

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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591215

研究課題名（和文） 水疱を利用した表皮水疱症の新規遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Development of new gene therapies for epidermolysis bullosa

研究代表者

大田 光仁 (OTA MITSUHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：10514242

研究成果の概要（和文）：

難治性先天性皮膚疾患である表皮水疱症のモデル動物の水疱内に、欠損している遺伝子を補充する治療法を開発する研究である。培養細胞では、欠損している遺伝子の補充に成功したが、動物個体では欠損している遺伝子の補充はみられなかった。このため、方針を変更して水疱内に直接培養細胞を投与する手法に切り替えた。結果、投与された培養細胞は、数日間投与部位で機能していることを確認できた。

研究成果の概要（英文）：

This study was aimed at developing a new therapy for epidermolysis bullosa, which is one of the severest congenital skin diseases. The study design was utilizing genetic technologies to introduce genes into blisters of disease model animals. Gene introduction was confirmed when the method was applied to cultured cells. However, when it comes to in vivo experiments, introduced genes were not detected in the injected sites. We modified the strategy in which cultured cells were injected into blisters of the disease model animals. We found that the injected cells were functional at the injected sites for at least several days after the treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：皮膚科学・表皮水疱症・遺伝子治療・水疱・レンチウイルス

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は、皮膚基底膜タンパクの先天的欠損によって生じる重篤な皮膚疾患であり、出生時から全身に皮膚の水疱やびらんを生じる。この疾患では有効な治療が確立されていない。

多くの遺伝性疾患の治療法開発の過程で、遺伝子治療が試みられてきたが、皮膚は全身を覆う臓器であることから、導入効率を上げるのが困難であると考えられてきた。

研究代表者のグループでは、この疾患のモデルマウスである 17 型コラーゲンノックア

ウトマウス (COL17KO マウス) を作成した。このマウスは、他の表皮水疱症モデルマウスとは異なり、20%ほどの個体が長期生存するために治療実験に用いることができるものである。

2. 研究の目的

表皮水疱症における新しい遺伝子治療戦略を開発すること。

3. 研究の方法

(1) COL17KO マウスに機械的刺激を加えて水疱を作成する。

(2) 水疱内に欠損している COL17 を遺伝子導入する。この際、導入方法としてレンチウイルスを用いる。

4. 研究成果

(1) in vitro における遺伝子導入の確立

まず、遺伝子導入の手法を確立するために、COL17KO マウス表皮から培養細胞株を樹立した。この培養細胞にレンチウイルスを用いて、GFP 遺伝子の導入を試みたところ、蛍光顕微鏡下で十分な GFP の蛍光を認めることができた。

この方法を利用して、COL17KO マウス培養表皮細胞に、欠損している COL17 遺伝子をレンチウイルスで導入した。導入後、細胞からライセートを収集し、COL17 遺伝子の発現を蛋白レベル (ウェスタンブロット法) で確認した。

(2) ウイルスの濃縮についての検討

レンチウイルスが in vitro における遺伝子導入で有効であることは十分に判明したが、in vivo で用いる際にはかなりの高濃度で用いる必要があると想定される。In vitro の実験で用いる際には、ウイルスを作成する 293 細胞の上清をそのまま用いていたが、これを濃縮するために超遠心法を用いた。結果、ウイルス液の濃縮に成功し、in vitro での遺伝子導入効率は向上した。

(3) in vivo における遺伝子の水疱内投与

濃縮させたレンチウイルスを用いて、COL17KO マウス背部の水疱に GFP 遺伝子と COL17 遺伝子の導入を試みた。しかし、いずれにおいても導入した遺伝子の発現を表皮の蛋白レベルで認めることはできなかった (染色、ウェスタンブロット法)。

(4) in vivo における細胞の水疱内投与

(3) で遺伝子の直接導入に成功しなかったため、培養細胞の水疱内投与を試みることにした。GFP が全身で強制発現されている GFP トランスジェニックマウスの皮膚から培養表皮細胞株を樹立した。この GFP トランスジ

ェニックマウス培養表皮細胞を COL17 マウス背部の水疱に投与したところ、投与された細胞は少なくとも数日間にわたって水疱内にとどまって GFP を発現していることが明らかとなった。

今後はこの方法を応用して、培養細胞の生着の効率を上げるような別の遺伝子導入や細胞外環境の調整を試みていく必要があるという方向付けが可能となった。

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 18 件)

1) Koguchi H, Arita K, Nakazato S, Moriuchi R, Yamane N, Shinkuma S, Matsumura K, Shimizu H:

An Erythematous Plaque on the Breast: A Quiz.

Acta Derm Venereol, in press (査読付)

doi: 10.2340/00015555-1527.

2) 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 (査読付)

doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05352.x.

3) Toyonaga E, Abe R, Moriuchi R, Ito K, Abe Y, Shimizu H:

Indomethacin for refractory infantile eosinophilic pustular folliculitis.

JAMA Dermatol 149:367-8, 2013 (査読付)

doi: 10.1001/2013.jamadermatol.591.

4) Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H:

Type VII collagen deficiency causes

defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts.
Am J Pathol 181:1659-71, 2012 (査読付)
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.018.

5) Hamade Y, Arita K, Toyonaga E, Inokuma D, Hamasaka K, Shimizu H:
Lichen planus in childhood showing various cutaneous features.
Acta Derm Venereol 92:386-7, 2012 (査読付)
doi: 10.2340/00015555-1260.

6) Koguchi H, Arita K, Yamane N, Shinkuma S, Shimizu H:
Erythema annulare centrifugum-like neutrophilic dermatosis: effects of potassium iodide.
Acta Derm Venereol 92:333-4, 2012 (査読付)
doi: 10.2340/00015555-1291.

7) Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Ujiie H, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H:
Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapsone.
Eur J Dermatol 22:282-3, 2012 (査読付)
doi: 10.1684/ejd.2012.1662.

8) Hoshina D, Arita K, Mizuno O, Fujimoto K, Nishio M, Kondo T, Abe R, Shimizu H:
Skin involvement in ALK-negative systemic anaplastic large-cell lymphoma.
J Am Acad Dermatol 67:e159-60, 2012 (査読付)
doi: 10.1016/j.jaad.2011.12.033.

9) Tanimura S, Ota M:
Disseminated erythema multiforme -like reaction triggered by tinea unguium.
Mycoses. 54: e641-642, 2011 (査読付)
doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01962.x.

10) Lin HY, Yanagi T, Akiyama M, Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, Arita K, Shimizu H:
Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies against type VII collagen and laminin-332.
Br J Dermatol 164:452-454, 2011 (査読付)
doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10065.x.

11) Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H:
A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing.
Exp Dermatol 20:74-76, 2011 (査読付)
doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01177.x.

12) Kikuchi K, Arita K, Tateishi Y, Onozawa M, Akiyama M, Shimizu H:
Recurrence of hydroxyurea-induced leg ulcer after discontinuation of treatment/therapy
Acta Derm Venereol 91:373-374, 2011 (査読付)
doi: 10.2340/00015555-1048.

13) Nomura Y, Ota M, Tochimaru H:
Self-healing congenital generalized skin creases: Michelin tire baby syndrome.

J Am Acad Dermatol. 63: 1110-1111, 2010.

(査読付)

doi: 10.1016/j.jaad.2009.03.025.

14) Ota M, Kawasaki H, Horimoto M:

Ice cream urticaria.

Am J Med. 123: e1-2, 2010. (査読付)

doi: 10.1016/j.amjmed.2010.04.034.

15) 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. (査読付)

doi: 10.1002/humu.21235.

16) Lin MW, Lee DD, Liu TT, Lin YF, Chen SY, Huang CC, Weng HY, Liu YF, Tanaka A, Arita K, Lai-Cheong J, Palisson F, Chang YT, Wong CK, Matsuura I, McGrath JA, Tsai SF:

Novel IL31RA gene mutation and ancestral OSMR mutant allele in familial primary cutaneous amyloidosis.

Eur J Hum Genet 18: 26-32, 2010 (査読付)

doi: 10.1038/ejhg.2009.135.

17) Natsuga K, Nishie W, Arita K, Shinkuma S, Nakamura H, Kubota S, Imakado S, Akiyama M, Shimizu H:

Complete paternal isodisomy of chromosome 17 in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia.

J Invest Dermatol 130: 2671-2674, 2010 (査

読付)

doi: 10.1038/jid.2010.182.

18) Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H:

Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex.

Hum Mutat 31: E1687-1698, 2010 (査読付)

doi: 10.1002/humu.21330.

[学会発表] (計 10 件)

1) 伊藤 圭, 飯谷麻里, 大宮若菜, 渡邊美佳:

乾癬に対する生物学的製剤治療の光と影
～当科 80 例の経験を通じて～.

第 42 回日本創傷治癒学会. 札幌, 2012. 12. 02～04 かでる 2・7

2) 伊藤 圭:

どの生物学的製剤を選択すべきか ～「正解なき薬剤選択」を含めた乾癬治療戦略～.

第 76 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 札幌, 2012. 09. 29～30 ロイトン札幌

3) 伊藤 圭:

ウステキヌマブの広く高い有用性 ～認可 1 年半の当科使用経験を通じて～.

第 27 回日本乾癬学会学術大会. 新潟, 2012. 09. 07～08 朱鷺メッセ

4) 大田光仁:

アトピー性皮膚炎～最近の話題と寛解維持に導くための標準治療～

千歳恵庭小児科学術講演会. 千歳, 2012. 07. 18 千歳 ANA クラウンホテル

5) 大田光仁 :
皮膚からはじまる食物アレルギー
千歳市民健康講座. 千歳, 2012. 05. 12 市立
千歳市民病院

7) 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 症例を含むウステ
キマブ投与患者 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,
2011. 12. 17 札幌医科大学講堂

6) Arita K, Nomura T, Nomura Y, Ota M,
Shimizu H:

7q22.1 as a possible gene locus of Michelin
tire baby syndrome.

The 36th annual meeting of the Japanese
Society for Investigative Dermatology
Kyoto, 2011. 12. 09~11 京都国際会館

8) 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, 2011. 10. 08~09 沖縄コンベンショ
ンセンター

9) 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 症例を含むウステキマブ投与患
者 10 例の使用経験

第 26 回日本乾癬学会学術大会 大阪, 2011.
09. 09~10 大阪国際会議場

10) 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 札幌,
2011. 09. 03 JR 札幌病院講堂

[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 ~頭のとっぺん
からつま先まで~. メディカルレビュー社,
pp 93, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大田 光仁 (OTA MITSUHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講
師

研究者番号 : 10514242

(2) 研究分担者

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

有田 賢 (ARITA KEN)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講
師

研究者番号 : 50374434