

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 17 日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659516
 研究課題名（和文） 7型コラーゲン完全ヒト化 - 優性栄養障害型表皮水疱症モデルマウスの作製
 研究課題名（英文） Generation of dominant dystrophic epidermolysis bullosa model mice using humanized COL7 mice
 研究代表者
 清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00146672

研究成果の概要（和文）：優性栄養障害型表皮水疱症（DDEB）は、表皮真皮間の接着に重要な役割を果たす分子の一つである 7 型コラーゲン（COL7）のドミナントネガティブ変異によって、表皮-真皮間が脆弱になり、水疱を形成する疾患である。これまで、DDEB モデルマウスは作製されておらず、治療方法の開発に難渋していた。今回 COL7 完全ヒト化マウスに DDEB 患者変異 COL7 遺伝子を導入し、ドミナントネガティブ効果により発症する世界初の DDEB モデルマウスの作製を試みた。

研究成果の概要（英文）：Dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB) is a clinically heterogeneous disorder characterized by blistering and scarring of the skin and mucous membranes in response to mechanical force. The DDEB phenotype arises because of a dominant negative effect of mutations in type VII collagen gene, resulting in the formation of structurally abnormal anchoring fibrils. There have not been DDEB model mouse. In this study, we attempt to generate the DDEB model mice.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮水疱症、モデルマウス、ドミナントネガティブ効果、グリシン置換変異、7型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異によって機能喪失したポリペ

プチドが正常な対立遺伝子の機能を阻害すること（ドミナントネガティブ効果）により

発症する疾患に対する有効な治療法はまだ確立されていない。その原因として、ドミナントネガティブ効果により発症するモデルマウスの作製が困難である点が挙げられる。

優性栄養障害型表皮水疱症 (DDEB) は表皮真皮間接合に重要な分子である 7 型コラーゲン (COL7) 遺伝子の一方がミスセンス変異などによりドミナントネガティブ効果を起こした結果、表皮真皮間接合が脆弱になり水疱を形成する疾患である。

DDEB モデルマウスの作製が困難な理由として、ヒト COL7 とマウス Co17 の構造が大きく異なるため、DDEB 患者 COL7 遺伝子をマウスに導入してもマウス Co17 に対しドミナントネガティブ効果を呈さない事が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は COL7 完全ヒト化マウスに DDEB 患者 COL7 遺伝子を導入し、これまでとは全く異なる手法を用いて、ドミナントネガティブ効果により発症する DDEB モデルマウスを作製する事である。このモデルマウスの作製手法の開発により、他の疾患モデルマウスの作製およびそれらの疾患に対する新規治療法の開発促進につながると考える。

3. 研究の方法

(1) G2028R 変異を有するヒト COL7 (G2028R-hCOL7) トランスジェニックマウスの作製

CMV プロモーターの下流に G2028R グリシン置換変異を有した hCOL7cDNA を挿入した

C57BL/6 マウストランスジェニックマウスを作製する。

(2) G2028R-hCOL7(+)/健常 hCOL7(+)-マウス (mCo17-/-) (DDEB モデルマウス) の作製

① G2028R-hCOL7 トランスジェニックマウスを mCo17 欠損マウスと交配する事により G2028R-hCOL7 のみを発現した G2028R-hCOL7(+)-マウス (mCo17-/-) を作製する。

② さらに、G2028R-hCOL7(+)-マウス (mCo17+/-) と正常 hCOL7(+)-マウス (mCo17-/-) (COL7 完全ヒト化マウス) を交配する事により、G2028R-hCOL7(+)/正常 hCOL7(+)-マウス (mCo17-/-) (DDEB モデルマウス) を作製する。

4. 研究成果

(1) G2028R 変異を有する hCOL7 (G2028R-hCOL7) トランスジェニックマウスの作製
G2028R-hCOL7 cDNA を発現したトランスジェニックマウスについて、hCOL7 特異抗体を用いた免疫組織学的検査により、G2028R-hCOL7 が表皮真皮境界部に発現していることが確認できた (図 1)。

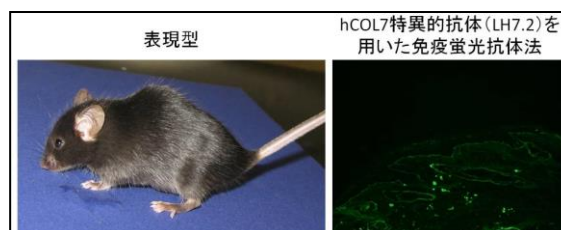


図 1

(2) G2028R-hCOL7(+)/健常 hCOL7(+)-マウス

ス (mCol17^{-/-}) (DDEB モデルマウス) の作製
 ① G2028R-hCOL7(+)⁺マウス (mCol17^{-/-}) を作製したところ、劣性栄養障害型表皮水疱症患者の臨床症状と同様、軽微な外力により表皮と真皮が剥離し、劣性栄養障害型表皮水疱症のモデルマウスになることが分かった (図2)。

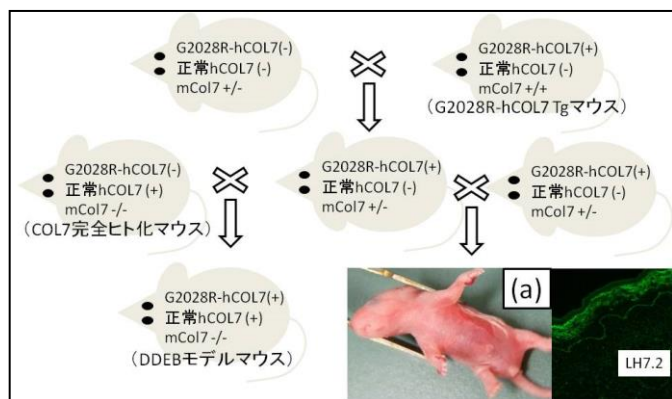


図 2

② G2028R-hCOL7(+)⁺/ 正常 hCOL7(+)⁺/mCol17^{-/-} (DDEB モデルマウス) を作製したところ、明らかな症状は認めなかった。現在、超微細構造学的所見などの解析を行っている。

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 3 件)

(1) Satoru Shinkuma、Daisuke Sawamura、Yasuyuki Fujita、Hiroyuki Kawasaki、Hiroyuki Nakamura、Masukazu Inoie、ataru Nishie、Hiroshi Shimizu、Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis

bullosa patient、Acta Dermato-Venereologica、査読有、in press

(2) Satoru Shinkuma、Wataru Nishie、Witold K. Jacyk、Ken Natsuga、Hideyuki Ujiie、Hideki Nakamura、Masashi Akiyama、Hiroshi Shimizu、A Novel Keratin 5 Mutation in an African Family with Epidermolysis Bullosa Simplex Indicates the Importance of the Amino Acid Located at the Boundary Site Between the H1 and Coil 1A Domains、査読有、in press

DOI: 10.2340/00015555-1538

(3) Hiroko Umemoto、Masashi Akiyama、Takanori Doman、Toshifumi Nomura、Satoru Shinkuma、Kei Ito、Takuya Asaka、Daisuke Sawamura、Jouni Uitto、Motohiro Uo、Yoshimasa Kitagawa、Hiroshi Shimizu、Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts、The American Journal of Pathology、査読有、181 巻、2012、1659-1671

DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.018

[学会発表] (計 2 件)

① 新熊 悟、ケラチン5のコイル1A領域N末端部にミスセンス変異を生じた単純型表皮水疱症、第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2012年09月30日、ロイトン札幌 (北海道)

- ② 新熊 悟、Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient、2012年05月10日、Raleigh Convention Center (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏 (SHIMIZU HIROSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00146672

(2) 研究分担者

新熊 悟 (SHINKUMA SATORU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00613788