

厚生労働科学研究費補助金

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19(2007)年3月

主任研究者 清水 宏

目次

I 班員構成	1
II 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	3
主任研究者 清水 宏（北海道大学）	
III 分担研究報告	
XVII 型コラーゲン / BP180 ノックアウトマウスの作製	1 1
主任研究者 清水 宏（北海道大学）	
リコンビナント VII 型コラーゲンを用いた治療法の開発	1 4
分担研究者 澤村大輔（弘前大学）	
遺伝子導入真皮線維芽細胞の有用性	1 7
分担研究者 澤村大輔（弘前大学）	
毛包上皮の幹細胞を標的とした遺伝子導入、毛包再構成システムに関する研究	2 1
分担研究者 秋山真志（北海道大学）	
造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究	2 5
分担研究者 阿部理一郎（北海道大学）	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	2 7
V 研究成果の刊行物・別刷	3 3

I 班員構成

I 班員構成

研究者名	研究実施場所	職名	主な研究分担
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	研究の総括、症例の集積、臨床表現の解析など
分担研究者 澤村 大輔	弘前大学医学部皮膚科	教授	遺伝子解析、遺伝子導入、動物実験など
古市 泰宏	(株) ジーンケア研究所	代表取締役研究所長	蛋白の精製、イムノプロットなど
秋山 真志	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	助教授	免疫組織化学、電顕検索、蛋白の解析など
阿部理一郎	北海道大学 北海道大学病院皮膚科	講師	骨髄移植、細胞の培養、mRNAの解析、遺伝子の構築など

II 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

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。本研究は、早期に臨床応用可能な、リコンビナント 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、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目的で行われた。その結果、VII 型コラーゲンの患者への投与から蛋白補充療法の有用性を確認した。さらに、表皮幹細胞と造血幹細胞の研究から、表皮水疱症への骨髄移植療法の可能性が示唆された。

分担研究者：

澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授

古市泰宏 (株) ジーンケア研究所
代表取締役研究所長

秋山真志 北海道大学大学院医学研究科
皮膚科学分野助教授

阿部理一郎 北海道大学北海道大学病院
皮膚科講師

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。

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

B. 研究方法

1) XVII 型コラーゲン / BP180 ノックアウトマウスに関する研究
COL17 genomic DNA の exon2 遺伝子を改

変したターゲッティングベクターを作製し、129/SvEv マウス ES 細胞へトランスフェクションした。正確に相同変換された ES 細胞へ C57BL/6 マウス blastocyst へ導入しキメラマウスを作製した。次にキメラマウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配することでヘテロマウスを作製し、十分に C57BL/6 マウスへ戻し交配したのちヘテロマウス同士を交配した。理論上、生まれてくる仔マウスの4分の1がKOマウスとなった。

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。精製したリコンビナント VII 型コラーゲンの安全性については、すでに動物実験で確認し、ラット皮膚に投与すると基底膜にそって沈着することを確認している。今回、16 歳男性の栄養障害型表皮水疱症患者で、12 歳時から有棘細胞癌が発生している患者の潰瘍部にヒトリコンビナント VII 型コラーゲンを局注した。1回 30 μ g で、総投与回数は 8 回とし

た。対症は、生理食塩を投与した。

3) 遺伝子導入真皮線維芽細胞の有用性に関する研究

全く VII 型コラーゲンを発現していない Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症患者から得られた、培養表皮細胞と線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて正常な VII 型コラーゲン遺伝子を導入した。表皮細胞は、マイトマイシン C で処理した 3T3 細胞をフィーダーとしてシート状に、線維芽細胞は、コラーゲンスポンジに培養した。それを用いて、遺伝子導入表皮細胞と無処置線維芽細胞、無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞の人工皮膚を作成し、無免疫動物にそれらを移植した。コントロールとして無処置表皮細胞および無処置線維芽細胞の皮膚とした。無免疫動物に人工皮膚移植後、3 週、6 週、9 週で構築された皮膚を生検し、VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 を用いて蛍光抗体法にて検討した。構築された皮膚を生検し、電顕学的に基底膜での anchoring fibrils の形成を検討した。

4) 毛包上皮の幹細胞に関する研究

ラット髭毛包のバルジ部位より、microdissection 法により、毛包上皮の幹細胞と考えられる細胞を採取し、培養した。それらの培養細胞について、細胞動態的検討を加えた。培養ラットバルジ由来毛包上皮の幹細胞から、mRNA を抽出し、Agilent 社製の Rat oligo microarray を用いて、幹細胞と考えられる培養細胞の遺伝子発現パターンを検討した。上記にて、得られたラット毛包上皮幹細胞に対して、GFP、あるいは、LacZ の reporter gene をコードするレトロウイルスベクターを遺伝子導入した。

それら、導入遺伝子を有する毛包上皮幹細胞を、未処理のラット毛乳頭細胞を混合して、SCID マウスの背部に移植した。その後、経時的に、移植部皮膚を採取し、組織学的に観察すると同時に、導入遺伝子の発現状況を検討した。

5) 造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究

皮膚再生の現象の場である、創傷治癒過程の皮膚における細胞遊走因子のスクリーニングを行い、候補となる遊走因子を数種同定した。同定したそれぞれの遊走因子において、骨髄幹細胞への遊走惹起能を *in vitro* で検討した。さらに皮膚創傷部位への骨髄由来表皮細胞遊走への、それぞれの遊走因子の影響を検討した。骨髄由来表皮細胞増加の、皮膚再生過程に対する寄与を解析するため、上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することによる、創傷治癒への影響を検討した。

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した。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った。遺伝子解析、同種培養真皮とヒトリコンビナント VII 型コラーゲン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。また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予定であった。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た。

C. 研究成果

1) XVII 型コラーゲン / BP180 ノックアウトマウスに関する研究

新生児 COL17 KO マウス皮膚は外的刺激によって容易に剥離可能であり、手足には水疱形成を認めた。組織学的に水疱は表皮下に生じ、COL17 の発現は消失していた。多くの KO マウスは生後 2～4 週以内に死亡したが、一部は 6 ヶ月以上成長した。これらの成長した KO マウスでは、肛囲のびらん、潰瘍化や指先の爪甲脱落を伴う癬痕化、脱毛や白髪など多くの特徴的な所見を多く呈していた。尚、明らかな歯牙のエナメル質形成不全症は認めなかった。

2) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

ヒトリコンビナント VII 型コラーゲン投与によって、局所の紅斑などのアレルギー反応は認められなかった。さらに、アナフィラキシーショックや薬疹などの全身の副作用は認められず、今回の第 1 の目的である、その安全性は確認された。また、効果であるが、臨床的には、生食を投与した対照部と比較して、投与部位で潰瘍の縮小が認められた。さらに、処置部の生検を行い、ヒト VII 型コラーゲンに対する抗体で VII 型コラーゲンの発現を検討したが、局注部で明らかな VII 型コラーゲンの増加は確認できなかった。

3) 遺伝子導入真皮線維芽細胞の有用性に関する研究

全く VII 型コラーゲンを発現していない Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症患者の表皮細胞と線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて正常な VII 型コラーゲン遺伝子を導入した。導入したそれぞれの細胞は、ウェスタンブロットにて、同等量の VII 型コラーゲンの発現を確認した。作成した人工皮膚を無免疫動物に移植し、構築された皮膚を生検し、VII 型コラーゲンの発現を蛍光抗体にて検討した所、3 週、6 週、9 週いずれの週においても、無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞を組み合わせ人工皮膚移植による皮膚が最も基底膜に強く VII 型コラーゲンが強く沈着していることが認められた (図 1 A)。さらに、基底膜に沈着した VII 型コラーゲンを数値化すると、有意に無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞の人工皮膚移植において、VII 型コラーゲンの発現が高いことが確認された。人工皮膚の移植により構築された皮膚において、anchoring fibrils の形成を確認するために、電顕を施行した所、遺伝子導入表皮細胞の皮膚においても、遺伝子導入線維芽細胞の皮膚においても、anchoring fibrils の形成を確認した。また、無処置の皮膚においては anchoring fibrils が形成されなかった。

4) 毛包上皮の幹細胞に関する研究

ラット髭毛包のバルジ部位より、microdissection 法により得られた細胞からの培養系は、それ以外の外毛根鞘由来の細胞、表皮由来の細胞と比べて、特に増殖能が優れており、有為に、colony forming unit 数が多かった。これらのデータは、このバルジ由来の細胞集団が、毛包上皮の幹細胞に富む集団であることを裏付けていた。

培養ラットバルジ由来毛包上皮の幹細胞からの mRNA を、Agilent 社製の Rat oligo microarray を用いて、検討した結果、procollagen type II, alpha I, insulin-like growth factor-binding protein, fibroblast growth factor, matrix metalloproteinase 3 等の遺伝子の発現が上昇していた。遺伝子を導入された毛包上皮幹細胞から、移植後、3 週間で、毛包付属器の再構成が観察された。再構成毛包は、ほぼ、正常な形態を有し、それらの上皮成分には、導入された reporter gene の発現が確認された。その後、経時的に、reporter gene の発現を観察した結果、再生毛包上皮には、移植後、6 ヶ月後にも、導入遺伝子の発現が確認された。

5) 造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究

現在までの検討で、皮膚創傷部位に特異的に発現し、かつ骨髄幹細胞の遊走を特異的に誘導する、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。この同定因子は生体内においても骨髄由来表皮細胞の数を増加させた。上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することにより、創傷治癒が有意に促進した。

D. 考察

1) XVII 型コラーゲン / BP180 ノックアウトマウスに関する研究

これまで多くの表皮水疱症モデルマウスが作製されてきたが、COL17 K0 マウス作製に成功した報告はなく本研究が初めてである。表皮水疱症モデルマウスの多くはヒトの臨床形に比較し重症化する傾向があり、大人になるまで成長するものは殆ど無い。

COL17 KO マウスもその多くが生後間もなく死亡するが、3ヶ月以上生存する個体も存在し必ずしも致命的ではなかったため、今後、表皮水疱症の病態解明と新規治療法開発に非常に有用であると思われる。COL17 遺伝子異常によって生じる非ヘルリツツ接合部型表皮水疱症患者では、表皮下水疱のほか歯牙の異常や脱毛などの所見を特徴とする。COL17 KO マウスでは、臨床的に確認可能な歯牙の異常は見られなかったが、水疱形成のほか毛髪の異常も伴っており、COL17 がこれらの病態に如何に関与しているかなども含め、今後更なる表皮水疱症の病態解明が期待できる。

表皮水疱症患者の治療法として遺伝子治療や欠損タンパク補充療法など種々の方法が施行されているが、未だ疾患モデル動物の治療に成功した報告はない。この理由として、表皮水疱症の治療自体が困難である以外に適切なモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。COL17 KO マウスの一部は長期生存可能なため、種々の治療実験の対象として今後大いに期待できる。

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)- β が VII 型コラーゲン発現を強力に増強することから、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。

前年の実験では、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。また、安全性のチェックのため、大量のリコンビナント VII 型コラーゲンをマウスに投与し、我々が精製したリコンビナント VII 型コラーゲンには毒性がないことを確認した。

今回、そのリコンビナント VII 型コラーゲンを初めてヒトに投与し、ヒトでの安全性を検討した。その結果、局所と全身の副作用はなく、その安全性を確認した。また、投与部位に潰瘍縮小作用が認められた。その効果は、局注した VII 型コラーゲンの作用と考えられたが、蛍光抗体で明らかな蛋白の増加がなかったのは、やはり、VII 型コラーゲンが基底膜に十分供給されていなかったと考えられた。今後、VII 型コラーゲンの量を増やしたり、局注した VII 型コラーゲンが皮膚に長く留まる工夫がさらに必要と考えた。また、今回の患者では異常ながら VII 型コラーゲンの発現が基底膜に

認められるので、VII型コラーゲンの発現がまったくない症例でも検討することが必要と思われた。

3) 遺伝子導入真皮線維芽細胞の有用性に関する研究

生体のヒトの皮膚においては、表皮細胞の方が線維芽細胞よりもVII型コラーゲンの発現量が多く、基底膜に存在するVII型コラーゲンの多くは、表皮細胞から供給されていることは知られている。そこで、線維芽細胞が表皮細胞と同じVII型コラーゲンの量を発現することが出来れば、どちらの細胞がより効果的に基底膜にVII型コラーゲンを供給できるかを比較検討できることになる。そこで、今回、レトロウィルスを用いて表皮細胞および線維芽細胞にVII型コラーゲン遺伝子の導入により、同等の遺伝子を導入することを可能とし、同等のVII型コラーゲン蛋白を発現させた。その細胞を用いて、人工皮膚を作成、基底膜に沈着したVII型コラーゲン蛋白の発現を解析した。

今回は、実際の遺伝子治療を想定して、劣性栄養障害型表皮水疱症患者から得られた表皮細胞と線維芽細胞に我々が確立したレトロウイルス法にて、VII型コラーゲンの遺伝子を導入した。劣性栄養障害型は全くVII型コラーゲンの発現がない重症型のHallopeau-Siemens型と少しは発現のある非Hallopeau-Siemens型に分類されるが、今回はHallopeau-Siemens型患者の細胞を使用した。その細胞を用いて、遺伝子導入を行い、人工皮膚を作成したところ、無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞を組み合わせた人工皮膚が最も基底膜に強くVII型コラーゲンが強く沈着していることが認

められた。よって、線維芽細胞に遺伝子を導入した方がより基底膜にVII型コラーゲンを供給出来ることが判明した。また、電子顕微鏡学的所見においても、Anchoring fibrilsの形成を確認し、正常の皮膚と同等の基底膜を作成できることが可能であることが示唆された。このように、培養が容易である線維芽細胞を標的細胞として遺伝子治療に用いることが、より効果的な治療法に成り得ることが考えられる。

4) 毛包上皮の幹細胞に関する研究

今回、我々が分離、培養した毛包上皮の幹細胞集団において発現が上昇していた遺伝子は、procollagen type II, alpha I, insulin-like growth factor-binding protein, fibroblast growth factor, matrix metalloproteinase 3, ornithine decarboxylase 1等であった。これらの中で、procollagen type II, alpha I, insulin-like growth factor-binding protein, fibroblast growth factorは、以前から幹細胞において発現の上昇が報告されている遺伝子であり、本研究で、我々が分離、培養した上皮細胞集団が、毛包上皮の幹細胞に富む集団であったことを裏付けるデータであった。

本研究の結果から、毛包上皮の幹細胞から再構成された皮膚においては、毛包付属器のみならず、毛包周囲の毛包間表皮にも導入遺伝子の発現が見られた。また、導入された遺伝子について、細胞移植後半年以上経過しても、その発現が認められた。このように長期に渡り、導入遺伝子の発現が見られた理由は、本研究での方法で、高率に幹細胞に遺伝子が導入されていたためと考えられる。今後、バルジ部の毛包上皮細胞

を採取後、幹細胞マーカーを用いて、FACSを行い、さらに、採取細胞中の幹細胞の密度を高くすれば、幹細胞への遺伝子導入効率を上げることができると考えられた。

5) 造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究

本年度の研究で、骨髄由来表皮細胞の割合を増加させるために、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。さらに実際に、この因子が、生体内における骨髄由来表皮細胞の割合を増加させることも明らかにした。加えて、骨髄由来表皮細胞増加の創傷治癒への影響も検討し、創傷治癒を促進させることを明らかにした。今後は現在までの成果を、臨床応用に近づけるべく、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）への正常マウスから骨髄移植療法を行う。

E. 結論

今回の研究により、表皮水疱症の病態解明と新規治療法開発を行う上で非常に有用であると期待される、COL17 KOマウス作製に成功し、リコンビナントVII型コラーゲンの補充療法は重症型表皮水疱症に対して、有用な治療法であることが示唆された。さらに、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療における標的細胞としては、表皮細胞よりも線維芽細胞の方が有力候補となることが示唆された。他方、我々の開発した毛包上皮の幹細胞を標的とした遺伝子導入と毛包の再構成システムは、信頼性の高い遺伝子機能解析や遺伝子治療に、広く応用可能な方法と考えられた。また、骨髄由来表皮細胞が創傷治癒を促進させることを明らかにした。

以上から今回の研究の主な目的である、VII型コラーゲン蛋白補充療法の有用性を確認し、表皮水疱症への骨髄移植療法の可能性を確認した。

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にまとめた

H. 知的財産の出願・登録状況

1 出願中特許

特許の名称：

角化異常症の診断支援方法

出願番号：特願 2006-019199

発明者：中川裕章、秋山真志、

清水 宏、西村紳一郎、近藤裕郷

出願人：北海道大学、

塩野義製薬株式会社

出願日：平成18年1月27日

2 実用新案登録

登録はなし

III 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

XVII 型コラーゲン / BP180 ノックアウトマウスの作製

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 XVII 型コラーゲン (COL17) / BP180 は表皮真皮間結合に重要な働きを担っており、遺伝性および自己免疫性水疱性皮膚疾患の発症に深く関与している。即ち遺伝子異常によって COL17 の発現が低下ないし消失すると、脆弱な皮膚となり容易に水疱を形成する非ヘルリツ接合部型表皮水疱症を呈し、一方 COL17 に対する自己免疫反応が生じると水疱性類天疱瘡を発症する。今回これらの水疱性皮膚疾患の病態解明と新規治療法作成のため、未だ報告のない COL17 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製した。

研究協力者

澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科教授、
後藤真希 北海道大学大学院医学研究科・
皮膚科学分野

A. 研究目的

これまで作製されている表皮水疱症モデルマウスの中で長期生存可能なものは僅かである。特に、接合部型および栄養障害型水疱症モデルマウスの全てが胎生致死あるいは生後間もなく死亡する。従って、これらの疾患モデルマウスは必ずしも表皮水疱症の病態解明および新規治療法開発に適していなかった。今回、長期生存可能な表皮水疱症遺伝子ノックアウト (KO) マウス作製を目指し、ヒトの臨床型が比較的軽症である非ヘルリツ接合部型表皮水疱症の原因遺伝子である XVII 型コラーゲン (COL17) / BP180 遺伝子ノックアウト作製を試みた。

B. 研究方法

COL17 genomic DNA の exon2 遺伝子を改変したターゲティングベクターを作製し、129/SvEv マウス ES 細胞へトランスフェク

ションする (図 1)。正確に相同変換された ES 細胞へ C57BL/6 マウス blastocyst へ導入しキメラマウスを作製する。次にキメラマウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配することでヘテロマウスを作製し、十分に C57BL/6 マウスへ戻し交配したのちヘテロマウス同士を交配する。理論上、生まれてくる仔マウスの 4 分の 1 が KO マウスとなる。

C. 研究結果

新生児 COL17 KO マウス皮膚は外的刺激によって容易に剥離可能であり、手足には水疱形成を認めた (図 2 a)。組織学的に水疱は表皮下に生じ、COL17 の発現は消失していた (図 2 c, d)。多くの KO マウスは生後 2~4 週以内に死亡したが、一部は 6 ヶ月以上成長した。これらの成長した KO マウスでは、肛囲のびらん、潰瘍化や指先の爪甲脱落を伴う癬痕化、脱毛や白髪など多くの特徴的な所見を多く呈していた (図 2 b)。尚、明らかな歯牙のエナメル質形成不全症は認めなかった。

D. 考察

これまで多くの表皮水疱症モデルマウスが作製されてきたが、COL17 KO マウス作製に成功した報告はなく本研究が初めてである。表皮水疱症モデルマウスの多くはヒトの臨床形に比較し重症化する傾向があり、大人になるまで成長するものは殆ど無い。COL17 KO マウスもその多くが生後間もなく死亡するが、3ヶ月以上生存する個体も存在し必ずしも致命的ではなかったため、今後、表皮水疱症の病態解明と新規治療法開発に非常に有用であると思われる。

COL17 遺伝子異常によって生じる非ヘルリッツ接合部型表皮水疱症患者では、表皮下水疱のほか歯牙の異常や脱毛などの所見を特徴とする。COL17 KO マウスでは、臨床的に確認可能な歯牙の異常は見られなかったが、水疱形成のほか毛髪異常も伴っており、COL17 がこれらの病態に如何に関与しているかなども含め、今後更なる表皮水疱症の病態解明が期待できる。

表皮水疱症患者の治療法として遺伝子治療や欠損タンパク補充療法など種々の方法が施行されているが、未だ疾患モデル動物の治療に成功した報告はない。この理由として、表皮水疱症の治療自体が困難である以外に適切なモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。COL17 KO マウスの一部は長期生存可能なため、種々の治療実験の対象として今後大いに期待できる。

E. 結論

今回、表皮水疱症の病態解明と新規治療法開発を行う上で非常に有用であると期待される、COL17 KO マウス作製に成功した。COL17 は自己免疫疾患である水疱性類天疱

瘡の自己抗原でもあるため、自己免疫性水疱症研究への発展、応用も期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（平成18年度）

研究成果の刊行に関する一覧表にまとめた

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 出願中特許

特許の名称：

角化異常症の診断支援方法

出願番号：特願 2006-019199

発明者：中川裕章、秋山真志、
清水 宏、西村紳一郎、近藤裕郷

出願人：北海道大学、

塩野義製薬株式会社

出願日：平成18年1月27日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図とその説明

図1 ターゲティングベクターの設計図。

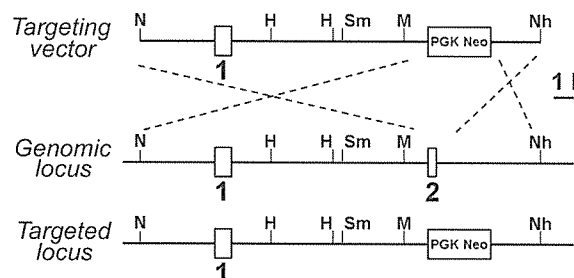
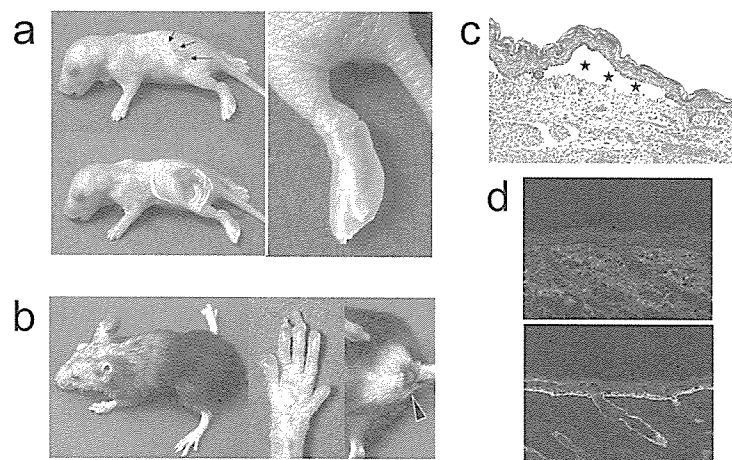


図2 COL17 KO マウス。a: 新生児 KO マウス。b: 生後8週の KO マウス。c: KO マウス皮膚の病理組織所見。d: COL17 タンパクの発現。上: KO マウス。下: 野生型マウス。



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 型コラーゲンをを用いた治療法の開発

分担研究者 澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科 教授

研究要旨

表皮水疱症の新しい治療法への開発のため、VII 型コラーゲン遺伝子導入細胞から得られたリコンビナント VII 型コラーゲンの有用性を検討した。前回、その蛋白を実験動物の皮膚に投与したところ、基底膜への取り込みが認められた野で、今回は実際に栄養障害型表皮水疱症患者の病変部に投与した。特に重大な副作用なく、投与部位に潰瘍縮小が認められ、リコンビナント VII 型コラーゲンの補充療法は有用な治療法であることが示唆され、さらに研究を継続することに決定した。

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。現在までに、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、正常と同様の機能を持つことを確認した。さらに、そのリコンビナント蛋白を動物に投与して、安全性ならびにその有用性を検討した。今回は、実際に栄養障害型表皮水疱症患者の病変部に投与し、その治療効果や副作用の有無を検討した。

B. 研究方法

VII 型コラーゲンの cDNA は 9kb と長いいため、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。

精製したリコンビナント VII 型コラーゲンの安全性については、すでに動物実験で確認し、ラット皮膚に投与すると基底膜にそって沈着することを確認している。今回、16 歳男性の栄養障害型表皮水疱症患者で、12 歳時から有棘細胞癌が発生している患者の潰瘍部にヒトリコンビナント VII 型コラーゲンを局注した。1回 30 μ g で、総投与

回数は8回とした。対症は、生理食塩を投与した。

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した。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った。遺伝子解析、同種培養真皮とヒトリコンビナント VII 型コラーゲン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。また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予定であった。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た。

C. 研究成果

ヒトリコンビナント VII 型コラーゲン投与によって、局所の紅斑などのアレルギー反応は認められなかった。さらに、アナフィラキシーショックや薬疹などの全身の副作用は認められず、今回の第1の目的である、その安全性は確認された。

また、効果であるが、臨床的には、生食を投与した対照部と比較して、投与部位で潰瘍の縮小が認められた。さらに、処置部の生検を行い、ヒト VII 型コラーゲンに対する抗体で VII 型コラーゲンの発現を検討したが、局注部で明らかな VII 型コラーゲンの増加は確認できなかった。

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おこり、創傷治癒が促進されると推測される。

前年の実験では、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。また、安全性のチェックのため、大量のリコンビナント VII 型コラーゲンをマウスに投与し、我々が精製したリコンビナント VII 型コラーゲンには毒性がないことを確認した。

今回、そのリコンビナント VII 型コラーゲンを初めてヒトに投与し、ヒトでの安全性を検討した。その結果、局所と全身の副

作用はなく、その安全性を確認した。また、投与部位に潰瘍縮小作用が認められた。その効果は、局注した VII 型コラーゲンの作用と考えられたが、蛍光抗体で明らかな蛋白の増加がなかったのは、やはり、VII 型コラーゲンが基底膜に十分供給されていなかったと考えられた。今後、VII 型コラーゲンの量を増やしたり、局注した VII 型コラーゲンが皮膚に長く留まる工夫がさらに必要と考えた。また、今回の患者では異常ながら VII 型コラーゲンの発現が基底膜に認められるので、VII 型コラーゲンの発現がまったくない症例でも検討することが必要と思われた。

E. 結論

ヒトリコンビナント VII 型コラーゲンの有用性を検討した。特に重大な副作用なく、投与部位に潰瘍縮小が認められ、リコンビナント VII 型コラーゲンの補充療法は重症型表皮水疱症に対して、有用な治療法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

投稿中

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
遺伝子導入真皮線維芽細胞の有用性
分担研究者 澤村大輔 弘前大学医学部皮膚科 教授

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表皮水疱症では、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 ex vivo の遺伝子治療の臨床応用が期待されている。VII 型コラーゲタンパクの多くは表皮細胞から作られているため、治療の標的細胞としては、表皮細胞が多く使われている。しかし、表皮細胞は培養が難しく、増殖が遅いため、比較的培養が容易な線維芽細胞も近年着目されてきている。今回、我々は、VII 型コラーゲンを同等量に発現させた患者表皮細胞および線維芽細胞を用いて、人工皮膚を作成した。作成した人工皮膚を無免疫動物に移植し、VII 型コラーゲンの基底膜への供給を検討した。その結果、遺伝子導入表皮細胞と無処置線維芽細胞の皮膚よりも、無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞の皮膚に、より多くの VII 型コラーゲンの蛋白が基底膜に沈着した。以上の結果から、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療において、遺伝子導入する標的細胞は、表皮細胞よりも線維芽細胞の方が有力であることが示唆された。

A. 研究目的

表皮水疱症は軽微な外的刺激により、皮膚に容易に水疱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。皮膚を構成する細胞は主に表皮細胞と線維芽細胞から成るが、VII 型コラーゲンの多くは表皮細胞から供給される。しかし、今回我々は、比較的培養が容易で、増殖能の高い線維芽細胞が遺伝子治療の際に、有用な標的細胞に成り得るか否かを検討した。

B. 研究方法

1) レトロウイルスを用いて

Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症患者細胞への正常 VII 型コラーゲン遺伝子の導入

全く VII 型コラーゲンを発現していない Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型表皮水疱症患者から得られた、培養表皮細胞と線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて正常な VII 型コラーゲン遺伝子を導入した。

2) 人工皮膚の作成

表皮細胞は、マイトマイシン C で処理した 3T3 細胞をフィーダーとしてシート状に、線維芽細胞は、コラーゲンスポンジに培養した。それを用いて、遺伝子導入表皮細胞と無処置線維芽細胞、無処置表皮細胞と遺伝子導入線維芽細胞の人工皮膚を作成し、無免疫動物にそれらを