

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月15日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659172

研究課題名（和文） クローディンをターゲットとした自己免疫モデルマウスの作出

研究課題名（英文） Generation of claudin targeted autoimmune disease mouse model.

研究代表者

月田 早智子 (TSUKITA SACHIKO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00188517

研究成果の概要（和文）：自己を免疫学的な攻撃対象とする自己免疫疾患は、いずれも治療が難しい難病であるが、疾患の原因となる自己抗原が明確ではない場合が多い。一方、多くの自己免疫疾患では、上皮細胞シートで囲まれた内部組織が炎症の主要な場である場合が多い。本申請では、クローディンをはじめとするタイトジャンクション構成蛋白質が自己免疫疾患の標的であると想定し、クローディンノックアウトマウスと免疫不全マウスを用いて、クローディンに対する自己免疫疾患モデルマウスを作製し、タイトジャンクション構成蛋白質と自己免疫疾患との関連性について検討することを主な目的とした。

研究成果の概要（英文）：Autoimmune diseases, in which tissues of the body are pathologically attacked by an individual's own immune system, are presently difficult to cure completely. Autoimmunogens are suggested to exist in almost all known autoimmune diseases, but their identity is not known in many cases. Notably, many autoimmune diseases are accompanied by inflammation in epithelial tissues. In this project, we propose that claudin, a major tight junction protein, is a target immunogen in some autoimmune diseases. To clarify the relationship between claudin and autoimmune diseases, we sought to generate a claudin-targeted autoimmune disease mouse model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：上皮細胞、タイトジャンクション、自己免疫疾患、自己抗体、クローディン

### 1. 研究開始当初の背景

膠原病を始めとする自己免疫疾患は、生体防御機構が自分自身へ向かってしまう反応により生じるとされるが、必ずしもその疾患の原因となる特異的な抗原が同定されているとは限らない。むしろ、免疫反応がシステムとして賦活化されていて、実際に疾患を惹起している抗体とは異なる産生量の多い抗体

が、疾患関連抗体として検出されている場合もあるのではないかとと思われる。異なる自己免疫疾患で同じ自己抗体が検出されたり、自己抗体が検出されない場合もあるからである。一方で、多くの膠原病は、シェーグレン症候群の唾液腺上皮や涙腺上皮、強皮症の皮膚の上皮、などのように上皮組織を標的としている。



など適宜時間を区切り、主に、組織学および生理学的、血液生化学的、免疫学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

研究に必要なクローディンおよびクローディン以外の数種のタイトジャンクション関連遺伝子ノックアウトマウスは、すでに大阪大学動物施設で飼育し、表現型の解析中であつた。さらに、作製中のタイトジャンクション関連マウスも存在した。また、自己抗体産生マウスとして用いる**RAG2/JAK3 ダブルノックアウトマウスは、熊本大学 CARD より凍結胚の分与を受け、大阪大学医学系研究科付属動物施設にて維持を進めた。**

実験は、具体的には、主に、慶応大学皮膚科学教室の天谷研究室の天疱瘡マウスモデル作製方法に準じる。即ち、**①**ノックアウトマウスに、ノックアウトされた遺伝子産物蛋白質をインジェクションする。野生型マウスでは免疫寛容の作用で抗体が産生されにくい、遺伝子欠損産物に対しては免疫寛容は成立しないので、抗体が比較的容易に産生される。**②**数回のブーストを経たのちに、脾臓を摘出し、ホモジナイズする。**RAG2/JAK3 ダブルノックアウトマウス**の尾静脈からインジェクションする。このホモジナイズの中に、ノックアウトされたクローディンに対する抗体を産生するリンパ球が含まれる。

**RAG2/JAK3 ダブルノックアウトマウス**は、抗体のクラススイッチができない重症複合型免疫不全マウスなので、尾静脈から移植されたリンパ球は拒絶されずに生着し、抗体の産生を続ける。このとき、両方のノックアウトマウスの遺伝的背景を揃えておくことで、タイトジャンクション関連蛋白質に対する自己抗体以外は産生を免れる。こうして、特定のタイトジャンクション関連蛋白質に対する**自己免疫疾患モデルマウス**が作出できる。ただし、特定のクローディンに対する抗体ができずに、複数のクローディンをクロスして認識する抗体が産生される可能性もあり得る。ただし、このことは、むしろヒトでの自己免疫疾患を模倣する可能性があり、ヒトの症状と比較する上ではメリットになる可能性が高い。**③**こうして、順次タイトジャンクション関連蛋白質を標的とする

自己免疫疾患モデルマウスを作出するが、ある特定のクローディンで表現型が得られないと、他のクローディンが自己抗体として働かないとは言えない。何故ならば、クローディンは、大きなファミリーを形成し、それらが臓器特異的な分布を示しているからである。**④**そのため、実験は存在する全てのタイトジャンクション関連蛋白質のノックアウトマウスについて行なう必要がある。ただし、それぞれのクローディンサブタイプの体内での臓器分布は、ほぼ明らかにされているので、表現型と結びつきやすいクローディンを用いたモデルマウス作製から進める予定とした。**⑤**マウスの解析については、通常の観察を行いつつ、**RAG2/JAK3 ダブルノックアウトマウスへの脾臓由来リンパ球インジェクション**後、1月、3月、半年、1年を目処に、剖検を行い、全身の組織学的な解析を行い、組織構築の変化、炎症の有無・程度、蛍光標識ラベル抗マウス抗体を用いた蛍光自己抗体染色、などを行う。**⑥**同時に、採血を行い、炎症の有無(CRPや白血球画分)/イムノグロブリン画分の変化/血沈などの検査を行う。さらに、通常の膠原病マーカーの出現についても検討を行う。

自己免疫疾患を含む表現型が得られた場合には、その治療方法について検討を進める。考えられる方法としては、1) 自己抗原とした蛋白質を用いての**抗体の吸着**、2) 抗原となるペプチドの投与による抗原抗体反応の中和、などである。さらに、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の治療法として用いられる脱感作療法の効果も検討することを目指した。

方法として、1;ノックアウトマウスにノックアウトされた遺伝子産物蛋白質をインジェクションする。2;数回のブーストを経たのちに、脾臓を摘出し、ホモジナイズする。**RAG2/JAK3ダブルノックアウトマウス**の尾静脈からインジェクションする。特定のタイトジャンクション関連蛋白質に対する自己免疫疾患モデルマウスが作出できる。3;マウス解析(組織病理学的解析、血液生化学的解析、など)を継時的に行う、を計画した。自己免疫疾患の標的としてのクローディンとして、

クローニン18胃型を考え、リンパ球の移植を行う免疫不全ノックアウトマウスを試行した。十分な結果が得られなかった。しかしながら、本申請内容の検討は、SLEなどの上皮細胞組織を標的とする自己免疫疾患の理解の向上のために必要と思われ、他のノックアウトマウスも含め、今後も検討を継続させたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ①Hayashi, H., Tamura, A., Krishnan, D., Tsukita, S., Suzuki, Y., Kocinsky, HS., Aronson, PS., Orłowski, J., Grinstein, S., and Alexander, RT., Ezrin is required for the functional regulation of the epithelial sodium proton exchanger, NHE3. *Plos One*, 8: e55623, 2013: 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0055623.
- ②Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., Yashiro, K., Tsukita, S., and Hamada, H. EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins, *Dev Biol.*, 15: 136-145, 2012: 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.005.
- ③Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T., and Narumiya, S., Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis, *Int Immunol.*, 24:705-717, 2012, 査読有 doi: 10.1093/intimm/dxs077.
- ④Wada, M., Tamura, A., Takahashi, N., and Tsukita, S., Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>(+)</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology*, 114:369-380, 2013, 査読有 doi: pii:S0016-5085(12)01551-X.
- ⑤Tamura, A., Yamazaki, Y., Hayashi, D., Suzuki, K., Sentani, K., Yasui, W., and Tsukita, S., Claudin-cased paracellular proton barrier in the stomach. *Ann NY Acad Sci.*, 1258:108-114, 2012, 査読有 doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06570.x.
- ⑥Itoh, M., Tsukita, S., Yamazaki, Y., and Sugimoto, H., Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 109:9905-9910, 2012, 査読有 doi: 10.1073/pnas.1115063109.

〔学会発表〕(計7件)

- ①Kazuhiro Tateishi, “Odf2 organizes two distinct appendage structures/functions

in centrosomes and basalbodies.” *Computational Cell Biology: The Interplay between Models and Experimentation.*

2013年03月19日～2013年03月21日  
Cold Spring Harbor Laboratory, USA

- ②Sachiko Tsukita “Clritical Role of Basal Feet in Coorninated Ciliary Beating.” *ASCB annual meeting.*

2012年12月15日～2012年12月19日  
San Francisco, USA

- ③月田早智子 “Molecular mechanisms of cell morphogenesis.”

第85回日本生化学会大会

2012年12月14日～2012年12月16日  
福岡国際会議場

- ④Sachiko Tsukita “Claudin species-specific biological functions in Digestive Epithelial Cells.”

*International Conference Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia.*

2012年12月14日

Hyatt Regency Hotel in Merida, Mexico

- ⑤Sachiko Tsukita. “Tight Junction-based Building of Biological Systems.”

第33回日本肥満学会

2012年10月11日～2012年10月12日  
ホテルグランヴィア京都

- ⑥Sachiko Tsukita. “Tight Junction-based Building of Biological Systems.”

上皮バリアと上皮輸送に関する国際シンポジウム

2012年09月15日～2012年09月16日  
立命館大学びわ国際キャンパス

- ⑦月田早智子「上皮細胞間タイトジャンクションを起点とした生体システムの構築」

第21回日本バイオイメーキング学会学術集会  
2012年08月27日～2012年08月28日  
京都国際会館

〔その他〕

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

月田 早智子 (TSUKITA SACHIKO)

大阪大学・生命機能/医学・教授

研究者番号: 00188517