

皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントーネガティブ トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討

京都大学 医学部

田 中 俊 宏

Retinoic acid plays an important role in the development of the organs, including skin. We constructed a cDNA functioning as a dominant-negative styled retinoic acid receptor and introduced it into mice. The resultant transgenic mice skin revealed a marked reduction of skin maturation. Macroscopic examination and microscopic examination of these transgenic mice showed thinning of the epidermis with the loss of primary wickels and rete ridge formation of dermo-epidermo junction. These findings indicate that the retinoic acid act as a strong physiological maturation factor of the skin. Keratins and filaggrin were analyzed as differentiation marker. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified keratin revealed normal amount of keratin 1, 10, 5, 14 were expressed both controls and transgenic mice skin. Ectopic expression of keratin 6 and 16 were detected in transgenic mice skin. Although, the expression of keratin occurs in transgenic mice, the expression pattern of these keratin were completely different to those of control mice as detected by immunofluorescence study. A complete depletion of fillagrin was observed with this technique. All these data indicate that retinoic acid plays an important role in the epidermal layer formation in fetal skin development.

緒 言

レチノイン酸は完成した皮膚に対して種々の薬理作用を持つことは既に知られている。例えば本物質の過剰はhyper vitamine A syndromeをひきおこし、また、欠乏は、成人皮膚に過角化を生じさせる。培養表皮細胞を用いた実験でも本物質の過剰または欠乏が、種々の遺伝子発現に影響を与え、特に分化マーカーであるケラチンの遺伝子発現に大きな作用を持つことが知られている。しかし、本物質の生理作用については、これが真に生理作用をもち機能しているか否かを含めて、不明のままであった。生理作用を検定する最も確実な

実験は、欠損状態を人為的に作製することであるが、レチノイン酸は生体にとって必須の物質であることから、皮膚以外の臓器に影響を及ぼさずに皮膚にレチノイン酸それ自体の欠乏状態を作り出すことはできない。われわれはこの問題を解決するために、皮膚のみで特異的に発現するプロモーターを用いて、レチノイン酸受容体のドミナントーネガティブの形質をもつ点突然変異体のレチノイン酸受容体をトランスジェニックマウスに導入することを試みた。

実 験

図1にトランスジェニックマウス作成に用いたDNAのコンストラクトを示す。プロモーターは皮膚基底細胞層に特異的な発現を示すK14プロモーターを用いた。これにたいしてベクターガラクトシダーゼ、正常なレチノイン酸受容体、点突然変異を持つレチノイン酸受容体をそれぞれコードするcDNAをつなげた。ベクターガラクトシダーゼは発現が正しく行なわれていることを確認する目的

Study of fetal skin maturation with dominantnegative retinoic acid receptor transgenic mice.



Toshihiro Tanaka
Faculty of Medicine
Kyoto University

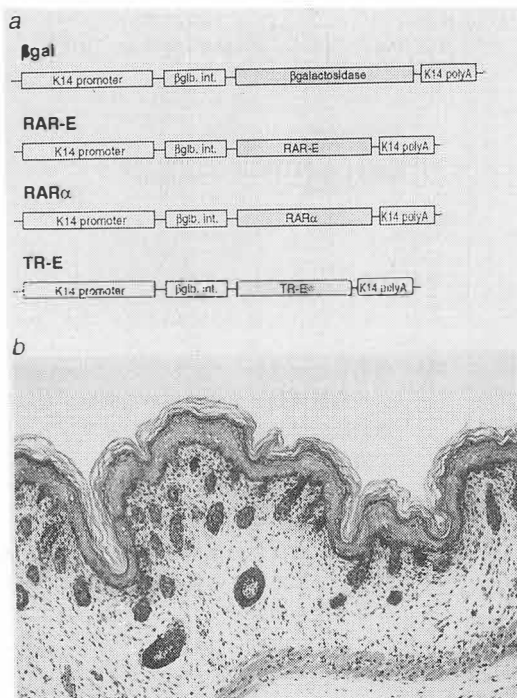


図1. トランスジェニックマウス作成に為のcDNAコンストラクトとコントロールのベータガラクトシダーゼの発現。

A: コンストラクト。ケラチン14プロモータにたいして、ベータガラクトシダーゼ、点突然変異体レチノイン酸受容体、正常なレチノイン酸受容体および点突然変異体をもつ甲状腺ホルモン受容体をそれぞれコードするcDNAをつなげた。

B: コントロールのベータガラクトシダーゼの発現をトランスジェニックマウスで観察したもの。基底細胞層のみが染色されている。

で、正常なレチノイン酸受容体は過剰発現による影響がないことを確認するために用いた。これらのcDNAに続いてK14遺伝子由来のポリAシグナルを導入した。トランスジェニックマウスの作成は常法通りに行なった¹⁾。生まれたトランスジェニックマウスはサザン法にて導入した外来遺伝子の挿入を確認した。マウスの形質の観察は、肉眼的所見およびヘマトキシリン・エオジン染色による光顕所見によった。トランスジェニックマウス表皮に発現されているケラチンは加熱により表皮を真皮

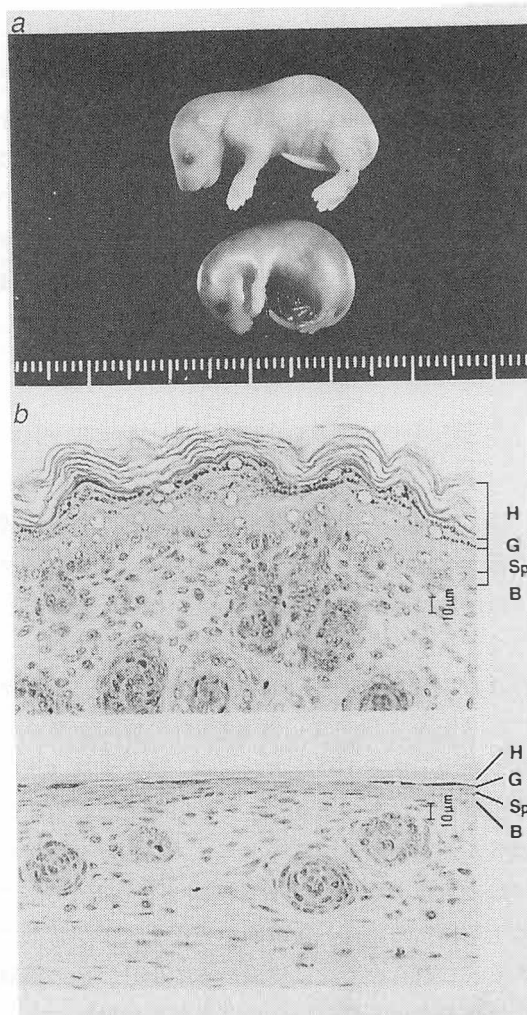


図2. トランスジェニックマウスのマクロ、ミクロの所見。

A: マクロの所見。上段はコントロールマウス。健康な皮膚をもつ。下段は点突然変異体レチノイン酸受容体を導入したトランスジェニックマウス。皮溝は消失し、真皮の血管が透けてみえる。

B: ヘマトキシリン・エオジン染色によるミクロの所見。上段はコントロールマウスの皮膚。下段はトランスジェニック。皮膚は著明に薄くなっている。一次皮溝は消退しレーテリッジは平坦となっている。

から剥離した後Steinertらの方法に準じて精製し、10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマシーブリリアントブルーにて染色した²⁾。各

ケラチンの同定は、おのおのにたいして特異的に反応する抗体を用いて、前述の方法で得たケラチンを免疫ブロット法にて同定した。ケラチンの分布はトランスジェニックマウス皮膚をFuchsらの方法に準じてカルモイ固定を行った。その後おのおのにたいして特異的に反応する抗体を第一抗体とし、さらにFITC標識された抗マウス抗体または抗ウサギ抗体にて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

結 果

図1下段にベータガラクトシダーゼの発現様式を示す。これまでの報告どおりにK14プロモーターは皮膚に特異的な発現を示す。作成したトランスジェニックマウスのマクロの所見を図2上段に、ミクロの所見を図2下段に示す。コントロールマウス（上）に比べて、外来性DNAの挿入があり、かつ発現のあるトランスジェニックマウス（下）の皮膚は、ひ薄であり、かつ危弱である。真皮の血管が透過される。このトランスジェニックマウスは皮膚より急速に水分を失い生後（E19.5にて帝王切開にて出産）数時間で死亡するのが特徴である。これらの変化は皮膚のみで生じ、他の臓器には特筆すべき変化はない。光顕所見ではコントロール（上）に比べてトランスジェニックマウス（下）は、1）一次皮溝の消失、2）マルピギー層の著名な減少、3）顆粒層の減少、4）表皮-真皮間のレーテリッジの消失が特徴としてあげられる。なお正常レチノイン酸受容体を導入したトランスジェニックマウスの皮膚には変化はない。

図3にトランスジェニックマウス表皮より精製したケラチンのSDS-PAGEの結果を示す。左がクマシーブリリアントブルー染色である。発現されているケラチンはコントロールでは主としてK1/K10、K5/K14であるが、トランスジェニックマウスでは、K1/K10、K5/K14に加えてK6/K16が発現している。これらのケラチンは分子量から明らかであるが、各々について特異的に反応する抗体を用

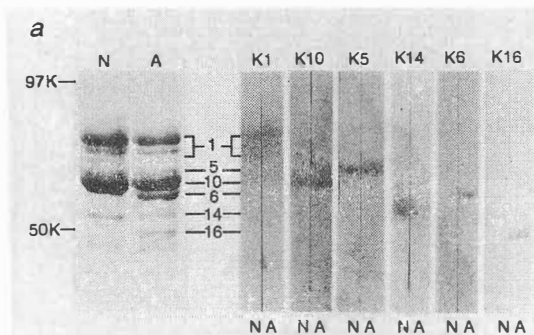


図3. 精製したケラチンのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動と抗体を用いた同定。左は電気泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したもの。

N: コントロールマウス皮膚由来のケラチン。
A: トランスジェニックマウス皮膚由来のケラチン。右は左の蛋白をそれぞれ上段にあるケラチンにたいする抗体で免疫ブロットをおこなったもの。

いて免疫ブロット法を行ったのが上の図である。これより各々のケラチンは免疫学的にも同定された。これらのケラチンのうちK1/K10、K5/K14はともにコントロールマウスでもトランスジェニックマウスでも発現しているが、それらが表皮細胞のterminal differentiationをつうじて正しい位置で発現しているかどうかを、これらケラチンの局在を調べることを通じて検討したのが図4である。図4は左が正常コントロールマウス皮膚を基質としたもの右がトランスジェニックマウス皮膚である。免疫ブロットの結果に対応して、K6/K16はコントロールマウスでは検出されない。一方ケラチンの分析ではコントロール、トランスジェニックともに発現されているK1/K10、K5/K14は発現の局在が変化していることが示された。すなわちトランスジェニックマウス皮膚では、K1/K10はコントロールよりおくれで発現を開始しK5/K14はコントロールより遅れて消失することが明らかとなった。

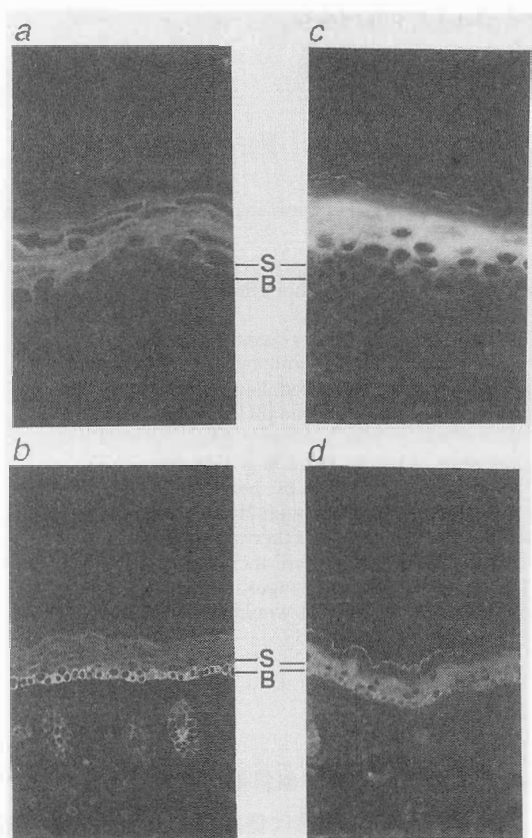


図4. 蛍光抗体所見。

- a: コントロールマウス皮膚をK10にたいする抗体で検出。
- b: コントロールマウス皮膚をK14にたいする抗体で検出。
- c: トランスジェニックマウス皮膚をK10にたいする抗体で検出。
- d: トランスジェニックマウス皮膚をK14にたいする抗体で検出。

考 察

われわれの用いたドミナントーネガティブ法によりレチノイン酸とその受容体の相互作用が失われることにより皮膚の発生にあきらかな異常が生じることが明らかとなった。レチノイン酸受容体はDNAに直接働きかけて遺伝子発現を制御する核

内のトランスクリプションファクターである。培養細胞を用いた実験からこの受容体はケラチン遺伝子に直接働きその発現を制御することが知られている。我々の作成したトランスジェニックマウス表皮では免疫プロット法で見る限りケラチン1、10、5、14は正しく発現しているように見える。しかし蛍光抗体法でその発現局在を検討するとノントランスジェニックマウスと比較して明らかに発現のタイミングが異なっていることが分かった。同時に分化のマーカであるフィラギリンの発現が全く見られなくなっていることがあきらかとなった。すなわち発生過程における分化をつかさどる一群の調節機構に変化が生じると考えられる結果である。肉眼的所見ではこのマウスは皮膚の菲薄化と脆弱性を示す。光学顕微鏡を用いた観察でも、このトランスジェニックマウスは表皮の菲薄化を示す。すなわち、ヘマトキシニーエオジン染色標本の観察では、マルピギー層の著明な減少と一次皮溝の消失およびレーテリッジの消失が観察される。これらの変化は、胎生16から17にかけて見られる形態学的特徴と一致しており、この観点からは胎児期の皮膚分化の阻害と考えられる。フィラグリンの発現も胎生16でいどに始まるとされており分化マーカーからも成熟化の遅延がうかがわれる。これらの観察よりレチノイン酸は皮膚の発生に生理的に重要な役割を演じておりかつそれは胎生皮膚発生での皮膚の成熟化を司ると考えられた。

文 献

- 1) Gordon jw in guide to techniques in mouse development (eds Wassarman PM & DePamphilis ML) 747-771 (Academic Press, San Diego 1993)
- 2) Steinert. P et al, *Biochemical J.* 149 39-48 1975