

【目的】 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が、視点を変えると問題点にもなる。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有用な治療法がある。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。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、最近貼付型マイクロニードルワクチンの開発研究を行った。針長 1 mm にも満たないマイクロニードル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。現在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(図)に対してマイクロニードルによる局所遺伝子治療を提案した(図)。本疾患を選んだ理由として、1. タンパク不足が原因と病態が単純であり、治療ゴールはタンパクの増加である。2. 皮膚にびらんが生じるため、皮膚バリアが最初から破綻した状態である。3. 皮膚のみの症状であり、全身治療の必要性がないという三つの理由が挙げられる。

【方法】 1. 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) の作製を行った。2. TriLink BioTechnologies 社の mRNA 合成サービスを利用するため、既知の *ATP2C1* mRNA (NM_001199179.3) を合成遺伝子にて作製することとした。T7 プロモーターを有する pET22 vector などに制限酵素サイトで導入し、それをもとに mRNA 合成を行う。この際、*ATP2C1* の上流に GFP あるいは 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。3. 合成 mRNA は、RNase フリーの環境下で作製されたものに関しては、通常、我々が細胞などから抽出する RNA に比べはるかに安定性が高いことは知られている。より安定性を高めるため化学修飾あるいは分解酵素の阻害遺伝子の導入を計画した。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、溶解型ナノファイバーシートに mRNA を混和して固形化した状態を作製した(図)。

【結果】 1. レンチウイルスベクターにより恒常的に Cas9 を発現する HaCaT 細胞を作製した (Cas9-HaCaT 細胞)。*ATP2C1* 遺伝子を切断するためのガイド RNA を作製して、トランスフェクションを行い限界希釈法により単一細胞クローン樹立を試みた。しかし、複数回行っても単一細胞では死滅したため、*ATP2C1* のノックダウンを行い、80%以上の低下を認めた。2. His タグをつけた *ATP2C1* 遺伝子を pET22 (+) ベクターの T7 プロモーター下流に導入したベクターが完成した。3. EGFP mRNA を含んだナノファイバーシートを作製して、長期安定性試験を実施している。2024 年 1 月で 6 カ月経過するが -30°C 保管で mRNA の総量の変化はほぼないことを確認した。

ヘイリーヘイリー病の臨床と病態、研究計画のイメージと作製したナノファイバーシート

