

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22890177

研究課題名（和文）

アトピー性皮膚炎モデルマウスの原因遺伝子の解明

研究課題名（英文）

Identification of responsible gene for atopic dermatitis in mice model

研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA AIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40383731

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎自然発症マウス *flaky tail* ( $ft \cdot ma / ft \cdot ma$ ) はフィラグリン遺伝子に変異をもつが、この変異が高IgE値表現型と *ma* (体毛がぼさぼさ) 表現型を示すものではないことを申請者のグループは明らかにした。高IgE値表現型と *ma* 表現型の原因遺伝子を同定するため、責任領域を決定するための多型マーカーを確立した。戻し交配による組み換え体マウスを解析し、*ma* 候補領域を 3.7 Mb まで狭めることに成功した。次に遺伝的組換えを生じたマウスの作出を試み、 $ft(ft \cdot ma^+ / ft \cdot ma^+)$  と  $ma(ft^+ \cdot ma / ft^+ \cdot ma)$  が分離しそれぞれを単独で持つ個体を獲得した。

研究成果の概要（英文）：

*Flaky tail mouse* ( $ft \cdot ma / ft \cdot ma$ ) is a model of atopic dermatitis, however, we found that both of matted coat (*ma*) and elevated IgE sensitization are not phenotype for filaggrin deficiency (*ft*). To identify responsible gene for these phenotypes, we established polymorphic markers and narrowed the *ma* responsible region within 3.7 Mb. Finally, we established  $ft(ft \cdot ma^+ / ft \cdot ma^+)$  and  $ma(ft^+ \cdot ma / ft^+ \cdot ma)$  mice strains by backcrossed recombination which was evaluated by our established polymorphic markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、モデルマウス、ゲノムシーケンシング、遺伝子多型、フィラグリン

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD: Atopic dermatitis)は、そう痒のある湿疹を主病変とした、慢性かつ再発性の経過を示す皮膚疾患である。ADはこれまでの知見から皮膚のバリア機能異常等が引き金となる IgE の過剰産

生を誘導するような免疫機構の過剰反応で発症すると考えられている。AD患者の多くは遺伝的なアトピー素因を持つと考えられているが、発症のメカニズムは未だに明らかになっていない点が多い。申請者を含むグループは、日本人 AD 集団における *FLG* 遺伝子変

異解析を行い、日本人特有の新規 *FLG* 遺伝子変異を発見した。現在までの報告や申請者のグループの解析により、日本人 AD 集団における *FLG* 遺伝子変異頻度は 10~20%程度であり、ヨーロッパと比較し低い事が明らかになった。*FLG* 遺伝子変異を有しても発症しない人もいる反面、*FLG* 遺伝子変異を有さない AD 患者も多いことから、*FLG* 遺伝子変異以外の原因が存在する事が示唆されている。

AD 様皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*)は、*ma* (*matted*: ぼさぼさした) の表現型を示すマウスの集団から出現した *ft*・*ma* / *ft*・*ma* の遺伝子型を有する突然変異株である。*ft* と *ma* は近接した遺伝子座であるが、*ft* はホモ接合体において出生直後から生後 2 週間まで皮膚異常と矮小な耳を示す。一方、*ma* はホモ接合体において、毛のキューティクル層が欠損しており、縮れてちぎれ易い構造の毛並みを示す。

flaky tail マウスにおいてフィラグリンの減少が報告され、さらに *ft* 遺伝子座と *Flg* 遺伝子が重なることから *Flg* 遺伝子内の変異であることが予想されたが、リピート間の相同性が 99%の *FLG* リピートがタンデムに並んだ構造であることから、通常の配列解析法では解読が不可能であった。申請者のグループは、ヒトゲノム解読で培ったノウハウを駆使し、flaky tail マウスの *Flg* 遺伝子からヒトの AD 患者と類似の 1 塩基欠失変異を同定し (研究業績 2) さらに経皮感作によるアトピー性皮膚炎の発症モデルを提唱した。しかし、その後 *ft*・*ma* を戻し交配する過程で *ft*・*ma* / *ft*・*ma* マウスを単離したところ、このマウスにおいては *ma* の表現型のみならず *ft*・*ma* マウスが示した高 IgE 値を示す等の免疫学的形質まで失われていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

そこで、本申請では戻し交配及び連鎖解析を用いて flaky tail マウスにおいて高 IgE 値を示す表現型の責任領域を絞り込むことを研究期間内の目標とする。

AD の研究では、主に免疫学的研究と皮膚バリア遺伝子解析が行われてきた。しかし、発症メカニズムなど未だ不明な点が多く、今後のメカニズム解明及び治療法の確立が期待される領域である。*FLG* 遺伝子は AD において皮膚バリア機能に関する主要な原因遺伝子の一つである事は既に示されている。しかし、*FLG* 遺伝子に変異を有さない AD 患者も数多く

存在することや、免疫症状に関与する遺伝子は未だ同定されていないことから、未知の原因遺伝子が存在することは明白である。

本研究によって新たな AD 関連遺伝子を同定することで、AD の発症メカニズムの一端を解明できると考えられる。申請者は本研究の成果に基づいて、将来的にはヒト AD 患者における当該遺伝子の変異解析も行う。この遺伝子がヒトでも AD 発症への関与があれば、病態の正確な理解に基づいた AD 発症の予防法を確立し、遺伝子変異を有していても発症自体を予防するための方法を確立することへ貢献でき、これが本研究の最も大きな意義であり、最終目標でもある。

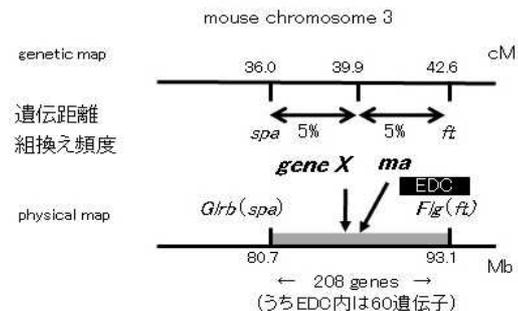
## 3. 研究の方法

*ft*・*ma* の交配実験により、皮膚分化に関係する遺伝子がクラスターしているマウス 3 番染色体 EDC (Epidermal Differentiation Complex) 近傍の 80.7~93.1Mb に *ma* はマップされている (図)。本研究においては *ma* 遺伝子そのものも有力な候補遺伝子の一つであるが、本研究の過程で高 IgE 値の原因となる遺伝子と *ma* 遺伝子が異なることが組換え体の解析から明らかになれば高 IgE 値の原因となる遺伝子に焦点を絞り、その解明を目指す。

### (1) CBA-C57BL/6 マウス間の DNA 多型マーカーの確立

*ft*・*ma* マウスは、交配により *spa*・*ma* 間及び *ma*・*ft* 間はそれぞれ約 5% で分離する事が報告されている (Lane PW, *Mouse News Lett.* 1972)。そこで、*spa*・*ma*・*ft* 間の CBA-C57BL/6 における組み換え位置を同定するために、CBA-C57BL/6 間の DNA 多型マーカーを確立する。

*spa* と *ft* の間に *ma* が存在している事は明らかになっているため、*ft* と *ma* が存在している CBA と相同性の高いアレル (CBA アレルと呼ぶ) と C57BL/6 のアレルを分離できるマーカーを確立する。*ft* の分離マーカーは前述にて既に確立しているため、*spa* マーカーから確立する。CBA と C57BL/6 マウス間の 1 塩基多型を利用した多型マーカーを検討する。



(図) *ma* が存在するゲノム領域マップ

## (2) *ft*・*ma*分離マウスの作出

表現型マーカーを用いた交配実験により、*ma*の責任領域は、約10Mb(206遺伝子)まで絞り込まれている。しかし、遺伝子変異を検索するには、206遺伝子はそれでもなお数が多いため、さらに領域を絞り込む必要がある(30遺伝子程度が目標である)。先の表現型マーカーを用いた交配実験では、*spa*・*ma*・*ft*間には減数分裂時にそれぞれ5%程度の頻度で相同性組換えが起こる事が報告されている。

そこで、以下の2点に注目する。

$ft \cdot ma / ft \cdot ma$  (flaky ホモマウス) と  $ft \cdot ma / ft^+ \cdot ma^+$  (flaky x C57BL/6 ヘテロマウス)を用いての交配を行い、CBA由来アレル(*ma*・*ft*が存在しているアレル)とC57BL/6由来アレルの*spa*・*ma*もしくは*ma*・*ft*間で相同性組換えを起こしたマウスを作出する。

*ft*及び*ma*の表現型と遺伝子マーカー解析により、*spa*・*ma*もしくは*ma*・*ft*間で相同性組換えをおこした個体を抽出し、さらにそれらの*spa*・*ft*間の相同性組換え領域を確立したDNA多型マーカーで同定する事により、*ma*責任領域を狭めていく。



$ft^- \cdot ma^- / ft^- \cdot ma^-$  (=flaky tail)



$ft^- \cdot ma^+ / ft^- \cdot ma^-$



野生型個体 (C57BL/6J)

(写真1) *ft*と*ma*の分離が予想されるマウスの表現型

## 4. 研究成果

本研究ではアトピー性皮膚炎自然発症マウス flaky tail ( $ft \cdot ma / ft \cdot ma$ )において高IgE値表現型と*ma*体毛がぼさぼさ表現型の責任領域を絞り込み、それぞれの原因遺伝子を同定することを目標とし、以下の研究を順次実施した。

### (1) CBA C57BL/6 マウス間の DNA 多型マーカーの確立

flaky tail マウスでは、3番染色体の*spa*・*ma*・*ft*間約12MbのCBA由来染色体領域に*ma*遺伝子座がマップされている。従ってflaky tail マウスをC57BL/6マウスと戻し交配して得られた組み換え体において、*ft*、*ma*あるいは高IgE値の表現型の有無とゲノムがCBA由来かC57BL/6由来かを対応させれば、それぞれの責任領域を絞り込むことが出来る。このため、CBA由来アレルとC57BL/6アレルを判別できる1塩基多型を利用した多型マーカーを*spa*・*ma*・*ft*間で12箇所作成し、このマーカーを用いて、戻し交配によって得られた既存の組み換え体マウスを解析した結果、*ma*候補領域を3.7Mbまで狭めることに成功した。

### (2) *ft*・*ma*分離マウスの作出

*ma*の責任領域は*spa*・*ma*・*ft*間約12Mbで、*spa*・*ma*間、*ma*・*ft*間でそれぞれ5%程度の頻度で遺伝的組換えが起こる事が報告されている。そこで、*ft*・*ma*間で遺伝的組換えを生じたマウスの作出を試みた。検討した*ft*及び*ma*の遺伝子マーカーを用いて産仔のジェノタイピングを行い、*ft*と*ma*が分離し、それぞれを単独で持つ個体の獲得に成功した。*ma*のみをホモで持つ個体は体毛がぼさぼさ、かつ、皮膚炎発症という表現型を示したのに対し、*ft*のみをホモで持つ個体はこ

これらの表現型を示さなかった。現在、*ft* および *ma* をそれぞれ単独でホモで持つ個体について IgE 値を測定して *ma* 表現型と高 IgE 値の責任領域が一致するか否かを検証する準備を進めている。



C57BL6/J



flaky tail (*ft* · *ma* / *ft* · *ma* )



*ma* (*ft*<sup>+</sup> · *ma* / *ft*<sup>+</sup> · *ma* )

(写真2) C57BL6/J、*flaky tail* (*ft* · *ma* / *ft* · *ma* )と *ma* (*ft*<sup>+</sup> · *ma* / *ft*<sup>+</sup> · *ma* )マウス生後6-7日目の表現型。*flaky tail* は背部皮膚のシワが顕著である。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
塩濱 愛子 (SHIOHAMA AIKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：40383731

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし