

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591291

研究課題名（和文） 表皮水疱症に対する遺伝子導入治療効果の客観的評価

研究課題名（英文） Objective Evaluation Method of Genetic Treatment for Epidermolysis bullosa

研究代表者

中村 秀樹 (NAKAMURA HIDEKI)

北海道大学・大学院医学研究科・助手

60435956

研究成果の概要：

non-Herlitz 接合部型表皮水疱症レスキューマウスを詳細に解析し、遺伝子導入治療の客観的評価法を検討した。レスキューマウスに生じる臨床効果の差異は超微細構造学的構造変化と蛋白発現によっても確認することができた。これらの差異が生じる要因として遺伝子導入状態の違いを確認することができたが、この違いを明らかにするためには導入された genomic DNA を確認するだけでは不十分であった。臨床効果を分岐する遺伝子導入状態の分岐点を明らかにするためには realtime PCR による mRNA の定量、Fluorescence in-situ Hybridization 法による遺伝子導入部位の確認が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学

## 1. 研究開始当初の背景

先天性表皮水疱症 (EB) の原因遺伝子が次々と明らかになってきている。重症型 EB の患者数はアメリカで 2000 例、日本で約 600 名と報告され、厚生労働省稀少難治性皮膚疾患にも指定されている。世界の現状は対症療法が主であるが、我々は積極的治療法である自家培養表皮シート移植や欠損蛋白補充療法を世界に先駆けて研究・臨床応用を試みている。しかし、現状では十分な治療効果は得られていない。遺伝性疾患の根本治療法である原因

遺伝子変異に対する積極的な遺伝子治療法の開発が強く望まれている。

これに対し、我々は EB である non-Herlitz 接合部型表皮水疱症モデルマウスを作成し、原因遺伝子である COL17 遺伝子のヒト正常遺伝子を導入することにより発症を防ぐレスキューマウスの作成に世界で始めて成功している。

## 2. 研究の目的

EB である non-Herlitz 接合部型表皮水疱症に対する遺伝子治療を行ったレスキューマウスは遺伝的に同じと考えられる。しかし、実際には表現型に相違を認める。これらを詳細に検討することにより、遺伝子導入状態と臨床効果の関係を客観的に示す評価システムを確立する。この客観的評価法により先天性表皮水疱症に対する効率的かつ効果的な遺伝子導入条件を決定し、遺伝子治療の安全性を著しく高めることが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) EB である non-Herlitz 接合部型表皮水疱症レスキューマウスを作製し、臨床効果により分類する。

これらの群に対して、

(2) PCR 法によるヒト COL17 遺伝子導入の確認を行う。

(3) 免疫蛍光抗体法による免疫組織学的検索および、Western blot 法より COL17 遺伝子がコードする BPAG2 蛋白の検索を行う。

(4) 透過型電子顕微鏡を用いて、BPAG2 が存在する表皮基底膜部へミデスモゾームの超微細構造学的検索を行う。

(5) RT-PCR, realtime PCR により、COL17 mRNA 発現についての分子生物学的検索を行う。

(6) Fluorescence in situ hybridization 法による COL17 遺伝子導入状態の解析を行う。

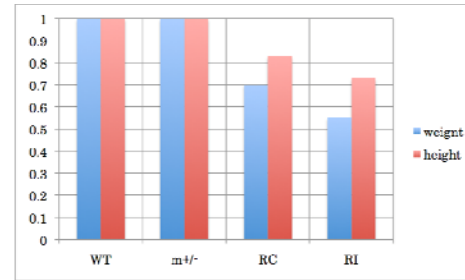
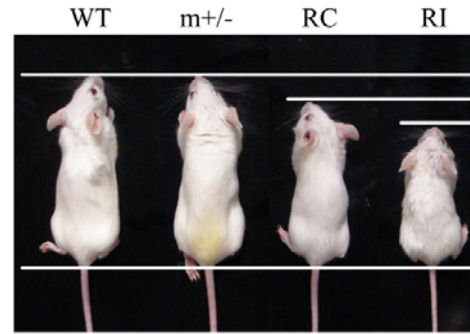
(7) 以上の結果を総合データ解析して、遺伝子導入状態と構造蛋白機能の回復、臨床効果の関係を明らかにする。これら一連の解析法により遺伝子導入治療効果の客観的評価法を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 作成した non-Herlitz 接合部型表皮水疱症レスキューマウスを臨床効果により完全寛解群と不完全寛解群に分類した。

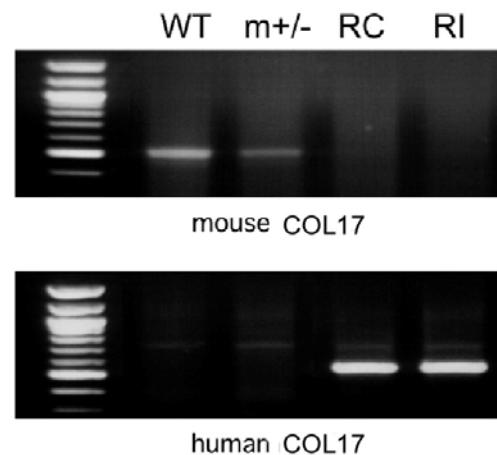
コントロール群として正常マウスとレスキューマウス作成の過程で利用する、マウス COL17 遺伝子 +/- のヘテロマウスを加えて以下の 4 群とした。使用するマウスはすべて週齢の一致したものをを用いた。

- ① Wild Typeマウス
- ② mouse COL17 +/- のヘテロマウス
- ③ ヒト COL17 遺伝子導入による完全寛解群(Rescue Complete) : human COL17+/, mouse COL17-/-
- ④ ヒト COL17 遺伝子導入による不完全寛解群(Rescue Incomplete) : human COL17+/, mouse COL17-/-



臨床表現型は WT に対して、m+/- では身長・体重とも正常で、RC では身長で 17%、体重で 30% の減少、RI では身長で 27%、体重で 45% の減少を認めた。

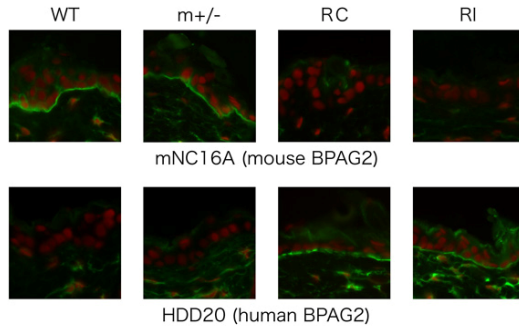
(2) 作成した non-Herlitz 接合部型表皮水疱症レスキューマウスに対して、マウス BPAG2 遺伝子(mouse COL17)、ヒト BPAG2 遺伝子(human COL17)を PCR 法にて確認した。



WT, m+/- に mouse COL17 のみを、RC, RI に human COL17 のみが発現しているのを確認した。

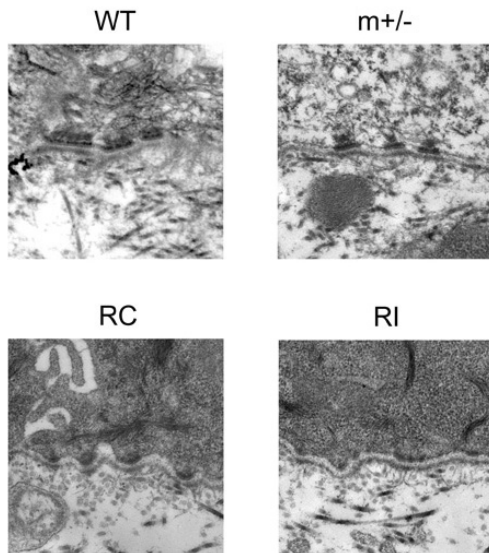
(3) 分類した①から④に対して定法にしたがって凍結切片を用いて、免疫蛍光抗体間接法を施行した。用いた抗体は、mouse BPAG2

NC-16A に対するモノクローナル抗体、human BPAG2 に対するモノクローナル抗体を用いて BPAG2 蛋白の発現状態を検討した。また、定法に従って調整した皮膚 sample を用いて Westernblot 法を施行した。

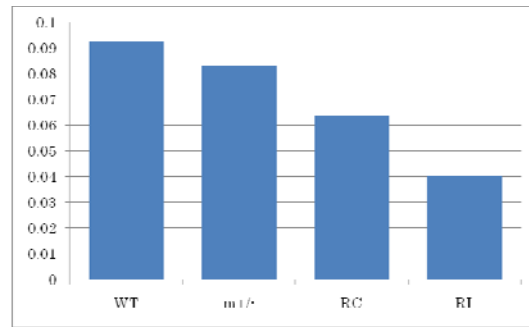


mouse BPAG2 に対しては WT, m+/- のみが反応を示し、human BPAG2 に対しては RC, RI のみが反応を示した。WT に比して m+/- に減弱を、RC に比して RI に減弱を認めた。Westernblot 法による結果も蛍光抗体法と同様であった。

(4) 分類した①から④に対して、定法により試料作成を行い、透過型電子顕微鏡（日立 H-7100）を用いて基底膜ヘミデスモゾーム部の超微細構造を検討した。

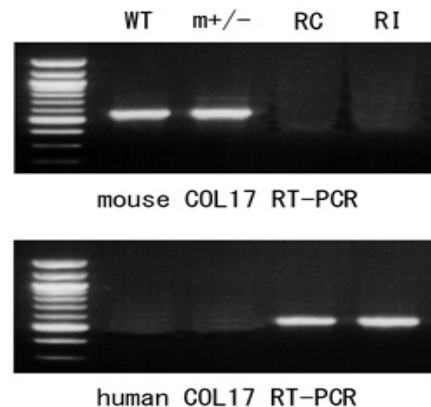


超微細構造の検討により、WT のヘミデスモゾームに比して m+/-, RC, RI に数・長さ・面積の減少を認めた。また、得られた画像より画像解析プログラム MethaMorph (Molecular Devices) を用いてヘミデスモゾーム面積の解析を行った。



MethaMorph の解析結果から、WT に比して m+/- > RC > RI の順で面積の低下を認めたが、統計学的には有意差を認められなかった。これは臨床効果から分類した RC の中に RI と同程度のヘミデスモゾームの減少、面積の低下を認めた群が存在するためと考えられた。また、RC と同様に m+/- ヘテロマウスも WT に比して構造学的には脆弱性を認めていることを確認した。

(5) ①から④に対して RT-PCR 法を用いて mouse COL17 mRNA, human COL17 mRNA を検討した。



RT-PCR にて RC, RI に human COL17 mRNA の発現を確認した。さらに realtime PCR にて発現量を定量した。realtime PCR での COL17 mRNA の発現量は WT > m+/-, RC > RI と推測したが、RC と RI の間に統計学的差を認めなかった。

以上の結果から、最初に臨床効果により分類した完全寛解群 (RC) に構造学的に合致しない個体が含まれていることを確認した。そのため、完全寛解群 (RC) をさらに完全構造・不完全構造に分類し、コントロール群を加えて 6 分類とした。

- ① Wild type mice
- ② m<sup>±</sup>/ hetero mice
- ③ RC・蛋白正常・完全構造
- ④ RC・低蛋白発現・不完全構造
- ⑤ RI・低蛋白発現・不完全構造
- ⑥ non-Herlitz 発症群

これにより、ヘミデスモゾーム面積のデータに統計学的有意差を認めた。しかし、④と⑤の mRNA に関しては統計学的有意差を認めなかった。

(6) ①から⑥について Fluorescence in-situ hybridization (FISH) 法を用いて遺伝子導入状態を解析した。

マウスの染色体はヒト染色体と異なり、形状が類似しているため比較が難しく、複雑な手技も伴って信頼性の高い結果は得られなかった。しかし、遺伝子導入状態は個数・部位ともに個体による差が大きく遺伝子導入状態が不安定であることが推測された。

#### (7) 結語

以上の結果から、我々が構築した non-Herlitz 接合部型表皮水疱症レスキューマウスは遺伝子導入状態が不安定であり、この不安定さが不完全寛解群を生じるものと思われた。この結果はバッククロスの不十分が原因と考えられ、バッククロスが進むに従って、これら不完全寛解群が生じる数が減少していることから明らかである。しかし、この結果は極めて重要であり、遺伝子導入治療効果は我々が実施してきた検索を行い、FISH 法にて遺伝子導入状態を明らかにすることで客観的評価を可能とし、genomic DNA の確認だけでは不十分であると結論できる。また、臨床効果から完全寛解群と思われた個体に構造学的脆弱性がみられたことから、完全寛解・蛋白正常・完全構造と完全寛解・低蛋白発現・不完全構造の間に臨床効果の分岐点が存在すると思われる。今後はこの分岐点を規定する遺伝子導入状態の解明を進めることが重要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Qiao H, Shimizu H, Collagen XVII Participates in Keratinocyte Adhesion to Collagen IV, and in p38MAPK-Dependent Migration and cell Signaling., *Journal of Investigative Dermatology*, epub, 2009、有

2. Asaka T, Shimizu H, Type XVII collagen is a key player in tooth enamel formation., *American Journal of Pathology*, 174 (1), 91-100, 2008、有
3. 西江渉, 自己抗原ヒト化マウスの開発と応用、*バイオテクノロジージャーナル*、7 巻、599-602、2007、無

[学会発表] (計 4 件)

1. 中村秀樹、西江渉、清水宏、正常ヒト XVII 型コラーゲン遺伝子導入レスキューマウスの解析、平成 20 年度日本顕微鏡学会、2008. 12. 13、札幌
2. 藤田靖幸、中村秀樹、清水宏、骨髄移植は 17 型コラーゲンノックアウトマウスにおいて欠損蛋白を補充し生命予後を改善する、第 40 回日本結合組織学会・第 55 回マトリックス研究学会合同学術集会、2008. 5. 30、東京
3. Shimizu H、Novel mouse model for junctional epidermolysis bullosa, The 21st World Congress of Dermatology, 2007. 10. 5、Buenos Aires
4. 西江渉、類天疱瘡のモデルに関する新しい知見について、第 71 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2007. 9. 22、札幌

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 秀樹 (NAKAMURA HIDEKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助手  
研究者番号：60435956

##### (2) 研究分担者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：00146672

##### (3) 連携研究者

西江 渉 (NISHIE WATARU)  
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：20443955