

表皮水疱症の新規治療法の開発

新 熊 悟

新潟大学大学院医歯学総合研究科

皮膚科学教室

(主任：阿部理一郎教授)

Gene Therapy for Dominant Negative Disorders

Satoru SHINKUMA

Department of Dermatology, Niigata University Graduate School of Medicine

(Director; Prof. Riichiro ABE)

要 旨

表皮水疱症は先天的に皮膚が脆弱で、軽微な外力により容易に水疱やびらんを生じる疾患である。表皮-真皮接着部の構成タンパクをコードする遺伝子の変異によって生じることが知られている。我々は表皮水疱症に対し、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子治療および患者由来のiPS細胞や表皮角化細胞を用いた再生医療の開発を行っている。今回、我々の研究成果を中心に、表皮水疱症の最新治療戦略について概説する。

キーワード：表皮水疱症、遺伝子治療、遺伝子編集、iPS細胞

はじめに

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa; EB) は、軽微な外力で全身の皮膚、粘膜に水疱、びらんを生じる遺伝性皮膚疾患である¹⁾。表皮-真皮境界部を構成する構造タンパクの先天的異常により発症する。表皮と真皮が離解する組織学的位置により、表皮水疱症は単純型、接合部型、栄養障害型に分類される。また、複数部位に裂隙が形成さ

れ、3分類のいずれにも該当しないキンドラー症候群が存在する。これらの4型はさらに皮膚の症状や遺伝形式、原因遺伝子によって細かく分類される²⁾。平成22年度の診療報酬算定方法の一部改訂に伴い、表皮水疱症患者に対する在宅難治性皮膚疾患処置指導管理料が設けられた結果、創傷被覆材や非固着性シリコンガーゼ等の在宅での使用が容易になり、治療選択肢の幅が広がった³⁾。しかし、これらの治療は全て対症療法であり、表

Reprint requests to: Satoru SHINKUMA
Department of Dermatology,
Niigata University Graduate School of Medicine,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
皮膚科学教室

新 熊 悟

皮水疱症に対する根治的治療法はいまだに存在しない。今回、根治的治療の有効な手段と考えられている表皮水疱症の遺伝子治療について解説する。

表皮水疱症の遺伝子治療

遺伝子治療は生体内に直接遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子導入法と、生体から採取した細胞に遺伝子を導入し、治療した細胞を生体に戻す *ex vivo* 遺伝子導入法に大きく分けられる。栄養障害型表皮水疱症の治療に用いられる遺伝子導入の対象となる細胞は、皮膚の主な構成細胞である表皮角化細胞や真皮線維芽細胞であり、様々な遺伝子導入法が施行されている。ウイルスベクターを用いた遺伝子導入は目的遺伝子が長大で、また遺伝子導入が困難である表皮角化細胞などにも効率的に遺伝子導入することが可能である⁴⁾。実際に、接合部型表皮水疱症の原因タンパクであるラミニンβ3が完全欠損した表皮水疱症患者から表皮角化細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いてラミニンβ3を発現する *LAMB3* cDNA を遺伝子導入し、表皮シートを作製し植皮する *ex vivo* 遺伝子治療が施行され、植皮された部位の皮膚症状の改善が認められている⁵⁾。しかし、ウイルスベクターとして頻用されるレトロウイルスベクターは宿主ゲノムにランダムに組み込まれ、細胞ががん化する危険性があるため、安全面での課題を克服する必要がある⁶⁾⁷⁾。

栄養障害型表皮水疱症

栄養障害型表皮水疱症 (dystrophic epidermolysis bullosa; DEB) は表皮と真皮を接着させる褶留線維の構成タンパクである7型コラーゲンの異常により、lamina densa 直下の真皮に水疱が形成される。常染色体優性遺伝と常染色体劣性遺伝のものが存在するが、一般的に劣性遺伝形式のものは重症で、優性遺伝形式のものは軽症であることが多い。他の表皮水疱症に比し、裂隙形成部位が深く位置するため、治癒後に癬痕や稗粒腫を残すことが特徴的とされる⁸⁾。

優性型は生下時ないし乳児期から全身主に四肢伸側に水疱形成を認め、爪の変形を伴う。劣性型は生下時ないし生後まもなくから、水疱やびらんが四肢、体幹に繰り返し出現する。さらに繰り返す水疱やびらんのため、指趾は癒合し棍棒状となることがある。口腔粘膜や食道粘膜などにも病変が出現することがあるため、重症例では食道狭窄や嚥下困難を生じる。その結果、栄養不良や慢性的な貧血さらには成長障害をきたす。癬痕部に悪性腫瘍(主に有棘細胞癌)を合併することも知られている⁸⁾。

優性栄養障害型、劣性栄養障害型いずれも7型コラーゲンをコードする *COL7A1* 遺伝子の異常によって発症する⁹⁾。7型コラーゲンは主に表皮角化細胞や真皮線維芽細胞で産生される。Gly-X-Yの3アミノ酸配列の繰り返し構造からなるコラーゲン領域を有する7型コラーゲン前駆分子は3重らせん構造(3量体)を形成した後、細胞外に分泌される。劣性栄養障害型は、両方のアリルに早期終止コドン変異やミスセンス変異など多彩な遺伝子変異を認める。一方、優性栄養障害型は、一つのアリルにコラーゲン領域の Gly-X-Y 繰り返し構造のグリシンが他のアミノ酸に変化するグリシン置換を伴うものが多く、一部の患者ではindel変異が認められる。これらの変異を有する7型コラーゲン前駆体分子は、もう一方の正常遺伝子由来の分子と重合してコラーゲン構造を形成するが、遺伝子変異により3量体の安定性が阻害され、容易に変性、消失するとされている(ドミナントネガティブ効果)¹⁰⁾。

遺伝子編集技術を用いた

優性栄養障害型表皮水疱症の治療戦略

近年、ZFNsやTALENs、CRISPR/Cas9といった遺伝子編集技術が開発され、ゲノム上の任意の配列を特異的に切断・自己修復させ、欠失/挿入変異を誘導することが可能になった¹¹⁾⁻¹³⁾。

我々の研究グループでは遺伝子変異配列のみを認識するゲノム編集技術を用いて、遺伝子変異を有するアリルのみにフレームシフト変異を誘導し

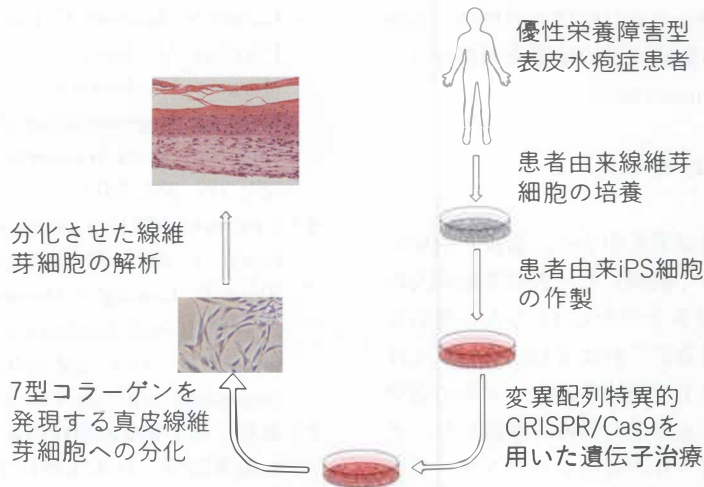


図1 遺伝子変異特異的CRISPR/Cas9を用いた優性栄養障害型表皮水疱症の治療戦略

Shinkuma S et al. Proc Natl Acad Sci USA 2016 より改変.

ノックアウトすることにより、ドミナントネガティブ効果により発症する遺伝性疾患を治療することが可能になると考えた。COL7A1 遺伝子のドミナントネガティブ変異により発症する優性栄養障害型表皮水疱症を対象として、本治療の有効性の検討を行った(図1)¹⁴⁾。

COL7A1 遺伝子の片方のアレルに 15del in の遺伝子変異を有する優性栄養障害型表皮水疱症患者由来細胞を用いて本研究を行った。患者線維芽細胞に episomal ベクターを用いてリプログラミングを行い、患者由来 iPS 細胞を作製した。次に変異特異的 CRISPR/Cas9 を作製し、患者由来 iPS 細胞に遺伝子導入した。その際、Cas9 ベクターとガイド RNA ベクターにそれぞれ GFP と DsRed を発現させ、遺伝子導入後、GFP と DsRed が陽性である iPS 細胞のみを選別回収したところ 90% に遺伝子編集が起こっていることを確認した。次に、フレームシフト変異を生じた iPS 細胞をシングルセルクローニングし、7 型コラーゲンを発現する表皮角化細胞と線維芽細胞に分化させることに成功した。この線維芽細胞において、RT-PCR およびウェスタンブロットによりフレームシフト変異を生じた 7 型コラーゲンが細胞内においてタンパクレベルで分解されている

ことが示唆された。さらにこれらのフレームシフト変異を生じた 7 型コラーゲンリコンビナントタンパクが 3 本鎖を形成できないことを確認した。また、共益免疫沈降法を用いて正常 7 型コラーゲンとフレームシフト変異を導入した 7 型コラーゲンが複合体を形成できないことを証明した。

これらの結果からフレームシフト変異を生じた 7 型コラーゲンは 3 本鎖を形成できず、細胞内で分解され、また正常 7 型コラーゲンと複合体を形成することができないと考えた。本治療法はドミナントネガティブ疾患に対し有効な遺伝子治療法であることが示された。

表皮水疱症友の会 (DebRA Japan)

表皮水疱症は非常に稀な疾患であり、疾患の重症度に比しその認知度は低い。そのため、皮膚科専門医であったとしても診断に難渋することがある。また、たとえ診断されたとしても有効な治療法がなく、対処法が分からないため、不安な日々を過ごしている患者や家族がほとんどである。そのような中、「表皮水疱症友の会 (DebRA Japan)」が 2008 年 3 月に発足し、今年で 10 年が経過した。全国各地から約 200 名の患者が登録

しており、その家族とともに症状や治療法、医療福祉情報、心の悩み相談などの情報交換を行っている (<http://debrajapan.com/>)。

おわりに

今回、我々の研究成果を中心に、表皮水疱症の最新治療戦略について概説した。表皮水疱症友の会が中心となり、日本全国から44万人の署名を集め、表皮水疱症患者がこれまで自己負担しなければならなかった自宅で使用するガーゼ等の包交材料費用の政府支給を厚生労働省に陳情した。その結果、創傷被覆材や非固着性シリコンガーゼ等の在宅での使用が可能になるなど、表皮水疱症患者を取り巻く環境は変わりつつある。しかし、現在の治療法はいずれも対処療法のみであり、表皮水疱症に対する根治的治療法の開発が待たれる。

参考文献

- 1) 新熊 悟, 清水 宏: 表皮水疱症: 病態と診断. 日本皮膚科学会誌 121: 127-133, 2011.
- 2) Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Mellerio JE, Moss C, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Woodley D and Zambruno G: Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol* 70: 1103-1126, 2014.
- 3) 新熊 悟, 清水 宏: 表皮水疱症における医療材料費の現状. *臨床皮膚科* 65: 150-152, 2011.
- 4) Jacków J, Titeux M, Portier S, Charbonnier S, Ganier C, Gaucher S and Hovnanian A: Gene-Corrected Fibroblast Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa using a Self-Inactivating COL7A1 Retroviral Vector. *J Invest Dermatol* 136: 1346-1354, 2016.
- 5) Hirsch T, Rothoelt T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Bicciato S, Bondanza S and De Luca M: Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 551: 327-332, 2017.
- 6) Lewinski MK1, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR and Bushman FD: Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* e60, 2006.
- 7) 新熊 悟: 表皮水疱症における最新の治療戦略と将来展望. *日本皮膚科学会雑誌* 122: 3176-3178, 2012.
- 8) Shinkuma S: Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 8: 275-284, 2015.
- 9) Dang N and Murrell DF: Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 17: 553-568, 2008.
- 10) Chung HJ and Uitto J: Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 28: 93-105, 2010.
- 11) Urnov FD1, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD and Holmes MC: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435: 646-651, 2005.
- 12) Bogdanove AJ and Voytas DF: TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333: 1843-1846, 2011.
- 13) Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE and Church GM: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826, 2013.
- 14) Shinkuma S, Guo Z and Christiano AM: Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 5676-5681, 2016.