

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890006

研究課題名（和文）劣性栄養障害型表皮水疱症患者における変異型 7 型コラーゲンの生理学的機能の解明

研究課題名（英文） New insight into genotype-phenotype correlation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa

研究代表者

新熊 悟 (SHINKUMA SATORU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00613788

研究成果の概要（和文）：劣性栄養障害型表皮水疱症は表皮と真皮を接着させる 7 型コラーゲン遺伝子が 2 本とも異常を呈することにより発症する。大多数の患者では、2 本の 7 型コラーゲン遺伝子にそれぞれ異なる遺伝子変異を有するため、遺伝子変異からその臨床予後を推測することは困難である。2 本の 7 型コラーゲン遺伝子のうち、1 本の遺伝子に全く 7 型コラーゲンを発現しない変異を有する患者を抽出し、残りの遺伝子変異と臨床重症度、タンパク発現量、超微細構造における相関関係を解明した。

研究成果の概要（英文）：Because most cases of recessive dystrophic epidermolysis bullosa are caused by compound heterozygous *COL7A1* mutations, it is usually difficult to assess the clinical phenotype and function of each mutant type VII collagen derived from different mutations. To clarify this question, genotype-phenotype correlation was analyzed in patients specifically having common *COL7A1* mutations on one allele, which is known to lead to complete loss of type VII collagen expression through a premature termination codon.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮水疱症・遺伝子変異検索・免疫組織学的検査・電子顕微鏡学的検査

1. 研究開始当初の背景

皮膚の表皮と真皮は境界部接合構成タンパクにより強固に接着しているため、皮膚を摩擦しても表皮と真皮は解離しない。表皮真皮境界部接合構成タンパクの最も重要な分子の一つである VII 型コラーゲン (COL7) は 3 量体を形成し、これらが互いに重合することにより機能する。この COL7 が先天的に

減少、もしくはミスセンス変異などにより機能異常が生じた結果、表皮-真皮間が脆弱になり容易に水疱を形成する栄養障害型表皮水疱症 (dystrophic epidermolysis bullosa; DEB) が生じる。さらに DEB は遺伝形式により常染色体優性型と、より重症である常染色体劣性型 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa; RDEB) に分類され

る。

RDEB 患者の臨床的重症度は COL7 の発現量とその機能異常によって左右されるため、COL7 タンパクの機能を解析することは患者の予後を予測する上で重要である。しかし、RDEB 患者では COL7 をコードする 2 つの対立遺伝子にそれぞれ異なる変異をもつ事が多く、単一の変異型 COL7 をそれぞれ別々に機能解析することは困難である。

日本人に頻発し、COL7 発現の完全欠損をきたす早期終止コドン変異として、c. 5818delC、c. 6573+1G>C が報告されている³⁾。そこで、COL7 の発現が完全欠損となる COL7 遺伝子変異 (c. 5818delC、c. 6573+1G>C) を片方のアリルに有する患者を解析することで、その対立遺伝子のみから産生される単一の変異型 COL7 の生理機能を免疫学的手法、電子顕微鏡学的手法、分子生物学的手法を用いて解明することが可能になる。

2. 研究の目的

(1) 変異型 COL7 の発現量と臨床重症度の比較解析

COL7 の発現が完全欠損となる COL7 遺伝子変異 (c. 5818delC、c. 6573+1G>C) を片方のアリルに有する RDEB 患者の皮膚に対し、抗 COL7 抗体を用いた蛍光抗体法により単一の変異型 COL7 の発現量と臨床重症度の比較解析し、変異型 COL7 の発現量から予後を推測可能なものにする。

(2) 変異型 COL7 の超微細構造と臨床重症度の比較解析

COL7 の発現が完全欠損となる COL7 遺伝子変異 (c. 5818delC、c. 6573+1G>C) を片方のアリルに有する RDEB 患者の皮膚を用いて、電子顕微鏡学的に COL7 が重合することにより構成される係留線維の超微細構造を解析し、係留線維の形態学的異常から予後を推測可能なものにする。

3. 研究の方法

(1) RDEB 患者の生体試料収集

現在、研究代表者が所属する研究科には数名の RDEB 患者が通院している。また、当施設では、通院している患者のみならず、日本全国から数十名にのぼる RDEB 患者に関するコンサルトを受けている。当研究科がコンサルトを受けている施設と密に連携し、インフォームドコンセントを得て、RDEB 患者の DNA サンプルや皮膚組織を含めた生体試料および患者情報を収集する。

(2) RDEB 患者における COL7 遺伝子変異解析

当研究室ですでに稼働している手法である

ダイレクトシーケンス法や制限酵素法により、RDEB 患者の COL7 遺伝子解析を行う。

(3) 免疫組織学的手法を用いた生体内変異型 COL7 の発現量の解析

収集した RDEB 患者皮膚組織に対し、全世界で広く使用されている抗 COL7 抗体 (LH7.2) を用いて蛍光抗体法を行い、生体内における変異型 COL7 の発現量を比較検討する。

(4) 電子顕微鏡学的手法を用いた生体内変異型 COL7 の超微細構造の解析

収集した RDEB 患者皮膚組織を用いて、COL7 が重合することにより構成される係留線維の超微細構造を電子顕微鏡学的に解析する。

4. 研究成果

(1) RDEB 患者の生体試料収集

本研究の目的に合致する日本人に頻発し、COL7 発現の完全欠損をきたす二つの早期終止コドン変異 (c. 5818delC、c. 6573+1G>C) のうち、いずれかの変異を片方のアリルに有する 12 名の RDEB 患者の DNA サンプルや皮膚組織を含めた生体試料および患者情報を収集した。

(2) RDEB 患者における COL7 遺伝子変異解析

ダイレクトシーケンス法および制限酵素法により、RDEB 患者の COL7 遺伝子解析を行った。COL7 発現の完全欠損をきたす二つの早期終止コドン変異を有するアリルの対となるアリルには、ミスセンス変異 (5 名)、ナンセンス変異 (3 名)、欠失変異 (2 名)、スプライスサイト変異 (2 名) が認められた (図 1)。

(3) 免疫組織学的手法を用いた生体内変異型 COL7 の発現量の解析

一方のアリルに早期終止コドン変異である c. 5818delC もしくは c. 6573+1G>C、もう一方のアリルにナンセンス変異、欠失変異、スプライスサイト変異のいずれかを有する患者では、免疫組織学的検査において COL7 の発現量と重症度は相関していた。一方、片方のアリルに c. 5818delC もしくは c. 6573+1G>C、もう一方のアリルにミスセンス変異を有する患者では、すべての症例で、COL7 の発現量はほぼ正常ないし軽度低下している程度であったが、R2063W や G2316R を有する患者の臨床症状は非常に重篤であり、G1815R もしくは G2623S を有する患者では中等～重症、R1957Q を有する患者では非常に軽症であった (図 2)。

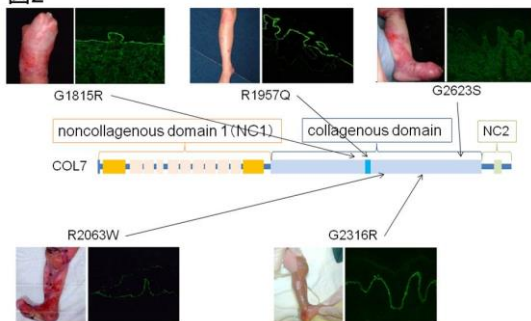
Table 1 COL7A1 mutations identified in RDEB patients with c.5818delG or IVS81 ds+1 G>C

| Case no. | Age/sex | Allele 1 | Allele 2 | DEB phenotype | Exon/intron | Protein location | Consequence | IF |
|----------|---------|---------------------|-----------|--------------------|-------------|------------------|-------------|----------|
| | | <i>Nonsense</i> | | | | | | |
| 1 | 17/M | E2857X | 6573+1G>C | Generalized other | exon 116 | Acidic/THC | PTC/PTC | Positive |
| 2 | 9/F | E2857X | 6573+1G>C | Generalized other | exon 116 | Acidic/THC | PTC/PTC | Positive |
| 3 | 43/M | E2857X | 5818delC | Generalized other | exon 116 | Acidic/39AA | PTC/PTC | Positive |
| | | <i>Deletion</i> | | | | | | |
| 4 | 0/M | 1474delB | 5818delC | Severe generalized | exon 11 | Fn3/39AA | PTC/PTC | Negative |
| 5 | 0/M | 5756delG | 6573+1G>C | Severe generalized | exon 69 | THC/THC | PTC/PTC | Negative |
| | | <i>Splice site</i> | | | | | | |
| 6 | 60/F | c.7272G>A | 6573+1G>C | Generalized other | exon 94 | THC/THC | Spl/PTC | weak |
| 7 | 0/F | 8109+2T>A | 5818delC | Generalized other | intron 109 | THC/39AA | Spl/PTC | weak |
| | | <i>Missense</i> | | | | | | |
| 8 | 44/F | G1815R | 5818delC | Generalized other | exon 63 | THC/39AA | GS/PTC | Positive |
| 9 | 5/M | R1957Q | 6573+1G>C | Generalized other | exon 72 | 39AA/THC | Mis/PTC | Positive |
| 10 | 0/M | R2063W | 5818delC | Generalized other | exon 74 | THC/39AA | Mis/PTC | Positive |
| 11 | 0/F | G2316R | 6573+1G>C | Generalized other | exon 89 | THC/THC | GS/PTC | Positive |
| 12 | 1/M | G2623S | 5818delC | Generalized other | exon 105 | THC/39AA | GS/PTC | Positive |

Novel mutations detected in this investigation are in bold.

Fn3, fibronectin III-like domains; THC, triple helical collagenous domain; AA39, 39 amino acid 'hinge' region; PTC, Premature termination codon mutation; Spl, Splice site mutation; GS, Glycine substitution mutation; Mis, Missense mutation.

図2



(4) 電子顕微鏡学的手法を用いた生体内変異型 COL7 の超微細構造の解析

臨床症状が非常に重篤であるにも関わらず、免疫組織学的染色において COL7 の発現量はほぼ正常ないし軽度低下している程度であった R2063W や G2316R を有する患者皮膚において、電子顕微鏡学的所見では係留繊維は低形成で、非常に細い形態を示していた。

(5) まとめ

ミスセンス変異を有する RDEB 患者では重症度はミスセンス変異によって産生された各々の変異 COL7 の機能と強い相関関係があり、電子顕微鏡学的検査などを用いた超微細構造の解析が患者の予後を推測するうえで重要であることが分かった。今後これらの患者をさらに集積し、単一の変異を有する遺伝子から産生された COL7 について遺伝子型-表現型の相互関係を系統立てて解析することにより、単一の COL7 遺伝子変異から将来的に発症し得る合併症といった予後などを推測することが可能になると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Satoru Shinkuma, Daisuke Sawamura, Yasuyuki Fujita, Hiroyuki Kawasaki, Hiroyuki Nakamura, Masukazu Inoie, ataru Nishie, Hiroshi Shimizu, Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient, *Acta Dermato-Venereologica*, 査読有, in press

(2) Satoru Shinkuma, Wataru Nishie, Witold K. Jacyk, Ken Natsuga, Hideyuki Ujiie, Hideki Nakamura, Masashi Akiyama, Hiroshi Shimizu, A Novel Keratin 5 Mutation in an African Family with Epidermolysis Bullosa Simplex Indicates the Importance of the Amino Acid Located at the Boundary Site Between the H1 and Coil 1A Domains, 査読有, in press

DOI: 10.2340/00015555-1538

(3) Hiroko Umemoto, Masashi Akiyama, Takanori Domon, Toshifumi Nomura, Satoru Shinkuma, Kei Ito, Takuya Asaka, Daisuke Sawamura, Jouni Uitto, Motohiro Uo, Yoshimasa Kitagawa, Hiroshi Shimizu, Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts, *The American Journal of Pathology*, 査読有, 181巻、2012、1659-1671

DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.018

〔学会発表〕(計2件)

① 新熊 悟、ケラチン5のコイル1A領域N末端部にミスセンス変異を生じた単純型表皮水疱症、第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2012年09月30日、ロイトン札幌(北海道)

② 新熊 悟、Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient、2012年05月10日、Raleigh Convention Center (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新熊 悟 (SHINKUMA SATORU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00613788