

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591293
研究課題名（和文） Gene silencing による水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の新規治療戦略
研究課題名（英文） New therapeutic strategy for Bullous congenital ichthyosiform erythroderma by gene silencing
研究代表者
阿部由紀子 (ABE YUKIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
40374433

研究成果の概要：

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(Bullous congenital ichthyosiform erythroderma : BCIE) は、表皮細胞に発現するケラチン 1 または 10 の遺伝子変異の dominant-negative effect により発症する、重症型の常染色体優性遺伝性角化症である。遺伝子変異の同定により、出生前診断が可能となったがまだ根本的な治療についての研究は進んでいない。一方、RNA interference (RNAi) は、21～23 塩基の二本鎖 RNA からなる small interfering RNA (siRNA) を細胞に導入すると、相同配列を持つ mRNA を破壊することで特定の蛋白質合成のみを特異的に抑制するものである。導入する siRNA はごく少量でも目的蛋白を劇的に抑制でき、その反応は非常に特異的であることから、遺伝子治療として臨床応用されることが期待されている。本研究では、BCIE をモデルとして、RNAi による遺伝性皮膚疾患の遺伝子治療を試みた。

理論上、異常なケラチン 10 を RNAi により mRNA レベルで特異的に発現抑制（ノックダウン）すると、正常なケラチン 10 を発現する mRNA のみが残り、臨床症状が改善する。本研究では、変異が同定されている BCIE 患者においてケラチン 10 の異常部位を含む配列で siRNA を設計することにより異常蛋白の発現を特異的に抑制しようと試みた。その結果、正常なケラチン 10 においては、siRNA 導入により mRNA レベルで発現が抑制されることを realtime PCR で確認することができ、持続的な抑制によりケラチン 10 の発現が十分抑えられると考えたが、経時的に観察したところ、重要な細胞骨格を形成するケラチン 10 を持続的に抑制することにより、細胞が死滅してしまうことが観察された。次に、異常なケラチン 10 の生成のみを特異的に抑えるため、BCIE 患者の変異部位を認識するように複数の siRNA を設計し導入を行ったが、mRNA レベルで効果的に発現抑制は確認されていない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝性疾患や癌など遺伝子異常が発症に関与する疾患に対し、RNAiを用いた遺伝子治療に関する研究が報告されている。RNAiは、21～23塩基の二本鎖RNAからなるsmall interfering RNA (siRNA)が細胞に導入されると、相同配列を持つ標的遺伝子(mRNA)を破壊することで特定の蛋白質合成のみを特異的に抑制するものである。導入するsiRNAはごく少量でも目的蛋白を劇的に抑制でき、その反応は非常に特異的であることから、遺伝子治療として臨床応用されることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(bullous congenital ichthyosiform erythroderma: BCIE)をモデルとして、RNAiによる遺伝性皮膚疾患の遺伝子治療を行うことである。Antisense oligonucleotideを用いた従来の遺伝子発現抑制とは異なり、RNAiではごく少量のsiRNAの導入によって、大量の目的遺伝子

の抑制が可能であることから、効果的な目的遺伝子の発現抑制が予想される。

BCIEは、表皮細胞に発現するケラチン1または10の遺伝子変異の

dominant-negative effectにより発症する、重症型の常染色体優性遺伝性角化症である。遺伝子変異の同定により出生前診断が可能となったが、まだ根本的な治療についての研究は進んでいない。

理論上、異常なケラチン10をRNAiによりmRNAレベルで特異的に発現抑制(ノックダウン)すると、正常なケラチン10を発現するmRNAのみが残り、臨床症状が改善するという仮説が立てられる。それを検証するために、本研究では、BCIEで認められるケラチン10のhelix initiation motifにおけるメチオニンからスレオニンのミスセンス変異(M150T)を認める患者について、変異部分を認識するsiRNAを設計し導入するという遺伝子治療を目指す。ケラチン10変異によるBCIEに的を絞って、原因遺伝子をもつケラチンの異常部位のみを認識し、実際にノックダウンを行うsiRNAの設計から始め、実際の臨床応用までを目指す。

3. 研究の方法

(1) ケラチン 10 に対する siRNA のデザインとその効果の検証：あらかじめノックダウン効果が確認されている siRNA を用いて、正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞で、効果的にノックダウンが確認できる至適濃度と siRNA 導入のためのトランスフェクション試薬の選定、およびその至適濃度につき条件設定を行っておく。次に、正常なケラチン 10 に対する siRNA を数種類デザインし、上記で定めた条件のもとに培養表皮細胞に導入し、realtime PCR を用いて、mRNA レベルでのケラチン 10 の発現量が特異的に発現低下しているかを確認するとともに、経時的に発現抑制効果を定量し、siRNA の効果発現期間について検討する。

この段階でケラチン 10 に関する RNAi 効果が認められない場合は、①導入する回数を増やしてみる、②培養開始後経時的に導入をしてみる、など様々な条件下で試みるが、それでもノックダウン効果が得られない場合は、M150T 以外の変異について計画 (1) を進める。

2) ケラチン 10 に対する siRNA のアデノウイルスベクターへの組み込みとその効果の確認：上記で実際にノックダウンが確認された siRNA を持続的に発現させる系として、当該 siRNA を short hairpin RNA の形としてアデノウイルスベクターに組み込んだものを生成する。生成されたベクターを、正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞にトランスフェクトし、realtime PCR を用いてケラチン 10 の発現量の低下を確認する。それとともに、経時的に発現低下を確認し、上記 (1) で認められた siRNA の発現抑制の期間と比べ、その持続時間が延長していることを確認する。

3) 異常ケラチン 10 に対する RNAi 効果の発現：培養表皮細胞でケラチン 10 発現を効果的にノックダウンすることを確認後、本研究の目的である BCIE 患者の M150T における変異を認識するようデザインした RNAi 効果についての検討を行う。研究代表者が北大皮膚科魚鱗癬外来にて診

療にあたり、既にケラチン 10 の遺伝子変異が検索されている BCIE の患者の中で、本研究への協力に同意している方々について、該当するケラチン 10 における変異部位の配列を含むように siRNA を複数デザインする。さらに、同患者について完全な informed consent に基づき、本研究用に皮膚生検を行う。患者から採取した皮膚より培養した表皮細胞に、ケラチン 10 の異常部位を認識する siRNA を導入し、realtime PCR を用いてその発現抑制を確認する。

4. 研究成果

(1) ケラチン 10 に対する siRNA のデザインとその効果の検証：あらかじめノックダウン効果が確認されている siRNA を用いて、正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞で、効果的にノックダウンが確認できる至適濃度と siRNA 導入のためのトランスフェクション試薬の選定、およびその至適濃度につき条件設定を行った。

次に、正常なケラチン 10 に対する siRNA を数種類デザインし、上記で定めた条件のもとに培養表皮細胞に導入し、realtime PCR を用いて、mRNA レベルでのケラチン 10 の発現量を測定したところ、特定の siRNA において、ケラチン 10 発現が特異的に低下していることが確認された。また、経時的に発現抑制効果を定量したところ、時間とともに発現抑制効果は高まるが、ある一定以上経過すると培養細胞が死滅してしまうことが検証された。

2) ケラチン 10 に対する siRNA のアデノウイルスベクターへの組み込みとその効果の確認：上記で実際にノックダウンが確認された siRNA を持続的に発現させる系として、当該 siRNA を short hairpin RNA の形としてアデノウイルスベクターに組み込んだものを生成した。生成されたベクターを、正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞にトランスフェクトし、realtime PCR を用いてケラチン 10 の発現量の低下を確認した。経時的にケラチン 10 の発現は低下するももの、一定時間の後に細胞が死滅するため、持続的な発現抑制の確認には至らなかった。

3) 異常ケラチン 10 に対する RNAi 効果の発現：培養表皮細胞でケラチン 10 発現を効果的にノックダウンすることを確認後、本研究の目的である BCIE 患者の M150T における変異を認識するようデザインした RNAi 効果についての検討を行った。事前に変異が同定されている BCIE 患者において、ケラチン 10 における変異部位の配列を含むように siRNA を複数デザインし、上記（1）と同様に導入を行ったが、現在のところ realtime PCR で明らかなケラチン 10 の mRNA 抑制を確認するには至っていない。

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 6 件）

- 1) Abe R, Murase S, Nomura Y, Natsuga K, Tateishi Y, Tomita Y, Tsuji-Abe Y, Matsumura T, Shimizu H. Acquired perforating dermatosis appearing as elastosis perforans serpiginosa and perforating folliculitis. *Clin Exp Dermatol.* 33, 653-4, 2008、査読有
- 2) Shinkuma S, Nishie W, Shibaki A, Sawamura D, Ito K, Tsuji-Abe Y, Natsuga K, Chan PT, Amagai M, Shimizu H. Cutaneous pemphigus vulgaris with skin features similar to the classic mucocutaneous type: a case report and review of the literature. *Clin Exp Dermatol.* 33, 724-8, 2008、査読有
- 3) Goto-Ohguchi Y, Nishie W, Akiyama M, Tateishi Y, Aoyagi S, Tsuji-Abe Y, Sawamura D, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H. A severe and refractory case of anti-p200 pemphigoid resulting in multiple skin ulcers and scar formation. *Dermatology.* 218, 265-71, 2009、査読有

- 4) Yaosaka M, Abe R, Ujiie H, Abe Y, Shimizu H. Unilateral periorbital oedema due to sarcoid infiltration of the eyelid: an unusual presentation of sarcoidosis with facial nerve palsy and parotid gland enlargement. *Br J Dermatol.* 157, 200-2, 2007、査読有
- 5) Nemoto I, Shimizu T, Fujita Y, Tateishi Y, Tsuji-Abe Y, Shimizu H. Tumour-like muscular sarcoidosis. *Clin Exp Dermatol.* 32, 298-300, 2007、査読有
- 6) Natsuga K, Akiyama M, Kato N, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Nishimura M, Hata H, Abe M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Onozuka T, Aoyagi S, Kodama K, Ujiie H, Tomita Y, Shimizu H. Novel ABCA12 mutations identified in two cases of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma associated with multiple skin malignant neoplasia. *Invest Dermatol.* 127, 2669-73, 2007、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部由紀子 (ABE YUKIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：40374433

(2) 研究分担者

秋山真志 (AKIYAMA MASASHI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60222551

(3) 連携研究者

なし