

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08770

研究課題名(和文) 新規尋常性白斑モデルマウスの作製と白斑発症機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of a novel mouse model of vitiligo

研究代表者

大沢 匡毅 (Osawa, Masatake)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10344029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性白斑はメラノサイトが消失してしまうことにより皮膚に白斑が形成される疾患であり、白斑という外見上の病変によって患者のQOLが著しく低下してしまうことが問題である。尋常性白斑症については病態を再現する有効な研究モデル系が確立されておらず、病態の解明やその有効な治療法の開発が遅れている。そこで、本研究課題では、尋常性白斑の病態を再現することができる新規白斑モデルマウスを作製することを目的に研究を行なった。CRISPR/Cas9システムを活用して遺伝子編集技術によって新たな白斑モデルマウスを作製することができた。本マウスは、尋常性白斑の病態の解明に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尋常性白斑は人口の1~2%が発症する発症率の高い皮膚疾患である。皮膚に白斑が形成されることが主症状であり、外見上の病変によって患者の生活の質が著しく低下してしまう。このような白斑は、皮膚に色をつける役割をしているメラノサイトが皮膚から消失してしまうことによって起こる。しかし、なぜメラノサイトが消失してしまうのか、その原因については十分に解明されていない。本研究では、ヒトの尋常性白斑症の病態を再現することができるモデルマウスを作製した。作製されたモデルマウスを用いて白斑が発症する仕組みを解明することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：Vitiligo is an autoimmune disease in which melanocytes are destructed by autoreactive T cells, forming patches of unpigmented skin. Here, using CRISPR/Cas9-mediated gene editing technology, we generated a novel mouse model of vitiligo. Our proof-of-concept study clearly shows robust ability of recapitulating the pathogenesis of the disease. This mouse model will provide a cue to elucidate pathological basis of human vitiligo.

研究分野：皮膚科学、発生生物学、実験動物

キーワード：尋常性白斑症 メラノサイト 疾患モデル 自己免疫疾患 実験動物

1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑症はメラノサイトが消失してしまうことにより皮膚に白斑が形成される皮膚疾患であり、人口の1~2%が発症する。白斑という外見上の病変が生じてしまうために、患者のQOLが低下してしまうことが問題になっている。尋常性白斑の病態発症には、環境的要因、メラノサイトの異常、および免疫的な素因が複合的に関与していると考えられている。しかし、このような高次元の生体反応を再現する有効な研究モデル系が確立されておらず、病態の解明やその有効な治療法の開発が遅れている。このような高次元な生体反応によって引き起こされる病態を理解するためには、個体レベルで病態の解析を行うことが必須となる。このような認識のもと、これまでに尋常性白斑モデルマウスが作製され、それらを活用することによって病態の解析が進められている。しかし、これらのモデルマウスには幾つかの欠点があり、ヒトの病態を忠実に再現することができていない。今後、ヒト尋常性白斑症の病態を忠実に再現することができる新たなモデルマウスが作製されることによって、細胞レベルや分子レベルでの病態機序の理解が進むものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、尋常性白斑を発症する新規な疾患モデルマウスを作製することともに、モデルマウスを用いて白斑が発症する仕組みを解析することによって、病態の細胞的および分子的基盤を解明することを目的に行う。これにより、治療のための標的を同定し、新規治療法創出のための道筋を立てることが本研究の最終目標である。そのための第一段階として、本研究課題では、病態を再現することができる新規白斑モデルマウスを作製するとともに、作製されたモデルマウスに対し CRISPR/Cas9 システムを用いてさらに遺伝子改変を施すことにより、病態発症に中心的役割を果たしている細胞系譜や機能分子を同定することを目的に研究を行う

3. 研究の方法

3-1 方法の概要

既にいくつかの白斑モデルマウスが作製されているが、既存のモデルマウスには以下に示すようないくつかの問題点がある。本研究では以下の問題点を改善した白斑モデルマウスを作製する。

- ① TCR トランスジェニックマウス-白斑モデルマウスでは、メラノサイト反応性の免疫反応を効率的に誘導するために、メラノサイトを特異的に認識する TCR α/β 鎖 (Pmel 抗原認識 TCR α/β 鎖) を T 細胞に強制発現させた TCR トランスジェニックマウス (Pmel マウス) が利用されている。しかし、このようなマウスでは T 細胞の発生過程に異常が生じることから、元来の T 細胞の生理的作用を反映していない可能性がある。本研究では、T 細胞の発生が完了した後にメラノサイトを認識する TCR をテトラサイクリン誘導性に発現させることができるマウスを作製することで、この問題を解決する。
- ② K14-SCF トランスジェニックマウス-ヒトの尋常性白斑症では皮膚上皮に存在するメラノサイトが消失することが白斑の原因となるが、野生型のマウスでは皮膚上皮にメラノサイトが存在しておらず、ヒトの病態を再現することが困難である。そこで、既存の尋常性白斑症モデルマウスでは皮膚上皮にメラノサイトを持つ K14-SCF トランスジェニックマウスが活用されている。しかし、このマウスは多コピーのトランスジーンを保持しているため非生理的な量の SCF を皮膚上皮に発現しており、これによって皮膚中に存在する肥満細胞や Th17 細胞、NK 細胞の数が野生型と比して増加していることが示されており、非生理的な免疫反応が増強される可能性が指摘されている。本研究では、1 コピーの K14-SCF 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作製することにより、この問題を解決する。
- ③ ヘアレスマウス-マウスの皮膚は体毛に覆われており、白斑を観察するためには剃毛や脱毛をしなければならない。剃毛や脱毛は皮膚炎を誘発する可能性があるため、白斑モデルマウスではヘアレスマウス (HRtm) が使われることがある。しかし、ヘアレスマウスは胸腺の発生異常が起こるため免疫学的な実験に使用するには適さないと考えられる。そこで、本研究では毛包の毛球部のみでヘアレス変異遺伝子 (*Dlx3-TDO*) を発現するトランスジェニックマウスを作製し、無毛化を行い、T 細胞の分化への影響を回避する。

3-2 ノックインコンストラクトおよび Cas9/gRNA 発現ベクターの作製

DNA 組換え実験は、岐阜大学組換え DNA 実験審査委員会の承認を得て行った。メラノサイト抗原 (Pmel) を認識する TCR α/β 鎖を T 細胞に発現させるために、テトラサイクリン応答性に TCR α/β 鎖を発現するカセットを *CD2* 遺伝子座にノックインするためのノックインドナーベクターを作製した。また、同様に、K14-SCF カセットを *Rosa26* 遺伝子座にノックインする

ためのドナーベクター、および *Krt35* 遺伝子座に *Dlx3-TDO* をノックインするためのドナーベクターを作製した。Cas9 タンパク質と *CD2*, *Rosa26*, および *Krt35* 遺伝子座のそれぞれを認識する gRNA を共発現するベクターを作製した。

3-3 ノックイン ES 細胞の作製

当研究室で樹立した Enhanced Pluripotent Stem (EPS) 細胞に対し、上記のようにして作製したノックインドナーベクターと Cas9/gRNA 発現ベクターをリポフェクション法によってトランスフェクションを行った。トランスフェクションされた細胞をピューロマイシン処理によって選別し、生存した EPS 細胞をあらかじめフィーダー細胞を播種した 10cm ディッシュ中で培養を行い EPS 細胞のコロニー形成を待った。EPS 細胞のコロニーをそれぞれピックアップし、Accutase 処理によって細胞を解離させ、その一部の細胞を 96 穴プレート中で培養を継続した。残りの一部の細胞からゲノム DNA を抽出した後、得られた DNA を用いて PCR ジェノタイピングを行うことによって、ノックインドナーコンストラクトがゲノム上の正しい遺伝子座にノックインされた EPS 細胞クローンを同定した。

3-4 ノックインマウスの作製

CD2, *Rosa26*, および *Krt35* 遺伝子座のそれぞれに正しくノックインされた EPS 細胞について、それぞれをマウス 8 細胞胚中へマイクロインジェクションを行った。マイクロインジェクションを行った 8 細胞胚を偽妊娠マウスの卵管中に移植し、EPS 細胞由来の 3 種類のノックインマウス (*Cd2*^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}, *Rosa*^{Krt14-SCF/+}, *Krt35*^{Dlx3-DTO/+}) を出産させ得た。これらの F0 マウスは C57BL/6 マウスと 2 世代の戻し交配を行った。戻し交配後にこれらのノックインマウス間で交配を行い、最終的に *Cd2*^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}; *Rosa*^{Krt14-SCF/+}; *Krt35*^{Dlx3-DTO/+} トリプルノックインマウスを作製した。

3-5 マウスに対する白斑誘導処理

マウスに対して白斑化を誘導するための手段として幾つかの方法が既に報告されている。本研究では、van den Boorn らの方法に従い、マウスの皮膚にモノベンゼンクリームを塗布することによって白斑化の誘導を試みた。このために、20%モノベンゼンクリーム (モノベンゼンクリーム (最終濃度が 20%になるようにモノベンゼンをワセリンに融解したもの) をマウスの背部に 30 日間にわたり毎日塗布し、その後の皮膚色の変化を観察した。

4. 研究成果

4-1 *Rosa*^{Krt14-SCF/+} ノックインマウスの作製

ヒト型皮膚モデルマウスとして *Krt14-SCF* (*Kit1*) トランスジェクマウスが広く用いられている。しかし、既存の *Krt14-SCF* (*Kit1*) トランスジェクマウスには多数のコピーのトランスジーンが挿入されており、過剰な免疫反応が誘導される可能性が指摘されている。このような問題点を解消するために、*Krt14* 遺伝子座のタンパク質コーディング領域の下流に 1 コピーの *SCF* (*Kit1*) 遺伝子をだけノックイン (*Krt14*^{P2A-Kit1}) することによって、*Krt14* 遺伝子の発現制御支配下で *SCF* 遺伝子を発現するノックインマウスを作製した。作製されたマウスは誕生直後から皮膚が黒色化し、*Krt14-SCF* トランスジェクマウスと同様な表現型を再現することができた。しかし、本マウスは生後 21 日目までに全てが死亡してしまうことがわかった。死亡の原因を明らかにするために、死亡したマウスの解剖したところ気管や食道、胃の上皮にメラノサイトが集積していることが認められ、このようなメラノサイトの集積が致死的に働いている可能性が考えられた。実際、Body Map 等の遺伝子発現データベースを調べたところ、これらの場所に *Krt14* が発現していることが確認されたことか

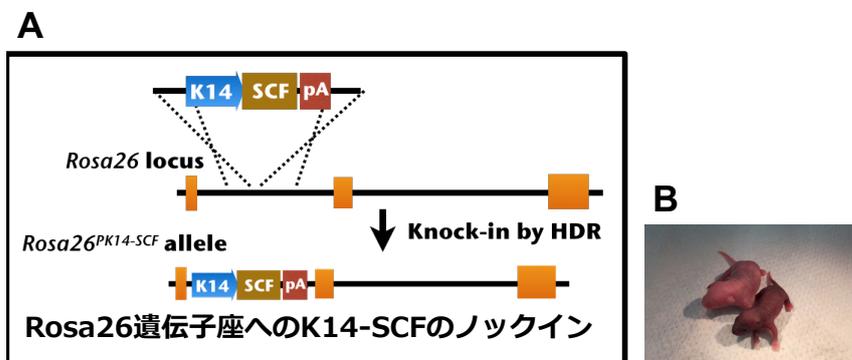


図1 *Rosa26*遺伝子座に*Krt14-SCF*コンストラクトを1コピーだけノックインしたマウスの作製

A. ノックインマウス作製のストラテジー。

B. 誕生した*Rosa26*^{krt14-SCF}マウスの表現型

わかった。死亡の原因を明らかにするために、死亡したマウスの解剖したところ気管や食道、胃の上皮にメラノサイトが集積していることが認められ、このようなメラノサイトの集積が致死的に働いている可能性が考えられた。実際、Body Map 等の遺伝子発現データベースを調べたところ、これらの場所に *Krt14* が発現していることが確認されたことか

ら、内在性の *Krt14* 遺伝子の発現制御機構によって SCF が発現することによってメラノサイトの異所的な集積が誘導されたと考えられた。一方、*Krt14-SCF* トランスジェクマウスでは、*Krt14^{P2A-Krt1}* ノックインマウスよりも強く皮膚が黒色化するにも関わらず、皮膚上皮以外の場所にメラノサイトが集積することは認められない。このことから、*Krt14-SCF* トランスジェクマウスの作製に用いた *Krt14* プロモーターには皮膚上皮以外の場所で遺伝子発現をするためのエンハンサーエレメントが含まれていないと考えられた。そこで、皮膚上皮に限定して SCF を強制発現させるために *Krt14-SCF* トランスジェクマウスの作製に用いたコンストラクト (*hK14-SCF-pA*) を *Rosa26* 遺伝子座 (遺伝子の不活性化が起こらない染色体部位) に 1 コピーだけノックインしたマウスを作製した (図 1)。

4-2 *Krt35^{Dlx3-TDO}* ノックインマウスの作製

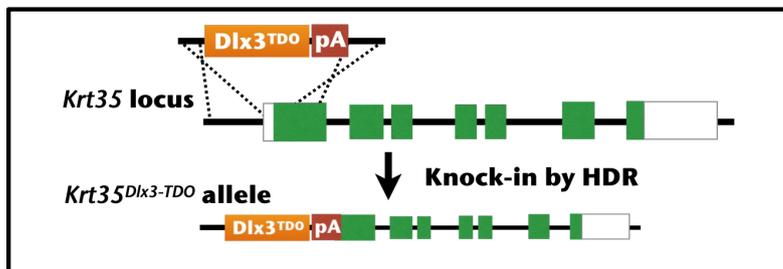


図2 *Krt31* 遺伝子座にヘアレス変異体 (*Dlx3-TDO*) をノックインしたマウス作製の戦略

皮膚の白斑形成には UV 照射や薬剤暴露によって生じるメラノサイトのストレス反応が関与していると考えられる。したがって、尋常性白斑症モデルマウスではこれらの外レス刺激を経皮的に与えることが必要になる。このような経皮的な刺激を容易化するために、ヘアレスマウスが白斑症モデルマウスとして利用されている。しかし、一般的なヘアレスマウスは、無毛化に加え、上皮形成に広く異常があり、特に胸腺上皮の異常によって正常な T 細胞分化が阻害されている。ヘアレスマウスは *Dlx3* 遺伝子の変異によって生じることがわかっている。ヒトでは *Dlx3* 遺伝子のドミナントネガティブ変異によって毛髪歯骨症候群 (TDO) が生じることが明らかになっている。そこで、本研究ではヘアレス遺伝子 (*Dlx3-TDO* 変異体) を毛包の内毛根鞘だけに特異的に発現させることによって、上皮形成に対するヘアレス変異体の異常を避け、無毛化を引き起こすマウスを作製することを試みた (図 2)。

内毛根鞘特異的にヘアレス遺伝子を発現させるために *Krt35* 遺伝子座の第 1 エキシソンの翻訳開始点に *Dlx3-TDO* 変異体遺伝子をノックインした。そのためにドナーコンストラクトを作製し、CRISPR/Cas9 法を用いてノックインされた ES 細胞株を樹立することができた。樹立した ES 細胞からノックインマウスを作製することができた。

4-3 *Cd2^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}* ノックインマウスの作製

マウスにおいてメラノサイト特異的な免疫反応を誘導するために、CD2 陽性 T 細胞においてテトラサイクリン誘導性に *Pme1* (メラノサイト抗原) を認識する TCR α 鎖および β 鎖を発現するノックインマウスを作製することを試みた。このために、*Cd2* 遺伝子座の第 1 エキシソンの翻訳開始点に、テトラサイクリン応答性トランスアクティベーター (TetON3G) およびテトラサイクリン誘導性 (TRE3G) に TCR α / β 遺伝子を発現するコンストラクトを作製した。作製したノックインドナーベクターを用いて CRISPR/Cas9 法によって ES 細胞にノックインを行なった。ノックインされた ES 細胞からノックインマウスを作製することができた (図 3)。

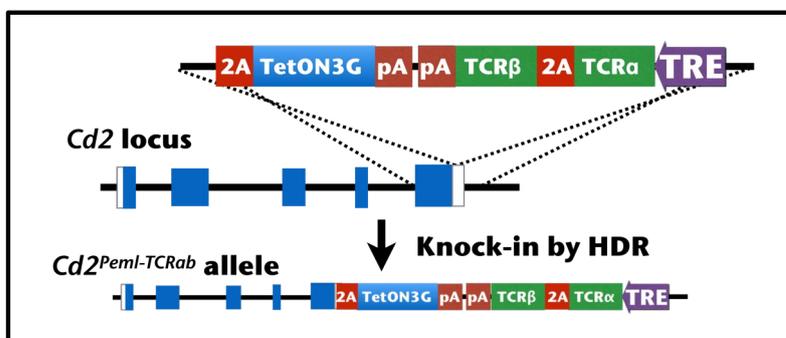


図3 *Cd2* 遺伝子座にテトラサイクリン応答性に *Pme1* 反応性の TCR α / β 遺伝子を発現することができるコンストラクトをノックインしたマウスを作製するための戦略

4-5. $Cd2^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}; Rosa^{Krt14-SCF/+}; Krt35^{Dlx3-DT0/+}$ トリプルノックインマウスを作製と尋常性白斑症モデルマウスとしての有効性の評価

$Rosa^{Krt14-SCF/+}$ ノックインマウス、 $Krt35^{Dlx3-TD0}$ ノックインマウス、および $Cd2^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}$ ノックインマウスの3種類のマウスを交配させることによって最終的に $Cd2^{P2A-TetON3G-TRE-Pme1TCR/+}; Rosa^{Krt14-SCF/+}; Krt35^{Dlx3-DT0/+}$ トリプルノックインマウスを得ることができた。得られたトリプルノックインマウスは、当初の期待通り、無毛で有色の表皮が観察された(図4A)。また、皮膚の免疫組織染色解析によって、このマウスの皮膚上皮中にメラノサイトが存在していることが確認された(図4B)。そこで、本マウスの尋常性白斑症モデルとしての有用性を検証するために、皮膚に対するモノベンゼン刺激によって白斑形成が誘導されるかを調べた。その結果、背部の皮膚に対するモノベンゼンクリーム塗布後から30-40日目ごろから皮膚の白斑化が観察され、モノベンゼン塗布をやめた後も皮膚の白斑化が進展していくことが観察された。白斑化した皮膚を組織免疫染色法で観察したところ、白斑部位ではメラノサイトが消失していることが確認され、また、多数のCD45陽性細胞が白斑部位の皮膚真皮層に浸潤していることが観察された。

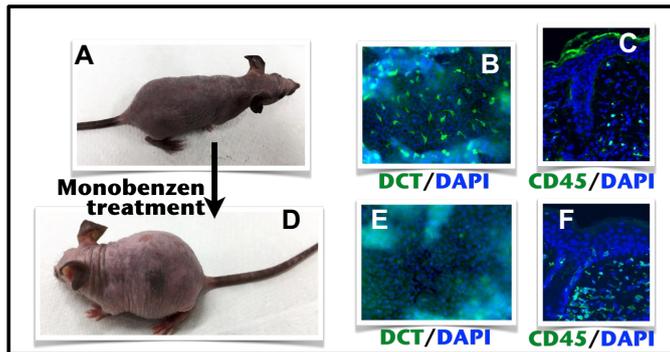


図4 トリプルノックインマウスの表現型と白斑誘導性の評価

A. トリプルノックインマウスの皮膚の表現型。無毛で皮膚がメラニン色素で有色化していることが確認された。B. トリプルノックインマウスの皮膚の組織免疫染色像。多数のDct陽性メラノサイトが皮膚上皮存在していることが確認された。D-F. モノベンゼン処理後のマウス皮膚の白斑化と白斑部位へのCD45陽性細胞の浸潤。モノベンゼン処理50日目のマウスの皮膚では白斑化の拡大がみとめられた(D)。また、白斑部位ではDct陽性のメラノサイトが消失し(E)、CD45陽性細胞が浸潤していることが観察された(F)。

本研究によって作製したマウスがモノベンゼン処理によって尋常性白斑症様の表現型を示すことが確認された。今後は、より精密な解析を行い、本マウスの尋常性白斑症モデルとしての有効性について評価を行う。また、本マウスにさらに遺伝子改変を加えることによって、白斑化に関する分子的メカニズムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Toshio, Shiraishi Akira, Osawa Masatake	4. 巻 88
2. 論文標題 Upregulated nicotinic ACh receptor signaling contributes to intestinal stem cell function through activation of Hippo and Notch signaling pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106984 ~ 106984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Otsuka Hiroki, Kimura Takeshi, Ago Yasuhiko, Nakama Mina, Aoyama Yuka, Abdelkreem Elsayed, Matsumoto Hideki, Ohnishi Hidenori, Sasai Hideo, Osawa Masatake, Yamaguchi Seiji, Mitchell Grant A., Fukao Toshiyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Deficiency of 3 hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 960 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Otsuka Hiroki, Kimura Takeshi, Ago Yasuhiko, Nakama Mina, Aoyama Yuka, Abdelkreem Elsayed, Matsumoto Hideki, Ohnishi Hidenori, Sasai Hideo, Osawa Masatake, Yamaguchi Seiji, Mitchell Grant A., Fukao Toshiyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Deficiency of 3 hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakuda Kyosuke, Niwa Ayumi, Honda Ryo, Yamaguchi Kei-ichi, Tomita Hiroyuki, Nojebuzzaman Md, Hara Akira, Goto Yuji, Osawa Masatake, Kuwata Kazuo	4. 巻 165
2. 論文標題 A DISC1 point mutation promotes oligomerization and impairs information processing in a mouse model of schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 369 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masatake Osawa, Morisheda, Nasrin, Ossama Salem, Xujuun Han
2. 発表標題 A novel tool for melanocyte lineage-specific inducible gene manipulation
3. 学会等名 24th The International Pigment Cell Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	矢澤 重信 (Yazawa Shigenobu) (30392153)	岐阜大学・大学院医学系研究科・助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------