

図3 病理組織所見。H&E 染色。棘融解とびらの形成。

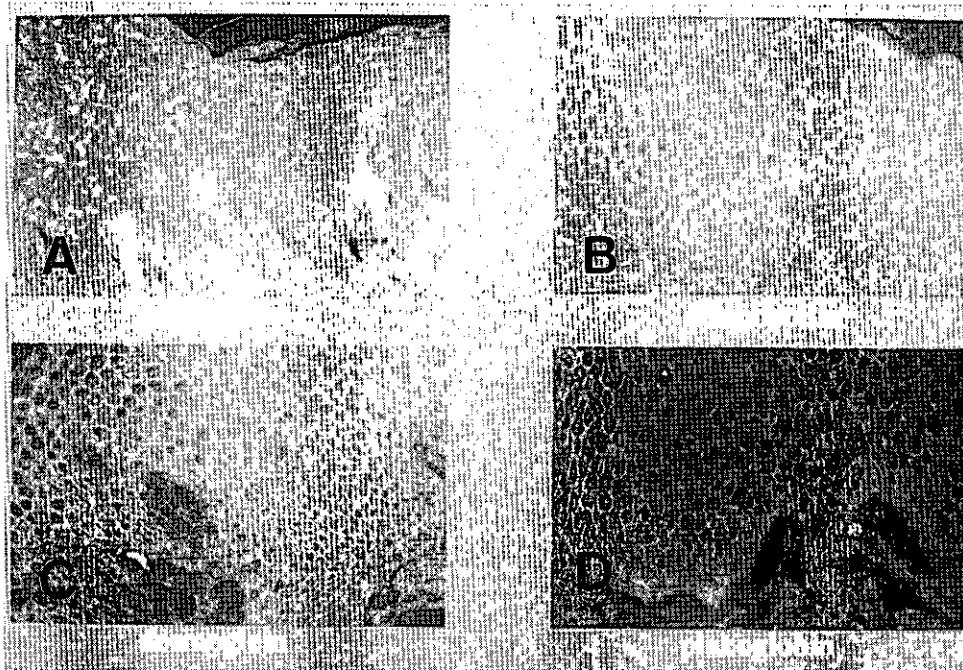


図4 免疫組織学的検索の結果：Plakophilin(A)、desmocollin(B)、desmoglein 1(C)、および plakoglobin (D)。Plakophilin のみ、表皮細胞間の陽性反応が著明に減弱している。



図5 電顕所見：表皮細胞間隙の拡大と desmosome 数の減少を認める。Hemidesmosome は正常である。

図6 皮膚脆弱症候群の位置付け

単純型表皮水疱症

棘融解性表皮水疱症（広義）

常染色体優性遺伝

- ・棘融解性表皮水疱症（狭義） → 成人発症で症状は掌蹠に限局

常染色体劣性遺伝

- ・皮膚脆弱症候群 → 出生直後から外胚葉形成不全症の症状
- ・皮膚脆弱症候群軽症型 → 幼児期から青年期に徐々に症状発現

3) 培養臍帯上皮細胞の重層化の試み：表皮水疱症治療への基礎的研究

研究協力者：池田志孝（順天堂大学医学部皮膚科）

分担研究者：溝口将之、須賀康（順天堂大学医学部皮膚科）

班長：小川秀興（順天堂大学医学部皮膚科）

抄 録

臍帯上皮細胞を表皮側へ分化させ、表皮シートを Biological engineering 出来ないかと考え、いくつかの条件下で臍帯上皮細胞の培養を試みた。その結果、95%O₂-5%CO₂の高酸素濃度の条件下で、臍帯上皮細胞は液相培養においては5~6層に重層化し、上層に向かうに従い核は扁平化し、その上層部においては、一部の領域でケラトヒアリン顆粒に類似した顆粒状の構造物を核周囲に認めた。また免疫学的検索では、重層化した培養臍帯上皮細胞では、最下層を除いて皮膚型ケラチンK10の発現を認め、上層部を中心に involucrin の発現を認めた。さらに抗フィラグリン抗体による染色では、上層部の顆粒状の構造物に一致して陽性所見を示した。これら所見は、臍帯上皮細胞から Biological engineering により表皮シートを作製出来る可能性を示唆するものと思われた。

はじめに

近年、皮膚形成外科領域において、難治性皮膚潰瘍に対する培養表皮移植の有効性が国内外から報告されているが¹⁾³⁾、他家培養表皮シートがすでに商品化されている欧米に対し⁴⁾、本邦では倫理面、安全性の面から自家培養表皮移植が推進されているのが現状である。そこで現在我々は、先天性表皮水疱症治療のための代替表皮として、臍帯上皮細胞を用いた培養表皮シート移植のプロジェクトを進めており、これまで臍帯からの上皮成分の分離培養、及び臍帯上皮の in vivo における分化関連マーカーの発現について検討してきた⁵⁾⁶⁾。その結果、臍帯上皮細胞は角化細胞用培地中で表皮細胞同様に増殖可能であり、その形態は表皮細胞に酷似していた。免疫学的検索では、臍帯上皮では羊膜同様、単純上皮及び粘膜型ケラチンK8/18、K4/13を発現しており、さらにその重層化した領域においては皮膚型ケラチンK1/10に加え TGase I、loricrin、involucrin といった cornified cell envelope (CCE)-associated protein の発現を認め、臍帯上皮が羊膜と表皮何れものポテンシャルをもった上皮であることが想定された。そこで今回、臍帯上皮細胞を表皮側へ分化させ、表皮シートを Biological engineering 出来ないかと考え、いくつかの条件下で臍帯上皮細胞の培養を試みたので報告する。

方 法

1) 臍帯上皮細胞の分離培養

出産後に得た臍帯を3cmずつに分割し、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、同培養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、Type I コラーゲンをコートした100mm dish

に播種し、37℃、95%air-5%CO₂の通常の条件下で培養した。1 dish 当たり約9 cm 分の臍帯を用いた。約10～14日後、細胞密度が70～80%に達したところで継代した。

2) 臍帯上皮細胞の重層化の試み

3代継代した上皮細胞を30mm 径の組織培養用透過性コラーゲンコート膜を有する culture insert に5×10⁶個播種し、低濃度カルシウムのKGM中で95%air-5%CO₂の高酸素濃度の条件下で培養した。2日後、培養液のカルシウム濃度を1.5mMに上昇させ、それぞれについて液相および気相下培養の2つの条件下でさらに7日間培養を続けた。

3) 免疫組織学検索

上記の方法に従って培養した臍帯上皮細胞からパラフィン切片を作製し、各種抗ケラチン抗体、抗インボルクリン抗体、抗フィラグリン抗体を用いて蛍光抗体間接法により比較検討した。

結 果

図1に各培養条件下における臍帯上皮細胞のHE染色像を示す。95%air-5%CO₂の通常の条件下では、液相(図1-a)、気相(図1-b)何れにおいて臍帯上皮細胞は重層化せず、これらは、FCS添加による影響は受けず、また、高カルシウム培地であるDMEMあるいはkeratinocyte conditioned mediumを用いても重層化は認められなかった。しかしながら、95%O₂-5%CO₂の高酸素濃度の条件下では、臍帯上皮細胞は液相培養においては5～6層に重層化し、上層に向かうに従い核は扁平化し、その上層部においては、一部の領域でケラトヒアリン顆粒に類似した顆粒状の構造物を核周囲に認めた(図1-c)。同条件下での気相下培養においては約3層程の構造を形成するにとどまり、ケラトヒアリン顆粒様の構造物や明らかな角層構造は認められなかった(図1-d)。免疫学的検索では、重層化した培養臍帯上皮細胞では、最下層を除いて皮膚型ケラチンK10の発現を認めた(図2-a)。また、上層部を中心にinvolucrinの発現を認め(図2-b)、抗フィラグリン抗体による染色では、上層部の顆粒状の構造物に一致して陽性所見を示した(図2-c)。

考 案

培養臍帯上皮細胞を用いて表皮シートの作製を試みた。その結果、培養臍帯上皮細胞は表皮細胞に比べて高酸素の条件下で培養することにより重層化した。重層化した臍帯上皮細胞では、皮膚分化型ケラチンの発現を認め、その上層部においては核周囲にフィラグリン陽性の顆粒状の構造物を認めた。これらの結果から、臍帯上皮細胞はin vitroにおいても、細胞の置かれた環境により重層化しうることが示され、今回示した実験系においては、免疫学的所見も合わせて考えると、表皮細胞同様に基底層、有棘層を通じて顆粒層まで形成できたと考えられた。臍帯は羊膜より連続する立方上皮により被われており、胎児皮膚へと連続する。羊膜上皮は、一武の重層化した領域を除いては終始単層構造を維持するが⁷⁾、臍帯上皮においては、広い範囲で上皮細胞は5～6層に重層化し胎生28週頃までにその分化は終了する⁸⁾。上層に向かうに従い細胞は扁平化し、核は消失し、細胞質内には角質細胞におけるケラチンパターン同様、密にパックされた線維状構造を形成する。興味深いことに、妊娠中、羊水中の酸素飽和度は子宮内で臍帯上皮の重層化がほぼ完成する妊娠約28週頃までは上昇を続け、28週をピークに次第に減少することが知られてい

る。今回我々が示した高酸素の条件下における臍帯上皮細胞の形態学的変化は、こういった母体内における環境の変化に応じた臍帯上皮細胞の分化様式を反映したものかもしれない。現在、コラーゲンゲル上での三次元培養、及び培養臍帯上皮細胞のヌードマウスへの移植についても検討中であり、より完全な表皮シートの完成に向け基礎研究を進めている。近年、ES cellや臍帯血に含まれる未分化細胞を用いて、造血幹細胞移植のみならず、骨や軟骨を再生させるプロジェクト研究もすすめられている。これまでの我々の結果から、臍帯上皮細胞は羊膜と皮膚の2方向性のポテンシャルをもった上皮細胞であると考えられ、臍帯上皮細胞から Biological engineeringにより表皮シートを作製することができれば、表皮水疱症をはじめとする難治性潰瘍治療の一つの有効な選択肢として普及するものと我々は考えている。

参考文献

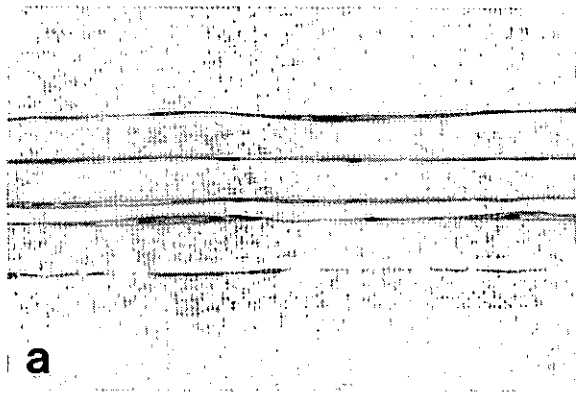
- 1) O'Connor NE, Mulliken JB, Banis-Schegel S, Keinde O, Green H: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells, *Lancet*, 1: 75-78, 1981
- 2) 橋本公二、松井善彦、東山真里、安東侑美：培養表皮シート移植を用いた先天性表皮水疱症における難治性潰瘍の治療について、厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成5年度研究報告書、P51-56、1994
- 3) 橋本公二、白方裕二、久保亮治他：先天性表皮水疱症の病型診断と培養表皮シート移植による治療の研究、厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成7年度研究報告書、P89-92、1996
- 4) Falanga V, Margolis D, Alvarez O, et al: Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent, *Arch Dermatol*, 134: 293-300, 1998
- 5) Mizoguchi M, Ikeda S, Suga Y, Ogawa H: Expression of cytokeratins and cornified cell envelope-associated proteins in umbilical cord epithelium, *J invest Dermatol*, 115: 133-134, 2000
- 6) 池田志孝、溝口将之、須賀 康、小川秀興：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、厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成11年度研究報告書、P36-40、2000
- 7) Shinha AA: Ultrastructure of human amnion and amniotic plaques of normal pregnancy, *Z. Zellforsch*, 122: 1-14, 1971
- 8) Hoyes AD: Ultrastructure of the epithelium of the human umbilical cord. *J Anat*, 105: 149-162, 1969

In vitro culture of epithelial cells derived from human umbilical cord

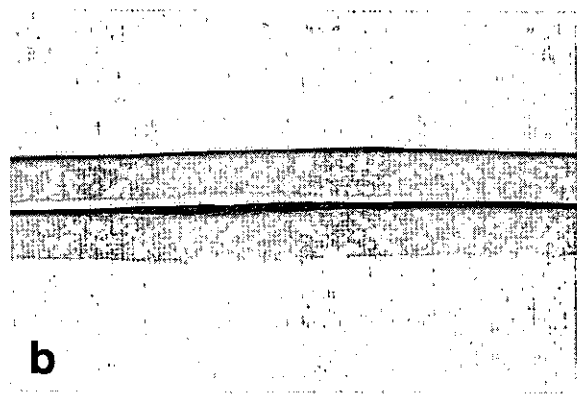
Shigaku Ikeda, Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga, and Hideoki Ogawa

Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

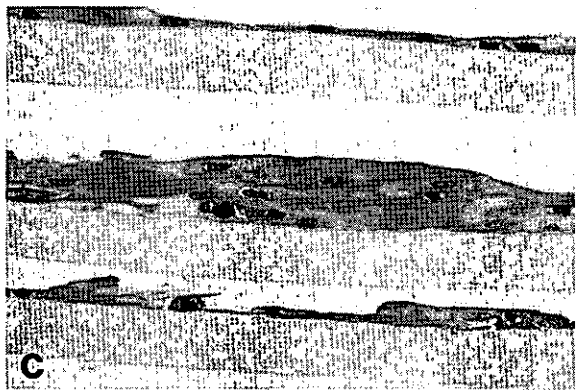
The umbilical cord (UC) epithelium is composed of a single epithelial layer that is thought to be derived from the amniotic epithelium. Occasionally, stratified regions and zone of cornification on the surface were observable in UC epithelium. Our previous study showed that the differentiation-specific markers such as keratin 1/10, loricrin, TGase were positive in UC epithelium. In order to analyze further its differentiation capacity, UC epithelial cells were cultured in serum free-medium on insert filter substrates. Within 1 week UC epithelial cells formed multiayered structure more than five layers containing keratohyalin like granules by the culture at high Ca^{2+} concentration (1.5mM) in 95% O_2 -5% CO_2 at 37°C, but not formed by incubation in 95% air-5% CO_2 at 37°C. Stratified epithelial CK10 were positive in the suprabasal layers, and involucrin were also observed in the upper part of cultured epithelium. These findings suggest that UC epithelial cells have an ability of stratification and differentiation in vitro as well as in vivo, and that these features may provide us with useful information about epidermal differentiation.



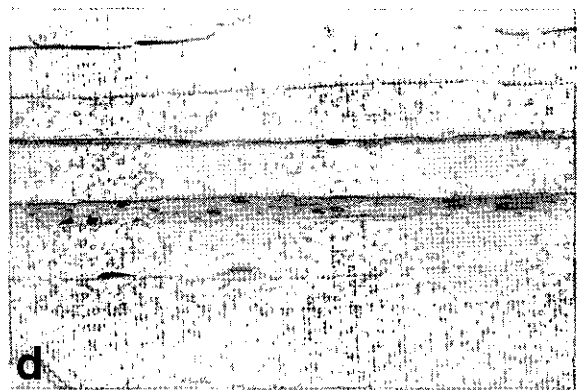
(a) : 95%air- 5 %CO₂、液相



(b) : 95%air- 5 %CO₂、気相

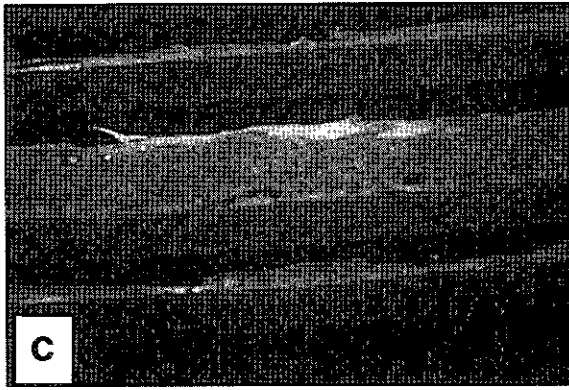


(c) : 95%O₂- 5 %CO₂、液相

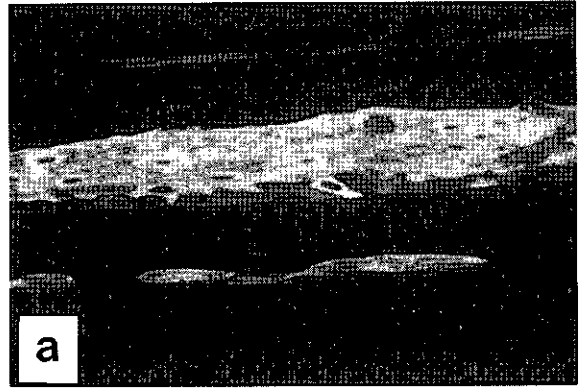


(d) : 95%O₂- 5 %CO₂、気相

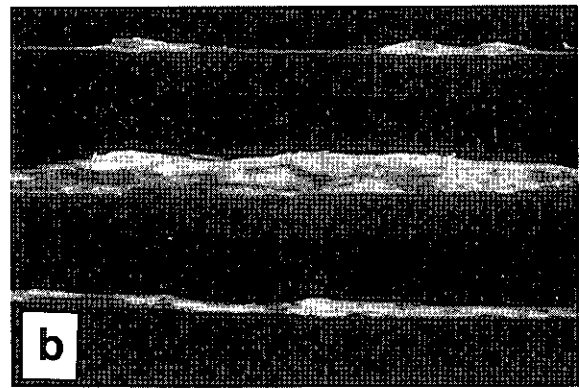
図1 各種培養条件下における臍帯上皮細胞のHE染色像



(c) : Filaggrin



(a) : Keratin 10



(b) : Involucrin

図2 重層化した臍帯上皮細胞における各種分化マーカーの発現

4) 皮膚疾患遺伝子治療のための技術開発

分担研究者：金 田 安 史（大阪大学医学系研究科遺伝子治療学）

要 約

遺伝子治療は皮膚疾患治療にはまだ不十分であり、導入、発現の観点からさらなる技術開発が望まれている。導入に関しては高効率、低侵襲ベクターが望ましいが、それを実現でき現皮膚組織への遺伝子導入が可能な HVJ-liposome が開発されてきた。そのベクター系を改良しより安全と考えられる再構成型 HVJ-liposome を開発した。また遺伝子発現については強力な発現レベル、長期発現に加えて、発現レベルを制御できる工夫が望ましい。そこで、遺伝子発現を誘導する試みの基礎実験として、熱ショック蛋白のプロモーターを利用し、細胞及び移植組織での遺伝子発現が温熱によって誘導可能かどうかを研究した。

は じ め に

表皮水疱症を代表とする難治性皮膚疾患に対する究極的な治療法は遺伝子治療である。遺伝子治療を可能にするためには高効率で低侵襲の遺伝子導入ベクターを開発すること、導入遺伝子発現を治療に十分なレベルで維持することが求められる。そこで1) HVJ-liposome を改良しより安全と考えられる再構成型 HVJ-liposome を開発した、2) 遺伝子発現を誘導する試みの基礎実験として、熱ショック蛋白のプロモーターを利用した遺伝子発現の誘導経について検討した。

方 法

1) 図1のように HVJ (Hemagglutinating virus of Japan; Sendai virus) を NP-40 で可溶化し、イオン交換カラムを用いて融合タンパク F、HN を分離した。これらの蛋白と脂質を NP-40 存在下で混合し、透析により NP-40 を徐々に除去することによって融合ベジクルを調整した。これを不活性化 HVJ の代わりに用いて遺伝子封入 liposome と融合し再構成型融合リポソームを作成した。その保存性、遺伝子導入効率を調べた。2) HSP70 (heat shock protein 70) のプロモーター 2.3kb を分離し、これをルシフェラーゼ遺伝子の上流につなぎ発現ベクター HSP-luciferase を作成した。リポソームによりマウス乳癌細胞 FM3A に導入し、45 度、30 分の処理を行った。コントロールとして CMV (cytomegalovirus) promoter による発現ベクター CMV-luciferase を用いた。熱処理後のルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。マウスに乳癌細胞 FM3A を移植して作成した乳癌組織に HVJ-liposome で HSP-luciferase、CMV-luciferase を導入し温浴による熱処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。

動物実験は全て大阪大学医学部動物実験ガイドラインに沿って行われた。

結 果

1) 再構成型融合リポソームは培養ヒト羊膜細胞にはほぼ 100% の確率で FITC-ODN (蛍光ラベルのオリゴヌクレオチド) の導入が可能であった。再構成融合粒子は 4 度で保存すると 4 週間以上融合活性を保ち、蛍光オリゴを封入したリポソームと融合し、細胞にかけても蛍光オリゴの

導入活性を保持していた。一方、紫外線で不活性化した HVJ は 1 週間で融合活性がなくなった。図 2 のように HEK293 細胞（ヒト胎児腎細胞）にルシフェラーゼ遺伝子を導入したが、再構成型は HVJ-liposome と同じ導入効率を示した。しかし還元剤の DTT 処理により導入活性が激減した。再構成融合ベジクルにより LacZ 遺伝子のマウス骨格筋への遺伝子導入を行ったが、HVJ-liposome とほぼ同じ導入効率を示した。組織の障害は全く認めなかった。

2) 熱処理による遺伝子誘導実験を行った。図 3 のように培養マウス乳癌細胞 FM3A では、45 度、30 分の処理によって HSP-luciferase では熱処理後 3 - 12 時間の間に 100 - 400 倍の遺伝子発現の増強が見られた。CMV-luciferase では発現の誘導はみられなかった。また 37 - 41 度では HSP-luciferase の発現の誘導はおこらなかった。同様に乳癌組織においても熱処理後、12、24 時間後に HSP-luciferase はそれぞれ 19、14 倍の遺伝子発現の増強があった。他の臓器では発現の誘導は見られなかった。

考 察

1) 再構成型融合ベジクルが機能することが示された。今後より安全性の高いベクター系として評価されるだろうが、如何に生産していくか、シンプルなものにしていくかが課題である。

2) 熱ショックにより遺伝子発現が劇的に亢進することがわかった。このことは培養皮膚シートを用いて移植による治療を行う際、遺伝子導入によって機能を賦与することが可能であるが、その遺伝子発現を必要時に高めることができうることを示唆している。これにより遺伝子による副作用を軽減し、より効果的に遺伝子治療を可能にすると考えられる。

謝 辞

熱ショックによる誘導実験は長崎大学医学部の山下俊一先生、大津留晶先生との共同研究によるもので、ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 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, 65-77, 2000.
- 2) Hagihara, Y., Saito, Y., Kaneda, Y., Kohmura, E., and Yoshimine, T.: Wide spread gene transfection into the central nervous system in rats. *Gene Therapy* 7, 759-763, 2000.
- 3) 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* 1, 425-431, 2000.
- 4) 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.
- 5) Breiden, V., Ohtsuru, A., Kawashita, Y., Miki, F., Sawada, T., Ito, M., Cao, Y., Kaneda, Y., Koji, T. and Yamashita, S.: Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under control of the heat shock protein promoter. *Human Gene Therapy* 11, 2453-2463, 2000.
- 6) Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Furukawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and Kaneda, Y.: Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, in

press.

英 文 抄 録

Gene therapy of intractable skin diseases such as congenital skin disorders have been desired. For this purpose, safer and more efficient gene delivery system should be developed. On the safety issue of gene therapy, we developed new methods from two different aspects. One was the development of a completely synthetic vector and another was the regulation of expression of a transgene.

To construct such a synthetic vector, we developed reconstituted fusion liposomes using purified fusion proteins of HVJ (hemagglutinating virus of Japan; Sendai virus). Fusion proteins F1 and HN of HVJ were extracted by mild lysis of the viral particles and purified by ion-exchange column chromatography. Purified viral fusion proteins were inserted into liposome membranes by detergent-solubilization and dialysis to construct the reconstituted fusion particles. These particles retained fusion activity during more than 4 weeks. DNA-loaded liposomes, which were prepared by vortexing-sonication, were fused with the reconstituted fusion particles to deliver DNA to cells. Using the reconstituted vehicle, fluorescent isothiocyanate (FITC)-labeled oligonucleotides were introduced into 100% of the nuclei of target human amniotic FL cells. In addition, luciferase gene expression upon transfection of human 293 cells with reconstituted fusion liposomes was almost the same as with standard HVJ-liposomes. The LacZ gene expression in mouse skeletal muscle by reconstituted liposomes was also the same as that by HVJ-liposomes. No cytotoxicity was observed both in vitro and in vivo.

Then, to regulate transgene expression, we investigated the usefulness of heat shock protein (HSP) promoter. When luciferase gene expression was driven by HSP promoter, luciferase activity in transformants of mouse mammary carcinoma cell line, FM3A, was markedly increased after heat shock (41-45°C), with maximum activation (about 400-fold) at 3 h. In mammary tumors of FM3A in mice, luciferase expression was enhanced 19 and 14 fold at 12 and 24 hours after heat shock (45°C, 30min).

These methods will provide us with much safer gene therapy in various organs including skin tissues.

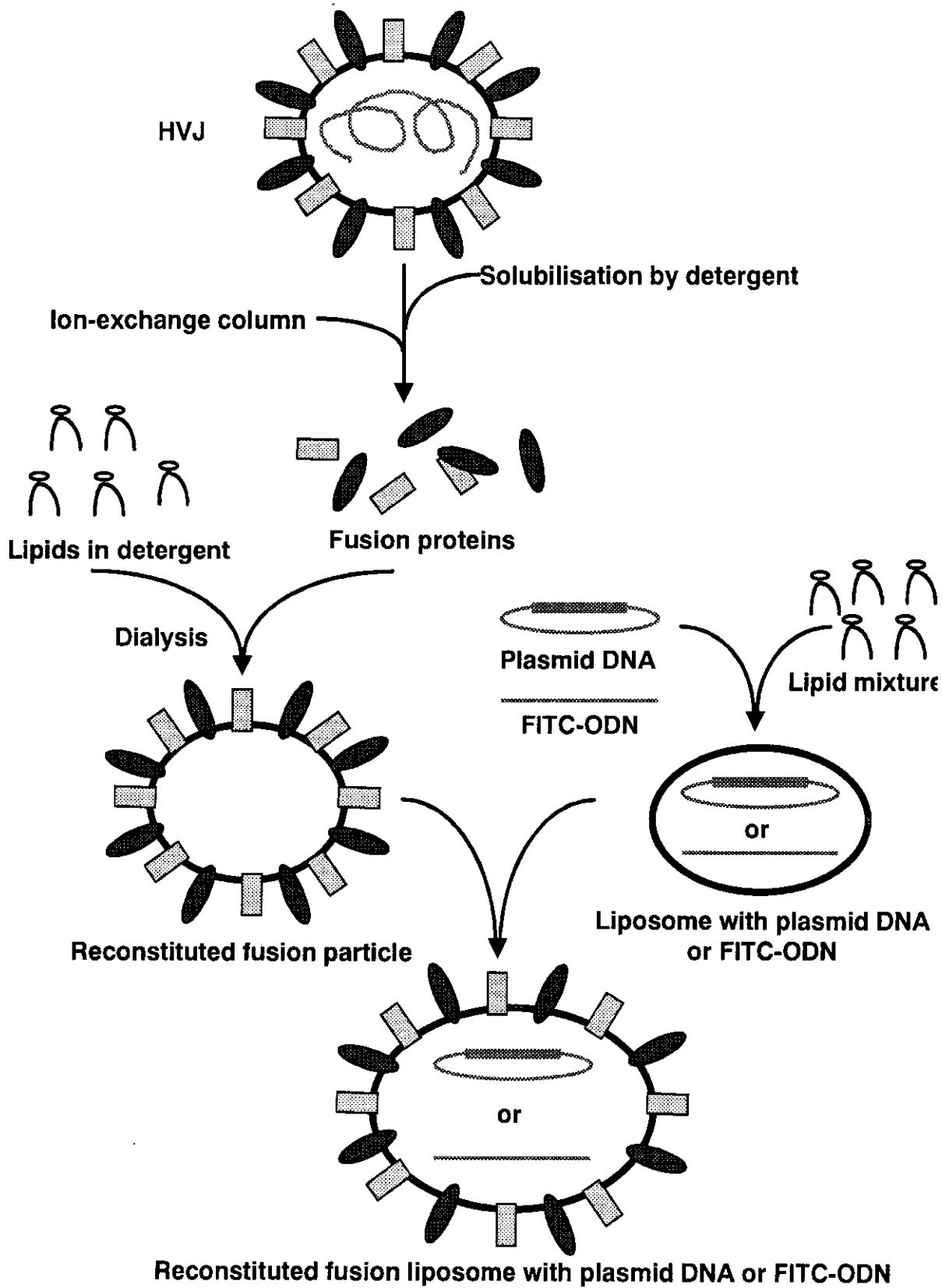


図1 再構成型融合ベジクルの作成法。

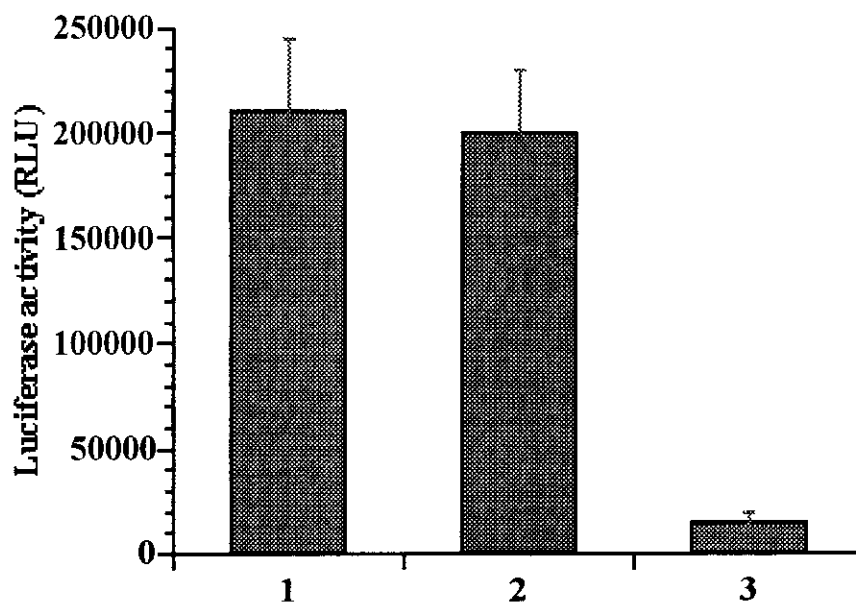


図2 再構成型融合ベジクル及びHVJ-liposomeによるHEK293細胞でのルシフェラーゼ遺伝子発現。

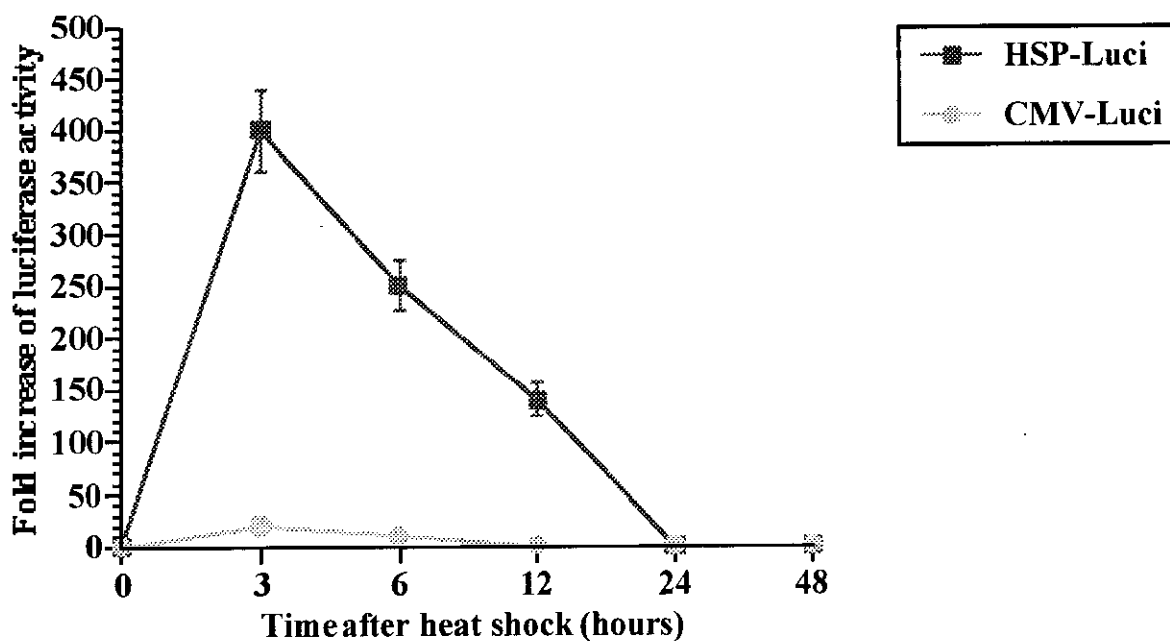


図3 熱処理によるマウスFM3A細胞でのルシフェラーゼ発現の誘導。

5) 出芽酵母をもちいた COL7A1 遺伝子変異検出法の開発

分担研究者：長 田 元 伸（東京医科歯科大学疾患遺伝子実験センター）

はじめに

COL7A1 は劣性栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であり、同遺伝子の先天的なフレームシフト変異やアミノ酸置換変異によって水疱症を発症する。遺伝子の変異を検出する手法として1. シークエンシング法、2. SSCP 法 (Single Strand Conformation Polymorphism)、などが代表的な方法としてあげられる。しかしながら、COL7A1 の変異をこれらの方法で検出するには、次に挙げるような理由で手技的煩雑さと技術的な困難がともなう。①COL7A1 は蛋白のコード領域が約 9 kb あり、遺伝子は 118 エクソンからなっており遺伝子が大きい。シークエンシング法、SSCP 法ともに多数の遺伝子断片に分割して解析しなければならない。②コード領域の GC 含量が平均で 65% と高く、部分的には 80% に達している。これは PCR 酵素の不正確な増幅、および逆転写酵素のスリップなどを引き起こしやすい。さらにシークエンシング法は正常型アレルが混在すると、ピークが重なってしまうために検出感度が下がるといった問題や、SSCP 法では標識に用いるアイソトープのために、その使用に制約を受けるといった問題点も存在する。こうした問題を回避し簡便に変異を検出するために酵母を用いたアッセイシステムの作成をおこなった。概略を図 1 に示す。表皮水疱症では早期終始コドンをかきたす変異の頻度が多いとされており、このフレームシフト変異を簡便に酵母の生育によって判定する方法の開発を試みた。RT-PCR 法によって増幅した COL7A1 の遺伝子断片を、発現ベクターと混合して酵母を形質転換し、相同組み換えを起こすことによって発現ベクター内に含まれるウラシル合成酵素と融合蛋白を形成させ、ウラシル欠損培地上での生育によってフレームシフト変異の有無を判別する。変異がなく in frame で uracil まで翻訳されれば増幅するが、早期終始コドンによる protein truncation がおきれば、選択培地上で増殖できなくなる。本法によって 9 kb の COL7A1 のフレームシフト変異の有無を約 5 日程度で判定することが可能になり、遺伝診断の迅速化に貢献するものと思われる。

方 法

プラスミドの作成①Wild Type 型の陽性コントロールプラスミドの作成；Ⅶ型コラーゲン蛋白を酵母 URA3 との融合蛋白として外来性に導入されたプラスミドから発現させ、ウラシル欠損培地上での増殖能を判定の指標とするが、融合蛋白が酵母の変異 URA3 を相補できるかどうかを検討するために、Wild Type 型の陽性コントロールプラスミドを作成した。COL7A1 遺伝子断片を約 2 kb ずつ重複するように 7 つの断片を RT-PCR 法で作成し、pCl-HA-URA3 の HA tag と URA3 の間に in frame でクローニングした (図 2)。融合蛋白は PGK promoter の制御下に酵母内で構成的に発現される。RNA は KB 細胞から AGPC 法で抽出し、逆転写反応は Gibco-BRL の Superscript II にて行った。PCR は Takara Ex Taq にて行った。②早期終始コドンを持つ Mutant Type 型の陰性コントロールプラスミドの作成；陽性コントロールプラスミドにクローニングされた COL7A1 内部にあるユニークな制限酵素部位で切断し、末端を平滑末端にするように処理してフレームをずらし、自己閉環させた。③相同組み換え用 gap vector の

作成；相同組み換えを起こさせるために、各 COL7A1 断片に対応して gap vector を作成した。gap vector は各 COL7A1 断片の両端の配列約 100bp ずつを pCl-HA-URA3 にクローニングし、gap が作れるように制限酵素認識部位を導入した。

酵母の形質転換および培地；酵母は YPH499 を用い、酵母の形質転換は酢酸リチウム法によって行った。培地は完全合成培地 SC を用い、酵母の維持にロイシン欠損培地、増殖の判定にウラシル欠損培地を用いた。増殖の判定のために、選択培地にプレーティング後 30℃で 48 時間の培養をおこなった。

結 果

各陽性および陰性コントロールの SC-leu-ura 培地上での増殖を図 3 に示す。陰性コントロールは培地上で増殖するが、陰性コントロールは増殖が抑制される。

考 察

DNA シークエンシング技術が近年急速な進歩を遂げ、間もなくヒトゲノムの全貌が明らかになるようとしているが、依然として個々の研究室ではそうした大規模解析が可能なわけではなく、遺伝子変異の簡便な解析方法の開発の意義は衰えていない。Genebank のデータベース上に登録されている COL7A1 の配列は、報告者によって塩基配列にいくつもの違いが認められる。5' prime から約 4000 塩基以降の配列が非常に GC rich であり、cDNA 合成あるいはシークエンシングの過程での手技的な困難さに起因するものと思われる、本遺伝子の変異探しにも困難さを与えていると考えられる。今回の研究は、遺伝子のフレームシフト変異を酵母を用いて検出することを目指すものであり、PCR 断片をそのまま酵母内に導入して蛋白を発現させ、短時間で遺伝子の変異を判定できるという点に特徴がある。一方本法の問題点は、ゲノム DNA では無く RNA を用いるという点である。ゲノム DNA でアッセイする場合検体の採取は容易であるが、RNA を用いる場合は発現している臓器から検体を回収し急速凍結して保存しなければならず、この点が特に臨床検体を用いる場合に問題となる。さらに、アミノ酸置換変異は原理的に検出できないことも、もう一つの問題点である。本法のような簡便な方法で、一次スクリーニングを行い、陽性例を振り分けたのちに陰性例を精査していくというのが、効率的な検査法であると思われる。

謝 辞

研究に御協力いただいた東北大学加齢医学研究所の石岡千加史先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Hovianian A, Rochat A, Bodemer C, et al: Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet* 61: 599-610, 1997
- 2) Jarvikallo A, Pulkkinen L, Uitto J: Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene (COL7A1). *Hum. Mutat.* 10: 338-347, 1997
- 3) Shafman T, Levitz S, Nixon A, et al: Prevalence of genomic truncation mutation in ATM in woman with a second breast cancer after radiation therapy for a contralateral tumor. *Genes, Chromosomes &*

Cancer 27: 124-129, 2000

- 4) Ishioka C, Suzuki T, Fitzgerald M, et al: Detection of heterozygous truncating mutations in the BRCA1 and APC genes by using rapid screening assay in yeast. Proc Nat Acad Sci USA 94: 449-453, 1997
- 5) Tamai K, Murai T, Mayama M et al: Recurrent COL7A1 Mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. J Invest Dermatology 1999, 112: 991-993
- 6) 玉井克人、間山真美子、橋本功、小川秀興：栄養障害型水疱症本邦例における 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－、厚生省特定疾患、稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班、平成 11 年度報告集、pp19-21

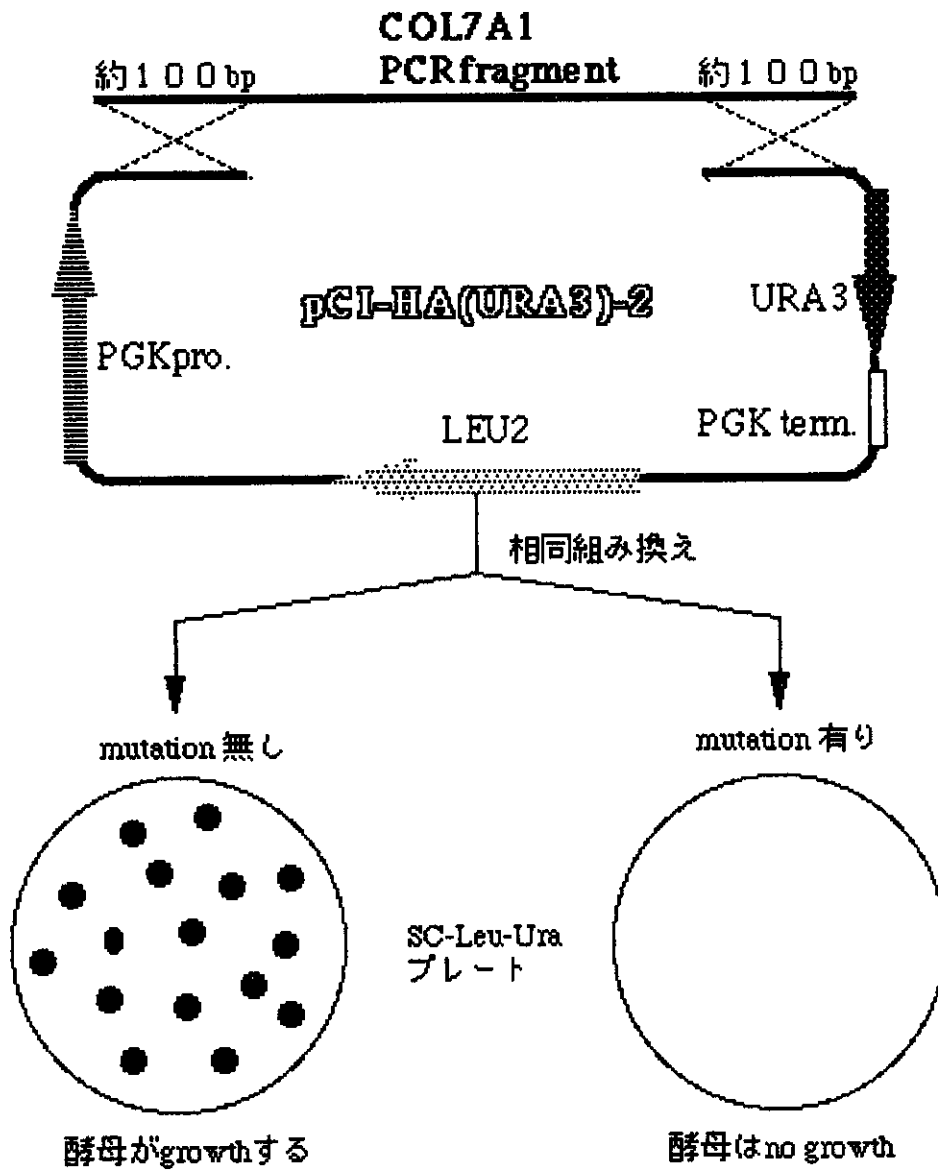


図1 早期終始コドン検出の原理

酵母発現プラスミド pCI-HA(URA3) に、COL7A1 遺伝子断片を酵母内で相同組み換えで組み入れ、URA3 との融合タンパクとして発現させる。早期終始コドンが有ると、URA3 の読み枠がずれることにより、ウラシル欠損培地上で増殖できなくなる。

LEU2 は酵母内でのプラスミドの維持に用いる。

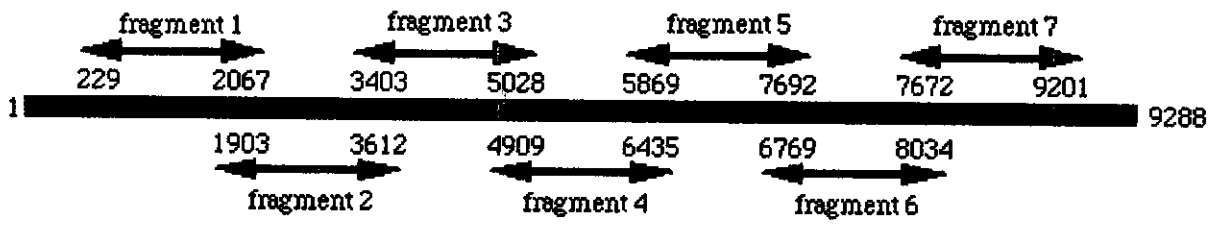


図2 COL7A1 RT-PCR 断片の配置

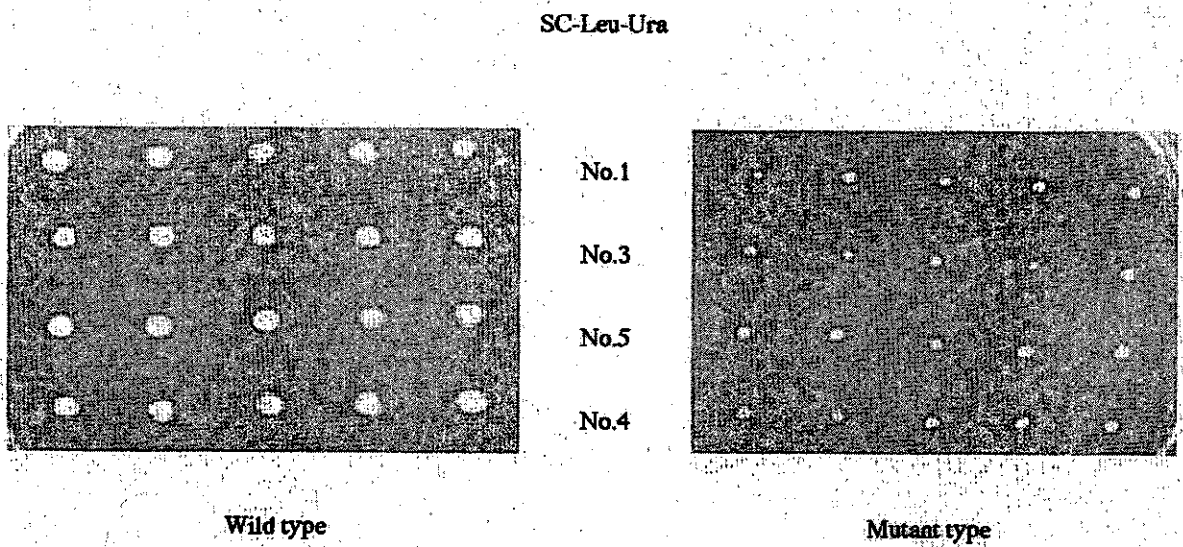


図3 野生型と早期終始コドン変異型による酵母増殖の差異

6) ケラチン病の病態形成におけるユビキチン化の役割

研究協力者：真 鍋 求（秋田大学医学部皮膚科）

要 約

我々は変異ケラチンの凝集が角化細胞の動態に及ぼす影響を観察するため、ケラチン病の細胞モデルを確立することを試みた。まず、ヒトケラチン 14 遺伝子に EBS-DM 型で観察される変異 (Arg125→Cys) を PCR により導入し、heat shock promoter と ecdysone/glucocorticoid response element をもつ発現ベクターである pIND/V5-His ベクターに挿入した。このベクターと pVgRXR を HaCaT 細胞にトランスフェクションし、ponasterone A による誘導を加えた後、抗 V5 抗体を用いた蛍光抗体法を行ったところ、変異ケラチンを発現している細胞においてケラチンの凝集塊が観察された。今後の予定として、この変異ケラチンが「細胞内タンパク質の品質管理」に重要な役割を果たしているユビキチンと結合しているか否かを抗ユビキチン抗体を用いた蛍光抗体法と免疫ブロット法により検索する予定である。

は じ め に

最近、多くの先天性皮膚疾患においてケラチン遺伝子の変異が見出されており、これらの疾患群は「ケラチン病」と総称されている。この変異ケラチンの発現により、疾患特異的な病態が形成される過程について、解明しなければならない課題が多く残されている。例えば、変異ケラチンの発現により、何故表皮が肥厚するのか、また、何故角層が剥離せず堆積するのか、あるいは、何故腫瘍が形成されることがあるのか、などに関する詳細な機序は全く不明である。これらはケラチンの異常と病態形成を結び付ける重要な研究課題であるとともに、臨床研究の究極の目的である治療法の開発に直接関わるものである。この疑問に明解な解答を与えるためには、点突然変異を挿入したケラチン遺伝子を培養細胞に発現させるのが最も効果的な方法であろう。そこで我々はこの細胞をケラチン遺伝子の異常によって発症する遺伝性皮膚疾患の細胞モデルとすることを試みる予定である。この研究はこれまで掘り所の無かったケラチン病の病態解明と治療法の開発への端緒となる。

材 料 と 方 法

(1) 変異ケラチン発現型 vector の作製

点突然変異を挿入するケラチン 14 遺伝子はジョンホプキンス大皮膚科より入手した。単純型先天性表皮水疱症の家系において実際に見つかっている (Coulombe PA et al. Cell, 66, 1301-1311, 1991) ケラチン 14 蛋白の 125 番目のアルギニンをシステインに置換 (Arg-125→Cys) するため、overlapping PCR の手法を用いて、ケラチン 14 をコードする遺伝子に点突然変異を導入した。すなわち、pET ベクター中のケラチン 14cDNA をテンプレートにして 4 個のプライマーを用いて PCR を行った。4 個のプライマーのうちプライマー 1 と 2 を用いて、360bp の PCR プロダクトを得、プライマー 3 と 4 を用いて 1 kb の PCR プロダクトを得た。これらのプロダクトをテンプレートにしてもう一度プライマー 1 とプライマー 4 を用いて変異ケラチン

cDNA をえた。PCR の条件は 2 ng の cDNA をテンプレートに使い、100pmol のプライマーを使用し、1 U の Taq polymerase を使用して、94°C 2 分の熱変性を行い、94°C 30 秒、55°C 45 秒、72°C 2 分の PCR を 30 サイクル行った。こうして得られた変異ケラチン 14 遺伝子を pIND/V5-His ベクターにサブクローニングした（以後このコンストラクトを pIND/MutK14-V5-His と呼ぶ）。このコンストラクトはシーケンスを行い、PCR によって目的とする部位以外に変異が導入されていないことを確認した。

(2) 培養細胞への遺伝子導入

DJM-1 細胞を低カルシウム培地 (KGM) で培養し、60% コンフルエントになった状態において、0.75 μ g の pIND/MutK14-V5-His と 0.75 μ g の pVgRXR と 2 μ g のドスパーリポソーマルリエージェントを混合したものを培地中に添加することにより遺伝子導入をおこなった。トランスフェクションは 6 時間施行した。

(3) 変異ケラチンの一過性発現

pVgRXR ベクターには、レチノイド X レセプターとエクデイソンレセプターをコードする 2 個の遺伝子が組み込まれている。レチノイド X レセプターとエクデイソンレセプターより形成されるヘテロダイマーにポナステロン A (エクデイソン同族体) が結合し、pIND/V5-His ベクターに存在するエクデイソンリスポンスエレメントに結合することにより、その下流域に組み込まれている MutK14 の転写が開始される。そこで、トランスフェクション開始後 22 時間後に 5 μ M のポナステロン A を培地に添加し、MutK14 の発現誘導を行った。pIND/V5-His ベクターから発現される蛋白質にはタグ (His tag および V5 tag) が付着するので、今回は抗 V5 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。DJM-1 細胞は -20°C メタノールにより固定した。1 次抗体としてマウス抗 V5 抗体 (Invitrogen 社製) をもちい、2 次抗体には FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Cappel 社製) を使用し、室温で 30 分反応させた。

結 果

変異ケラチン遺伝子を導入して HaCaT 細胞質内に、抗 V5 抗体にて染色される凝集塊が観察された。

考 察

点突然変異を持つケラチンが発現すると何故細胞内に水疱形成がおこるのか？そして、これを如何にして阻止するか？これらはケラチンの異常と病態形成を結び付ける重要な課題であるとともに、臨床研究の究極の目的である治療法の開発に直接関わるものである。それでは、この疑問に明解な解答を与えるためには如何なる方法論がある。それは点突然変異を挿入したケラチン遺伝子を培養細胞に発現させるのが最も効果的な方法である。しかしながら、通常の変異ケラチン 14 遺伝子をトランスフェクションした場合、細胞内にケラチン蛋白質凝集物が出現すると、その細胞は細胞の構造維持が困難となり、継代培養ができなくなる。そのため、通常は変異ケラチンを発現せず、ある条件下においてのみ特異的に変異ケラチンを発現する細胞を作成する必要がある。そのため、この本研究では Ecdysone Inducible Mammalian Expression システムを用いることとした。すなわち、培養角化細胞に点突然変異を持つケラチ