

20030832

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

**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15年度 総括・分担研究報告書

平成16(2004)年3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
主任研究者 清水 宏(北海道大学)

II. 分担研究報告

1. 有棘細胞癌が多発した栄養障害型表皮水疱症患者への
自己培養表皮シート移植術の試み …………… 7
主任研究者 清水 宏(北海道大学)
2. VII 型コラーゲンと 180kD 類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの
作成に関する研究 ……………10
分担研究者 澤村大輔(北海道大学)
3. VII 型コラーゲン蛋白の単離と表皮細胞への
VII 型コラーゲンの遺伝子の導入 ……………13
分担研究者 古市泰宏(株式会社ジーンケア研究所)
4. 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究 ……………16
分担研究者 増永卓司(株式会社コーセイ研究本部)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……19

IV. 研究成果の刊行物・別冊……25

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業)

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科学分野 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さらに明らかになり、蛋白補充療法や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。蛋白補充療法で用いる合成VII型コラーゲンを分離生成する方法を確立し、臨床応用への準備が整った。さらに、将来の遺伝子治療に関して、基礎的研究を完了することができた。

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。本症の原因は、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、医療レベルの進歩から、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。患者表皮角化細胞を培養し培養表皮シートを作成し、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が、自家組織の移植のため、やはり原因蛋白が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、180kD類天疱瘡抗原、ラミニン5β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本研究の目的である。

B 研究方法

1) 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究(増永)

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する。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する。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。

2) VII 型コラーゲンと 180kD 類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成に関する研究(澤村)

始めに、マウスの VII 型コラーゲンと 180kD 類天疱瘡抗原の遺伝子のクローニングを行い、相同組み換え用のコンストラクトを作成した。そのコンストラクトを ES 細胞に導入して、通常の方法で相同組み換えを起こした ES 細胞を抗生剤のマーカで選択した。さらに、相同組み換え ES 細胞をプラストシストにマイクロインジェクションして、キメラを作成した。キメラを正常のマウスと好配することにより、F1ヘテロ接合体を得る。そのヘテロ接合体どうじの交配で、ホモ接合のノックアウトマウスを得る。

3) VII 型コラーゲン蛋白の単離と表皮細胞への VII 型コラーゲンの遺伝子の導入(古市)

VII 型コラーゲンの cDNA は 9kb と長いため、Flp-in system を採用した。始めに、NIH3T3 細胞と 293 細胞に pFRT/lacZeo ベクターを導入した。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、細胞に導入して VII 型コラーゲン発現細胞を選択した。VII 型コラーゲンの発現は蛍光抗体法とウエスタンブロットで確認した。

VII 型コラーゲンの cDNA をレトロウイルスベクターに組み込み gag,env,pol 遺伝子を導入してあるプロデュース細胞に導入した。出来たウイルスを添加して表皮細胞での VII 型コラーゲンの発現を蛍光抗体法とウエスタンブロットで確認した。さらに、導入効率をあげるため、レトロネクチンを加える試み、また通常 env ではなく水疱性口内炎ウイルス:VSV-G エンベロープタンパクを使用する方法も試みた。

4) 有棘細胞癌が多発した栄養障害型表皮水疱症患者への自己培養表皮シート移植術の試み(清水)

12歳、男児の表皮水疱症患者を対象とした。生下時より全身に、水疱、びらんが多発しており、検査の結果 recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) と診断されている。蛍光抗体法で表皮真皮境界部に VII 型コラーゲンの沈着を少ないながら認めたことより、non-Hallopeau-Siemens 亜型と診断されている。今回、左足の外側に腫瘍が出現、生検にて有棘細胞癌と診断され、拡大切除目的で入院。さらに将来、蛋白補充自己培養表皮シート移植術の試みる前段階として、自己培養表皮シート移植術を行った。尚、表皮細胞の培養は、Japan Tissue Engineering との共同研究である。

倫理面への配慮

本研究は、インフォームド・コンセントに基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面に

よる個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、そのことで何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

C 研究結果

1) 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究(増永)

爪の変形を遺伝的に有する米国家系の VII 型コラーゲンの遺伝子解析を行った。その結果、患者に G2028R という、グリシン置換変異を見いだした。同じ変異をもつ日本人家系と台湾人家系が文献的に見つかった。米国人症例では爪の変化のみであったが、日本人では epidermolysis bullosa pruriginosa、台湾人では通常の優性栄養障害型であった。それらの家系の DNA の VII 型コラーゲンを解析したが、エクソン、エクソン-イントロン境界部、プロモーターの塩基に塩基の相違はなかった。次に、生下時から、全身の水疱びらんを示し、かつ、胃の幽門閉鎖をみとめた 2 症例の検索を行った。形態学的には、表皮細胞内に水疱が起こり、プレクチンの発現が見られなかった。次に、それらの症例でもプレクチン遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、一例目には Q305X と 1344G→A、2 症例目には Q2538X と R1189X のヘテロ接合変異を検出した。

2) VII 型コラーゲンと 180kD 類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成に関する研究(澤村)

VII 型コラーゲン遺伝子を破壊した F1 ヘテロ接合体に皮膚に症状はなかった。ヘテロ接合体同士をかけ合わせたところ、ホモ接合体のマウスが生まれ、全身に水疱が発生していた。多くのマウスは 1 週間以内に死亡した。病理組織学的には、ヒトの栄養障害型表皮と同様に表皮下水疱を認め、VII 型コラーゲンの抗体を用いて免疫抗体法でも VII 型コラーゲンの発現は皆無であった。また、電顕的にも、VII 型コラーゲンを構成成分とするアンカリングフィブリルの形成不全があり、水疱は真皮内に存在し、まさに患者と同様の所見をしめした。尚、VII 型コラーゲンのノックアウトマウスの研究は、米国のトーマスジェファソン医科大学のウイット教授との共同研究である。

180kD 類天疱瘡抗原については、当教室独自に進めている研究であるが、すでに F1 ヘテロ接合体を確立しているが、ヒトの同様に無症状であり、今後のヘテロ同士の交配によるホモ接合体がどのような臨床症状を示すが興味深い。

3) VII 型コラーゲン蛋白の単離と表皮細胞への VII 型コラーゲンの遺伝子の導入(古市)

我々が以前確立した、表皮細胞株である HaCaT 細胞と比較して、線維芽細胞株である NIH3T3 細胞は同様の VII 型コラーゲンの分泌能を有していた。また、腎臓由来でよく合成蛋白産生細胞としてよく使用されている 293 細胞は HaCaT 細胞や NIH3T3 細胞より、有意に

VII型コラーゲンの産生能が高かった。VII型コラーゲンのサイズには3細胞で変わりはなかった。

通常のレトロウイルス法で導入した場合、導入効率は非常に低かった。レトロネクチンは細胞とウイルス粒子を結び付ける作用があるが、その使用によってやく5倍効率が上がった。また、水疱性口内炎ウイルス:VSV-Gエンベロープ遺伝子を導入することにより、ウイルス粒子の濃縮が可能になり効率が上昇した。

4) 有棘細胞癌が多発した栄養障害型表皮水疱症患者への自己培養表皮シート移植術の試み(清水)

拡大切除した腫瘍は組織学的に有棘細胞癌であった。尚、この後、さらに異なる部位での有棘細胞癌の発症が認められた。また、培養表皮シートを患者の数カ所の潰瘍部に移植した結果、一部のシートはそのまま正着し著効した部分もあったが、培養表皮は生着しなかったが明らかに上皮化が促進された部位、ほとんど効果なかった部位が観察された。

D 考察

1) 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究(増永)

近年、VII型コラーゲンのグリシンにおいて、片方のアリルの変異と接合すると劣性栄養障害型となるが、単独では爪の変化のみおこすグリシン置換が明らかにされた。今回、米国人に見いだされたG2028R変異はまさにこのグリシン置換と考えられた。しかし、同じG2028R変異でも、日本人ではepidermolysis bullosa pruriginosa、台湾人では通常の優性栄養障害型であり、VII型コラーゲンの基本的な部分での塩基配列に差異はみとめられなかった。VII型コラーゲンのそれ以外の部位や他の遺伝子も、栄養障害型表皮水疱症の症状に関与していることが推測された。

表皮水疱症において、プレクチンの変異では通常筋ジストロフィーを伴う単純型、アルファ6やベータ4インテグリンの変異で幽門閉鎖を伴う接合部型が発症する。今回経験した2症例は、プレクチンの変異で起こる幽門閉鎖を伴う単純型で、表皮水疱症の新病型と考えた。

2) VII型コラーゲンと180kD類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成に関する研究(澤村)

今回の研究では患者病変部に欠損する蛋白を補充する蛋白補充療法や患者の細胞に原因となる遺伝子を導入する遺伝子治療の開発を行うために、ジーンターゲティングの手法で、ノックアウトマウスの作成を試みている。VII型コラーゲンのノックアウトマウスは、ホモ接合体がヒトの劣性栄養障害型表皮水疱症と極めて類似する臨床症状を示し、治療実験に使用可能と考えられた。また、180kD類天疱瘡抗原遺伝子では、ヘテロ接合体の交配を早期に行い、治療実験基礎を作ることが急がれる。

3) VII型コラーゲン蛋白の単離と表皮細胞へのVII型コラーゲンの遺伝子の導入(古市)

NIH3T3 細胞は HaCaT 細胞と同様の VII 型コラーゲン分泌能を有すること、293細胞は HaCaT 細胞や NIH3T3 細胞より有意に VII 型コラーゲンの産生能が高いことが確かめられた。今後、293細胞を用いることにより、大量の VII 型コラーゲンの分離し、近日中に臨床に応用することを計画している。

始めに、通常のレトロウイルス法で導入した所、導入効率は著しく低かった。しかし、レトロネクチンや VSV-G エンベロープタンパクをもちいることにより、濃縮したウイルスを使用することにより、さらに効率を高められた。この方法で、我々は、患者表皮細胞への遺伝子導入にも成功しているので、臨床応用も、将来可能になると推測している。

4) 有棘細胞癌が多発した栄養障害型表皮水疱症患者への自己培養表皮シート移植術の試み

表皮水疱症に発生する有棘細胞癌は、癬痕に発生する有棘細胞癌と類似し、組織学的には高分化であるのにも関わらず、進展が早く、転移を起こしやすく、予後不良である。自験例では HS 型ではないのに早期に有棘細胞癌が発生したことは、臨床症状の程度に関わらず、本症において有棘細胞癌の発生を注意深く観察する必要性が再確認された。

今回の結果でも、自家培養表皮シートの移植では移植した表皮には欠損蛋白は発現されないのが問題であり、欠損する蛋白を補充すれば移植表皮は正着する可能性が示唆された。

E 結論

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さらに明らかになり、蛋白補充療法や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。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は臨床応用準備は整ったと考えられた。また、表皮細胞への遺伝子導入する研究に関しても、レトロウイルスを使用することにより、可能であることが示唆された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H 知的財産の出願・登録状況

整理番号:PSH-0001, 受付番号:50300060047, 出願番号:特願 2003-8130「組換えヒト VII 型コラーゲンを含有する創傷治癒促進剤」発明者、特許出願人:清水 宏、澤村大輔)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

有棘細胞癌が多発した栄養障害型表皮水疱症患者への自己培養表皮シート移植術の試み
主任研究者 清水宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨

今回、有棘細胞癌が多発した、12歳の栄養障害型患者を経験した。蛍光抗体法で表皮真皮境界部にVII型コラーゲンの発現が認められるnon-Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症にも関わらず、有棘細胞癌が多発した。臨床症状の程度に関係なく、有棘細胞癌の発生を注意深く観察する必要性が明らかにされた。さらに、将来その患者への蛋白補充療法の施行を想定し、第一段階として、培養表皮シート移植術を試みた。結果は、自家培養表皮シートの移植では移植した表皮には欠損蛋白が発現されないことが問題となることが明らかになり、欠損する蛋白を補充する治療法の開発が急務であると結論した。

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。その治療法としては、自己培養表皮シート移植術がある程度効果があることが示されているが、有効な治療法はいまだ確立されていない状態である。本研究の一つの目的は、VII型コラーゲンを合成し、自己培養表皮シート移植術の際に、欠損するVII型コラーゲンを補充する方法を開発し、臨床応用することにある。

今回は、その第一段階として、実際に北大の栄養障害型表皮水疱症患者に、培養表皮シート移植術を試み、将来の蛋白補充療法の準備を行った。

B 研究方法

症例:患者:12歳、男児。

主訴:全身の水疱、びらん、潰瘍。

家族歴:特記すべきこと無し。

現病歴:生下時より全身に、水疱、びらんが多発しており、検査の結果recessive dystrophic

epidermolysis bullosa(RDEB)と診断された。尚、VII型コラーゲンの遺伝子変異は、E2858XとG2576Rのヘテロ接合体であった。また、蛍光抗体法で表皮真皮境界部にVII型コラーゲンの沈着を少ないながら認めたことより、non- Hallopeau-Siemens型と診断されている。手指や足趾の癒合があり、1990.11.14 足趾に全層植皮術、1994.5.20 両手指分層植皮術、1999.3.11 内視鏡下食道拡張術を受けている。今回、左足の外側に腫瘍が出現、生検にて有棘細胞癌と診断され、拡大切除目的で入院。さらに将来、蛋白補充自己培養表皮シート移植術の試みる前段階として、自己培養表皮シート移植術を行った。

現症：左足外側に直径1cm の乳頭状に角化する盛り上がる腫瘍ある。その他、全身の所々に、水疱、びらんが多発も認める。水疱が治癒した後は、瘢痕、委縮、miliumを形成し、手指や足趾の癒合がある。

培養表皮シート移植術：予め皮膚を切除して、表皮細胞を採取し、表皮細胞を培養した。表皮細胞の培養方法は、グリーンの方法に従い、3T3-J2細胞のフィーダーとして使用している。尚、表皮細胞の培養は、Japan Tissue Engineeringとの共同研究である。

倫理面への配慮

本研究は、インフォームド・コンセントに基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面による個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、そのことで何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

C 研究結果

拡大切除した腫瘍は組織学的に有棘細胞癌であった。尚、この後、さらに異なる部位での有棘細胞癌の発症が認められた。また、培養表皮シートを患者の数カ所の潰瘍部に移植した結果、一部のシートはそのまま正着し著効した部分もあったが、培養表皮は生着しなかったが明らかに上皮化が促進された部位、ほとんど効果なかった部位が観察された。

D 考察

表皮水疱症に有棘細胞癌を合併することはよく知られている。表皮水疱症に発生する有棘細胞癌は、瘢痕に発生する有棘細胞癌と類似し、組織学的には高分化であるのにも関わらず、進展が早く、転移を起しやすく、予後不良である。劣性栄養障害型は VII 型コラーゲンの発現がまったくない Hallopeau-Siemens (HS)と減弱ながら認める non- Hallopeau-Siemens (nHS)があるが、60歳までにHS型では約3/4に、nHS型では1/4に有棘細胞癌が発生する。我々が過去93例の有棘細胞癌が多発した表皮水疱症例を詳細に調べたところ、20歳以下での多発は6例であった。12歳という年齢は、そのなかでもっとも若年齢であった。自験例では HS 型

ではないのに早期に有棘細胞癌が発生したことは、臨床症状の程度に関わらず、本症において有棘細胞癌の発生を注意深く観察する必要性が再確認された(論文1)。

自家培養表皮シート移植の有効性は、直接効果と間接効果が想定されている。直接効果は、移植した表皮がそのまま生着する場合であり、間接効果は移植表皮から分泌される IL-1、IL-6、TGF- α などのサイトカインが上皮化を促進する効果である。今回の結果でも、そのまま正着し著効した部分、明らかに上皮化が促進された部位、ほとんど効果なかった部位が観察され、その仮説を裏付けるものであった。やはり、自家培養表皮シートの移植では移植した表皮には欠損蛋白は発現されないのが問題であり、欠損する蛋白を補充すれば移植表皮は正着する可能性が示唆された。

E 結論

表皮水疱症において、臨床症状の程度に関わらず、有棘細胞癌の発生を注意深く観察する必要性が再確認された。また、自家培養表皮シートの移植では移植した表皮には欠損蛋白が発現されないのが問題であり、欠損する蛋白を補充する治療法の確立が急務であることも推測された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. 論文1 Kawasaki H, Sawamura D, Iwao F, Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, Shimizu H. Squamous cell carcinoma developed in a 12-year-old boy with non-Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Br J Dermatol, 148, 1047-50, 2003.

その他、投稿準備中。

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

VII型コラーゲンと180kD 類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成に関する研究
分担研究者 澤村大輔
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 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。さらに、将来の遺伝子治療モデルとして、VII型コラーゲンと180kD 類天疱瘡抗原遺伝子が欠損するノックアウト動物の作成を行った。VII型コラーゲンのノックアウトマウスは、ヒトの劣性栄養障害型表皮水疱症と極めて類似する臨床症状を示していた。このVII型コラーゲンのノックアウトマウスは治療実験に非常に有用であると考えられた。また、180kD 類天疱瘡抗原遺伝子では、ヘテロ接合体の確立まで進行した。

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、患者病変部に欠損する蛋白を補充する蛋白補充療法や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。しかしながら、それらの治療法の確立にはモデル動物の作成が不可欠である。

今回の研究では、表皮水疱症のモデルとして、VII型コラーゲンノックアウトマウスと180kD 類天疱瘡抗原のノックアウトマウスの作成を試みた。

B 研究方法

始めに、マウスのVII型コラーゲンと180kD 類天疱瘡抗原の遺伝子のクローニングを行い、相同組み換え用のコンストラクトを作成した。このコンストラクトはVII型コラーゲンの11537から24092までの領域と、180kD 類天疱瘡抗原遺伝子の389から8962までの領域を含む。また、ネオマイシン遺伝子は、VII型コラーゲンの場合は遺伝子の前1/3の部位に、180kD 類天疱瘡抗原遺伝子の場合は遺伝子の最初の部位に、挿入されている。そのコンストラクトをES細胞に導入して、通常の方法で相同組み換えを起こしたES細胞を抗生剤のマーカーで選択し

た。さらに、相同組み換え ES 細胞をブラストシストにマイクロインジェクションして、キメラを作成した。キメラを正常のマウスと好配することにより、F1ヘテロ接合体を得る。そのヘテロ接合体どうじの交配で、ホモ接合のノックアウトマウスを得る。

C 研究結果

VII 型コラーゲンのノックアウトマウスの研究は、米国のトーマスジェファーソン医科大学のウイト教授との共同研究である。上述した方法により、VII 型コラーゲン遺伝子を破壊した F1ヘテロ接合体を得たが、皮膚に症状はなかった。次に、そのヘテロ接合体同士をかけ合わせたところ、1/4の確率で、水疱が生ずるマウスが生まれた。それらのマウスは、体の所々に水疱を認め、前後肢には血疱が生じた。なお、ミルクを飲む行動が弱く、多くのマウスは1週間以内に死亡した。病理組織学的には、ヒトの栄養障害型表皮と同様に表皮下水疱を認め、VII 型コラーゲンの抗体を用いて免疫抗体法でも VII 型コラーゲンの発現は皆無であった。また、電顕的にも、VII 型コラーゲンを構成成分とするアンカリングフィブリルの形成不全があり、水疱は真皮内に存在し、まさに患者と同様の所見をしめした。

180kD 類天疱瘡抗原については、当教室独自に進めている研究であるが、すでに F1ヘテロ接合体を確立しているが、ヒトの同様に無症状であり、今後のヘテロ同士の交配によるホモ接合体がどのような臨床症状を示すが興味深い。

D 考察

遺伝子治療を含め、新しい治療法の開発にはモデル動物の存在が不可欠である。今回の研究では患者病変部に欠損する蛋白を補充する蛋白補充療法や患者の細胞に原因となる遺伝子を導入する遺伝子治療の開発を行うために、ジーンターゲティングの手法で、ノックアウトマウスの作成を試みている。VII 型コラーゲンのノックアウトマウスは、米国の研究グループとの共同研究であるが、ホモ接合体がヒトの劣性栄養障害型表皮水疱症と極めて類似する臨床症状を示している。他の、遺伝子ではヒトでは疾患に至るが、マウスでは無症状であったり、逆にマウスでは症状があるが、ヒトではなにも起こらないという現象も見受けられる。VII 型コラーゲンのノックアウトマウスは治療実験に使用可能と考えられた。しかしながら、1週間しか生存できないのが問題で、現在よりもより3'側で翻訳が中止するような変異を入れるノックアウトマウスの作成が将来必要になると思われた。また、180kD 類天疱瘡抗原遺伝子では、ヘテロ接合体の交配を早期に行い、治療実験基礎を作ることが急がれる。

E 結論

今回の研究では、表皮真皮に存在する表皮水疱症の原因蛋白は、ヒトやマウスの両種において、表皮真皮の接合に重要な役割を演じていることが明にされた。また、VII 型コラーゲンのモデル動物が確立され、表皮水疱症の遺伝子治療実験に貢献すると確信した。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

投稿準備中

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

VII 型コラーゲン蛋白の単離と表皮細胞への VII 型コラーゲンの遺伝子の導入
分担研究者 古市泰宏
株式会社ジーンケア研究所 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や VII 型コラーゲン遺伝子を導入する遺伝子治療の臨床応用が期待されている。今回の研究では、合成 VII 型コラーゲンの産生細胞として、HaCaT 細胞や NIH3T3 細胞と比較して、293細胞が VII 型コラーゲンの産生能が一番高いことが明らかになった。また、VII 型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に導入するには、通常のレトロウイルス法では効率が著しく低かった。それにレトロネクチンや VSV-G エンベロープタンパクを加えることにより、導入効率が臨床応用可能な程度上昇することを確かめた。

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が、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。

我々は、VII 型コラーゲン遺伝子を表皮細胞培養株である HaCaT 細胞に導入し、その上清から VII 型コラーゲンを得ていたが、その収量が著しく低かった。そこで、今回の研究では、蛋白産生によく使用される NIH3T3 細胞と 293細胞に VII 型コラーゲン遺伝子を加えて、どの程度収量があがるかを検討した。また、我々は *in vivo* の方法で表皮細胞への遺伝子導入に成功しているが、導入効率が低いのが問題となっていた。そこで、今回は、*in vitro* レトロウイルスを用いた導入法の確立を試みた。

B 研究方法

VII型コラーゲンのcDNAは9kbと長いため、Flp-in systemを採用した。始めに、NIH3T3細胞と293細胞にpFRT/lacZeoベクターを導入することにより、それらの細胞のゲノムにFlp recombinaseの標的となるFRT部位を挿入した。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、VII型コラーゲン発現細胞を選択した。VII型コラーゲンの発現はウエスタンブロットで定量した。

VII型コラーゲンのcDNAをレトロウイルスベクターであるpDON-A1ベクターに組み込み、gag,env,pol遺伝子を導入してあるプロデュース細胞に導入した。出来たウイルスを添加して表皮細胞でのVII型コラーゲンの発現を蛍光抗体法とウエスタンブロットで確認した。さらに、導入効率をあげるため、レトロネクチンを加える試み、また通常のenvではなく水疱性口内炎ウイルス:VSV-Gエンベロープタンパクを使用する方法も試みた。

C 研究結果

最初に蛍光抗体で検討してみた。我々が以前確立した、表皮細胞株であるHaCaT細胞と比較して、線維芽細胞株であるNIH3T3細胞は同様のVII型コラーゲンの分泌能を有していた。また、腎臓由来でよく合成蛋白産生細胞としてよく使用されている293細胞はHaCaT細胞やNIH3T3細胞より、有意にVII型コラーゲンの産生能が高かった。さらに、ウエスタンブロットでの比較でも、293細胞の産生能が高いのが明かで、VII型コラーゲンのサイズには3細胞で変わりはなかった。

つぎに、レトロウイルスでの表皮細胞への遺伝子導入の結果であるが、単に通常の方法で導入した場合、導入効率は非常に低かった。レトロネクチンは細胞とウイルス粒子を結び付ける作用があるが、その使用によってやく5倍効率があがった。また、水疱性口内炎ウイルス:VSV-Gエンベロープ遺伝子を導入することにより、ウイルス粒子の超遠心が可能になり、ウイルスの濃縮が可能になる。ウイルスを20倍濃縮すると、効率は5倍に、さらに50倍に濃縮すると10倍に効率があがった。

D 考察

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やならなかった。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。そこで我々は、2段階方式であるFlp-in systemを採用し、HaCaT細胞にstableにVII型コラーゲン遺伝子を導入することにより、持続発現株の作成に成功している。しかし、培養上清中に発現されるVII型コラーゲン量は少ない。そこで、今回は、表皮細胞株であるHaCaT細胞に加え、線維芽細胞株であるNIH3T3細胞、腎臓由来でよく合成蛋白産生細胞としてよく使用されている293細胞を試してみた。結

果は、NIH3T3 細胞は HaCaT 細胞と同様の分泌能を有すること、293細胞は HaCaT 細胞や NIH3T3 細胞より有意に VII 型コラーゲンの産生能が高いことが、蛍光抗体法とウエスタンブロット法で確かめられた。我々は、すでに、VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 を使用した、アフィニティークロマトグラフィーにて VII 型コラーゲンの単離に成功しているので、さらに293細胞を用いることにより、大量の VII 型コラーゲンの分離し、近日中に臨床に応用することを計画している。

VII 型コラーゲン遺伝子は cDNA の状態でも9kb と、レトロウイルスで導入できるサイズの限界である。また、表皮細胞へのレトロウイルスの親和性は比較的低いと考えられている。始めに、通常の方法で導入した所、導入効率は著しく低かった。そこで、レトロネクチンを試みた。レトロネクチンは、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン (Type III repeat, 8, 9, 10)、ヘパリン結合ドメイン II (Type III repeat, 12, 13, 14) および CSI 部位 (III CS の N 末端 25 残基) を含む、分子量約 63,000 (574 アミノ酸残基) の組換えタンパク質である。レトロウイルスベクターを介した哺乳動物細胞への遺伝子導入時に培養器の底面に RetroNectin をコートしておくことによって、その導入効率を飛躍的に向上させることが可能となる。我々の結果でも、効率の増加が認められた。また、水疱性口内炎ウイルス:VSV-G エンベロープタンパクをもちいることにより、濃縮したウイルスを使用することにより、さらに効率を高められた。この方法で、我々は、患者表皮細胞への遺伝子導入にも成功しているので、臨床応用も、将来可能になると推測している。

E 結論

VII 型コラーゲン蛋白を合成する細胞として、293細胞は有用であった。VII 型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に導入するには、通常のリトロウイルス法に、レトロネクチン VSV-G エンベロープタンパクを使用する方法を加える必要があることを明らかにした。

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。

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告

表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究
分担研究者 増永卓司
株式会社コーセー研究本部 主任研究員

研究要旨

今回、優性遺伝形式に爪の変形を生じた米国家系の VII 型コラーゲン遺伝子変異検索を行い、グリシン置換 G2028R を検出した。同様の変異を持つ、epidermolysis bullosa pruriginosa を示した日本人、通常の優性栄養障害型であった台湾人の VII 型コラーゲンを解析したが、エクソン、エクソン-イントロン境界部、プロモーターの塩基は、3 症例とも同じであった。VII 型コラーゲンのそれ以外の部位や他の遺伝子も、栄養障害型表皮水疱症の症状に関与していることが推測された。また、全身の水疱びらんを示し、かつ、胃の幽門閉鎖をみとめた表皮水疱症 2 症例の検索を行い、プレクチン遺伝子に変異を検出した。プレクチンの変異では通常筋ジストロフィーを伴う単純型、アルファ6やベータ4インテグリンの変異で幽門閉鎖を伴う接合部型が発症する。今回経験した 2 症例は、プレクチンの変異で起こる幽門閉鎖を伴う単純型で、表皮水疱症の新病型と考えた。

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、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開発には、患者さんの診断を確実にしなければならない。そこで、表皮水疱症患者の遺伝子変異の検索を行なった。さらに、実際にその変異が病態にどのように影響しているかを、変異遺伝子を細胞に導入して検討した。

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する。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する。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、インフォームド・コンセントに基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面による個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、そのことで何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

C 研究結果

- 1) 米国から依頼のあった爪の変形を遺伝的に有する家系の VII 型コラーゲンの遺伝子解析を行った。その家系では、常染色体性優性の形式で爪の変形が遺伝している。その結果、患者に G2028R という、グリシン置換変異を見いだした。過去の文献を詳しく調べたところ、同じ変異をもつ日本人家系と台湾人家系があった。米国人症例では爪の変化のみであったが、日本人では epidermolysis bullosa pruriginosa、台湾人では通常の優性栄養障害型であった。それらの家系の DNA を当教室に御送り頂きその VII 型コラーゲンを解析したが、エクソン、エクソン-イントロン境界部、プロモーターの塩基は、3症例とも同じであった(論文1)。
- 2) 今回、生下時から、全身の水疱びらんを示し、かつ、胃の幽門閉鎖をみとめた2症例の検索を行った。まず、皮膚を生検して VII 型コラーゲンの原因となる蛋白の発現を検討した。その結果、電顕的に表皮細胞内に水疱が起こり、プレクチンの発現が見られなかった。次に、プレクチン遺伝子に変異があることが予想されたので、それらの症例でもプレクチン遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、一例目には Q305X と 1344G→A、2症例目には Q2538X と R1189X のヘテロ接合変異を検出した。尚、1例めの 1344G→A はアミノ酸の置換を起こさないスプライス部位変異であったため、エクソントラップ実験を行い、mRNA レベルでの異常を確認した。

D 考察

VII 型コラーゲンのコラーゲンドメインに起こるグリシン置換は、そのみで優性栄養障害型、片方アレルの変異を接合して劣性栄養障害型、病的ではない、の3型が知られていた。しかしながら、最近、片方のアレルの接合すると劣性栄養障害型となるが、単独では爪の変化のみおこすグリシン置換が明らかにされた。今回、米国人に見いだされた G2028R 変異はまさにこのグリシン置換と考えられた。しかし、同じ G2028R 変異でも、日本人では epidermolysis bullosa