

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390274

研究課題名(和文) 17型コラーゲン発現制御による画期的水疱症モデルの作成と応用

研究課題名(英文) Production of a novel blistering disease model by regulating expression of collagen XVII

研究代表者

西江 渉(Nishie, Wataru)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20443955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘミデスモゾーム構成分子の一つであるXVII型コラーゲン(COL17)は表皮真皮間接合に重要で、遺伝子異常に伴い発現が欠損すると表皮水疱症(EB)の一型を発症する。また後天的にCOL17に対し自己免疫応答を生じると、自己免疫水疱症である水疱性類天疱瘡(BP)を発症する。本研究では、Tet-onシステムを応用し、ドキシサイクリン(DOX)投与によりヒトCOL17の発現を制御可能な遺伝子改変(Tg)マウスを作製した。TgマウスへDOXを経口投与すると、ヒトCOL17が皮膚で新たに発現し、抗ヒトCOL17抗体を生じた。本モデルは、EBやBPの病態解明と治療法開発に有用であると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Collagen XVII (COL17) is a hemidesmosomal molecule which keeps adhesion between the epidermis and dermis. Loss of COL17 expression due to mutation in the COL17A1 leads to blistering disease, epidermolysis bullosa (EB); in addition, autoimmunity to COL17 results in autoimmune blistering disorder bullous pemphigoid (BP). The purpose of this study is to produce a novel blistering model by regulating COL17 expression based on Tet-on system. Transgenic mice carrying human COL17 cDNA driven under the CMV promoter with Tet response element and Tet transactivator sequences driven under the K14 promoter were produced. Upon oral administration of doxycycline (DOX), the Tg mice started to express human COL17 in basal keratinocytes, following by production of IgG autoantibodies directing human COL17. The Tg mice must be useful tool for elucidating pathogenesis of EB and BP, as well as for establishing therapies for these orphan diseases.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚病態学

1. 研究開始当初の背景

膜貫通タンパクである XVII 型コラーゲン (COL17) は表皮基底細胞のヘミデスモゾーム構成分子の一つであり、表皮真皮間接合に重要な機能を担っている。COL17 遺伝子に変異が生じ発現が消失すると、外的刺激に伴い容易に水疱を形成する表皮水疱症の一型を発症し、COL17 に対し自己免疫反応を生じると、高齢者に好発し自己免疫性水疱症のなかで最も患者数の多い水疱性類天疱瘡 (Bullous pemphigoid, BP) を発症する。この 2 つの水疱症から、COL17 の表皮真皮間接合における重要性が理解できる。

EB や BP の病態解明や新規治療法開発には、疾患モデル動物が必須である。研究者らは、マウス Col17 遺伝子をノックアウトし、更にヒト COL17 を導入した COL17 ヒト化マウスを作製し、EB と BP モデルの樹立に応用してきた (Nishie W, et al. Nat Med 13: 387, 2007)。本モデルは現在でも有用だが、疾患モデルの表現型を誘導するには多くの時間と手間を要する。例えば BP モデルの場合、新生仔 COL17 ヒト化マウスへ抗ヒト COL17 抗体を投与するか、ヒト COL17 で免疫したマウスから脾細胞を Rag2 遺伝子ノックアウト COL17 ヒト化マウスへ移植する必要がある (Ujii H, Nishie W, et al. J Immunol 184: 2166, 2010)。一方、EB モデルである Col17 遺伝子ノックアウトマウスの多くは生後まもなく死亡するため、成体の EB モデルを用いた実験には、多数のノックアウトマウスを維持繁殖する必要がある。従って、より簡便に作製可能な EB あるいは BP モデルは、病態解明と新規治療法開発に非常に有用と予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤投与によりマウス皮膚でヒト COL17 の発現を自在に制御可能なモデルを作製することである。後天的にヒト COL17 がマウス皮膚で発現されると、ヒト

COL17 に対する抗体を生じ BP を発症すると予想される。一方、生下時から薬剤投与を継続し、アダルトマウスまで成長した時点で投与を中止すると COL17 の発現が消失し大人の EB モデルを得ることが可能である。そこで本研究では、BP と EB の病態解明と新規治療法開発への応用に極めて有用と予想される、“薬剤投与により COL17 の発現を自在に制御可能な画期的モデルマウスの作製”を試みた。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞を用いたヒト COL17 発現制御効率の検討

ヒト COL17 遺伝子の発現制御法として、ドキシサイクリン (DOX) 投与に伴い遺伝子発現を抑制可能な Tet-on/off システムに着眼した。Tet-on/off Advanced vector (Clontech) を HEK293 細胞へそれぞれ導入した宿主細胞をそれぞれ作製し、全長のヒト COL17 cDNA を pTRE tight vector へ組み込んだコンストラクト (pTRE-COL17) を遺伝子導入する。この細胞の培地へ異なる濃度の DOX (0~1,000ng/ml) を 48 時間投与し、ヒト COL17 の発現効率をウエスタンブロット法で評価する。この実験によって、ヒト COL17 の発現制御に Tet-on あるいは Tet-off システムのどちらがよいかが明らかとなる。

(2) pTRE-COL17 発現遺伝子導入トランスジェニック (Tg) マウスの作製

制限酵素で直線化した pTRE-COL17 を C57BL/6 マウス受精卵前核へマイクロインジェクションし Tg マウスを作製する。本手法がうまくいかなかった場合は、一つのベクターで、ケラチン 14 プロモーター下でテトラサイクリン性トランス活性化因子、pTRE-COL17、をそれぞれ発現するベクターを用い、Tg マウス作製を検討する。得られた Tg マウスを、ケラチン 14 プロモーター下でテトラサイクリン性トランス活性化因子を発現する Tet-on 発現 Tg マウスと交配するが、

これは市販のものを用いた（ジャクソン）。

(3) DOX 投与による Tg マウス由来培養表皮角化細胞でのヒト COL17 発現誘導

Tg マウス尾から Cnt-Prime 培地 (CellInTec) を用い表皮角化細胞を培養し、DOX 1mg/ml 濃度で 3 日間培養し、mRNA を抽出 RT-PCR 後に以下のプライマーを用いヒト COL17 mRNA 発現を確認する (F5 inner:

5' -AGACCTGAAGACTGTGTCCA-3' , B6 inner:

5' -ACCTGGAGTCCCAGGGAAC-3')

(4) DOX 投与による Tg マウス皮膚におけるヒト COL17 発現誘導

DOX 2mg/ml と Sucrose を含有する飲用水を遮光した給水瓶でマウスへ 2 週間、経口投与し、皮膚組織を抗ヒト COL17 抗体 (TS39-3, Ujiie H, et al. J Immunol 2010) を用い蛍光抗体間接法で免疫染色を施行する。

(4) ELISA、蛍光抗体間接法、直接法

DOX 投与前、2、4、6 週後のマウスからそれぞれ採血し、血清を 101 倍希釈し BP180 NC16A ELISA キット (MBL) を用い ELISA を施行する。その際、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を用いる。また、全長のリコンビナントヒト COL17 タンパクを用いた ELISA 法も施行する (Izumi K, Nishie W, et al. J Invest Dermatol, under revision)。マウス尾から皮膚を採取し、OCT コンパウンドで包埋後、凍結皮膚組織標本作製し PBS で洗浄後、Alexa488 抗マウス IgG を用い蛍光抗体直接法を行い、皮膚基底膜部への IgG クラス自己抗体の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞でのヒト COL17 の発現制御

Tet-on Advanced vector と pTRE-COL17 vector をそれぞれ安定発現する HEK293 細胞の培地へ DOX を投与したところ、容量依存性に COL17 の発現誘導された (図 1 A)。DOX 投与 (-) では COL17 の発現を検出できず、基底レベルでのリーキングは極めて

少ないことが確認でき、マウス皮膚で後天的に COL17 を発現させると抗原抗体反応を惹起させる可能性を示唆していた。一方、Tet-off Advanced vector と pTRE-COL17 vector をそれぞれ安定発現する 293 細胞の培地へ DOX を投与すると、薬剤投与量依存性に COL17 の発現が阻害された (図 1 B)。

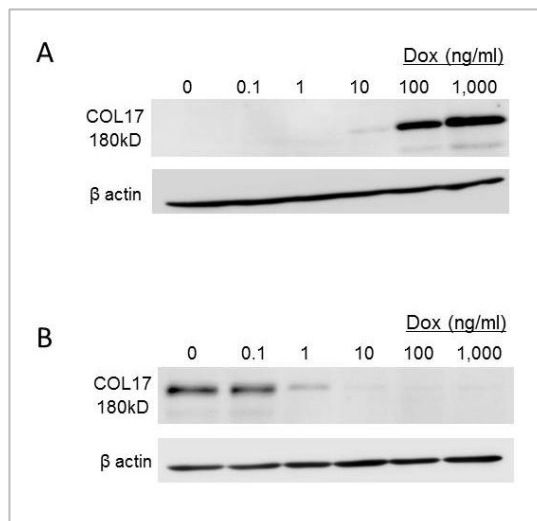


図 1 Tet-on (A) と Te-off (B) システムによるヒト COL17 の発現制御

(2) pTRE-COL17 発現 Tg マウスの作製

制限酵素 HindIII で直線化した pTRE-COL17 を 386 個の C57BL/6 マウス受精卵前核へマイクロインジェクションし、349 個を 16 匹の偽妊娠マウス子宮へ移植したところ、72 匹の産仔を得た。PCR でトランスジーンの有無をスクリーニングした結果、6 匹が陽性だった。

(3) Tg マウス表皮細胞におけるヒト COL17 mRNA の発現

6 匹の陽性 Tg マウスからそれぞれ表皮細胞を培養し、Tet-off Advanced vector をレトロウイルスで遺伝子導入した。遺伝子導入後の細胞の培地へ DOX を添加したところ、3 匹のマウス (No. 14, 15, 24) でヒト COL17 mRNA が発現誘導されることを確認した (図 2)。以上の結果をもとに、Tg マウスを K14 プロモーター下で Tet-on 応答因子を発現する (K14-Tet-on) Tg マウスと交配し、pTRE-COL17 と Tet-on 応答因子のダブル Tg マ

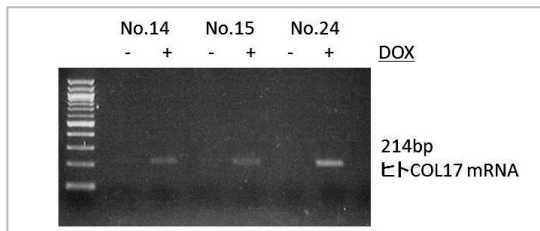


図2 Tet-off Advanced vector を導入した Tg マウス細胞 . DOX 投与によりヒト COL17 mRNA が発現誘導されている

ウス作製を試みた。No.15 と No.24 由来のダブル Tg マウスへ 2 週間 DOX を経口投与し、マウス皮膚を抗ヒト COL17 抗体で蛍光抗体間接法を行ったが、表皮真皮境界部にはヒト COL17 は明瞭には確認できなかった (図 3) 。

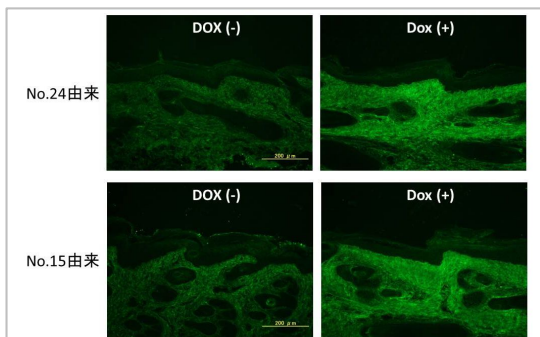


図3 経口で DOX を投与したダブル Tg マウス皮膚におけるヒト COL17 の発現

ヒト COL17 発現の不良は、スクリーニング時の pTRE-COL17 陽性 Tg マウスが 6 匹と少なく、培養細胞系では DOX 投与によって COL17 mRNA が発現誘導されたもののタンパクレベルでは不十分であったと予想された。

(4) K14-Tet-on、pTRE-COL17 デュアル発現 Tg マウスの作製

上記 (3) の結果と、過去の報告 (Barde I, et al. Mol Ther 13: 382, 2006) を基に、一つのコンストラクトで K14 プロモーター下の Tet-on 応答因子 (rtTA-Advanced) と pTRE-COL17 を、それぞれ逆方向に発現するベクターを作製し (図 4 A) 制限酵素で直線化後、496 個の C57BL/6 マウス受精卵前核ヘマイクロインジェクション施行した。431 個を 21 匹の偽妊娠マウス子宮へ移植し、78 匹の産仔を得た結果、PCR のスクリーニングでは 19 匹が陽性で、そのうち 15 匹が生存した (図 4 B) 。

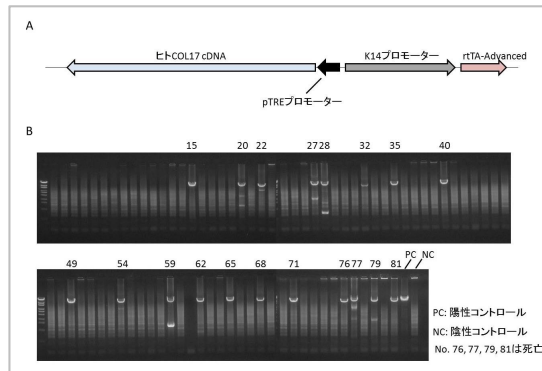


図4 新規 Tg マウスコンストラクト (A) と仔のスクリーニング結果 (B)

(5) K14-Tet-on、pTRE-COL17 デュアル発現 Tg マウスの解析

ヒト COL17 発現皮膚を野生型マウスへ移植すると 2 ~ 3 週後に抗ヒト COL17 IgG 抗体が産生される (Olasz EB, et al. J Invest Dermatol 127: 2807, 2007) 。従って、抗ヒト COL17 IgG 抗体の産生は Tg マウス皮膚において新たに発現したヒト COL17 タンパクの指標となる。一方、DOX 投与しない状態でヒト COL17 を発現してしまうと (リーキング現象) 免疫寛容が働かず、抗ヒト COL17 IgG は産生されないと予想される。従って抗ヒト COL17 IgG の検出は、新規 Tg マウスでヒト COL17 の発現制御効率が良い個体をスクリーニングする手法に有用と予想される。

15 匹の Tg マウスへ DOX を経口投与し経時的に抗ヒト COL17 IgG クラス自己抗体の推移を、ELISA 法と正常ヒト皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で検討した結果、全長ヒト COL17 ELISA では 4 匹の個体で経時的に抗ヒト COL17 IgG を検出した (No. 32, 35, 40, 54、図 5) 。抗 BP180 NC16A ELISA では 3 匹の個体で経時的な抗 COL17 IgG 自己抗体の増加を認め (No. 32, 40, 54、図 6) 投与 4 週後の Tg マウス血清には 5 匹の個体 (No. 32, 35, 40, 54, 59) で、正常ヒト皮膚抗基底膜部 IgG クラス抗体を認めた (図 7) 。また DOX 投与 4 週後のマウス皮膚を用い蛍光抗体直接法を施行したところ、No. 32 と 40 で抗基底膜部にマウス IgG が線状に沈着し (図 8) 免疫学

的に BP に類似した病態が再現することに成功した。しかしこれらマウスには水疱形成など、明らかな臨床的表現型は認めなかった。

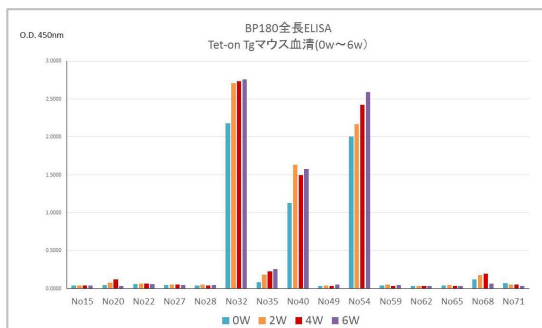


図5 DOX 投与に伴う抗ヒト COL17 IgG クラス抗体の推移 (全長 COL17 ELISA)

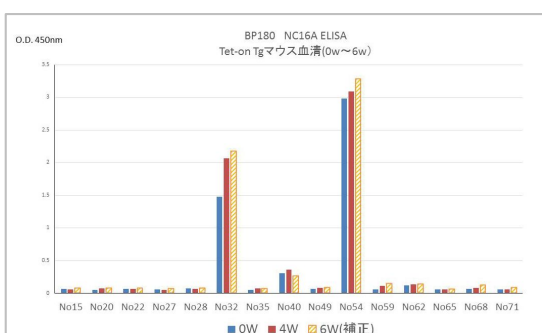


図6 DOX 投与に伴う抗ヒト COL17 IgG クラス抗体の推移 (BP180 NC16A ELISA)

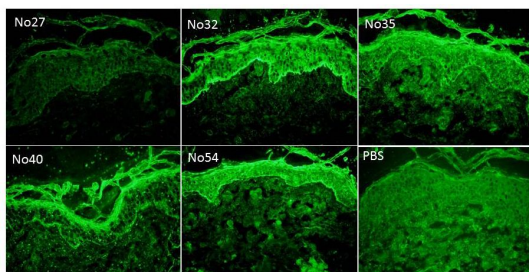


図7 正常ヒト皮膚を基質に用いた DOX 投与マウス血清の蛍光抗体間接法 (No.27 は自己抗体を生じなかった個体)

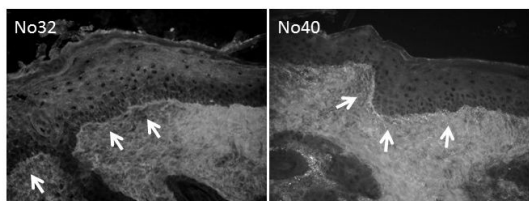


図8 DOX 投与マウス皮膚(尾)の蛍光抗体直接法 (矢印: 基底膜部に沈着した IgG クラス自己抗体)

本研究によって、DOX の経口投与により抗ヒト COL17 IgG クラス抗体を誘導可能なマウスの作製に成功した。本マウスでは水疱形成など BP に類似する表現型は得られ

なかったが、その一因には作製した Tg マウスではマウス COL17 も表皮基底細胞に発現することが考えられた。今後、マウス COL17 遺伝子ノックアウトと交配を進めることで、より BP に類似するモデルが作製可能であろうと予想される。また、生下時から大人へ成長するまで DOX を投与し、ヒト COL17 の発現が消失した大人の EB モデルを得ることも可能である。これらモデルは BP と EB の病態解明と新規治療法開発へ極めて有用であることが期待される。

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5件)

1. Nishie W, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Ujiie H, Toyonaga E, Hata H, Nakamura H, Shimizu H.

Context-dependent regulation of collagen XVII ectodomain shedding in skin.

Am J Pathol 185; 1361-71, 2015、査読あり、DOI:

10.1016/j.ajpath.2015.01.012.

2. Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H.

Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation.

J Immunol 193; 4415-4428, 2014、査読あり、DOI: 10.4049/jimmunol.1400095.

3. Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito T, Toyonaga E, Sato H, Shimizu H.

A recurrent 'hot spot' glycine substitution mutation, G2043R in COL7A1, induces dominant dystrophic epidermolysis bullosa associated with intracytoplasmic accumulation of

pro-collagen VII.

J Dermatol Sci 75:69-71, 2014、査読あり、DOI:

10.1016/j.jdermsci.2014.04.006.

4. Nishie W, Jackow J, Hofmann SC, Franzke CW, Bruckner-Tuderman L. Coiled coils ensure the physiological ectodomain shedding of collagen XVII. J Biol Chem 287:29940-29948, 2012、査読あり、DOI: 10.1074/jbc.M112.345454.
5. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. Br J Dermatol 166:903-905, 2012、査読あり、DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10696.x.

[学会発表](計5件)

1. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamra H, Watanabe M, Kambe M, Hatamochi A, Kimura U, Suga Y, Shimizu H. A single laminin subunit deficiency alters other laminin expression depending on the mutated genes. 第40回日本研究皮膚科学会総会、2015年12月11日 - 2015年12月13日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)
2. 泉 健太郎、西江 渉、夏賀 健、岩田 浩明、氏家英之、清水 宏. 全長 XVII 型コラーゲンを抗原とした ELISA による粘膜類天疱瘡患者自己抗体の検出. 第37回水疱症研究会、2015年9月26日、コラッセ福島、(福島県・福島市)
3. Izumu K, Nishie W, Ujiie H, Shimizu H. Establishment of novel ELISA using full-length recombinant human collagen

XVII.

International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh, England, May 8 to 11, 2013.

4. Nishie W, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H. Role of collagen XVII in migrating keratinocytes. 第37回日本研究皮膚科学会総会、2012年12月7日 - 2012年12月9日、ロワジュールホテル(沖縄県・那覇市)
5. Nishie W, Ujiie H, Shinkuma S, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Neopeptides on the modified amino-terminus of the shed ectodomain of collagen XVII. The 43rd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Venice, Italy, September 19 to 22, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 20443955

(2)研究分担者

氏家英之 (UJIIE HIDEYUKI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 600374435

新熊 悟 (SHINKUMA SATORU)

北海道大学、医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 00613788

夏賀 健 (NATSUGA KEN)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 70645457