

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

皮膚炎を自然発症する Tmem79 欠損マウスの樹立と皮膚炎発症機構の解明

研究分担者 海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科学 准教授
佐々木 貴史 慶應義塾大学医学部コーサースキンケア・アレルギー
予防医学寄附講座 特任講師

研究要旨

皮膚炎を自然発症する突然変異マウス Flaky tail の原因変異は Tmem79 ナンセンス変異であったことから、我々は Tmem79 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。その結果、Flaky tail マウス同様に SPF 環境下でも皮膚炎を発症したことから、単一遺伝子欠損で皮膚炎を発症する皮膚炎モデルマウスを樹立できた。Tmem79 欠損マウスの皮疹部解析の結果、アトピー性皮膚炎患者にも見られる黄色ブドウ球菌の異常繁殖が見られることが明らかになった。今後は Tmem79 欠損マウスの皮膚炎及び黄色ブドウ球菌繁殖を解明、及び、アトピー性皮膚炎との比較により、アトピー性皮膚炎の皮膚炎発症機構解明の一端となることが期待される。

研究協力者

久保 亮治 慶應大医学部皮膚科学
専任講師
塩濱 愛子 慶應大医学部 MSD アレルギー
研究寄附講座 特任助教
安田 文世 慶應大医学部皮膚科学
大学院生

なること、Tmem79 が存在する染色体領域には表皮分化に関する遺伝子がクラスターする Epidermal differentiation complex (EDC) に隣接しており、Flg 変異と同様に皮膚症状に関する変異が連鎖している可能性が排除できないことから、Tmem79 を完全欠損した Tmem79 欠損マウスを作出し、詳細な皮膚炎発症機構の解明を試みた。

A . 研究目的

近年アトピー性皮膚炎(AD)患者からフィラグリン(FLG)遺伝子の機能喪失変異が疾病素因である事が疫学的に明らかにされ、皮膚バリア機能障害が、アトピー性皮膚炎の発症原因の一つとなる事が明らかになった。Flaky tail マウスは、Flg 5303delA(Flg^{fl})変異と matted (ma)変異を有し血中 IgE 値上昇を伴う皮膚炎を自然発症することから、AD モデルマウスとして注目されている。我々は Flaky tail マウスの自然発症皮膚炎の原因変異は Tmem79 のナンセンス変異である事を明らかにした。Flaky tail マウスは突然変異マウスであり遺伝背景が通常使われているマウスと異

B . 研究方法

Tmem79 の exon2-4 を欠損した C57BL/6N 由来 ES 細胞を受精卵に注入をし、キメラマウスを作成した。キメラマウスと野生型マウスを交配し、Tmem79 欠損をヘテロに有するマウスを得た。Tmem79 ヘテロ欠損マウス同士を交配し、最終的に Tmem79 欠損マウスを作出した。

作出した Tmem79 欠損マウスは、matted マウスとの差を明らかにするために、皮膚炎スコア、掻爬回数などを比較した。皮疹部における黄色ブドウ球菌の繁殖を解析するために、皮疹部 1cm²を滅菌 PBS につけた綿棒を用いて 10 回こすり取るスワブ法

により表皮細菌を回収し、黄色ブドウ球菌の選択培地であるマンニット培地で培養を行った。

C . 研究結果

キメラマウスのスクリーニングと交配の結果、*Tmem79* 欠損マウスを樹立した。mRNA 解析及び抗 *Tmem79* 抗体を用いた発現解析により、*Tmem79* は完全欠損していることを確認した。*Tmem79* 欠損マウスと matted マウスを比較した結果、皮膚炎の発症時期、発症部位など、多くの点で類似した皮膚炎を発症していることから、*Tmem79* 欠損と *Tmem79* Y280*ナンセンス変異はほぼ同様の皮膚炎を生じることが明らかになった。

皮疹部における黄色ブドウ球菌繁殖の解析を行うために、4, 8, 32 週齢 *Tmem79* 欠損マウスからスワブ法により細菌を採取した結果、皮疹が強く見られる 32 週齢の前胸部、頬部から黄色ブドウ球菌が検出された。

D . 考察

Tmem79 欠損マウスと *Tmem79* Y280*ナンセンス変異を有する matted マウスは、ほぼ類似した皮膚炎症状を示した。*Tmem79* は *Flg* を含むマウス 3 番染色体 EDC に隣接するため、EDC 内に別の変異が存在した場合、同様に分離できず、他の遺伝子変異の影響による皮膚症状を区別できない可能性がある。また、Flaky tail は CBA と C57BL/6 との混合遺伝背景を有しており、交配によっては研究室ごとに遺伝背景の異なるマウスになる可能性がある。さらに、matted マウスでは *Tmem79* ナンセンス変異よりも前が部分タンパク質として発現していることが明らかになっていることから、解析ではこの部分タンパク質の影響を考慮に入れなければならなかった。今回、我々が作出した *Tmem79* 欠損マウスは、均一な遺伝背景を有する *Tmem79* 完全欠損マウスであることを確認できたことから、今後はこのマウスを用いて解析を行う予定である。

また、今回の解析で *Tmem79* 欠損マウスは時期及び部位特異的に皮疹部に黄色ブドウ球菌が検出されることが明らかになった。アトピー性皮膚炎の皮疹部では黄色

ブドウ球菌が高頻度に検出されることが明らかになっているが、これが結果なのか原因なのかは明らかになっていない。今後は、*Tmem79* 欠損マウスの解析によって、皮疹部での黄色ブドウ球菌増殖機構が解明されることが期待される。

E . 結論

Tmem79 を欠損する C57BL/6N の遺伝背景を有するマウスを樹立した。*Tmem79* 欠損マウスはアトピー性皮膚炎患者と類似した、時期・部位特異的に皮疹部に黄色ブドウ球菌が検出されることが明らかになった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表 (平成 26 年度)

< 論文発表 >

1. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830. e826, 2014.
2. Sasaki T, Furusyo N, Shiohama A, Takeuchi S, Nakahara T, Uchi H, Hirota T, Tamari M, Shimizu N, Ebihara T, Amagai M, Furue M, Hayashi J, Kudoh J: Filaggrin loss-of-function mutations are not a predisposing factor for atopic dermatitis in an Ishigaki Island under subtropical climate. **J Dermatol Sci**, 76 (1), 10-15, 2014.
3. Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 856-864, 2014.
4. Tamari M, Saeki H, Hayashi M, Umezawa Y, Ito T, Fukuchi O, Nobeyama Y, Yanaba K, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Fujieda S, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Hirota T: An association study of 36 psoriasis susceptibility loci for psoriasis vulgaris and

atopic dermatitis in a Japanese population. **J Dermatol Sci**, 76 (2), 149-160, 2014.

5. 佐々木貴史, 天谷雅行: フィラグリン (filaggrin). **分子消化器病**, 11 (2), 88-93, 2014.
6. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 天谷雅行: 皮膚バリア異常を示す自然発症皮膚炎マウスモデル. **日本臨床免疫学会会誌**, 37 (3 (第41回総会ポスター賞受賞記念論文掲載号)), 160-165, 2014.

< 学会発表 >

1. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Tmem79の同定. **第21回分子皮膚科学フォーラム**, 京都, 2014. 4. 11- 12.
2. 佐々木貴史, 古庄憲浩, 塩濱愛子, 竹内聡, 中原剛士, 内博史, 広田朝光, 玉利真由美, 清水信義, 海老原全, 天谷雅行, 古江増隆, 工藤純: 石垣島小児コホート(KIDS)でのFLG機能喪失変異解析及び次世代シーケンサを用いた新規FLG全配列解読法の確立. **第35回日本炎症再生医学会**, 沖縄, 2014. 7. 1- 4.
3. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Tmem79ノックアウトマウスの確立. **第35回日本炎症・再生医学会**, 沖縄, 2014. 7. 1- 4.
4. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 自然発症皮膚炎を起こすTmem79 KO マウスは層板顆粒の分泌異常を示す. **第42回日本臨床免疫学会総会**, 東京, 2014. 9. 25- 27.

H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし