

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380164
 研究課題名（和文） 新規 NFκB 抑制タンパク質欠損マウスを用いたアトピー性皮膚炎発症機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of a novel NFκB inhibitor deficient mouse as a model for atopic dermatitis
 研究代表者
 森松 正美（MORIMATSU MASAMI）
 北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
 研究者番号：70241370

研究成果の概要（和文）：NFκB抑制核タンパク質MAILを欠損する新規マウスを用いて新しいアトピー性皮膚炎モデル動物として確立するとともに、これを材料としてアトピー性皮膚炎の発症機構を解析した。新規MAIL欠損マウスにおける皮膚炎病態を解析してその発症メカニズムを考察し、MAILと機能的に相互作用する遺伝子を検索して胎生期致死や皮膚炎の原因を探った。また、MAIL欠損マウスにおける胎生期致死の問題を克服してマウスを作出する効率を上昇させることを試みた。

研究成果の概要（英文）：MAIL (molecule possessing ankyrin-repeats induced by LPS) is a nuclear IκB protein that is also termed inhibitor of nuclear factor kappaB (IκB) zeta. We generated Mail-deficient mice that appeared to develop atopic dermatitis (AD). In this study, we tried to rescue embryonic lethality of the mice. We investigated expression and function of MAIL in the skin to elucidate its role in AD. Possible interactions of Mail with some genes were also investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：NFκB、IκB、アトピー性皮膚炎、疾患モデル、

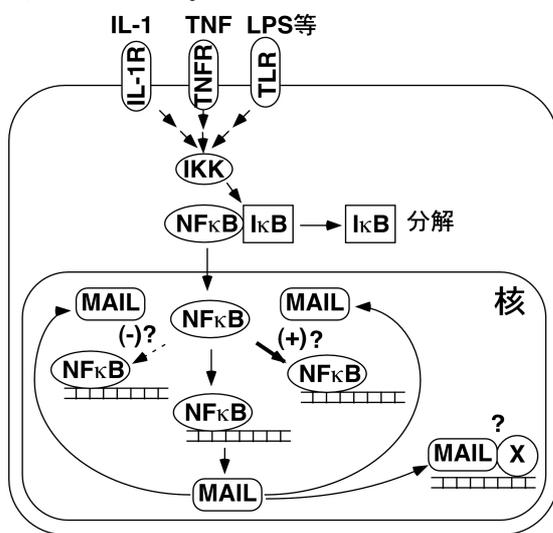
1. 研究開始当初の背景

自然免疫 (innate immunity) は、各種病原体に共通して存在する構造物 (リポ多糖

体 (LPS)、細胞壁ペプチドグリカン、二本鎖 RNA など) を認識する生体防御反応であり、これらの構造物が Toll 様受容体

(TLR)を介してNFκB(nuclear factor for κ chain gene in B cells)系を活性化する細胞内情報伝達機構がその反応系において中心的な役割を担っている。

研究代表者らはマウスに大腸菌由来LPSを投与して炎症反応を起こさせた際に顕著に増加する分子を検索する過程で、NFκB抑制タンパク質(IκB: inhibitor of NFκB)ファミリーと類似したアミノ酸配列を持つユニークな分子、IκB-MAIL(molecule possessing ankyrin repeat induced by lipopolysaccharide)を発見した。それまで報告されていたIκBファミリー分子はあらゆる細胞で恒常的に存在してNFκBと結合しこれを細胞質にとどめる抑制タンパク質であり、刺激に応じてIκBが分解されると抑制が解除されてNFκBが核に移行し標的遺伝子群の転写が活性化される。これに対して申請者らが発見したIκB-MAILは他のIκBと異なり、無刺激状態では細胞にほとんど存在せず、LPSや炎症性サイトカインによる刺激で誘導されて速やかに核に局在する。しかし、IκB-MAILの生体内での機能にはまだ不明な点が多く残されていた。



想定されるIκB-MAILの役割

研究代表者らは、このIκB-MAILの機能解析のためにジーンターゲットングによりこの分子を破壊したマウスを作製したところ、ホモ型欠損マウスの約9割が胎生期に死亡することを発見した。また、出生したマウスは顔面を中心にアトピー性皮膚炎様の病態を示すことを発見した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らが開発したアトピー性皮膚炎様の病態を示すMAIL欠損マウスを新しい疾患モデル動物として確立するとともに、これを材料としてアトピー性皮膚炎の発症機構を解明することとした。具体的には、このマウスを用いて次の3つの目的で研究を行った。

- (1) MAIL欠損マウスにおける皮膚炎病態の解析
- (2) MAILと機能的に相互作用する遺伝子の検索
- (3) MAIL欠損マウスにおける胎生期致死の問題の克服

3. 研究の方法

(1) 動物実験

マウスは室温24±1℃、湿度50%、12時間毎の明暗交代照明条件下で飼育し、市販の固形試料および水道水を自由に摂取させた。すべての動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省)、および「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づいて行った。

(2) 細胞培養

初代培養角化細胞は、生後3日以内の新生仔マウスより分離した皮膚をディスペラーゼおよびトリプシンで処理して調製し、(KGM2 Bullet kit; Cambrex)で培養した。

マウス角化細胞株PAM212は、10% FCSを含むEMEMで培養した。

(3) mRNA発現量の解析

臓器、あるいは細胞からmRNAをTRIzol Reagent(Invitrogen)で抽出し、RT-PCRを行って発現量を解析した。定量的PCRはTaqManケミストリを利用したリアルタイムPCRシステムで行った。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドをFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)で細胞に導入し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)によって活性を測定した。

(5) 免疫組織化学

凍結させた組織から厚さ5 μmの切片を作製し、各種の特異抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗体、あるいは蛍光標識抗体と反応させて観察した。

(6) 皮膚におけるアポトーシスの検出

パラホルムアルデヒドで固定した組織で TUNEL 法により検出した。

4. 研究成果

(1) マウス皮膚における MAIL の発現調節について

無刺激正常マウスにおける MAIL の発現量を解析したところ、皮膚における MAIL の発現量と脾臓、胸腺などの免疫担当臓器における MAIL の発現量は、ほぼ同等であった。皮膚において MAIL は真皮ではなく表皮に特異的に発現していた。LPS の投与によって皮膚における MAIL の発現量は変化しなかった。

初代培養角化細胞において MAIL は大量に発現しており、その量は NF κ B 阻害剤である Bay11-7082 の添加により 90%減少した。角化細胞株の PAM212 も MAIL を発現していることを確認した上で PAM212 細胞を用いて *Mail* プロモーターの上流 1.7 kb の配列、あるいは NF κ B 依存性(4 \times κ B)配列を含むレポータープラスミドの転写活性をルシフェラーゼアッセイにて解析したところ、2 つのプロモーターはほぼ同等の転写活性を示した。IkB α M スーパーリプレッサーとコトランスフェクションすると、転写活性はどちらのプロモーターも 60%減少した。

C57BL/6 マウスの皮膚と、PAM212 における NF κ B サブユニットの細胞内局在を調べたところ、RelA と c-Rel は大部分が細胞質に局在していたが部分的には核内にも存在していた。p50 と p52 は核内にのみ存在していた。RelA は表皮基底細胞層の細胞質および核内に存在した。c-Rel は表皮の全層にわたって細胞質および核内に存在した。p50 と p52 は表皮基底細胞から有棘細胞層の核内に存在した。RelA と c-Rel は PAM212 細胞においても、細胞質と核内に存在した。その多くが細胞質に存在し核内に存在するものは一部であった。p50 と p52 は PAM212 細胞においても核内にのみ存在した。

角化細胞における MAIL の発現調節を、初代培養角化細胞と角化細胞株 PAM212 を用いて調べた。in vivo の結果と同様に、初代培養角化細胞を LPS で刺激しても MAIL の発現量は増加しなかった。初代培養角化細胞を IL-1 あるいは TNF- α で刺激

すると、無刺激と比べてそれぞれ 10 倍あるいは 2 倍に MAIL の発現量が増加した。初代培養角化細胞を LPS 刺激しても IkB α の発現量は増加しなかった。しかし、IL-1 あるいは TNF- α で刺激すると、無刺激と比べてそれぞれ 5 倍あるいは 3 倍に IkB α の発現量が増加した。初代培養角化細胞において IL-6 は無刺激時には検出限界以下であったが、LPS, IL-1, TNF- α のいずれによっても刺激後著しく誘導された。LPS 受容体である TLR2 と TLR4 は初代培養角化細胞で、刺激の有無に関係なく構成的に発現していた。角化細胞株 PAM212 を LPS で刺激すると無刺激に比べて 10 倍に MAIL の発現量が増加した。角化細胞株 PAM212 を IL-1, TNF- α で刺激するとどちらの刺激によっても MAIL の発現量は 2 倍に増加した。

これらの結果から角化細胞での恒常的な MAIL の発現には NF κ B が関与していることが示された。また、MAIL は角化細胞では、IL-1 刺激では誘導されるにもかかわらず、LPS 刺激によっては誘導されなかったことから、角化細胞における刺激の種類に特異的な MAIL 発現調節機構の存在が推察された。

(2) 皮膚での MAIL の発現調節における IFN- γ の役割について

初代培養角化細胞において、IFN- γ 単独刺激によって MAIL の発現量は 15 倍に増加し、これは IL-1 の単独刺激よりも強い作用であった。IL-1 あるいは TNF- α を IFN- γ と共刺激した場合、IL-1 では 60 倍、TNF- α では 45 倍に MAIL の発現量が増加し、それぞれ IFN- γ 刺激との間に相乗効果が認められた。細胞株 PAM212 では、IFN- γ 単独の刺激によって MAIL の発現量は 2 倍に増加した。IFN- γ と共刺激した実験においては、LPS では 7 倍、IL-1 では 11 倍、TNF- α では 11 倍に MAIL の発現量が増加し、それぞれ IFN- γ 刺激との間に相乗効果が認められた。

IFN- α 単独の刺激は 4 倍に MAIL の発現量を増加させたが、IL-1 あるいは IFN- γ と IFN- α を共刺激した場合、IFN- γ を用いた共刺激で見られるような相乗効果は認められなかった。IL-1、IFN- α 、IFN- γ の 3 因子による共刺激では 20 倍まで発現が増加した。

初代培養角化細胞において、Bay11-7082

と JAK inhibitor I は IL-1 と IFN- γ の共刺激による MAIL 発現量の増加を完全に、また PD98059 と SB203580 は 60% 抑制したのに対し、AG490 と SP600125 は抑制効果を示さなかった。PAM212 細胞についてもこれらの阻害剤と同様の効果が認められた。

上流 1737 b、上流 723 b、上流 357 b のフラグメントをトランスフェクションしたところ、IL-1 と IFN- γ の共刺激をすることでルシフェラーゼ活性が上昇した。上流 1737 b よりも、約 1 kb 短い上流 723 b のフラグメントをトランスフェクションした場合の方が共刺激に対する応答性が高かった。3 つの ISRE と STAT 認識配列を削った上流 357 のフラグメントをトランスフェクションした場合には、共刺激に対する応答性は低下した。

IFN- γ は、IL-1 や TNF- α による MAIL の発現誘導を相乗的に増加させ、この相乗効果には NF κ B 経路、JAK-STAT 経路、MAPK 経路が関与していることが示された。

(3) MAIL 欠損マウス皮膚の皮膚炎病態の解析

表皮基底細胞の分化マーカーである K14 はノックアウトと野生型の間で違いがなかったが、有棘層から顆粒層にかけての分化マーカーである K10 と顆粒層の分化マーカーである filaggrin の染色性がノックアウトマウスでは低下していた。

皮膚組織切片において細胞増殖マーカーである Ki-67 が陽性の角化細胞数は、MAIL ノックアウトマウスのほうが野生型マウスよりも少なかった。初代培養角化細胞を用いて培養下での増殖能を検討したところ、野生型に比べて MAIL ノックアウトマウスに由来する角化細胞の方が低かった。

表皮においてアポトーシスをおこしている角化細胞を TUNEL 法で検索したところ、その頻度や位置に関してはノックアウトと野生型とで違いがなかった。

MAIL は NF κ B 調節タンパク質であるため、MAIL をノックアウトすることによって角化細胞における NF κ B の活性が影響を受ける可能性があるため、NF κ B の代表的な標的遺伝子である I κ B α の遺伝子産物を免疫染色で調べたところ、MAIL ノックアウトマウスと野生型とで違いがなかった。

皮膚炎発症における要因の候補として、細菌の影響を検討したところ、常在菌の一種が分離された。

以上の結果より、MAIL が角化細胞の分化、増殖に関与していることが示されたが、これは NF κ B 経路への直接的な影響とは別のものによることが示された。また、皮膚炎の発症に常在菌が関与することが示唆された。

(4) MAIL 欠損マウスと他の系統のマウスの交配による遺伝学的解析

MAIL 欠損マウスの胎生期致死を克服するとともに、MAIL と機能的に相互作用する遺伝子を同定するため、交配による解析を行った。

本研究では NF κ B コンポーネント、NF κ B 標的分子、およびアポトーシス制御分子についてそれぞれの欠損マウスを MAIL 欠損マウスと交配させ、胎生期致死への影響を解析したが、いずれの交配においても改善は認められなかった。

胎生期致死が部分的であることの原因が遺伝的背景の不均一性に起因する可能性を調べるため、129 系と C57BL/6 の交雑系であるものにたいして戻し交配を行った。コンジュニックとなっても胎生期致死は部分的であったことから、これは遺伝的な不均一性によるものではないことが判明した。

一方、クローズドコロニーの系統と交配させることで若干の改善が認められたことから、胎生期致死は遺伝子による影響を受けていることが明らかとなった。しかし、具体的に影響を与える遺伝子の同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kano, K., Kitamura, A, Matsuwaki, T, Morimatsu, M., Naito, K, Discoidin domain receptor 2 (DDR2) is required for maintenance of spermatogenesis in male mice, Mol. Reprod. Dev. 査読有、77巻、2010年、29-37ページ

② Tomioaka, Y., Morimatsu, M., Amagai, K, Kuramochi, M, Watanabe, Y, Kouda, S, Wada,

T, Kuboki, N, Ono, E.、 Fusion protein consisting of the first immunoglobulin-like domain of porcine nectin-1 and Fc portion of human IgG1 provides a marked resistance against pseudorabies virus infection to transgenic mice、Microbiol. Immunol.、査読有、53 卷、2009 年、8-15 ページ

研究者番号：

〔学会発表〕（計 9 件）

①Yoshikawa, Y. ら、BRCA2 (FANCD1) loss of heterozygosity identified in a case of canine mammary tumor using novel microsatellite marker、The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008、2008 年 4 月 22 日、大津市

②Yoshikawa, Y. ら、Mutation analysis of unclassified variants in the C-terminal RAD51-binding region of BRCA2/FANCD1、The Twentieth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium 2008 年 10 月 4 日、米国オレゴン州ユージン市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森松 正美 (MORIMATSU MASAMI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：7 0 2 4 1 3 7 0

(2) 研究分担者

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：5 0 3 7 4 6 7 4

重茂 克彦 (OMOE KATSUHIKO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：6 0 2 2 4 3 0 9

加納 聖 (KANO KIYOSHI)
東京大学・農学生命化学研究科・助教
研究者番号：4 0 3 1 2 5 1 6

前田 貞俊 (MAEDA SADATOSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：5 0 3 7 7 6 9 4

(3) 連携研究者（該当なし）

()