

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670516

研究課題名(和文) X染色体の不活化を応用した表皮水疱症モザイクモデルの作製

研究課題名(英文) Generation of mosaic model of epidermolysis bullosa by inactivation of X chromosome.

研究代表者

西江 渉(Nishie, Wataru)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20443955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、X染色体の不活化を応用した表皮水疱症のモザイクモデル作製を試みることである。テトラサイクリン応答配列を有するプロモーター下でヒトXVII型コラーゲン(COL17)遺伝子cDNAを発現するマウスを作製し、X染色体上でK14プロモーター下でリバーステトラサイクリン発現制御因子を発現するマウスと交配しダブルトランスジェニックマウスを作製した。マウス表皮培養細胞へドキシサイクリンを投与するとCOL17遺伝子の発現は誘導できたがタンパクレベルでの発現には至らなかった。本手法によるモザイクモデル作製には、いかに高い発現効率を有する個体を作製できるかが課題であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to generate a mosaic model of epidermolysis bullosa by inactivation of X chromosome. We have generated transgenic (Tg) mice with tetracycline response plasmid expressing human type XVII collagen (COL17) cDNA, and then crossed with the Tg mice expressing reverse tetracycline transactivator driven under keratin 14 promoter on X-chromosome. When primary keratinocytes from the double Tg mice were treated with doxycycline in culture, increased human COL17 gene expression was observed; however, COL17 protein expression was not induced. These results indicate that it may be challenging for this method to obtain mice with high inducible level of COL17, which is needed to be improved.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚病態学

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症 (EB) は、皮膚基底膜タンパクの遺伝子異常により発症し容易に水疱形成を生じる疾患群である。従来 EB では全ての皮膚が脆弱になると考えられていたが、1997年に 17 型コラーゲン (COL17) 遺伝子異常を持つ接合部型 EB (JEB) 患者において、一部に正常皮膚をモザイク状に有する患者が初めて報告された (Jonkman MF, et al. Cell 1997)。その後、同様の患者は他の病型の EB 患者でも多数報告されており、モザイク現象は予想より多く生じている可能性が高い。興味深いことに、COL17 の遺伝子異常を持つ JEB の軽症例では 100%モザイク現象を伴うと報告されており (Pasmooij AM, et al. JID 2012)、モザイク現象は予後と重症度へ関与する可能性が示唆されている。しかし適切なモデルが存在しないため、モザイク現象と予後の関連性は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、X 染色体の不活化とテトラサイクリン発現誘導 (Tet-on) システムを用いるという斬新な手法を用い、EB のモザイクモデル作製を試みることである。

3. 研究の方法

雌の個体では X 染色体がランダムに不活化される。X 染色体上でケラチン 14 プロモーター下にリバーステトラサイクリン発現制御因子を発現する遺伝子改変マウス (Jackson) と、テトラサイクリン応用因子を有するプロモーター下でヒト COL17 cDNA を発現する遺伝子発現マウスを交配する。後者の既存マウスは存在しないため、新たに作製する。得られたマウス同士を交配し、上記、2 つの遺伝子をそれぞれ発現するダブルトランスジェニックマウスを作製する。得られたマウスから表皮基底細胞を培養し、培地中へドキシサイクリンを投与し RT-PCR にてヒト COL17 cDNA の発現誘導を確認する。また細胞ライセートからヒト COL17 タ

ンパクの発現をウエスタンブロット法で確認する。最も発現効率の良い遺伝子改変マウスを更に COL17 遺伝子ノックアウトマウス (Nishie, et al. Nat Med 2007) と交配し、ドキシサイクリン投与により誘導可能な EB のモザイクモデルを作製する。

4. 研究成果

トラサイクリン応用因子を有するプロモーター下でヒト COL17 cDNA を発現するプラスミドを 349 個の C57BL/6 系統の受精卵前核へマイクロインジェクション施行した結果、72 匹生存産子が得られ、このうち 6 匹 (5 匹、1 匹) で発現遺伝子が確認された。6 匹中 3 匹が交配可能であり、X 染色体上でケラチン 14 プロモーター下にリバーステトラサイクリン発現制御因子を発現する遺伝子改変マウスと交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作製した。培養表皮細胞の培地へドキシサイクリンを投与 (1mg/ml) した結果、RT-PCR 法でいずれもヒト COL17 cDNA の発現誘導を確認したが、タンパクレベルでの発現は確認出来なかった。

X 染色体は 1 個体ではランダムに不活化されるため、全ての細胞でヘテロの状態にある。従って、X 染色体上で発現するリバーステトラサイクリン発現制御因子は、他の染色体上でホモとして発現する場合に比較して発現効率が低いことが予想される。今回、トラサイクリン応用因子を有するプロモーター下でヒト COL17 cDNA を発現する Tg マウスは 6 匹得られたが、交配可能であった個体は 3 匹と少なかったため、効率よく遺伝子発現可能な個体を得られなかった可能性が高い。遺伝子レベルではドキシサイクリン投与による発現誘導は可能であったため、より発現効率の良い Tg マウスが得られると、本手法によって画期的な EB のモザイクモデル作製が可能となると考えられ、解決すべき最

も重要な課題であることが明らかとなった。

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 10 件)

1. Nishie W, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Ujiie H, Toyonaga E, Hata H, Nakamura H, Shimizu H.
Context-dependent regulation of collagen XVII ectodomain shedding in skin.
Am J Pathol 185; 1361-71, 2015 査読あり, DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.01.012.
2. Moriuchi R, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K, Shimizu H.
In vivo analysis of IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: a study of 100 cases.
J Dermatol Sci 78; 21-5, 2015 査読あり, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.01.013.
3. Nishie W.
Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII.
J Dermatol Sci 73: 179-186, 2014. 査読あり, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.12.001.
4. Nishie W, Natsuga K, Nakamura H, Ito T, Toyonaga E, Sato H, Shimizu H.
A recurrent 'hot spot' glycine substitution mutation, G2043R in COL7A1, induces dominant dystrophic epidermolysis bullosa associated with intracytoplasmic accumulation of pro-collagen VII.
J Dermatol Sci 75:69-71, 2014 査読あり, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.04.006.
5. Haga N, Nishie W, Hata H, Miyauchi T, Muramatsu K, Kitamura S, Osawa R, Shimizu H.
Two cases of pseudolymphoma on the lips.

- Br J Dermatol 170; 1204-6, 2014. 査読あり, DOI: 10.1111/bjd.12837.
6. Ito T, Fujita Y, Nishie W, Hirata Y, Shimizu H.
Spontaneously resolving granulomatous tattoo reaction in multiple color regions.
J Dermatol 41; 647-648, 2014 査読あり, DOI: 10.1111/1346-8138.12531.
7. Kitamura S, Hata H, Imafuku K, Nishie W, Shimizu H.
Sprinkle brightness lesion" appearance in ultrasound B-mode findings of sinusoidal hemangioma.
J Dermatol 41; 1123-4, 2014. 査読あり, DOI: 10.1111/1346-8138.12672.
8. Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H.
Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation.
J Immunol 193; 4415-4428, 2014 査読あり, DOI: 10.4049/jimmunol.1400095.
9. Mizuno O, Nomura T, Suzuki S, Takeda M, Ohguchi Y, Fujita Y, Nishie W, Sugiura K, Akiyama M, Shimizu H.
Highly prevalent SERPINB7 founder mutation causes pseudodominant inheritance pattern in Nagashima-type palmoplantar keratosis.
Br J Dermatol 171; 845-853, 2014 査読あり, DOI: 10.1111/bjd.13076.
10. Hsu CK, Huang HY, Chen WR, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K, Fan ST, Wang HK, Lee JY, Tsai WL, Shimizu H, Cheng CM.
Paper-based ELISA for the Detection of Autoimmune Antibodies in Body Fluid-the Case of Bullous Pemphigoid.
Anal Chem 86; 4605-4610, 2014. 査読あり

あり, DOI: 10.1021/ac500835k.

[学会発表](計 4 件)

1. Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Nakamura H, Shimizu H:
One amino acid deletion in type XII collagen-binding domain of plectin with a truncation mutation underlies epidermolysis bullosa simplex.
第 39 回日本研究皮膚科学会総会、2014 年 12 月 12 日 - 2014 年 12 月 14 日、ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)
2. Nishie W, Natsuga K, Izumi K, Ujiie H, Hata H, Nakamura H, Shimizu H:
Context-dependent tight regulation of collagen XVII ectodomain shedding in skin.
第 39 回日本研究皮膚科学会総会、2014 年 12 月 12 日 - 2014 年 12 月 14 日、ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)
3. Wada M, Nishie W, Ujiie H, Izumi K, Iwata H, Natsuga K, Kitagawa Y, Shimizu H:
Epitope-dependent pathogenicity of antibodies to collagen XVII/BP180 for blister formation.
第 39 回日本研究皮膚科学会総会、2014 年 12 月 12 日 - 2014 年 12 月 14 日、ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)
4. Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H:
The relevance of type XVII collagen expression in epidermal differentiation and proliferation.
第 39 回日本研究皮膚科学会総会、2014 年 12 月 12 日 - 2014 年 12 月 14 日、ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西江 渉 (NISHIE WATARU)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号: 20443955

(2) 研究分担者

夏賀 健 (NATSUGA KEN)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 70645457