

平成22年05月21日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790781
 研究課題名 (和文)
 表皮水疱症に対する遺伝子治療効果の検証：疾患モデルマウスのトランスジェニック救済
 研究課題名 (英文)
 Analysis of the gene therapy for epidermolysis bullosa using transgenic rescue experiments of the disease model mice
 研究代表者：伊藤 圭 (ITO KEI)
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号：20421977

研究成果の概要 (和文)：表皮水疱症において、表皮、真皮のいずれに遺伝子を導入しても、基底膜部に機能的な係留線維を形成しうることが生体内で証明され、将来遺伝子治療が行われる際への提言となった。また、変異遺伝子を導入しヒト表皮水疱症と同様の臨床像を呈する長期生存マウスの開発に成功したことは、今後の疾患治療実験に使用でき、かつ個々の表皮水疱症患者における変異遺伝子がもたらす疾患予後の推測やテーラーメイド医療開発にも繋がる意義が大きい研究であると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Recessive dystrophic epidermolysis bullosa comprises a group of hereditary bullous disease caused by mutations in the type VII collagen gene (*COL7A1*) that is a major component of anchoring fibril. We have investigated anchoring fibril formation in the *Col7a1* knockout mice that express human *COL7A1* in epidermal keratinocytes or dermal fibroblasts, using transgenic rescue experiments. In both rescue mice, normal anchoring fibril formation was seen within basement membrane zone. These data indicate that we can select either keratinocytes or fibroblasts as target cells in case of gene therapy for epidermolysis bullosa. Furthermore, using same transgenic rescue experiments, we were able to generate surviving animal models of epidermolysis bullosa with mutated human *COL7A1* gene. This model has great potential for future research into the pathomechanisms of epidermolysis bullosa and the development of gene therapies for epidermolysis bullosa patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

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であり、皮膚基底膜に存在する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により発症する。有効な治療法は未だない。そのような中、将来的に行われる遺伝子治療が有効的な治療になり得るのか疾患モデルマウスに遺伝子導入し検証することを計画した。

2. 研究の目的

重症型表皮水疱症のモデル動物に対してトランスジェニック救済(transgenic rescue)実験を行い、将来的に遺伝子治療を施行した状態を再現し、本症に対する遺伝子治療の有用性を生体レベルで初めて検証することである。

3. 研究の方法

(1)VII型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウスの準備：表皮水疱症研究の世界的権威である Jefferson 医科大の Jouni Uitto 教授から供与を受け、C57BL マウスに戻し交配を行った。

(2)VII型コラーゲントランスジェニックマウスの作成：表皮角化細胞、真皮線維芽細胞、個体の全細胞にヒトVII型コラーゲン遺伝子を強制発現させるトランスジェニックマウスをマイクロインジェクション法によりそれぞれ作成した。

(3)ノックアウトマウスのトランスジェニック救済：ノックアウトマウスとそれぞれのトランスジェニックマウスの交配を重ね、マウスのVII型コラーゲンを持たず導入したヒトVII型コラーゲンのみを持つマウスの作成（救済実験：レスキュー実験）を行った。

(4)トランスジェニック救済マウスの検討：臨床的長期予後の観察とともに、機能的な係留線維形成が行われているかを蛍光抗体法や免疫電顕法にて解析する。

(5)新規の長期生存モデルマウスの作成と解析：同手法により変異ヒトVII型コラーゲン遺伝子を導入した救済実験を行い解析した。

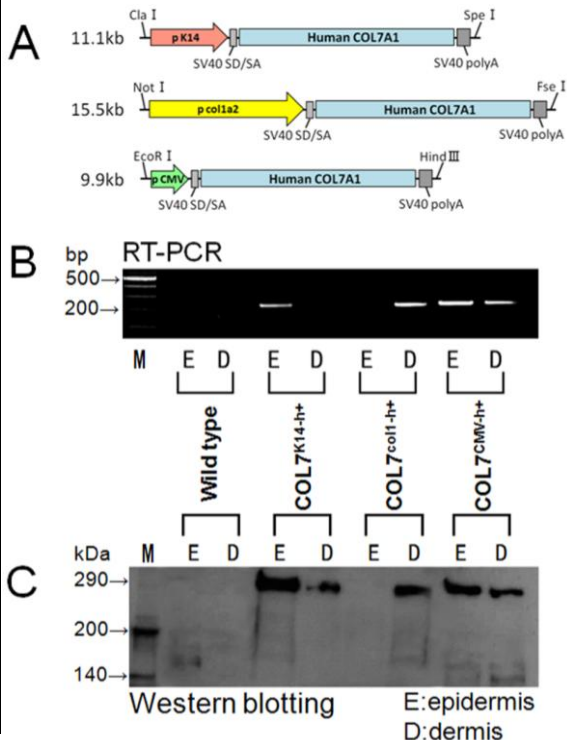
4. 研究成果

(1)表皮角化細胞にヒトVII型コラーゲン遺

伝子を強制発現させるべくケラチン14プロモーター（約2kb）の調節下にヒトVII型コラーゲン全長のcDNAを組み込んだコンストラクトを作成、同様に真皮線維芽細胞にヒトVII型コラーゲンを強制発現させるべくI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖のプロモーター（約8kb）の調節下にヒトVII型コラーゲン全長のcDNAを組み込んだコンストラクトを作成、また個体全身の細胞に強制発現させるコンストラクトを作成した。各々のコンストラクトをC57BLマウスの前核期胚にマイクロインジェクションを行い、トランスジェニックマウスを作成した。

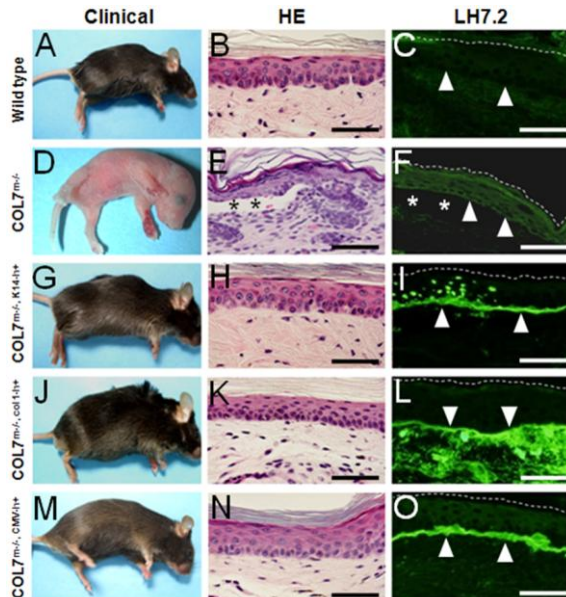
A：ヒトVII型コラーゲン全長を組み込んだ各々のコンストラクト

B, C：RT-PCRおよびWestern blotting法によるトランスジェニックマウスの解析；表皮角化細胞にヒトVII型コラーゲンを強制発現させるトランスジェニックマウスでは表皮角化細胞に、真皮線維芽細胞に発現させるトランスジェニックマウスでは真皮線維芽細胞に、全身の細胞に発現させるトランスジェニックマウスでは表皮・真皮両者にヒトVII型コラーゲンのmRNAおよび蛋白を確認した。

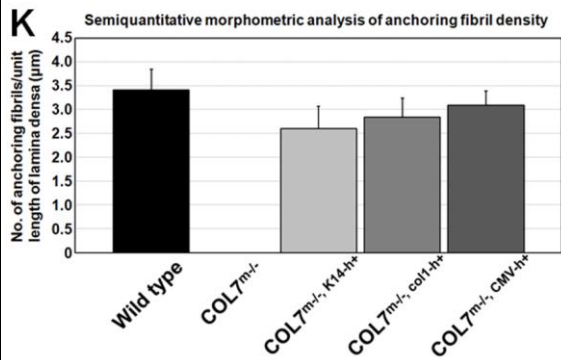
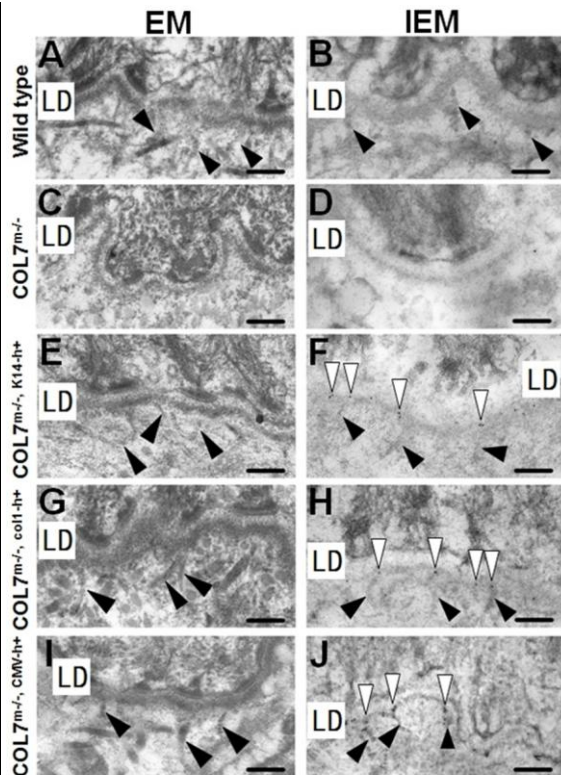


(2) マウス VII 型コラーゲンノックアウトマウス（ヘテロ）と各々のトランスジェニックマウスの交配を重ね、マウスの VII 型コラーゲンを持たず導入したヒト VII 型コラーゲンのみを持つマウスの作成（救済実験：レスキュー実験）を行った。

A, B, C: ワイルドタイプマウス
 D, E, F: ノックアウトマウス（ホモ）；表皮下水疱がみられる（全例 2 週間以内に死亡）。
 G, H, I: 表皮発現パターンレスキューマウス、J, K, L: 真皮発現パターンレスキューマウス、M, N, O: 全身発現パターンレスキューマウス；いずれのレスキューマウスにおいても臨床的にワイルドタイプと成長も含め差異はなく、組織学的に水疱を認めず、かつ蛍光抗体法では基底膜上にヒト VII 型コラーゲンの線状の沈着が見られた。



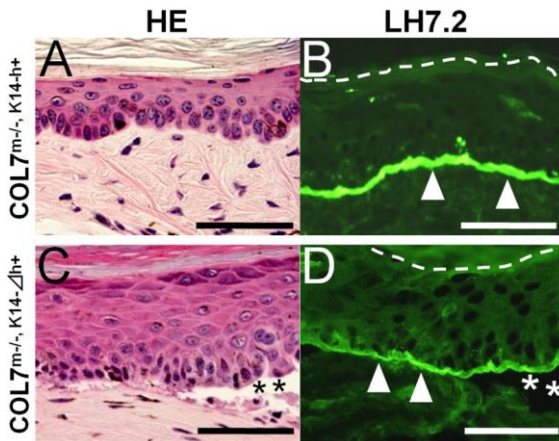
(3) 表皮 (E, F)・真皮 (G, H)・個体全細胞 (I, J) いずれのレスキューマウスにおいても電子顕微鏡による超微細構造の解析において、基底膜から真皮内に半弧状に存在する係留線維の形成を確認することができ、かつ免疫電子顕微鏡による解析では、基底膜部に VII 型コラーゲンの N 末端（係留線維の基底膜部への付着部）を指し示す金コロイドを認めた。なお、形成された係留線維の数を半定量的に解析したところ、個体全細胞発現パターンレスキューマウスが一番多く、続き真皮発現パターン、比較し一番少なかったのが表皮発現パターンであった (K)。



(4) ヒト栄養障害型表皮水疱症類似の新規モデル動物を作成するため、同様の手法でケラチン 14 プロモーターの下流に変異ヒト VII 型コラーゲン cDNA (7528de1G) を持つコンストラクトを作成しトランスジェニックマウスを作成、およびレスキュー実験を行った。K~O はヒト栄養障害型表皮水疱症であるが、変異遺伝子によるレスキューマウスは、ヒト本疾患類似の臨床像、脱毛 (F)、歯牙形成不全 (G)、成長するにつれ手足の棍棒状の癒着を認めた (H；生後 14 日, I；生後 30 日, J；生後 60 日)。
 また、VII 型コラーゲンノックアウトマウス（ホモ）は生後 2 週間以内に全例死亡してしまうが、変異遺伝子導入によるレスキューマウスは、約 6 ヶ月間生存した (F~J)。



変異遺伝子導入レスキューマウスの皮膚組織の蛍光抗体法による解析では、基底膜上に線状にヒト VII 型コラーゲンの発現を認めるものの、組織学的にヒト栄養障害型表皮水疱症同様に表皮下に水疱を認めた (C, D)。



(5) 栄養障害型表皮水疱症は、表皮真皮境界部を構成する構造蛋白 (係留線維) をコードする VII 型コラーゲン遺伝子の変異により発症し、生涯にわたり全身性の水疱形成、びらん、潰瘍を繰り返す遺伝性皮膚疾患である。未だ有効な治療法はなく、水疱やびらん、潰瘍に対する対症的治療が行われているにすぎない。今回、将来的に (自家) 培養表皮もしくは培養真皮に遺伝子導入治療がなされることを想定して、表皮角化細胞もしくは真皮線維芽細胞を遺伝子導入のターゲットとしたレスキュー実験を生体内 (マウス) にて行った。そうしたところ、表皮、真皮いずれに VII 型コラーゲン遺伝子を導入しても基底膜部で機能的な係留線維の形成がなされることを実証することができた。このことは将来的に遺伝子治療が行われる際の大きな指標になると考える。すなわち、導入細胞を選択することができない直接 gene gun で遺伝子導入を行う方法であっても係留線維の形成が期待できることを意味する。また、培養皮膚に導入する際にも、培養表皮であれ培養

真皮であれ、より培養しやすいものを自由に選択しても係留線維の形成に支障がないことも意味する。

生体内 (マウス) にて遺伝子治療が有効であることは実証したが、治療対象動物として本研究でも使用したマウス VII 型コラーゲンノックアウトマウス (ホモ) は生後 2 週間以内に全例死亡してしまうため、治療実験に用いることは困難であった。今回、変異ヒト VII 型コラーゲン遺伝子導入にてレスキューしたマウスは、ヒト栄養障害型表皮水疱症同様の臨床像および組織像を呈し、かつ 6 カ月という長期生存が可能であった。この新規モデル動物の開発に成功したことは、今後の治療実験を行っていく上での大きな足掛かりになると考えられた。また、遺伝子的背景と臨床徴候を持ち合わせたモデル動物を開発する本研究の手法は、皮膚科学における表皮水疱症のみならず、多くの遺伝性疾患の長期的臨床予後の予測や個々のテーラーメイド医療にも繋がる大きな提言となったと考える。

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 1 件)

- ① Kei Ito, Daisuke Sawamura, Maki Goto, Hideki Nakamura, Wataru Nishie, Kaori Sakai, Ken Natsuga, Satoru Shinkuma, Akihiko Shibaki, Jouni Uitto, Christopher P. Denton, Osamu Nakajima, Masashi Akiyama and Hiroshi Shimizu, Keratinocyte-/fibroblast-targeted rescue of *Col7a1* disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human *COL7A1* mutation, The American Journal of Pathology, 査読有, Vol 175, 2009, 2508-2517

[学会発表] (計 1 件)

- ① 伊藤 圭, 澤村大輔, 西江 涉, 中村秀樹, 後藤真希, Jouni Uitto, Christopher P Denton, 中島 修, 清水 宏
Surviving animal model of dystrophic epidermolysis bullosa with a human mutated gene toward tailored therapies
第 30 回水疱症研究会 東京 2008. 10. 26.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 圭 (ITO KEI)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：20421977

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし