

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度 総括・分担研究報告書

平成 15 年（2003 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 …………… 9
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 …………… 13
澤村大輔（北海道大学）
3. 重症表皮水疱症における VII 型コラーゲンおよび
VII 型コラーゲン遺伝子の治療効果 …………… 17
古市泰宏（株式会社ジーンケア研究所）
4. VII 型コラーゲン遺伝子に確認された alternative splicing の
創傷治癒への関与 …………… 21
増永卓司（株式会社コーサー研究本部）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 25

IV. 研究成果の刊行物・別冊 …………… 33

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(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を培養表皮細胞に導入することにより得られた合成 VII 型コラーゲンは、自己培養皮膚移植法の補充療法に有用である可能性が示唆された。

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。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、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

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。さらに、in vitro mutagenesis の技術を用いてケラチン K 5 遺伝子に患者の変異を導入した。さらに、その変異遺伝子を発現ベクターに挿入し、作成されたコンストラクトを表皮細胞に導入した。最後に、ケラチン K 5 に対する抗体を用いてケラチン K 5 蛋白の凝集の度合を確認した。

2) VII 型コラーゲンの生体表皮での発現

レポーター遺伝子として GFP 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に組み込んだ。そのベクターをローダミンで標識した。その結果、遺伝子は赤色の蛍光で、遺伝子産物は緑色の蛍光で追跡することが可能になる。その遺伝子を 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、蛍光顕微鏡で経時変化を観察した。

3) 表皮細胞への導入遺伝子の血中への分泌

IL-4,6,10,TGF-beta,MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g の各遺伝子の cDNA をクローニングして、発現ベクターに挿入した。次に、それらのプラスミド DNA をラット皮下に局注して、表皮細胞に遺伝を導入した。その後、血中のレベルを ELISA にて経時的に測定し、血中への分泌量を決定した。

4) 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マウス 180kD 類天疱瘡抗原遺伝子のエクソン 1 から 4 を含み、ネオマイシン遺伝子によりエクソン 1 を破壊している。そのコンストラクトを ES 細胞に導入して、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。

5) VII 型コラーゲン蛋白補充療法

ヒトの表皮細胞株に VII 型コラーゲンの cDNA 発現ベクターを stable に導入し、VII 型コラーゲン持続発現株を作成した。その細胞培養液には多量の VII 型コラーゲンが含まれることがウエスタンブロットで確認できた。そこで、ヘアレスラットに皮膚潰瘍を作成し、VII 型コラーゲンを多量に含む上清と対照の上清を外用し、潰瘍の縮小を比較した。

6) VII 型コラーゲン遺伝子導入療法

作成した VII 型コラーゲン導入表皮細胞株にて培養表皮シートを作成した。無免疫のヌードラットに皮膚潰瘍を作成し、培養表皮シート移植と同様にこれらの細胞で表皮シートを作成し、潰瘍部に移植し治療効果を判定した。

7) VII 型コラーゲン遺伝子に確認された alternative splicing の解析

Alternative splicing から新しく生ずるアミノ酸の立体構造、NC-1 ドメインのどのサブドメインに挿入されるのか、それによってどのような状況が NC-1 ドメインにおこるのかを、コンピュータープログラムを用いて推測した。

TGF- β は VII 型コラーゲンの発現を強力に誘導する作用があるし、創傷治癒促進作用がある。そこで、培養表皮細胞に TGF- β を加え、alternative splicing の頻度が増加するかどうかを、検討した。

Alternative splicing の実際のヒト皮膚で確認するため、熱傷や外傷などで皮膚潰瘍を生じている患者を選択し、正常部と潰瘍周辺から皮膚を採取した。皮膚をデスパーゼ処理し表皮を分離した後、トリプシンにて表皮細胞を単離した。次に、表皮細胞から RNA を抽出し、オリゴ d T にてプライミングリバーストランスクリプターゼにて cDNA を合成した。その後、PCR を行い alternative splicing の定量化を行った。

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。別紙のように、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

臨床症状が症例で異なる単純型表皮水疱症家系の遺伝子解析を行い、ケラチン K 5 遺伝子に E170K と E418K の 2 つの変異を確認した。中等度の患者では E170K と E418K の両者が、軽症の患者では E170K のみ変異が見つかった。また、E418K のみでは症状は起こらなかった。この結果、E170K は優性、E418K は劣性、に働くことが明らかになった。また、E418K はケラチン分子の stutter 領域に見つかったはじめての変異であった。さらに、それらの変異を人工的にケラチン K 5 の cDNA に組み込み、その遺伝子を表皮細胞に発現させた所、臨床症状と同様にケラチン K 5 の構築が阻害された。表皮水疱症のなかでも最重症型である Hallopeau-Siemens 型栄養障害性表皮水疱症 (HS-RDEB) の COL7A1 遺伝子検索を行った。その結果、新規 4 塩基挿入変異 434insGCAT ならびに新規ナンセンス点変異 R2261X を見いだした。本症例は、生直後から難治性のびらんが全身に繰り返し出現し、爪が生後数ヶ月で脱落し、臨床的に最重症型であった。

2) II 型コラーゲンの生体表皮での発現

導入から 4 時間後：皮膚全体に赤色の蛍光。8 時間後：表皮全体に赤色の蛍光。12 時間後：表皮全体に赤色の蛍光、一部の細胞に緑色の蛍光。18 時間後、赤色の蛍光が現弱し、緑色の蛍光を示す細胞が所々に認めるようになった。24 時間後：赤色の蛍光は消失し、緑色の細胞が目立った。

3) 表皮細胞への導入遺伝子の血中への分泌

IL-4,6,10,TGF-beta,MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g の各サイトカイン内 IL-4,6,10,TGF-beta 遺伝子導入群では血中のそれらの濃度は上昇していた。一方、MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g 遺伝子導入群では血中での上昇はみとめられなかった。

4) 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相同組み換え用のコンストラクトを ES 細胞に導入した所、500個のネオマイシン耐性のクローンをスクリーニングし、一個の陽性細胞を同定した。

5) VII 型コラーゲン蛋白補充療法

ヘアレスラットに作成した直径 2 センチメートルの潰瘍は、VII 型コラーゲン外用群では、2 週間で上皮化したのに比較して、対照群では 3 週間かかった。また、縮小の速度も外用群が有意に良好であった。

6) VII 型コラーゲン遺伝子導入療法

ヌードラットに作成した直径 2 センチメートルの潰瘍は、VII 型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞で表皮シートを作成し移植した群、あるいは VII 型コラーゲン遺伝子を導入していない対照細胞を用いた群に、潰瘍の治療に有意な差はなかった。

7) VII 型コラーゲン遺伝子に確認された alternative splicing の解析

解析の結果、alternative splicing によるアクセプターサイトの移動により、イントロンの配列から新しく 9 アミノ酸が翻訳されることが判明した。そのうち、3 個がプロリンでありこの 9 アミノ酸は turn 構造を作りやすいことが推測された。また、VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインには 9 個のフィブロネクチンタイプ 3 の繰り返し構造があるが、この 9 アミノ酸はフィブロネクチンタイプ 3 の 6 と 7 番目の間にちょうどおさまると予想された。

TGF- β を培養細胞に添加し、RT-PCR を行い alternative splicing を検討した所、TGF- β 添加によって alternative splicing の増加が認められた。

潰瘍辺縁部と健常部の表皮から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。その結果、健常部と比較して潰瘍辺縁部で、有為に alternative splicing の増加が認められた。

D. 考 察

1) 治療対象となる表皮水疱症患者の集積と診断の確定

今回臨床症状が異なる単純型表皮水疱症家系において始めて、その病態を分子レベルで解明した。従来、ダウリングメアラ、ケブネル、ウエーバーコックキーネ型単純型では常染色体性優性遺伝形式で発症し、ケラチン5や14遺伝子のドミナント・ネガティブ効果で起こることが知られていた。今回の研究では、優性と劣性の変異がヘテロに組み合わせられることにより、発症した症例を報告し、さらに、その2つの変異により家系内の臨床症状の相違が生ずること示した。さらに、本研究では、細胞レベルの患者に起こっている病態を解明し得た。このような報告は過去にはなく、本症の病態を解明する上で、非常に有意義な結果といえる。

日本人の HS-RDEB の新しい変異を確認し得た。既に 170 種以上の変異が確認されている VII 型コラーゲンの変異でも、挿入変異は、まれで、10 種類ほどの報告を見いだすのみである。4 塩基挿入変異は、Whittock ら (J Invest Dermatol. 113, 673, 1999) により 1 例報告されているのみで、調べ得た限り、本症例は、日本人の家系で初めての 4 塩基挿入変異である。RDEB の病因となる VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 は、9kb と大きい。従って変異の種類が多く、これまで、欠失、点変異、一塩基挿入など様々な変異が報告されているが、4 塩基挿入という複数塩基の挿入が確認された変異は極めてまれである。本症例の変異は、2つのアレルとも翻訳途中で停止コドンが生じるため臨床的な重症度と関連した。

2) I 型コラーゲンの生体表皮での発現

本研究では遺伝子にはローダミンによる赤色の蛍光、遺伝子産物は GFP による緑色の蛍光で、それらの追跡が可能になっている。遺伝子導入後、プラスミド DNA は皮膚全体に分布するが、次第に表皮のみに限局するようになり、しだいに現弱していった。一方、緑色の蛍光は一部の表皮細胞のみに陽性であった。この結果は、真皮に導入された DNA は、ほとんどの表皮細胞に取り込まれ、一部の細胞のみそれが最終的に蛋白に翻訳されると推測された。

3) 血中への分泌表皮細胞への導入遺伝子の血中への分泌

今回の研究では、表皮細胞に導入された遺伝子から産生される遺伝子産物でも、その種類によっては血中に分泌されることが明らかになり、将来表皮

細胞にサイトカインやホルモン遺伝子を導入し、その遺伝子導入表皮細胞から全身にそれらの遺伝子産物を供給する治療の可能性が示唆された。

4) 表皮水疱症のモデルの作成

今回の研究で相同組み換えを起こした ES 細胞が単離されたので、その細胞をプラストサイトにインジェクションし、キメラマウスを作成予定である。

5) VII 型コラーゲン蛋白補充療法

VII 型コラーゲン自体の潰瘍治療作用を確認するため、VII 型コラーゲンを含む培養上清で潰瘍の治療を行った。その結果、対照と比較して VII 型コラーゲン添加群では有意に治療効果が確認できた。この結果は、表皮水疱症患者の潰瘍面に VII 型コラーゲン蛋白を外用したり、自己培養表皮シート移植の場合に VII 型コラーゲンを添加してから表皮シートを移植する療法が有効である可能性が示唆された。

6) VII 型コラーゲン遺伝子導入療法

VII 型コラーゲンの遺伝子を導入する遺伝子治療を鑑み、VII 型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞株から表皮シートを作成し、潰瘍面に移植したが、対照と比較して有意な差はなかった。今回の実験で用いたラットは VII 型コラーゲンに関しては正常であるため、このような結果であったことが推測され、今後 VII 型コラーゲンノックアウトマウスを使用する実験を予定している。

7) VII 型コラーゲン遺伝子に確認された alternative splicing の解析

近年、ヒトのすべてのゲノムの塩基配列が明らかにされ、以前は10万個と考えられた遺伝子数は、3 から 4 万と是正された。そして、数少ない遺伝子から、多機能をもつ蛋白質を作り出す1つの手段として、alternative splicing が注目されている。今回、我々の作成した VII 型コラーゲン遺伝子 cDNA 全長に発見された塩基の挿入は、正常の細胞でも確認された。

その alternative splicing 結果、蛋白では 9 アミノ酸の挿入となった。その 9 アミノ酸はプロリンが豊富で折り曲げ構造をとりやすい構造と推測された。VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインには 9 個のフィブロネクチンタイプ 3 の繰り返し構造がある。フィブロネクチンタイプ 3 構造は、約 90 個のアミノ酸からなり、7 つの β ストランドが見つかる。その 3 ストランドから 1 つの β シートが、さらに残りの 4 つからもう 1 つの β シートが作成される。2 つの

β シートは向かいあう構造をとり β バレル構造をとる。その結果、フィブロネクチンタイプ3のN末とC末から引っ張る力が働くと、あたかもバネのように伸びたり縮んだりすることが可能になる。今回の alternative splicing により生ずる9アミノ酸は丁度、6と7番目のフィブロネクチンタイプ3ドメインの間に存在し、バネの角度を変え、NC-1ドメイン全体の細胞外基質への接着能を変化させると推測した。

つぎに、その alternative splicing が表皮と真皮の接着に関与すると推測されたので、創傷治癒への関与も検討してみた。はじめに、創傷治癒を促進させるサイトカインである TGF- β の影響を調べたところ、alternative splicing の増加が認められた。さらに、創傷治癒過程にある潰瘍辺縁の表皮を検討した結果、正常部と比較して alternative splicing の増加が観察された。

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、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を培養表皮細胞に導入することにより得られた合成VII型コラーゲンは、自己培養皮膚移植法の補充療法に有用である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

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

研究発表

分担研究報告書に詳細に記載する。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(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

今回、家系内で臨床症状が異なる単純型表皮水疱症家系の遺伝子変異の検索を行い、ケラチン K5 遺伝子の優性と劣性の変異でそのような病態がおこっていることを見い出した。さらに、*in vitro mutagenesis* の技術を用いて変異を人工的に変異を作成し、その遺伝子を培養細胞に導入することにより、さらにその結果を確認した。また、VII 型コラーゲン遺伝子の 4 塩基挿入で起こる劣性栄養障害型変異を始めて報告した。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、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。

さらに、*in vitro mutagenesis* の技術を用いてケラチン K 5 遺伝子に患者の変異を導入した。さらに、その変異遺伝子を発現ベクターに挿入し、作成されたコンストラクトを表皮細胞に導入した。最後に、ケラチン K 5 に対する抗体を用いてケラチン K 5 蛋白の凝集の度合を確認した。

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、血族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) 臨床症状が症例で異なる単純型表皮水疱症家系の遺伝子解析を行い、ケラチン K 5 遺伝子に E170K と E418K の 2 つの変異を確認した。中等度の患者では E170K と E418K の両者が、軽症の患者では E170K のみ変異が見つかった。

また、E418K のみでは症状は起こらなかった。この結果、E170K は優性、E418K は劣性、に働くことが明らかになった。また、E418K はケラチン分子の *stutter* 領域に見つかったはじめての変異であった。さらに、それらの変異を人工的にケラチン K 5 の cDNA に組み込み、その遺伝子を表皮細胞に発現させた所、臨床症状と同様にケラチン K 5 の構築が阻害された。(論文 1)

2) 表皮水疱症のなかでも最重症型である Hallopeau-Siemens 型栄養障害性表皮水疱症 (HS-RDEB) の COL7A1 遺伝子検索を行った。その結果、新規 4 塩基挿入変異 434insGCAT ならびに新規ナンセンス点変異 R2261X を見いだした。本症例は、生直後から難治性のびらんが全身に繰り返し出現し、爪が生後数ヶ月で脱落し、臨床的に最重症型であった。(論文 2)

D. 考 察

今回臨床症状が異なる単純型表皮水疱症家系において始めて、その病態を分子レベルで解明した。従来、ダウリングメアラ、ケブネル、ウエーバーコッキーネ型単純型では常染色体性優性遺伝形式で発症し、ケラチン 5 や 14 遺伝子のドミナント・ネガティブ効果で起こることが知られていた。今回の研究では、優性と劣性の変異がヘテロに組み合わせられることにより、発症した症例を報告し、さらに、その 2 つの変異により家系内の臨床症状の相違が生ずること示した。さらに、本研究では、細胞レベルの患者に起こっている病態を解明し得た。このような報告は過去にはなく、本症の病態を解明する上で、非常に有意義な結果といえる。

日本人の HS-RDEB の新しい変異を確認し得た。既に 170 種以上の変異が確認されている VII 型コラーゲンの変異でも、挿入変異は、まれで、10 種類ほどの報告を見いだすのみである。4 塩基挿入変異は、Whitlock ら (J Invest Dermatol. 113, 673, 1999) により 1 例報告されているのみで、調べ得た限り、本症例は、日本人の家系で初めての 4 塩基挿入変異である。RDEB の病因となる VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 は、9kb と大きい。従って変異の種類が多く、これまで、欠失、点変異、一塩基挿入など様々な変異が報告されているが、4 塩基挿入という複数塩基の挿入が確認された変異は極めてまれである。本症例の変異は、2 つのアレルとも翻訳途中で停止コドンが生じるため臨床的な重症度と相関した。

E. 結 論

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文 1) Yasukawa K, Sawamura D, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu H. Dominant and recessive compound heterozygous mutations in Epidermolysis Bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly. *J Biol Chem*, 277, 23670-74, 2002.

論文 2) Sato-Matsumura KC, Sawamura D, Goto M, Goto M, Nakamura H, Shimizu H. A novel paternal four base pairs insertion and a maternal nonsense point mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Dermato-Venereol* In press.

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

(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から産生される遺伝子産物が血中に分泌されることを示した。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。

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、それらの遺伝子がどのような機構で表皮細胞から発現されるのかを検討した。また、2) 表皮細胞内に導入した遺伝子から発現される遺伝子産物が血中に分泌されるのかも検討した。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

レポーター遺伝子として GFP 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に組み込んだ。そのベクターをローダミンで標識した。その結果、遺伝子は赤色の蛍光で、遺伝子産物は緑色の蛍光で追跡することが可能になる。その遺伝子を naked DNA 投与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、蛍光顕微鏡で経時変化を観察した。

2) 血中への分泌

IL-4,6,10,TGF-beta,MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g の各遺伝子の cDNA をクローニングして、発現ベクターに挿入した。次に、それらのプラスミド DNA をラット皮下に局注して、表皮細胞に遺伝を導入した。その後、血中のレベルを ELISA にて経時的に測定し、血中への分泌量を決定した。

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マウス 180kD 類天疱瘡抗原遺伝子のエクソン 1 から 4 を含み、ネオマイシン遺伝子によりエクソン 1 を破壊している。そのコンストラクトを ES 細胞に導入して、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。

C. 研究結果

1) 生体表皮での発現 (論文 1)

導入から 4 時間後：皮膚全体に赤色の蛍光。8 時間後：表皮全体に赤色の蛍光。12 時間後：表皮全体に赤色の蛍光、一部の細胞に緑色の蛍光。18 時間後、赤色の蛍光が現弱し、緑色の蛍光を示す細胞が所々に認められるようになった。24 時間後：赤色の蛍光は消失し、緑色の細胞が目立った。

2) 血中への分泌 (論文 2)

IL-4,6,10,TGF-beta,MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g の各サイトカイン内 IL-4,6,10,TGF-beta 遺伝子導入群では血中のそれらの濃度は上昇していた。一方、MCAF,GMCSF,TNF-a,IFN-g 遺伝子導入群では血中での上昇はみとめられなかった。

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相同組み換え用のコンストラクトを ES 細胞に導入した所、500個のネオマイシン耐性のクローンをスクリーニングし、一個の陽性細胞を同定した。

D. 考 察

1) 体表皮での発現

本研究では遺伝子にはローダミンによる赤色の蛍光、遺伝子産物は GFP による緑色の蛍光で、それらの追跡が可能になっている。遺伝子導入後、プラスミド DNA は皮膚全体に分布するが、次第に表皮のみに限局するようになり、しだいに現弱していった。一方、緑色の蛍光は一部の表皮細胞のみに陽性であった。この結果は、真皮に導入された DNA は、ほとんどの表皮細胞に取り込まれ、一部の細胞のみそれが最終的に蛋白に翻訳されると推測された。

2) 血中への分泌

今回の研究では、表皮細胞に導入された遺伝子から産生される遺伝子産物でも、その種類によっては血中に分泌されることが明らかになり、将来表皮細胞にサイトカインやホルモン遺伝子を導入し、その遺伝子導入表皮細胞から全身にそれらの遺伝子産物を供給する治療の可能性が示唆された。

3) モデルの作成

今回の研究で相同組み換えを起こした ES 細胞が単離されたので、その細胞をプラストサイトにインジェクションし、キメラマウスを作成予定である。

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、それらの遺伝子がほとんどの細胞に取り込まれるが、一部の細胞しか発現できないことが示された。また、原因遺伝子が血中に分布される可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文 1) Meng X, Sawamura D, Ina S, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I. Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin. *Experimental Dermatol*, 11, 456-461, 2002.

論文 2) 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*, 118, 967-71, 2002.

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
(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

重症表皮水疱症における VII 型コラーゲンおよび VII 型コラーゲン遺伝子の治療効果

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、1) VII 型コラーゲン遺伝子を導入した VII 型コラーゲンの持続産生株から得られた VII 型コラーゲンの潰瘍への治療効果、ならびに 2) VII 型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞株から作成した表皮シートの皮膚潰瘍への治療効果を検討した。その結果、VII 型コラーゲン外用により潰瘍の上皮化促進が認められたが、VII 型コラーゲンの導入細胞と対照の細胞では潰瘍の上皮化に変化はなかった。

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。

今回の研究では、1) VII 型コラーゲン遺伝子を導入した VII 型コラーゲンの持続産生株から得られた VII 型コラーゲンの潰瘍への治療効果、ならびに

2) VII型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞株から作成した表皮シートの皮膚潰瘍への治療効果を検討した。

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。

- 1) そこで、ヒトの表皮細胞株にVII型コラーゲンのcDNA発現ベクターをstableに導入し、VII型コラーゲン持続発現株を作成した。その細胞培養液には多量のVII型コラーゲンが含まれることがウエスタンブロットで確認できた。そこで、ヘアレスラットに皮膚潰瘍を作成し、VII型コラーゲンを多量に含む上清と対照の上清を外用し、潰瘍の縮小を比較した。
- 2) さらに、そのVII型コラーゲン導入表皮細胞株にて培養表皮シートを作成した。無免疫のヌードラットに皮膚潰瘍を作成し、培養表皮シート移植と同様にそれらの細胞で表皮シートを作成し、潰瘍部に移植し治療効果を判定した。

C. 研究結果

- 1) ヘアレスラットに作成した直径2センチメートルの潰瘍は、VII型コラーゲン外用群では、2週間で上皮化したのに比較して、対照群では3週間かかった。また、縮小の速度も外用群が有意に良好であった。
- 2) ヌードラットに作成した直径2センチメートルの潰瘍は、VII型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞で表皮シートを作成し移植した群、あるいはVII型コラーゲン遺伝子を導入していない対照細胞を用いた群に、潰瘍の治療に有意な差はなかった。