

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390305

研究課題名 (和文) VII 型コラーゲン遺伝子改変マウスによる栄養障害型と後天性表皮水疱症の新規モデル

研究課題名 (英文) Animal model for dystrophic epidermolysis bullosa and acquired epidermolysis bullosa using genetically engineered mice of type VII collagen

研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60196334

研究成果の概要 (和文) : VII型コラーゲンは皮膚基底膜に存在する構造蛋白であり、その遺伝子異常で栄養障害型表皮水疱症が、またその蛋白に対する自己抗体により後天性表皮水疱症が発症する。そのため、皮膚科領域では重要な蛋白である。本研究の目的は、コンディショナルノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスを用い、その2疾患の新しいモデル動物を作成し、その病態の解明や画期的治療法の開発に寄与することであった。今回の研究で、生存可能な栄養障害型のモデルの作成に成功した。後天性表皮水疱症に関しては、自己抗体の産生が認められなかった。その他、表皮水疱症の遺伝子変異検索なども行った。

研究成果の概要 (英文) : Type VII collagen is a structural protein within basement membrane zone and its gene defect leads to dystrophic epidermolysis bullosa. Also generation of autoantibody against type VII collagen causes acquired epidermolysis bullosa. Thus, type VII collagen is a major protein in the field of dermatology. The purposes of this study are to establish models of those type VII collagen related diseases and make great contributions for disclosing disease mechanisms and development of new effective treatments using genetically engineered mice. In this study we could generate model mouse of dystrophic epidermolysis which can survive for long time. However, we could not detect auto antibody against type VII collagen in the model mice for acquired epidermolysis. Furthermore, we performed mutation analysis of patients with epidermolysis bullosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮水疱症、VII型コラーゲン、基底膜、遺伝子治療、マウスモデル、自己免疫、皮膚、抗体

1. 研究開始当初の背景

研究代表者である澤村大輔は、長期にわたりVII型コラーゲンに関連する研究を継続し

てきた。VII型コラーゲンcDNA全長の構築を行い、その遺伝子を初めて生体の表皮細胞に導入し (Sawamura et al. J Invest Dermatol

(JID) 2002)、VII型コラーゲンの創傷治癒における重要性を明らかにした(Sawamura et al. JID 2003)。また、患者表皮細胞や線維芽細胞にレトロウイルスを用いてVII型コラーゲン遺伝子を導入する方法を確立し(Goto, Sawamura et al. JID 2005)、本遺伝子の終止コドンをもつエクソンをオリゴRNAを用いてスキップさせることにより翻訳を継続する新しい治療法の開発も行っている(Goto, Sawamura et al. JID 2006)。以上のように研究を進めてきたが、栄養障害型表皮水疱症や後天性表皮水疱症の病態解析、新規治療法の確立などをさらに発展させるには、有用なモデル動物が不可欠である。我々は近年、接合部型表皮水疱症のモデルとして、XVII型コラーゲンのノックアウト(KO)マウスを独自に開発した(Nishie, Sawamura, Co-first, Nat Med 2007)。このKOマウスは、長期生存可能な動物モデルであったため、これにより接合部型表皮水疱症の発症機構を明らかにし、また遺伝子治療の効果を検討できた。しかし、栄養障害型表皮水疱症のモデル動物を見てみると、確かにVII型コラーゲンのKOマウスはあるが、VII型コラーゲン欠損は致死性であり、生後すぐ死亡するため、いろいろな解析実験に用いることができない。一方、後天性表皮水疱症患者の自己抗体をマウスに投与すると病変は形成されるが、マウス自体からは抗体が産生されない。そこで、新しい遺伝子改変システムであるコンディショナル(con) KOマウスの系を用いる本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、タモキシフェン(TAM)投与でCreリコンビナーゼが活性化されるシステムを持つTGマウスとconKOマウスを掛け合わせる。その結果、TAMを投与した時点でマウスのVII型コラーゲン遺伝子が破壊され、栄養障害型が発症する。一方、さらにそのマウスに、テトラサイクリン(TC)で誘導できるヒトVII型コラーゲン遺伝子を持つTGマウスを交配する。始めに、そのマウスをヒトVII型コラーゲンで免疫し、抗体を誘導する。つぎにTAMにてマウスの遺伝子を破壊、TCにてヒトの遺伝子を誘導する。新たに発現したヒトVII型コラーゲンへ自己抗体が反応し、後天性表皮水疱症が発症する仕組みである。我々は、このような、条件つきでVII型コラーゲンの遺伝子を壊すことができるconKOマウスの実験

をすでにスタートし、その作成に成功している。もちろん、現在までに、VII型コラーゲンのconKOマウスを用いた原著論文の発表は国内外にない。

そこで、本研究では、我々作成したそのconKOマウスを用いて、以下の2つの目標を設定した。まず、我々が研究を行ってきたVII型コラーゲンの遺伝子治療と蛋白補充療法の有用性をこの動物モデルで明らかにする。すなわち、ある程度conKOマウスが成長してから、タモキシフェンにてCreリコンビナーゼを誘導して、マウスVII型コラーゲン遺伝子を破壊し疾患を再現する。そして、そのモデルマウスに遺伝子治療や蛋白補充療法の実験を行い、その治療効果を判定する。次に、ヒトVII型コラーゲンの抗体を産生するマウスを、図3のように2つの誘導剤にて、マウス遺伝子を破壊しヒトのVII型コラーゲンを発現し、その抗体が自己抗体になるようにする。このマウスについて水疱などの症状を確認するとともに、後天性表皮水疱症治療法の検討を行う予定であった。

3. 研究の方法

本研究では Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスの解析、ヒト VII 型コラーゲン発現誘導型 TG マウス (h7COL) の作成、トランスジーンが組み込まれた conKO マウスの解析、後天性表皮水疱症モデルマウス作成、などを計画した。その内容について簡単に記載した。

① Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスの解析

我々はすでに、VII 型コラーゲンの conKO マウスを作成し、さらに全身に Cre リコンビナーゼが発現する TG マウス (CAG-Cre)、タモキシフェン投与で Cre 活性化の可能な TG マウス (CMV-Cre-ER)、表皮のみで Cre リコンビナーゼを発現しかつ活性化可能な TG マウス (K14-Cre-ER)、を入手している。TG マウスの場合、遺伝子は挿入されているが、蛋白の発現が不安定であることがよく観察される。そこで、これらの TG マウスで、Cre リコンビナーゼが遺伝子操作に相応して発現しているかを、タモキシフェン投与などで、Cre リコンビナーゼを誘導し、蛍光抗体、ウエスタンブロットで確認する。

② ヒト VII 型コラーゲン発現誘導型 TG

マウス (h7COL) の作成

我々は現在、テトラサイクリン調節性の Tet system にヒト VII 型コラーゲン遺伝子を導入した T G マウス用のコンストラクトを作成しているため、マイクロインジェクションを行い h7COL-T G マウスの作成を行う。

③ トランスジーンが組み込まれた conK O マウスの解析

CAG-Cre-T G マウス、CMV-Cre-ER-T G マウス、K14-Cre-ER-T G マウス、とヘテロ状態の VII 型コラーゲン conK O マウスを交配し、それぞれのトランスジーンを有するヘテロ状態の conK O マウスを作成する。次にこのオスメスを交配して、トランスジーンを有するホモ状態の conK O マウスを作成する。この状態で、トランスジーン的设计にあつた Cre リコンビナーゼが発現し、VII 型コラーゲンのエクソン 22 から 27 が切り取られる。作成された conK O マウスの Cre リコンビナーゼが当初的设计に従い、正しく機能するか、あるいは VII 型コラーゲンが正しく不活化されるかを、蛍光抗体、ウエスタンブロット、PCR などで確認する。

④ 後天性表皮水疱症モデルマウス作成

前年から作成している T G (h7COL) マウスにおいて、テトラサイクリンでヒト VII 型コラーゲンを誘導し、蛍光抗体、ウエスタンブロットで確認する。次に、conK O マウスと CMV-Cre-ER-T G マウスを掛け合わせたマウスに、この h7COL-T G マウスをさらにつけ合わせ、後天性表皮水疱症モデルマウスを作成する。さらにそのマウスでのマウスとヒトの VII 型コラーゲンの遺伝子の状態、タモキシフェンやテトラサイクリンでの誘導状態をチェックする。

4. 研究成果

コンディショナル (con) K O マウスの解析に関しては、我々の作成したマウスでは、VII 型コラーゲンが破壊され、表皮水疱症のモデルの作成に成功した。マウスはすぐ死ぬことはなく、生存可能なモデルの作成に成功した。Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスの解析については、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスは日本の研究者から購入予定であったが、マウスの感染症の問題から購入を断念せざるえなくなり、米国のジャクソンから購入した。そのために、時間がすこしかかった。ヒト VII 型コラーゲン発現誘導型 T G マウス (h7COL) の

作成は予定通り作成した。VII 型コラーゲンの発現を検討したところ、VII 型コラーゲンは誘導されたが、その発現は低かった。トランスジーンが組み込まれた conK O マウスの解析、それらのマウスを作成した。後天性表皮水疱症モデルマウス作成に関して、実験をおこなったが、うまく自己抗体の誘導はなかった。現在、さらに検討中である。リコンビナント VII 型コラーゲン蛋白での治療、産生したリコンビナント VII 型コラーゲンを栄養障害型モデルマウスに投与したが、有意な効果はなかった。モデル動物に対する遺伝子治療実験については、今回は、子宮内に β ガラクトシダーゼ遺伝子の導入を行ったが、有効には子宮内のモデルマウスには取り込まれなかった。VII 型コラーゲン遺伝子については、 β ガラクトシダーゼ遺伝子の導入効率がよくなってから行う予定である。

その他、表皮水疱症やその他の遺伝性疾患の遺伝子変異検索などを行った。

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 35 件)

- 1) Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Tanaka Y, Nishie W, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 177-187, 2011. 査読有
- 2) Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Kimura K, Takiyoshi N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, Tsuchida S, Sawamura D. Raf kinase inhibitor protein expression correlates with differentiation but does not affect MAP kinase pathway activity in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci*, 60, 199-201, 2010. 査読有
- 3) Takemoto H, Tamai K, Akasaka E, Rokunohe D, Takiyoshi N, Umegaki N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D. Relation between the expression levels of the POU transcription factors Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci*, 60, 203-205, 2010. 査読有
- 4) Takeuchi S, Akasaka E, Rokunohe D, Kayo SJ, Matsuzaki Y, Ooshima H, Nakano H, Sawamura D. Leukemia cutis is an early sign of blast

- transformation that may mimic a common skin disease: sycosis-like eruptions in chronic myelomonocytic leukemia. *J Dermatol*, 37, 916-918, 2010. 査読有
- 5) Wang G, Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Kikuchi K, Li Q, McMillan JR, Morioka H, Sawamura D, Nakamura H, Shimizu H. Blockade of autoantibody-initiated tissue damage by using recombinant Fab antibody fragments against pathogenic autoantigen. *Am J Pathol*, 176, 914-925, 2010. 査読有
 - 6) Natsuga K, Nishie W, Akiyama M, Nakamura H, Shinkuma S, McMillan JR, Nagasaki A, Has C, Ouchi T, Ishiko A, Hirako Y, Owaribe K, Sawamura D, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat*, 31, 308-316, 2010. 査読有
 - 7) Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto-Ohguchi Y, Aoyagi S, Akiyama M, Kuroyanagi Y, Shimizu H. Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute. *Acta Derm Venereol*, 90, 165-169, 2010. 査読有
 - 8) Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Sawamura D, Wang G, Tateishi Y, Li Q, Moriuchi R, Qiao H, Nakamura H, Akiyama M, Shimizu H. A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J Immunol*, 184, 2166-2174, 2010. 査読有
 - 9) Takeuchi S, Nakano H, Daiki R, Akasaka E, Nishizawa A, Matsuzaki Y, Sawamura D. Disseminated lupus vulgaris diagnosed more than 63 years after onset due to early misdiagnosis as a port-wine stain. *Clin Exp Dermatol*, 35, e28-29, 2010. 査読有
 - 10) Sawamura D, Nakano H, Matsuzaki Y. Overview of epidermolysis bullosa. *J Dermatol*, 37, 214-219, 2010. 査読有
 - 11) Jiin K, Nakano H, Akasaka E, Rokunohe D, Minakawa S, Ishii N, Hashimoto T, Sawamura D. Linear immunoglobulin A bullous dermatosis possibly induced by mefenamic acid. *J Dermatol*, 37, 269-271, 2010. 査読有
 - 12) Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 14345-14350, 2010. 査読有
 - 13) Hashikawa K, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Kuroki R, Nakama T, Yasumoto S, Tamai K, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent COL7A1 mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn. *J Dermatol Sci*, 56, 66-68, 2009. 査読有
 - 14) Nishie W, Sawamura D, Natsuga K, Shinkuma S, Goto M, Shibaki A, Ujiie H, Olasz E, Yancey KB, Shimizu H. A novel humanized neonatal autoimmune blistering skin disease model induced by maternally transferred antibodies. *J Immunol*, 183, 4088-4093, 2009. 査読有
 - 15) Ito K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Nishie W, Sakai K, Natsuga K, Shinkuma S, Shibaki A, Uitto J, Denton CP, Nakajima O, Akiyama M, Shimizu H. Keratinocyte-/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human COL7A1 mutation. *Am J Pathol*, 175, 2508-2517, 2009. 査読有
 - 16) Nishizawa A, Satoh T, Watanabe R, Takayama K, Nakano H, Sawamura D, Yokozeki H. Cowden syndrome: a novel mutation and overlooked glycogenic acanthosis in gingiva. *Br J Dermatol* 160, 1116-1118, 2009. 査読有
 - 17) Imada K, Dainichi T, Yokomizo A, Tsunoda T, Song YH, Nagasaki A, Sawamura D, Nishie W, Shimizu H, Fukagawa S, Urabe K, Furue M, Hashimoto T, Naito S. Birt-Hogg-Dubé syndrome with clear-cell and oncocytic renal tumour and trichoblastoma associated with a novel FLCN mutation. *Br J Dermatol* 160, 1350-1353, 2009. 査読有
 - 18) Nakano H, Nakamura Y, Kawamura T, Shibagaki N, Matsue H, Aizu T, Rokunohe D, Akasaka E, Kimura K, Nishizawa A, Umegaki N, Mitsuhashi Y,

- Shimada S, Sawamura D. Novel and recurrent nonsense mutation of the SLC39A4 gene in Japanese patients with acrodermatitis enteropathica. *Br J Dermatol*. 161, 184-186, 2009. 査読有
- 19) Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Abe T, Nagata K, Koro O, Hatano Y, Nakano H, Sawamura D, Hashimoto T. A Japanese family with dominant pretibial dystrophic epidermolysis bullosa: Identification of a new glycine substitution in the triple-helical collagenous domain of type VII collagen. *J Dermatol Sci*, 54, 212-214, 2009. 査読有
- 20) Goto-Ohguchi Y, Nishie W, Akiyama M, Tateishi Y, Aoyagi S, Tsuji-Abe Y, Sawamura D, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H. A severe and refractory case of anti-p200 pemphigoid resulting in multiple skin ulcers and scar formation. *Dermatology*, 218, 265-271, 2009. 査読有
- 21) Nishizawa A, Nakano H, Satoh T, Takayama K, Sawamura D, Yokozeki H. Haber's syndrome may be a clinical entity different from Dowling-Degos disease. *Br J Dermatol*, 160, 215-217, 2009. 査読有
- 22) Minakawa S, Nakano H, Takeda H, Mizukami H, Yagihashi S, Satoh T, Sawamura D. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome associated with severe eczema. *Clin Exp Dermatol* 34, 410-411, 2009. 査読有
- 23) Ochiai T, Nakano H, Rokunohe D, Akasaka E, Toyomaki Y, Mitsuhashi Y, Sawamura D. Novel p.M1T and recurrent p.G301S mutations in cathepsin C in a Japanese patient with Papillon-Lefevre syndrome: implications for understanding the genotype/phenotype relationship. *J Dermatol Sci*, 53, 73-75, 2009. 査読有
- 24) Nakano H, Akasaka E, Rokunohe D, Yokoyama S, Toyomaki Y, Umegaki N, Mitsuhashi Y, Sawamura D. A novel homozygous missense mutation in the fatty aldehyde dehydrogenase gene causes Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci*, 52, 136-138, 2008.
- 25) Nishizawa A, Nakajima R, Nakano H, Sawamura D, Takayama K, Satoh T, Yokozeki H. A de novo missense mutation in the keratin 13 gene in oral white sponge nevus. *Br J Dermatol*, 159, 974-975, 2008.
- 26) Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D. Vitamin D3 inhibits expression of pemphigus vulgaris antigen, desmoglein 3: implication of partial mechanism in pharmacological effect of VD3 on skin diseases. *Mol Med Rep*, 1, 581-583, 2008.
- 27) Nagasaki A, Nishie W, Sato K, Oba I, Noguchi E, Akitsu H, Sawamura D, Shimizu H. Clinical and Genetic analysis of Fabry disease: report of 6 cases including 3 heterozygous females. *J Dermatol Sci*, 52, 61-64, 2008.
- 28) Hamada T, Fukuda S, Ishii N, Sakaguchi S, Ishikawa T, Abe T, Yasumoto S, Hashimoto T, Nakano H, Sawamura D. Genotype-phenotype correlation in non-Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa: The splice site mutation c.6216+5G>T in the COL7A1 gene results in aberrant and normal splicings. *J Dermatol Sci* 50: 147-150, 2008.
- 29) Kivisaari AK, Kallajoki M, Mirtti T, McGrath JA, Bauer JW, Weber F, Königová R, Sawamura D, Sato-Matsumura KC, Shimizu H, Csikós M, Sinemus K, Beckert W, Kähäri VM. Transformation-specific matrix metalloproteinases (MMP)-7 and MMP-13 are expressed by tumour cells in epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol* 158: 778-1785, 2008.
- 30) Aizu T, Tamai K, Nakano H, Rokunohe D, Toyomaki Y, Uitto J, Sawamura D. Calcineurin/NFAT-dependent regulation of 230-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 51: 45-51, 2008.
- 31) Nakajima K, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe D, Ikenaga S, Aizu T, Kaneko T, Mitsuhashi Y, Sawamura D. Papillon-Lefevre syndrome and malignant melanoma: a high incidence of melanoma development in Japanese palmoplantar keratoderma patients. *Dermatol* 217: 58-62, 2008.
- 32) Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, Wu

- M, Hanada K, Sawamura D, Fisher DE, Imokawa G. Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. FASEB J 22: 1155-1168, 2008.
- 33) Nakajima K, Tamai K, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a splice variant that is induced by high calcium concentration and specifically expressed in normal human keratinocytes. J Invest Dermatol 128: 1336-1339, 2008.
- 34) Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D. Vitamin D₃ inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. J Dermatol Sci 50: 155-158, 2008.
- 35) Rokunohe D, Nakano H, Ikenaga S, Umegaki N, Kaneko T, Matsubishi Y, Tando Y, Toyoki Y, Hakamada K, Kusumi T, Harada K, Sawamura D. Reduction in epidermal Langerhans cells in patients with necrolytic migratory erythema. J Dermatol Sci 50: 76-80, 2008.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60196334

(2) 研究分担者

中野 創 (NAKANO HAJIME)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90281922

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50322946

(3) 連携研究者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)
北海道大学・大学医学研究科・教授
研究者番号：00146672