

栄養障害型表皮水疱症に対する新規治療法の開発

～構造蛋白補充療法～

学位論文内容の要旨

【背景と目的】先天性遺伝性疾患とは、その発症に遺伝子の変異が関与している疾患群で、現段階では根本的に治療することは難しい場合が多い。将来的な治療法としては、遺伝子治療、再生医療、蛋白補充療法などが考えられるが、発癌や倫理面の問題から、前二者の臨床応用にはさらなる時間が必要である。そこで我々は、先天性遺伝性疾患の治療法として、最も早期に臨床応用可能であろう蛋白補充療法に着目した。

蛋白質は大きくわけて、構造蛋白と非構造蛋白の2種類に分類される。非構造蛋白に異常を生じる先天性遺伝性疾患にはファブリー病等があり、幼少児から α ガラクトシダーゼを定期的に全身投与する非構造蛋白補充療法である、酵素補充療法が実際に臨床応用されている。

一方、構造蛋白に異常をきたす代表的な遺伝性疾患としては、表皮水疱症(epidermolysis bullosa; EB)がある。EBは、表皮-真皮境界部を構成する構造蛋白をcodeする遺伝子に変異が生じているため、生下時より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。EBは、国際分類により、単純型、接合部型、栄養障害型と大きく3型に分類されるが、栄養障害型EB(dystrophic EB; DEB)は、真皮最上部の基底板(lamina densa)直下に水疱を形成し、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。より重症型である劣性栄養障害型表皮水疱症(recessive DEB; RDEB)は、糜爛・潰瘍に加えて、粘膜障害・手指の棍棒状変化・食道狭窄・著明な成長障害・脱毛・歯牙の形成不全等をきたす。また、繰り返す皮膚潰瘍による慢性炎症に基づき、若年者から有棘細胞癌を合併する症例が多く、健常人に比べ寿命も短い。その死亡原因としては、有棘細胞癌、肺炎、腎不全の順に多く、55歳までに50%が死亡するとの報告がある。

本研究においては、RDEB患者にリコンビナントヒトVII型コラーゲン蛋白を補充し、蛋白欠損部である表皮基底膜部に適切に沈着させ、機能させることを最終目標におき、補充すべき蛋白であるリコンビナントヒトVII型コラーゲンの単離・精製を試みた。

【材料と方法】ヒト胎児腎細胞由来である293細胞に、ヒトVII型コラーゲン遺伝子cDNA全長をtransfectionし、安定したリコンビナントヒトVII型コラーゲン蛋白を分泌する細胞株を得た。大量細胞培養のために、10cmシャーレ10枚分が一度に培養できる専用の回転ボトルを用いて回転培養施行し、培養液を2～3日に1度回収した。大量培養上清を回収し、硫酸塩析・透析を施行した。透析後のサンプルを用いて、イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーを施行した。

高分子用のゲルろ過検量線キットであるGel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を用いて、最終産物であるリコンビナントヒトVII型コラーゲン蛋白の分子量を算出した。

【結果】回転ボトルで大量細胞培養後、その上清を硫酸塩析し、引き続き透析施行した。これを粗分画とし、イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーを施行した。ゲル濾過クロマトグラフィー後の最終産物を用いて、SDS-PAGE を行い Coomassie Blue 染色した結果、単一のバンドが認められた。次いで、ヒト VII 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体 (LH7.2) を用いた免疫ブロッティングで、この単一のバンドはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンであることが確認された。

ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定用マーカーである、高分子用 Gel Filtration Calibration Kit で検量線を作成し、そこから分子量を算出すると約 900kDa であった。

【考察】RDEB は生下時より全身に糜爛、潰瘍を繰り返す難治性の先天性遺伝性皮膚疾患の一つである。新しい種々の治療法が研究されてはいるが、現在基本となるのは全身の糜爛に対する軟膏塗布とガーゼ保護であり、患者とその家族の QOL は著しく低下する。将来的な治療として遺伝子治療・再生医療等の報告があるが、いずれも満足のいく結果は得られていない。そこで我々は、RDEB の治療法として、最も早期に臨床応用可能であり、現存する他の治療法より効果があると予測されるリコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白補充療法に着目した。

コラーゲンは、3本の α 鎖とよばれるペプチドがヘリックスを形成し、且つ各々の α 鎖は Gly-X-Y というアミノ酸配列 (X,Y は任意であるがプロリンヒドロキシプロリンが位置することが多い) をとるという特徴をもった一群の蛋白質である。VII 型コラーゲンは、表皮と真皮を強固に接着させる機能を有する蛋白の一つで、基板 (lamina densa) 直下に、係留線維 (anchoring fibril) として存在する。VII 型コラーゲンは、2944 個のアミノ酸からなる約 290kDa の前駆体タンパク質が 3 個重合した三量体 ($[\alpha 1(\text{VII})]_3$) で、C 末端側のシステインを介して 2 つの VII 型コラーゲン分子が互いに向き合ってジスルフィド結合し、アンチパラレルダイマーを形成する。この二量体分子がさらに側方に複数重合することにより anchoring fibril が形成される。anchoring fibril は、半弧状にフックのように存在し、N 末端側の NC-1 ドメインを介して基底膜の lamina densa に接着し、表皮と真皮を強固に接着させる機能を有する蛋白の一つである。

我々は、本研究において、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンの単離・精製に成功し、現在 in vivo の研究に取りかかっている。今後重要なのはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンを動物に投与した際に、それが基底膜の lamina densa 直下に正確に組み込まれ、他の蛋白と正常に相互作用し機能しなければならないことである。その結果、anchoring fibril としての機能を発揮することができれば RDEB 患者の表皮・真皮の解離の抑制、つまり潰瘍予防に効果があるはずであり、今後それらについて検討してゆかなければならない。現在マウス、ラット皮内への局所投与を開始したところであるが、いずれも特に全身的な副作用はなく、局所の紅斑などの副作用も認めていない。さらに、単純塗布、静脈内投与、腹腔内投与なども施行予定である。リコンビナントヒト VII 型コラーゲンによる構造蛋白補充療法は、RDEB 患者における治療選択肢の 1 つになると思われ、今後の構造蛋白補充療法の礎になればと考えている。

【結論】本研究では、ヒト VII 型コラーゲン遺伝子を動物細胞に導入し、リコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白の単離・精製を試みた。リコンビナントヒト VII 型コラーゲン蛋白は 900kDa であり、三量体を形成していることも確認され、患者への臨床応用につながる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

栄養障害型表皮水疱症に対する新規治療法の開発

～構造蛋白補充療法～

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 code する遺伝子に変異が生じているため、生下時より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。EB は、国際分類により、単純型、接合部型、栄養障害型と大きく 3 型に分類される。真皮最上部の基板直下に水疱を形成する栄養障害型 EB (dystrophic EB; DEB) は、VII 型コラーゲンの遺伝子変異により、蛋白量が減少・欠損することにより発症する。重症型である劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive DEB; RDEB) は、糜爛・潰瘍に加えて、粘膜障害・手指の棍棒状変化・食道狭窄・著明な成長障害・脱毛・歯牙の形成不全等をきたす。繰り返す皮膚潰瘍による慢性炎症に基づき、若年者から有棘細胞癌を合併する症例が多く、健常人に比べ寿命も短い。死亡原因としては、有棘細胞癌、肺炎、腎不全の順に多く、55 歳までに 50% が死亡するとの報告がある。

本研究においては、RDEB 患者にリコンビナントヒト VII 型コラーゲンを補充し、蛋白欠損部である表皮基底膜部に沈着させ、機能させることを最終目標におき、補充すべき蛋白であるリコンビナントヒト VII 型コラーゲンの単離・精製を試みた。

293 細胞に、ヒト VII 型コラーゲン cDNA を transfection し、10cm シャーレ 10 枚分が一度に培養できる専用の回転ボトルを用いて大量細胞培養を施行した。上清を回収し、硫酸塩析し、引き続き透析施行した。これを粗分画とし、イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーを施行した。最終産物を用いて、SDS-PAGE を行い Coomassie Blue 染色した結果、単一のバンドが認められた。次いで、ヒト VII 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体 (LH7.2) を用いた免疫プロットティングで、この単一のバンドはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンであることが確認された。分子量測定用マーカである、高分子用 Gel Filtration Calibration Kit で検量線を作成し、そこから分子量を算出すると約 900kDa であった。

本研究において、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンの単離・精製に成功し、現在 *in vivo* の研究に取りかかっている。今後重要なのはリコンビナントヒト VII 型コラーゲンを動物に投与した際に、それが基底膜の基板直下に正確に組み込まれ、他の蛋白と正常に相互作用し機能しなければならないことである。その結果、anchoring fibril としての機能を発揮することができれば RDEB 患者の表皮-真皮の解離の抑制、つまり潰瘍予防に効果

があるはずであり、今後それらについて検討してゆかなければならない。現在マウス、ラット皮内への局所投与を開始したところであるが、いずれも特に全身的な副作用はなく、局所の紅班などの副作用も認めていない。さらに、単純塗布、静脈内投与、腹腔内投与なども施行予定である。リコンビナントヒト VII 型コラーゲンによる構造蛋白補充療法は、RDEB 患者における治療選択肢の 1 つになると思われ、今後の構造蛋白補充療法の礎になればと考えている。

副査の山本有平教授からは、RDEB 患者における有棘細胞癌の特徴や転移のメカニズムなどの質問、口腔粘膜・舌・咽頭・喉頭など含めた頭頸部癌の発症についての質問、今後の *in vivo* での実験内容についての質問があった。ついで副査の守内哲也教授からは、VII 型コラーゲンの発現の有無と有棘細胞癌浸潤の関係についての質問、VII 型コラーゲン蛋白補充療法実現後の有棘細胞癌発症頻度についての質問、VII 型コラーゲン精製・投与に関する過去の報告や参考文献についてのコメントがあった。最後に、主査の清水宏教授からは、将来的な臨床応用にむけての展望についての質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、12 才という世界最年少で有棘細胞癌を発症した例、VII 型コラーゲン NC-1 ドメインの有棘細胞癌への影響に関する論文報告等を引用し、大概適切な回答をした。VII 型コラーゲン精製・投与に関する過去の報告例については、学位論文内で追加参考文献を用いて考察することとした。

この論文は、リコンビナントヒト VII 型コラーゲンの単離・精製に成功し、ヒトへの臨床応用の可能性を示唆した研究である点が高く評価され、今後、構造蛋白補充療法の実現に向け、*in vivo* におけるリコンビナントヒト VII 型コラーゲンの効果について明らかにしてゆくことが期待される。

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。