

リコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白による 表皮水疱症に対する新規治療法の開発

学位論文内容の要旨

遺伝的に皮膚の脆弱をきたし水疱を生じる表皮水疱症(epidermolysis bullosa; EB)は、表皮・真皮境界部位における電子顕微鏡的な裂隙の生じる部位により 3 型に分類される。すなわち裂隙が表皮基底細胞内にあるものを単純型、基底膜部の透明層内にあるものを接合部型、および真皮内にあるものを栄養障害型 (dystrophic EB; DEB) と呼称する。

DEB は、さらに優性栄養障害型 (dominant DEB; DDEB) と劣性栄養障害型 (recessive DEB; RDEB) に分けられ、両者共に、基底膜部に存在する係留線維の主要構成蛋白である VII 型コラーゲンの遺伝子変異により発症することが明らかにされている。このような事実より VII 型コラーゲンは表皮と真皮の接着に最も重要な分子の一つであることが明らかになった。

DEB の原因遺伝子・蛋白、それらの詳しい構造については明らかになってきたが、本症の治療法の開発は遅れ、現在本症に有効な治療法はない。患者の表皮細胞を培養して潰瘍面に移植する自家培養表皮移植術はある程度効果が認められるが、自己細胞のために移植部には VII 型コラーゲンの発現はない。また、原因遺伝子を導入する遺伝子治療は、表皮細胞への遺伝子導入効率、倫理問題などがあり臨床応用にまだ時間が必要である。近年、出生時から特定の蛋白が欠損する遺伝病で蛋白補充療法が試みられているが、酵素などがほとんどで、構造蛋白が欠損した疾患にそれを補充した報告はない。

本研究では、培養細胞にヒト VII 型コラーゲン遺伝子を導入することにより、分泌されるリコンビナントヒト VII 型コラーゲンを大量に単離・精製した。そのリコンビナントヒト VII 型コラーゲンをを用い、本症に対する新規治療開発を試みた。さらに、表皮水疱症以外の皮膚潰瘍を呈する疾患に対する治療剤としての有用性も検討した。

ヒト VII 型コラーゲン遺伝子をヒト培養細胞である 293 細胞に導入し、その上清からリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白を抽出する方法を開発した。アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過操作を行うと、SDS-PAGE で単一のバンドとなる程度の精製が可能であった。また、モノクローナル抗体(LH7.2)を用いたイムノプロットで、それらのバンドはヒト VII 型コラーゲンに由来するものであることが確かめられた。

次に、このリコンビナントヒト VII 型コラーゲンが *in vivo* において係留線維としての機能を発揮するか否かを検討するために、正常のラットの皮膚に局注した。その結果、ラット皮膚基底膜にヒト VII 型コラーゲンが集積することを確認した。

また RDEB のモデルマウスである VII 型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウスの水疱部にリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注する実験を行った。ノックアウトマウスは生後間もなく死亡するため、ノックアウトマウスの皮膚を採皮し、無免疫ラットに移植後、その移植片にリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注した。その結果、ノックアウトマウスの皮膚基底膜部にリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白が組み込

まれ、VII型コラーゲンが本症の表皮・真皮の解離の改善に効果がある可能性が示唆された。動物の真皮内に注入されたリコンビナントヒトVII型コラーゲン蛋白がどのように基底膜に集積されるかどうかは不明であるが、VII型コラーゲン蛋白補充療法はDEB患者における治療選択肢の1つになると考えられた。

創傷治癒は近年特に注目される分野で、皮膚科領域では、褥瘡、下腿潰瘍、手術創と深い関連がある。治療対象となる患者数が多く、臨床的に使用されている薬剤も多数あるが、特筆する効果を持つものがないため、新しいより有効な薬剤の出現が望まれている。

創傷治癒は、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、種々のマトリックス蛋白、サイトカインなどが複雑に影響しあいながら進行する。創傷治癒を促進する作用があるtransforming growth factor- β がVII型コラーゲン発現を強力に増強すること、治癒過程にある潰瘍底にある新生真皮に大量のVII型コラーゲンが検出されることから、VII型コラーゲンが創傷治癒に必須のものであることが証明された。このような背景から、表皮細胞が遊走する潰瘍面にVII型コラーゲンが豊富に存在すると上皮化が容易におこり、創傷治癒が促進されると推測される。

そこで、我々は、RDEB治療にとどまらず一般の抗潰瘍剤として効果の可能性を模索するために、細胞培養レベルで実験的な皮膚の欠損を作成し、細胞の遊走へのVII型コラーゲンの効果を調べた。その結果、リコンビナントヒトVII型コラーゲンにて処理したディッシュにおいて、表皮細胞もヒト線維芽細胞も遊走の亢進が認められた。VII型コラーゲン分子の半分の領域を占めるNC-1ドメインはマトリックス蛋白との結合に重要とされている。そこでVII型コラーゲンの創傷治癒促進作用は、マトリックスへの結合と解離、すなわち細胞の遊走に関連しているのではないかと予想した。次に実際にラットに実験的な潰瘍を作成し、リコンビナントヒトVII型コラーゲンを投与した。その結果、対照と比較しリコンビナントヒトVII型コラーゲン投与部に有意に潰瘍の縮小が認められた。これらことから、VII型コラーゲンが創傷治癒に必須のものであることが示唆され、リコンビナントヒトVII型コラーゲンが、皮膚科領域で問題となっている褥瘡、下腿潰瘍、手術創の治療剤として使用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

リコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白による 表皮水疱症に対する新規治療法の開発

表皮水疱症は表皮・真皮境界部を構成する構造タンパク質をコードする遺伝子の異常により、生まれながらにして軽微な外力によって皮膚に糜爛・潰瘍を形成する遺伝性皮膚疾患である。表皮水疱症は表皮・真皮境界部の裂隙のレベルによって大きく3つの群から成りたち、水疱が基板の直下の真皮に形成される栄養障害型表皮水疱症は、基底膜部に存在するアンカーリングフィブリルの主要構成タンパク質である VII 型コラーゲンの遺伝子変異により発症することが明らかにされている。本研究では、培養細胞にヒト VII 型コラーゲン遺伝子を導入することにより、分泌されるリコンビナントヒト VII 型コラーゲンを大量に単離・精製した。そのリコンビナントヒト VII 型コラーゲンをを用い、本症に対する新規治療開発を試みた。さらに、表皮水疱症以外の皮膚潰瘍を呈する疾患に対する治療剤としての有用性も検討した。

始めに、精製方法であるが、ヒト VII 型コラーゲン遺伝子をヒト培養細胞である 293 細胞に導入し、その上清からリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白を抽出する方法を開発した。今回の実験ではアフィニティークロマトグラフィーと Sephacryl カラムによるゲルろ過操作を行うと、SDS-PAGE で単一のバンドとして認められる程度の精製が可能であった。また、モノクローナル抗体(LH7.2)を用いたイムノプロットでは、それらのバンドはヒト VII 型コラーゲンに由来するものであることが確かめられた。

次に抽出したリコンビナントヒト VII 型コラーゲンがアンカーリングフィブリルとしての機能を発揮するか否かを検討するために、正常ラット皮膚と、栄養障害型表皮水疱症のモデルマウスである VII 型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウスの基底膜部にリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注する実験を行った。その結果、正常ラットおよび、ノックアウトマウスの皮膚基底膜部にリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白が組み込まれ、VII 型コラーゲンが本症の表皮・真皮の解離の改善に効果がある可能性が示唆された。以上より、リコンビナントヒト VII 型コラーゲン補充療法は栄養障害型表皮水疱症患者への有用な治療になりうると考えられた。

最後に、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンの創傷治癒に対する効果を検討した。まず、細胞培養レベルで実験的な皮膚の欠損を作成し、細胞の遊走への VII 型コラーゲンの効果を調べた。その結果、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンにて処理したディッシュにおいて、表皮細胞もヒト線維芽細胞も遊走の亢進が認められた。次に実際にラットに潰瘍を作成し、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンを投与した。その結果、対照と比較しリコンビナントヒト VII 型コラーゲン投与部に有意に潰瘍の縮小が認められた。これらのことから、VII 型コラーゲンは創傷治癒過程において有用なものであることが示唆され、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンが、皮膚科領域で問題となっている褥瘡、下腿潰瘍、手術創の治療剤として使用できる可能性が示唆された。

公開發表に際し、副査の三浪明男教授からはヒトとラットの VII 型コラーゲンの違い、栄養障害型表皮水疱症モデルマウスについての質問、副査の安田和則教授からはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンの投与方法、創傷治癒機転についての質問、主査の清水宏教授からはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンの局注以外の導入方法についての質問など、その他多くの質問があったが、申請者は大概適切な回答をなし得た。

この論文は、栄養障害型表皮水疱症の創薬としての可能性を示す研究でありこの点を高く評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。