

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591240

研究課題名(和文)ダブルノックアウトマウスを利用したアトピー性皮膚炎モデルマウスの作製

研究課題名(英文)Creation of atopic dermatitis model mouse using double knock out mouse

研究代表者

米田 耕造 (Yoneda, Kozo)

香川大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60260626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎は、掻痒の強い湿疹病変を主とする難治性皮膚疾患であり、フィラグリンタンパク質の遺伝子異常による。ロリクリンはフィラグリンと同様、表皮角層細胞の辺縁帯の主成分である。ロリクリン遺伝子の変異による疾患(亜型ボーウィンゲル症候群)の臨床症状は、掌蹠角化症を合併した魚鱗癬であり、フィラグリン遺伝子機能喪失変異により生じる尋常性魚鱗癬の臨床症状に酷似している。本研究の目的は、アトピー性皮膚炎の動物モデルを作製し、その病態に関与するロリクリンの果たす役割を解析し、創薬に役立てることである。その目的に向けてわれわれはロリクリンノックアウトマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis is one of intractable skin diseases. The clinical feature of this disease is itchy eczema. This disease is caused by mutations in filaggrin gene now. Loricrin is major constituent of marginal band of epidermal corneocyte. The clinical aspects of the variant form of Vohwinkel syndrome are mutilating keratoderma with ichthyosis. This phenotype is similar to ichthyosis vulgaris. Ichthyosis vulgaris is caused by homozygous or compound heterozygous mutations in the filaggrin gene. The aim of this project is creation of atopic dermatitis mouse model using loricrin knock out mouse.

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：ロリクリン ノックアウトマウス 魚鱗癬 アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初ロリクリンがアトピー性皮膚炎において果たしている役割については、何も判明していなかった。本研究の目的は、ロリクリンノックアウトマウスを利用してアトピー性皮膚炎の動物モデルを作製し、その病態に關与するロリクリンの果たす役割を詳細に解析することであった。そして最終的にはアトピー性皮膚炎の創薬を目指した。

2. 研究の目的

研究の学術的背景

アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒の強い湿疹病変を主とする難治性皮膚疾患である。2006年、アトピー性皮膚炎の原因が、皮膚角層の構造蛋白の一つであるフィラグリン蛋白の遺伝子異常によることが報告された(下記文献)。

Palmer, C.N. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 38, 441-446. (2006).

現在では、個人にフィラグリン遺伝子の異常が存在すると、表皮のバリア機構が破綻を来し、起炎物質が、表皮内に容易に侵入し、持続性のアトピー性皮膚炎という慢性アレルギー性炎症が生じると考えられている。また、フィラグリン遺伝子に機能喪失変異が生じると、最も頻度の高い皮膚角化異常症である尋常性魚鱗癬が生じる。(下記文献)。

Smith, F.J. et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* 38, 337-342. (2006).

他方ロリクリンもフィラグリンと同様、表皮角層細胞の辺縁帯すなわちコーニファイドセルエンベロープ(cornified cell envelope:CE)の主成分である。ロリクリンは、CEの約70%を占める(皮膚のバリア機能上)重要なタンパク質である。ロリクリン遺伝子の変異による疾患(亜型ポーウィンケル症候群)も明らかになっておりその臨床症状は、掌蹠角化症を合併した魚鱗癬であり、フィラグリン遺伝子機能喪失変異により生じる尋常性魚鱗癬の臨床症状に類似している。しかしながらロリクリンがアトピー性皮膚炎において果たしている役割については、現時点では何も判明していない。本研究の目的は、アトピー性皮膚炎の動物モデルを作製し、その病態に關与するロリクリンの果たす役割を解析し、創薬につなげることであった。

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとしたか

A. ロリクリンノックアウトマウスを作製する。

B. ロリクリンノックアウトマウスの皮膚に、ダニアレルゲンなどの起炎物質を塗布して、得られた皮膚病変を解析する。

C. フィラグリンが欠損しているである Flaky Tail Mice とロリクリンノックアウトマウスをかけ合わせ、ロリクリンとフィラグリンのダブルノックアウトマウスを作製する。

D. 上記のダブルノックアウトマウスの皮膚に、ダニアレルゲンなどの起炎物質を塗布して、得られた皮膚病変を解析する。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

本研究はアレルギー領域においてひじょうに重要な疾病であるアトピー性皮膚炎におけるロリクリンの關与について動物モデルを用いて検証する点に最大の特徴がある。

本研究はアトピー性皮膚炎の誘因が、フィラグリンのバリア機構の破綻のみならず、ロリクリンのバリア機構の破綻も深く關与しているのではないかという仮説をたて、ロリクリンノックアウトマウスを使用してアトピー性皮膚炎の動物モデルを作製するという点に最大の特徴・独創的な点がある。すなわちアトピー性皮膚炎においては、フィラグリン遺伝子のみならず、ロリクリン遺伝子にも異常があるのではないかという仮説のもと、角層細胞 CE で最も大量に存在する構造蛋白質であるロリクリンを、皮膚の難治性疾患であるアトピー性皮膚炎に有機的に結びつけることにより、アトピー性皮膚炎の病態メカニズムを解明しようと試みる非常にユニークかつ独創的なプロジェクトである。

われわれは、日常臨床上非常に大事な問題である重症アトピー性皮膚炎患者では、フィラグリン遺伝子異常のみならず、ロリクリン遺伝子異常も合併しているのではないかと考えている。起炎物質やアレルゲンをロリクリン単独ノックアウトマウス、あるいはダブルノックアウトマウスに塗布した時に、得られる皮膚病変が、ダブルノックアウトマウスにおいてより重症であれば、われわれの仮説の正当性を証明できる。

3. 研究の方法

ロリクリンノックアウトマウスの作製

129Sv ゲノムライブラリーより、マウスロリクリン gDNA をスクリーニングする。

ターゲティングベクターの構築を行う。

ES 細胞にエレクトロポレーションを行ない、その後薬剤耐性選択を行う。

薬剤耐性の ES 細胞に対しさらに、PCR スクリーニングを行い、相同組換え体を同定する。

上記 4 で得られた陽性 ES 細胞クローンを仮親の 8 細胞期胚にマイクロインジェクションする。

上記 5 で得られたキメラマウスの飼育と交配を行う。

キメラマウスを交配して、毛色で判断して ES 細胞由来の子孫マウス (F1) が得られたら PCR で、ジャームライン・トランスミッションを確認する。

F1 ヘテロ変異マウス同士を交配させ、F2 ホモ変異マウスを得る。

4 . 研究成果

ロリクリンノックアウトマウスを得ることが出来た。ロリクリンノックアウトマウスの皮膚において、ロリクリン mRNA の発現は観察されなかった。免疫組織化学的に、検索する目的でウサギ抗ロリクリン抗体を使用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。やはりロリクリンの発現はノックアウトマウス皮膚においては観察されなかった。ロリクリンノックアウトマウスの皮膚よりタンパク質を抽出、免疫ブロット法でもロリクリンタンパク質の発現を調べた。免疫ブロット法にてもロリクリンタンパク質の発現は見られなかった。

ロリクリンノックアウトマウスの皮膚を使用して、プロフィラグリン N 末端タンパク質とケラチン 10 タンパク質の発現を免疫組織学的に調べた。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。プロフィラグリン N 末端タンパク質は顆粒層上層から角層細胞にかけて存在していた。ケラチン 10 タンパク質は、基底層を除く有棘層より上層の細胞にその存在が観察された。さらに、ロリクリンノックアウトマウス皮膚におけるプロフィラグリン N 末端タンパク質とケラチン 10 タンパク質の発現を、免疫電子顕微鏡を用いて詳細に検討を加えた。プロフィラグリン N 末端タンパク質は主としてフィラグリン顆粒に存在していた。ケラチン 10 タンパク質は、フィラグリン顆粒内とフィラグリン顆粒外の両方の部位に存在していた。

今後は、ロリクリンノックアウトマウスの皮膚に、ダニアレルゲンなどの起炎物質を塗布して、得られた皮膚病変を解析する予定である。さらには、フィラグリンが欠損しているである Flaky Tail Mice とロリクリンノックアウトマウスをかけ合わせ、ロリクリンとフィラグリンのダブルノックアウトマウスを

作製する。そして、このダブルノックアウトマウスの皮膚に、ダニアレルゲンなどの起炎物質を塗布して、得られた皮膚病変を解析する予定である。

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 41 件)

1. Yoneda K, Demitsu T, Nakai K, Morieue T, Ogawa W, Igarashi J, Kosaka H and Kubota Y: Activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a cellular model of loricrin keratoderma. *J Biol Chem* 285: 16184-16194, 2010
2. Kubota Y, Shirahige Y, Nakai K, Katsuura J, Morieue T and Yoneda K: Community-based epidemiological study of psychosocial effects of acne in Japanese adolescents. *J Dermatol* 37: 617-622, 2010
3. Demitsu T, Yoneda K, Kakurai M, Sasaki K, Hiratsuka Y, Azuma R, Yamada T and Umemoto N: Clinical efficacy of reserpine as “add-on therapy” to antihistamines in patients with recalcitrant chronic idiopathic urticaria and urticarial vasculitis. *J Dermatol* 37: 827-829, 2010
4. Munehiro A, Yoneda K, Nakai K, Demitsu T, Morieue T, Morieue J, Yokoi I, Fujita N, Matsuura N, Ishikawa S, Yokomise H and Kubota Y: Bevacizumab-induced hand-foot syndrome: circumscribed type. *Br J Dermatol* 162: 1411-1413, 2010
5. Yoneda K, Demitsu T, Manabe M, Igarashi J, Kosaka H, Inagaki N, Takahashi H, Kon A, Kakurai M and Kubota Y: Expression of wild-type, but not mutant, loricrin causes programmed cell death in HaCaT keratinocytes. *J Dermatol* 37: 956-964, 2010
6. Yoneda K, Nakai K, Demitsu T, Morieue T, Morieue J, Yokoi I, Munehiro A, Noma T, Kohno M and Kubota Y: Late radiation dermatitis of the right arm after cardiac catheterization. *Eur J Dermatol* 20: 654-656, 2010
7. Nakai K, Yoneda K, Morieue T, Munehiro A, Fujita N, Morieue J, Yokoi I, Haba R, Itoh S and Kubota Y: Seborrheic keratoses and acanthosis nigricans in a long-term survivor of thanatophoric dysplasia. *Br J Dermatol* 163: 656-658, 2010
8. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M and Shimizu H: A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its

- application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20: 74-76, 2011
9. Nakai K, Yoneda K, Ishihara Y, Ohmori K, Moriuie T, Igarashi J, Kohno M, Kosaka H and Kubota Y: Lipid peroxidation-induced VEGF expression in the skin of KKA^y obese mice. *Exp Dermatol* 20: 388-393, 2011
 10. Yoneda K, Nakai K, Hosokawa Y, Moriuie T, Demitsu T and Kubota Y: Skin infiltration of pelvic actinomycosis after total gastrectomy. *Eur J Dermatol* 21: 290-291, 2011
 11. Nakai K, Yoneda K, Moriuie T, Hosokawa Y, Yokoi I and Kubota Y: Unilateral palm pompholyx in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Dermatol* 21: 445-446, 2011
 12. Yoneda K, Kakurai M, Umemoto N, Nakai K, Kubota Y and Demitsu T: Sarcoidosis presenting transepidermal elimination. *Eur J Dermatol* 21: 616-617, 2011
 13. Natsuga K, Nishie W, Smith BJ, Shinkuma S, Smith TA, Parry DA, Oiso N, Kawada A, Yoneda K, Akiyama M and Shimizu H: Consequences of two different amino-acid substitutions at the same codon in KRT14 indicate definitive roles of structural distortion in epidermolysis bullosa simplex pathogenesis. *J Invest Dermatol* 131: 1869-1876, 2011
 14. Munehiro A, Murakami Y, Shirahige Y, Nakai K, Moriuie T, Matsunaka H, Yoneda K and Kubota Y: Combination effects of cosmetic moisturisers in the topical treatment of acne vulgaris. *J Dermatol Treat* 23: 172-176, 2012
 15. Kameda T, Dobashi H, Yoneda K, Susaki K, Kuno T, Murao K and Ishida T: A case of Degos disease successfully treated with corticosteroid combined with cyclophosphamide. *Rheumatol Int* 32: 2169-2173, 2012
 16. Yoneda K, Nakai K, Moriuie T, Ishikawa E, Demitsu T, Ohkusu K and Kubota Y: *Scedosporium apiospermum* skin infection mimicking tuberous xanthoma. *J Dermatol* 39: 316-318, 2012
 17. Yoneda K, Moriuie J, Nakai K, Demitsu T, Moriuie T, Yokoi I, Munehiro A, Dobashi H and Kubota Y: Numerous mucin nodules in a patient with seropositive wide spread discoid lupus erythematosus. *Ann Dermatol* 24: 112-114, 2012
 18. Yoneda K, Presland RB, Demitsu T, Shimizu T and Kubota Y: The profilaggrin N-terminal domain is absent in pityriasis rotunda. *Br J Dermatol* 166: 227-229, 2012
 19. Yoneda K, Demitsu T and Kubota Y: Juvenile xanthogranuloma with lichenoid appearance. *J Dermatol* 39: 462-465, 2012
 20. Yoneda K, Nakagawa T, Lawrence OT, Huard J, Demitsu T, Kubota Y and Presland RB: Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with loricrin in human cultured keratinocytes and epidermis. *J Invest Dermatol* 132: 1206-1214, 2012
 21. Kubota Y, Munehiro A, Shirahige Y, Nakai K, Katsuura J, Moriuie T, Murakami Y, Matsunaka H and Yoneda K: Effect of sequential application of topical adapalene and clindamycin phosphate in the treatment of Japanese patients with acne vulgaris. *J Dermatol Treat* 23: 37-45, 2012
 22. Wakatabi K, Kakurai M, Yamada T, Umemoto N, Demitsu T and Yoneda K: Inflammatory disseminated superficial porokeratosis with an unusual clinical feature of the pruritic, erythematous papules preceding annular brownish pigmentation. *J Dermatol* 39: 946-948, 2012
 23. Demitsu T, Yamada T, Umemoto N, Narita T, Kakurai M and Yoneda K: Cutaneous *Mycobacterium marinum* infection mimicking felon in a patient with psoriatic arthritis treated with infliximab. *J Dermatol* 39: 970-971, 2012
 24. Ishikawa E, Yoneda K, Nakai K, Moriuie J, Yokoi I, Munehiro A and Kubota Y: Primary cutaneous cryptococcosis in a patient with CREST syndrome. *Eur J Dermatol* 22: 421-422, 2012
 25. Munehiro A, Yoneda K, Koura A, Nakai K and Kubota Y: Macular lymphocytic arteritis in a patient with rheumatoid arthritis. *Eur J Dermatol* 22: 427-428, 2012
 26. Moriuie T, Yoneda K, Moriuie J, Nakai K, Yokoi I, Fujita N, Munehiro A, Maeda R and Kubota Y: Pinch and ligation method: a new non-surgical approach to viral warts. *J Dermatol* 39: 1108-1109, 2012
 27. Yoneda K, Matsuoka-Shirahige Y, Demitsu T and Kubota Y: Pustular psoriasis precipitated by cytomegalovirus infection. *Br J Dermatol* 167: 1186-1189, 2012
 28. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriuie T, Presland RB, Fallon PG, Kabashima K, Kosaka H and Kubota Y: Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies. *Am J Pathol* 181: 969-977, 2012
 29. Moriuie J, Yoneda K, Nakai K, Hosokawa Y, Moriuie T, and Kubota Y: A survey of the factors associated with concerns about oral antihistamine use in Japanese pruritic

- skin disease patients. *J Dermatol Treat* 24: 450-453, 2013
30. Hosokawa Y, Yoneda K, Nakai K, Moriue J and Kubota Y: Completely thrombosed venous aneurysm in great saphenous vein. *Ann Dermatol* 25: 268-270, 2013
 31. Yamada T, Nakamura S, Demitsu T, Nakamura T, Iida E, Yoneda K, Fukuda S and Hashimoto T: Paraneoplastic pemphigus mimicking toxic epidermal necrolysis associated with B-cell lymphoma. *J Dermatol* 40: 286-288, 2013
 32. Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Tsukamoto I, Moriue T, Kubota Y and Kosaka H: Dexamethasone induces caveolin-1 in vascular endothelial cells: implications for attenuated responses to VEGF. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C790-800, 2013
 33. Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Hashimoto T, Nakai K, Kosaka H and Kubota Y: Sphingosine 1-phosphate attenuates peroxide-induced apoptosis in HaCaT cells cultured in vitro. *Clin Exp Dermatol* 38: 638-645, 2013
 34. Moriue J, Yoneda K, Moriue T, Nakai K, Katsuki N, Haba R, Ikeda M and Kubota Y: Primary dermal melanoma latent for more than 10 years. *Ann Dermatol* 25: 385-386, 2013
 35. Kubota Y, Nakai K, Munehiro A, Moriue J and Yoneda K: Zosteriform cutaneous metastasis of lung adenocarcinoma. *J Clin Exp Dermatol Res* in press
 36. Yoneda K, Demitsu T, Kakurai M, Narita T, Nakai K, Kubota Y, Ishii N and Hashimoto T: Detection of apoptotic keratinocytes in a case of bullous pemphigoid developed after graft-versus-host disease. *Acta Derm Venereol* 94: 231-232, 2014
 37. Moriue T, Yoneda K, Moriue J, Nakai K and Kubota Y: Multi-branched acquired periungual fibrokeratoma. *JAMA Dermatol* 2014 Feb 19. doi: 10.1001/jamadermatol.2013.6631. [Epub ahead of print] PMID: 24553736
 38. Yokoi I, Ishikawa E, Koura A, Hosokawa Y, Tamai A, Nakai K, Moriue J, Moriue T, Yoneda K and Kubota Y: Successful treatment of primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with intralesional methotrexate therapy. *Acta Derm Venereol* 2013 Sep 3. doi: 10.2340/00015555-1692. [Epub ahead of print] PMID: 24002114
 39. Inaba Y, Kanazawa N, Furukawa F, Sakurane Y, Nakano H, Sawamura D, Yoneda K, Hamada T and Hashimoto T: Pachyonychia congenita in Japan: report of familial cases with a recurrent KRT16 mutation and review of the literature. *Eur J Dermatol* in press
 40. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue T, Kosaka H, Kubota Y and Inoue S: Deranged epidermal differentiation in *kl/kl* mouse and the effects of β Klotho siRNA on the differentiation of HaCaT cells. *Exp Dermatol* 2013 Oct 7. doi: 10.1111/exd.12258. [Epub ahead of print] PMID: 24118302
 41. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue J, Moriue T, Ishikawa E, Inoue S and Kubota Y: Two cases of nevus sebaceous accompanying secondary tumors with \square Klotho expression. *J Dermatol* 41: 171-172, 2014 doi: 10.1111/1346-8138.12371. PMID: 24433225
- 〔学会発表〕(計8件)
1. Nakai K, Yoneda K, Ishihara Y, Ohmori K, Moriue T, Igarashi J, Kohno M, Kosaka H and Kubota Y: Pitavastatin suppresses lipid peroxidation-induced VEGF expression in the skin of *KKA^y* metabolic syndrome mice. 17th Annual Meeting of The Society for Free Radical Biology and Medicine, November 18, 2010, Orlando
 2. Yoneda K, Nakai K, Moriue T, Demitsu T and Kubota Y: Abnormally aggregated caveolin-1 in the cytoplasm of cellular model of classic Vohwinkel syndrome. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 4, 2010, Wakayama
 3. Nakai K, Yoneda K, Ishihara Y, Ohmori K, Moriue T, Igarashi J, Kohno M, Kosaka H and Kubota Y: The effects of oxidized LDL on VEGF production in HaCaT cells: a possible mechanism for psoriasis in metabolic syndrome. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 3, 2010, Wakayama
 4. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriue T and Kubota Y: Reduced expression of EGF receptor, E-cadherin and occludin is due to loricrin deficiency in the skin of flaky tail mice. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 9, 2011, Kyoto
 5. Hosokawa Y, Yoneda K, Moriue T, Nakai K and Kubota Y: Direct effects of bevacizumab on cell proliferation and cell signaling pathways in HaCaT cells. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 9, 2011, Kyoto
 6. Yoneda K, Presland RB, Demitsu T, Shimizu T and Kubota Y: The profilaggrin N-terminal domain is absent

- in pityriasis rotunda. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 9, 2011, Kyoto
7. Yoneda K, Matsuoka-Shirahige Y, Demitsu T and Kubota Y:
Cytomegalovirus infection is one of the precipitating factors for pustular psoriasis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 7, 2012, Okinawa
8. Nakai K, Inoue S, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Hosokawa Y, Moriue T, Yoneda K and Kubota Y: β Klotho regulates the differentiation and tumorigenesis of epidermal keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 7, 2012, Okinawa

〔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

米田 耕造 (YONEDA Kozo)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60260626

(2) 研究分担者

窪田 泰夫 (KUBOTA Yasuo)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10126047

荒木 伸一 (ARAKI Nobukazu)
香川大学・医学部・教授

研究者番号：10202748

中井 浩三 (Nakai Kozo)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：40363204

(3) 連携研究者

()

研究者番号：