

200/0869

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

重症型先天性表皮水疱症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

平成 14 年 (2002 年) 4 月

主任研究者 清 水 宏

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|---|---|
| 重症型先天性表皮水疱症に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究 …………… | 1 |
| 清水 宏 (北海道大学) | |

II. 分担研究報告

| | |
|--|----|
| 1. 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究 …………… | 7 |
| 清水 宏 (北海道大学) | |
| 2. 表皮水疱症関連遺伝子の生体表皮での発現とノックアウトマウスの 作成に関する研究 …………… | 11 |
| 澤村大輔 (北海道大学) | |
| 3. 表皮水疱症の原因蛋白の合成に関する研究 古市泰宏 (ジーンケア研究所) | |
| 4. 表皮水疱症の治療用 VII 型コラーゲン遺伝子の作成と NC-1 ドメインの 機能の解析に関する研究 …………… | 15 |
| 増永卓司 (コーセー基盤技術研究所) | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… | 21 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 …………… | 24 |
|-----------------------|----|

厚生科学研究費補助金
(特定疾患対策研究事業)
総括研究報告書

重症型先天性表皮水疱症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 清水 宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 教授

研究要旨

重症型先天性表皮水疱症に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究を行なった。今回の研究では、表皮水疱症患者の遺伝子変異と臨床症状の関連がある程度明らかになったが、不明な部分も残り、遺伝子治療などに向けて、さらに多くの症例の解析が必要と思われた。本研究グループで作成した VII 型コラーゲン遺伝子は、培養表皮細胞や生体の表皮細胞への導入すると、正常の VII 型コラーゲンが発現され、栄養障害型表皮水疱症の補充療法や遺伝子治療への応用には問題ないと考えられた。

清水 宏・北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 教授

A. 研究目的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の分子生物学の進歩により、ケラチン 5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$ インテグリン、ラミニン 5、VII 型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなったが、現在までに根本的な治療法はない。それらの重症型では、以前には医療レベルが低く命を落とすような例もあったが、現在では対症療法の進歩から、水疱や潰瘍症状を持ったまま人生を全うすることが多く、患者の QOL は著しく障害される。患者から表皮角化細胞を採取し、その表皮角化細胞を培養し培養表皮シートを作成し、患者の病変部に移植する自己培養表皮移植療法が、当教室を含む 2・3 の施設で最近試みられ、ある程

度の効果がみられている。しかし、自家組織の移植のため、原因遺伝子によりコードされているタンパクの発現は、やはり欠損しているままであることが問題点となっている。そこで、本研究では特に VII 型コラーゲンやラミニン 5 β 鎖が異常である重症型表皮水疱症に焦点を絞り、それらの疾患治療において、合成した正常のそれらの蛋白を外用してから自己培養表皮シートを移植する蛋白補充療法、さらにそれらの遺伝子を患者培養表皮角化細胞に導入し、その表皮角化細胞から作成した表皮シートを患者の潰瘍面に移植する遺伝子治療を併用した、自己培養皮膚移植法の開発と臨床応用が今回の研究の目的である。

B. 研究方法

1) 治療対象となる表皮水疱症患者の集積と診断の確定

将来、補充療法や遺伝子治療の対象となる表皮水疱症患者について正確な診断を行った。皮膚生検を行い、電顕、各種基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検索を行い、基底膜における微細構造、発現蛋白の変化を観察した。さらに、患者本人、ならびに家族から採血を行い、genomic DNA を抽出し、PCR、heteroduplex、direct sequencing 法などを用いて DNA 解析を行い、診断を確定した。

2) VII 型コラーゲン遺伝子の作成

本研究グループではすでに VII 型コラーゲン cDNA の全長を表皮細胞のライブラリーからクローニングしているが、最終的にその遺伝子産物やその遺伝子そのものを患者に用いるので、すべての塩基配列について塩基配列を確認した。

3) VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインの機能の解析

VII 型コラーゲンは N 末端側の非コラーゲン領域 NC-1 domain (145kDa) と C 末端側の非コラーゲン領域 NC-2 domain (34kDa) とが、Gly-X-Y の繰り返し構造からなるコラーゲン領域 collagenous domain (145kDa) を挟む構造をとる。その NC-1 ドメインは各種のコラーゲンやラミニンとの結合に関与している。従って、NC-1 ドメインの多様性を出すために、NC-1 ドメイン遺伝子に alternative splicing が起こっている可能性がある。そこで、NC-1 ドメインに一致する各種 cDNA をクローニングし、alternative splicing 有無を

確認した。

4) VII型コラーゲン遺伝子の細胞への導入とVII型コラーゲン永久発現株の作成

VII型コラーゲンのcDNAを発現ベクターに挿入し、リコンビナント蛋白を作成するため、細菌に導入したが、成熟したVII型コラーゲを作成できなかった。そこで、表皮細胞株であるHaCaT細胞に導入し、合成蛋白を作成した。

5) VII型コラーゲンの生体表皮内での発現

VII型コラーゲン遺伝子は、3万塩基対と非常に長く、エクソンも118と数が多い。そこで、遺伝子治療に用いられる遺伝子は、イントロンを除いたcDNAとなる。そのVII型コラーゲンのcDNAを実際に生体の表皮細胞にnaked DNA法を用いて導入し、VII型コラーゲンが産生されるのかを検討した。

6) 180kD類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成

表皮水疱症の原因遺伝子として、180kD類天疱瘡抗原があり、その遺伝子が欠損すると接合部型が発症する。本遺伝子の欠損症では、他型とは異なり、脱毛や歯の異常を合併することが多い。そこで、本症の水疱発生機序やそれらの合併症の発症機構を解明するため、また、遺伝子治療のモデルを作るため、180kD類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成を計画した。

7) その他、本研究に関連する多数の研究も行なった。

倫理面への配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解（インフォームドコンセント）に係わる状況を鑑み、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行する。また、動物を使用する実験を行う場合、動物に対する動物愛護上の配慮から、北海道大学で定める動物実験規則に従う。遺伝子解析、培養表皮シートによる治療の試みに関しては、すでに北海道大学医学部倫理委員会の承認を得ているが、新たに遺伝子治療を行う場合は、北海道大学医学部倫理委員会や厚生労働省の認可を受ける。

以上のようにシステムをすでに構築し、人権、利益の保護に関しては万全の体制が整っている。

C. 研究結果

1) 治療対象となる表皮水疱症患者の集積と診断の確定 (清水)

多数の新規患者の集積と診断の確定を行った。その内、栄養障害型表皮水疱症の2家系で興味深い結果が得られた。そのVII型コラーゲン遺伝子に、G1815R, G1595R, Q2827Xの新規変異を確認し、G1815R, あるいはG1595Rが一方のアリルにある場合、水疱はなく爪の変形のみを来すことを明らかにした。キンドラー症候群は、水疱や皮膚の萎縮を示し、表皮水疱症と類似する臨床症状を来す。今回、表皮水疱症と長い間誤診されたキンドラー症候群の症例を報告した。また、VII型コラーゲンの遺伝子の変異を詳細に検討したが、検出されなかった。

2) VII型コラーゲン遺伝子のcDNA全長作成 (増永)

本研究グループで作成したVII型コラーゲンcDNAの全長の塩基配列を確認したところ、27塩基の挿入が検出された。その遺伝子配列を調べると、その挿入はスプライシングのアクセプター部位がイントロン側に移動することにより生じていた。尚、アミノ酸が新たに9加わるのみで、オープンリーディングフレームには影響はでなかった。また、その部の挿入を試験管内変異導入技術で除去した。

3) VII型コラーゲンのNC-1ドメインの機能の解析 (増永)

上記2)の研究で、NC-1ドメインに新しいalternative splicingが見つかった。そこで、NC-1ドメインは各種のコラーゲンやラミニンとの結合に関与している。そこで、他のalternative splicingが存在するかを検討した。その他のalternative splicingは見つからなかった。また、培養表皮細胞にTGF- β を加えるとそのalternative splicingが増加することが観察された。

4) VII型コラーゲン遺伝子の細胞への導入とVII型コラーゲン持続発現株の作成 (古市)

まず、表皮細胞株であるHaCaT細胞のゲノムに、Flp recombinaseの標的となるFRT部位を挿入した。そして、ヒグロマイシン耐性のVII型コラーゲンの発現ベクターとFlp recombinaseの発現ベクターをco-transfectionし、VII型コラーゲン遺伝子の持続発現株を作成した。培養上清に大量のリコン

ビナント蛋白を検出した（古市）。

5) VII型コラーゲンの生体表皮内での発現（澤村）

VII型コラーゲン遺伝子の発現ベクターをラットの皮膚に直接局注し、VII型コラーゲンの抗体を用いて免疫染色を行なった。48時間後には、ラット表皮細胞内にVII型コラーゲンの発現が確認された。また、1週間後には、基底膜領域に陽性所見が認められた（澤村）。

6) 180kD類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成（澤村）

我々は、マウスの180kD類天疱瘡抗原の遺伝子のクローニングを行ない、エクソンとイントロン構造を明らかにしている。本遺伝子の第一エクソンにネオマイシン遺伝子を挿入することで遺伝子を不活化する。現在、ターゲティングベクターが構築され、ES細胞への導入が行なわれ、リコンビネーションを確認中である。

7) その他、本研究に関連する研究も行い、興味ある知見が多数得られている。

D. 考 察

1) 表皮水疱症患者の集積と診断の確定（清水）

今回行なった検索でも、表皮水疱症患者の遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、さらに多くの症例の解析が必要と思われる。

2) VII型コラーゲン遺伝子に関して（増永）

本研究グループで作成したVII型コラーゲンcDNAの全長の塩基配列を確認したところ、27塩基の挿入が検出されたがその部は除去した。その他のalternative splicingは見つからなかった。

3) VII型コラーゲン遺伝子の細胞への導入（古市）

VII型コラーゲン遺伝子の持続発現株を作成した。培養上清に大量のリコンビナント蛋白を検出した。

4) VII型コラーゲンの生体表皮内での発現（澤村）

VII型コラーゲン遺伝子の発現ベクターをラットの皮膚に直接局注し、生体表皮でのVII型コラーゲン発現に成功した。

5) その他、本研究に関連する研究も行なった。各、分担研究の項目で後述した。

E. 結 論

表皮水疱症患者の遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、補充療法や遺伝子治療に向けて、さらに多くの症例の解析が必要と思われる。本研究グループで作成した VII 型コラーゲン遺伝子は、培養表皮細胞や生体の表皮細胞への導入で正常の VII 型コラーゲンが発現され、補充療法や遺伝子治療への応用には問題ないと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

分担研究報告書に詳細に記載した。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

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

表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究

主任研究者 清水 宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 教授

研究要旨

表皮水疱症の診断の確定や新しい治療法への適応の決定のため、本症や類症の遺伝子診断を行った。新しい変異を多数見い出したが、いまだ遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、さらに多くの症例の解析が必要と思われ、今後もさらに症例を増やして遺伝子診断を継続する。

清水 宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 教授

A. 目 的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、ケラチン5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$ インテグリン、ラミニン5、VII型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に参与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。

しかしながら、いまだに各遺伝子の変異と臨床症状関連は明確には明らかにされていない。また、新しい治療法などの臨床治療研究を行う場合には、患者の診断を確実にすることは必須である。そこで、表皮水疱症患者集積とその遺伝子変異の検索を行なった。さらに、本症で原因となる新しい遺伝子や本症の亜型の検索のため、水疱を混じる他の遺伝性疾患についても遺伝子の検索を行なった。

B. 研究方法

表皮水疱症や水疱を生ずる遺伝性皮膚疾患患者の臨床症状や家族歴を詳しく聴取した。次に皮膚生検を行い、電顕、各種基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検索を行い、基底膜における微細構造、発現蛋白の変化を観察した。さらに、患者本人、ならびに家族から採血を行い、genomic DNA を抽出し、PCR、heteroduplex、direct sequencing 法などを用いて DNA 解析を行なった。

倫理面への配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解（インフォームドコンセント）に係わる状況を鑑がみ、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行した。

C. 研究結果

栄養障害型表皮水疱症の2家系のVII型コラーゲン遺伝子を検索した。この結果、G1815R、G1595R、Q2827Xの新規の変異を確認した。また、G1815R、あるいはG1595Rが一方のアリルにある場合、水疱はなく爪の変形のみを来すことを明らかにした（論文1）。キンドラー症候群は、水疱や皮膚の萎縮を示し、表皮水疱症と類似する臨床症状を来す。今回、表皮水疱症と長い間誤診されたキンドラー症候群の症例を報告した。また、VII型コラーゲンの遺伝子の変異は詳細に検討したが、検出されなかった（論文2）。軽症型の葉状魚鱗癬の原因遺伝子はいまだ不明な部分が多いが、今回トランスグルタミナーゼ1遺伝子における新しいミスセンス変異L204Qを見出した（論文3）。水疱性魚鱗癬様紅皮症の原因遺伝子はケラチン1や10遺伝子であるが、出生時には水疱を混ざるため表皮水疱症との鑑別が重要となる。ケラチン10遺伝子のhelix initiation motifの7番目のアミノ酸がロイシンからバリンに変わる変異を同定した（論文4）

D. 考 察

VII型コラーゲンのグリシン置換変異では、優性障害型表皮水疱症を生ずる一方、爪甲の変形のみを起すことがあることを示した(論文1)。キンドラー症候群でのVII型コラーゲンの変異で起こるものではないことを明らかにした。さらに、本症と表皮水疱症の鑑別の重要性を強調した(論文2)。トランスグルタミナーゼのノンセンス変異の組み合わせでは重症の葉状魚鱗癬が起こるが、ミスセンス変異では比較的軽症な本症が発症する可能性が示唆された(論文3)。水疱性魚鱗癬様紅皮症では現在まで多くの変異が報告されているが、今回さらに helix initiation motif におこる新しい変異を同定した(論文4)。

E. 結 論

今回行なった検索では、表皮水疱症患者の遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、さらに多くの症例の解析が必要と思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文1)

Sato-Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, Shimizu H. Toenail Dystrophy With COL7A1 Glycine Substitution Mutations Segregates as an Autosomal Dominant Trait in 2 Families With Dystrophic Epidermolysis Bullosa. Arch Dermatol 138: 269-71, 2002.

論文2)

Yasukawa K, Sato-Matsumura KC, McMillan J, Tsuchiya K, Shimizu H. Exclusion of COL7A1 mutation in Kindler syndrome. J Am Acad Dermatol 46: 447-50, 2002.

論文 3)

Akiyama M, Takizawa Y, Suzuki Y, Ishiko A, Matsuo I, Shimizu H. Compound heterozygous TGM1 mutations including a novel missense mutation L204Q in a mild form of lamellar ichthyosis. J Invest Dermatol, 992-5, 2001.

論文 4)

Ishiko A, Akiyama M, Takizawa Y, Nishikawa T, Shimizu Y, Shimizu H. A novel leucine to valine mutation in residue 7 of the helix initiation motif of keratin10 leads to bullous congenital ichthyosiform erythroderma. J Invest Dermatol 116, 991-2,2001.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

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

表皮水疱症関連遺伝子の生体表皮での発現とノックアウトマウスの作成に関する研究

澤村大輔

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 助教授

研究要旨

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称であり、表皮真皮境界部に存在する種々の蛋白の遺伝子異常で発症する。今回の研究では、それらの遺伝子を生体表皮細胞に導入した場合、それらの遺伝子から蛋白が正常に発現されること、また表皮細胞内に導入した遺伝子の発現を調節することが可能であることを示した。さらに、将来の遺伝子治療モデルとして、それらの遺伝子が欠損するノックアウト動物の作成を行った。

澤村大輔

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学 助教授

A. 目 的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、ケラチン5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$ インテグリン、ラミニン5、VII型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。しかしながら、現在までに根本的な治療法はなく、患者の細胞に原因となる遺伝子を導入する遺伝子治療が根本的な治療法として期待されている。

そこで、今回の研究では、1) 実際にそれらの遺伝子を生体表皮細胞に導入した場合、それらの遺伝子から蛋白が発現されるかどうか検討した。また、2) 表皮細胞内に導入した遺伝子の発現を調節することが可能かどうかも検討した。

さらに、3) 将来の遺伝子治療モデルとして、それらの遺伝子が欠損するノックアウト動物の作成を試みた。

B. 研究方法

1) 生体表皮での発現

VII 型コラーゲンの cDNA 遺伝子を生体表皮細胞で挿入された遺伝子を強力に発現するベクターである pCY4B に組み込んだ。そのベクターを naked DNA 投与方法にてラットの表皮細胞に導入した。導入部位から、経時的に皮膚を採取し、VII 型コラーゲンの抗体で免疫染色を行った。

2) 発現の調節

マウスのメタロチオネイン遺伝子とラットのビタミン D3 水解酵素遺伝子プロモーターをクローニングした。その下流に β -galactosidase 遺伝子を組み、その融合遺伝子をラット表皮細胞に導入した。メタロチオネインのプロモーターに関しては、その誘導剤である亜鉛を全身あるいは局所投与を行った。さらに、ビタミン D3 水解酵素遺伝子に関しては、導入部位に種々の濃度のビタミン D3 軟膏を外用した。48 時間後に、皮膚を採取し、表皮細胞中の β -galactosidase の活性を測定した。

3) 表皮水疱症モデル作成

表皮水疱症の原因遺伝子の 1 つとして、180kD 類天疱瘡抗原が知られている。今回、その遺伝子が欠損するモデル作成のため、本マウス遺伝子のノックアウトマウスの作成を開始した。

C. 研究結果

1) 体表皮での発現

VII 型コラーゲンの発現は 24 時間後に生体表皮細胞に認められた。また、48 時間後には表皮真皮境界領域に線状に認められる部位もあった。

2) 発現の調節

亜鉛の全身投与では β -galactosidase の活性は 2~3 倍、局所投与では 6~8 倍に増加した。また、ビタミン D3 の外用実験では、ビタミン D3 の濃度依存的に β -galactosidase の活性の上昇が見られた。

3) 表皮水疱症モデルの作成

マウス 180kD 類天疱瘡抗原遺伝子のエクソン 1 から 4 を含む、ゲノムクローンの単離に成功した。また、その部のすべて塩基配列を決定した。さらに、本遺伝子の null マウス作成のため、そのクローンのエクソン 1 に遺伝子を破壊するようにネオマイシン遺伝子を組み込んだ。

D. 考 察

1) 生体表皮での発現

VII 型コラーゲン遺伝子は、3 万塩基対と非常に長く、エクソンも 118 と数が多い。そこで、遺伝子治療に用いられる遺伝子は、イントロンを除いた cDNA となる。その VII 型コラーゲンの cDNA を実際に生体の表皮細胞に naked DNA 法を用いて導入し、VII 型コラーゲンが産生されるのかを検討した。その結果、VII 型コラーゲンの発現が表皮に認められ、cDNA も問題ないことが示された。さらに、1 週間後に表皮真皮基底膜領域に VII 型コラーゲンが線状に認められたことは、導入した遺伝子から産生された VII 型コラーゲンが正常の機能を有することが示唆された (論文 1)

2) 発現の調節

生体では状況に合わせて、各遺伝子の発現がコントロールされている。遺伝子治療を行う場合、導入された遺伝子の発現を自由に調節できることが理想である。表皮細胞は生体の最外層に存在するため、外用剤の影響を受けやすい。今回、表皮細胞に遺伝子を導入して、プロモーターの誘導剤を全身性あるいは局所性に加えたが、誘導の効率は局所性のほうが良好であった。また、誘導外用剤の濃度を変えることにより、発現の調節が可能であった。以上の結果は、表皮細胞に導入した遺伝子の発現をコントロールできる可能性が示唆された (論文 2)

3) モデルの作成

180kD 類天疱瘡抗原のエクソン1にネオマイシン遺伝子を挿入することにより、その欠損モデルを作成する。現在、ターゲティング・ベクターの作成まで終了した。今後、ノックアウトマウス作成の操作をすすめる。

E. 結 論

今回の研究では、表皮水疱症の原因遺伝子を生体表皮細胞に導入した場合、それらの遺伝子から蛋白が発現されることが示された。また、2) 表皮細胞内に導入した遺伝子の発現を調節することが可能であることが示めされた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文1)

Sawamura D, Yasukawa K, Kodama K, Yokota K, Sato-Matsumura KC, Tanaka T, Shimizu H. The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product. J Invest Dermatol, in press.

論文2)

Itai K, Sawamura D, Meng X, Hashimoto I. Keratinocyte gene therapy: inducible promoters and in vivo control of transgene expression. Clin Exp Dermatol, 26, 531-5, 2001.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

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

表皮水疱症の原因蛋白の合成に関する研究

古市泰宏 (ジーンケア研究所 代表取締役社長 研究職)

研究要旨

VII型コラーゲン遺伝子の変異により生ずる栄養障害型では、VII型コラーゲンを外用してから表皮シートを移植する蛋白補充療法の臨床応用が期待されている。今回の研究では、VII型コラーゲンの合成のため、VII型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に導入し、VII型コラーゲンの持続産生株の作成を行なった。その細胞株から発現されるVII型コラーゲンは、栄養障害型表皮水疱症の蛋白補充療法の使用可能と考えられた。さらに、この研究により、患者の表皮細胞にVII型コラーゲン遺伝子を導入する遺伝子治療の可能性も示唆された。

表皮水疱症の原因蛋白の合成に関する研究

古市泰宏 (ジーンケア研究所 代表取締役社長 研究職)

A. 目 的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、VII型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなったが、現在までに根本的な治療法はない。患者から表皮角化細胞を採取し、その細胞を培養し培養表皮シートを作成し、患者の病変部に植皮をする自己培養表皮移植療法が、当教室を含む2・3の施設で最近試みられ、ある程度の効果がみられている。しかし、自家組織の移植のため、原因遺伝子によりコードされているタンパクの発現は、やはり欠損しているままであることが問題点となっている。そこで、原因となる蛋白を外用してから表皮シートを移植する蛋白補充療法の臨床応用が期待されている。

本研究ではVII型コラーゲンの遺伝子を表皮細胞に導入し、持続的に培養液に

その蛋白を分泌する細胞株の作成を試みた。

B. 研究方法

現在、成熟 VII 型コラーゲンを商業ベースで得ることはできなく、組織中に発現される VII 型コラーゲンは微量である。我々はすでに VII 型コラーゲン遺伝子を作成し、細菌でのリコンビナント蛋白の作成を試みたが、可溶性の VII 型コラーゲンを単離出来なかった。そこで、今回は、ヒトの表皮細胞株で試みた。VII 型コラーゲンの cDNA は 9kb と長いため、2 段階方式である Flp-in system を採用した。即ち、表皮細胞株である HaCaT 細胞に pFRT/lacZeo ベクターを導入することにより、HaCaT 細胞のゲノムに Flp recombinase の標的となる FRT 部位を挿入した。尚、選択の指標は、抗生剤ゼオシンと lacZ の発現である。次に、VII 型コラーゲン cDNA を発現ベクターである pcDNA5/FRT に組み込み、Flp recombinase の発現ベクターを co-transfection し、ヒグロマイシンにて選択を行なった。抗生剤耐性 HaCaT 細胞を選択し、そのなかから VII 型コラーゲン発現株をクローニングした。

C. 研究結果

最終的に、ヒグロマイシン耐性であった HaCaT 細胞を 10 株選択した。VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 にて免疫染色を行なった所、2 株の細胞に陽性所見が認められた。さらに、それらの上清の免疫プロットで、LH7.2 が 290kD の蛋白を認識していた。尚、それらの細胞に形態的な以上は認められなかった。

D. 考 察

コラーゲンは、一般に 3 本鎖の高次構造を構成するため、親水性と疎水性の部分複雑に入組んでいる。さらに、VII 型コラーゲンはそのコラーゲンのなかでも最長のコラーゲンである。我々は、リコンビナント VII 型コラーゲンを得るために、細菌にその遺伝子を組み込んだが、発現する細菌は死滅し、出来

た VII 型コラーゲンも可溶性にならなかった。次に、ヒトの表皮細胞で挿入された遺伝子を強力に発現する pCY4B に VII 型コラーゲンの cDNA を組み込み、ヒト表皮細胞に導入したが、発現細胞は増殖しなかった。

今回それらの失敗を基礎として、2 段階方式である Flp-in system を採用した。尚、プロモーターは、表皮細胞では中等度の CMV プロモーターを使用した。その結果、VII 型コラーゲンの持続発現株の作成に成功した。尚、VII 型コラーゲンの発現株に形態的な異常はなかった。

つぎに、その上清から大量の VII 型コラーゲンを分離できれば、本遺伝子が原因となる栄養障害型表皮水疱症の蛋白補充療法が臨床応用が実現する。また、本法と同様の手技で患者培養表皮に本遺伝子を組み込む遺伝子治療が可能になると考えられた。

さらに、その VII 型コラーゲンは、本蛋白に対する自己免疫性疾患である、後天性表皮水疱症や水疱性全身性エリテマトーデスの診断や治療効果の判定に有用と思われた。

E. 結 論

VII 型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に導入することにより、VII 型コラーゲンの持続発現株を作成した。発現される VII 型コラーゲンは、本遺伝子が原因である栄養障害型表皮水疱症の蛋白補充療法の使用可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究発表や論文投稿に関して準備中である。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

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

表皮水疱症の治療用 VII 型コラーゲン遺伝子の作成と NC-1 ドメインの機能の解析に関する研究

増永卓司 (コーセー基盤技術研究所 研究員)

研究要旨

VII 型コラーゲンは栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子である。その蛋白補充療法や遺伝子治療のための、VII 型コラーゲン cDNA の全長を作成した。また、作成過程で見出された 27bp の挿入が alternative splicing から生ずることを確認した。その alternative splicing は、VII 型コラーゲンの NC1 ドメインに創傷治癒に関連するような機能を付加していることが示唆された。

増永卓司 (コーセー基盤技術研究所 研究員)

A. 目 的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年、表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする種々の遺伝子変異により本症が発症することが明らかとなった。VII 型コラーゲン遺伝子は、栄養障害型の原因遺伝子でありが、遺伝子が 3 万塩基対と非常に長く、エクソンも 118 と数が多い。そこで本症の、蛋白補充療法や遺伝子治療に用いられる遺伝子は、イントロンを除いた cDNA となる。

本研究グループではすでに VII 型コラーゲン cDNA の全長を表皮細胞のライブラリーからクローニングしている。今回、その遺伝子産物やその遺伝子そのものを最終的に患者に用いることを予定しているため、すべての塩基配列について塩基配列を確認した。VII 型コラーゲンは N 末端側の非コラーゲン領域 NC-1 domain (145kDa) と C 末端側の非コラーゲン領域 NC-2 domain (34kDa) とが、Gly-X-Y の繰り返し構造からなるコラーゲン領域 collagenous domain (145kDa) を挟む構造をとる。その NC-1 ドメインは各種のコラーゲンやラミ