

平成 30 年 7 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0289

研究課題名（和文）17型コラーゲン発現制御による画期的水疱症モデルの作成と応用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Production of blistering disease model by regulating collagen XVII expression.
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

西江 渉 (Nishie, Wataru)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20443955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間：7ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、皮膚の基底膜構成分子である17型コラーゲン（COL17）にR1303Q変異に伴い生じる皮膚基底膜の重層化機序を解明することである。渡航先の研究室では本変異を持つ患者の臨床データを解析し、本変異を持つマウスのCOL17タンパクを作製した。マウスCOL17でも、細胞外領域のプロセッシングが変異に伴い阻害されることを確認した。またゲノム編集技術を応用し、R1303Qに相当する変異（R1282Q）をCOL17に有するマウスを作製した。予定通りヘテロで変異を持つマウス作製に成功し、現在、皮膚の基底膜の重層化や角化細胞の遊走への影響を明らかにするためにホモで変異を持つマウスを作製中である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate pathomechanism of basement membrane duplications in the skin due to R1303Q mutation in the COL17A1. From plenty amount of clinical information of the patients with COL17A1 mutations in the department of dermatology Freiburg University Medical Center, clinical characteristics of COL17 R1303Q patients were addressed. Recombinant mouse COL17 protein with the same mutation revealed that the mutation impedes the processing of COL17, as observed in human COL17 R1303Q keratinocytes. Based on this in vitro data, we tried to generate gene manipulated mice carrying the R1282Q mutation in mouse COL17, which corresponds to human COL17 R1303Q, by gene editing using CRISPR/Cas-9. Fortunately, heterozygous mice with the mutation were produced. Currently, we are trying to produce homozygous mice with the mutation to address pathomechanism of pathomechanism of basement membrane duplications in the skin due to R1303Q mutation in the COL17A1.

研究分野：水疱症

キーワード：コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

膜貫通タンパクである XVII 型コラーゲン (COL17) は、細胞外領域を介し細胞外マトリクス (ECM) でラミニン 332 や IV 型コラーゲンと結合する皮膚の基底膜構成分子である (図 1)。

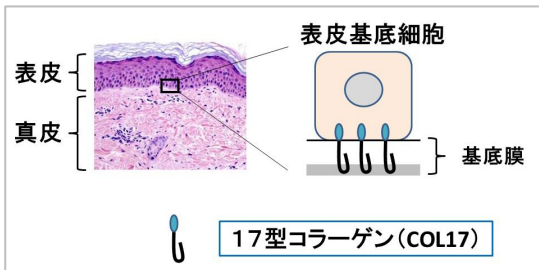


図 1 表皮真皮間接合を担う COL17

COL17 は表皮真皮間接合に必須な分子であり、遺伝子変異に伴い COL17 発現が消失すると、外的刺激に伴い容易に水疱を形成する表皮水疱症を発症する。また COL17 の細胞外領域に 1 アミノ酸置換 (R1303Q 変異) が生じると、水疱形成に加え基底膜の重層化を来すことが知られており (図 2) 皮膚基底膜の構築には正常な COL17 の発現が不可欠であることが解る。



図 2 COL17 に R1303Q 変異を持つ患者 (基底膜が重層化している)

COL17 に R1303Q 変異を持つ表皮基底細胞 (R1303Q-COL17 表皮基底細胞) を用いると、本変異に伴う基底膜重層化機序の解明が期待できるため、研究者は 1 名の本邦在住患者から初代 R1303Q-COL17 表皮基底細胞を培養し、研究をすすめてきた (Nishimura M, et al. Hum Mol Genet 25: 328-39, 2016)。しかし本変異を持つ患者は極めて少なく、研究の更に発展するためには、本症例を有

する研究機関との共同研究が必須である。

研究者らは、過去に COL17 発現をノックアウトし、さらに正常ヒト COL17 を遺伝子導入した “COL17 ヒト化マウス” を作成したが (Nishie W, et al. Nature Medicine 13: 378-83, 2007)、本技術を応用すると R1303Q-COL17 発現モデルマウス (R1303Q-COL17 ヒト化マウス) を作成可能である。本マウスは、R1303Q 変異に伴う皮膚基底膜の重層化機序の解明に極めて有用であると予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、COL17 の R1303Q 変異に伴う皮膚基底膜の重層化機序と皮膚基底膜の構築機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) COL17 R1303Q 変異 (+) 患者の解析

世界で最も多くの COL17 R1303Q 変異 (+) 患者を診療しているドイツフライブルグ大学皮膚科で多数の症例の臨床所見を詳細に解析し、本疾患の臨床的特徴を把握する。

(2) COL17 R1303Q 変異 (マウス COL17 では R1282Q 変異) に伴う COL17 のプロセッシングの影響

研究者らは、R1303Q 変異 (+) に伴い COL17 の細胞外領域のプロセッシングが阻害されることを報告している (Nishimura M, et al. Hum Mol Genet 25: 328-39, 2016)。しかしマウス COL17 でも同様の变化を来すかは全く不明である。本変異はマウス COL17 の R1282Q に相当するため、ヒト COL17 R1303Q を解析した際と同様に、HEK293 細胞を用いリコンビナントマウス COL17 R1282Q 細胞を作製する。得られたリコンビナントタンパクをプラスミンで切断し、R1282Q 変異に伴う C 末端の切断への影響について明らかにする。

(3) COL17 変異を持つモデルマウスの作製

本研究を計画した当初は、R1303Q 変異 (+) ヒト COL17 遺伝子発現マウスを新たに

作製し、研究者らが有する COL17 遺伝子ノックアウトマウスと交配し、“ R1303Q-COL17 ヒト化マウス ” を作製する計画を立てていた。しかし近年ゲノム編集技術が飛躍的に進んだことから、マウス COL17 自体をゲノム編集し、マウス COL17 に R1282Q 変異を持つ有する遺伝子改変動物を作製した方が簡単であろうと予想された。そこでマウス C57BL/c マウス受精卵へ Cas-9 タンパク発現ベクターとマウス COL17 R1282Q 付近を標的としたガイド RNA (gRNA)、R1282Q 変異を導入 (1,282 番目の Arg をコードする AGG を Gln をコードする CAG へ置換) した約 120bp の一本鎖 DNA をテンプレートとしてマイクロインジェクションすることとした。遺伝子導入した胚は偽妊娠マウス子宮へ移植し産仔マウスから DNA を抽出し、当該変異を有する個体をダイレクトシーケンス法で同定する。

4 . 研究成果

ドイツ、フライブルグ大学皮膚科で多数の COL17 R1303Q 変異 (+) 患者を診療している Has 医師と Bruckner-Tuderman 医師と情報交換し、本疾患ではこれまで報告されている手指の硬化に加え過角化も生じていることを見出した。COL17 の変異に伴う表皮基底細胞の角化への影響については全く解明されていないため、モデル動物が作製された際には解析を進める予定である。

マウス COL17 に R1282Q 変異が生じた際のプロセッシングに与える影響を解析するために、Flp-In システムを用い正常のリコンビナントマウス COL17 タンパクと R1282Q 変異を持つマウス COL17 タンパクを作製した。作製した各リコンビナントタンパクをプラスミンで切断したところ、R1303Q 変異を持つヒト COL17 タンパクと同様、R1282Q 変異を持つマウス COL17 タンパクも C 末端の切断が阻害されることを確認した (図 3)

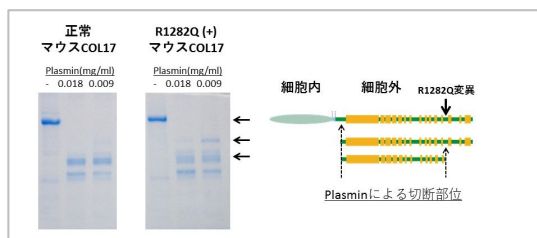


図 3 R1282Q 変異による C 末端の切断阻害

本結果から、マウス COL17 へ R1282Q 変異を導入した場合、ヒト COL17 に R1303Q 変異を持つ患者と同様の表現型を再現できる可能性を示唆している。

上記の結果に基づき、マウス COL17 の R1282Q 付近をターゲットとする gRNA、R1282Q 変異を持つ約 150bp の一本鎖合成 DNA を C57/BL6 マウス受精卵へマイクロインジェクション施行したところ、同変異をヘテロで持つ複数の個体が得られた。本変異をヘテロで持つマウスは、患者の両親と同様、異常な表現型は認めなかった (図 4)

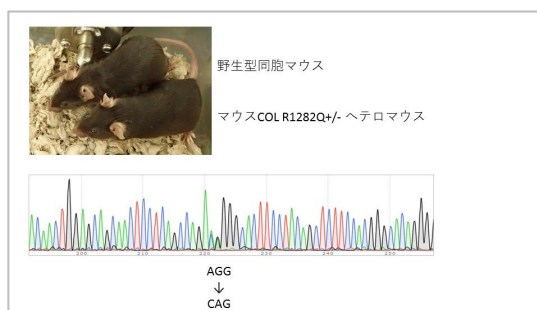


図 4 ゲノム編集で作製された COL17 R1282Q +/- マウス

得られたマウスを野生型マウスと交配し、同変異が継代された仔マウス同士を更に交配し、現在、マウス COL17 に R1282Q 変異をホモで持つ目的マウスを作製しているところである。目的マウスは COL17 の変異に伴う皮膚基底膜の重層化機序の解明に極めて有用であると予想され、今後、解析を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Ujiie H, Iwata

- H, Natsuga K, Hiroshi Shimizu.
Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay.
J Dermatol Sci 88; 247-8, 2017 査読あり、
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.005
2. Toyonaga E, Nishie W, Mayumi W, Ujiie H, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Nakamura H, Shimizu H.
C-terminal cleavage of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA bullous dermatosis autoantibodies.
J Invest Dermatol 137; 2552-9, 2017 査読あり、
DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.831
3. Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Tsukiyama T, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt F, Shimizu H.
Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis.
eLife 6; e26635, 2017 査読あり、
DOI: 10.7554/eLife.26635
4. Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Shinkuma S, Watanabe M, Izumi K, Nakamura H, Hirako Y, Shimizu H.
Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis bullosa simplex.
Hum Mutat 38; 1666-70, 2017 査読あり、
DOI: 10.1002/humu.23344

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Nishie W.
Fc-independent mechanisms.
Scientific conference of the International Pemphigus and Pemphigoid Foundation (IPPF).

2017年6月23日、Media Docks (Lübeck, Germany)

2. Nishie W.
DPP4 inhibitors-associated bullous pemphigoid.
Italian association of pemphigus and pemphigoid patients.
2017年10月7日、IDI Istituto Dermatologico dell'Immacolata (Rome, Italy)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西江 渉 (NISHIE, Wataru)

北海道大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：20443955

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Leena Bruckner-Tuderman

フライブルグ大学・皮膚科・教授