

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の  
開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年3月

主任研究者 清水 宏

## 目次

### I. 総括研究報告

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究

主任研究者 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

主任研究者 清水 宏 (北海道大学)

2. リコンビナントVII型コラーゲンに関する研究

分担研究者 澤村大輔 (北海道大学)

3. VII型コラーゲンの遺伝子の皮膚細胞への導入に関する研究

分担研究者 古市泰宏 (株式会社ジーンケア研究所)

4. 造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究

分担研究者 阿部理一郎（北海道大学）

5. 表皮および毛包上皮の幹細胞部位（ハシルジ）における表皮水疱症関連蛋白の発現とギャップ結合に関する研究

分担研究者 秋山真志（北海道大学）

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊

# I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

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科学分野 教授

研究要旨

本研究の対象疾患は、軽微な外力により皮膚に容易に水疱や潰瘍を生じ、患者の QOL が著しく障害される重症型表皮水疱症である。今回、VII 型コラーゲンの蛋白補充療法と骨髄移植で本症を治療するという画期的治療法の研究を行った。その結果、新たに表皮水疱症の臨床型と遺伝子型の関連をさらに明らかにできた。また、VII 型コラーゲンの補充療法の有用性を培養細胞と実験動物で確認した。さらに、表皮水疱症への骨髄移植療法の可能性が示唆された

## A 研究目的

本研究の対象疾患は、軽微な外力により皮膚に容易に水疱や潰瘍を生じ、患者の QOL が著しく障害される重症型表皮水疱症である。近年の分子生物学的研究の進歩で、多くの重症型表皮水疱症の原因遺伝子が VII 型コラーゲン遺伝子であり、患者皮膚ではその蛋白が皆無であることが明らかにされた。しかしながら、現在有効な治療法はなく、画期的治療法の開発が急務である。清水宏を代表とする研究グループは、平成 13-15 年に厚労省科学研究費の補助を受け、構造蛋白である VII 型コラーゲンを補充する治療の基礎的研究を行った。その結果、本蛋白を合成単離する方法を確立し、その合成 VII 型コラーゲンが皮膚の創傷治癒を促進することを明らかにしている。

この過去 3 年の研究成果を基盤として、1) 早期に臨床応用可能な、合成 VII 型コラーゲン蛋白を補充するという新しい発想に基づく治療法を実現し、2) さらに骨髄移植を行い、移植された骨髄幹細胞より分化した皮膚細胞から VII 型コラーゲンを供給させるという新しい観点から再生治療も検討し、難治性皮膚疾患

である表皮水疱症の画期的治療法を確立するのが本研究の目的である。

## B 研究方法

### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

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) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

VII 型コラーゲンの cDNA は 9kb と長いため、Flp-in system を採用し、293細胞に VII 型コラーゲン遺伝子を導入した。上清に分泌されるリコンビナント VII 型コラーゲンは 30% 硫酸塩析

後、VII型コラーゲンのモノクローナル抗体であるLH7.2のアフィニティカラム処理、最後にゲル濾過にて精製を行った。次に、細胞の遊走能への効果を測定した。即ち、リコンビナントVII型コラーゲンをPBSに溶解し、細胞培養用のdishに添加した。その後、そのdishに培養表皮細胞と線維芽細胞を播種し、プラスチックピペットチップで細胞をはがした。その後、その細胞をはがした部位への細胞の遊走を測定した。

### 3) VII型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

2種類の優性栄養障害型の変異をVII型コラーゲン遺伝子に加えた。一つは、本症に一番多く見つかっているG2034Rで、もう一つはこの変異があるとVII型コラーゲンが表皮細胞に蓄積するようになるG2037Eである。これらの変異をin vitro mutagenesisの技術にて導入した。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。導入効率をあげるため、ウイルスをレトロネクチンを添加してから加える試み、また通常のenvではなく水疱性口内炎ウイルス：



VSV-G エンベロープ蛋白発現ベクターを同時に導入する使用する方法を用いている。VII型コラーゲンの発現は、VII型コラーゲンのモノクローナル抗体であるLH7.2で確かめた。

#### 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

ヒト胎児皮膚を経時的に採取し、毛包のバルジが顕著である発生過程の毛包における hemidesmosome および基底膜蛋白の発現を蛍光抗体法、免疫組織化学染色にて観察し、各発生段階での経時変化を検討した。さらに、ヒト皮膚の表皮細胞等のギャップ結合の重要構成蛋白であるコネキシン 26、コネキシン 43 の発現を、免疫蛍光抗体法を用いて、経時的に採取したヒト胎児皮膚を対象として観察した。さらに、超微形態学的にギャップ結合の形成を観察し、その形成頻度も評価した。この際、特に、発生過程の毛包の著明なバルジ幹細胞を重点的に検討した。

#### 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究

表皮構造タンパク欠損マウス (VII型コラーゲンノックアウトマウス) に正常マウスから骨髄移植を行うことで、ドナー骨髄

由来の表皮細胞が出現するかを確認した。具体的には、骨髄移植されたマウス皮膚を経時的に採取し、ドナー骨髄からの表皮細胞が認められるか、ドナー抗原を用いて確認を行った。さらにヒト末梢血細胞を用いて、in vitro において、様々な培養条件（添加物、共培養など）を行い、末梢血中に表皮細胞へ分化しうる細胞が存在するか検討した。

#### 6) 倫理面に対する配慮

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 Consent）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。また、すべての研究は実施期間での倫理委員会の承認を得ている。

## C 研究結果

### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

症例 1 は 2 歳の女兒。出生 1 ヶ月後から掌蹠にびらんと水疱が出現。次第に腋窩、手首、手背、単徑に網目状の色素沈着と疣状の角化性丘疹を伴うようになった。

症例 2 は 30 歳男性。症例 1 の父親。幼少時より掌蹠に水疱の新生を繰り返す。しだいに網目状の色素沈着が間擦部より生じ、顔面を除くほぼ全身に広がった。掌蹠に疣状の角化性丘疹と部分的な角質肥厚を認める。電顕的検索：患者皮膚生検標本での水疱形成部位は、症例 1、2 ともに、基底細胞内であり、単純型に一致する所見であった。基底細胞内ではケラチン線維の偏位やメラノゾームの密集像が観察された。また一部のデスモゾームにはケラチン線維との結合不全が認められた。ケラチン 5 遺伝子の変異検索を行った。その結果、症例 1、症例 2 共に P25L 変異が同定された。

## 2) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

VII 型コラーゲンを添加した dish に培養した表皮細胞と、対照であるアルブミンを添加した dish に培養した群での比較を行った。培養当初から、VII 型コラーゲンを添加した dish では、対照

と比較して、チップで細胞をはがした部への培養表皮細胞の早期遊走を認めた。最終的には、約40%の遊走の亢進が認められた。VII型コラーゲンを添加したdishに培養した線維芽細胞と、対照であるアルブミンを添加したdishに培養した群での比較を行った。培養当初から、VII型コラーゲンを添加したdishでは、対照と比較して、チップで細胞をはがした部への培養線維芽細胞の早期遊走を軽度認めた。最終的には、約20%の遊走の亢進が認められた。

### 3) VII型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

優性栄養障害型は、優性のコラーゲン領域のグリシン置換変異で発症するので、導入する遺伝子は、変異したもの、正常と変異を1:1の割合で混合したもの、対照として正常のみ、とした。G2034Rの変異では、変異のみ、変異/正常、正常の3グループの間に、VII型コラーゲンの分布や量に見られなかった。G2037Eの変異では、変異のみ、変異/正常の表皮細胞に、対照と比較して明らかにVII型コラーゲンの貯留が認められた。さらに、細胞への貯留をスコア化して貯留度を比較すると、変異

のみの方が、変異/正常のものと比較して有意に貯留度が高かった。

#### 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

ヒト胎生期、発達過程にある毛包において、バルジ幹細胞部位では常に、基底膜領域に hemidesmosome 蛋白の発現が維持されていた。ギャップ結合の構成蛋白であるコネキシン 26、コネキシン 43 の発現は、ヒト胎児の発生過程での毛包において、発生早期から認められ、コネキシン 43 の発現はバルジ幹細胞にも見られた。また、コネキシン 43 を発現している幹細胞は、超微形態的に明らかなギャップ結合の形成を示した。

#### 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究：

骨髄移植されたマウス皮膚に、ドナー由来の表皮細胞が存在することを確認した。あわせて、骨髄由来表皮細胞の遊走に付いても検討を行い、ある種のケモカインが強力な遊走因子であることを見出した。末梢血細胞と表皮細胞との共培養で、末梢血細胞の一部は表皮細胞のマーカー (keratin 10 など) を発現す

ることを確認した。加えて、骨髄造血幹細胞のみを用いた同様の検討で、非常に高い割合で表皮細胞に分化することを確認した。

## D 考察

### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

EBS-MP は現在まで7家系で遺伝子解析が行なわれているが、ケラチン5 遺伝子の P25L の変異のみが同定されている。よってこのケラチン5 遺伝子の25番目のプロリンの異常が色素沈着や角化病変など EBS-MP の特徴的な臨床所見をひき起こしていると考えられる。この結果を裏付けるように今回遺伝子解析を行った EBS-MP1 家系2症例にも同じ変異が検出された。

25番目のプロリンはケラチン5分子の頭部であるN末端VIドメイン内に位置している。この部位はデスモゾーム構成分子であるデスモプラキンのC末端と直接結合する部位である事が知られている。最近このデスモゾーム構成分子のデスモプラキンやデスモグレインの遺伝子変異にてデスモゾームとケラチン

線維との結合不全が生じると掌蹠に角化異常が生じることが判明してきた。

我々は EBS-MP における角化異常もこのデスモゾームとケラチンの結合不全が関与するのではないかという仮説のもと電顕的検索を行なった。従来報告されてきた表皮内での水疱形成、メラノゾームの密集、ケラチン線維の偏位などの EBS-MP に特徴的な所見の他に、一部のデスモゾームではケラチン線維との結合不全が観察された。よってケラチン 5 の 25 番目のプロリンはケラチン線維とデスモゾームの結合に関与しており、その異常が水疱形成のみならず角化異常をもひき起こしていることが明らかになった。

## 2) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

VII 型コラーゲンは、表皮真皮境界部に存在するアンカリングフィブリルの構成成分である。VII 型コラーゲンの遺伝子に変異があると栄養障害型表皮水疱症が発症し、また自己抗体が産生されると自己免疫水疱症である後天性表皮水疱症が発症する。このような事実より VII 型コラーゲンは表皮と真皮の接着に最

も重要な分子の一つであることが明らかになった。さらに、それらの疾患では、通常の熱傷などの潰瘍と比較して、創傷治癒が著名に遷延することが知られている。

創傷治癒を促進する作用がある transforming growth factor (TGF)- $\beta$ が VII 型コラーゲン発現を強力に増強すること、治癒過程にある潰瘍底にある新生真皮に大量の VII 型コラーゲンが検出されることから、VII 型コラーゲンが創傷治癒に必須のものであることが証明された。このような背景から、表皮細胞が遊走する潰瘍面に VII 型コラーゲンが豊富に存在すると上皮化が容易におこり、創傷治癒が促進されると推測される。

今回の実験では、合成 VII 型コラーゲンの dish に添加することにより、著明に表皮細胞と線維芽細胞の遊走が有意に上昇することが確かめられた。この結果は、VII 型コラーゲンの創傷治癒促進作用は、それらの細胞の遊走を亢進することによると考えられた。表皮細胞が線維芽細胞に比較して、より遊走の亢進を示したことについては、今回の実験だけでは不明で、今後の問題と考えられた。一方これらの実験は、我々の合成した VII 型コラーゲンが、本来の機能を兼ね備えたリコンビナント蛋白である



ことも示していた。

創傷治癒は近年特に注目される分野で、皮膚科領域では、褥瘡、下腿潰瘍、手術創と深い関連がある。治療対象となる患者数が多く、臨床的に使用されている薬剤も複数あるが、あまり有効なものがないため、新しいより有効な薬剤の出現が望まれている。リコンビナントVII型コラーゲンも、劣性栄養障害型表皮水疱症患者はもちろん、難治性潰瘍の治療剤としての可能性も示唆された。

### 3) VII型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

VII型コラーゲン遺伝子のサイズは大きく、cDNAにしても9kBである。その遺伝子を培養表皮細胞に導入する場合、通常よく用いられている、リポ製剤でVII型コラーゲンの発現プラスミドを導入すると、その効率は3%にも満たない。一方、VII型コラーゲン遺伝子の発現実験にはプラスミドを導入してから抗生剤で選択して、偶然遺伝子が細胞のゲノムに挿入された細胞を選択することになるが、その効率も $10^7$ 分の1と低く、多くのサンプルを試すには不適當である。

レトロウイルスでの表皮細胞への遺伝子導入があるが、単に通常の方法で導入した場合、導入効率は非常に低い。我々は、レトロネクチン使用によって約5倍効率があげ、さらに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、10倍効率を上げることができた。今回はこのシステムを使用して、色々な変異を持つVII型コラーゲン遺伝子を導入した。

優性栄養障害型の変異の多くはコラーゲン領域にあるグリシン置換である。そのグリシン置換は、その他、他方のアリルと共同して、劣性栄養障害型を生じたり、また全く変異とならないものもある。例えば、VII型コラーゲンの片方のアリルに早期終止コドンがあり、そのアリルから全くVII型コラーゲンが産生されなくても、病気は発症しない。従って、優性型のグリシン置換はドミナント-ネガティブに他方のアリルからの正常のVII型コラーゲンの機能を障害していることになる。

VII型コラーゲンのコラーゲン領域には、コラーゲンのgly-X-Yの繰り返しがとぎれるところが多数ある。そこで、優性型の変異を持つVII型コラーゲンと正常のVII型コラーゲンが2つあることが問題で、変異を持つ物のみであれば疾患を生じない可能

もあると考えた。そこで、変異のみ、変異/正常、正常のみ、の遺伝子を表皮細胞に導入して VII 型コラーゲンの分布や量を検討した。G2034R では、形態学的に異常を検出出来なかったが、この変異があると VII 型コラーゲンが表皮細胞に蓄積するようになる G2037E では、表皮細胞への貯留を培養細胞でも認めた。さらに、さらに、細胞への貯留をスコア一化して貯留度を比較すると、変異のみの方が、変異/正常のものと比較して有意に貯留度が高かった。この結果は、優性栄養障害型がドミナントネガティブ効果に加え、変異 VII 型コラーゲンの構造異常による影響もあることが示唆された。

#### 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

今回の研究で、バルジ幹細胞部位では常に、基底膜領域に hemidesmosome 蛋白の発現が維持されていた。この結果から、hemidesmosome を介した幹細胞と細胞外基質の相互作用が表皮の幹細胞であるバルジ幹細胞の性質の維持に重要な役割を果たしていることが推察された。今後の表皮水疱症の遺伝子治療においては、この hemidesmosome を介した幹細胞と細胞外基質の相互作用

を健全に保った状態での治療が必要と考えられる。従来、表皮の幹細胞は個別に存在し、ギャップ結合を介した細胞相互の情報伝達は行なわれないと考えられてきた。しかし、今回の研究結果から、表皮の幹細胞もギャップ結合を介した情報伝達を行なっており、それが、幹細胞プールとしてのバルジの維持に働いている可能性が示唆された。このギャップ結合を介した情報伝達、物質伝達の存在が、遺伝子治療においてどのような意味を持つのか、今後の検討が必要である。

#### 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究：

本年度の研究で、実際に骨髄由来表皮細胞の存在を確認した。また培養系において、末梢血細胞から表皮細胞に分化しうることを明らかにした。今後は骨髄由来表皮細胞の分化を促進させる条件の検索を行う。現在、表皮細胞への分化能をもつ骨髄由来細胞を表皮へ遊走させるケモカインに重点をおき検討している。上記の効果を持つケモカインを同定できれば、より臨床応用に近づくと考える。