

学位論文題名

ヒトⅦ型コラーゲン発現トランスジェニックマウスに
おける係留線維形成の解析

学位論文内容の要旨

背景:表皮水疱症(epidermolysis bullosa; EB)は表皮-真皮境界部を構成する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により, 先天的に軽微な外力によって皮膚に水疱を形成する遺伝性皮膚疾患である. 水疱形成部位により大きく3つに分類されるが, その中で基板直下の真皮最上部に水疱を形成するEBを栄養障害型(dystrophic EB; DEB)と呼称する.

DEBは, 遺伝形式により優性栄養障害型と劣性栄養障害型に分けられ, 両者共に基底膜部に存在する係留線維の構成蛋白であるⅦ型コラーゲン(COL7A1)遺伝子の変異により発症することが明らかにされている. DEBの原因となる遺伝子や蛋白分子構造については解明されてきたが, 本症に対する治療は対症療法にとどまり, 有効な治療法は開発されていない.

近年, 表皮水疱症患者からの表皮細胞を培養し, 潰瘍面に移植する自家培養表皮移植が試みられているが, 患者皮膚からの培養表皮シートは遺伝子的・構造的欠損を補えていないため, 移植部にⅦ型コラーゲンの発現は無く, 永続的な効果は期待できない. また, 遺伝子導入を行うには限界に近い約9kbと非常に大きいCOL7A1遺伝子を導入し, 完全な機能蛋白として発現させる効果的・効率的な方法についても確立されていない. そこで, 患者では欠損もしくは減弱している正常COL7A1遺伝子を自家培養皮膚に導入できたならば, その自家培養皮膚移植術は永続的・根本的な治療法になり得ると考えられる.

研究の目的: マウスの表皮角化細胞および真皮線維芽細胞に正常ヒトCOL7A1遺伝子を強制発現させ, 導入された遺伝子が十分な機能を果たし, 将来的に効果のある治療法へと結びつくかについてトランスジェニックマウス(Tgm)を作製・解析することにより検討する.

実験の方法: COL7A1を表皮に発現させるベクターではヒトケラチン14(K14)プロモーター, 真皮に発現させるベクターではマウスⅠ型コラーゲン(COL1A2)プロモーターとし, 共にその下流にヒトCOL7A1 cDNA全長を配置するベクターを作製し, マイクロインジェクション法にてTgmを作製した. 産仔マウスをPCR法にてスクリーニングし, かつマウス皮膚が抗ヒトⅦ型コラーゲンNC-1 domain specific抗体であるLH7.2抗体にて強陽性を認めたマウスをTgm(F0)とした. Tgm(F0)をC57BL/6マウスと交配し, 得られた産仔を前述同様にPCRスクリーニング, 免疫組織染色を行い, ヘテロで発現しているTgm(F1)をRT-PCR, ウェスタンブロット, 電子顕微鏡, 免疫電子顕微鏡にて観察・解析した.

結果: K14プロモーターTgm(K14 Tgm)に関しては, LH7.2抗体を用いた免疫組織染色で良好な蛍光発色を確認できたTgm(F0)は2匹であった. COL1A2プロモーターTgm(COL1 Tgm)では, 良好な蛍光発色を確認できたTgm(F0)は8匹であった. C57BL/6マウスと交配し, 系統維持されたそれぞれ代表的な1系統のTgm(F1)についての解析を行った. LH7.2抗体を用いた蛍光抗体法所見は, K14 Tgm(F1)では, 基底膜部に線状沈着, および一部の表皮角化細胞細胞質に顆粒状の沈着を認めた. また, 毛包基底膜・毛包上皮内にも沈着を認めた. COL1 Tgm(F1)では, 基底膜部に線状沈着, および真皮全層に広範囲

に顆粒状の沈着を認めた。Tgm(F1)皮膚を表皮 - 真皮間で剥離し行った RT-PCR 法の結果は、K14 Tgm 表皮側および COL1 Tgm 真皮側に強いヒト COL7A1 mRNA の発現を認めた。また、K14 Tgm 真皮側には弱いながらも、毛包由来と思われる mRNA の発現がみられた。COL1 Tgm 表皮側には発現は認められなかった。同様に表皮 - 真皮間剥離皮膚で行ったウエスタンブロット法の結果は、K14 Tgm 表皮側:K14 Tgm 真皮側:COL1 Tgm 真皮側のヒト COL7A1 蛋白発現量の比率は、2:0.6:1 であった。いずれも LH7.2 抗体と反応した 290kDa バンドであり、ヒト COL7A1 に由来するものであった。COL1 Tgm の表皮側には発現を認めなかった。透過電子顕微鏡による解析において、いずれの Tgm においても係留線維の形成を形態学的に確認したが、マウス既存のものか導入したヒト COL7A1 に由来するものか判別できなかった。LH7.2 抗体を用いた免疫電子顕微鏡による解析では、K14 Tgm 皮膚では、基底板の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認め、一部は基底板上部の透明層や表皮角化細胞内にも認めた。COL1 Tgm 皮膚では、基底板の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認め、また真皮内にも金コロイド粒子の存在を認めた。

考察: K14 Tgm においては、表皮側で強く mRNA の発現が認められ、かつ蛍光抗体法では表皮角化細胞での蛍光発色陽性となり、ウエスタンブロット法では 290kDa の COL7A1 蛋白が表皮内で認められたことより、表皮で COL7A1 が発現する系を反映する Tgm を作製することができた。また、蛍光抗体法所見で基底膜部に線状に強い発色がみられ、かつ免疫電顕所見で COL7A1 の N 末端側の NC-1 ドメインを示す金コロイドが基底板部にみられたことより、表皮内で作られたヒト COL7A1 が表皮内細胞膜を通過し細胞外へ排出され、基底板上で蛋白としての機能を果たす係留線維を形成したと考えられた。COL1 Tgm においては、真皮側において強く mRNA の発現が認められ、蛍光抗体法において真皮全層に強い蛍光発色が認められたこと、ウエスタンブロット法で COL7A1 蛋白が真皮側で認められたことにより、真皮で COL7A1 が発現する系を反映する Tgm を作製することができた。また、蛍光抗体法所見で基底膜部に線状に発色がみられたこと、および免疫電顕所見で金コロイドが基底板部に認められたことは、真皮内で作られたヒト COL7A1 が基底膜へ向かい、基底板に NC-1 ドメイン部分を付着させ、係留線維を形成したことを意味する。

ウエスタンブロット法による解析でヒト COL7A1 蛋白発現量を比較すると、真皮線維芽細胞よりも表皮角化細胞での発現量が約 2 倍まさっており、表皮角化細胞のほうが係留線維形成に寄与するポテンシャルを高度にもっているものと推測された。一方、皮膚欠損状態など表皮からの蛋白供給が途絶えるような状況では、真皮全層の線維芽細胞がどの深さであってもそのポテンシャルを発揮し、係留線維形成を十分行えることが推測された。

本研究では、表皮角化細胞もしくは真皮の線維芽細胞、いずれに COL7A1 を導入しても係留線維の形成を認めた。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、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を意味する。

現段階では、COL7A1 遺伝子が約 9kb と非常に塩基数が大きいいため、細胞への導入効率の問題が大きなハードルとなっている。我々は、ヒト COL7A1 cDNA 全長を導入した Tgm が成功したことを受け、ヒト COL7A1 cDNA を部分的に短くした遺伝子でも同様に係留線維が形成されるかについても検討を行っている。より短い遺伝子導入でも係留線維形成が行われるならば、さらに遺伝子治療の実現に向けて大きな前進となりうると思われる。

また、DEB のモデルマウスである COL7A1 ノックアウトマウスを今回作製した Tgm を用いてトランスジェニックレスキューすることも検討している。ヒト COL7A1 遺伝子由来の係留線維のみでのレスキューが成功すれば、そのレスキューマウスを用いて、疾患の再現実験や治療の研究など様々な方向性で活用できると考えられ、今回作製した Tgm はその大きな足がかりになることが期待できる。

結論: DEB の原因遺伝子であるヒト COL7A1 遺伝子をマウスの表皮角化細胞もしくは真皮線維芽細胞に導入したトランスジェニックマウスを作製し、マウス皮膚にヒト COL7A1 遺伝子由来の係留線維の形成を確認した。今後、さらなる研究を進めていくことで、DEB に対する遺伝子治療がより実現性を増していくものと考えられた。

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

ヒト VII 型コラーゲン発現トランスジェニックマウスに おける係留線維形成の解析

栄養障害型表皮水疱症は、先天的に皮膚に水疱を形成する遺伝性疾患で、表皮-真皮境界部の接着構築を担う係留線維の構成蛋白であるVII型コラーゲン(COL7A1)遺伝子の変異により発症する。有効な治療法はなく、新規遺伝子治療の開発が待たれる。そこで、マウスの表皮角化細胞および真皮線維芽細胞に正常ヒト COL7A1 遺伝子を強制発現させ、導入された遺伝子が十分な機能を果たし、将来的に効果のある治療法へと結びつくかについてトランスジェニックマウス(Tgm)を作製・解析することにより検討を行った。その結果、抗ヒト COL7A1 モノクローナル抗体 (LH7.2) を用いた蛍光抗体法にて、表皮発現 Tgm(K14 Tgm)では、基底膜部に線状沈着および一部の表皮角化細胞細胞質に顆粒状の沈着を認めた。真皮発現 Tgm(COL1 Tgm)では、基底膜部に線状沈着および真皮全層に広範囲に顆粒状の沈着を認めた。Tgm 皮膚を表皮-真皮間で剥離し行った RT-PCR 法の結果は、K14 Tgm 表皮側および COL1 Tgm 真皮側に強いヒト COL7A1 mRNA の発現を認めた。同様に表皮-真皮間剥離皮膚で行ったウエスタンブロット法の結果は、K14 Tgm 表皮側および COL1 Tgm 真皮側に 290kDa の COL7A1 蛋白の発現を認めた。透過電子顕微鏡による解析において、いずれの Tgm においても係留線維の形成を形態学的に確認したが、マウス既存のものか導入したヒト COL7A1 に由来するものか判別できなかった。LH7.2 抗体を用いた免疫電子顕微鏡による解析では、K14 Tgm 皮膚では、基底板の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認め、一部は基底板上部の透明層や表皮角化細胞内にも認めた。COL1 Tgm 皮膚では、基底板の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認め、また真皮内にも金コロイド粒子の存在を認めた。以上の結果より、K14 Tgm においては、表皮側で強く mRNA の発現が認められ、かつ蛍光抗体法では表皮角化細胞での蛍光発色陽性となり、ウエスタンブロット法では 290kDa の COL7A1 蛋白が表皮内で認められたことより、表皮で COL7A1 が発現する系を反映する Tgm を作製することができた。また、蛍光抗体法所見で基底膜部に線状に強い発色がみられ、かつ免疫電顕所見で COL7A1 の N 末端側の NC-1 ドメインを示す金コロイドが基底板部にみられたことより、表皮内で作られたヒト COL7A1 が表皮内細胞膜を通過し細胞外へ排出され、基底板上で蛋白としての機能を果たす係留線維を形成したと考えられた。COL1 Tgm においては、真皮側において強く mRNA の発現が認められ、蛍光抗体法において真皮全層に強い蛍光発色が認められたこと、ウエス

タンブロット法で COL7A1 蛋白が真皮側で認められたことにより，真皮で COL7A1 が発現する系を反映する Tgm を作製することができた。また，蛍光抗体法所見で基底膜部に線状に発色がみられたこと，および免疫電顕所見で金コロイドが基底板部に認められたことは，真皮内で作られたヒト COL7A1 が基底膜へ向かい，基底板に NC-1 ドメイン部分を付着させ，係留線維を形成したことを意味する。

本研究では，表皮もしくは真皮のいずれにヒト COL7A1 遺伝子を導入しても係留線維の形成を認めたことを証明した。このことは，将来的に遺伝子治療が行われる際の重要な evidence になると考えられ，今後のさらなる研究によって，栄養型表皮水疱症に対する遺伝子治療がより実現性を増していくものと考えられた。

副査の三浪明男教授からは，COL7A1 遺伝子のヒトとマウスの相同性について，また，遺伝子導入における今後の課題についての質問，副査の安田和則教授からは，マウスにヒト由来の遺伝子が導入されることによる生理的な障害の有無について，およびマウス由来の係留線維の減少などみられるのかについて，主査の清水 宏教授からは今回作製し得たトランスジェニックマウスと COL7A1 ノックアウトマウスとのレスキュー実験に関する質問などがあったが，申請者は大概適切な回答をした。

この論文は，表皮もしくは真皮のいずれにヒト COL7A1 遺伝子を導入しても係留線維の形成を認めたことを証明し，将来的に遺伝子治療が行われる際の大きな指標になる点が評価された。今後さらに研究を継続することで，遺伝子治療の実現に向けて大きく前進することが期待される。

審査員一同は，これらの点を高く評価し，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。