

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659540

研究課題名（和文） 皮膚に存在するいかなる細胞も培養可能にする挑戦的戦略

研究課題名（英文） Challenging method allowing all skin cells to be cultured

研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMUERA DAISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60196334

研究成果の概要(和文):皮膚にあるいかなる細胞も培養でふやすことができる方法ができれば、それはいかなる研究にも発展する画期的な萌芽システムになる。今回の研究では遺伝子に、テトラサイクリン誘導可能なプロモーターや Cre リコンビナーゼで切断される LoxP 配列を加えることにより、1) テトラサイクリン投与により初めて発現が誘導され、かつ、2) タモキシフェン投与で破壊されるような MCV-Large T 抗原遺伝子を有する遺伝子改変マウス作成を試みた。

研究成果の概要(英文): If we can culture all cells in the skin in vitro, it must be a potential system which can develop to any studies. In this study, we tried to add tetracycline-induced promoter and LoxP sequence which is cleaved by Cre recombinase to the vector DNA and generate a transgenic mouse with MCV-Large T gene which is induced by treatment of tetracycline and is abolished by treatment of tamoxifen.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：メルケル細胞癌、遺伝子、トランスジェニックマウス、テトラサイクリン、タモキシフェン、培養細胞

1. 研究開始当初の背景

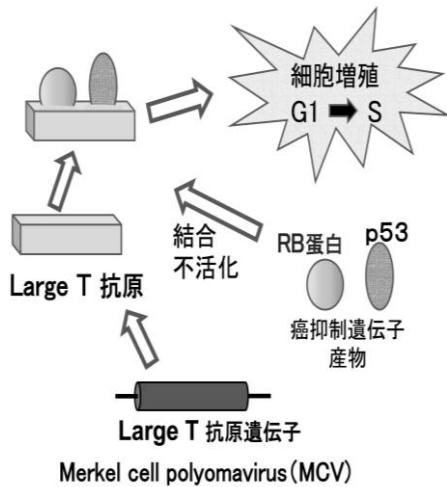
特定の細胞の研究にもっとも必要な技術のひとつに細胞培養があり、その細胞を取り出し比較的単純な環境で増やし維持することが可能になる。もし、皮膚に存在するいかなる細胞も細胞培養でふやすことができる方法論、あるいは皮膚に存在するすべての細胞をとりだすことができるライブラリーを作ることができれば、それはいかなる研究にも発展する画期的な萌芽システムになるこ

とは間違いない。

2008年、メルケル細胞癌から新しいポリオマーウイルスが発見されメルケル細胞ポリオマーウイルス Merkel cell

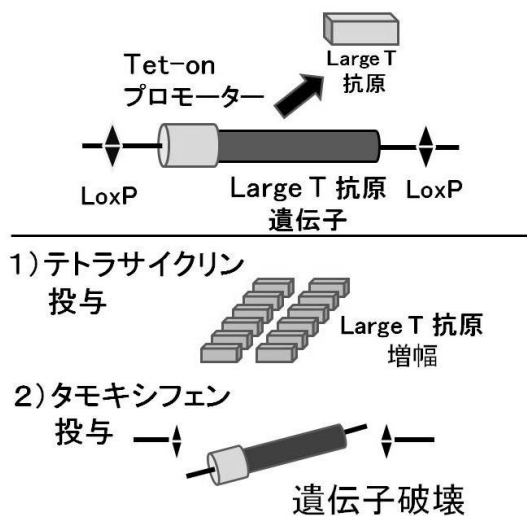
Polyomavirus; MCV) と名付けられた。それ以後、有棘細胞癌、基底細胞癌はもとより、疣贅や皮膚良性腫瘍にも見付きり始め、皮膚腫瘍に MCV が強く関連することが明らかになってきた。一般に、ポリオマーウイルスは細胞の増殖に関連するウイルスで、細胞に感染するとそこから翻訳される Large T 抗原が

癌抑制遺伝子産物である RB 蛋白と p53 に結合してその機能を抑制することにより細胞が不死化し増殖し続けるようになる（下図）。



2. 研究の目的

今回の研究では遺伝子に、テトラサイクリン誘導可能なプロモーターや Cre リコンビナーゼで切断される LoxP 配列を加えることにより、1) テトラサイクリン投与により初めて発現が誘導され、かつ、2) タモキシフェン投与で破壊されるような MCV-Large T 抗原遺伝子を有する遺伝子改変マウスを作成することにある（下図）。



3. 研究の方法

メルケル細胞ポリオマーウイルス (MCV) large T 抗原の発現ベクターの構築：TRE を有しテトラサイクリンにより誘導可能なプロモーターを有するベクター、PCR で増幅した MCV の Large T 抗原遺伝子を組む。次に、そのベクターのポリリンカーサイトの制限酵素部位を利用し、合成した LoxP 配列を両端に組み込み、培養表皮細胞と線維芽細胞に実際にそのベクターを導入し、遺伝子、蛋白レベルで Large T 抗原の発現を確認する。同様に、Cre リコンビナーゼの発現ベクターも導入して LoxP 配列の正常の働きを培養細胞で確認する。MCV-large T 抗原発現トランスジェニック (TG) マウスの作成：MCV-Large T 抗原発現ベクターをプラスミドの部分を取り取りとるため、制限酵素で線状化し、精製する。委託施設に DNA を送り TG マウスの前核インジェクションを行う。得られたトランスジェニックマウス、約 100 匹の DNA を弘前大学に送っていただく。マウスのテイル DNA の PCR にて遺伝子挿入を確認する。さらに、陽性であったマウスを弘前大学に輸送。最後に、それらのマウスの皮膚から遺伝子レベル、蛋白レベルで発現を確認する。

4. 研究成果

本研究で行う本法は、すでに生体に存在するときから皮膚に親和性のある MCV-large T 抗原が不活化された状態で備わっているという独創的な発想に基づく。本遺伝子改変マウスでは、MCV-large T 抗原遺伝子が Tet-on システムのプロモーターの支配下にあるため、通常の状態では厳密に不活化されている。しかし、一旦テトラサイクリンが投与されると MCV-large T 抗原が細胞内で産生され、いかなる細胞でも比較的簡単なかつ同じ条件で培養可能である。また、テトラサイクリン

を除き増殖を中止することもできる。さらに、MCV-Large T 抗原遺伝子が LoxP 配列には含まれているので、遺伝子に問題あればタモキシフェンで Cre リコンビナーゼ活性が誘導され、MCV-largeT 抗原遺伝子を破壊できる安全なシステムも有している。さらに、本研究のチャレンジ性は、皮膚に存在する新しい細胞を同定できる点である。一つの細胞からも増殖できるため、細胞のクローン化が可能になる。皮膚からシングルセルをとり増殖させ皮膚由来細胞のライブラリーの構築が可能になる。そこでシングル細胞から、特異な形態を示すもの、特定の遺伝子や蛋白の発現のあるもの、遊走や接着など特定の機能を持つ細胞などを選択すれば、いままで同定されていなかった細胞の発見、あるいはいままで培養できていなかった細胞も発見される可能性が高い挑戦的な試みである。

研究の結果であるが、large T 抗原の発現ベクターの構築に関しては、TRE を有しテトラサイクリンにより誘導可能なプロモーターを有するベクター、PCR で増幅した。その断片のシーケンスを確認した。MCV の Large T 抗原遺伝子を組む。次に、そのベクターのポリリンカーサイトの制限酵素部位を利用し、合成した LoxP 配列を両端に組み込み、発現ベクターを構築した。培養細胞での発現：培養表皮細胞にそのベクターを導入したとこと遺伝子と蛋白レベルで Large T 抗原の発現を確認した。同様に、線維芽細胞に実際にそのベクターを導入し、遺伝子、蛋白レベルで Large T 抗原の発現を確認した。また、stable の系も作成した。Cre リコンビナーゼの働きの確認：つぎに、その stable の系に Cre リコンビナーゼの発現ベクターも導入して LoxP 配列の正常の働きを培養細胞で確認した。Cre リコンビナーゼの発現ベクターの導入によって、Large T 抗原の発現は消失した。

また、PCR にて Large T 抗原遺伝子がきりとられることを確認した。MCV-large T 抗原発現トランスジェニック (TG) マウスの作成：MCV-Large T 抗原発現ベクターをプラスミドの部分を取り取りとるため、制限酵素で線状化し、精製する。委託施設に DNA を送り TG マウスの前核インジェクションを行った。得られたトランスジェニックマウスについて遺伝子挿入を 5 - 6 匹のマウスで確認した。現在、それらのマウスの皮膚から遺伝子レベル、蛋白レベルで発現を確認中である。今後、rTet リプレッサーならびに Cre リコンビナーゼを有する TG マウスとの交配、Cre-rTetR-LT マウス皮膚からシングル細胞の単離を予定している。

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 Akasaka E, Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Nishikawa Y, Korekawa A, Matsuzaki Y, Mitsuhashi Y, Sawamura D.

Diffuse and focal palmoplantar keratoderma can be caused by a keratin 6c mutation.

Br J Dermatol. 2011;165(6):1290-1292.
doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10552.x

- ② Nakamura H, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Sawamura D, Akiyama M, Shimizu H.

DNA-based prenatal diagnosis of plectin-deficient epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia.

Int J Dermatol, 2011;50(4):439-442.
doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04771.

- ③ Narumi H, Nakano H, Matsuzaki Y, Sawamura D, Hanada K.
Immunohistochemical analysis of in vivo UVB-induced secretion of IL-1 α and IL-6 in keratinocytes.
Mol Med Report. 2011;4(4):611-614.
doi: 10.3892/mmr.2011.478.
- ④ Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I.
Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesions and recurrent mutation causing digital mutilation.
Br J Dermatol, 2011;165(1):199-201.
doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10317.x.
- ⑤ Hayashi M, Kawaguchi M, Hozumi Y, Nakano H, Sawamura D, Suzuki T.
Dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa of elderly onset.
J Dermatol, 2011;38(2):173-178.
doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00953.x.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMUERA 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

会津 隆幸 (AIZU TAKAYUKI)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00400135
中島 康爾 (NAKAJIMA KOJI)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70374832

(3) 連携研究者

()
研究者番号：