

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791047

研究課題名（和文） ヒトVII型コラーゲン含有ミルクによる表皮水疱症の治療

研究課題名（英文） Therapeutic study for epidermolysis bullosa using milk with human collagen VII

研究代表者

伊藤 圭（ITO KEI）

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20421977

研究成果の概要（和文）：劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）は、表皮基底膜部に存在するVII型コラーゲン蛋白をコードする遺伝子の変異により発症するが有効な治療法はない。本研究は、ヒトVII型コラーゲン蛋白を母乳中に強制発現するマウスを用い、RDEBに対する治療効果を判定するものである。最初に母乳自体を表皮水疱症モデルであるVII型コラーゲン遺伝子ノックアウトマウスへ経口投与試みたが、口腔内の水疱形成のため困難であった。次に、母乳中からヒトVII型コラーゲン蛋白を精製し、マウス皮膚へ局所投与したところ免疫反応などの副作用が無いことを確認した。しかし、ヒトVII型コラーゲタンパクの精製効率が悪かったため、実際に表皮水疱症モデルマウス生体での治療実験には至らなかった。今後、母乳中からのタンパク精製効率の改善が課題である。

研究成果の概要（英文）：Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is a congenital blistering skin disorder of which collagen VII. In this study, we aimed at transgenic mice we created in which human collagen VII is secreted into their milk. We assessed the valuable of the milk with human collagen VII as a novel therapeutic approach for RDEB. First, direct breast feed of neonatal collagen VII knockout mice by the transgenic mice was not successful due to severe blister formation of the EB model mice. Second, local cutaneous injection of purified human collagen VII did not induce adverse immune reactions, suggesting safety of the molecule. However, it was very difficult to purify enough amount of the human collagen VII protein from the milk for in vivo therapeutic study. Recombinant collagen VII may be useful as a novel therapeutic approach for RDEB patients if improved protocol for purification of the molecule will be established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、蛋白補充療法

## 1. 研究開始当初の背景

劣性栄養障害型表皮水疱症 (Recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) は、表皮基底膜部に存在する VII 型コラーゲン蛋白をコードする遺伝子の変異により発症するが、未だ有効な治療法はない。また、非常に分子量の大きい VII 型コラーゲン蛋白 (約 290kDa) をヒト疾患の治療に使用可能なほど大量、かつ永続的に得る方法は開発されていない。最近、研究代表者は、母乳中に蛋白を発現させるという非常に作成効率が高い画期的な手法により、ヒト VII 型コラーゲン蛋白を母乳中に強制発現させるトランスジェニック (Tg) マウスの系の確立に成功した。このヒト VII 型コラーゲン蛋白を含む母乳は、RDEB に対する新規治療法として有用である可能性がある。

## 2. 研究の目的

ヒト VII 型コラーゲン蛋白を母乳中に強制発現させる Tg マウスからの母乳が RDEB に対し効果のある新規蛋白補充療法となり得るかを検証することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) Tg マウスからの母乳の搾乳

既に研究代表者は、 $\beta$  カゼインプロモーターの調節下にヒト VII 型コラーゲンの cDNA を組み込んだコンストラクトを用いて、マイクロインジェクション法により Tg マウスを作成している (未発表 data)。また、出生したマウス離乳時に尾から DNA を採取してヒト VII 型コラーゲン遺伝子が組み込まれていることを確認し、Tg マウスを選択、およびその系の確立も行っている。交配を重ね、搾乳の対象となる Tg マウスを量産する。それらの Tg マウス (♀) を交配させ、出産後最大分泌期である分娩後に、母体に乳汁量増加を促すためにオキシトシンを腹腔内局注した後、搾乳を行う。

### (2) 母乳中のヒト VII 型コラーゲン蛋白の確認

乳汁分泌期の Tg マウス (♀) から搾乳した母乳をウェスタンブロット法により解析し、290kDa のヒト VII 型コラーゲン蛋白の発現を確認する。

### (3) 母乳中のヒト VII 型コラーゲン蛋白精製

大量に集めたヒト VII 型コラーゲンを含む母乳を 30% 硫酸アンモニウムにて硫酸塩析後、遠心し、回収ペレットを PBS 溶解し限外ろ過を実施する。このサンプルを、ヒト VII 型コ

ラーゲンモノクローナル抗体をカップリングさせたゲルに結合させ、アフィニティクロマトグラフィーを実施する。トリフルオロ酢酸 (pH 2.6) を用いて溶出後、Tris-HCl (1.5M pH 8.5) で中和させ、その後ゲルろ過クロマトグラフィーを実施し、高濃度のヒト VII 型コラーゲン蛋白を精製する。そして、精製したリコンビナントヒト VII 型コラーゲンをマウス皮内へ投与し、局所および全身性の免疫反応の有無について評価を行う。

### (4) 精製ヒト VII 型コラーゲンの RDEB モデルマウスへの投与

VII 型コラーゲン遺伝子ノックアウトマウスへヒト VII 型コラーゲン蛋白を含む母乳の投与を行い、治療効果を判定する。また、精製蛋白を RDEB モデルマウスである VII 型コラーゲン遺伝子ノックアウトマウス腹腔内や皮下へ全身投与し治療効果について判定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) Tg マウスからの母乳の搾乳

$\beta$  カゼインをプロモーターとし、ヒト VII 型コラーゲン遺伝子を組み込んだ Tg マウスを作成し、搾乳対象となる雌 Tg マウスの量産体制を確立した。作成した Tg マウスは、尾から DNA を抽出し、PCR 法にてヒト VII 型コラーゲン遺伝子が組み込まれていることを確認した。乳汁量増加を企図してオキシトシンの腹腔内注射法を検討した。乳汁最大分泌期である出産後 13~14 日後の Tg マウスにオキシトシン腹腔内注射を行って搾乳した。コントロール群に比して 5~10 倍の乳汁量増加を確認した。これらの結果から逐次搾乳を継続してヒト VII 型コラーゲン含有乳汁を蓄積した。

### (2) 母乳中のヒト VII 型コラーゲン蛋白の確認

作成した乳汁分泌期 Tg マウスより乳汁を搾乳し、ウェスタンブロット法により 290kDa のヒト VII 型コラーゲン蛋白の発現を確認した。乳汁中のヒト VII 型コラーゲンは出産 20 日後の乳汁中でも発現し、再出産時にも確認できた。 $\beta$  カゼインをプロモーターとした本 Tg マウスは安定的にヒト VII 型コラーゲン蛋白を発現することを確認した。母乳サンプルとコントロールのリコンビナントヒト VII 型コラーゲンをヒト VII 型コラーゲンに対する抗体 (LH7.2) を用いてウェスタンブロットした結果、母乳 1ml 中に 1.75ml と比較的高濃度の VII 型コラーゲンが含まれることが明らかとなった (図 1)。

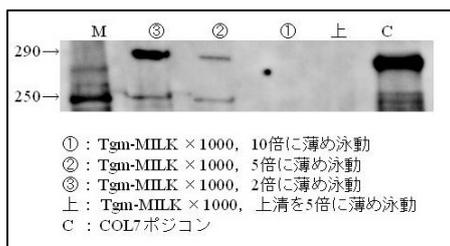


図 1

### (3) 母乳中のヒトVII型コラーゲン蛋白精製

蓄積した乳汁を硫酸塩析し、限外濾過により濃縮を行った。引き続きヒトVII型コラーゲンモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行ってヒトVII型コラーゲンを精製した(図2)。

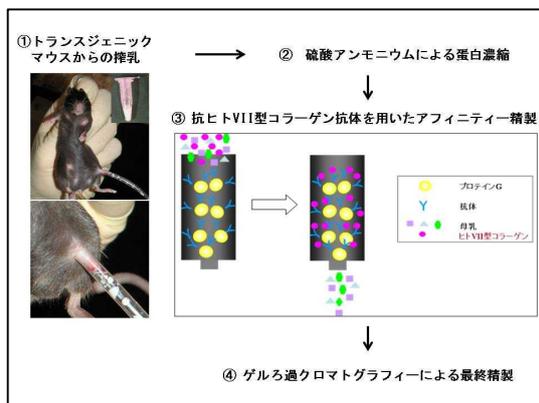


図 2

精製したリコンビナントヒトVII型コラーゲンをマウス皮内へ投与したところ、臨床的・組織学的な変化無く副作用を否定し得た。

### (4) 精製ヒトVII型コラーゲンのRDEBモデルマウスへの投与

VII型コラーゲンノックアウトマウス新生児は生後1週間ほどで死亡するため、生後直後から治療実験を開始した。母乳分泌期にあるヒトVII型コラーゲンを母乳中に強制発現するTgマウスを仮親とした投与実験では、新生児への授乳が困難であった。さらに注射器やゾンデによる強制給餌などで経口投与を試みたが、十分な量の乳汁を経口摂取させることは極めて困難であった。一方、乳汁からのVII型コラーゲンの精製は、純度の高いヒトVII型コラーゲンを乳汁から精製可能となった。しかし、乳汁採取量が極めて小さいこと、また精製過程での損失が大きく、投与実験に供するための十分な精製VII型コラーゲンの取得が困難であった。

以上の結果から、今後、母乳中からのタンパク精製効率が向上された際、本治療法は有用である可能性があると思われる。

## 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)

- Mizuno O, Yanagi T, Baba K, Yamane N, Inokuma D, Ito K, Akiyama M, Shimizu H. Sweet's syndrome presenting with vegetative nodules on the hands: relationship to neutrophilic dermatosis of the dorsal hands. *Int J Dermatol*, in press. 査読有り
- 福永淳, 錦織千佳子, 伊藤圭, 清水宏, 佐々木りか子, 加藤真弓, 宮地良樹, 竹内聡, 田代あかり, 古江増隆: 光線過敏症などに対するサンスクリーン剤の有用性評価. 査読無し  
*西日本皮膚科* 73: 271-277, 2011.
- Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H. Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Mutat.* 31:602-610, 2010. PMID:20213768 査読有り

[学会発表] (計24件)

- Umamoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Nishie W, Shinkuma S, Ito K, Sawamura D, Uitto J, Kitagawa Y, Shimizu H: Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poorly differentiated ameloblasts. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Kyoto International Conference Center, Kyoto, 2011/12/09-11
- Toyonaga E, Abe R, Moriuchi R, Ito K, Abe Y, Shimizu H: Treatment With Oral Indomethacin In Childhood Type Eosinophilic Pustular Folliculitis. 22nd World Congress of Dermatology. Soul, Korea Convention and Exhibition Center, Korea, 2011/5/24-29
- Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito K, Shimizu H: New insight into genotype-phenotype correlation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a range of COL7A1 missense mutations. The 40th European Society for Dermatological Research (ESDR) Annual

- Meeting. Marina Congress Centre, Finland, Helsinki, 2010/09/08-11
4. Shinkuma S, Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito K, Akiyama M, Shimizu H: Distinctive anchoring fibril structures produced by different COL7A1 mutations. The 37th SCUR Annual Meeting, Marina Congress Centre, Helsinki, Finland, 2010/09/07-08
  5. Iitani MM, Shibaki A, Matsumura W, Tsubota A, Ito K, Hayashi T, Yamada Y, Shimizu H:  
A case of recurrent giant onychomatricoma.  
The first eastern asian dermatology congress, Hotel New Otani Hakata, Fukuoka, 2010/03
  6. 豊永愛恋, 伊藤圭, 渡邊英里香, 飯谷麻里, 小玉和郎, 小林仁, 安田秀美, 村本文男, 西村真智子:  
JR 札幌病院における乾癬に対するインフリキシマブの投与 14 症例の検討.  
第 385 回日本皮膚科学会北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2011/2/19
  7. 飯谷麻里, 伊藤圭, 大宮若菜, 渡邊英里香, 本多佐保, 西野雅彦, 佐々木真由美, 小林仁:  
本邦初となる乾癬に対する infliximab 投与後の結核発症例.  
日本皮膚科学会第 388 回北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2011/12/17
  8. 渡邊英里香, 伊藤圭, 飯谷麻里, 大宮若菜, 岩田英里:  
Ferguson-Smith 型多発性ケラトアcantoma の 1 例.  
日本皮膚科学会第 388 回北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2011/12/17
  9. 大宮若菜, 伊藤圭, 渡邊英里香, 飯谷麻里, 小林仁, 佐々木真由美:  
cosmetic lip tattoo により生じた口唇の granulomatous reaction の 1 例.  
日本皮膚科学会第 387 回北海道地方会. 大正製薬ビル, 札幌医科大学, 札幌, 2011/9/3
  10. 大宮若菜, 伊藤圭, 渡邊英里香, 飯谷麻里:  
診断基準の大基準 5 項目すべてを満たした母斑性基底細胞癌症候群の 1 例.  
日本皮膚科学会第 388 回北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2011/12/17
  11. 伊藤圭, 飯谷麻里, 渡邊英里香, 大宮若菜, 豊永愛恋, 小玉和郎, 小林仁, 安田秀美, 浜坂幸吉, 村本文男, 大田光仁, 西村真智子:  
インフリキシマブ投与乾癬患者 25 例およびバイオロジクススイッチ 5 症例を含むウスステキスマブ投与患者 20 例の使用経験.  
第 388 回日本皮膚科学会北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2011 12. 札幌, 2011/12/17
  12. 伊藤圭, 飯谷麻里, 渡邊英里香, 大宮若菜, 豊永愛恋, 小玉和郎, 小林仁, 安田秀美, 浜坂幸吉, 村本文男, 西村真智子:  
インフリキシマブ投与乾癬患者 22 例および切り替え 5 症例を含むウスステキスマブ投与患者 10 例の使用経験.  
第 26 回日本乾癬学会学術大会. 大阪国際会議場, 大阪, 2011/9/9-10
  13. 伊藤圭, 飯谷麻里, 渡邊英里香, 大宮若菜, 小林仁, 佐々木真由美:  
Cosmetic lip tattoo により生じた広範な乾酪壊死巣を伴う口唇全周性 granulomatous reaction の 1 例.  
第 63 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 沖縄, 沖縄コンベンションセンター 2011/10/8-9
  14. 伊藤圭, 飯谷麻里, 渡邊英里香, 大宮若菜:  
乾癬への生物学的製剤認可 1 年半の当院での治療の軌跡.  
第 91 回日本交通医学会北海道地方会. JR 札幌病院, 札幌, 2011/9
  15. 伊藤圭:  
PASI ゼロ (乾癬皮疹なし) への挑戦 ~生物学的製剤の使用経験と今後の乾癬治療の展望~.  
第 38 回難病患者・障害者と家族の全道集会札幌大会 分科会 乾癬学習懇談会 2011 in 札幌. かでるホール, 札幌, 2011/8
  16. 豊永愛恋, 伊藤圭, 渡邊英里香, 飯谷麻里, 小玉和郎:  
セレコキシブ (セレコックス®) による薬疹の 4 例.  
第 384 回日本皮膚科学会北海道地方会. 札幌医科大学, 札幌, 2010/12/11
  17. 平田悠, 伊藤圭, 濱出洋平, 劔持靖子, 浜坂明日香, 芝木晃彦, 清水宏, 横関真由美:  
大量免疫グロブリン静注療法が奏効した治療抵抗性水疱性類天疱瘡の 1 例.  
第 74 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 江陽グランドホテル, 仙台, 2010/11/20-21
  18. 平田悠, 伊藤圭, 濱出洋平, 劔持靖子, 浜坂明日香, 芝木晃彦, 清水宏, 横関真由美:  
大量免疫グロブリン静注療法が奏効した治療抵抗性水疱性類天疱瘡の 1 例.  
第 383 回日本皮膚科学会北海道地方会. 大正製薬ビル, 札幌, 2010/08/28
  19. 渡邊美佳, 伊藤圭, 阿部理一郎, 芝木晃彦, 清水宏:  
当科で経験した好酸球性筋膜炎の 4 例~本邦における報告例のまとめと考察~.  
第 382 回日本皮膚科学会北海道地方会. 大雪クリスタルホール, 旭川, 2010/06/13

20. 新熊悟, 西江渉, 夏賀健, 伊藤圭, 中村秀樹, 清水宏:  
劣性栄養障害型表皮水疱症患者における遺伝子型—表現型の相互関係解析.  
第 383 回日本皮膚科学会北海道地方会. 大正製薬ビル, 札幌, 2010/08/28
21. 新熊悟, 秋山真志, 夏賀健, 乃村俊史, 有田賢, 阿部理一郎, 伊藤圭, 中村秀樹, 氏家英之, 芝木晃彦, 西江渉, 清水宏:  
高頻度に認められる LIPH founder 変異を有した常染色体劣性乏毛症の 4 家系.  
第 109 回日本皮膚科学会総会. 大阪国際会議場, 大阪, 2010/04/16-18
22. 洪綺憶, 阿部理一郎, 守内玲寧, 伊藤圭, 阿部由紀子, 清水宏, 宮澤仁:  
小児に生じた Eosinophilic pustular folliculitis の 2 例.  
第 382 回日本皮膚科学会北海道地方会. 大雪クリスタルホール, 旭川, 2010/06/13
23. 伊藤圭:  
インフリキシマブの臨床効果と患者満足度について.  
第 1 回北海道皮膚科 Biologics Forum. JR タワーホテル日航, 札幌, 2010/10/15

[図書] (計 1 件)

1. 伊藤圭: 脛骨前粘液水腫 (甲状腺機能亢進症). 皮膚科 フォト クリニック シリーズ 皮膚で見つける全身疾患 ~頭のてっぺんからつま先まで~. . . 東京: メディカルレビュー社, 2011, p 93

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 圭 (ITO KEI)  
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号: 20421977

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: