

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02943

研究課題名(和文) 復帰変異モザイクモデルマウスを用いた表皮細胞の増殖優位性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for revertant mosaicism using model mice

研究代表者

新熊 悟 (Shinkuma, Satoru)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00613788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：表皮水疱症の復帰変異モザイクの面積は他の疾患に比し極めて大きく、表皮水疱症の復帰変異モザイクは増殖優位性を獲得していることが示唆される。そこで、本研究では、表皮細胞の増殖優位性を獲得する機序を解明するため、遺伝子編集技術を応用した復帰変異モザイクを有する表皮水疱症モデルマウスを世界で初めて作製した。

実際には、Col17a1遺伝子に複合ヘテロ接合性に欠失変異をもった接合部型表皮水疱症モデルマウスを作製し、さらに、これらの変異部の間に存在する部位を特異的に切断するCRISPR/Cas9システムを皮内投与したところ、復帰変異モザイクの誘導を行うことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性皮肤病疾患の根治的治療の有望な選択肢である遺伝子治療は、全身への遺伝子治療した細胞の移植が必要であり、安全面やコスト面から実現困難である。もし遺伝子治療した細胞が周囲に対して優位に増殖すれば、最小限の移植で広範囲に効果を波及させることが可能になる。表皮水疱症の復帰変異モザイクの面積は他の疾患に比べて大きく、増殖優位性を獲得していることが示唆されている。本研究では、表皮細胞の増殖優位性を解明するため、復帰変異モザイクを有する表皮水疱症モデルマウスを作製した。この成果は、復帰変異モザイクの研究に留まらず、遺伝子・再生治療戦略のブレークスルーにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The area of revertant mosaicism in epidermolysis bullosa is significantly larger compared to other diseases, suggesting that revertant cells in epidermolysis bullosa acquire a proliferative advantage. In this study, to elucidate the mechanism by which epidermal cells acquire proliferative advantage, we created epidermolysis bullosa model mice with revertant mosaicism using gene editing technology.

We generated junctional epidermolysis bullosa model mice with compound heterozygous deletion mutations in the Col17a1 gene. Furthermore, by intradermally administering a CRISPR/Cas9 system that specifically cleaves the region between these mutations, we successfully induced revertant mosaicism.

研究分野：皮膚科

キーワード：表皮水疱症 遺伝子編集 復帰変異モザイク 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症やネザートン症候群などの遺伝性皮膚疾患に対し、遺伝子治療の治験や基礎研究が行われている (Shinkuma et al., PNAS 2016; Takashima, Shinkuma et al., JID 2019)。しかし、全身に病変を伴う遺伝性皮膚疾患では遺伝子治療した細胞を全身に移植する必要があり、数億円以上の費用がかかる。さらに十分な細胞数を確保するため、遺伝子治療した多様な細胞クローンを用いる必要があり、安全面の課題も克服する必要がある。もし遺伝子治療した細胞が周囲の細胞に対し増殖優位性を有していた場合、最小限の移植で広範囲にその効果を波及することが可能になり、これらの問題を克服できる。

一部の遺伝性皮膚疾患では、後天的に一部の遺伝子が正常化する復帰変異モザイクが認められる。これは体細胞分裂時の相同組換え (染色体組換え) によって生じる。近年、この復帰変異モザイク細胞を用いた再生医療が臨床応用化された (Matsumura, Fujita, Shinkuma et al., JID 2019)。この復帰変異モザイクは様々な遺伝性皮膚疾患で認められるが、表皮水疱症の復帰変異モザイクの面積は他の疾患に比し極めて大きい (図 1)。しかし、疾患ごとに認められる復帰変異モザイクの大きさの違いに関する研究は皆無である。この機序を解明し、効率的に機能不全に陥った細胞を正常な細胞と置換することが可能になれば、遺伝子治療や再生医療技術の発展に大きく寄与することが期待できる。



図1 表皮水疱症(左)の復帰変異モザイクは角化症(右)と比較し、著明に大きい。

表皮水疱症は表皮-真皮間の接着タンパク質の異常によって全身に水疱・びらんを生じる。接合部型表皮水疱症の責任タンパク質である 17 型コラーゲン (COL17) の細胞競合への関与が示唆されているが (Watanabe et al. Elife, 2017, Liu N et al. Nature.2019)、その他の表皮水疱症においても広範囲の復帰変異モザイクが認められるため、増殖優位性の獲得には様々な要因が存在することが予想される。

### 2. 研究の目的

復帰変異モザイクで認められる増殖優位性の獲得機序を遺伝子治療に応用することで、一部の皮膚を遺伝子治療するだけで治療した細胞が自律的に増殖し、広範囲で未治療の細胞と置き換えることが可能になる。本研究により、将来的に遺伝性皮膚疾患に対する遺伝子治療の社会実装が可能になるだけでなく、悪性腫瘍に対して増殖優位性を有する細胞を投与することで癌細胞を淘汰することも可能な、画期的な治療法の開発につながる可能性がある。

そこで、本研究では細胞競合に優位な表皮幹細胞の同定、復帰変異モザイクの増殖優位性における上皮-間葉転換の役割の解明などにつながる、復帰変異モザイクを有する表皮水疱症モデルマウスを作製することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 複合ヘテロ接合性 Col17a1 欠損マウスの作製

復帰変異モザイクは体細胞分裂時の相同組換えによって生じるため、複合ヘテロ接合型遺伝子変異を有するマウスを作製する必要がある。そこで、Col17 遺伝子の exon3 と exon4 にフレームシフト変異を導入したマウスをそれぞれ作製し (図 2A)、これらのマウスを交配することで、それぞれのアレルの exon3 と exon4 にフレームシフト変異を有する複合ヘテロ Col17 欠損マウスを作製する (図 2b)。

(2) 復帰変異モザイクの誘導

複合ヘテロ接合性 Col17a1 欠損マウスの培養表皮細胞もしくはマウスに対し

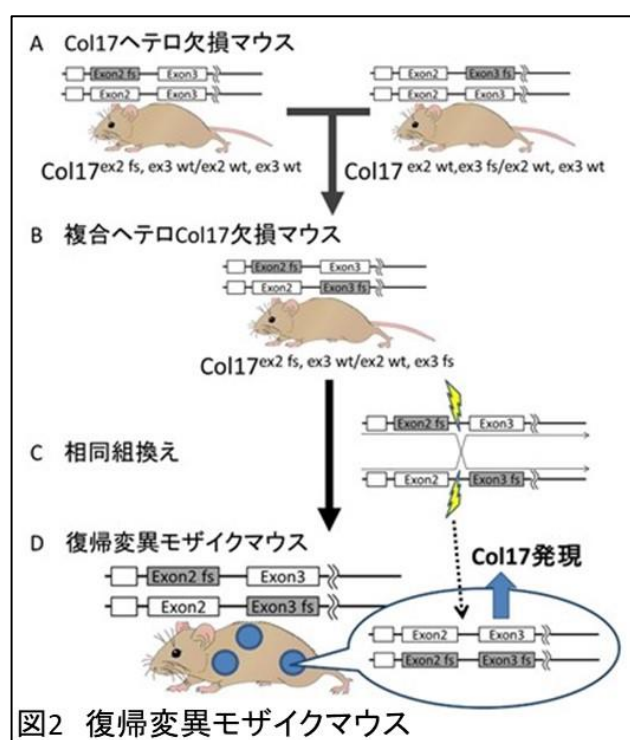


図2 復帰変異モザイクマウス

て、CRISPR/Cas9 発現 AAV ベクターを用いて exon3 と exon4 の間で遺伝子切断することで (図 3C)、一部の細胞で復帰変異モザイクを誘導可能となる。

### (3) 培養細胞レベルにおける復帰変異モザイクの同定

複合ヘテロ接合性 Col17a1 欠損マウスから単離、培養した表皮細胞に対し、exon3 と exon4 の間を特異的に認識する CRISPR/Cas9 発現 AAV ベクターを遺伝子導入し、二本鎖切断を誘導し、免疫蛍光染色、ウェスタンブロットなどを用いて復帰変異モザイク細胞の有無を確認する。

### (4) 生体内における復帰変異モザイクの同定

最後に exon3 と exon4 の間を特異的に認識する CRISPR/Cas9 発現 AAV ベクターを直接モデルマウスに皮内注射し、生体内で復帰変異モザイクを誘導させ、復帰変異モザイクの有無について免疫組織学的解析を用いて解析する。これらの研究により、世界初の復帰変異モザイクモデルマウスが完成する (図 2D)。

## 4. 研究成果

### (1) 複合ヘテロ接合性 Col17a1 欠損マウスの作製

Col17a1 遺伝子の exon3 および exon4 に欠失変異を有するマウスを作製した。さらに、これらのマウスを交配し、複合ヘテロ接合性 Col17a1 欠損マウスを作製することに成功した。このマウスは、接合部型表皮水疱症と類似の臨床症状を取ることが分かった (図 3)。

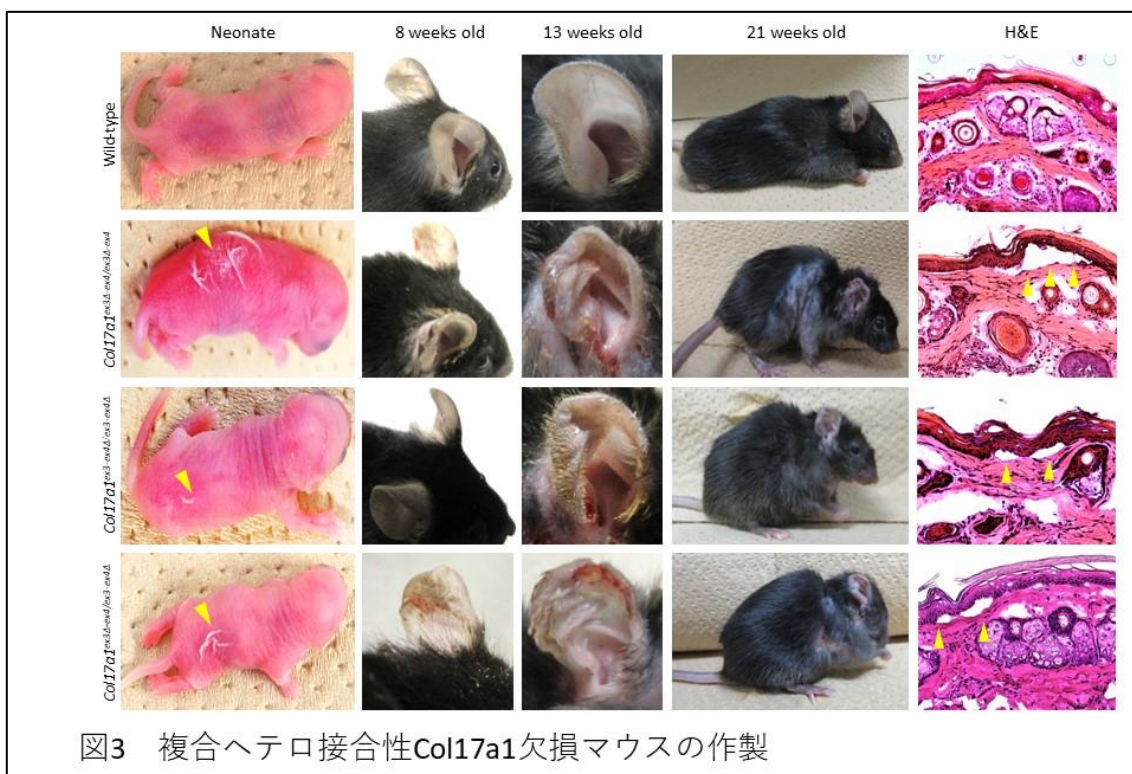


図3 複合ヘテロ接合性Col17a1欠損マウスの作製

### (2) 培養細胞レベルにおける復帰変異モザイクの同定

Col17a1 遺伝子の exon3 と exon4 の間で遺伝子二本鎖切断を誘導したところ、免疫蛍光抗体法にて、一部の細胞で Col17 の発現量が増加していることが分かった。さらに、フローサイトメトリー法やウェスタンブロット法においても発現量の増加を確認することができた。

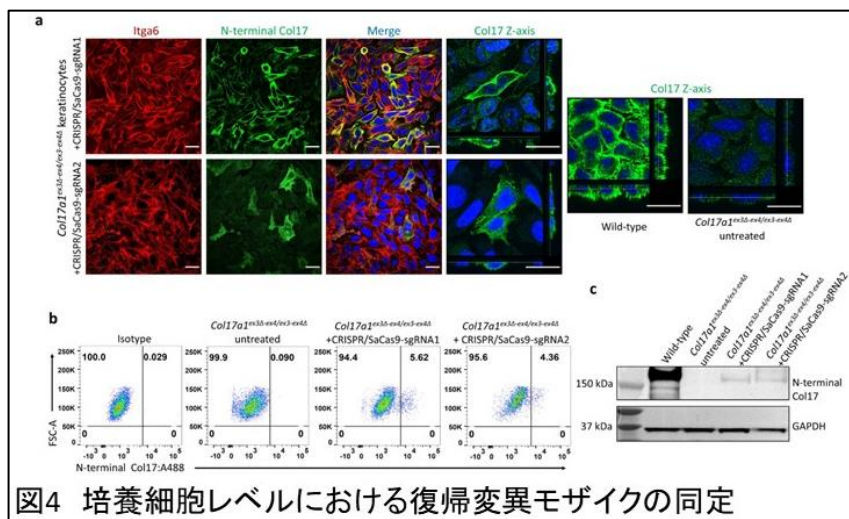


図4 培養細胞レベルにおける復帰変異モザイクの同定



(3) 生体内における復帰変異モザイクの同定

同様に、Col17a1 遺伝子の exon3 と exon4 の間で遺伝子二本鎖切断を誘導し、マウス皮膚を採取し、whole mount staining 法にて Col17 の発現の有無を確認したところ、毛包部にて Col17 の発現を有する復帰変異モザイクを同定することに成功した。

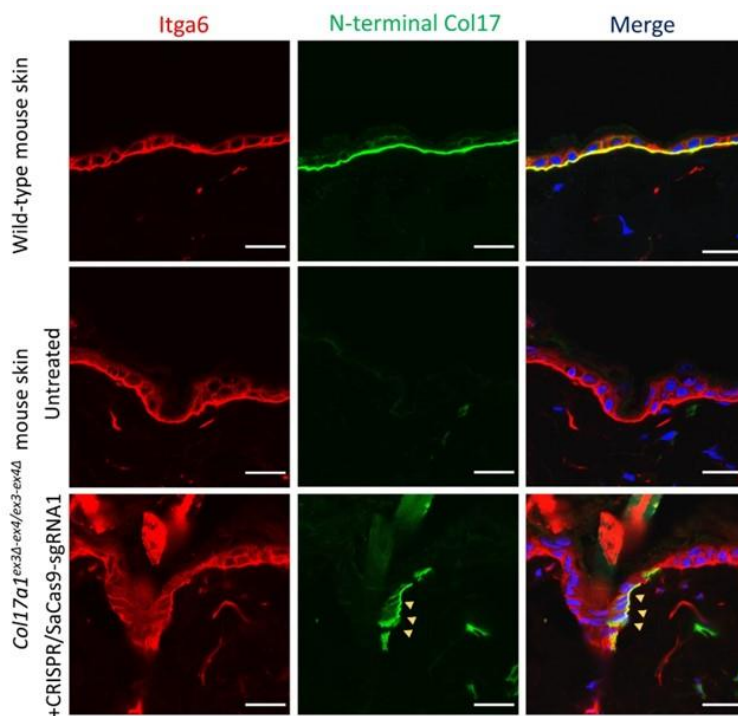


図5 生体内における復帰変異モザイクの同定

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nguyen Hong Ha, Shinkuma Satoru, Hayashi Ryota, Katsumi Tatsuya, Nishiguchi Tomoki, Natsuga Ken, Fujita Yasuyuki, Abe Riichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 New insight of itch mediators and proinflammatory cytokines in epidermolysis bullosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Immunology and Allergy	6. 最初と最後の頁 78～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cia2.12230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shinkuma Satoru	4. 巻 103
2. 論文標題 Advances in gene therapy and their application to skin diseases: A review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 2～9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Natsuga Ken, Shinkuma Satoru, Hsu Chao-Kai, Fujita Yasuyuki, Ishiko Akira, Tamai Katsuto, McGrath John A.	4. 巻 104
2. 論文標題 Current topics in Epidermolysis bullosa: Pathophysiology and therapeutic challenges	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 164～176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Akari, Shinkuma Satoru, Miura Nobuaki, Deguchi Tokiko, Oginezawa Mahoko, Nakajima Mami, Katsumi Tatsuya, Hayashi Ryota, Abe Riichiro	4. 巻 190
2. 論文標題 Possible relation of cathepsin C activity and seasonal fluctuation of skin lesions in Papiillon?Lef?vre syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 272～274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bjd/ljad373	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hong Ha Nguyen, Satoru Shinkuma, Ryota Hayashi, Tatsuya Katsumi, Tomoki Nishiguchi, Ken Natsuga, Yasuyuki Fujita, Riichiro Abe
2. 発表標題 New insight of itch mediators and proinflammatory cytokines in epidermolysis bullosa
3. 学会等名 Society of Investigative Dermatology annual meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新熊 悟
2. 発表標題 モザイク病変と遺伝性皮膚疾患
3. 学会等名 第72回 日本皮膚科学会中部支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hong Ha Nguyen
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 targeting an intronic region for retrieving Col17 expression in junctional epidermolysis bullosa model mice
3. 学会等名 The 46th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------