

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号：20700362  
 研究課題名 (和文) matted (ma) マウスの毛包形成異常に関わる原因遺伝子の解明  
 研究課題名 (英文) Elucidation of a novel skin and hair follicle mutation gene “matted (ma)” in mouse.  
 研究代表者  
 石井 寿幸 (ISHII YOSHIYUKI)  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
 研究者番号：90323485

研究成果の概要 (和文) : *matted* (*ma*) マウスの皮膚・被毛異常に関わる原因遺伝子を解明し、さらにその異常病態のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。本研究から、*ma* 遺伝子はマウス 3 番染色体の候補領域 (D3Mit40-0.85cM-*ma*-0.85cM- D3Mit49) に特定された。原因領域は約 1100 Kb であり、領域内に 48 遺伝子が存在することが判明した。しかしながら、今回の塩基配列解析では変異と考えられる異常配列は検出できなかった。今後も更なる解析を継続する予定である。

研究成果の概要 (英文) : The aim of this study was to identify the mutated gene responsible for defects of skin and hair follicle in *matted* (*ma*) mice, and to elucidate the pathologic mechanisms of its abnormal skin and hair follicle formation. In this study, the *ma* locus was mapped between the two DNA markers (D3Mit40, D3Mit49) on mouse chromosome 3 by linkage analysis. The size of the responsible DNA region is about 1,100 Kbases, and there are 48 genes estimated in the region. However so far, any mutated sequence have not been detected from skin cDNAs of the candidate genes in *ma* mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：

キーワード：疾患モデル、毛包組織、突然変異、連鎖解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 毛包組織は上皮系細胞由来の毛包ケラチノサイトおよび間葉系細胞由来の毛乳頭細胞によって構成される。また、毛包組織は毛包幹細胞が劇的に増殖し、かつ複数の細胞

層に分化し組織形成される。この性状は毛包ケラチノサイトの複雑で繊細な増殖・分化の制御により維持されているが、その調節機構に関する体系的な理解は未だ得られていない。

(2) *matted* (*ma*) マウスは 1952 年に英国ロンドン大学にて発見された、CBA/Gr 系に自然発症した皮膚突然変異マウスである。本マウスの被毛異常は生後 2-4 週齢ほどから認められ、まずは逆立った被毛が観察され、続いて湾曲した粗毛が顕著となる。さらに、成長に伴い口部周囲から胸部皮膚において無毛状態を呈し、多くの個体で下顎部皮膚に潰瘍を生ずる。これらの皮膚および被毛における異常は常染色体上の単一劣性遺伝子によるもので、これまでにマウス第 3 染色体上に存在することが報告されている。しかし、本マウスの原因遺伝子およびそれに起因する皮膚病態機序はいまだ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、*ma* マウスの皮膚・被毛異常における原因遺伝子を連鎖解析を用いて解明し、さらに病理組織学的アプローチにより本マウスの皮膚・被毛病態のメカニズムを詳細に明らかにすることを目的とする。また、得られた成果から未だ明らかとなっていない正常毛包組織の分化・維持に関する調節機構に対し新たな情報を提示することも目的の一つである。

## 3. 研究の方法

(1) これまでに予備実験として *ma* マウスと C57BL/6J 系との間の  $F_1$  個体を用いた連鎖解析を行っている。 $F_1$  交雑により 59 匹の  $F_2$  個体を得たが、その表現型分離比は *ma/ma* : 野生型 = 15 : 44  $\approx$  1 : 3 であった。また、異なるミュータント同士との交配試験により、*ma* 遺伝子座の位置はマウス 3 番染色体上 *Glr*b-3cM - *ma*-3.8cM - *Gja*8 と報告されていることから、用いるマーカーとして、*Glr*b, *Gja*8 両遺伝子を含む領域に存在する D3Mit マーカーを選択した。上記の材料を用いて連鎖解析を行なったところ、*ma* 遺伝子候補領域の範囲に狭めることができた。さらに、新たなマーカーを候補領域内側に作成することにより、約 1100 Kb、48 遺伝子の範囲に狭めることができた。

(2) 上記の連鎖解析の結果を元に *ma* マウスにおける被毛異常の原因遺伝子を解明する。さらに組織病理学的手法により本マウスの皮膚・被毛病態の解析を行う。

### ① *ma* マウスの原因遺伝子の解明

現在 *ma* 遺伝子候補領域は約 1.7 cM、約 1100 Kb、48 因子にまで狭まっているが、これでも全ての候補遺伝子をシーケンズ解析するのは困難である。対策として、候補領域内遺伝子に関して、マウス皮膚での発現情報や塩基配列から予想される蛋白の種類、KO マウス

の存在と皮膚疾患の有無の情報等を各種データベースにより調査し、候補遺伝子の優先順位をつける。その遺伝子順に *ma* マウスにおける変異の有無を解析することで、最も早く原因遺伝子が解明できると考えられる。

また  $F_2$  DNA サンプルを 200 個体程度まで増やし連鎖解析を継続することも計画している。これにより理論上候補領域を 0.4cM 以下にできる。この実験により候補遺伝子の数はかなり少なくできると予想できる。

### ② 病理組織学的アプローチによる *ma* マウスの皮膚・被毛病態の解析

*ma* マウスの毛包形成異常の過程を明らかにするため、本マウスの病理組織学的検索を経時的に行なう。本マウスの毛包形成異常におけるクリティカルポイント (= 正常および *ma* マウスの間で初めて組織学的に差異が認められる時期) を断定するのが目的であり、おそらく原因遺伝子が毛包で発現し始める時期と一致すると考えられる。

### ③ 原因遺伝子と協調的に働く遺伝子群の探索

原因遺伝子の変異は多くの遺伝子の発現変化を引き起こすことで毛包形成異常を起こすと予想されるので、毛包の形態異常が初めて認められる (= 原因遺伝子が発現し始める) 時期の *ma* マウス皮膚 mRNA および同齢の正常マウス皮膚 mRNA を検体として両 mRNA で発現量の異なる遺伝子群を明らかにする。

原因遺伝子が明らかになり次第、各種データベースを駆使して原因遺伝子との関連因子を探索し、次項④での検索に加える。

### ④ 上記遺伝子群の毛包組織における発現様式・局在の検索

上記③で得られた遺伝子群の正常/*ma* マウス皮膚における発現様式を RT-PCR 法、northern blotting 法や western blotting 法により定量し、その局在を免疫組織学的手法または in situ hybridization 法により検索し、両マウス間および各毛周期において比較する。また、各因子の正常/*ma* マウス毛包における時間的・空間的発現変化を明らかにすることにより、それらの毛包における作用が推測できる。

## 4. 研究成果

(1) 被毛形成異常を呈する突然変異動物である *matted* (*ma*) マウスについて、その原因遺伝子の解明を目的として実験計画を遂行した。*ma* マウスの原因遺伝子座はマウス 3 番染色体上に存在し、遺伝解析により候補領域を D3Mit40-0.85cM - *ma*-0.85cM - D3Mit49 の範囲に限定することができた。約 1100 Kb に相当する原因領域には 48 遺伝子が存在す

ることが判明しており、表皮分化複合体 (Epidermal Differentiation Complex: EDC) として知られた遺伝子クラスターが本遺伝子存在領域に隣接してしていることから、遺伝解析は良好に行なわれたと考えられる。

(2) 上記の候補領域に存在する 48 遺伝子に関して *ma* マウスおよびコントロールマウス皮膚 cDNA を用いて RT-PCR による発現量解析および塩基配列の解析を行った。しかしながら、*ma* マウスにおいて原因遺伝子の変異と考えられる塩基配列の異常は検出できなかった。変異遺伝子が同定できなかった理由として以下の点が考えられる。

① 今回の塩基配列の解析は、検索の優先順位から、原則として遺伝子の蛋白コード領域のみを対象に解析していた。また RT-PCR による発現量解析では両マウス皮膚に大きな発現の差は確認できなかったため遺伝子上流の DNA 配列 (プロモーター領域) に異常があるとは考えにくい。しかし、少ない可能性であるが毛包組織特異的なプロモーターが存在し、その DNA 領域が変異している可能性がある。

② 上記①の通り、対象となるほとんどの mRNA の非翻訳領域 (5' および 3') は解析できなかった。最近の文献では mRNA 非翻訳領域の塩基配列やそれにより生じる小ペプチドが mRNA の転写・分解や蛋白の翻訳をコントロールしているという報告がされている。

③ 単純な読み間違えという可能性もあり、検体動物を増やして遺伝解析により原因領域を可能な限り狭めること、および候補領域内にある各遺伝子の毛包における局在の有無を明らかにすることで候補遺伝子のセレクトを行うなど地道で誠実な実験手法で対応していくことが必要である。皮膚科学領域だけでなく細胞増殖・分化のコントロールに関しても興味深い研究テーマであるので、必ず原因遺伝子を解明できるよう本研究期間が終了しても解析を継続していきたい。

(3) 本研究は当初の実験計画と比べ大幅に原因遺伝子の解析に時間がかかってしまい、項目 3. 研究の方法 (2) ③④にある実験計画は大きく変更をせざるを得なかった。

(4) 縮れた粗毛を呈する *ma* マウスの肉眼的特徴は病理組織学的観察によっても示された。これまで多くの遺伝子改変マウスや突然変異マウス・ラットにおいて被毛異常が報告されているが、縮れた粗毛を呈することは少なくない。実際に Jackson Database では、

変異により *waved hair* を示す遺伝子が 10 以上報告されている。その中でも、*Tgf $\alpha$* 、*Egfr*、*Sgk3* 各遺伝子はお互いにリガンド、レセプターおよび細胞内シグナル蛋白という関係であり、突然変異を起こすと三者とも同様の被毛異常を呈することが知られている。このことから、*ma* マウスの原因遺伝子による病態メカニズムは上記遺伝子と関連して協調的に作用する可能性が考えられる。

#### 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 10 件)

- ① Iha K, Ishii Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y (他 5 名) Molecular cloning and expression analysis of bat toll-like receptors 3, 7 and 9. J Vet Med Sci. 2010 Feb;72(2):217-20. (査読有)
- ② Kitagawa Y, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y (他 4 名) Indirect ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay for detecting the antibody against murine norovirus S7 in mice. Exp Anim. 2010;59(1):47-55. (査読有)
- ③ Iha K, Ishii Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y (他 5 名) Molecular cloning and sequencing of the cDNAs encoding the bat interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, and tumor necrosis factor-alpha. J Vet Med Sci. 2009 Dec;71(12):1691-5. (査読有)
- ④ Wajid M, Ishii Y, Shimomura Y, Christiano AM (他 2 名) Polyalanine repeat expansion mutations in the HOXD13 gene in Pakistani families with synpolydactyly. Clin Genet. 2009 Sep;76(3):300-2. (査読有)
- ⑤ Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, Christiano AM (他 4 名) Identification of mutations in the EDA and EDAR genes in Pakistani families with hypohidrotic ectodermal dysplasia. Clin Genet. 2009 Jun;75(6):582-4. (査読有)
- ⑥ Kurokawa M, Hideshima M, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Aortic ER stress in streptozotocin-induced diabetes mellitus in APA hamsters. Exp Anim. 2009 Apr;58(2):113-21. (査読有)

- ⑦Kuraoka M, Ishii Y, and Yoshikawa Y. (他4名) Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim.* 2009 Jan;58(1):19-29. (査読有)
- ⑧Omatsu T, Ishii Y, and Yoshikawa Y. (他4名) Induction and sequencing of Roussette bat interferon alpha and beta genes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 Jul 15;124(1-2):169-76. (査読有)
- ⑨Ishii Y, Wajid M, Kellsell DP, and Christiano AM. (他6名) Mutations in R-spondin 4 (RSP04) underlie inherited anonychia. *J Invest Dermatol.* 2008 Apr;128(4):867-70. (査読有)
- ⑩Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, and Christiano AM. (他3名) Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):335-9. (査読有)

[学会発表] (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 寿幸 (ISHII YOSHIYUKI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・助教  
研究者番号：90323485

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：