

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591327

研究課題名(和文)

ラミニン5欠損ヒト皮膚を用いた基底膜構成成分の生体内相互作用の免疫電顕的解析

研究課題名(英文)

Immunoelectron microscopic analysis of in vivo interaction of basement membrane components using human skin lacking laminin 5.

研究代表者

増永 卓司 (MASUNAGA TAKUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70424140

研究成果の概要(和文): 表皮基底膜は表皮-真皮接合を担う重要な組織であり、多くの構成成分からなる。これら構成成分間の相互作用を明らかにすることは、表皮基底膜部に裂隙を生じる水疱症の病態解明にとって必要不可欠である。今回、我々は基底膜構成成分であるラミニン332(旧・ラミニン5)を欠損しているヒト皮膚組織を用いて、XVII型コラーゲン等の表皮基底膜構成成分の微細局在部位を、最も信頼性が高いpost-embedding免疫電顕により解析した。その結果、ラミニン332欠損ヒト皮膚におけるXVII型コラーゲンC末端の分布は、正常ヒト皮膚における分布とは異なっていたことから、生体内において、両者が何らかの相互作用をしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The epidermal basement membrane, an important structure to adhere the epidermis to the dermis, is consisted of many molecules. To clarify the in vivo interaction between these components gives a clue to elucidating the pathophysiology of skin bullous diseases showing blister formation in the epidermal basement membrane zone. In the present study, we employed post-embedding immunoelectron microscopy using human skin lacking laminin 332 (former laminin 5) to clarify the ultrastructural distribution of basement membrane components, including type XVII collagen. As a result, ultrastructural distribution of C-terminus of type XVII collagen in human skin lacking laminin 332 was different from that in normal human skin, indicating in vivo interaction between laminin 332 and type XVII collagen.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：免疫組織化学、分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：遺伝子、病理学、基底膜、ラミニン332、表皮水疱症、免疫電顕

1. 研究開始当初の背景

表皮基底膜は、表皮-真皮接合を担っており、多くの分子から構成される複雑な構造体である。表皮基底膜構成成分として、ラミニン332(旧・ラミニン5)の他にXVII型コラーゲン(180 kD 類天疱瘡抗原、BPAG2)、230 kD

類天疱瘡抗原(BPAG1)、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ 、VII型コラーゲン、プレクチンなどが同定されている。これらの成分をコードする遺伝子の変異により、遺伝性的水疱症である表皮水疱症が生じる。例えば、ラミニン332の3本鎖をコードする3つの遺伝子(LAMA3, LAMB3,

LAMC2)のいずれかに早期停止コドンを生じれば、正常なラミニン332が産生されず、表皮-真皮間に裂隙を生じる最重篤型の表皮水疱症であるHerlitz致死型接合部型表皮水疱症を生じることが知られている。一方、基底膜構成成分に対する自己抗体が産生されれば、基底膜部に水疱を形成する自己免疫性的水疱症を生じる。

このように、表皮基底膜構成成分は、表皮と真皮の接合にかかわる重要な成分であり、我々は各種の免疫電顕を用いて、基底膜における構成成分の分子構築を明らかにしてきた。すなわち、モノクローナル抗体あるいは融合タンパク質を用いて作製したエピトープ特異的抗体を用いた各種免疫電顕を駆使し、基底膜構成成分の各エピトープの微細局在部位を定量的・客観的に解析することにより、目的分子の微細局在部位のみならず、その分子のオリエンテーションや存在様式についても解析し、表皮基底膜の分子構築を明らかにしてきた。そのことにより、遺伝性および自己免疫性水疱症の病態生理を理解することが可能となり、さらに基底膜構成成分の生物学的意義・役割が解明されてきた。しかしながら、多数の分子が、複雑に相互作用し合って構築されている基底膜では、正確な微細局在部位のみならず、それぞれの構成成分同士の関わりや相互作用について明らかにすることが、基底膜部に裂隙を生じる水疱症のさらなる病態解明、あるいは基底膜の詳細な生物学的意義・役割の解明にとって必要不可欠である。

タンパク質同士の相互作用の解析は、two hybrid法などの方法が知られている。しかし、これは直接的ではあるが、*in vitro*での解析手法であり、生体内における実際の相互作用を観察している訳ではない。生体内における各タンパク質間の相互関係を解析することは容易ではないが、ある特定の構成成分が欠損している場合とそれが存在している正常の場合とで、他の構成成分の存在状態が異なれば、両者は相互関係していると推定でき、このような手法を用いることにより、基底膜構成成分の、生体内における分子間相互作用を解析することが可能と考えられる。単一遺伝子の変異により発症する表皮水疱症患者の皮膚は、ある特定の基底膜構成成分だけが特異的に欠損していることから、この患者皮膚において、他の構成成分の存在状態を詳細に解析することにより、欠損していた構成成分と他の構成成分との相互作用が明らかになるものと考えられる。また、この手法は、実際の生体組織を用いた解析方法であり、*in vitro*での実験では得がたい情報が得られるものと考えられる。この*in vivo*における存在状態の変化を鋭敏に検出するには、微細局在部位の定量的な解析法を含めた高度な免

疫電顕技術を用いることが必須である。

我々はこれまでに、凍結固定・凍結置換を用いたpost-embedding免疫電顕法などの各種免疫電顕を駆使した研究を進めてきている。このpost-embedding免疫電顕法は、最も信頼性が高い免疫電顕手法である事が知られており、また、エピトープの微細局在部位について、定量的解析が可能であるという特徴も併せ持っている。すなわち、本手法を用いることにより初めて、上述の*in vivo*における基底膜構成成分の相互作用を明らかにすることが出来る。また、ある特定の基底膜構成成分が欠損しているヒト皮膚を用いることが、本研究の重要なポイントの1つであるが、慶應義塾大学病院皮膚科では、遺伝相談外来を開設しており、そのような特殊な皮膚組織を利用できる研究環境下にある。

このように、これまでに我々が培ってきた高度な免疫電顕技術を駆使し、表皮基底膜構成成分間の*in vivo*における相互関係を解析することは、従来の手法では得がたい情報が得られることから、基底膜に関わる疾患の解明、あるいは基底膜の生物学的機能解析において非常に有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

表皮基底膜を構成する多くの分子間の生体内相互作用を明らかにすることは、表皮基底膜部に裂隙を生じる水疱症の病態生理の解明ならびに表皮基底膜の生物学的な意義・役割の解明のために重要なことである。このような背景のもと、本研究では、ラミニン332が先天的に欠損しているヒト皮膚組織(Herlitz致死型接合部型表皮水疱症患者から得た皮膚生検組織)を基質とし、XVII型コラーゲン、VII型コラーゲンなどに対するモノクローナル抗体あるいはエピトープ特異的抗体を用いてpost-embedding金コロイド免疫電顕を実施し、それらエピトープの微細局在部位を明らかにし、正常ヒト皮膚における微細局在部位との差を解析することにより、*in vivo*におけるこれらの成分とラミニン332との相互作用について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

慶應義塾大学病院皮膚科・遺伝相談外来に来院したHerlitz致死型接合部型表皮水疱症患者およびnon-Herlitz接合部型表皮水疱症患者から、十分な説明を行い、同意を得た上で皮膚生検を行い、光顕・電顕レベルでの病理組織学的な検討、免疫組織化学による基底膜構成成分の発現の検討を行い、正確な診断を行った。さらに遺伝子変異検索の必要性および本研究の目的等について、十分な説明を

行い、同意が得られた患者ならびに家族から採血を行い、抹消血から genomic DNA を抽出し、この genomic DNA を鋳型として、ラミニン 332 の 3 本鎖をコードする遺伝子 (LAMA3, LAMB3, LMAC2) について、全エクソンならびにその近傍を PCR 法にて増幅し、direct sequence 法により塩基配列の決定を行い、遺伝子変異の有無を調べ、さらに制限酵素消化等の方法により遺伝子変異の確定を行った。

本研究の目的等について、十分な説明を行い、承諾が得られた患者から、数 mm の皮膚を剪刀で shave biopsy し、post-embedding 免疫電顕の基質とした。すなわち、表皮・真皮が剥離しないように十分に注意しながら、患者皮膚を 1 mm 以下程度の大きさに切り出し、-190 に冷却した液体プロパン中に急速投入して凍結固定し、80 のアセトン中で凍結置換した後、60 で Lowicryl K11M 樹脂に包埋、紫外線重合させ、免疫電顕用ブロックを作製した。各ブロックについて、semithin 切片を作製し、形態の保持状態が良いブロックを選び出し、以後の免疫電顕に用いた。

選び出された免疫電顕用ブロックから超薄切片を作製し、1 次抗体として各種基底膜構成成分に対するモノクローナル抗体あるいはエピトープ特異的抗体を、また 2 次抗体として金コロイド標識抗体を用いて免疫染色を行った。免疫染色後、透過電顕にて試料の観察を行い、表皮基底膜の全領域について、可能な限りの写真撮影を行った。なお、正常コントロールとして、正常ヒト皮膚を基質とし、同様に免疫染色、電顕観察、写真撮影を行った。

Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者皮膚、non Herlitz 接合部型表皮水疱症患者皮膚、正常ヒト皮膚において、基底膜の各構成成分の微細局在を示す金コロイド標識の分布を比較し、分布がどのように異なるのか、あるいは同じなのかについて検討を行い、基底膜構成成分の相互作用についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子変異の同定

慶應義塾大学病院皮膚科遺伝相談外来に新たに来院した Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者について、診断を確定するために、また本研究の目的に合致した患者であることを確認するために、遺伝子変異の解析を行った。Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症では LAMB3 遺伝子に高頻度で変異が見つかることから、まず LAMB3 遺伝子における変異の検索を行ったが、変異は見つからなかった。続いて、次に頻度の高い LAMC2 遺伝子の変異を検索したところ、p.Cys553X/p.Cys553X のホ

モ接合体、および p.Cys553X/c.2868+1delG の複合ヘテロ接合体を見出した。いずれの変異も早期停止コドンを生じるものであり、ラミニン 332 の遺伝子変異により生じた Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症であることが確定されるとともに、本研究の目的に合致した患者であることが確認できた。

ところで、LAMC2 遺伝子における p.Cys553X 変異は、これまでも当施設および他施設において、日本人 Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者で見つかったこと、また、日本人以外の Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者では報告がないことから、本変異は日本人における高頻度変異であることが考えられた。LAMC2 遺伝子において、日本人高頻度変異が見つかったのは初めてである。さらに、haplotype 解析の結果から、この高頻度変異は創始者効果によることが示唆された。これまでに、LAMB3 遺伝子における日本人高頻度変異は報告されていたが、LAMC2 遺伝子にも日本人高頻度変異が見つかったことは、Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症における遺伝子変異検索において、重要な知見と考えられる。

(2) 免疫電顕による解析

過去に臨床的診断が下されており、さらに遺伝子診断も行われていて、本研究の目的に合致している Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者も含めて、複数の患者から得た皮膚組織を凍結固定、凍結置換法にて、免疫電顕用 Lowicryl ブロックを作製した。多くの免疫電顕用ブロックの中から、ブロックの出来具合、形態の保持等の観点から、適切なブロックを選択し、post-embedding 金コロイド免疫電顕を実施した。1 次抗体には、抗 XVII 型コラーゲン C 末端抗体、抗 VII コラーゲン N 末端抗体、抗 230 kD 類天疱瘡抗原抗体を用いた。

これら基底膜構成成分のうち、XVII 型コラーゲンは基底細胞と基板を直接繋いでいる唯一の分子であり、その C 末端が真皮側に存在していることが知られている。正常ヒト皮膚における XVII 型コラーゲンの微細局在様式については、これまでに post-embedding 金コロイド免疫電顕法などを用いた我々の詳細な検討により明らかになっている (J Invest Dermatol 109:200-206, 1997)。すなわち、膜通過タンパクである XVII 型コラーゲンは表皮基底細胞の細胞内から細胞膜を通過して、その C 末端は基板 (lamina densa) にまで達しており、その分布の中心は透明層-基板境界部 (lamina lucida-lamina densa 境界部) 付近にあることが示されている (図 1)。今回、ラミニン 332 が遺伝的に欠損している Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者の皮膚組織を用いて、同様に

XVII 型コラーゲンの微細局在様式を検討した結果、そのC末端の微細局在を示す金コロイド標識は透明層(lamina lucida)にも多く認められたことから、XVII 型コラーゲンC末端の分布は、正常ヒト皮膚に比べて、表皮基底細胞側に寄っていることが示された(図2)。なお、VII 型コラーゲンN末端、230 kD 類天疱瘡抗原の微細局在部位については、正常ヒト皮膚の微細局在部位と比較して、明らかな差異は認められなかった。今回は検討症例数が少ないため、明確な結論を導くには至っていないため、今後、症例数を増やして検討を行い、その普遍性について検証していく必要があるものの、ラミニン 332 が欠損した皮膚組織における XVII 型コラーゲンC末端の分布が、正常ヒト皮膚における分布と異なっていることは、生体内において、ラミニン 332 と XVII 型コラーゲンが何らかの相互作用をしていることを示唆するものである。

また、今回、ラミニン 332 に変異が同定された non Herlitz 接合部型表皮水疱症患者から得た皮膚組織についても、同様に post-embedding 金コロイド免疫電顕をおこない、XVII 型コラーゲンC末端の分布について検討を行った。non Herlitz 接合部型表皮水疱症はラミニン 332 における遺伝子変異により発症する水疱症(XVII 型コラーゲンをコードする遺伝子における変異により発症するものもある)であるものの、Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症とは異なり、ラミニン 332 は完全欠損しないことが知られている。この検討結果からは、同じラミニン 332 に遺伝子変異が同定されながら、臨床症状が大きく異なっている2つの亜型について、その違いの要因を明らかにする手掛かりが得られることも期待されたが、今回の免疫電顕用ブロックでは、基板等形態が明瞭でなく、また金コロイド標識のバックグラウンドも認められていることから、明確な結果を得るには至らなかった(図3)。

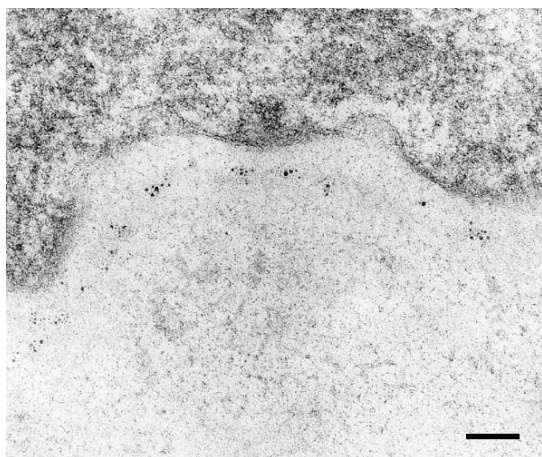


図1 正常ヒト皮膚における XVII 型コラー

ゲンC末端の微細局在。

抗 XVII 型コラーゲン C 末端抗体を用いて post-embedding 金コロイド免疫電顕を実施したところ、その分布の中心は透明層-基板境界部付近にあることが示された。Bar = 100 nm.

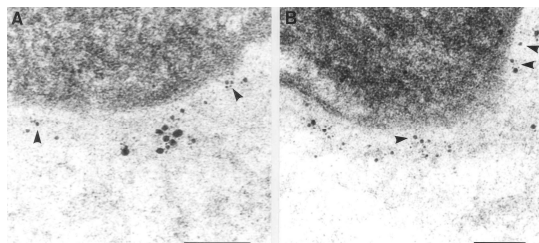


図2 Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症患者から得た皮膚における XVII 型コラーゲンC末端の微細局在。

XVII 型コラーゲン C 末端抗体の post-embedding 金コロイド免疫電顕を実施した結果、正常ヒト皮膚における分布に比べて、透明層にも金コロイド標識が認められ (arrowheads)、その分布は基底細胞側によって示された(A, B)。Bars = 100 nm.

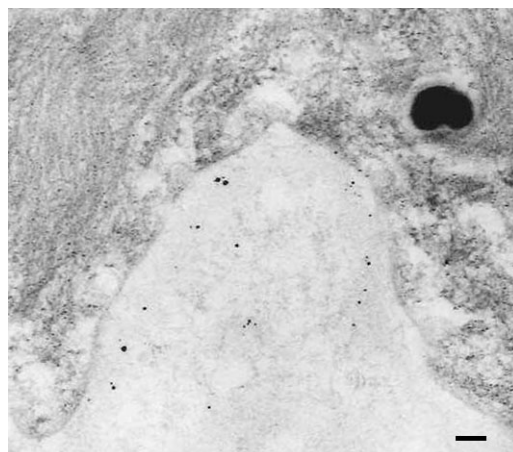


図3 non Herlitz 接合部型表皮水疱症患者から得た皮膚における XVII 型コラーゲンC末端の微細局在。

XVII 型コラーゲン C 末端抗体の post-embedding 金コロイド免疫電顕を実施したが、基板等形態保持が十分でなく、また金コロイド標識のバックグラウンドも比較的高く、明確な結果を得るには至らなかった。Bar = 100 nm.

(3) 本研究の成果、意義

以上のように、ラミニン 332 欠損皮膚組織を用いた免疫電顕を行うことにより、生体内において、ラミニン 332 と XVII 型コラーゲンが相互作用している可能性が示唆された。このことは表皮基底膜の機能解明、表皮基底

膜部に裂隙を生じる水疱症の病態生理の解明の一助となるものと考えられる。なお、本研究の実施過程において、LAMC2 遺伝子における日本人高頻度変異が新たに見出された。このことは、Herlitz 致死型接合部型表皮水疱症の病態生理の解明のみならず、時間と労力のかかる遺伝子変異検索を実施していく上においても、重要な知見といえる。

また本研究は、特定の基底膜構成成分が欠損している皮膚組織を用いて、他の基底膜構成成分の微細局在部位を詳細に検討することにより、それら構成成分間の生体内相互作用を明らかにすることが出来ることを示したものであり、本手法は生体内における分子間相互作用を解明する方法として有用であることを示唆するものであり、その意義は大きいと考える。

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1件)

Michiyoshi Kouno, Rika Ko, Atsushi Shimizu, Takeshi Ouchi, Ko Sueoka, Takuji Masunaga, Akira Ishiko. A Japanese-specific recurrent mutation and a novel splice site mutation in the LAMC2 gene identified in two Japanese families with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Clin Exp Dermatol, 36: 386-392, 2011 (査読有)

[学会発表](計1件)

河野通良. LAMC2 遺伝子に変異を認めた Herlitz 致死型接合部型先天性表皮水疱症の1例. 第32回日本小児皮膚科学会, 2008. 6. 28-29, 東京

[その他]

ホームページ等

http://web.sc.itc.keio.ac.jp/derma/r_research/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

増永 卓司 (MASUNAGA TAKUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70424140

(2)研究分担者

石河 晃 (ISHIKO AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10202988

(3)連携研究者

木村 佳史 (KIMURA YOSHIFUMI)

北里大学北里研究所病院・皮膚科・部長

研究者番号：10306772