

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 西村 真智子

### 学位論文題名

Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation

(17型コラーゲンの細胞外領域での切断は正常な基底膜構築に不可欠である)

【背景】皮膚の表皮基底細胞は、基底膜を介して真皮と強固に結合している一方、分化増殖のため常に解離している。正常な基底膜の構築には、ヘミデスモゾームタンパクや細胞外基質タンパク (Extracellular matrix, ECM) が正しく発現することが不可欠であり、ヒトにおいては一分子であっても発現が欠如すると、正常な基底膜が形成されず表皮水疱症を発症する。しかし、ヘミデスモゾームタンパクや ECM タンパクが翻訳後にうける生理的な切断に関する重要性は十分に解明されていない。本研究ではヘミデスモゾーム構成分子の1つである17型コラーゲン (Collagen XVII, COL17) のC末端での切断が、基底膜構築に不可欠であることを示す。タンパクの未知の役割を明らかにするためには、遺伝性疾患の解析がその一助となるが、基底膜の重層化、手指の皮膚硬化など特徴的な所見を呈するCOL17に p. R1303Q 変異を有する先天性表皮水疱症を経験した。R1303Qが存在するCOL17のC末端付近はラミニン332との結合部位であり、COL17がC末端での切断をうける部位とされていることから、変異の部位は生理学的に重要であると推測した。

【目的】COL17のC末端にR1303Q変異を生じた際の病態生理を解明する。R1303Q変異に伴う基底膜の重層化機序を解明し、皮膚基底膜の構築機序の解明に迫る。

【対象と方法】R1303Q変異を有するCOL17リコンビナントタンパクを作成し、ラミニン332との親和性、COL17のC末端での切断による変化の有無を解析した。患者由来の表皮角化細胞 (R1303Q keratinocyte, R1303Q KC) と正常ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte, NHEK) の基底膜構成分子の発現を、遺伝子レベル、タンパクレベルで解析し、これらの変化がR1303Qを有する表皮角化細胞の遊走、接着、形態や真皮を構成する分子の発現に与える影響を解析した。

【結果】正常およびR1303Q変異を有するCOL17リコンビナントタンパクの間でラミニン332との結合能に差はなかったが、変異によりCOL17のC末端での切断が阻害されていることを示した。この結果と一致して、R1303Q KCのECM中にはC末端での切断をうけないCOL17が増え、さらにラミニン332の沈着量も増加していた。次にR1303Q KCを用いた *in vitro* の解析では、ECMへのラミニン332の沈着が亢進していた一方で、遺伝子レベルでのラミニン332の発現はR1303Qで抑制されていた。以上の結果から、ECMへのラミニン332沈着がふえた原因は、ラミニン332の過剰発現ではなく、C末端での切断等のCOL17の翻訳後のプロセスが関与している可能性が示唆された。次にECM中のラミニン332が細胞の接着、遊走、形態に与える影響を解析した。R1303Q変異により接着能には変化はなかったが、遊走能が低下し細胞面積は大きくなった。さらに臨床的に線維化をきたし基底膜の重層化がみ

られる病態では5型コラーゲン (COL5) の発現が亢進していることに注目し、R1303Q KC での COL5A1 の過剰発現、患者皮膚の真皮で COL5 の過剰発現を示した。

#### 【考察】

NC16A 領域での COL17 の切断は角化細胞の遊走能に関与し、基底膜から角化細胞が解離する際に重要であると推測されていたが、COL17 の C 末端での切断の生理学的な重要性は明らかにされていなかった。本研究では、R1303Q 変異が COL17 の C 末端での切断を阻害することを明らかにした。さらに変異をもつ患者角化細胞を用いて、C 末端での切断が阻害された結果ラミニン 332 の異所性の沈着が生じ、これが基底膜構築異常の原因であることを示した。

ラミニン 332 は基底膜構築に重要な分子で、インテグリン $\alpha 3\beta 1$  やインテグリン $\alpha 6\beta 4$  を介して COL17 と相互作用を有する。*In vitro* では遊走する表皮角化細胞はラミニン 332 を ECM 中へ分泌し、ラミニン 332 は細胞の遊走や接着に影響を与える。本研究でも R1303Q KC の ECM へのラミニン 332 沈着量が増えたことが、遊走能低下や細胞面積の拡大につながったことを示した。

*In silico* の予測とは異なり、本研究では R1303Q 変異が COL17 とラミニン 332 の結合能を変化させないことを明らかにした。さらに R1303Q KC 内でのラミニン 332 の遺伝子発現量は減少したが、ECM でのラミニン 332 の沈着量は増加したことを示した。ここで COL17 の NC4 領域はラミニン 332 との結合に重要な部位であることに注目した。*In vivo* で COL17 を 97kDa に切断するプロテアーゼは明らかになっていないが、セリンプロテアーゼであるプラスミンは COL17 を 97kDa に切断し、プラスミンによる COL17 の C 末端での切断部位は分子量に基づき、R1303Q 存在する NC4 領域と推測されている。正常および R1303Q を有する COL17 リコンビナントタンパクをプラスミンで切断した結果、R1303Q 変異が COL17 の NC4 領域での切断を阻害していることを明らかにした。さらにその結果として ECM へのラミニン 332 の沈着量が増えることを示した。

基底膜の重層化は COL17 の R1303Q 変異のほか、Kindlin-1、インテグリン $\alpha 3$ 、4型コラーゲン、V型コラーゲンなどの遺伝子異常でもみられる。これらの事実は、角化細胞内および ECM に存在する分子が基底膜形成に関与していることを示唆しているが、これらの疾患に伴い基底膜が重層化する機序だけでなく、正常の基底膜が形成されるメカニズムは殆ど解明されていない。本研究では COL17 の C 末端での切断が阻害されたことによりラミニン 332 の異所性の沈着がみられ、これが基底膜の重層化を引き起こしたことを示した。正常な基底膜構築のためには ECM タンパクの分解が正しく制御される必要があることを世界で初めて解明した。

COL17 に R1303Q 変異を有する表皮水疱症患者では、手指などに硬化がみられる。一方でキンドラー症候群やインテグリン $\alpha 3$  欠損では、皮膚の硬化はみられない。本研究では *in vitro* で R1303Q KC での COL5A1 の過剰発現と、患者皮膚の真皮で COL5 の過剰発現を示した。COL5 は発現量が少ないが線維化や線維の太さを調節する際に重要な役割をもち、表皮基底細胞で COL5 が過剰発現するマウスでは基底膜の重層化を認める。これらを考慮すると、COL5 の発現亢進は一部ではあるが、R1303Q 変異に関連した線維化や基底膜の重層化に関与していると考えられる。

【結論】ECM タンパクのプロセッシングを正しく制御することが皮膚基底膜の形成には不可欠である。