

## 単純性表皮水疱症モデルとしての 新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析

栗山 桃奈<sup>1</sup>・吉岡 望<sup>1</sup>・加畑 雄大<sup>2,3</sup>・牛木 辰男<sup>3</sup>・吉木 淳<sup>4</sup>

Thomas J Sproule<sup>5</sup>・阿部理一郎<sup>2</sup>・竹林 浩秀<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新潟大学医歯学総合研究科 神経生物・解剖学分野

<sup>2</sup>同 皮膚科学分野

<sup>3</sup>同 顕微解剖学分野

<sup>4</sup>理化学研究所バイオリソースセンター

<sup>5</sup>ジャクソン研究所

### Analyses of a Novel Naturally Occurring *Dystonin/Bpag1* Mutation as a Mouse Model of Epidermolysis Bullosa Simplex

Momona KURIYAMA<sup>1</sup>, Nozomu YOSHIOKA<sup>1</sup>, Yudai KABATA<sup>2</sup>, Tatsuo USHIKI<sup>3</sup>, Atsushi YOSHIKI<sup>4</sup>

Thomas J SPROULE<sup>5</sup>, Riichiro ABE<sup>2</sup> and Hirohide TAKEBAYASHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Neurobiology and Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

<sup>2</sup>Division of Dermatology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

<sup>3</sup>Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

<sup>4</sup>RIKEN BioResource Center

<sup>5</sup>The Jackson Laboratory

#### 要 旨

*Dystonia musculorum* (*dt*) マウスは *Dystonin* 遺伝子 (*Dst*, 別名 *Bpag1*) の変異によってジストニア様の運動障害を示す自然発生突然変異マウスである。 *Dst* は組織ごとに異なるアイソフォームを発現し、皮膚型アイソフォームは表皮と真皮の間の接着装置であるヘミデスモソームの構成タンパク質である *Dst-e* (*Bpag1e*, BP230) をコードする。ヒト *Dst-e* のホモ接合体変異は、表皮下に緊満性水疱が生じる単純性表皮水疱症 [epidermolysis bullosa simplex (EBS)] の原因となる。本研究では最近新しく遺伝子変異が同定された *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> マウスの皮膚を組織学的に解析した。肉眼所見では、*Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ホモマウスの皮膚に明らかな異常は認められなかつ

Reprint requests to: Hirohide TAKEBAYASHI  
Division of Neurobiology and Anatomy,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Niigata University,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
神経生物・解剖学分野

竹林 浩秀

たが、尾の皮膚において表皮と真皮の接着強度の低下が確認された。in situ hybridization 法により皮膚における *Dst-e* の遺伝子発現を検討したところ、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの皮膚において *Dst-e* の発現は検出されなかった。次に、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と抗 pan-Keratin 抗体 (KL-1) の免疫染色を行い、光学顕微鏡観察を行ったところ、表皮内と真皮内の構造に異常は認められなかったが、表皮真皮接合部に一部裂隙がみられ、そこに水疱が観察された。また抗 Uchl1 (PGP9.5) 抗体の免疫染色により、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの表皮と真皮において感覚神経終末の減少が認められた。さらに電子顕微鏡観察により、上皮細胞-基底膜間の接着装置であるヘミデスモソームにおいて *Dst-e* により構成される細胞膜裏打ち構造の消失が観察された。以上の結果から、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスではヘミデスモソームの構造異常によって表皮と真皮の接着強度が低下して、これにより表皮下に水疱が生じると考えられた。従って *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスは EBS の新規モデル動物として有用である。

キーワード：*Dystonia musculorum* (*dt*) マウス、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* アリール、*Dst-e* (*Bpag1e*, *BP230*)、単純性表皮水疱症 [epidermolysis bullosa simplex (EBS)]、水疱性類天疱瘡 [Bullous pemphigoid (BP)]、遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーVI型 [Hereditary sensory and autonomic neuropathy type VI (HSAN6)]

## 緒言

*Dystonia musculorum* マウス (以下、*dt* マウス) は、後根神経節の感覚神経細胞が脱落し、主動筋と拮抗筋の同時収縮により四肢と体幹が捻転する表現型を示す。*dt* マウスは、全身性ジストニア症状を示すマウスとして50年以上前に樹立された自然発生突然変異マウスである<sup>1)</sup>。その後の研究で、*dt* マウスは細胞骨格リンカータンパク質をコードする *Dystonin* (*Dst*) の変異によることが明らかとなり、さらにこの遺伝子は水疱性類天疱瘡 [Bullous pemphigoid (BP)] の自己抗原をコードする *Bpag1* と同一であることが示された<sup>2)3)</sup>。*Dst* 遺伝子座からは、特異的プロモーターの使用や選択的スプライシングにより神経型 (*Dst-a*, 別名 *Bpag1a*)、筋肉型 (*Dst-b*, 別名 *Bpag1b*)、皮膚型 (*Dst-e*, 別名 *Bpag1e*, *BP230*) の三つのアイソフォームが産生されることが示されている<sup>4)5)</sup>。そのうちの *Dst-e* は上皮細胞-基底膜の細胞接着装置であるヘミデスモソームの裏打ちタンパク質として機能することが示されている。ヒト *Dst-e* の変異による皮膚疾患として EBS<sup>6)</sup> がある。この疾患では表皮基底細胞のヘミデスモソームの構造異常により、手足を中心に緊満性水

疱が生じる。また、ヒト *Dst-e* に対する自己抗体を産生する自己免疫疾患である BP も類似した臨床像を示す。*Bpag1e* ノックアウトマウスでは表皮下に水疱が生じるだけでなく、創傷治癒の遅延、皮膚の感覚神経線維の減少、ジストニア様の運動障害などが報告されている<sup>2)</sup>。

本研究では、理研バイオリソースセンターで樹立された自然発生突然変異 *dt* マウス<sup>7)</sup> の皮膚の表現型を解析した。このマウスの変異アリールは (*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* アリール)、*Dst* の Plakin ドメインをコードするエクソンに終止コドンが入るナンセンス変異が存在し、ホモマウスではジストニア様の運動障害を示すことが明らかになっている<sup>7)</sup>。プラキンドメインは神経型、筋肉型、皮膚型のすべてのアイソフォームに挿入されている共通のドメインであるので、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスは、皮膚にも症状があると予想される。そこで本研究では、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの皮膚症状を組織学的に検討した。

## 材料と方法

### マウス

今回用いた *dt* マウス (アリール名：*Dst<sup>dt-</sup>*

*23Rbre*) は Plakin ドメインにナンセンス変異を持ち、ホモ接合体で運動障害などの表現型を示す<sup>7)</sup>。ホモマウスは、生後 12 日齢ごろに神経症状の出現により同定可能である。マウス遺伝子診断は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) と制限酵素断片長多型 (RFLP) を組み合わせた方法で、以前の報告通りに行った<sup>7)</sup>。本研究では新潟大学動物実験施設で飼育した 24 日齢から 29 日齢の *Dst<sup>dt-23Rbre</sup>* マウスとその同腹仔を使用した。動物を用いた全ての実験は新潟大学動物実験倫理委員会の許可のもと、そのガイドラインに沿って行った。

#### マウス尾における真皮-表皮結合部の強度試験

29 日齢のマウス腹腔内にペントバルビタールナトリウム (125 mg/kg) を注射して安楽死させた後、表皮-真皮結合部の強度を測るために、マウスの尾を根元から強く引っ張った<sup>8)</sup>。真皮-表皮結合部の強度が低下しているマウスでは、尾の皮膚の剥離が観察される。コントロール (*Dst<sup>dt-23Rbre</sup>* ヘテロマウス) と *Dst<sup>dt-23Rbre</sup>* ホモマウスについて、同様に実験を行った。

#### マウスの灌流固定と組織採取

24 日齢から 29 日齢のマウス腹腔内にペントバルビタールナトリウム (125 mg/kg) を注射した。マウスの左心室より、5ml の 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と 30 ~ 50ml の 4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) / 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) を注入し灌流固定した。背中、腹部と足底の皮膚を採取し、4% PFA / 0.1 M PB で一晩後固定し、光学顕微鏡による観察 (免疫染色および *in situ* hybridization) 用の切片作成のためにパラフィン包埋を行った。電子顕微鏡による観察用の切片作成のために、上述の方法で採取した皮膚を 2% グルタルアルデヒド / 0.1 M PB と 1% 四酸化オスミウム / 0.1 M PB で後固定し、エタノール上昇系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。

#### パラフィン切片の作製

パラフィン包埋した皮膚組織をマイクローム (MICROM HM325, Thermo Fisher) を用いて薄

切し、10 $\mu$ m 厚のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片を MAS コートスライドガラス (MAS-01, 松浪硝子) に貼付し、37 $^{\circ}$ C で一晩乾燥させた。

#### ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

脱パラフィン処理した切片をヘマトキシリンと 10 分間反応させた。流水で洗ったのち、エオジンと 5 分間反応させた。その後、エタノールとキシレンで脱水してビオライト (応研商事, 東京) を用いて封入した。

#### 免疫染色

パラフィン切片をキシレンとエタノールで脱パラフィン処理し、10mM クエン酸バッファー溶液 (pH 6.0) 中で電子レンジにより抗原賦活化した (200W, 5 分)。蒸留水で洗浄した後、0.5% のスキムミルクを含む 0.01 M PBS で希釈したマウスモノクローナル抗 pan-Keratin 抗体 (KL1, 1:100, Immunotech, Marseille, France)<sup>9)</sup>、または、ウサギポリクローナル抗 Uchl1 (PGP9.5) 抗体 (1:1000, UltraClone Limited, Wellow, Isle of Wight, UK) にて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた後に蒸留水で洗浄した。続いて、0.5% のスキムミルクを含む 0.01 M PBS で希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識した抗マウス抗体 (1:200, MBL, 名古屋) にて 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後に蒸留水で洗浄した。最後に 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) を溶かした 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) に 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた溶液にて 37 $^{\circ}$ C で 5 ~ 10 分間発色させた。その後、エタノールとキシレンで脱水してビオライト (応研商事) を用いて封入した。

#### *in situ* hybridization 法

*Dst-C* プローブ (Genbank accession number NM\_001276764, nt 15994-17059) を用いた *in situ* hybridization 法は、論文に記載した通りに行った<sup>7)</sup>。

### 光学顕微鏡による観察

免疫染色を行った組織標本は正立型光学顕微鏡 (BX53, オリンパス) で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP74, オリンパス, 東京) で画像を取得した。得られた画像のトリミング等の編集は Microsoft PowerPoint 上で行った。

### 電子顕微鏡による観察

樹脂包埋した皮膚組織をウルトラミクロトーム (Ultracut N, Reichert-Nissei, 東京) を用いて薄切し、80nm 厚の超薄切片を作成した。超薄切

片に酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H7650, 東京) により観察を行った<sup>10)</sup>。

## 結 果

### *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> マウスにおける皮膚の肉眼所見と *Dst-e* の発現

*Dst* には組織ごとに異なる発現を示す3つのアイソフォーム (*Dst-a*, *Dst-b*, *Dst-e*) が存在し、このうち皮膚には *Dst-e* が発現する<sup>4)5)</sup> (図1A)。

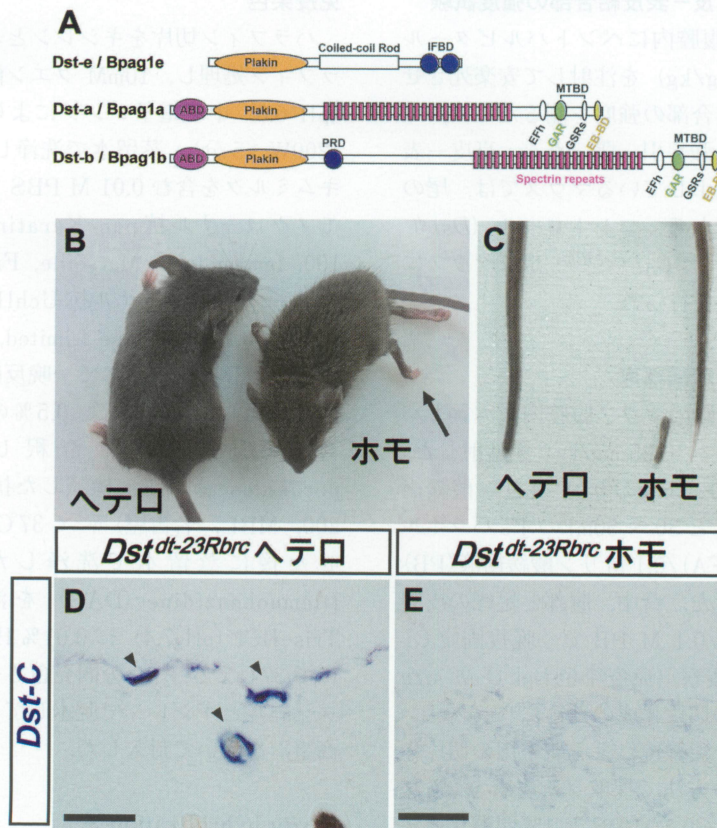


図1 *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> マウスの肉眼観察と、皮膚における *Dst* の遺伝子発現

A: *Dst* 遺伝子のアイソフォーム。 *Dst-e*, *Dst-a*, *Dst-b* の構造。

B: 29日齢の *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ヘテロマウスと29日齢の *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ホモマウス。 *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ホモマウスに四肢の捻転を認めた (矢印)。

C: 真皮-表皮結合部の強度試験。安楽死させたマウスの尾を強く引っ張ったところ、 *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ホモマウスの尾の表皮が剥離した。

D, E: 24日齢の *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> マウスの皮膚における *in situ* hybridization による *Dst* 遺伝子発現の検討。 *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ヘテロマウスの表皮では *Dst* mRNA のシグナルが検出された (矢頭) が、 *Dst*<sup>*dt-23Rbrc*</sup> ホモマウスの表皮では *Dst* mRNA は検出感度以下であった。スケールバー: 50 $\mu$ m。

コントロールの *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ヘテロマウスと *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの外見を比較したところ、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスでは四肢と体幹の捻転を認めた (図 1 B)。肉眼所見では明らかな皮膚の異常は観察されなかったが、表皮と真皮の接着強度を調べるために、マウスを麻酔薬の過剰投与により安楽死させた後に、尾を強く引っ張ると、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスにおいて表皮の剥離が観察された (図 1 C)。

続いて、*in situ* hybridization 法により、すべての *Dst* アイソフォームにハイブリダイズする *Dst-C* プロンプを用いて *Dst* mRNA を検出した。*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ヘテロマウスの表皮には陽性反応が認

められたが、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスには認められなかった。従って、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの皮膚において、*Dst-e* の発現が減少していることが示された (図 1 D)。

***Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの皮膚における表皮下水疱形成と感覚神経線維の減少**

次に、皮膚の組織学的な異常を見いだすために、コントロールの *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ヘテロマウスと *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの皮膚切片の HE 染色を行い観察したところ、表皮内と真皮内には明らかな構造上の異常はみられなかった。しかしながら、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスでは表皮下に複数の水疱が

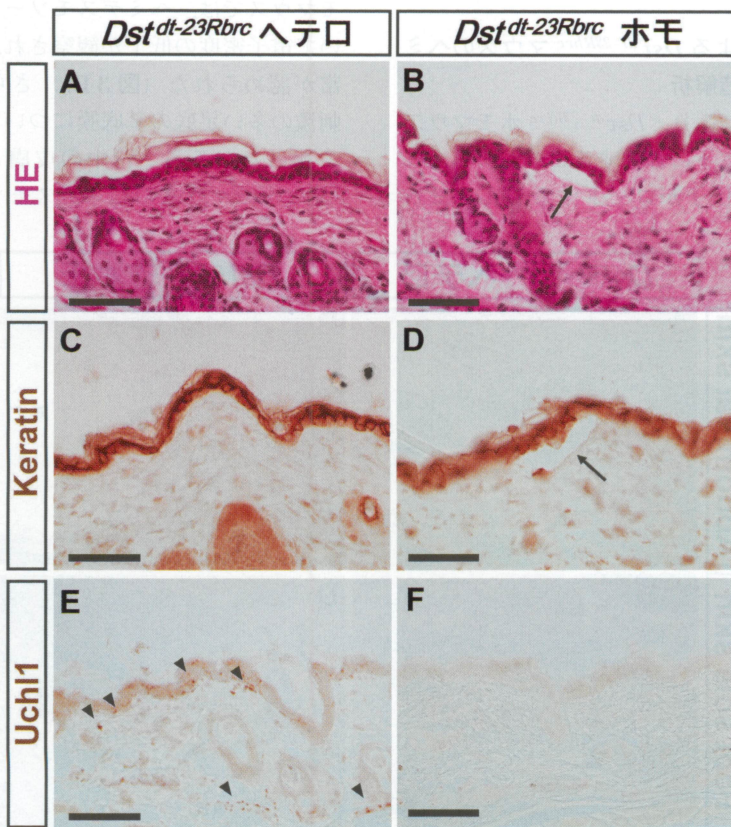


図 2 *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの組織学的所見

A, B : 24 日齢の *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの背中の皮膚の HE 染色. C, D : 抗 pan-Keratin 抗体による免疫染色. *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの表皮下に水疱が観察された (矢印). E, F : 抗 Uchl1(PGP9.5) 抗体による免疫染色. *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ヘテロマウスでは表皮と真皮に Uchl1 陽性神経線維 (矢頭) が認められる. 一方, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスでは殆ど認められない. スケールバー : 50 $\mu$ m.

観察された(図2A, B). 次に, 表皮を染色するために, 複数のケラチンに反応する抗pan-Keratin抗体(KL-1)で免疫染色すると, やはり, 表皮下に水疱が観察された(図2C, D).

皮膚における感覚神経線維の分布を観察するために, 神経細胞に反応する抗Uchl1 (PGP9.5)抗体で免疫染色した. Uchl1は, ユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素アイソザイムL1とも呼ばれ, C末端に付加されたユビキチンを加水分解する脱ユビキチン化酵素であり, 神経軸索などに豊富に存在する. *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ヘテロマウスでは皮膚の表皮と真皮においてUchl1陽性の感覚神経終末が観察されたが(図2E), *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスではそれらがほとんど見られなかった(図2F).

#### 電子顕微鏡観察による *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスのヘミデスモソームの構造解析

光学顕微鏡観察により, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスにおける水疱は表皮下に存在することが明らかになり, その原因遺伝子がコードする *Dst-e* はヘ

ミデスモソームの構成タンパクの一つであるので, 表皮基底膜細胞のヘミデスモソームに構造異常があると考えられる. そこで, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ヘテロマウスと *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスの腹部の皮膚の電子顕微鏡像を比較した. まず基底膜について検討したところ, 基底板の透明層, 緻密層, 線維網状層の3層において明らかな異常は認められず, 電子顕微鏡観察した視野内では表皮基底細胞と基底膜間の乖離は認められなかった. 次に, 表皮基底細胞のヘミデスモソームの構造を検討した. ヘミデスモソームの細胞質側には電子密度の高い部分があり, そこに多数のケラチン線維(トフィラメント)がヘアピン状に入り込んで細胞膜の裏打ちをしている(図3A). *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスでは, ヘミデスモソームの細胞質側において電子密度の低下が観察され, 裏打ち構造に異常が認められた(図3B). さらに, より機械的刺激の多い足底の基底膜についても比較検討をおこなったところ, 背中の皮膚と同様に, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスのヘミデスモソームにおけるケ

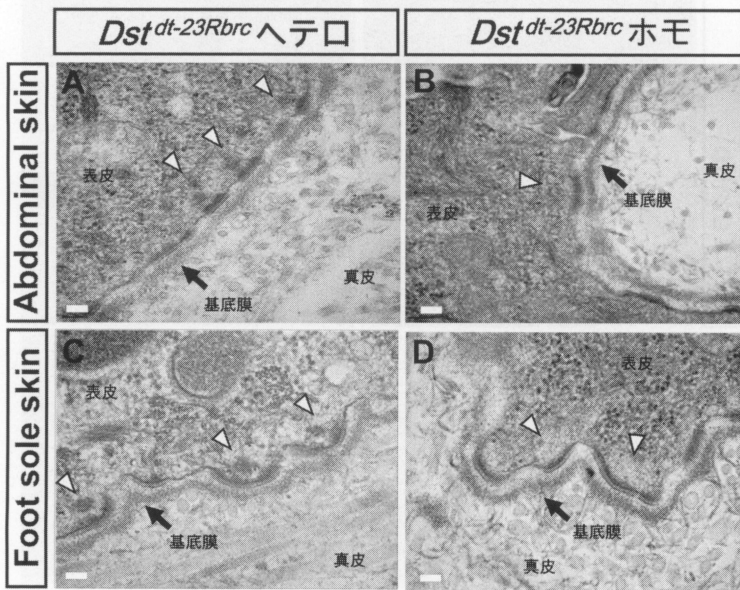


図3 *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの皮膚の電子顕微鏡観察

A-D: *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスにおける皮膚の電子顕微鏡像 (A, B: 腹部, C, D: 足底). 基底膜 (矢印) には, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ヘテロマウスと *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスの間で明らかな構造の違いは認められない. ヘミデスモソームの構造を比較すると, コントロールの *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ヘテロマウスで見られるヘミデスモソームの裏打ち構造が, *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>*ホモマウスでは観察できない (矢頭). スケールバー: 100nm.

ラチン線維の裏打ち構造異常が観察された (図3 C, D).

考 察

本研究により, *Dst* 遺伝子の Plakin ドメインにナンセンス変異をもつ *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスは表皮下水疱をもち, 表皮基底細胞のヘミデスモソームの構造異常があることが明らかになった. ヘミデスモソームの裏打ちタンパク質の一つである *Dst-e* の欠失により, ケラチンサイトと基底膜との接着が弱くなり, 表皮下に水疱が出来たと考えられる. *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスはヒト遺伝性皮膚疾患である EBS のモデルマウスになると考えられる.

*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスによる EBS の病態メカニズムの解析

本研究で *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスの表皮と真皮が剥がれやすくなり, 表皮下に水疱ができることが明らかになった. 表皮下に水疱が生じる疾患として, 上皮細胞-基底膜間の接着強度が低下する EBS がある. EBS の原因遺伝子としてヘミデスモソームの構成分子をコードする *keratin 14*<sup>13)14)</sup>, *keratin 5*<sup>14)15)</sup>, *plectin*<sup>16)</sup> が以前から知られてい

るが, 2010 年に *Dst-e* の変異による EBS の発症例が報告された<sup>6)</sup>. この症例では *Dst-e* の Coiled-coil ドメインにナンセンス変異を持ち, 踵の周りのほか, 顔や体幹, 四肢の近位部に水疱やびらんが生じる. さらに, 電子顕微鏡観察で, ケラチンサイトが基底膜に接着するための装置であるヘミデスモソームの裏打ち構造の消失も確認されている. 皮膚において *Dst-e* はヘミデスモソームの構成タンパク質の一つであり, ヘミデスモソームの裏打ち構造を形成する際に, ケラチンと BPAG2 (XVII 型コラーゲン, BP180),  $\beta 4$  インテグリンに結合する. つまり *Dst-e* は, 別のヘミデスモソーム裏打ちタンパク質であるプレクチンと同様に, 細胞接着因子とケラチンの仲介をして, ケラチン線維を細胞外の基底膜に係留する役割をしている<sup>5)</sup> (図4). *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* ホモマウスでは, ヘミデスモソームの裏打ち部分の電子密度が低下したが, これは *Dst-e* の欠失によりヘミデスモソームの裏打ち部分においてケラチンと BPAG2 を係留できなくなったことを反映していると考えられる. *plectin* を欠失したマウスにおいても表皮下に水疱が生じることが報告されており<sup>12)</sup>, ヘミデスモソームの裏打ち構造の異常は表皮基底細胞と基底膜との接着を減弱させて, 機械的的刺激により表皮下に水疱を生じさせると考

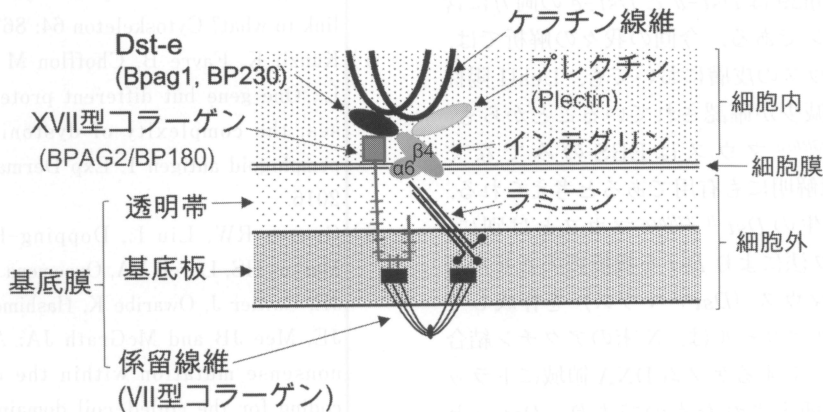


図4 ヘミデスモソーム構成分子群の模式図

*Dst-e* は, ヘミデスモソームの裏打ちタンパク質として機能し, ケラチンと細胞接着因子 (インテグリンや BP180) に結合し, ケラチン線維をヘミデスモソームに係留している. プレクチンも同様に, ケラチンとインテグリンに結合し, ケラチン線維をヘミデスモソームに係留することが知られている.

えられる。尾の皮膚が剥離しやすくなるのも、同様の理由だと思われる。今回の研究により、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスは、水疱形成やヘミデスモソムの裏打ち構造の異常など、*Dst-e* に変異を持つ EBS 患者と同様の皮膚症状を示した。従って、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスは EBS の病態解明に有用な動物モデルになると期待される。

### Dystonin 遺伝子変異による表現型の多様性

*Dst* 遺伝子座からは、組織ごとに異なるアイソフォームが発現するために、*Dst* 遺伝子の変異挿入部位によって多様な病態を示す可能性がある。例えば、*Dst* の神経型アイソフォームである *Dst-a2* の変異は、成人型の遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー VI 型 [Hereditary sensory and autonomic neuropathy type VI (HSAN6)] の原因となる<sup>11)</sup>。この患者では、痛覚や触覚、振動覚といった感覚の低下、発汗減少、瞳孔異常、消化管や生殖器の機能低下といった自律神経異常が生じ、病理所見として皮膚において Uchl1 陽性の感覚神経線維と自律神経線維両方の減少が示されている。ごく最近、DST のコンパウンドヘテロ (c.806C>T (p.H269R) in exon 7, c.3886A>G (p.R1296X) in exon 29) の遺伝子型で、皮膚と神経系などに多様な症状を示す 17 歳女性の症例が報告された<sup>17)</sup>。興味深いことに、exon7 は *Dst-a* に、exon29 は *Dst-a* と *Dst-e* の両方に含まれるエクソンである。今回の我々の解析では、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスの皮膚においても、Uchl1 陽性の神経線維の減少が確認されていることから、この、*Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスは EBS のみでなく HSAN6 の病態解明にも有用であると考えられる。我々は自然発生の *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウスとは別に、遺伝子トラップ法により *Dst* を機能喪失させた遺伝子トラップマウス (*Dst<sup>Gt</sup>* マウス) を作成している<sup>18)</sup>。*Dst<sup>Gt</sup>* アリアルは、N 末のアクチン結合ドメインをコードするゲノム DNA 領域にトラップカセットが挿入されたものであり、*Dst-a* と *Dst-b* のみを遺伝子トラップする。従って、*Dst<sup>Gt</sup>* マウスでは、皮膚症状が見られないと予想される。今後は *Dst<sup>Gt</sup>* マウスと *Dst<sup>dt-23Rbrc</sup>* マウス

の皮膚症状を比較検討することで、*Dst* 遺伝子の遺伝子変異により EBS が生じるメカニズムについての理解が深まることが期待される。

### 謝 辞

本研究を進めるにあたり、ディスカッションをして頂いた皮膚科学教室の林良太先生をはじめ、抗 Uchl1 (PGP9.5) 抗体を分与くださった新潟大学歯学部の大島勇人先生、斎藤浩太郎先生、実験補助を行っていただいた高橋誠治氏、森由紀子博士、山際紗斗子氏、今田夕焼氏に御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Duchon LW, Strich SJ and Falconer DS: Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice (Dystonia musculorum). *Brain* 87: 367-378, 1964.
- 2) Guo L, Degenstein L, Dowling J, Yu QC, Wollmann R, Perman B and Fuchs E: Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 81: 233-243, 1995.
- 3) Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J and Kothary R: The mouse *dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet* 10: 301-306, 1995.
- 4) Young KG and Kothary R: Dystonin/Bpag1—a link to what? *Cytoskeleton* 64: 867-905, 2007.
- 5) Künzli K, Favre B, Chofflon M and Borradori L.: One gene but different proteins and diseases: the complexity of dystonin and bullous pemphigoid antigen 1. *Exp Dermatol* 25: 10-16, 2016.
- 6) Groves RW, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Markus HS, Lovell PA, Ozoemena L, Lai-Cheong JE, Gawler J, Owaribe K, Hashimoto T, Mellerio JE, Mee JB and McGrath JA: A homozygous nonsense mutation within the dystonin gene coding for the coiled-coil domain of the epithelial isoform of BPAG1 underlies a new subtype of autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol* 130: 1551-1557,



- 2010.
- 7) Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MI, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A and Takebayashi H: Characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice: Implications for central nervous system abnormality. *Neurobiol Dis* 96: 271-283, 2016.
  - 8) Sproule TJ, Roopenian DC and Sundberg JP: A direct method to determine the strength of the dermal-epidermal junction in a mouse model for epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 6: 453-455, 2012.
  - 9) Viac J, Reano A, Brochier J, Staquet N-J and Thivolet J: Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody (KL1). *J Invest Dermatol* 81: 351-354, 1983.
  - 10) Eady RAJ: Transmission electron microscopy. In D Skerrow, CJ Skerrow (Eds.) *Methods in Skin Research*. Wiley, Chichester, pp.1-36, 1985.
  - 11) Manganelli F, Parisi S, Nolano M, Tao F, Paladino S, Pisciotta C, Tozza S, Nesti C, Rebelo AP, Provitera V, Santorelli FM, Shy ME, Russo T, Zuchner S and Santoro L: Novel mutations in *Dystonin* provide clues to the pathomechanisms of HSN-VI. *Neurology* 88: 2132-2140, 2017.
  - 12) Ackerl R, Walko G, Fuchs P, Fischer I, Schmuth M and Wiche G: Conditional targeting of plectin in prenatal and adult mouse stratified epithelia causes keratinocyte fragility and lesional epidermal barrier defects. *J Cell Sci* 120: 2435-2443, 2007.
  - 13) Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS and Fuchs E: Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301-1311, 1991.
  - 14) Bonifas JM, Rothman AL and Epstein EH Jr: Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254:1202-1205, 1991.
  - 15) Lane EB, Rugg EL, Navsaria H, Leigh IM, Heagerty AH, Ishida-Yamamoto A and Eady RA: A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356: 244-246, 1992.
  - 16) McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM and Uitto J: Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev* 10: 1724-1735, 1996.
  - 17) Cappuccio G, Pinelli M, Torella A, Alagia M, Auricchio R, Staiano A, Nigro V, TUDP and Brunetti-Pierri N: Expanding the phenotype of DST-related disorder: A case report suggesting a genotype/phenotype correlation. *Am J Med Genet A* 173: 2743-2746, 2017.
  - 18) Horie M, Watanabe K, Bepari AK, Nashimoto J, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita A, Yamamura K and Takebayashi H: Disruption of actin-binding domain-containing *Dystonin* protein causes *dystonia musculorum* in mice. *Eur J Neurosci* 40: 3458-3471, 2014.

(平成 29 年 9 月 19 日受付)