

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461681

研究課題名(和文)7型コラーゲンプロモーターを標的にした劣性栄養障害型表皮水疱症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa targeting at the COL7A1 promoter

研究代表者

有田 賢 (ARITA, KEN)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：50374434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：劣性栄養型表皮水疱症に対する根治的治療法は現在のところ存在しない。本研究では本症の原因遺伝子であるCOL7A1のプロモーターを活性化させる化合物を同定し、新規治療法を開発することを目指した。COL7A1遺伝子プロモーターをluc2P遺伝子の下流にクローニングし、安定発現細胞株を樹立した。この細胞を化合物ライブラリーにて治療したところ、発光の増加を示す化合物を複数同定した。しかし、validationの結果、その大部分が擬陽性であることが判明した。今後、7型コラーゲンを発現する正常ヒト表皮角化細胞を化合物で治療し、薬効を評価する予定である。

研究成果の概要(英文)：No curative therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) are currently available. In this study, we sought to develop novel therapies for this intractable disease targeting at the COL7A1 promoter. First, we constructed a vector containing the luc2P gene driven by the COL7A1 promoter and generated stable cell lines carrying the gene construct. Compound library screening using the stable cells identified a dozen of 'hits'. However, further screening showed that most of them are 'false-positive'. We are now testing these compounds using normal human epidermal keratinocytes to see if they up-regulate the COL7A1 promoter.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 7型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

劣性栄養型表皮水疱症 (Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa; RDEB) は、表皮と真皮の接着に最も重要な役割を果たしている係留線維を構成する7型コラーゲンをコードする COL7A1 の遺伝子変異により発症する重症の遺伝性水疱症であり、生下時から全身に水疱とびらん、潰瘍をきたす。繰り返す潰瘍と瘢痕形成により、指趾は癒合して棍棒状になり (図1)、患者のQOLを著しく低下させるほか、病変は口腔粘膜や食道粘膜にも多発し、摂食障害や嚥下困難、食道閉塞をきたし、栄養障害や成長障害をもたらす。全身に多発する潰瘍により重症の感染症をきたし若年期に死の転帰をとることも少なくなく、また、潰瘍治癒後の瘢痕の上には高率に有棘細胞癌を発症することが知られており、極めて予後不良な疾患である。申請者の研究室では、以前から本疾患の病因の解明に注力しており、これまで多数の遺伝子変異を同定するとともに、疾患モデルマウスの作成にも成功してきた (Ito K, et al. Am J Pathol, 2009)。

図1: 重症汎発型RDEB患者の重篤な臨床症状

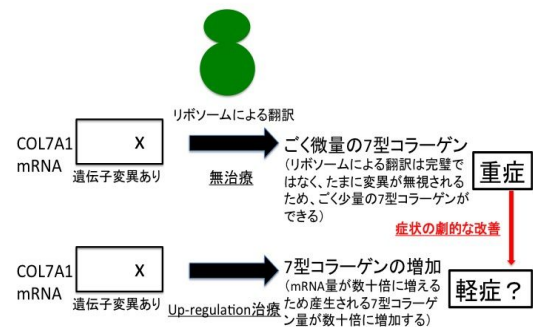


現在、RDEB の治療は対症療法が主体であり、患者とその家族は連日自宅での長時間にわたる外用処置 (抗潰瘍剤の外用や創傷被覆剤の貼付) を強いられている。近年、より根治的な治療を目指し、7型コラーゲンを補充または産生させる治療法として、タンパク補充療法 (7型コラーゲンの局注療法)、骨髄移

植療法などの開発が申請者の研究室を中心に国内外で精力的に進められている (Fujita Y, et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010)。しかしながら、タンパク補充療法は局注部位にしか効果を発現しない上に頻回の投与が必要であり、患者に強い痛みを強いるほか、7型コラーゲンの大量の生成が必要になるため、実用性が低い。骨髄移植療法は、一定の効果が報告されているものの、骨髄破壊処置に伴う免疫不全により治療関連死のリスクがあり、ドナーも限られていることからすべての患者に適応するのは難しい。従って、いずれの治療法も RDEB 患者に汎用するのは現時点では現実的ではない。

そこで、我々は、RDEB に対する根治的な治療として、COL7A1 のプロモーターを刺激することで7型コラーゲンの発現を増やす 'up-regulation 治療' の開発を企画した (図2)。

図2 Up-regulation治療のメカニズム



前述の通り、RDEB 患者は COL7A1 遺伝子変異により発症するが、その多くはナンセンス変異またはフレームシフト変異であり、早期終止コドン (premature termination codon; PTC) が形成される。これら PTC を持つ mRNA からは理論上は正常なタンパク質は生成されないが、実際にはリボソームによる翻訳の際に約 0.1% の確率で PTC の読み飛ばしが起こり、微量ながらも、正常なタンパク質が産生されることが知られている。COL7A1 のプロモ

ーターを刺激する薬剤は、患者の変異アレルからの mRNA 産生を促進するため、PTC の読み飛ばしを受ける mRNA を増加させ、7 型コラーゲンの産生量が増加することが期待される。COL7A1 の変異の違いによる皮膚基底膜の 7 型コラーゲン量のわずかな違いが RDEB の重症度を規定するため、**up-regulation 治療により 7 型コラーゲンの産生を増加させることで臨床症状が劇的に改善されることが期待される (図 2)。**

2. 研究の目的

本研究では 7 型コラーゲン遺伝子のプロモーターを刺激する薬剤を開発し 7 型コラーゲンの発現増加を促進するという RDEB に対する新しい治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) COL7A1 のプロモーター活性を評価可能な stable cell line の作成

まず初めに、COL7A1 遺伝子のプロモーター領域を、レポーター遺伝子の 1 つである luc2P 遺伝子の^{上流に}クローニングし、COL7A1 プロモーターにより luc2P の発現がコントロールされるプラスミドを作成した。FlpIn system を用いて、この construct を安定的に発現する stable cell line を完成させた。次に、得られた stable cell line のクローンを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、最適と考えられるクローンをピックアップし、多数の stock を作製した。

(2) COL7A1 プロモーターを up-regulation する化合物のスクリーニング

(high-throughput drug screening)

(1) で得た stable cell line を用い、high-throughput drug screening を行った。当科では、ChemBridge 社から購入した diversity set (約 2 万種類の化合物を含む compound library) がすでに利用可能であり、これらの化合物をスクリーニングし、統計的

処理を用いてデータ解析を行った。対照コントロールと比して、有意な発光増強を示した化合物を集め、再度ルシフェラーゼアッセイを行い (retest screening)、発光増強を示す化合物を決定した。ルシフェラーゼ分解阻害により発光が増している擬陽性の可能性を排除するために、ルシフェラーゼを恒常的に発現している細胞株をこれらの化合物で治療した。

4. 研究成果

COL7A1 遺伝子のプロモーターの下流に luc2P を発現するベクターを作製した後に、FlpIn system を用いて安定発現細胞株を作製したところ、ルシフェラーゼアッセイにて強い発光を確認することができた。

次に、この安定発現細胞株を各種化合物で 24 時間治療し、ルシフェラーゼアッセイにてスクリーニングを行ったところ、100 個以上の化合物で、無治療時と比べ有意に発光が増加していた。

これらの化合物添加時のルシフェラーゼの発現上昇が擬陽性ではないことを確認するために、ルシフェラーゼを恒常的に発現する細胞株を治療したところ、大部分の化合物が発光の増加を示した。

これらの結果は、スクリーニングで同定した化合物の大部分がルシフェラーゼの分解抑制により発光増加をきたしていることを示唆しているが、現在、7 型コラーゲンを発現する正常ヒト表皮角化細胞にこれらの化合物を添加し、7 型コラーゲンの発現が増加するか、タンパク質レベル・mRNA レベルで確認中である。

正常ヒト表皮角化細胞で薬効が確認できれば、その化合物は真に COL7A1 プロモーターを活性化するといえ、新規治療薬の開発を期

待できる。

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 11 件)

1. Miyauchi T, Nomura T, Suzuki S, Takeda M, Shinkuma S, Arita K, Fujita Y, Shimizu H. Genetic analysis of a novel splice-site mutation in *TMC8* reveals the in-vivo importance of the TMC domain of TMC8. Br J Dermatol, in press. 査読有
DOI: 10.1111/bjd.14569
2. Watanabe M, Natsuga K, Arita K, Abe R, Shimizu H. Generalized acute subcutaneous edema as a rare cutaneous manifestation of severe dermatomyositis. J Eur Acad Dermatol Venereol, in press. 査読有
DOI: 10.1111/jdv.13460
3. Nakazato S, Nomura T, Yamane N, Shinkuma S, Natsuga K, Fujita Y, Arita K, Shimizu H. Nodular morphoea: a first case associated with linear morphoea. Eur J Dermatol 26: 95-96, 2016. 査読有
DOI: 10.1684/ejd.2015.2656
4. Horie K, Izumi K, Nishie W, Nomura T, Nomura Y, Arita K, Shimizu H. Deep venous thrombosis in patients with Behcet's disease. J Dermatol 42: 101-102, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/1346-8138.12741
5. 中里信一, 野村友希子, 柴 景子, 平田悠, 本間英里奈, 有田 賢, 大岡智学, 松居喜郎, 月永一郎, 西江 涉, 清水 宏. 難治性静脈うっ滞性下腿潰瘍に対して内視鏡下筋膜下不全穿通枝切離術が奏功した1例. 臨床皮膚科 68: 459-464, 2014. 査読有
6. Izumi K, Arita K, Horie K, Hoshina D, Shimizu H. Localized cutaneous amyloidosis associated with poikilodermatous mycosis fungoides. Acta Derm Venereol 94: 225-226, 2014. 査読有
DOI: 10.2340/00015555-1657
7. 秦 洋郎, 青柳 哲, 宮内俊成, 伊東孝政, 本間英里奈, 新熊 悟, 有田 賢, 清水 宏. 劣性栄養障害型表皮水疱症患者に生じた難治性の潰瘍を呈した有棘細胞癌の1例. Skin Cancer 28: 160-163, 2013. 査読有
8. Izumi K, Yanagi T, Akiyama M, Moriuchi R, Arita K, Shimizu H. Intractable erythematous plaques on the hands: palmoplantar eosinophilic pustular folliculitis. Int J Dermatol 52: 1274-1275, 2013. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-4632
9. Tsujiwaki M, Abe R, Nomura Y, Nishimura M, Hoshina D, Shinkuma S, Natsuga K, Ujiie H, Arita K, Shimizu H. Coexistence case of bullous pemphigoid and pemphigus foliaceus. Eur J Dermatol 23: 552-553, 2013. 査読有
DOI: 10.1684/ejd.2013.2084
10. Koguchi H, Arita K, Nakazato S, Moriuchi R, Yamane N, Shinkuma S, Matsumura K, Shimizu H. An erythematous plaque on the breast: a quiz. Solitary T-cell pseudolymphoma, superficial type. Acta Derm Venereol 93: 763, 2013. 査読有
DOI: 10.2340/00015555-1527
11. 渡邊美佳, 有田 賢, 平田 悠, 水野 修, 保科大地, 阿部理一郎, 南辻泰志, 清水 宏. 紅皮症を呈した重症落葉状天疱瘡 過去10年間の当院における落葉状天疱瘡

の統括とともに.皮膚病診療 35 : 501-505,
2013.査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 中里信一, 乃村俊史, 山根尚子, 新熊 悟,
夏賀 健, 藤田靖幸, 有田 賢, 竹中ち
ひろ, 清水 宏. 結節性強皮症の1例.
第38回脈管膠原病研究会, 2015年1月
24日, 三田ホール(東京都港区)
2. 宮内俊成, 乃村俊史, 鈴木翔多朗, 新熊
悟, 有田 賢, 松本光博, 清水 宏. TMC8
に新規スプライスサイト変異を認めた疣
贅状表皮発育異常症の1例. 第113回日
本皮膚科学会総会, 2014年5月31日,
国立京都国際会館(京都府京都市)
3. 秦 洋郎, 青柳 哲, 宮内俊成, 伊東孝
政, 本間英里奈, 新熊 悟, 有田 賢,
清水 宏. 劣性栄養障害型表皮水疱症患
者に生じた難治性の潰瘍を呈した有棘細
胞癌の1例. 第29回日本皮膚悪性腫瘍学
会, 2013年8月9日, 甲府富士屋ホテル
(山梨県甲府市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 賢 (ARITA Ken)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・

客員研究員

研究者番号: 50374434

(2) 研究分担者

乃村 俊史 (NOMURA Toshifumi)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 50399911

清水 宏 (SHIMIZU Hiroshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号: 00146672