

新規 Fibrillin-1 変異マウスの皮膚病変の解析

Choi Junhyeok (筑波大学 生物学類)

指導教員：柳沢 裕美 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【イントロダクション】

Stiff skin syndrome (SSS) は毎年罹患率 10 (人口 10 万対) の疾患であり、限局性と全身性に区別される。限局性 SSS の場合は皮膚のみが硬くなる病気で、内臓を侵さない。一方、全身性 SSS は皮膚を含め、内臓まで硬くなり、臓器不全を起こす疾患である。

SSS の発病要因は 15p21.1 に位置する Fibrillin-1 (FBN1) 遺伝子の変異による先天性とベンゼンやトルエンなどの化学物質の体内蓄積による後天性が報告されている。先行研究で、先天性 SSS は TNF α 、IL-6、TGF β 2 を含むサイトカインの分泌促進と体内で過剰に合成されたコラーゲンが真皮に蓄積する自己免疫疾患であることが知られている。また、FBN1 の 37-38 エクソンや 50-51 エクソンに位置する TGF β -binding (TB) ドメインや Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) モチーフの変異が疾患に関連していることが報告しているが、詳しい発症機序は未だに明らかになっていない。

近年、我々の研究グループは大動脈解離患者から FBN1 遺伝子の新規変異を同定した。この変異を有するモデルマウスを作製したところ、SSS 患者に類似した皮膚の表現型を示すことが明らかになった。

【目的】

本研究では、新規 FBN1 遺伝子変異マウスを用いて、SSS 発症の病理学的メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

・実験に使用したマウス：FBN1 遺伝子変異マウスの 2-3 週齢のホモ個体を使用し、対照群として野生型マウスを利用した。

・組織学的解析：同週齢の野生型マウスと変異型マウスを用意し、背側の皮膚を採取し、凍結ブロックを作製した。その後、cryostat (NX70) で 10 μ m 薄切切片を作製し、Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色、Masson Trichrome 染色及び Harts 染色にて皮膚組織の組織学的分析を行った。

・免疫蛍光染色的解析：上記と同様に作成した皮膚切片を用いて、免疫蛍光染色を行った。その際、それぞれの一次抗体は collagen1 (AB765P, Millipore)、collagen4 (ab6586, Abcam)、fibrillin-1 (Dr.Lynn より供与)、elastin (RA75, EPC) を使用した。核の染色には Hoechst を使用した。

・皮膚硬化・弾性評価：マルチ皮膚測定器 (MPA6、インテグラル)、皮膚粘弾性測定プローブ (CT580、同上)、皮膚押下型硬度測定プローブ (IDM800、同上) を使い、皮膚硬度と弾性を測定した。計測はマウスの背側を Fascia 層まで切り取り、皮膚をティッシュの上に固定し、測定した。

【結果】

・皮膚構造解析：H&E 染色を行ったところ、表皮・真皮・脂肪層の肥厚は観察されなかった。

・コラーゲン及びエラスチンの蓄積：コラーゲン・エラスチン蓄積を分析するため、同週齢の野生型と変異型マウスの皮膚に Masson Trichrome 染色・Harts 染色・免疫蛍光染色を行ったところ、それぞれの発現量・構造差は確認できなかった。

・FBN1 発現量及び構造異常：FBN1 発現量及び構造を調べるため、免疫蛍光染色をしたところ、真皮側で変異型マウスの FBN1 の発現量が低く、Fibrillin-1 が断片化していた。(図 1.A)

・皮膚硬度及び弾性評価：野生型と変異型マウスから、皮膚の硬度を表す R_0 値と弾性を表す R_5 値を取ったところ、有意な差は認められなかった。

(図 1.B)、

・Panniculus muscle 及び Fascia の異常：表皮・真皮・脂肪層からの構造異常が観察されなかったため、脂肪層より下部組織の Panniculus muscle 及び Fascia を観察したところ、変異型マウスでエラスチン線維の断裂を認めた。(図 1.C)

【考察】

先行研究の FBN1 変異モデルでは、表皮・真皮肥厚や脂肪層の萎縮、真皮内のコラーゲン蓄積が観察された。一方、我々の新規 FBN1 変異マウスは真皮や表皮での構造異常、コラーゲン蓄積は観察できなかった。しかし、皮膚下部組織である Panniculus muscle 及び Fascia の弾性繊維の断裂が確認できた。よって、新規 FBN1 変異マウスは、従来報告されている ECM が豊富に分布する真皮層の異常による stiff skin ではなく、筋肉層の弾性繊維の異常による stiff skin を発症していると考えられた。

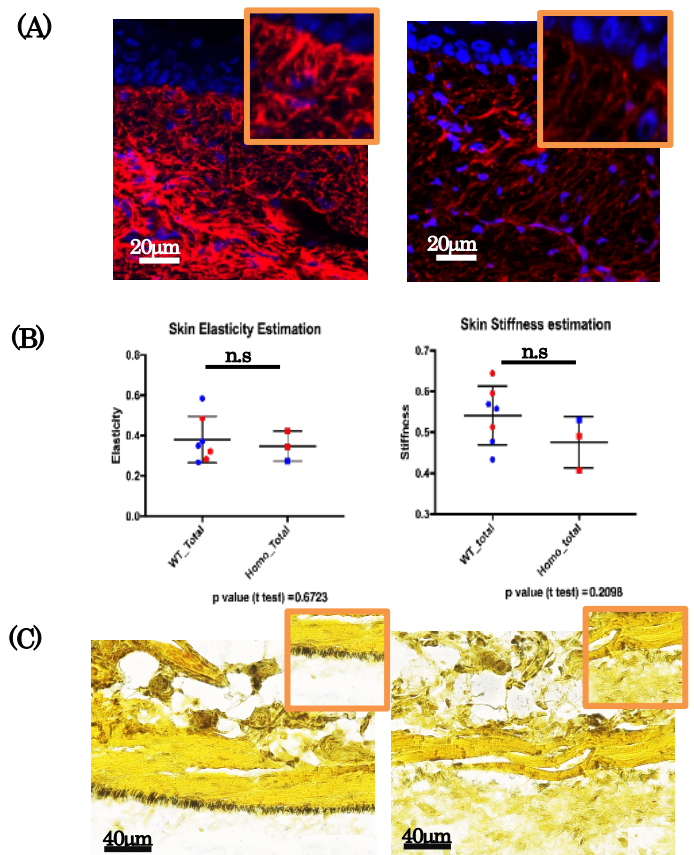


図 1.(A) 真皮での FBN1 構造、左が野生型、右が変異型 (B) 皮膚硬化・弾性評価結果、(C) Panniculus muscle 及び Fascia におけるエラスチン構造、左が野生型、右が変異型。