

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293254

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたBP230への自己抗体の誘導とBP230の新規機能の解析

研究課題名(英文) Induction of autoantibodies to BP230 and analysis of new function of BP230 using gene-engineered mouse

研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：60196334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性類天疱瘡は、全身に表皮下水疱が多発する高齢者に後発する皮膚疾患である。本症では、抗基底膜に対する自己抗体が存在するため、自己免疫性水疱症と理解されている。今回の研究で、BP230ノックアウトマウスの作成、ならびに表皮のみでBP230が欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。その結果、BP230は筋肉で重要な役割を演じていることが明らかとなった。また、表皮真皮の結合に寄与していることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bullous pemphigoid is a skin disease which shows generalized blisters and occurs mostly in the elderly. This disease is characterized by autoantibodies to basement membrane zone and considered as autoimmune blistering disease. In this study, we generated knockout mouse of BP230 and also conditional knockout mouse without epidermal BP230 expression. The results demonstrated that BP230 plays an important role in muscle function. Furthermore, BP230 has great contributions to stability of binding between the epidermis and the dermis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝子 自己免疫 皮膚 水疱

1. 研究開始当初の背景

水疱性類天疱瘡は、全身に表皮下水疱が多発する高齢者に後発する皮膚疾患である。本症では、抗基底膜に対する自己抗体が存在するため、自己免疫性水疱症と理解されている。本症の自己抗体が認識する自己抗原は、180kDa と 230kDa 類天疱瘡抗原 (BP180 と BP230) である。我々は、20 年以上にわたり類天疱瘡の研究を継続してきた。まず、その自己抗原の解析を行った。BP230 の主な研究では、全アミノ酸配列を決定、発現調節領域の解析、BP180 の主な研究では、遺伝子構造の解析である。このように自己抗原の解析は進んだが、自己抗体の病原性についての証明はなかなか進まなかった。つまり、患者の自己抗体が動物の BP 抗原を認識しないため、自己抗体を動物に移入しても病変が形成されなかった。我々のグループは BP180 の遺伝子改変マウスを駆使し、マウスの BP180 のヒト化に成功し、BP180 を認識する自己抗体が病変を起こすことを初めて証明した。さて、水疱性類天疱瘡において BP180 への自己抗体が病変を形成していることが明らかになったが、BP230 に対する自己抗体に関しては、病態と関連を示す明確な実験はない。BP230 への自己抗体の病原性、また BP230 の表皮真皮結合能や新規機能の詳細を、解明するのが本研究の主な目的である。

2. 研究の目的

水疱性類天疱瘡の自己抗原として BP230 がある。BP230 への自己抗体の病原性、また BP230 の表皮真皮結合能や新規機能の詳細を、解明するのが本研究の主な目的である。そのために、コンディショナルノックアウトマウスを用い、1) BP230 に対する自己抗体を有するモデル動物の作製、2) BP230 のノックアウト状態の長期観察、3) 表皮に局限する皮膚欠損の作製、を行う。

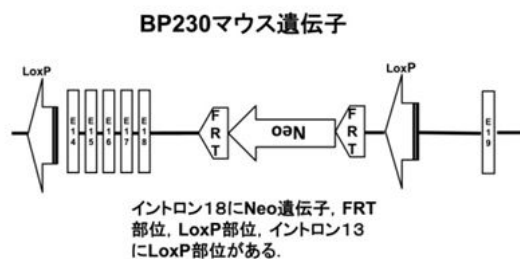
3. 研究の方法

BP230 のコンディショナルノックアウトマウスのデザインならびにそのマウスの作製：マウス BP230 の遺伝子配列から、遺伝子発現や遺伝子のスプライシングに影響のないイントロンを選択する。それにより、Neo 遺伝子の挿入部位、FRT 部位、LoxP 部位を設定。その後、ベクターの構築、ベクターの ES 細胞への導入、ホモログスリコンビネーション成功クローンの選択、3-5 日胚盤胞への注入、ヘテロマウスの選択を行った。ヘテロマウス

を正常マウスと交配し、戻し交配をおこなった。ヘテロの同士の交配から、BP230 のノックアウトマウス得た。BP230 の表皮特異的ノックアウトマウスの作製：Flp マウスは Flp recombinase が全身の細胞で高発現する。この Flp マウスとヘテロマウス交配する。その結果、イントロンには FRT 部位のみ残り、遺伝子の機能は損なわれない。このマウスは、loxP にはさまれる領域が除かれる準備ができたことから、floxed マウスと呼ばれる。次に、このマウスをさらに K14Cre マウスと交配する。K14Cre マウスは、表皮でのみ発現するプロモーターを有している。Cre recombinase は loxP 部位を認識し、その部位に挟まれた領域を切り取る。その結果、表皮でのみ BP230 が欠損するマウスを得た。そのマウスについて、光学顕微鏡、電子顕微鏡、蛍光抗体法などで皮膚を詳細に検討した。BP230 自己抗体誘導実験：BP230 遺伝子のノックアウトより脾細胞を採取する。得られた脾細胞を無免疫の Rag2KO マウスに静脈投与を行う。定期的に、皮膚症状、血清のマウス BP230 やマウス BP180 に対する抗体価、皮膚の生検を行う。得られた皮膚は、HE 染色と蛍光抗体直接法を行う。

4. 研究成果

BP230 のコンディショナルノックアウトマウスのデザインならびにそのマウスの作製：ヘテロ同士の交配から、BP230 のノックアウトマウス得た。得られた BP230 のノックアウトマウスでは全身の BP230 が欠損する。このマウスは、1-2 週間で、筋肉のジストニアを発症し 1-2 週間で死亡した。過去に作製されたノックアウトマウスとはデザインは異なるが、表現型は変わらない結果であった。BP230 の表皮特異的ノックアウトマウスの作製；



コンディショナルノックアウトマウスのデザイン

floxed マウスと K14Cre マウスと交配によって、表皮のみで BP230 が欠損するコンディショナル

ノックアウトマウスを得た。本マウスでは、ノックアウトマウスとは異なり、筋肉のジストニア症状は消失していた。それにより、長期に生存した。光学顕微鏡的には、表皮と真皮の間に微小な水疱の形成が認められた。さらに、電子顕微鏡的にもBP230より形成されるヘミデスモゾームブランクの低形成が認められた。また、表皮下水疱も観察された。蛍光抗体法や免疫プロットにて、表皮でのBP230の欠損が認められた。BP230自己抗体誘導実験：BP230遺伝子のノックアウトより脾細胞を採取し、無免疫のRag2KOマウスに静脈投与を行ったが、BP230に対する自己抗体の産生を証明することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

1. Nishikawa Y, Matsuzaki Y, Kimura K, Rokunohe A, Nakano H, Sawamura D. Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) expression by interferon- in human keratinocytes. *Biochem Genet*. 査読有, 2018;56:93-102. Doi: 10.1007/s10528-017-9832-7.
2. Mizawa M, Makino T, Furukawa F, Torai R, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. The 6-year follow-up of a Japanese patient with silent erythropoietic protoporphyria. *JAAD Case Rep*. 査読有, 2017;3:169-171. Doi: 10.1016/j.jdc.2017.01.025.
3. Li M, Higashi N, Nakano H, Saeki H. An ATP2A2 Missense Mutation in a Japanese Family with Darier Disease: A Case Report and Review of the Japanese Darier Disease Patients with ATP2A2 Mutations. *J Nippon Med Sch*. 査読有, 2017; 84: 246-250. Doi: 10.1272/jnms.84.246.
4. Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Hirako Y, Sawamura D, Fujimoto W, Shimizu H. C-Terminal Processing of Collagen XVII Induces Neoepitopes for Linear IgA Dermatitis Autoantibodies. *J Invest Dermatol*. 査読有, 2017;137:2552-2559. Doi: 10.1016/j.jid.2017.07.831.
5. Takadama S, Nakaminami H, Aoki S, Akashi M, Wajima T, Ikeda M, Mochida A, Shimoe F, Kimura K, Matsuzaki Y, Sawamura D, Inaba Y, Oishi T, Nemoto O, Baba N, Noguchi N. Prevalence of skin infections caused by Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan, particularly in Ishigaki, Okinawa. *J Infect Chemother*. 査読有, 2017;23:800-803. Doi: 10.1016/j.jiac.2017.04.016.
6. Suzuki H, Kikuchi K, Fukuhara N, Nakano H, Aiba S. Case of late-onset erythropoietic protoporphyria with myelodysplastic syndrome who has homozygous IVS3-48C polymorphism in the ferrochelatase gene. *J Dermatol*. 査読有, 2017;44:651-655. Doi: 10.1111/1346-8138.13709.
7. Fujii A, Matsuyama K, Mizutani Y, Kanoh H, Nakano H, Seishima M. Multiple familial trichoepithelioma with a novel mutation of the CYLD gene. *J Dermatol*. 査読有, 2017;44:e228-e229. Doi: 10.1111/1346-8138.13901.
8. Akasaka E, Nakano H, Takagi Y, Toyomaki Y, Sawamura D: Multiple Milia as an Isolated Skin Manifestation of Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Evidence of Phenotypic Variability. *Pediatr Dermatol*. 査読有, 2017; 34(2):e106-e108.

- Doi: 10.1111/pde.13047.
9. Akasaka E, Hagiwara C, Takiyoshi N, Aizu T, Nakano H, Sawamura D, Ota T: Elevated levels of circulating immunoglobulin E autoantibodies against BP180 and BP230 in an intractable case of bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 査読有, 2016; 84(1): 110-113. Doi:10.1016/j.jdermsci.2016.07.011.
 10. Nishimura M, Nishie W, Shirafuji Y, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Sawamura D, Iwatsuki K, Shimizu H. Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation. *Hum Mol Genet*. 査読有, 2016; 25(2): 328-329. Doi:10.1093/hmg/ddv478.
 11. Akasaka E, Sato-Jin K, Nakano H, Ishii N, Hashimoto T, Sawamura D: Diaminodiphenyl sulfone-induced hemolytic anemia and alopecia in a case of linear IgA bullous dermatosis. *Case Rep Dermatol*. 査読有, 2015;7:183-186. Doi: 10.1159/000438506.
 12. Korekawa A, Kaneko T, Nakajima K, Rokunohe D, Akasaka E, Nakano H, Sawamura D, Fukui T, Takiyoshi N, Kitamura H, Harada K: Mycosis fungoides bullosa associated with bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*. 査読有, 2015;54(9):e366-e368. Doi: 10.1111/ijd.12821.
 13. Kinjyo C, Kaneko T, Korekawa A, Rokunohe A, Aizu T, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D: Oral lichen planus with antibodies to desmogleins 1 and 3. *J Dermatol*. 査読有, 2015;42(1):40-41. Doi: 10.1111/1346-8138.12661.
 14. Akasaka E, Okawa Y, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe D, Toyomaki Y, Sawamura D, Sueki H: Two Japanese familial cases of punctate palmoplantar keratoderma caused by a novel AAGAB mutation, c.191_194delCAAA. *J Dermatol Sci*. 査読有, 2015;78(2):156-158. Doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.004.
 15. Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Nakano H, Tanemura A, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I: Severe scoliosis associated with the WNT10A mutation. *J Dermatol*. 査読有, 2015; 42: 322-323. Doi: 10.1111/1346-8138.12762.
 16. Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Yutani M, Murota H, Nakano H, Sawamura D, Katayama I. Atopic Diathesis in Hypohidrotic/Anhidrotic Ectodermal Dysplasia. *Acta Derm Venereol*. 査読有, 2015; 95: 476-479. Doi:10.2340/00015555-1978.
 17. Akasaka E, Nakano H, Korekawa A, Fukui T, Nishikawa Y, Kaneko T, Koga H, Hashimoto T, Sawamura D: Anti-laminin gamma1 pemphigoid associated to ulcerative colitis and psoriasis vulgaris, co-existing with distinct autoantibodies to laminin gamma1, type XVII collagen, and laminin 332. *Eur J dermatol*. 査読有, 2015;25(2):198-199. Doi:10.1684/ejd.2014.2499
 18. Shimizu Y, Ogawa Y, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M: A palindromic motif in the -2084 to -2078 upstream region is essential for ABCA12 promoter function in cultured human keratinocytes. *Sci Rep*. 査読有, 2014 ; 4:6737. Doi:10.1038/sreo06737.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 澤村大輔:最近経験した遺伝性皮膚疾患、第 133 回山陰・第 29 回島根合同開催地方会、2017 年
2. 中野 創:遺伝性皮膚疾患の遺伝子診断、函館皮膚科医会学術講演、2017 年
3. 松崎康司:皮膚科新薬の効果と最近経験した興味深い症例、第 124 回弘前皮膚科専門医会、2017 年
4. 中野 創:栄養状態と皮膚の健康 創傷治癒から帯状疱疹まで一、第 32 回東北静脈経腸栄養研究会、2017 年
5. 赤坂英二郎、高橋実か、原 憲司、是川あゆ美、会津隆幸、中野 創、澤村大輔:外科手術を契機に再燃し免疫グロブリン大量静注時に血小板減少をきたした水疱性類天疱瘡、第 39 回水疱症研究会、2017 年
6. 金子高英、古川和仁、萩原千尋、滝吉典子、中野 創、澤村大輔、桜庭裕丈:ヒドロキシクロロキンによる急性汎発性発疹性膿疱症 (AGEP)、第 81 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2017 年
7. Akasaka E, Nakano H, Sawamura D: Mutational analysis of dystrophic epidermolysis bullosa, The 13th International Congress of Human Genetics, 2016 年
8. 赤坂英二郎、中野 創、神田由紀、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔:栄養障害型表皮水疱症における末梢血単核球から分離した mRNA を用いた COL7A1 変異検索、第 23 回分子皮膚科学フォーラム、2016 年
9. 赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔:稗粒腫を初発症状とし家系内で異なる臨床病型を呈した優性栄養障害型表皮水疱症の 1 家系例、第 115 回日本皮膚科学会総会、2016 年
10. 澤村大輔:日常診療でみられる遺伝性皮膚疾患、遺伝子診断、第 6 回城南皮膚病カンファレンス、2016 年
11. 澤村大輔:表皮水疱症の最近の話題、皮膚病態学アフェレシスフォーラム、2016 年
12. 澤村大輔:遺伝性皮膚疾患のトピックス、皮膚科セミナー、2016 年
13. 赤坂英二郎、中野 創、神田由起、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔:栄養障害型表皮水疱症の遺伝子診断における末梢血単核球の型コラーゲン発現についての検討、第 38 回水疱症研究会、2016 年
14. 澤村大輔:表皮水疱症:その臨床と最近の治療.第 3 回北海道皮膚 IVIG 療法研究会、2015 年
15. 澤村大輔:表皮水疱症の最近の話題、第 4 回東京水疱症研究会、2015 年
16. 澤村大輔:表皮水疱症の診断基準と最新の治療研究報告. 仙台市医療講演・相談会難病医療法から学ぶ表皮水疱症 (EB) Q&A、2015 年
17. 赤坂英二郎、金城千尋、会津隆幸、中野 創、澤村大輔:著名な好酸球増多と浮腫性紅斑を示し血漿交換が奏功した水疱性類天疱瘡. 第 37 回水疱症研究会、2015 年
18. 赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔:優性栄養障害型表皮水疱症の遺伝カウンセリング ~G2251E 変異について~.第 39 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2015 年
19. 赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、中野あおい、玉井克人、野村和夫、三橋善比古、橋本 功、澤村大輔:栄養障害型表皮水疱症 133 家系の COL7A1 遺伝子変異解析. 第 113 回日本皮膚科学会総会、2014 年
20. 金子高英、会津隆幸、松井彰伸、滝吉典子、六戸大樹、松崎康司、中野 創、澤村大輔、北山眞任、橋本 浩、廣田和美:

複数の神経ブロックを併用して腋窩郭清
を施行した重症型表皮水疱症の1例．第
29回日本皮膚外科学会総会・学術集会、
2014年

21. 澤村大輔：表皮下水疱症の臨床と治療．
第1回福島皮膚科水疱症フォーラム、
2014年

6．研究組織

(1)研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA, Daisuke)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60196334

(2)研究分担者

松崎 康司 (MATSUZAKI, Yasushi)
弘前大学・医学部附属病医院・講師
研究者番号：50322946

中野 創 (NAKANO, Hajime)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90281922