

平成21年 4月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591311  
 研究課題名（和文） Tet-On 遺伝子誘導発現マウスを用いた乾癬発症機序における HB-EGF の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of HB-EGF on the pathogenesis of psoriasis using tetracycline-inducible transgenic mice system.  
 研究代表者  
 白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：50226320

## 研究成果の概要：

本研究は、活性化 STAT3 が乾癬病変の形成に重要な役割を果たすことから、STAT3 を活性化する EGF family の機能を明らかにすることにある。表皮において重要である EGF Family の HB-EGF と Amphiregulin の遊離型と膜型の遺伝子誘導マウスをそれぞれ開発し、乾癬のモデルマウスとして有用か否かについて検討した。これらのマウスにドキシサイクリンを投与し、自然発症乾癬モデルマウスとなり得るか現在観察中である。また、創傷刺激を与えて乾癬病変が誘導できるか否かについての実験を準備中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 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：尋常性乾癬、遺伝子誘導、HB-EGF, Amphiregulin, Tet-on, TG mouse

## 1. 研究開始当初の背景

乾癬は皮膚科領域を代表する疾患であり、表皮の過増殖、炎症性細胞浸潤を特徴とし、さらには血管内皮の過剰増殖も報告されている。乾癬の発症機序に関しては大別して二つの考え方に分類される。1番目の説は、表皮細胞の異常が原因であるという考え方（表皮説）であり、もう一つの説は、免疫異常により惹起されるとの考え方（免疫説）である。表皮説は、乾癬では表皮の過増殖を起こす異常がその発症に関係するとの考え方である。表皮はその最下層である基底細胞層のみで

分裂増殖するが、実際、乾癬の基底細胞層では表皮角化細胞の DNA 合成が亢進し、cyclin D などの増加もみられる。また、分化も異常を呈しており、その病態は創傷治癒過程の増殖している表皮に近似しているといわれている。しかし、一方乾癬病変部では、活性化 T 細胞の浸潤、好中球の表皮への浸潤などがみられることより、これらの免疫異常がまず起こり、これに伴って表皮の過増殖が引き起こされるのではないかとこの考えが提唱されるようになった。TNF-alpha の機能を阻害するバイオリジクスの投与により乾癬の病態

が改善されることが知られており、乾癬における免疫異常が存在することは確実であろう。しかしながら、このような状況下で、表皮説を裏付ける報告が相次いだ。まず、Wagner らのグループは、転写因子 AP-1 の構成因子である JunB の表皮特異的欠損マウスを作製したところ、このマウスでは、乾癬に類似した皮膚病変が出現したのみならず、関節病変も出現した。乾癬病変の出現に先行して、白血球遊走因子である S100A8 と S100A9 の増加をみられることから、これらが免疫系の異常につながる可能性が指摘されている。一方、Sano らは、STAT3 の表皮細胞における異常が乾癬の発症に関連することを報告した。即ち、持続活性型の STAT3 を表皮特異的に強制発現したトランスジェニックマウスを作製したところ、自然発生的にあるいは創傷誘発的に乾癬病変が出現し、T 細胞の活性化を伴ったことを報告している。これらの報告は、表皮説を強く支持するものであり、乾癬病変発症における表皮内シグナル伝達機構の重要性を示唆している。STAT3 は転写調節因子であり、様々な刺激により活性化される。表皮細胞においてはサイトカイン受容体は細胞内ドメインに会合した JAK 型チロシンキナーゼを介してシグナルを送り、JAK により STAT がリン酸化され 2 量体化し核へ移行して直接遺伝子の発現を制御する。表皮角化細胞における JAK 型チロシンキナーゼ受容体の代表的なものが EGF receptor である。乾癬は表皮の過増殖状態であることが示されており、その病態は創傷治癒過程に近似している。EGF receptor を活性化する因子は上皮細胞成長因子群、すなわち EGF family であり、表皮の増殖、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。EGF family のなかで表皮角化細胞自身が産生するものは TGF- $\alpha$ , HB-EGF, amphiregulin, epipegulin であり、これらの因子はお互いに産生を誘導するメカニズムを備えていることを報告した (Shirakata et al: JBC)。乾癬において TGF- $\alpha$  の産生が亢進していることが 1990 年に報告され、amphiregulin, HB-EGF の産生も更新していることが報告された。また、Epipegulin も同様に乾癬表皮において産生が亢進していることを見いだしている (Shirakata et al: JDS)。すなわち、乾癬発症機序における表皮説では EGF family-STAT3 の経路が異常亢進していることは容易に推察できることである。実際、角化細胞において EGF family が STAT3 を活性化し、表皮角化細胞の遊走に重要な役割を果たしていることを我々は報告している (Tokumaru et al: )。表皮における EGF ファミリーの発現については TGF- $\alpha$ , amphiregulin, HB-EGF, epipegulin が発現し、オートクリン因子として働くばかりでなく、

お互いの発現を増幅する機構を有し、少量の刺激ですべての EGF ファミリーの産生が角化細胞に於いて増強することを示してきた (Shirakata, JBC, 2000)。これらの研究の過程において HB-EGF は様々な刺激により急速に、かつ最も産生が誘導されることに気づいた。HB-EGF のノックアウトマウスは胎性致死となる場合が多く、表皮における特異的な機能を解析するためにケラチン 5 プロモーターを用いた cre/loxP システムにて表皮特異的 HB-EGF ノックアウトマウスを作製した。このマウスの皮膚は一見正常であったが、創傷治癒が遅延していることが明らかとなった (Shirakata, JCS, 2005)。では逆に表皮において HB-EGF を過剰に発現させると過増殖状態である乾癬に近いモデルが得られるのではないかと考え、K5 promoter で HB-EGF を強制発現するマウスの作製を試みたが、表皮特異的 HB-EGF 発現マウスは通常生まれず、体外受精にてわずかに 1 系統のみしか生まれてこず、系統維持ができなかった (白方未発表データ)。1 系統の HB-EGF 強発現マウスは表皮の肥厚が認められ、乾癬に近い病態を示すことが示唆されたが詳細な解析は不可能であった。そこで、出生後に HB-EGF を強発現するマウスを開発することにより乾癬モデルとしての可能性、ならびに乾癬発症機序における EGF family, 特に HB-EGF の関与について詳細に検討を加えることができるのではないかと考え本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化 STAT3 が乾癬病変の形成に重要な役割を果たすことから、STAT3 を活性化する EGF family の機能を明らかにすることにある。本質的に EGF family すべてが乾癬発症に重要な役割を果たしているのか、はたまた一つの因子のみが重要であるのかについては混沌としており、その解答を得るには至っていない。本研究においては EGF Family 因子である HB-EGF と Amphiregulin の遺伝子誘導マウスを開発し、乾癬のモデルマウスとして有用か否かについて明らかにする。同時に EGF family のなかで、HB-EGF と Amphiregulin のどちらが重要な役割を果たしているかについてマウスモデルで比較検討する。

## 3. 研究の方法

### Tet-On 遺伝子誘導発現ベクターの作製

過去の実験により、表皮特異的 HB-EGF 発現マウスは通常生まれず、体外受精にてわずかに 1 系統のみしか生まれてこず、系統維持ができなかった。これは着床に問題があると解釈している。そのため、遺伝子発現誘導マウスを用いる必要がある。現在タモキシフェン誘導型とドキシサイクリン誘導

型が主に用いられているが、リークが少ないドキシサイクリン誘導型を採用した。Clontech社製のTet-On Advanced Inducible Gene Expression Systemを用いてベクターを作製した。Tetシステム発現ベクターである pTRE-Tight vector に HB-EGF cDNA、Amphiregulin cDNA を組み込み、E. Coli にトランスフェクションを行った。アンピシリンにてセレクションを行い大量に増幅後精製を行い凍結保存した。

K5 promoter rtTA-Advanced vector の作製  
表皮特異的に遺伝子発現をさせるために K5 promoter による rtTA を発現するベクターを作製した。上記と同様に Clontech 社の pTet-on-Advanced vector を用いた。この vector は CMV プロモーターにより転写が制御されているため、表皮特異的に発現させるために K5 promoter と置換した。上記と同様に E. Coli にトランスフェクションを行い、アンピシリンにてセレクションを行い大量に増幅後精製を行い凍結保存した。

Tet-on による遺伝子発現の確認

表皮角化細胞に pTRE-Tight vector/HB-EGF, pTRE-Tight vector/Amphiregulin と K5/pTet-on-Advanced vector をそれぞれ co-transfection を行った。Transfection 後 24-48 時間後にドキシサイクリンを含む培養液に交換し、経時的に RNA を回収した。得られた RNA をテンプレートとして、real time PCR を行い、HB-EGF, Amphiregulin の遺伝子発現が誘導されているかを確認した。同様の方法にて線維芽細胞へトランスフェクションを行い、24-48 時間後にドキシサイクリンを含む培養液に交換し、経時的に RNA を回収した。得られた RNA をテンプレートとして、real time PCR を行い、HB-EGF, Amphiregulin の遺伝子発現が誘導されないことを (K5 promoter が作用しているかについて) 確認した。

トランスジェニックマウスの作製：  
pTRE/HB-EGF, pTRE/Amphiregulin, K5/pTet-on のプラスミドをマウス ES 細胞へマイクロインジェクションを行い、トランスジェニックマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

Tet システム発現ベクターである pTRE-Tight vector に遺伝子変異を入れた HB-EGF と Amphiregulin の soluble form と uncleavable form の cDNA を組み込み E. coli にトランスフェクションを行い増幅と精製を行った。表皮特異的に上記遺伝子を発現するために、K5 promoter による rtTA を発現するベクターを作製する必要がある。Clontech 社の pTet-on-Advanced vector の CMV プ

ロモーター領域を K5 プロモーターと置換したベクターを作製した。同様に E. coli にトランスフェクションを行い、アンピシリンにてセレクションを行い、増殖、精製した。これらのベクターをマウス ES 細胞にマイクロインジェクションを行い、トランスジェニックマウスを作製した。HB-EGF-sol, HB-EGF-uc, AREG-sol, AREG-uc のそれぞれについて 3-4 系統のマウスが生まれた。それぞれの genotype を PCR にて確認し、トランスジェニックマウスが作製できていることを確認した。C57/BL6 マウスと 3 回バッククロスを行い、系統維持を行った。マウスは順調に繁殖し、germline にのっていることを確認した。一方、K5-rtTA-TG マウスは 2 系統生まれ、genotype を PCR にて確認し、トランスジェニックマウスが作製できていることを確認した。現在までに 2 回 C57/BL6 マウスとバッククロスを行い、系統維持を行った。マウスは順調に繁殖し、germline にのっていることを確認した。さらに amphiregulin の c 末端を数塩基欠失させ、c 末端が核移行できない変異体を発現するトランスジェニックマウスを作製し、同様に genotype を PCR にて確認した。pTRE-HB-EGF-sol, HB-EGF-uc, AREG-sol, AREG-uc, AREG-deltaC マウスと K5-rtTA-TG マウスを各々交配し、テトラサイクリン誘導型表皮特異的 HB-EGF-sol, HB-EGF-uc, AREG-sol, AREG-uc, AREG-deltaC マウスが完成した。これらのマウスにドキシサイクリンを投与し、自然発症乾癬モデルマウスとなり得るか現在観察中である。また、創傷刺激を与えて乾癬病変が誘導できるか否かについての実験を準備中である。

#### 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 10 件)

1. Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K. : PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci* 50:53-60, 2008
2. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S,

- Hashimoto K.: The NF- $\kappa$ B, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol*. 20:901-9, 2008
3. Tohyama M, **Shirakata Y**, Sayama K, Hashimoto K. A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*. 159:981-4, 2008
  4. Nanba D, Inoue H, Shigemitsu Y, **Shirakata Y**, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. *J Cell Physiol*. 214:465-73, 2008
  5. **Shirakata Y**, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 45:69-72, 2007
  6. Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, Ideta R, Soma T, Yano K, Kawasaki C, Suzuki S, **Shirakata Y**, Hashimoto K, Kishimoto J: Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *J Invest Dermatol* 127(9):2106-15, 2007.
  7. Dai X, Sayama K, **Shirakata Y**, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Wang X, Hirakawa S, Tohyama M, Yamauchi T, Takashi K, Kagechika H, Hashimoto K. STAT5a/PPARgamma Pathway Regulates Involucrin Expression in Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol*. 127(7):1728-35, 2007
  8. Nagai H, Tokumaru S, Sayama K, **Shirakata Y**, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K: Suppressor of cytokine signaling 3 negative regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in platelet-derived growth factor-induced fibroblast migration. *J Dermatol*. 34:523-530, 2007
  9. Tohyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, Hanakawa Y, **Shirakata Y**, Dai X, Yang L, Tokumaru S, Nagai H, Hirakawa S, Sugai M, Hashimoto K: CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int Immunol* 19: 1095-1102, 2007
  10. Morita S, **Shirakata Y**, Shiraiishi A, Kadota Y, Hashimoto K, Higashiyama S,

Ohashi Y: Human corneal epithelial cell proliferation by epiregulin and its cross-induction by other EGF family members. *Molecular Vision* 13:2119-2128, 2007

[学会発表] (計 4件)

1. **Shirakata Y**, Yang L, et al : Keratinocyte-specific SOCS3 knockout mice show clinical phenotypes similar to human psoriasis. International Investigative Dermatology May 14-17, 2008. Kyoto
2. **Shirakata Y**, Yang L, Hashimoto K : A new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. 8<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology November 15-17, 2007. Yokohama
3. Dai X, **Shirakata Y**, et al : PPAR-gamma is involved in 1.25-dihydroxyvitamin D3-induced beta-defensin-3 and cathelicidin expression in normal keratinocyte. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 9-12, 2007. Los Angeles
4. Yang L, **Shirakata Y** et al : Development of a new skin equivalent model using de-epithelialized amnion membrane. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 9-12, 2007 Los Angeles

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 50226320

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者