

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791290
 研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎原因候補遺伝子 *ma1* の機能解析と皮膚炎発症の分子機構解明
 研究課題名(英文) Analysis of *ma1*, candidate responsible gene for atopic dermatitis, and elucidation of molecular mechanism for the dermatitis caused by *ma1* deficiency.
 研究代表者
 塩濱 愛子 (SHIOHAMA AIKO)
 慶應義塾大学・医学部・特任助教
 研究者番号：40383731

研究成果の概要(和文)：

本研究では、新規に発見したアトピー性皮膚炎(AD)様皮膚炎発症の候補遺伝子 *ma1* に注目し、*ma1* タンパクの機能を明らかにするとともに、AD自然発症マウスである flaky tail (*ft*・*ma*) と、戻し交配によって作出した matted マウス (*ma*) を用いて (1)角質機能の解析(2)角質内脂質の成分解析(3)細胞内脂質の解析といった皮膚バリア機能解析を実施し、AD 様皮膚炎発症機構の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：

We established matted mice (*ma*) strain previously, which develop spontaneous dermatitis in specific-pathogen-free conditions. And we examined *Matted* was responsible for the dermatitis phenotype and corresponds to a nonsense mutation in the *ma1* gene. The aim of this work was to elucidate the pathogenic mechanism of human atopic dermatitis (AD), so that we performed several analysis in the skin barrier function using matted mice (*ma*) and Flaky tail (*ft*・*ma*) as a model of AD.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アトピー性皮膚炎、モデルマウス、ゲノムシーケンシング、フィラグリン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD: Atopic dermatitis)は、そう痒のある湿疹を主病変とした、慢性かつ再発性の経過を示す皮膚疾患である。AD はこれまでの知見から皮膚のバ

リア機能異常等が引き金となる IgE の過剰産生を誘導するような免疫機構の過剰反応で発症すると考えられている。AD 患者の多くは遺伝的なアトピー素因を持つと考えられているが、発症のメカニズムは未だに明らかに

なっていない点が多い。日本における患者数は 40 万人を超え現在も激増していることから、大きな社会問題の一つとなっている。

2006 年、Sandilands 等は皮膚の乾燥により皮膚表面が硬化し剥落する疾患である尋常性魚鱗癬(IV: Ichthyosis Vulgaris)の原因遺伝子である皮膚バリア機能タンパクフィラグリン(*FLG*)について、アイルランドの AD 患者集団においては約 50%の患者が変異を有している事を報告した。IV と AD では皮膚の症状は類似しているものの、IV では AD 様のアレルギー様症状は示さない症例が存在する。申請者を含むグループは、*FLG* 解読法を確立し日本人 AD 集団における *FLG* 遺伝子変異解析を行い、日本人特有の新規 *FLG* 遺伝子変異を発見した。現在までの報告や申請者のグループの解析により、日本人 AD 集団における *FLG* 遺伝子変異頻度は 10~30%程度であり、アイルランドの結果と比較し変異率が低い。この結果は、*FLG* 遺伝子変異以外の原因が存在する事を示唆している。

アトピー性皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*)は、*ma* (matted: ぼさぼさした)の表現型を示すマウスの集団から出現した (*ft*・*ma*)の遺伝子型を有する突然変異株である。*ft* と *ma* は近接した遺伝子座であるが、*ft* はホモ接合体において出生直後から生後 2 週間まで皮膚異常と矮小な耳を示し、一方、*ma* はホモ接合体において、毛のキューティクル層が欠損しており、縮れてちぎれ易い構造の毛並みを示すと報告されている。*ft* マウスにおいてフィラグリンの減少が報告され、さらに *ft* 遺伝子座と *Flg* 遺伝子が重なることから *Flg* 遺伝子内の変異であることが予想されたが、リピート間の相同性が 99%の *FLG* リピートがタンデムに並んだ構造であることから、通常の配列解析法では解読が不可能であった。申請者のグループは、ヒトゲノ

ム解読で培ったノウハウを駆使し、flaky tail マウスの *Flg* 遺伝子からヒトの AD 患者と類似の 1 塩基欠失変異を同定し、さらに経皮感作によるアトピー性皮膚炎の発症モデルを提唱した。

しかし、その後 flaky tail (*ft*・*ma*) を戻し交配する過程で (*ft*・*ma* / *ft*・+) マウスを単離したところ、このマウスにおいては *ma* の表現型のみならず flaky tail マウスが示した高 IgE 値を示す等の免疫学的形質まで失われていることが示唆された。

申請者は「平成 22 年度科学研究費補助金・研究活動スタート支援」により、新たに *ma* の遺伝子領域を 3.6Mb まで絞り込む事ができた。さらにこの領域のみを次世代シーケンサーを用いて解析した結果、flaky tail マウスは元の系統である CBA マウスと比較し、3.6Mb の対象領域に 10 箇所の塩基置換が起きており、それらのうち 2 遺伝子(*ma1* 及び *ma2*)においてアミノ酸変異を生じる事が明らかになった。

同時に申請者は戻し交配から matted (*ma*) が分離したマウス (+・*ma* / +・*ma*) を獲得し、この個体は flaky tail マウスが示す異常(皮膚肥厚、矮小な耳介)は示さないが、ぼさぼさした毛及び皮膚炎様症状を生後 2 週間までに発症し、免疫学的形質は *ma* 遺伝子座に存在することが判明した。

2. 研究の目的

申請者等はアトピー性皮膚炎(AD)様皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*・*ma*)の解析から、AD 様皮膚炎の発症の遺伝的要因が実は、ヒト AD の原因となる皮膚バリアタンパクフィラグリンに変異を起こした *ft* 遺伝子そのものではなく、*ft* 遺伝子から約 2.7cM 離れた正体不明の *ma* 遺伝子座周辺に存在することを発見し、当該 3.6Mb 領域の次世代 DNA

シーケンサーによる解析により、ナンセンス変異を持ち、皮膚での強い発現が見られる候補遺伝子 *ma1* を発見した。本申請では、この新規に発見した AD 様皮膚炎発症の候補遺伝子 *ma1* の機能解析から AD 発症の原因となる新たな分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

Flaky tail マウスにおける AD 様皮膚炎発症の原因遺伝子 *ma1* の機能解析を行うために、以下の実験を実施した。

(1) mRNA 組織発現解析

ma1 が免疫関連遺伝子であれば免疫系組織・細胞もしくは抗原刺激よりに発現すると考えられ、皮膚バリア構成に関与しているのであれば皮膚上皮に発現していると考えられる。また発現時期解析により、生後直後ではなく数週間後に見られる AD 様皮膚炎との関係を解明できる。

(2) ポリクローナル抗体作成と免疫組織染色・タンパク質細胞内局在解析

ma1 遺伝子 mRNA 発現している組織でタンパク質発現と、*ma1* タンパクの細胞内局在を解明するために、ポリクローナル抗体を作成する。*ma1* タンパクのアミノ酸配列は 2 次構造予測プログラム「Sosui」検索にて、膜貫通型タンパクとして予測できた。そこでタンパク質の N 末端側および膜外に予測されたアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、ウサギに経皮免疫したポリクローナル抗体を作成する。抗体をペプチドカラムにて精製後、SDS-PAGE 後にウェスタンブロット法を用いて *ma1* タンパクの検出が行える抗体を選択する。

選択した抗 *ma1* 抗体を用いて免疫組織染色を行い、発現の詳細な細胞内局在部位を検討する。

(3) タンパク強制発現系による *ma1* 機能解析

ma1 はアミノ酸配列から膜貫通型タンパクと予想されるが、典型的なシグナルペプチドは有しておらず細胞内局在は、細胞膜もしくは細胞内器官の膜であると予想している。そこで、詳細な解析を行うために、*ma1* タンパクに FLAG タグおよび GFP を結合した融合タンパク発現ベクターを作成する。HeLa 細胞もしくは HEK293 細胞へ遺伝子導入した後、タグ特異的抗体を利用した蛍光抗体法を用いてレーザー共焦点顕微鏡で *ma1* タンパクの局在を観察する。また、GFP 融合タンパク質発現ベクターを用いて生細胞における *ma1*-GFP の局在とその移動について観察する。

(4) 角質機能の解析

角質層の評価を行うために、生後 3-5 日の幼若マウスの背中を予めサフラニン染色しておき、非侵襲的なテープストリップ法で物理的に剥がし、テープに付着し剥がれてくる角質層のパターンを検討した。

(5) 角質内脂質の成分解析

これまでの結果と flaky tail 及び *ma* マウスの表現型から、申請者は *ma1* 遺伝子機能候補の一つとして細胞内脂質輸送を予測している。そこで、C57BL/6、flaky tail および *ma* マウスの角質内脂質成分を解析するために、角質内脂質を有機溶媒を用いて抽出し、クロマトグラフィーにて脂質の解析を行う。

(6) 細胞内脂質の解析

マウス表皮シートを作製し、疎水性色素であるナイルレッドを用いた細胞内脂質の検出を行う。

4. 研究成果

(1) mRNA 組織発現解析

RT-PCR 法により mRNA の発現部位と発現時期の解析を行った。発生 13 日目から mRNA の発現が認められ、これはマウス胎児で表皮の重層化が始まる時期と一致していた。

ノーザンブロット法を用いて成体マウスでの *ma1* mRNA の発現組織を検討した結果、皮膚に強い発現が認められた。そこで皮膚における詳細な発現を明らかにするために、皮膚を表皮と真皮に分離後それぞれから mRNA を抽出し、定量 RT-PCR 法にて発現解析を行った結果、表皮での増幅が顕著であり、*ma1* 遺伝子 mRNA は表皮にて発現している事を明らかにした。

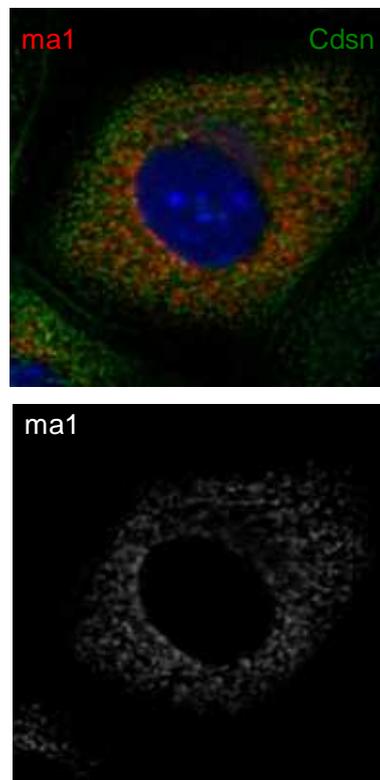
現在は多くの遺伝子発現データがデータベースに登録されている事から、検索の結果 Mouse Genome Informatics データベースに発生 14.5 日目での *ma1* 遺伝子 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果が登録されていた。その結果は重層化の始まった表皮に特異的な発現をしており、我々の RT-PCR の結果と一致していた。

(2)ポリクローナル抗体作成と免疫組織染色・タンパク質の細胞内局在解析

ma1 タンパク質の発現組織と、細胞内局在を解明するために、ポリクローナル抗体を作成した。*ma1* タンパクの N 末端側および C 末端側のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、ウサギに免疫後に血清からペプチドカラムを用いて抗 *ma1* ウサギ抗体を精製した。この抗 *ma1* 抗体を用いた蛍光抗体法による免疫組織染色の結果、*ma1* タンパクは表皮顆粒層の最上層である SG1 領域に発現している事が明らかになった。また、表皮シートを用いた詳細な細胞内発現解析の結果、*ma1* タンパクは細胞内に局在していた。

(3)タンパク強制発現系による *ma1* 機能解析

ma1 タンパクに HA タグおよび GFP を結合した融合タンパク発現ベクターを作成し、ラット新生仔腎由来株化培養細胞へ遺伝子導入を行い、薬剤選択により安定発現細胞株を作成した。蛍光顕微鏡を用いて *ma1* タンパクの局在を観察したところ、*ma1*-GFP 融合タンパ



(写真)皮膚表皮シートを用いた抗 *ma1* 免疫組織染色は培養細胞では粗面小胞体と思われる輸送系細胞内小器官に局在が認められた。

(4)角質機能の解析

C57BL/6 では角質層が上から 1~2 枚ずつ順々に剥がれていくのに対し、*matted* マウスでは表皮顆粒層が C57BL/6 よりも厚くなっており、さらに 1 回のテープストリップにて角質層から顆粒層最上層までブロック状に剥がれ、角質層のバリア機能に障害を起していることが予想された。

(5)角質内脂質の成分解析

メタノール・アセトン混合液を用いて皮膚及び毛から脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィーを用いて分離し、希硫酸を噴霧後に加熱して分離バンドを検出した。*flaky tail* マウス毛抽出液において、対照である C57BL/6 マウスでは検出されない高 Rf 値を示すバンドが検出された。このバンドの Rf 値よりコレステロールエステルであると予想された。

(6)細胞内脂質の解析

C57BL/6 マウスでは角質最下層の細胞膜、及び顆粒層 SG1 細胞の細胞膜と細胞内脂質が

2～3点の顆粒状に染色された。これに対して matted マウスでは細胞膜の他に染色される細胞内脂質顆粒の数が10～20点程度に増加していた。このことから角質層形成に必要な脂質が正常に放出されずに細胞内に滞留している可能性が示された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA AIKO)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：40383731