

78. 皮膚疾患に対する局所遺伝子治療の開発

岩田 浩明

岐阜大学 大学院医学系研究科 皮膚科学

Key words : 遺伝性皮膚疾患, ハプロ不全, 局所遺伝子治療, ナノファイバーシート

緒言

皮膚は生命維持における最も重要な物理的バリアの一つである。バリア機能により微生物、熱、光などの体内への侵入を防御している。皮膚疾患の治療には、内服・注射薬とは異なり外用剤という最も簡便かつ効率的な治療法がある。しかし、外用剤治療は皮膚バリアを通過しないと目的の細胞あるいは分子に到達することはできない。外用剤治療は、正常なバリア機能を破壊せず、一方で薬剤は通過させるという相反することを両立させることが求められる。

我々は、最近貼付型ワクチンであるマイクロニードルアレイ（以下 MNA）（図 1a）の開発研究を行った [1]。針長 1 mm にも満たない MNA は皮内で溶解してワクチンが皮膚に浸透する。そのため注射針を用いることなくワクチン接種が可能である。MNA は新しい Drug delivery system (DDS) としての有用性に加えて、大きな将来性ある結果が得られた。日本脳炎ワクチンを MNA で接種をしたところ、従来の皮下注射に比較し 10% の抗原量で同等の中和抗体価を得ることができた。そして、25% の抗原量だと 1 回の接種で抗体価はプラトーに達するという経皮免疫の有効性を示す画期的成果が得られた。

我々は、現在のところ有効な治療法がない遺伝性皮膚疾患であるヘイリーヘイリー病（以下 HHD）に対して MNA のような DDS を用いた局所遺伝子治療を提案した。HHD は厚生省の指定難病の一つで常染色体顕性遺伝性皮膚疾患であり、我々は診療ガイドラインの作成責任者をしている [2]。腋窩、鼠径部などにびらんが生じるため激しい疼痛を伴い QOL を著しく損なう。原因は細胞内のゴルジ体に存在するカルシウムポンプ SPCA1 をコードする *ATP2C1* にヘテロ接合性にナンセンス変異が生じる結果、ハプロ不全によりタンパク不足が生じる。その結果、細胞内カルシウム濃度の調整ができず細胞接着が障害されてびらんが生じる [3]。HHD は他の遺伝性疾患同様に有効な治療法がなく、対症療法を行うのみであり新規治療法が強く望まれている。本研究は、MNA を DDS として遺伝性皮膚疾患に応用することを目的とする。

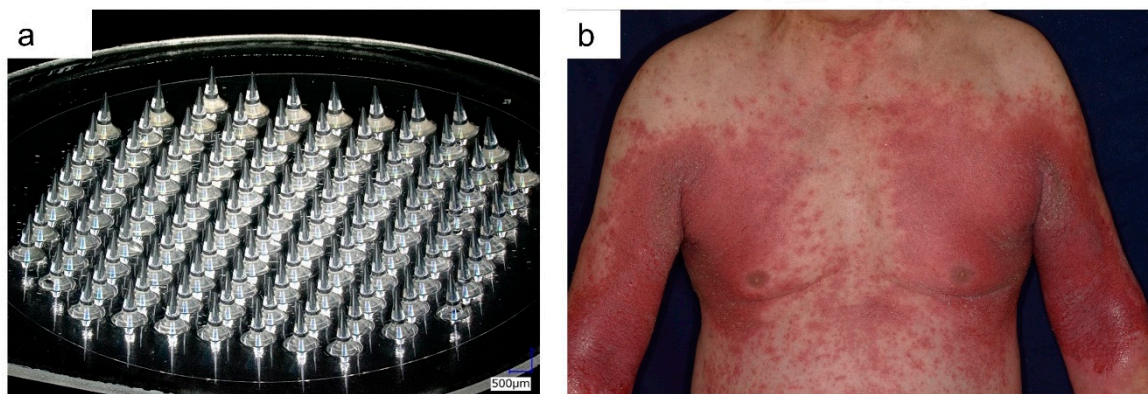


図 1. マイクロニードル (MNA) の拡大像と HHD の臨床像

- 直径約 1.5 cm のプレート上に 109 本の溶解型マイクロニードルが配列している。
- 腋窩から前胸部、腹部にかけて広くびらんが見られる。

方法および結果

1. *ATP2C1* 変異細胞の樹立

不死化ケラチノサイト (HaCaT 細胞) に対して、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子編集を行い、*ATP2C1* 変異細胞 (ノックアウト KO と発現低下細胞) の作製を試みた。

はじめに、lentiCas9-Blast ベクター (Addgene, Plasmid #52962) を用いて Cas9 恒常発現 HaCaT 細胞 (Cas9-HaCaT 細胞) を樹立した。続いて、lentiGuide-Puro ベクター (Addgene, Plasmid #52963) を制限酵素 BsmBI 処理して、*ATP2C1* を標的とするガイド RNA ベクターを作製した。当初は、患者と同じ変異を有する細胞株樹立のため患者と同じ変異 (c457 C>T (pArg 153 Ter) exon7 nonsense mutation) を含むテンプレート DNA を用いた組換えを行ったが効率が非常に低いため断念した。そこで、Cas9-HaCaT 細胞にガイド RNA 処理を行い、ランダムな変異導入によるノックアウト細胞樹立に変更した。ガイド RNA 処理した細胞を 96 ウェルプレートで限界希釈を行い、増殖したコロニーについて *ATP2C1* 遺伝子発現を定量的 PCR (qPCR) にて解析を実施した (図 2)。複数のクローンで *ATP2C1* の mRNA 発現低下があるため、シングルセル樹立を試みたが、毎回全滅するため樹立ができなかった。同様の実験は、*Tert* 遺伝子導入による不死化ケラチノサイト (Ker-CT) でも試みたが、同様にシングルセルにする段階で全滅した。

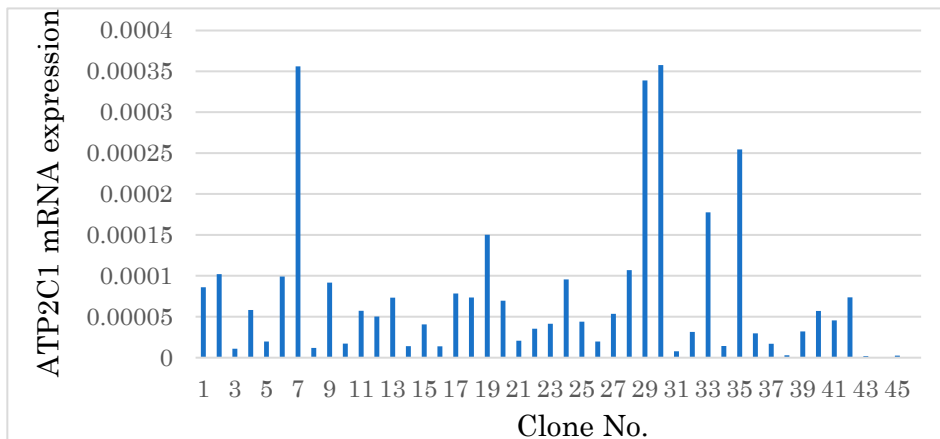


図 2. HaCaT 細胞を用いた *ATP2C1* ノックアウト細胞の作製

ATP2C1 に対して CRISPR-Cas9 処理を行い、限界希釈で得た 45 クローンについて *ATP2C1* の qPCR を実施した。遺伝子発現の極めて低い 9 クローンを二次スクリーニングへと進めた。

一方で、代替案として siRNA によるノックダウンを試みた。ノックダウンは 80%以上の効率が確認できた (図 3)。そのため、今後の細胞実験は、ノックダウン細胞での代用を予定している。

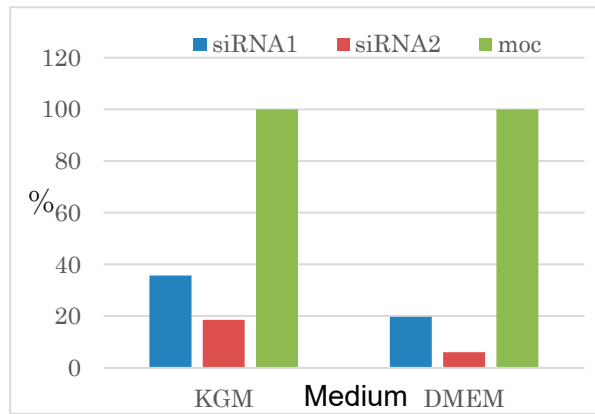


図 3. siRNA による ATP2C1 ノックダウン細胞の作製
 ATP2C1 に対して siRNA 処理を行い qPCR にて遺伝子発現を検討した。80%以上のノックダウン効率を得ることができた。

2. ATP2C1 mRNA の作製

TriLink BioTechnologies 社の mRNA 合成サービスを利用し、既知の ATP2C1 mRNA (NM_001199179.3) を合成遺伝子にて作製を試みた。

T7 プロモーターを有する pET22 (+) ベクターに制限酵素サイトで導入する。ATP2C1 cDNA (NM_001199179.3) は、pUC57 ベクターの BamHI と PstI の制限酵素間に合成遺伝子にて作製した。この際 ATP2C1 の上流に His タグを付して、タンパク発現した細胞を内因性タンパクと区別できるようにした。pUC57 ベクターから pET22 (+) ベクターに XbaI と NotI の制限酵素処理で ATP2C1 遺伝子の入れ替えを行い、mRNA 合成サービスのためには T7 プロモーター直後の配列の制限 (AGG) があるため、一部塩基の除去を Mutagenesis プライマーを用いて行い、ベクターを完成させた。

3. ナノファイバーシート作製

溶解型マイクロニードルワクチン作製が技術的に困難であったため、ポリビニルアルコール基剤を用いた mRNA 含有溶解型ナノファイバーシートを作製した。mRNA の安定性評価は、ATP2C1 の代わりに市販の EGFP mRNA を用いた (全体重量 25 mg、理論上の mRNA 含有量 0.3124 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、作製時の混合条件: 8%ポリビニルアルコール水溶液 1,000 μL 、EGFP mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 25 μL 、Ultrapure water 25 μL) (図 4)。-80°C、-30°C の条件下で保管をしているが、6 カ月経過している。保管検体を作製直後と 6 カ月後で濃度を測定したところ明らかな低下は見られていない。



図 4. 作製したナノファイバーシートと電子顕微鏡像
 EGFP mRNA を含有したナノファイバーシートを作製した。

現在、作製している EGFP mRNA ナノファイバーシートはトランスフェクション試薬を含有しない条件で作製している。トランスフェクション効率を向上させるために、リポフェクション試薬を混合させる必要がある。そのため、EGFP mRNA を 3 種類のトランスフェクション試薬 (RNAiMax、TransIT-mRNA、JetMessenger) を用いて、培養セラチノサイトにトランスフェクションを行った (図 5)。RNAiMax と JetMessenger が比較的高い効率でトランスフェクションが行えたことが分かる。濃度依存性と効率性などから JetMessenger を混合してナノファイバーシートを作製する予定である。

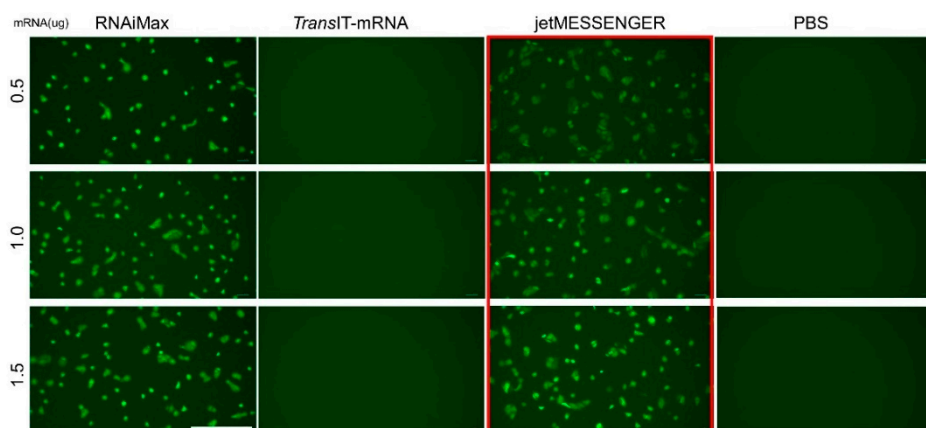


図 5. mRNA トランスフェクション試薬の検討

EGFP mRNA を Ker-CT 細胞にトランスフェクションするために、リポフェクション試薬の効率について検討した。JetMessenger が mRNA の容量依存的にトランスフェクション効率の上昇が認められた。スケール (左下) : 500 μ m。

考 察

遺伝性皮膚疾患は、他の遺伝子疾患同様に有効な治療法がほとんどないのが現状である。本研究では、ゲノム編集のように根本的な遺伝子治療ではなく病変部皮膚のみで一過性の遺伝子発現上昇を誘導する局所遺伝子治療の開発を目的とした研究である。生体に取り込まれても安全な素材ポリビニルアルコールを基質として作製するナノファイバーシートという溶解型のシートを用いて標的遺伝子の mRNA を病変部に届けるということを治療コンセプトとしている。mRNA 医療の臨床応用は、COVID19 のワクチンとして実用化された。しかし、疾患治療目的での臨床応用は実用化に至っていないが、安全性あるいは臨床応用の実現性はワクチンで十分証明された。mRNA 医療の大きな問題点の一つに mRNA の不安定性がある。COVID19 ワクチンも -80°C フリーザーが必要とされて供給問題が生じた。ナノファイバーシートを応用した mRNA 治療では、安定性が飛躍的に高まることが期待される。予備実験レベルで常温保管での安定性と無菌操作なくとも mRNA 分解は進まないことを確認している。さらに、ナノファイバーシートはあらゆる物質に表面加工できるため、創傷被覆材表面に加工し常温保管して使用するということが可能であると期待している。

ナノファイバーシートは、電界紡糸 (エレクトロスピンニング) 法により調製される。高分子ナノファイバーは、サブミクロンサイズ (1 μ m 未満) 径のナノ繊維である。外観は薄いシート状であり、創傷被覆材、外用剤 (貼付剤)、舌下フィルムなど粘膜適用製剤など様々な剤形に応用することが可能であるため、医薬品製剤化プラットフォームになると期待されている [4]。創傷被覆材に加工した際には、病変部に直接 mRNA を送達するため DDS の観点では全身療法と異なり大きなアドバンテージとなる。

本研究は、HHD あるいは表皮水疱症など遺伝性皮膚疾患に対する局所遺伝子治療を開発することを目的としている。これらの疾患の一部はタンパク不足で生じるため、治療はタンパクを増加させることとコンセプトはシ

ンプルである。タンパクを増やすためには、①タンパク補充、②mRNA 補充・mRNA 発現促進、③ゲノム編集・遺伝子導入と大きく 3 つの治療方針が考えられる。①タンパク補充は、mRNA に比べて時間と費用が莫大となる欠点がある。一方で、安定性は高い利点がある。③ゲノム編集は、発がん性リスクが大きな問題であるが、より根本的治療となる利点がある。ゲノム編集以外は基本的には一過性治療で、治療継続が必要となるため、遺伝子疾患では究極的な目標はゲノム編集となる。②mRNA 補充は、mRNA が不安定であり一過性であるが、今回のナノファイバーシートを用いることにより不安定性は克服できる可能性がある。さらに、別プロジェクトでは異なるコンセプトで治療開発を行っている。HHD はハプロ不全のため 1 つの遺伝子は正常に機能している。正常な *ATP2C1* 遺伝子発現を向上させることができれば、タンパク発現が増加して症状改善が得られる可能性がある。そのため *ATP2C1* 遺伝子のプロモーター刺激をする低分子化合物のスクリーニングから治療候補を探求している。

遺伝性疾患の多くは、いまだに根本的治療は困難である。しかし、遺伝子疾患は多因子疾患と異なり原因は明らかであるため治療標的は明確である。表皮水疱症でヘルペスウイルスにより遺伝子導入療法などが米国では臨床応用され、本邦での治験が進んでいる [5]。少しずつであるが対症療法に代わる治療が実用化されることが期待される。我々の研究も、治療候補の一つとなることを目指して今後も継続していく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ナノファイバーシートの作製に関して岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤研究室の田原耕平先生、mRNA の安定化技術について岐阜大学工学部化学・生命工学科の喜多村徳昭先生に協力を頂いた。

文 献

- 1) Iwata H, Kakita K, Imafuku K, Takashima S, Haga N, Yamaguchi Y, et al. Safety and dose-sparing effect of Japanese encephalitis vaccine administered by microneedle patch in uninfected, healthy adults (MNA-J): a randomised, partly blinded, active-controlled, phase 1 trial. *Lancet Microbe*. 2022 Feb;3(2):e96–104. PMID: 35544051 DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00269-X
- 2) 家族性良性慢性天疱瘡診療ガイドライン策定委員会岩田 浩明. 家族性良性慢性天疱瘡診療ガイドライン 2023. *日本皮膚科学会雑誌*. 2024 Feb;134(2):273–87.
- 3) Farahnik B, Blattner CM, Mortazie MB, Perry BM, Lear W, Elston DM. Interventional treatments for Hailey-Hailey disease. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Mar;76(3):551-558.e3. PMID: 27745906 DOI: 10.1016/j.jaad.2016.08.039
- 4) 耕平田原. *Drug Delivery & Formulation 研究の推進と社会実装に向けて—岐阜薬科大学 製剤学研究室とナノファイバー創剤学寄附講座—*. 薬剤学. 2022;82(4):206–10.
- 5) Guide SV, Gonzalez ME, Bağcı IS, Agostini B, Chen H, Feeney G, et al. Trial of Beremagene Geperpavec (B-VEC) for Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *N Engl J Med*. 2022 Dec;387(24):2211–9. PMID: 36516090 DOI: 10.1056/NEJMoa2206663