

200/0868

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策事業

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成14（2002）年4月

目 次

I. 総括研究報告

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究-----1	
橋本公二	

II. 分担研究報告

1. アデノウィルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入に関する研究-----7	
橋本公二	
2. 角化細胞の Stem cell の単離・培養に関する研究-----11	
大河内仁志	
3. VII型コラーゲン遺伝子のクローニングに関する研究-----13	
玉井克人	
4. 感染症の高感度診断技術の確立に関する研究-----16	
品川森一	
5. 角化細胞無血清培養法の開発に関する研究-----20	
白方裕司	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----23	
----------------------------	--

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----25	
------------------------	--

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

主任研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

角化細胞の無血清培養法を確立することに成功した。また、プリオンの迅速な検出法を開発した。さらに、1個の細胞から2-3万個の細胞まで増殖させることが可能となったことは、今後の再生医療において大きな意味を持つと考えられる。これら培養法の基礎技術の改良に加え、VII型コラーゲン遺伝子のcDNAが得られたことは表皮水疱症患者の遺伝子治療が飛躍的に進むことが予想される。

大河内仁志・国立国際医療センター・部長、玉井克人・弘前大学・助教授、品川森一・帯広畜産大学・教授、白方裕司・愛媛大学・助手

A. 研究目的

糖尿病性潰瘍、褥創、難治性下肢潰瘍、栄養障害型先天性表皮水疱症などの難治性皮膚疾患に対しては有効な治療法がなく、培養皮膚移植法による治療が期待される。培養皮膚移植は患者自身の細胞を用いる自己移植と他人の細胞を用いる同種移植に分類され、自己移植は主としてstem cell移植を、同種移植はbiological dressing効果を目的として使用される。同種移植は熱傷などの緊急性の患者に用いられるが最終的には生着しないことおよび潜在性の感染症の可能性が完全には否定できないことなどから、緊急性よりもstem cellの生着が重視される難治性皮膚潰瘍に対しては自己培養皮膚移植が適している。しかし、培養皮膚移植は現在、必ずしも臨床的に普及しているとは言い難い。その理由として、1) 現在表皮細胞培養法として普及し

ているGreenらの方法は牛胎児血清を使用し、プリオン感染の危険性が懸念されること、2) 毛嚢、汗腺などの皮膚付属器あるいは血管を備えた人工培養皮膚が開発されていないこと、3) 広く臨床応用を可能にするために必須である低コストかつ簡便な培養皮膚の保存法および輸送法の開発が不十分であること、4) 先天性表皮水疱症などの遺伝性疾患の治療に不可欠な遺伝子治療の基礎技術の開発が遅れていること、5) これらの研究、開発の基礎となる皮膚構成細胞のstem cellの基礎的研究が臨床応用開発の視点で行われていないことなどが挙げられる。本研究は上記の培養皮膚の問題点を解決した皮膚難治性疾患に対する自己培養皮膚移植法を確立することを目的として行う。

B. 研究方法

角化細胞のStem cellの単離・培養に関する研究では、正常角化細胞（新生児包皮由来）、無血清培地（KGM-2）を用いた。まず低密度培養を可能にするために、培養液の検討を行い、角化細胞の培養上清を新鮮な培養液に25%、50%、75%加えて96穴プレート上

で限界希釈法により細胞増殖を比較検討した。セルソーターを用い、コラーゲン IV でコートした 96 穴プレートに $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現している細胞を 1 個ずつ播種し、倒立顕微鏡で経時的に観察した。

感染症の高感度診断技術の確立に関する研究 (PrP^{Sc} 検出のための高感度サンドイッチ ELISA 法の開発) に関しては、大腸菌で発現させた組換えマウス PrP (rMoPrP23-231) を PrP 遺伝子欠損マウスに免疫して常法に従い細胞融合を行い、ハイブリドーマの上清を rMoPrP23-231 でスクリーニングを行ない、ハイブリドーマを樹立した。欠損組換えマウス PrP、各種動物組換え PrP 及びペプスポット膜を用いて、抗体の性状解析を行った。PrP^{Sc} の変性剤 GdnSCN 濃度を captured ELISA により検討し試料調整法を検討した。

牛由来材料を用いない培養法の確立に関しては、MCDB153 type II 無血清培地のアミノ酸、微量分子の配合量を検討し、さらに添加因子を種々組み合わせることで完全無血清培養法を確立した。培地の可否についてはすでに保存している角化細胞を用いる系と初代培養の系の両方で検討した。さらに、完全無血清にて培養した角化細胞を用いた三次元培養皮膚の作製が可能かについて検討した。

VII 型コラーゲン cDNA のクローニングに関しては、ヒト角化細胞より抽出した total RNA から RT-PCR 法にて cDNA を作成し、これをテンプレートとして PCR 法により全長を 4 分割して DNA 断片を増幅した。それぞれを制限酵素切断とライゲーション処理にて cDNA を作成した。得られた cDNA の塩基配列をシーケンサーで確認し、正常ヒト cDNA の塩基配列と一致しているかについて

確認した。

Cre recombinase を組み込んだアデノウイルスベクター (AdexCre) と loxP 配列で挟まれた Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) を組み込んだアデノウイルスベクター (AdexLNEGFP) を COS-TPC 法を用いて作製した。このアデノウイルスベクターを三次元培養皮膚へ感染させ遺伝子発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。倫理面への配慮として、本研究は生検ヒト皮膚を用いるが、試料等の保存及び使用方法について十分な説明を行った上で、自由意志に基づく文書による同意 (インフォームド・コンセント) を得た上で行った。

C. 研究結果

ケラチノサイトの培養上清を 25%, 50%, 75% 加えたものの方が新鮮な培養液のみの場合よりも低密度で増殖できることが示された。通常の培養条件では 96 穴 1 well に 100 個以下の場合、増殖しないのに対して、特に 50%, 75% 加えたものでは 1 well に 5-10 個程度の細胞からコンフルエントになるまで増殖できた。培養上清中の細胞成長因子等を ELISA 法を用いて検討したが、新鮮な培養液と有意差のあるものは見いだせなかった。 $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現 (上位 10%) している細胞は 1 個からコンフルエントになるまで (約 2-3 万個) 増殖することが可能であった。1 日に 1 回細胞分裂をし、2-3 週間でコンフルエントになった。1 週間目ころから角化した細胞が出現し、10 日以降には樹状突起をもった神経細胞様のもも出現した。プリオンの迅速な診断法として ELISA 法を確立した。mAb 44B1 を固相化し、mAb 72-5 からビオチン化 Fab を調整し、HRP 標識ストレプトアビジンと共に検出系

として、ELISA 系を構築した。感染マウス脳乳剤を非感染マウス脳乳剤で2倍段階希釈し、各希釈からウエスタンブロット用、ELISA 遠心、ELISA 遠心無しを試料を調整し、各々の方法で検出限界を求めて感度の比較を行った。ウエスタンブロット法では 2^{-8} 、ELISA 遠心無しでは 2^{-9} 、ELISA 遠心で 2^{-11} が各々の検出限界であった。今回確立されたELISA 法は遠心を省いて試料を調整してもウエスタンブロット法と同等以上の感度であった。先に今回使用したウエスタンブロット法の系とスクリーニングに用いられているキットの感度の比較を行い、ウエスタンブロット法が4倍ほど感度が高い成績を得ている。このことから、本ELISA 法は遠心操作を加えない簡便法の場合でも十分スクリーニングに用いることができると推測された。

MCDB153 type II 培地のアミノ酸含有を変更した培地を作製した。添加因子として EGF, PGE2, trasnfferin, IGF-1 を用い、それぞれ最適の濃度を決定し、カルシウム濃度を変更した。保存培養角化細胞を用いて細胞の増殖能を検討したところ、従来の培地と同等ないしはそれ以上の増殖が認められた。正常ヒト皮膚から初代培養を行ったところ、同程度の細胞増殖が認められ、さらに継代を繰り返して細胞増殖能を検討したところ、7-10 代の継代が可能であった。新規無血清培養法で培養した角化細胞を用いて三次元皮膚を作製し、組織学的に完成度を比較検討した。従来の方法とくらべ何ら遜色のない三次元培養皮膚が完成した。従来の無血清培養法を改良し、完全無血清培養法を確立した。この培養法は培養液の見直しと添加因子の調製を繰り返すことと達成できたと考えられる。また、この培養法を用

培養した角化細胞は従来の方法で分離した角化細胞と同様に、良好な三次元皮膚を形成する。今回は角化細胞の増殖は比較的早く、臨床応用に関してもあると思われ。細胞の増殖が早い分、分化の形態を呈する細胞の比率も多少多いる印象であり、今後さらなる培養液の改良が望まれる。今回の研究では、角化細胞全体でその増殖能を比較検討したが、今後は幹細胞を開発、すなわち、目的とする細胞に、応じた培養液の使用等を検討し、培養液の開発を進めてゆくべきであると考えられる。

ヒトVII型コラーゲン cDNA のクローニングに成功し、プラスミドを発現ベクターに組み込むことに成功した。この成果により栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療が発展することが期待される。アデノウィルスベクターによる三次元培養皮膚への遺伝子導入に関しては、重層化後7日目の角層が完成した後、一時的に表皮と真皮を剥離し、直接アデノウィルスベクターを感染させたところ、EGFP は基底層と傍基底層に強く発現していた。

D. 考察

ケラチノサイトの単細胞からの培養法は feeder layer を用いてコロニーを形成させたものが報告されているが、feeder layer なしで成功したのは今回が初めてと思われる。ケラチノサイトの幹細胞マーカーとして $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンが知られているが、セルソーターによる単離は細胞ダメージのために難しいとされていた。我々は培養上清を添加することにより、低密度培養を可能にし、細胞ダメージを最小限にするソーティング法により、増殖能力の強い細胞を1個ずつ分離・培養

することができたと考えた。培養上清中に存在するケラチノサイトの生存と増殖に関与する因子はケラチノサイト自身が産生しているものであり、それが何であるかを追求することは意義あることと思われる。今後 differential display 法などにより検討していきたいと考えている。また1個から2-3万個に増殖する過程で分化した細胞が出現しており、一部樹状突起をもつ神経細胞様の細胞が出現したのも興味深い。対称分裂と非対称分裂のメカニズムを考へる対称分裂の重要な点と思われる。同時に、ケラチノサイトの未分化状態維持機構の解明につながる可能性を秘めていると思われる。従来は、遠心操作は検出感度を高めるうえで有効な方法である。事実、我が国で実施されている ELISA スクリーニング検査では試料調整に遠心が組み込まれている。しかし、多数の検体を検査する場合時間を要し、煩雑なステップである。今回確立された ELISA 法は遠心を省いて試料を調整してもウエスタンプロット法と同等以上の感度であった。先に今回使用したウエスタンプロット法の系とスクリーニングに用いられているキットの感度の比較を行い、ウエスタンプロット法が4倍ほど感度が高い成績を得ている。このことから、本 ELISA 法は遠心操作を加えない簡便法の場合でも十分スクリーニングに用いることができると推測された。

DEB は、COL7A1 の変異により発症する遺伝性水疱症で、これまでの遺伝子変異検索により、臨床像と遺伝子変異の関係が解明されつつある。即ち、早期停止コドン (premature termination codon、PTC) を対立遺伝子に併せ持つ場合は、その殆どが最重症型 (Hallopeau-Siemense 型)

となり、アミノ酸置換型変異の組み合わせは、その殆どが中等症~軽症となる。それゆえ、臨床症状の完成していない出生後あるいは乳幼児期にも、遺伝子変異の解析より得た情報をもとに臨床的予後 (重症度) の予測が可能であり、Hallopeau-Siemense 型が予想される場合には、将来の遺伝治療の適応となるであろう。また、遺伝子導入技術の確立として、アデノウィルスベクターを用いて三次元培養皮膚に遺伝子を導入することが可能であった。これらの cDNA、アデノウィルスベクター、三次元培養皮膚を用いる遺伝子治療の発展が期待される。従来は無血清培養法を改良し、完全無血清培養法を確立した。この培養法は培養液の見直しと添加因子の調製を繰り返すことで達成できたと考えられる。また、この培養法を用いて培養した角化細胞は従来の方法で分離した角化細胞と同様に、良好な三次元皮膚を形成しうることを示された。今回の培養法では角化細胞の増殖は比較的早く、臨床応用に関しても有利であると思われる。細胞の増殖が早い分、分化の形態を呈する細胞の比率も多少多い印象を得ており、今後さらなる培養液の改良が望まれる。今回の研究では、角化細胞全体でその増殖能を比較検討したが、今後は幹細胞を特異的に増殖させる培養液の開発、すなわち、目的とする細胞に応じた培養液の使用等を考慮し、培養液の開発を進めてゆくべきと考えられる。

E. 結論

角化細胞の無血清培養法を確立することに成功した。また、プリオンの迅速な検出法を開発したことは今後の培養皮膚移植を開発する上で大きな功績であるといえる。さらに、1個の細胞

から 2-3 万個の細胞まで増殖させることが可能となったことは、今後の再生医療において大きな意味を持つと考えられる。これら培養法の基礎技術の改良に加え、VII型コラーゲン遺伝子の cDNA が得られたことは表皮水疱症患者の遺伝子治療が飛躍的に進むことが予想される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Nagata K, Yoshimura A. :Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. **J Clin Invest** 2001 108(12):1781-8
- 2) Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Herlyn M.: Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. **Oncogene** 2001 6;20(56):8125-35
- 3) Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Hirose S, Kyo S, Ito M. :Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. **Biochem Biophys Acta** 2001 19;1518(1-2):124-31
- 4) Hamada K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M. :Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines. **Oncol Rep** 2001 ;8(2):347-54
- 5) Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K**. :Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. **J Dermatol Sci** 2001;27(2):130-9
- 6) Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, **Hashimoto K**: Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. **J Biol Chem** 276:999-1004, 2001
- 7) 橋本公二: 皮膚工学 *Excerpta Medica* 4: 1-3, 2001
- 8) 白方裕司、鳥生信子、橋本公二: 表皮におけるβ1 インテグリンの発現 *Excerpta Medica* 4: 4, 2001
- 9) 白方裕司、橋本公二: 培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療 *Excerpta Medica* 4: 5, 2001
- 10) 白方裕司、中岡博喜、橋本公二: 血管新生 (FGF) を利用した難治性皮膚潰瘍治療 最新医学 56: 1786-1791, 2001
- 11) 橋本公二: スキンバンク -up-to-date- 臨床皮膚科 55: 145-148, 2001
- 12) 橋本公二: ビタミンDの皮膚作用 腎と骨代謝 14: 115-121, 2001
- 13) Yano, S., **Okochi, H.**, Tamaki, K.: Analysis of the Expression of Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen on the Peripheral Blood and Cutaneous Lymphocytes of Alopecia Areata Patients. **Acta Derm Venereol** in press
- 14) H Nakamura, M Aoki, **K Tamai**, M Oishi, T Ogihara, Y Kaneda and R Morishita.: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model Gene Therapy in press
- 15) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., **Shinagawa, M.**, Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990, 2001
- 16) **品川森一**、堀内基広、松井高峯: プリオンの免疫学的検出法 生活衛生 45 巻 259-269, 2001
- 17) 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、**品川森一**: 牛海綿状脳症に関する検査概

2. 学会発表

- 1) Y Shirakata, H Oura, K Yano, P Velasco, L Riccardi, M Streit, K. Hashimoto, and M Detmar: Inverse regulation of the angiogenesis factor VEGF and the angiogenesis inhibitors thrombospondin-1 and TSP-2 in human epidermal keratinocytes. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 2) Y. Yahata, S. Tokumaru, Y. Hanakawa, K. Yamasaki, Y. Shirakata, K. Hashimoto: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for endothelial cell migration induced by basic FGF: STAT3 phosphorylation is involved in tube formation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 3) K. Sayama, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, N. Toriu, S. Tokumaru, K. Hashimoto: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates early phase keratinocyte differentiation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 4) K. Yamasaki, N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, S. Tokumaru, Y. Yahata, M. Tohyama, K. Sayama, K. Hashimoto: Keratinocyte growth inhibition by high doses of epidermal growth factor is mediated through autoinduction of transforming growth factor beta: Negative feedback mechanism of keratinocyte growth. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 5) N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Hashimoto: Exogenous gene expression in skin-equivalent keratinocytes using a Cre/loxP adenovirus system. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 6) Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, K. Hashimoto: BIOLOGICAL DRESSING EFFECT

OF CULTURED EPIDERMAL SHEETS IS MEDIATED BY THE PRODUCTION OF VEGF AND TGF- β . 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

- 7) K. Midorikawa, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Sayama, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Hashimoto: CRE-LOXP ADENOVIRUS-MEDIATED FOREIGN GENE EXPRESSION IN SKIN EQUIVALENT KERATINOCYTES. 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan
- 8) Okochi H: keratinocyte stem cell culture without using feeder layer after single cell sorting by $\alpha 6$ integrin. Timberline Symposium 2002 2002年2月3日ポートランド(米国)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

アデノウイルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入に関する研究

主任研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

表皮水疱症の遺伝子治療の基礎研究として、Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。ウイルスベクターの感染時期、感染方法を工夫することで、三次元培養皮膚の基底層に効率よく遺伝子を発現させることが可能となった。

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症はその原因遺伝子がVII型コラーゲンの遺伝子であることが同定された遺伝性皮膚疾患であり、将来遺伝子治療の適応となるべき疾患であると思われる。特に、劣性栄養障害型表皮水疱症は正常VII型コラーゲン遺伝子を導入することにより遺伝子治療が可能である。我々は、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行っており角化細胞には100%遺伝子導入が可能であることを確認しており、将来的にはVII型コラーゲン遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターが作成可能な状況となってきた。また我々は栄養障害型表皮水疱症患者に対する培養表皮シート自家移植・三次元培養皮膚移植の有用性について報告してきた。そこで、遺伝子治療の基礎的研究としてアデノウイルスベクターによる三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した

B. 研究方法

正常ヒト皮膚より表皮ケラチノサイトを無血清培養法にて培養した。使用した細胞は3-4代継代したものをを用いた。真皮線

維芽細胞は outgrowth 法にてダルベッコ変法 MEM に 10%牛胎仔血清を加えた培地を用いて培養し、7-10代継代したものを使用した。

三次元培養皮膚の作製法：Bellの方法に準じカルチャーインサート（コースター社）を用いて三次元培養皮膚を作成した。I型コラーゲン溶液（セルマトリクスタイプ1A：新田ゼラチン）：6容量に対して0.1N NaOH：1容量、8倍濃度DMEM：1容量、20%FCS/DMEM：10容量の割合で中和コラーゲン液を作成し、インサートに1mlずつ添加し、ゲル化させた。予め培養しておいた対数増殖期の線維芽細胞をトリプシンで分散し、細胞懸濁液を調整し、線維芽細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整し、各インサートに3.5mlずつ添加しインキュベーター内でゲル化させた。ゲル化を確認した後10%FCS/DMEMをゲルが浸る程度加え5日間静置培養した。培養開始後5日後にはゲル上部は収縮し直径13-15mm程度となり、この陥凹している上に角化細胞を播種し、角化細胞がゲルに密着するように1.5-2.0時間インキュベーター内で静置したのち、さ

らに 2-3 日間液相下で培養を続けた。引き続き空気にさらすことにより分化を誘導し（気相下培養）重層化させ、三次元培養皮膚を作成した。

アデノウイルスベクターの作製：COS-TPC 法を用いてアデノウイルスベクターを作製した。Cre recombinase を組み込んだアデノウイルスベクター (AdexCre) と loxP 配列で挟まれた Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) を組み込んだアデノウイルスベクター (AdexLNEGFP) をそれぞれ 293 細胞へ感染させ、大量に増殖させた後、超音波処理、塩化セシウム密度勾配法にて精製・濃縮し PBS(-) に対して透析したものを使用した。濃縮ウイルス液の力価は 1×10^9 PFU/ml であった。

倫理面への配慮として、本研究は生検ヒト皮膚を用いるが、試料等の保存及び使用方法について十分な説明を行った上で、自由意志に基づく文書による同意（インフォームド・コンセント）を得た上で行った。

C. 研究結果

単層培養表皮角化細胞へ AdexCre, AdexLNEGFP を MOI=5+5, MOI=10+10 で感染させ、経時的に蛍光位相差顕微鏡にて観察した。6 時間後には EGFP の発現が認められ、角化細胞のほぼ 100% の細胞で EGFP の発現が認められた。EGFP の発現は時間経過とともに発現が増強し、24-36 時間でピークに達した。Cre/loxP システムと通常のアデノウイルスシステムでの EGFP の発現を比較したところ、EGFP の MOI に比例しており、Cre/loxP においても発現は同様に認められることが明かとなった。すなわち、遺伝子の on/off システムとしての Cre/loxP アデノウイルスベクターは角化細胞においても良好に作動することが明か

なった。

つぎに三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。まず、コラーゲンゲル上に角化細胞を播種する直前にアデノウイルスベクターを感染させ空気暴露により重層化させたところ、EGFP の発現は角層に限局し、基底細胞での発現はほとんど認められなかった。そこで、重層化後 7 日目の角層が完成した後、一時的に表皮と真皮を剥離し、直接アデノウイルスベクターを感染させたところ、EGFP は基底層と傍基底層に強く発現していた。

D. 考察

アデノウイルスの長所としては感染効率の高さ、非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であること、遺伝子の発現が一過性であること、高い濃度のウイルス液の作製が可能ながあげられる。問題点としては、細胞分裂により遺伝子が希釈されること、導入可能な遺伝子のサイズに制限があること、非特異的免疫反応が起きることなどがあげられるが、これら問題点についてそれぞれ改良されたウイルスベクターの作製が精力的に行われており近い将来解決されると思われる。Cre/loxP アデノウイルスベクターは遺伝子発現制御を可能とし、目的遺伝子を on/off できるシステムとして注目を集めている。今後の遺伝子治療においても、単に遺伝子を導入するだけでなく、遺伝子の発現量の調節や、導入遺伝子の削除などが必要となってくるとと思われる。Cre/loxP アデノウイルスベクターは角化細胞においても良好に作動することが明かとなった。さらに、三次元培養皮膚への遺伝子導入も Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いることにより導入可能であった。また、ウイルスベクターの感染時期、感染方法を工夫することで、三

元培養皮膚の基底層に効率よく遺伝子を発現させることが明らかとなった。三次元培養皮膚移植はすでに実用可能であり、その有用性は表皮水疱症においても示されている。近い将来、三次元培養皮膚を用いた遺伝子治療が表皮水疱症において実施されることが期待される。

E. 結論

表皮水疱症の遺伝子治療の基礎研究として、Cre/loxP アデノウイルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。ウイルスベクターの感染時期、感染方法を工夫することで、三次元培養皮膚の基底層に効率よく遺伝子を発現させることが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Nagata K, Yoshimura A. :Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001 108(12):1781-8
- 2) Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Herlyn M.: Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 2001 6;20(56):8125-35
- 3) Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Hirose S, Kyo S, Ito M. :Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochem Biophys Acta* 2001 19;1518(1-2):124-31
- 4) Hamada K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M. :Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines. *Oncol Rep* 2001 ;8(2):347-54
- 5) Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K**. :Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 2001;27(2):130-9
- 6) Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, **Hashimoto K**: Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276:999-1004, 2001
- 7) 橋本公二: 皮膚工学 *Excerpta Medica* 4: 1-3, 2001
- 8) 白方裕司、鳥生信子、橋本公二: 表皮におけるβ1 インテグリンの発現 *Excerpta Medica* 4: 4, 2001
- 9) 白方裕司、橋本公二: 培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療 *Excerpta Medica* 4: 5, 2001
- 10) 白方裕司、中岡博喜、橋本公二: 血管新生 (FGF) を利用した難治性皮膚潰瘍治療 最新医学 56: 1786-1791, 2001
- 11) 橋本公二: スキンバンク-up-to-date- 臨床皮膚科 55: 145-148, 2001
- 12) 橋本公二: ビタミンDの皮膚作用 腎と骨代謝 14: 115-121, 2001

2. 学会発表

- 1) Y Shirakata, H Oura, K Yano, P Velasco, L Riccardi, M Streit, **K. Hashimoto**, and M Detmar: Inverse regulation of the angiogenesis factor VEGF and the angiogenesis inhibitors thrombospondin-1 and TSP-2 in human epidermal keratinocytes. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 2) Y. Yahata, S. Tokumaru, Y. Hanakawa, K. Yamasaki, Y. Shirakata, **K. Hashimoto**: Nuclear translocation of

- phosphorylated STAT3 is essential for endothelial cell migration induced by basic FGF: STAT3 phosphorylation is involved in tube formation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
- 3) K. Sayama, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, N. Toriu, S. Tokumaru, K. Hashimoto: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates early phase keratinocyte differentiation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
 - 4) K. Yamasaki, N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, S. Tokumaru, Y. Yahata, M. Tohyama, K. Sayama, K. Hashimoto: Keratinocyte growth inhibition by high doses of epidermal growth factor is mediated through autoinduction of transforming growth factor beta: Negative feedback mechanism of keratinocyte growth. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
 - 5) N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Hashimoto: Exogenous gene expression in skin-equivalent keratinocytes using a Cre/loxP adenovirus system. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA
 - 6) Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, K. Hashimoto: BIOLOGICAL DRESSING EFFECT OF CULTURED EPIDERMAL SHEETS IS MEDIATED BY THE PRODUCTION OF VEGF AND TGF- β . 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan
 - 7) K. Midorikawa, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Sayama, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Hashimoto: CRE-LOXP ADENOVIRUS-MEDIATED FOREIGN GENE EXPRESSION IN SKIN EQUIVALENT KERATINOCYTES. 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

角化細胞の Stem cell の単離・培養に関する研究

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター 部長

研究要旨

正常ヒトケラチノサイトの低密度培養にはケラチノサイトの培養上清の添加が必要なことを明らかにした。 $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現している細胞をセルソーターを用いて、単離・培養することに成功し、1個から2～3万個にまで増殖させることが可能であった。

A. 研究目的

ケラチノサイトの幹細胞については生物学的にまだ不明な点が多い。幹細胞マーカーによるセルソーティングにてケラチノサイトの幹細胞を feeder layer なしで単離・培養することを目的とする。

B. 研究方法

正常ヒトケラチノサイト（新生児包皮由来）の培養には無血清培地（KGM-2）を用いた。まず低密度培養を可能にするために、培養液の検討を行い、ケラチノサイトの培養上清を新鮮な培養液に25%、50%、75%加えて96穴プレート上で限界希釈法により細胞増殖を比較検討した。

ベックマン・コールター社のセルソーター（EPICS ALTRA）を用い、シース液として氷冷した滅菌 PBS を使用し、コラーゲン IV でコートした96穴プレートに $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現している細胞を1個ずつ播種した。倒立顕微鏡で経時的に観察した。

（倫理面への配慮）

今回は市販されている正常ヒトケラチノサイトを使用したもので、倫理面が問題となることはなか

った。

C. 研究結果

ケラチノサイトの培養上清を25%、50%、75%加えたものの方が新鮮な培養液のみの場合よりも低密度で増殖できることが示された。通常の培養条件では96穴1wellに100個以下の場合、増殖しないのに対して、特に50%、75%加えたものでは1wellに5-10個程度の細胞からコンフルエントになるまで増殖できた。培養上清中の細胞成長因子等を、ELISA法を用いて検討したが、新鮮な培養液と有意差のあるものは見いだせなかった。

以後のセルソーターの実験には50%培養上清を加えたものを使用した。

$\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現（上位10%）している細胞は1個からコンフルエントになるまで（約2-3万個）増殖することが可能であった。1日に1回細胞分裂をし、2-3週間でコンフルエントになった。1週間目ころから角化した細胞が出現し、10日以降には樹状突起をもった神経細胞様のもものも出現した。

D. 考察

ケラチノサイトの単細胞からの培養法は feeder layer を用いてコロニーを形成させたものが報告されているが、feeder layer なしで成功したのは今回が初めてと思われる。ケラチノサイトの幹細胞マーカーとして $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンが知られているが、セルソーターによる単離は細胞ダメージのために難しいとされていた。我々は培養上清を添加することにより、低密度培養を可能にし、細胞ダメージを最小限にするソーティング法により、増殖能力の強い細胞を1個ずつ分離・培養することができたと考えた。培養上清中に存在するケラチノサイトの生存と増殖に関与する因子はケラチノサイト自身が産生しているものであり、それが何であるかを追求することは意義あることと思われる。今後 differential display 法などにより検討していきたいと考えている。また1個から2-3万個に増殖する過程で分化した細胞が出現しており、一部樹状突起をもつ神経細胞様の細胞が出現したのも興味深い。対称分裂と非対称分裂のメカニズムを考える上で重要な点と思われると同時に、ケラチノサイトの未分化状態維持機構の解明につながる可能性を秘めていると思われる。

E. 結論

feeder layer なしで正常ヒトケラチノサイトを1個からコンフルエント(2-3万個)になるまで増殖させることに成功し、培養上清が重要であることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano, S., Okochi, H., Tamaki, K.: Analysis of the Expression of Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen on the Peripheral Blood and Cutaneous Lymphocytes of Alopecia Areata Patients. **Acta Derm Venereol** in press

2. 学会発表

- 1) Okochi H: keratinocyte stem cell culture without using feeder layer after single cell sorting by $\alpha 6$ integrin. Timberline Symposium 2002 2002年2月3日ポートランド(米国)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

VII型コラーゲン遺伝子のクローニングに関する研究

分担研究者 玉井 克人 弘前大学 助教授

研究要旨

VII型コラーゲンが欠損した患者皮膚に導入するVII型コラーゲン発現ベクターpCY4B-COL7を作成した。このベクターを生体皮膚に導入することにより、VII型コラーゲンの発現、係留線維の形成が可能であることが示唆される。

A. 研究目的

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）の変異により、表皮・真皮境界部の基底膜と真皮を接合する接着分子である係留線維が消失ないし未発達となり、基底膜直下の真皮側に水疱を形成する遺伝性水疱性皮膚疾患である。水疱の治癒過程で著明な瘢痕を形成するため、重症例では手指の棍棒状癒着、開口障害、食道狭窄などをきたし、また経過中に皮膚有棘細胞癌を効率に合併する。これまで、培養皮膚移植や蛋白分解酵素阻害剤投与など、様々な治療の試みがなされてきたがいずれも対症療法であり、遺伝子治療をはじめとする有効な根治的治療の開発が切望されている。今回われわれは、重症栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を目的としたVII型コラーゲン発現ベクターを作成したので、その作成方法について報告する。

B. 研究方法

正常ヒトケラチノサイトより抽出した total RNA を用いて逆転写酵素により cDNA を作成。こ

れをテンプレートとして、PCR 法により VII 型コラーゲン cDNA 全長を、両端ないし片方の端が特定の制限酵素部位をはさんで順次オーバーラップする四つの DNA 断片に分割して増幅した（図、A～D）。次にこれらの DNA 断片をそれぞれ図に示した制限酵素で切断し、プラスミド pCY4B の EcoRI/HindIII 部位に、A→B→C→D の順番に接続した。具体的には、まず断片 A を EcoRI/HindIII で切断後、pCY4B の EcoRI/HindIII 部位に挿入。得られたプラスミドを HindIII/SbfI で切断・開環し、B を EcoRI/SbfI で切断して得た断片を挿入。得られたプラスミドをさらに HindIII/AgeI で切断後、C を HindIII/AgeI で切断して得た断片を挿入。最後にこのプラスミドを AgeI で切断し、その部位に D を AgeI で切断して得た断片を挿入して完全長の VII 型コラーゲン cDNA を挿入した発現プラスミド pCY4B-COL7 を作成した。（倫理面への配慮）

今回は市販されている正常ヒトケラチノサイトを使用したもので、倫理面が問題となることはなかった。

C. 研究結果

得られたプラスミドに挿入した VII 型コラーゲン cDNA 領域は、DNA 塩基配列自動決定装置 (ABI) を用い、塩基配列を確認した。その結果、挿入した 8535bp 中に 6 カ所の PCR エラーを同定したため、in vitro mutagenesis 法によりそれぞれのエラー配列を正常配列に置換・修復した。

D. 考察

DEB は、COL7A1 の変異により発症する遺伝性水疱症で、これまでの遺伝子変異検索により、臨床像と遺伝子変異の関係が解明されつつある。即ち、早期停止コドン (premature termination codon、PTC) を対立遺伝子に併せ持つ場合は、その殆どが最重症型 (Hallopeau-Siemense 型) となり、アミノ酸置換型変異の組み合わせは、その殆どが中等症～軽症となる。それゆえ、臨床症状の完成していない出生直後あるいは乳幼児期にも、遺伝子変異の解析より得た情報をもとに臨床的予後 (重症度) の予測が可能であり、Hallopeau-Siemense 型が予想される場合には、将来の遺伝治療の適応となるであろう。

E. 結論

今回われわれは、VII 型コラーゲンが欠損した患者皮膚に導入する VII 型コラーゲン発現ベクター pCY4B-COL7 を作成した。今後、このベクターを生体皮膚に導入することにより、VII 型コラーゲンの発現、係留線維の形成が可能であることを明らかにすると共に、DEB モデルマウスを用いて治療効果を検討し、有効性・安全性を確認し得た後に、重篤な皮膚症状に悩む DEB 患者の遺伝子治療法を確立していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Nakamura, M Aoki, K Tamai, M Oishi, T Ogihara, Y Kaneda and R Morishita.: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model
Gene Therapy in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

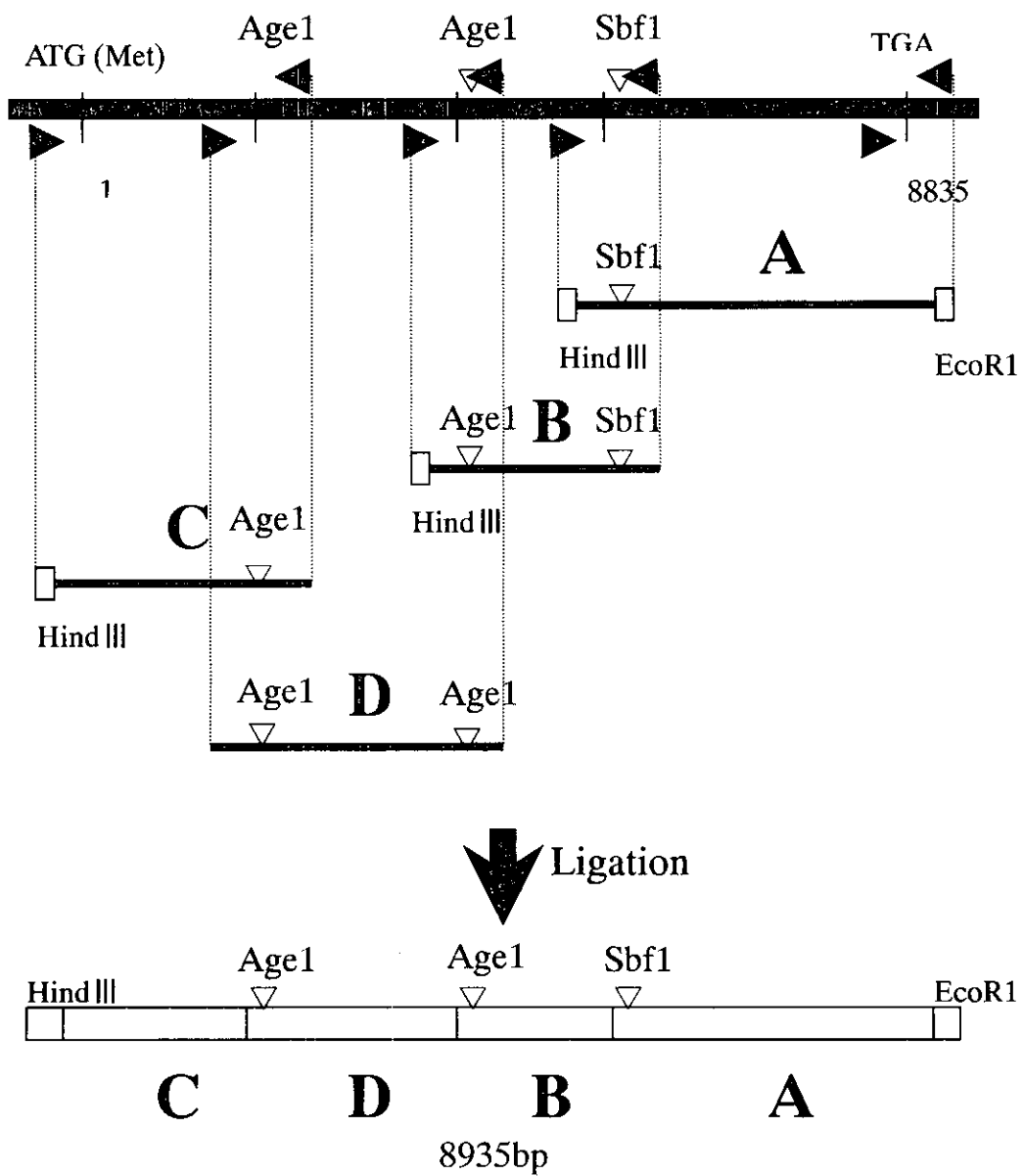


図 PCRによる完全長VII型コラーゲンcDNAの作成

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

感染症の高感度診断技術の確立に関する研究
(PrP^{Sc} 検出のための高感度サンドイッチ ELISA 法の開発)

分担研究者 品川 森一 帯広畜産大学 獣医公衆衛生学教授

研究要旨

組替えプリオン蛋白 (rPrP) に対する mAb の性状解析を終え、反応性が高く、種特異性が低く且つエピトープの違う mAb 72-5 及び mAb 44B1 を選び、高い検出感度でを構築した。試料調整に遠心操作を加えない場合もウエスタンブロット法に比べ、2 倍、遠心操作を加えると 64 倍程高い検出感度であった。現在我が国で使用されている ELISA キットの感度はウエスタンブロット法の半分程度であることから、高感度で簡便な実用性の高い ELISA 検出系と言える。

A. 研究目的

プリオン病の免疫診断はプリオン構成蛋白 PrP^{Sc} の構造異性体 PrP^C を蛋白分解酵素により消化除去し、残存する PrP^{Sc} を変性剤処理して抗 PrP 抗体によって検出するものである。これらの検出感度を上げる為にはより優れた抗体の作出と、試料調整法の確立が必要である。BSE 検査が広く実施される様になった現在、国産の簡便安価な高感度 ELISA 系を確立することは急務である。

本研究では、抗体の性状解析、試料調整法の検討のために開発した ELISA 系を臨床応用のために改良し、高感度で簡便な検出系を作出することを目的とした。

B. 研究方法

大腸菌で発現させた組換えマウス PrP (rMoPrP23-231) を PrP 遺伝子欠損マウスに免疫して常法に従い細胞融合を行い、ハイブリドーマの上清を rMoPrP23-231 でスクリーニングを行なってハイブリドーマを樹立した。欠損組換えマウス PrP、各種動物組換え PrP 及びペプスポット膜を用いて、抗体の性状解析を行っ

た。PrP^{Sc} の変性剤 GdnSCN 濃度を captured ELISA により検討し試料調整法を検討した。

(倫理面絵の配慮)

実験動物使用時は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施している。また、使用動物数は必要最小限に止めた。

C. 研究結果

プリオンの変性分散には 2.6M 以上の GdnSCN が必要であった。一方 mAb 44B1 は他の抗体より高い GdnSCN 濃度、0.5M までは反応性を保持したため、captured 抗体として固相化した。mAb 72-5 からビオチン化 Fab を調整し、HRP 標識ストレプトアビジンと共に検出系として、ELISA 系を構築した。

確立された簡便な試料調整は以下の通りである。組織乳剤をコラゲナーゼ・DNase 処理に続き Proteinase K 処理を行い、蛋白分解酵素阻害剤を加えて消化を停止する。遠心操作を加える場合、この段階で 15,000 回転 15 分遠心で沈殿をえる。最終濃度 3M

に GdnSCN を加えて変性分散後、PBS で希釈して GdnSCN 濃度を 0.4M として試料とする。

感染マウス脳乳剤を非感染マウス脳乳剤で 2 倍段階希釈し、各希釈からウエスタンブロット用、ELISA 遠心、ELISA 遠心無しでの試料を調整し、夫々の方法で検出限界を求めて感度の比較を行った (図)。ウエスタンブロット法では 2^{-8} 、ELISA 遠心無しでは 2^{-9} 、ELISA 遠心で 2^{-14} が夫々の検出限界であった。

抗原として BSE 感染牛脳を用いて ELISA 系が動くことを確認した。

D. 考察

遠心操作は検出感度を高めるうえで有効な方法である。事実、我が国で実施されている ELISA スクリーニング検査では試料調整に遠心が組み込まれている。しかし、多数の検体を検査する場合時間を要し、煩雑なステップである。今回確立された ELISA 法は遠心を省いて試料を調整してもウエスタンブロット法と同等以上の感度であった。先に今回使用したウエスタンブロット法の系とスクリーニングに用いられているキットの感度の比較を行い、ウエスタンブロット法が 4 倍ほど感度が高い成績を得ている。このことから、本 ELISA 法は遠心操作を加えない簡便法の場合でも十分スクリーニングに用いることができると推測された。

E. 結論

新たに得られた mAb を用いて、PrP 検出用サンドイッチ ELISA 系を構築した。本 ELISA 系は感度の点、試料調整の簡便さの点で十分実用に耐える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. J. Vet. Med. Sci., 63: 983-990, 2001
- 2) 品川森一、堀内基広、松井高峯: プリオンの免疫学的検出法 生活衛生 45 巻 259-269, 2001
- 3) 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一: 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 食品衛生研究 52 巻 33-42, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図)

