度は導入遺伝子の長期維持について報告したが今年度は導入遺伝子の発現増強技術の開発を行った。

### 研 究 方 法

2つのアプローチを行った。1つは長期遺伝子発現を可能にした Epstein-Barr virus (EBV) のコンポーネントである EBNA-1 と oriP を用いる方法である。すなわち EBNA-1 の強発現ベクター pCMV-EBNA-1 と oriP を付加したルシフェラーゼ発現ベクター poriP-CMV-Luci を HVJ-liposome で共導入した。もう1つは遺伝子の転写を制御するヒストン脱アセチル化阻害剤 FR901228 (藤澤製薬) をルシフェラーゼ遺伝子 (pCMV-Luci) とともに細胞内に導入する方法である。どちらの方法においても培養細胞と生体組織においてその効果を検証した。

### 結 果 と 考 察

(1) pCMV-EBNA-1、poriP-CMV-Luci 共導入系：pCMV-EBNA-1 の導入量に依存してルシフェラーゼ遺伝子発現がマウス、ヒト線維芽細胞 (L929, FS3)、癌細胞 (B16-F1, Hela-S3) で最大30倍まで増強された。1週間以上の遺伝子発現の増強が確認でき、これは転写レベルでおこっていることをノーザンブロットで解説した。またこの増強は oriP 依存性で、oriP をもたない遺伝子ではおこらなかった。この共導入系による同様の遺伝子発現増強はマウス骨格筋へのヒトインスリン遺伝子 (poriP-CMV-HIN) 発現やマウス肝臓でのルシフェラーゼ遺伝子発現でもおこった。特に肝臓においては遺伝子発現が検出されなくなった導入15日目に pCMV-EBNA-1 のみの導入によってもルシフェラーゼ遺伝子発現の再活性化がみられた。このことから導入遺伝子の核内維持のためには oriP の付加のみで十分であり、その転写活性化のために EBNA-1 が必要と考えられた。(2) FR901228 100nM を pCMV-Luci とともに培養細胞 (HEK293, FS3, B16-F1, NIH3T3) に導入するとルシフェラーゼ遺伝子発現を 10-5000 倍増強する事に成功した。増強は FR901228 の濃度、処理時間に依存しており、効果は 1-3 日の持続であった。ルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現する B16-F1 の形質転換株においても FR901228 の処理で発現増強がおこった。FR901228 によるヒストンのアセチル化の促進も確認した。発現の増強は転写レベルでおこり、その効果は導入後 3 時間で確認できた。そこでマウス肝臓や B16-F1 の腫瘍塊にルシフェラーゼ遺伝子と FR901228 を導入することによりルシフェラーゼ遺伝子発現を 5-10 倍増強できた。

## 結 論

EBNA-1、oriP プラスミドの共導入による増強系、ヒストンアセチル化阻害剤 FR901228 の共導入系による増強系ともに培養細胞、生体組織において効果を発揮した。これらを併用することにより必要なときに治療に有効なレベルまで遺伝子発現を高めることができると期待される。

## 研 究 発 表

### 1. 論文発表

Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R.: Gene therapy using HVL-liposomes; the best of both worlds? *Molecular Medicine Today* 5, 298-303, 1999.

Kaneda, Y., Saeki, Y., Nakabayashi, M., Zhou, W-Z., Wataya-Kaneda, M., and Morishita, R.: Enhancement of transgene expression by cotransfection of oriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Hum. Gene Ther.* 11, 471-479, 2000.

Yamano, T., Ura, K., Morishita, R., Nakajima, H., Monden, M., and Kaneda, Y.: Amplification of transgene expression in vitro and in vivo using a novel inhibitor of histone deacetylase. *Molecular Therapy* 6, 425-431, 2000

### 2. 学会発表

Yasufumi Kaneda “Development of virosomes for gene therapy” 第2回アメリカ遺伝子治療学会

1999年6月11日 Washington D.C. (USA)

山野智基、中島秀典、森下竜一、富田尚裕、門田守人、金田安史 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた癌遺伝子治療に対する基礎的検討” 日本癌学会総会 平成11年10月1日 広島知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

取得済特許

Kaneda, Y. Dzau, V.J. : “Method for in vivo delivery of therapeutic agents via liposomes” (U. S. Patent No.08/241, 372, European Patent 95917788. 2-2110)

出願中特許

金田安史：不活化 HVJ による長期保存型遺伝子導入ベクターの開発 (科学技術振興事業団)

金田安史ら：HDAC 阻害剤による遺伝子治療増強法の開発 (藤澤製薬)

### 参考文献

1. Nakamura, N., Timmermann, S. A., Hart, D., Kaneda, Y., Shrive, N. G., Ochi, T., and Frank, C. B. : A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing. *Gene Therapy* in press.
2. Mason, C. A. E., Brgras, J-L., OBrien, S. B., Zhou, B., McIntyre, B, Nakamura, N., Kaneda, Y., and Rabinovitch, M. : Gene transfer in utero biologically engineers a patent ductus arteriosus in lambs by arresting fibronction-dependent neointimal formation. *Nature Medicine* 5, 176-182, 1999.
3. Sato, M., Saeki, Y., Tanaka, K., and Kaneda, Y. : Ribosome associated protein LBP/p40 binds to S21



- protein of 40S ribosome, analysis using a yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256, 385-390, 1999.
4. Kawashita, Y., Otsuru, A., **Kaneda, Y.**, Kawazoe, Y., Eguti, S., Kuroda, H., Nagayama, Y., Fujioka, H., Yamashita, S., and Kanematsu, T: Regression of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Hum. Gene Ther.* 10, 1509-1519, 1999.
  5. Uehara, T., Honda, K., Hatano, E., Terao, R., Iimuro, Y., Yamamoto, N., Yamamoto, M., **Kaneda, Y.** and Yamaoka, Y. : Gene transfer to rat biliary tract with the HVJ-cationic liposome method. *J. Hepatology* 30, 836-842, 1999.
  6. Zhou, W-Z, **Kaneda, Y.** , Huang, S. K. S., Morishita, R., and Hoon, D. S. B. : Protective immunization against melanoma by gp 200 DNA HVJ-liposome vaccine. *Gene Therapy* in press.
  7. Ueda, H., Sawa, Y., Matsumoto, K., Kitagawa-Sakakida, S., Kawashira, Y., Nakamura, T., **Kaneda, Y.**, & Matsuda, H.: Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *A. Thorac. Surg.* 67, 1726-1731, 1999.
  8. Zhou, W-Z., Hoon, D. S. B., Huang, S. K. S., Fujii, S., Hashimoto, K., Morishita, R. and **Kaneda, Y.** : RNA melanoma vaccine, induction of anti-tumor immunity by human gp100 mRNA immunization. *Human Gene Therapy* 10, 2719-2724, 1999.
  9. Nishii, T., Moriguchi, A., Morishita, R., Yamada, K., Nakamura, S., Tomita, N., **Kaneda, Y.**, Fukamizu, A., Mikami, H., Higaki, J., and Ogihara, T. : Angiotensinogen gene-activating elements regulate blood pressure in the brain. *Circulation Res.* 85, 257-263, 1999.
  10. Aoki, M., Morishita, R., Matsushita, H., Hayashi, S., Nakagami, H., Yamamoto, K., Moriguchi, A., **Kaneda, Y.** , Higaki, J., and Ogihara, T. : Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells; Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 34, 192-200, 1999.
  11. Yoshizumi, T., Yonemitsu Y., Yanaga, K., **Kaneda, Y.**, Sugimachi, K., and Sueishi, K. : A novel and highly efficient delivery system for oligo-deoxynucleotides transfer to the Kupffer cells in the hepatic graft. *Transplantation* in press.
  12. Nakamura, S., Moriguchi, A., Morishita, R., Yamada, K., Nishii, T., Tomita, N., Ohishi, M., **Kaneda, Y.** , Higaki, J., and Ogihara, T. : Activation of the brain angiotensin system by *in vivo* human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats. *Hypertension* 34, 302-308, 1999.
  13. Isaka, Y., Akagi, Y., Ando, Y., Tsujie, M., Sudo, T., Ohno, N., Border, W. A., Noble, N. A., **Kaneda, Y.**, Hori, M., and Imai, E.: Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55, 465-475, 1999.
  14. Suzuki, K., Sawa, Y., Ichikawa, H., **Kaneda, Y.** , and Matsuda, H. : Myocardial protection with endogenous overexpression of manganese superoxide dismutase. *Ann. Thoracic Surgery* 68, 1266-1271, 1999.
  15. **Kaneda, Y.**, Saeki, Y., Nakabayashi, M., Zhou, W-Z., Wataya-Kaneda, M., and Morishita, R. : Enhancement of transgene expression by cotransfection of oriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Hum. Gene Ther.* 11, 471-479, 2000.
  16. Nakamura, N., Boorman, R., Marchuk, L., Barclay, L., Sutherland, C., Hart, D. A. A., Shrive, N. B., **Kaneda, Y.** , and Frank, C. B. : Decorin Antisense Gene Therapy Improves Early Ligament Healing, A Morphological and High Load Mechanical Assessment. *Journal of Orthopaedic Research* in press.
  17. Suzuki, K., Nakashima, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsuda, H., and **Kaneda, Y.** : Reconstituted

- fusion liposomes for gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther. Regulat.* 1, 1-13, 2000.
18. Matsumoto, T., Komori, K., Yonemitsu, Y., Morishita, R., Sueishi, K., Kaneda, Y., and Sugimachi, K. : Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J. Vasc. Surgery* in press.
  19. Hagihara, Y., Saito, Y., Kaneda, Y., and Yoshimine, T. : Widespread gene transfection into the central nervous system of primates. *Gene Therapy* in press.
  20. Yamano, T., Ura, K., Morishita, R., Nakajima, H., Monden, M., and Kaneda, Y. : Amplification of transgene expression in vitro and in vivo using a novel inhibitor of histone deacetylase. *Molecular Therapy* 6, 425-431, 2000.
  21. Fujimoto, J., and Kaneda, Y. : (Editorial) Reversing liver cirrhosis, Impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Therapy* 6, 305-306, 1999.
  22. Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R. : Gene therapy using HVJ-liposomes; the best of both worlds? *Molecular Medicine Today* 5, 298-303, 1999.
  23. Isobe, M., Suzuki, J., Morishita, R., Kaneda, Y., and Amano, J. : Gene therapy for heart transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Annals of New York Academy of Science* 902, 77-83, 2000.
  24. Kaneda, Y. : Development of a novel fusogenic viral liposome system (HVJ-liposomes) and its applications to the treatment of acquired diseases. *Molecular Membrane Biology* 16, 119-122, 1999.

## 7) 表皮水疱症治療のための代替表皮作製の試み：臍帯上皮における各種分化マーカーの発現及び上皮細胞の分離培養について

協力研究者：池田 志 孝（順天堂大学皮膚科）

共同研究者：溝口 将 之、須賀 康、小川 秀 興（順天堂大学皮膚科）

### はじめに

培養表皮細胞の臨床応用は、細胞工学の発展に伴い様々な試みがなされており、皮膚科領域においては、広範囲熱傷や難治性潰瘍に対して良好な成績が得られている<sup>1)~3)</sup>。培養表皮移植は、自家移植と他家（同種）移植に分類される。他家移植は、拒絶反応により永久生着はしないと考えられているが、一般の被覆材に比べ一段と優れた創傷治癒ならびに被覆効果を有しており、今後、他家移植の需要は爆発的に増加すると考えられる。しかしながら、本邦においては他家移植のシステム化には倫理面、安全性の点で社会的認知を受ける必要があり、自家移植がもっぱら推進されているのが現状である。一方、眼科領域においては、瘢痕性角結膜症に対する外科的アプローチとして、羊膜移植がその応用範囲を広げてきている。羊膜移植は、生体の各組織の中で最も拒絶反応の顕著に認められる皮膚においては、最終的には拒絶されるものの、Biological dressing としては同種皮膚移植と比べ格段優れた臨床効果が報告されている<sup>4)5)</sup>。臍帯や胎盤組織はドナーにとって不要なものであり、法律上も排泄物と考えられ、妊婦が不利益を被ることはなく、倫理的にも問題はない。臍帯や羊膜上皮細胞が皮膚への分化能を持ち、幹細胞のみを選択的に分離培養し移植することができれば、先天性表皮水疱症治療のための代替表皮として飛躍的な臨床効果が期待できよう。そこで今回、臍帯上皮における各種分化マーカーの発現について検討し、また、臍帯から上皮成分の分離培養を行ったので報告する。

Expression of epidermal differentiation markers in umbilical cord epithelium

Shigaku Ikeda, Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga, and Hideoki Ogawa

Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine

The umbilical cord (UC) epithelium is composed of a single epithelial layer covering mucous connective tissue derived from the amniotic epithelium. However, stratification of more than five cell layers and zones of cornification on the epithelial surface were occasionally observable in UC epithelium. In this study, we examined the expression of cytokeratins (CKs) and cornified cell envelope (CCE)-associated proteins in the UC, amniotic epithelium and the fetal shin using immunostaining. The simple epithelial CK 8 and 18 were homogeneously positive both in the UC and amniotic epithelium. Mucous epithelial CK 4, 13 were also homogeneously positive in UC epithelium, while only CK 13 was positive in amniotic epithelium. On the other hand, the stratified epithelial CK 1, 10 and 14 were found in UC epithelium, but only CK 14 was detected in the amniotic epithelium. The distribution of loricrin was noted only in the superficial zone of UC epithelium. Immunoreactivities of involucrin and TGaseI were seen both in the cytoplasm

and the superficial zone of cornification in UC epithelium, but only TGaseI was weakly positive in amniotic epithelium. These findings indicate that epidermal cytokeratins and CCE-associated proteins are expressed in UC epithelium and suggest that the UC epithelium shares features with both the amniotic epithelium and the epidermis.

## 方 法

### 1) 免疫組織学的検索

満期正常分娩時に得られた臍帯、羊膜からパラフィン切片および凍結切片を作製し、各種ケラチン特異的抗体、各種角化関連蛋白に対する特異的抗体を用いて、蛍光抗体間接法及びABC法により比較検討した。用いた抗体は以下の通りである。CK1 (34βB4、ENZO)、CK2e (Ks2.342.7.1、PROGEN)、CK4 (6B10、Sigma)、CK6 (Ks6.KA12、PROGEN)、CK8 (4.1.18、Boehringer)、CK10 (DE-K10、DAKO、Japan) CK13 (KS-1A3、Sigma)、CK14 (RCK107、PROGEN)、CK18 (CK2、Boehringer)、TGaseI (B. Cl、HARBOR BIO-PRODUCTS)、involucrin (SY5、NeoMarkers)、rabbit polyclonal antibody to loricrin。

### 2) 臍帯および羊膜上皮細胞の培養

出産後に得た臍帯を約3cmずつに切断し、PBSで洗浄し血液成分を除去した後、0.25%トリプシン溶液中で4℃、60分処理。続いて37℃、60分処理後、10%FCS/DMEM中でトリプシンを不活化させた後、同溶液中でタッピングにより上皮細胞を分離し、遠心後に得た細胞をKeratinocyte growth medium (KGM)で懸濁し、100dishに播種。1dish当たり約9cm文の臍帯を用いた。細胞密度が70~80%に達したところで継代した。

## 結 果

羊膜、臍帯上皮のHE染色を図1に示す。羊膜は単層の立方上皮から成り、一方、臍帯上皮では羊膜同様の単層領域と重層化した領域が認められ、重層化領域の上層部では角層様の構造を形成していた。羊膜、臍帯、妊娠16週の胎児表皮及び成人表皮における各種分化マーカーの発現を表1に示す。羊膜、臍帯上皮いずれにおいても全層に単純上皮型ケラチンK8/18、扁平上皮型ケラチンK14発現を認めた。粘膜型ケラチンK4は臍帯上皮のみに陽性であり、同じ粘膜型ケラチンであるK13は、羊膜、臍帯上皮いずれにも陽性であった。皮膚型ケラチンK1は、臍帯上皮の重層化領域の一部、最上層部のみに陽性所見を認めたが、皮膚型ケラチンK10は臍帯上皮の全周性に全層に陽性であった。また、表皮では有棘層の上層に発現するK2eは、羊膜、臍帯上皮いずれにも発現を認めず、過増殖型ケラチンK6は羊膜及び臍帯上皮全層に発現を認めた。Cornified cell envelope (CCE) associated proteinであるTGaseIは、羊膜上皮には弱い発現を認め、臍帯上皮では上層部に強く発現していた。Involucrinは羊膜上皮には発現を認めず、臍帯上皮では全層に発現を認めた。Loricrinは臍帯上皮においてTGaseI類似の分布を示し、特に最上層部に強い発現を認めた。

臍帯上皮細胞の分離培養では、肉眼的観察ではあるが、その増殖形態、速度は表皮より分離培養した角化細胞に酷似しており、約2週間で80%コンフレントに達し、その後の継代培養では約8代まで継代可能であった。