

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591333
 研究課題名（和文）ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた難治性潰瘍の遺伝子治療
 研究課題名（英文）Gene therapy for refractory skin ulcer by using Histone deacetylase inhibitor
 研究代表者
 安川 香菜 (YASUKAWA KANA)
 北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
 研究者番号：10419202

研究成果の概要（和文）：

本研究で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACI）を用いることによる遺伝子導入効果の増強が明らかとなった。これらの遺伝子導入増強効果は局所注射だけでなく、局所外用でも認められ、その効果も一過性であることが明らかとなった。しかし、成長因子遺伝子を用いた研究で潰瘍縮小効果が認められなかったことから、遺伝子導入回数や成長因子の組合せなどの検討が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrated that HDAC inhibitors increased transient transgene expression. This effect was observed by not only local injection but also external use. However, an ulcer reduction effect was not observed in the study using the growth factor gene. For this result, it was thought that the examination of the gene introduction number of times and the combination of growth factors were necessary.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

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：皮膚炎症、再生医療、免疫、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、膠原病、閉塞性動脈硬化症などの血行障害を背景とした疾患では、外的刺激などで容易に皮膚に潰瘍を形成する。これらの潰瘍は種々の治療に抵抗性であり、潰瘍が長期に続くことより二次感染が続発する場合もある。ゆえに、より効果的な潰瘍に対する治療が切望されている。創傷治癒の過程では様々な成長因子が重要な役割を果たし

ており、本邦ではヒト組換え型 fibroblast growth factor (FGF)が臨床応用されている。しかし、製法の煩雑さや精製コストにより製剤が極めて高価となり、使用が限定されているのが実情である。一方、皮膚は局所投与あるいは外用など治療に関してアプローチしやすい臓器であるため、遺伝子治療の格好のターゲットとなる。遺伝子を運ぶベクターは容易に増幅可能であり、直接患部で成長因子

を発現するため、低コストでかつ効果的な治療が期待できる。実際に欧米では慢性潰瘍に対して、hepatocyte growth factor (HGF)とplatelet-derived growth factor A (PDGF-A)の遺伝子治療の治験が行われている。この際、成長因子の発現は一過性であることが望ましく、また生体への影響を考慮するとウイルスベクターは使用できないため、リポ製剤による遺伝子導入が選択されている。このため細胞への遺伝子導入の効率が悪く、発現の低下によって十分な治療効果は得られていない。

核の中では染色体 DNA はヒストンというコア蛋白に巻かれた形で存在するが、このヒストンがアセチル化されると、蛋白の構造が変化して転写因子が作用しやすくなり、遺伝子の発現が増強する。しかし、アセチル化はヒストン脱アセチル化酵素によって速やかに解除されるため、遺伝子発現の増強は持続し得ない。このヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤 (HDACI) に着目した研究が近年相次いでいる。本研究によって明らかになる新しい遺伝子導入法は難治性潰瘍患者の QOL を著しく改善させるだけでなく、皮膚悪性腫瘍や悪性腫瘍の皮膚転移例にサイトカイン遺伝子を導入するなど他の遺伝子治療にも応用が期待できる。

2. 研究の目的

血行障害を背景とする皮膚潰瘍は治療に抵抗性で長期化する。本研究の目的は、これら難治性潰瘍に対して効果的な治療を可能とする遺伝子導入法の開発である。HDACI を遺伝子導入時に投与し、遺伝子導入効果の増強を確認し、その条件設定を行う。さらに明らかとなった遺伝子導入法を用いて、最も治療効果のある遺伝子 (成長因子など) を決定して条件設定を行う。以上の結果から、HDACI を用いた難治性潰瘍への臨床応用を目指すことが目的である。また、この経皮的な遺伝子導入法は難治性潰瘍の治療のみならず、皮膚悪性腫瘍や悪性腫瘍の皮膚転移例にサイトカイン遺伝子を導入するなど他の遺伝子治療にも応用ができるため、安全性が高く効率的で経済的な遺伝子治療の発展へとつながることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では難治性潰瘍モデルラットを用いて潰瘍を形成し、遺伝子導入して潰瘍治癒状態を分子生物学的検索、免疫学的検索を行う。糖尿病は創傷治癒が遅延し難治性潰瘍をつくりやすいことから、糖尿病のモデルラット

を実験動物として使用する。

(予備実験) : in vitro (ヒト培養線維芽細胞) における HDACI の外来遺伝子 (β -galactosidase ; β -gal) 発現増強の確認。

ヒト培養線維芽細胞に対して、 β -gal 遺伝子を組み込んだベクターを作成し HDACI (FK228,CHAP31,TSA-1) 投与と同時に遺伝子導入剤 (リポ製剤) で導入する。24~72 時間後に real time PCR,RT-PCR により、RNA レベルで、アッセイキットを用いた β -gal 活性測定により蛋白レベルで確認する。

(1) 計画-1 : in vivo (局所注射) における HDACI の外来遺伝子 (β -gal) 発現増強の検討

a) 麻酔下でラット背部に皮膚欠損を作成し、 β -gal 遺伝子を組み込んだベクターを作成し HDACI (FK228) 投与と同時に遺伝子導入剤 (リポ製剤) で導入する。24~72 時間後、一週間後にラット背部より皮膚生検を行う。これにより、HDACI による外来遺伝子増強を real time PCR,RT-PCR により、RNA レベルで、アッセイキットを用いた β -gal 活性測定により蛋白レベルで確認し、さらに抗 β -gal 抗体を用いた免疫組織化学法により β -gal 発現細胞と発現範囲を観察する。

b) これらを半減期の異なる HDACI (CHAP31,TSA-1) についても検討し、 β -gal の発現がもっとも増強される HDACI の種類とその至適濃度を決定する。

(2) 計画-2 : in vivo (局所外用) における HDACI の外来遺伝子 (β -gal) 発現増強の検討。

研究計画-1 の局所注射を局所外用にして同様に検討する。

(3) 計画-3 : 局所注射による成長因子遺伝子発現増強と創傷治癒促進効果の検討。

a) 計画-1 の外来遺伝子 (β -gal) を HGF, PDGF あるいは、Insulin-like growth factor(IGF-1)遺伝子に変えて行う。

b) 潰瘍の大きさ (縦×横) を経時的に計測し縮小率に差があるかどうかを検討する。

(4) 計画-4 : 局所外用による成長因子遺伝子発現増強と創傷治癒促進効果の検討。

計画-3 の局所注射を局所外用にして同様に検討する。

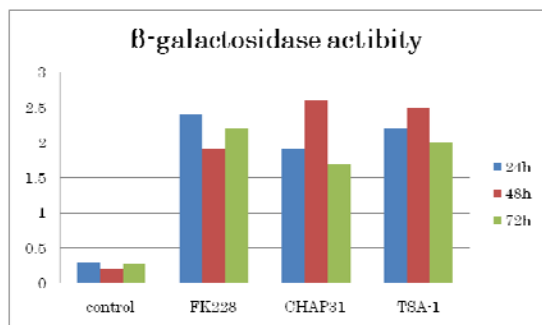
計画-5 : 臨床応用への検討。

計画 1~4 によって得られた条件において臨床応用を検討する。

4. 研究成果

(予備実験) : in vitro (ヒト培養線維芽細胞)

における HDACI の外来遺伝子 (β -galactosidase ; β -gal) 発現増強の確認。予備実験としてヒト培養線維芽細胞への HDACI(FK228, CHAP31, TSA-1)の外来遺伝子 (β -galactosidase ; β -gal) 発現増強の検討を行った。各 HDACIとも HDACIを用いないコントロールに比して、8 倍から 13 倍までの発現増強を確認した。(図：アッセイキットによる β -galactosidase 活性測定)



(1) 計画-1 : in vivo (局所注射) における HDACI の外来遺伝子 (β -gal) 発現増強の検討。

皮膚欠損を人工的に作成した糖尿病モデルラットに、マーカー (β -gal) を有するベクターをその周囲に遺伝子導入剤とともに皮下注射した (C群)。もう一群には導入の際 HDAIC (FK228) を一緒に投与し (H群)、 β -gal 発現量を real time PCR、RT-PCR により比較した。両群とも m-RNA 量は導入後 24 時間後にピークとなり以後は減弱した。H 群では C 群の 10 倍の RNA 発現を認め、HDACI が外来遺伝子を増強することが RNA レベルで確認された。遺伝子導入されたラット組織のアッセイキットを用いた β -gal 定量においても H 群は C 群の約 8 倍であり、蛋白としての発現増強も確認された。尚この増強は 72 時間にピークがみられ 1 週間後まで持続した。抗 β -gal 抗体を用いた免疫組織化学による解析では、発現細胞は主に真皮上層の線維芽細胞であった。次に半減期の異なる 2 つの HDACI(CHAP31,TSA-1)について同様の実験を行い、FK228 と発現増強に差があるかどうか検討したが、増強程度は同様で有意差はみられなかった (図： β -gal アッセイキットによる活性解析)。さらに、HDACI の至適濃度設定の検討において、高濃度で細胞障害性による刺激反応を誘発した。

(2) 計画-2 : in vivo (局所外用) における HDACI の外来遺伝子 (β -gal) 発現増強の検

討。

次に計画-1 と同様に皮膚欠損を作成したラットに、 β -gal ベクターと遺伝子導入剤を皮下注射ではなく直接欠損部に塗布し前記と同様の実験を行った。m-RNA 量は両群とも 24 時間後にピークとなり以後は減弱した。H 群では C 群の 6 倍の RNA 発現を認めた。アッセイキットによる蛋白としての発現解析も 4 倍であり単純塗布においても HDAIC は外来遺伝子を増強することが RNA レベルで確認された。抗 β -gal 抗体を用いた免疫組織化学による解析でも同様で、発現細胞は主に真皮上層の線維芽細胞であった。またこの実験でも各 HDACI 間で差は認められなかった。

(3) 計画-3 : PDGF と IGF-1 の HDACI による発現増強は β -gal に比して低く、RNA レベルで 3 倍、蛋白レベルでは 2 倍程度であった。ラットの皮膚欠損は時間とともに収縮し最終的に治癒したが、遺伝子導入の有無、HDACI の種類でその期間に差は認められなかった。その効果については、本邦で行われているヒト組換え型 fibroblast growth factor に対して優位な縮小効果を見いだせなかった。

(4) 計画-4 : 局所外用においても計画-3 の結果と同様に導入遺伝子、HDACI の有無でその期間に差は認められなかった。

(5) 結語 : 本研究により、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いることにより、遺伝子導入効果の増強が確認された。局所注射による外来遺伝子発現増強は RNA レベルで約 10 倍、蛋白レベルで約 8 倍であった。局所外用においても RNA レベルで 6 倍、蛋白レベルで 4 倍となった。効果の持続性も RNA レベルで 24 時間後、蛋白レベルで 72 時間後にピークを迎えて以後減少し、増強効果が一過性であることを証明した。しかし、成長因子 (PDGF, IGF-1) 遺伝子導入の増強効果は RNA レベルでも蛋白レベルでも確認されたものの、 β -gal 遺伝子導入に比して半分と低かった。さらに、潰瘍の縮小効果についても、用いた HDACI、成長因子の有無や種類において差を認めなかった。これら導入遺伝子の増強効果は認められるものの、潰瘍の縮小効果が認められなかった結果は、HDACI の至適濃度の検討が不十分であった可能性や、用いた成長因子を組み込んだベクターの問題、もしくは単独の成長因子では不十分であった可能性が考えられる。本研究で、HDACI は低い濃度では十分な遺伝子導入の増強効

果を発揮できないが、高い濃度では細胞障害性を示し、その至適濃度の決定は非常に難しかった。HDACI は選択的に癌細胞のみにアポトーシスを誘導するとされているが、その機序は解明されていない。今回の細胞障害性がHDACIの正常細胞に対するアポトーシス誘導によるものかは不明だが、高い濃度や長期の使用には適さないことは明らかである。今回の研究でHDACIの遺伝子導入増強効果が一過性であることが明らかになったが、潰瘍縮小効果は低いため、HDACIによる複数回の遺伝子導入、もしくは複数の成長因子を組み合わせて用いるなどの検討が必要と考えられる。

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5件)

1. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao HJ, Morioka H, Shinkuma S, Natsuga K, Long HA, Nishie W, Shimizu H. Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model. *Journal of Immunology*, 査読有, 185(12), 2010, 7746-55
2. 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-PLA1 alpha in autosomal recessive hypotrichosis. *Human mutation*, 査読有, 31(5), 2010, 602-10
3. Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, McMillan JR, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H. Blockade of autoantibody-initiated tissue damage by using recombinant fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *Human mutation*, 査読有, 31(5), 2010, 602-10
4. 安藤佐土美, 津田玲子, 安川香菜, 他, Synovitis-Acne-Pustulosis-Hyperostosis-Osteomyelitis 症候群の1例, 皮膚科

の臨床, 査読有, 51, 2009, 665-8

5. Yasukawa K, Kato N, Hamasaka A, Hata H. Unusual annular purpura and erythema in a patient with malignant lymphoma accompanied with hyperglovinemia. *International Journal of Dermatology*, 査読有, 47(3), 2008, 302-4

[学会発表] (計2件)

1. 馬場慶子, 安川香菜, Adenoma of the nipple の1例, 第384回日本皮膚科学会北海道地方会, H22.12.11, 札幌市
2. 馬場慶子, 安川香菜, 扁桃炎を契機に急性汎発性嚢胞性細菌疹を繰り返した1例, 第383回日本皮膚科学会北海道地方会, H22.8.28, 札幌市

6. 研究組織

(1)研究代表者

安川 香菜 (YASUKAWA KANA)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号: 10419202

(2)研究分担者

芝木 晃彦 (SHIBAKI AKIHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号: 40291231

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