

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790798
 研究課題名（和文） 自己炎症性疾患制御因子 *Ttc7* を中心とした高 IgE 値と皮膚炎発症についての研究
 研究課題名（英文） Research on development of hyper IgE and dermatitis through *Ttc7*, the regulatory factor of an autoinflammatory disease
 研究代表者
 三木田 直哉 (MIKITA NAOYA)
 和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
 研究者番号：60405462

研究成果の概要（和文）：当大学動物実験施設 SPF 領域の MHV 汚染もあり、*fsn* マウスを用いた実験は *in vivo*、*ex vivo* とも十分に行えず、満足な結果を得られなかった。*Fsn* マウスのバックグランドを BALB/c から C57BL/6 に代えるための戻し交配を進め、クリーナップも行ったが、明らかな表現型を見出すことはできなかった。一方、ヒト慢性皮膚炎患者の SNP 解析により、*Ttc7a* 遺伝子の特定の SNP ハプロタイプが、アトピー性皮膚炎よりもむしろ乾癬と弱いながら相関することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Sufficient results have not been obtained by *in vivo* and *ex vivo* experiments using *fsn* mice, owing to MHV pollution in the SPF areas of the Wakayama Medical University Animal Facilities. Backcrossing BALB/c-*fsn* mice with C57BL/6 mice has been performed without revealing any obvious phenotype. On the other hand, the SNP analyses on human chronic dermatitis have shown a weak but significant association of a particular haplotype of the *Ttc7a* gene with psoriasis, rather than atopic dermatitis.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1 6 0 0 0 0 0	0	1 6 0 0 0 0 0
2008 年度	1 3 0 0 0 0 0	3 9 0 0 0 0	1 6 9 0 0 0 0
2009 年度	5 0 0 0 0 0	1 5 0 0 0 0	6 5 0 0 0 0
年度			
年度			
総計	3 4 0 0 0 0 0	5 4 0 0 0 0	3 9 4 0 0 0 0

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：flaky *Ttc7* IgE 皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の病因から病態を解明することは、新たなる診断法、治療法の開発につながり重要な課題である。しかし、ヒト患者を対象にした研究では病因を含めた病態の解明は困難である。自己炎症性疾患モデ

ルマウスである flaky (*fsn*) マウスは、1)乳輪部周囲の落屑、2)全身の掻痒を伴う皮膚炎、3)IgE 高値を呈し、小児アトピー性皮膚炎と類似の徴候を示すが、この皮膚炎はリンパ球非依存性に、好中球やマクロファージなど骨髄系細胞の異常により発症することが知ら

れる。最近、fsn マウスの原因遺伝子として tetratricopeptide repeat domain 7 (Ttc7) の変異が報告されたが、その分子機能、病態への関与、生体での機能については不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、IgE 産生機構と皮膚炎発症機序及びその関連について、Ttc7 の機能解析を中心に解析することにより、fsn マウスの病因から見た病態解析のみならず、小児アトピー性皮膚炎の病因病態を解明することを目指す。

3. 研究の方法

まず fsn マウス由来 ES 細胞を樹立し、その細胞に正常 Ttc7 遺伝子を標的導入し、さらにその細胞から個体を作製することによって、fsn マウスの種々の表現型を正常化できるか検証する。次に Ttc7 変異がなぜ皮膚炎や高 IgE 値を呈するのか調べるため、マクロファージや樹状細胞などの細胞培養系を用いて、Ttc7 変異がサイトカイン分泌や抗原貪食、分解、提示能等の機能にどのような影響を与えるか、分子生物学的に検討する。

さらに、Ttc7 遺伝子変異がヒトのアトピー性皮膚炎に実際に関与しないか、アトピー性皮膚炎と並んで代表的な慢性皮膚炎症疾患である乾癬患者と健常者をコントロールに SNP 解析を行う。

4. 研究成果

まず flaky (Balb/c-fsn) マウスを当大学動物実験施設に導入し、ヘテロで維持することに成功したが、SPF における MHV による汚染が発覚し、皮膚炎自然発症への影響も懸念されたため、2008年度に *in vivo* での実験、マウス由来 ES 細胞 (fsn/fsn, fsn+/+, +/+) の樹立は一時中断し、fsn/+ マウスを凍結卵で保存した。そこで、ES 細胞作製のバックアップと考えていた C57BL/6-Tg マウス作成の準備として、fsn マウスのバックグラウンドを BALB/c から C57BL/6 に代えるための戻し交配を進めた。6代交配したところで、当大学動物実験施設 SPF 領域のクリーンアップに合わせて fsn/+ マウスを凍結卵で一旦保存した。2009年にクリーンアップが完了しその後は汚染が認められないことを確認して、凍結卵を起し実験を再開した。さらに C57BL/6 への戻し交配を続けると同時に、ヘテロ同士の交配によりホモ化を行ったが、fsn/fsn の子供が育たず、ホモマウスの解析はできていない。Fsn/+ マウスについて、高齢になるまで皮膚炎の発症、抗核抗体や高 IgE 血症の有無を検索したが、異

常は認められなかった。また胎児、新生児の解析も試みたが、胎児皮膚の形成過程においては肉眼的にも組織学的にも明らかな異常を認めなかった。BALB/c-fsn/fsn マウスには皮膚炎以外にも貧血や免疫異常があることが知られ、親である C57BL/6-fsn/+ マウスにも何らかの異常がある可能性があるが、成長、生殖には問題なく、下痢や異常死などの目に見える異常は見当たらなかった。それ以上の解析は行っておらず、fsn/fsn の子供が育たなかったことの原因は不明である。

一方、*in vitro* の解析のため、Ttc7 遺伝子の全長を組み込んだ発現ベクターを作製し、RAW264.7 細胞への遺伝子導入を試みているが、発現効率が悪く、期待したような変化は見られていない。代わりに、*ex vivo* の解析として、骨髄由来樹状細胞における機能変化を検討した。Fsn/fsn マウス骨髄由来細胞では、fsn/+ マウス骨髄由来細胞に比べ、GM-CSF に反応した細胞増殖がやや劣るが、生成する樹状細胞の成熟度には差を認めなかった。また予想に反し、未成熟状態での FITC デキストラン取り込み能において、fsn/fsn 樹状細胞の方が fsn/+ 樹状細胞に劣るという結果を得た。さらに、flaky マウス (fsn/fsn, fsn/+) リンパ節あるいは骨髄由来樹状細胞を用いて、OVA タンパク・ペプチド抗原の取り込み、OT-I, II 細胞への提示能を正常マウスと比較検討したが、一定した結果は得られなかった。当大学動物実験施設 SPF 領域の MHV 汚染が長引き、その影響もあるのかもしれない。

一方、当大学病院皮膚科外来通院中のアトピー性皮膚炎患者と乾癬患者、さらに健常コントロールそれぞれ 30 例弱について、fsn 遺伝子のヒトホモログである Ttc7a と Ttc7b 遺伝子の複数の SNP (新規のものを含む) ハプロタイプについて、疾患発症との相関を検討した。その結果、Ttc7a 遺伝子の特定の SNP ハプロタイプが乾癬と弱いながら相関することを見出した。乾癬に対して弱い相関を持つ SNP の存在が明らかとなったことから、C57BL/6-flaky マウスが乾癬のモデルマウスとしてふさわしい可能性も考えられ、C57BL/6 マウスとの戻し交配を続けているが、前述のようにホモがうまく育たず、今後ヘテロで表現型が見られるようになるのか、現在のところ結論は出ていない。

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 4 件)

1. 金澤伸雄、三木田直哉、李洪錦、中谷友

- 美、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実. 日本人のハンセン病発症における細菌センサー分子TLR2・DC-SIGN・NOD1・NOD2の遺伝子多型の関与. 日本ハンセン病学会雑誌 2009; 78: 255-261. 査読無
2. Mikita N, Kanazawa N, Yoshimasu T, Ikeda T, Li HJ, Yamamoto Y, Furukawa F. The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. *Clinical Developmental Immunology* 2009; 673952. 査読有
 3. Mikita N, Kanazawa N, Ozaki M, Kosaka M, Ishi N, Nishimura H, Furukawa F. No involvement of non-synonymous TLR2 polymorphisms in Japanese leprosy patients. *Journal of Dermatological Science* 2009; 54: 48-49. 査読有
 4. Yoshimasu T, Kanazawa N, Mikita N, Furukawa F. The expression of histamine receptors in skin lesions of MRL/MP-lpr/lpr mice. *Open Dermatology Journal* 2008; 2: 83-86. 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
1. 三木田直哉. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮疹に対する UVA1 照射の効果. 第 1 回日本研究皮膚科学会きさらぎ塾 2010 年 2 月 13 日-14 日 沖縄県読谷村
 2. Furukawa F, Yamamoto Y, Mikita N, Kanazawa N, Yoshimasu T, Uede M. The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. The 4th Asian Congress on Autoimmunity 2009 年 9 月 11 日-13 日 シンガポール
 3. Yoshimasu T, Mikita N, Kanazawa N, Furukawa F. The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. The 69th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology 2009 年 5 月 6 日-9 日 モントリオール
 4. 三木田直哉, 李洪錦, 石黒真理子, 池田高治, 吉益隆, 金澤伸雄, 山本有紀, 古川福実. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮疹に対する UVA1 照射の効果. 第 108 回日本皮膚科学会総会 2009 年 4 月 24 日-26 日 福岡
 5. 三木田直哉, 李洪錦, 石黒真理子, 池田高治, 吉益隆, 金澤伸雄, 山本有紀, 古川福実. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮疹に対する UVA1 照射の効果. 第 412 回日本皮膚科学会大阪地方会 2009 年 3 月 21 日-26 日 大阪
 6. 金澤伸雄, 三木田直哉, 李洪錦, 中谷友美, 尾崎元昭, 小坂眞紀, 石井則久, 古川福実. 日本のハンセン病における細菌センサー分子 TLR2, DC-SIGN, NOD1, and NOD2 の遺伝子的関与. 第 38 回日本免疫学会総会・学術大会 2008 年 12 月 1 日-3 日 京都
 7. 三木田直哉, 李洪錦, 乾匡範, 池田高治, 吉益隆, 金澤伸雄, 古川福実. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮膚症に対する紫外線 UVA-1 治療の予防的効果の検討. 第 38 回日本免疫学会総会・学術大会 2008 年 12 月 1 日-3 日 京都
 8. 三木田直哉, 李洪錦, 池田高治, 吉益隆, 金澤伸雄, 古川福実. MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮膚症に対する紫外線 UVA-1 治療の予防的効果の検討. 第 58 回日本アレルギー学会秋期学術大会 2008 年 11 月 27 日-29 日 東京
 9. 三木田直哉, 乾匡範, 金澤伸雄, 西村泰行, 古川福実. アトピー性皮膚炎患者及び乾癬患者における Tetratricopeptide repeat domain 7A 遺伝子多型の検討. 第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会 2008 年 11 月 7 日-9 日 大阪
 10. Kanazawa N, Mikita N, Li H, Nakatani N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Furukawa F. Genetic involvement of bacterial sensor molecules, TLR2, DC-SIGN, NOD1 and NOD2, in Japanese leprosy. The 10th International Symposium on Dendritic Cells 2008 年 10 月 1 日-5 日 神戸
 11. 金澤伸雄, 三木田直哉, 尾崎元昭, 小坂眞紀, 石井則久, 古川福実. 細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD2 の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第 20 回日本アレルギー学会春期臨床大会 2008 年 6 月 12 日-14 日 東京
 12. 金澤伸雄, 三木田直哉, 尾崎元昭, 小坂眞紀, 石井則久, 西村泰行, 古川福実. 細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD2 の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 21 日-23 日 熊本
 13. Mikita N, Inui M, Kanazawa N, Nishimura H, Furukawa F. Analysis of the Tetratricopeptide repeat domain 7 gene polymorphisms in Japanese psoriasis and atopic dermatitis patients. *International Investigative Dermatology* 2008 2008 年 5 月 14 日-17 日 京都
 14. Kanazawa N, Mikita N, Nakatani N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H,

- Furukawa F. Genetic involvement of bacterial sensor molecules, TLR2, DC-SIGN and NOD2, in Hansen's disease. International Investigative Dermatology 2008 2008年5月14日-17日 京都
15. Kanazawa N, Mikita N, Furukawa F, Nishimura H, Kawano S, Matsunaka M, Koike M, Sugino H. Familial Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome): a novel hereditary periodic fever with partial lipodystrophy and a search for LPIN gene mutations. The Fifth International Congress on Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases 2008 年4月4日-8日 ローマ (イタリア)
 16. Kanazawa N, Mikita N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F. Analysis of TLR2 gene polymorphisms in Hansen's disease. 第37回日本免疫学会総会・学術大会 2007年11月20日-22日 東京
 17. Kanazawa N, Mikita N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F. Analysis of TLR2 gene polymorphisms in Hansen's disease. The 4th World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders 2007年10月19日-20日 東京
 18. 三木田直哉、金澤伸雄、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実. ハンセン病における TLR2 遺伝子変異の検索. 第401回日本皮膚科学会大阪地方会和歌山地区会 2007年5月26日 和歌山
 19. 金澤伸雄、三木田直哉、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実. ハンセン病における TLR2 遺伝子変異の検索. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月17日-19日 横浜
 20. 三木田直哉、金澤伸雄、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実. ハンセン病における TLR2 遺伝子変異の検索. 第32回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2007年4月18日-20日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木田 直哉 (MIKITA NAOYA)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60405462