

E 結語

今回の研究で、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。

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

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

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

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、今後も遺伝子診断を継続する。

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、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

患者

症例1：2歳の女児。出生1ヵ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、単径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2：30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。(図 2)

遺伝子検索：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。(図 3)

D 考察

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 V1 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。

E 結論

今回、EBS-MP の変異検索と電顕的観察を報告した。ケラチン線維とデスモゾームの結合不全が角化異常をひき起こす詳細なメカニズムについてははまだ明らかではなく、詳しく検討する

必用があると思われた。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文 1)

Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Sato-Matsumura KC, LaDuca J, Lee JYY, Masunaga T, Shimizu H. The G2028R glycine substitution mutation in *COL7A1* leads to marked inter-familial clinical heterogeneity in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci*, 34, 195-200, 2004.

論文 2)

Yasukawa K, Sawamura D, Akiyama M, Motoda N, Shimizu H. Keratotic lesions in epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *J Am Acad Dermatol*,

52, 172-173, 2005.

論文 3)

Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, McMillan JR, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, Shimizu H. Mutations in the Plectin Gene (*PLEC1*) Cause a Novel Clinical Subtype, Epidermolysis Bullosa Simplex Associated with Pyloric Atresia. J Mol Diagn, in press.

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

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、今後も遺伝子診断を継続する。

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、現在有効な治療法はなく、画期的治療法の開発が急務である。そこで我々は、表皮水疱症で欠損する蛋白と直接補充する治療の開発を行っている。今回、特に、VII 型コラーゲン遺伝子の変異でおこる、劣性栄養障害型に注目した。実際に VII 型コラーゲン遺伝子を培養細胞に導入し、その上清から得られるリコンビナント VII 型コラーゲンの機能を検討した。

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、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。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。得られた VII 型コラーゲンは SDS-PAGE 電気泳動にてシングルバンドになる。

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 100mg/l の濃度に 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、70%の密度になった時点で、200 μ l 用の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。対象はアルブミンを添加した。

C 研究成果

培養表皮細胞への効果

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。

線維芽細胞への効果

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。

D 考察

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)- β 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起こり、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り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。

E 結論

我々の合成した VII 型コラーゲンの表皮細胞と線維芽細胞遊走能亢進作用から、そのリコンビナント VII 型コラーゲンが本来の機能をもったものであることが、示された。また、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。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文の投稿準備中。

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金

(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 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型コラーゲン遺伝子を患者の表皮細胞や線維芽細胞に導入してから、それらの細胞を移植する遺伝子治療の臨床応用が期待されている。今回、我々が確立したレトロウイルス法にて、優性栄養障害型の遺伝子変異を持つVII型コラーゲンの遺伝子の導入を行った。その結果、正常と変異の遺伝子の組み合わせで導入した場合、VII型コラーゲンの発現の異常を生じた。さらに、変異のみの遺伝子ではさらにその異常が増強した。以上から、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。

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。しかしながら、現在までに根本的な治療法はなく、皮膚の細胞にVII型コラーゲンの遺伝子を導入する遺伝子治療の開発が期待されている。我々は、通常のリトロウイルス法に、リトロネクチンとVSV-Gエンベロープタンパクを使用する方法を開発することにより、VII型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に高率に導入する方法を確立している。

今回我々はその方法を用いて、優性栄養障害型に見られる変異を表皮細胞に導入することにより、優性障害型の変異がVII型コラーゲンの構築傷害するメカニズムの解明を試みた。

B 研究方法

1) VII 型コラーゲンの変異の導入

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。

2) VII 型コラーゲン遺伝子の導入

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 エンベロープタンパク発現ベクターを同時に導入する使用する方法をもちいている。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。

D 考察

VII 型コラーゲン遺伝子のサイズは大きく、cDNA にしても 9 kB 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物質で選択して、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、他方のアシルと共同して、劣性栄養障害型を生じたり、また全く変異とならないも