

# 爪の形状に対する VII 型コラーゲンの変異がかかわる影響について

北海道大学 医学部附属病院

松村 和子

Nail cosmetics have recently made remarkable progress. However, the basic study related to the nail shape has not been revealed yet. The etiology of toenail deformity is not fully understood. Shimizu et al and we have previously reported that certain glycine substitutions in the type VII collagen gene (COL7A1) lead to toenail deformity, in 1999. We explored the possibility that other patients exist with toenail deformity but without blister formation and that this is inherited in an autosomal dominant manner.

The eleven pedigrees, which contain more than one dystrophic epidermolysis bullosa patient, were investigated from the clinical point of view and gene mutation. Additionally, five pedigrees of the patient who have familial toe nail deformity were genetically analyzed. Four out of eleven pedigrees had familial nail deformity. The members who had nail deformity within the four pedigrees had glycine substitution within the collagenous domain of COL7A1. The five familial nail deformity pedigrees without dystrophic epidermolysis bullosa familial nail dystrophy were also investigated for COL7A1 mutation. No mutation was detected within COL7A1 except MspI polymorphism was found within one pedigree. The multiple etiology has been suspected with in familial nail dystrophy.

## 1. 緒言

化粧品学の発達に伴い、爪の化粧が、近年、注目されるようになった。しかしながら、爪の形状に関する基礎的研究は、あまりなされていない。VII 型コラーゲンの遺伝子変異によって発症する表皮水疱症、皮膚 VII 型コラーゲンに対する自己抗体を形成によって発症する後天性表皮水疱症のいずれもが、爪が脱落したり、萎縮したりすることに注目し、VII 型コラーゲンが爪の形成に深くかかわっている可能性を予測した。

VII 型コラーゲンは、皮膚に於いては、真皮を結びつけるアンカーリング フィブリルの主要成分である。アンカーリング フィブリルは電子顕微鏡を用いた超微構造解析の結果から、表皮からループ状に真皮側に垂れ下がり、そのループには、真皮のコラーゲン線維束が、ちょうどフック状になった留め金にロープでとめつけるようになって表皮と真皮をつなぎ止めていることが明らかになった<sup>1)</sup>。表皮水疱症のなかでも発症頻度が高く、しばしば、重症化する栄養障害性表皮水疱症は、VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 遺伝子の変異によって皮膚の脆弱性がおこることが明らかにされている<sup>2)</sup>。爪母および爪床の真皮接合部においても VII 型コラーゲンが果たす役割は大きいと考え、少数の症例で詳細な観察を行った。その結果、表皮水疱症のキャリアーのなかに、他の症状が全くないにもか

わらず、小さい爪、変形した爪を持つ症例があることがわかった。今回、我々は、小さい爪をもつ表皮水疱症のキャリアー、および、表皮水疱症の家族歴がないが、爪が小さい患者の VII 型コラーゲンを変異を検索し、VII 型コラーゲンの異常が爪の形状に及ぼす影響を分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで検討を行った。

## 2. 実験

### 2.1 対象

北海道大学医学部附属病院皮膚科の表皮水疱症の患者のうち、遺伝子検索の同意を得られた 11 家系ならびに、家族に表皮水疱症患者は見られないが、幼少時から小さい爪、爪の変形を自覚していた患者のうち、遺伝子検索の同意を得た 5 家系を対象とした。

### 2.2 倫理的配慮

患者 DNA の解析にあたっては、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会が定めた規定に準じ、被験者の同意を文書にて得たのちに解析した。プライバシーの保護のため、試料と検査結果は匿名化して保管し、また、検索結果を含む個人情報も、全て匿名化し管理した。

### 2.3 遺伝子検索

EDTA2Na 入り採血管にて採血した患者末梢血由来の単核球から Sambrook ら<sup>3)</sup> による標準的な方法を用いて、DNA を抽出した。VII 型コラーゲンをコードする COL7A1 の全エクソン 118 を intron-exon border の情報をもとに PCR にて増幅した。増幅条件および、プライマーの設定は、既に報告された条件で行った<sup>2,4)</sup>。変異の一次スクリーニングのため、Glycerol-tolerant gel buffer を用いた 6.8% アクリルアミドによる Conformation sensitive gel



Nail deformity and type VII collagen abnormality

Kazuko Matsumura

Department of dermatology, Hokkaido University graduate school of Medicine

electrophoresis heteroduplex analysis を行った<sup>2,4)</sup>。Heteroduplex バンドを検出し得た増幅断片のみ Big Dye terminator cycle sequence FS (PE applied biosystem) を用いてシーケンス PCR を行い、蛍光色素標識した。解読は、ABI prism 310 (PE applied biosystem) を用いた。変異した allele については、制限酵素切断部位の有無により検証した。

### 3 結果

#### 3.1 表皮水疱症家系に見られる爪の臨床症状

栄養障害性表皮水疱症家系の 11 家系について表 1 の通

表 1 表皮水疱症臨床症状のまとめ

症例	臨床症状	患者家系の爪甲変形
1	Dominant	有
2	Dominant	無
3	Dominant	有
4	Resesive 重度	有
5	Resesive 中等度	有
6	Resesive 軽度	無
7	Resesive 中等度	無
8	Resesive 中等度	無
9	Resesive 中等度	無
10	Resesive 中等度	無
11	Resesive 重度	無

り臨床症状をまとめた。臨床的に優性栄養障害型表皮水疱症を呈する家系は、3 家系、中等度から重度の劣性栄養障害型表皮水疱症を呈する家系は 9 家系あった。そのうち、臨床的に水疱が認められない血族に爪甲形状の異常が認められた家系は、4 家系であった。表皮水疱症 11 家系について共通している所見は、次の通りである。爪の変形は、特に両母趾に強く、遊離縁への伸長が不良で爪襟が消失し、爪床側に埋没した状態になっている。爪甲の厚さは、通常と変わらない症例と軽度肥厚している症例が混在する。後爪郭および爪上皮も萎縮あるいは消失している (Fig. 1a, 1b)。

#### 3.2 血族に表皮水疱症をもたない爪の臨床症状

表皮水疱症患者を家系にもたない症例の爪の変形の臨床症状は様々である。そのうち、2 家系は、詳細な家族歴の検索および全身症状の検索の結果、膝蓋骨の変形が認められ、neil patella 症候群に罹患していることが判明した。これらの家系は、小さい爪であることは、表皮水疱症家系の爪の変化と共通するが、爪床側に埋没した爪の変形ではなく、むしろ、爪甲の分離や、爪の表面に凸凹が形成される変化が認められることが特徴的である (Fig. 2a)。残りの 3 家系は、表皮水疱症患者を血族にもつ症例に認められる爪の



Fig. 1a 血族に栄養障害性表皮水疱症がある遺伝性の足爪の変形

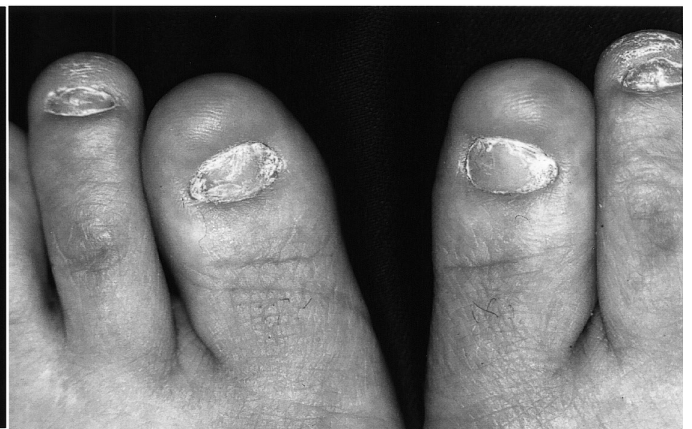


Fig. 1b 血族に栄養障害性表皮水疱症がある遺伝性の足爪の変形。特に第一趾爪に変形が強い。



Fig. 2a 血族に栄養障害性表皮水疱症がない遺伝性の足爪の変形。検索の結果、Nail patella 症候群であった。

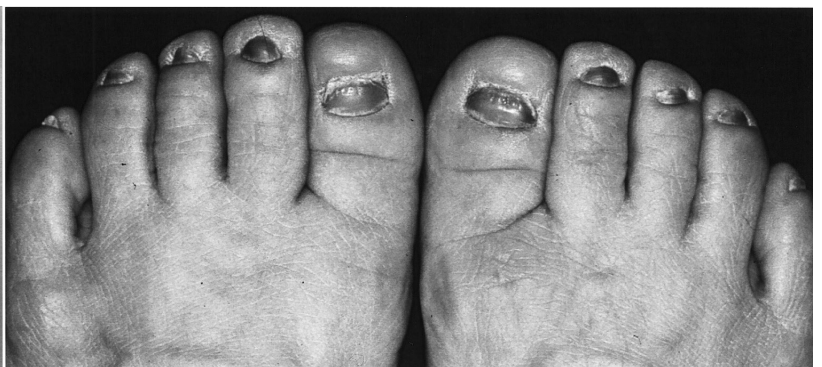


Fig. 2b 血族に栄養障害性表皮水疱症がない遺伝性の足爪の変形。検索の結果、COL7A1 ポリモルフィズムが存在した。



変化と同様に遊離縁への伸長が不良で爪襟が消失し、爪床側に埋没した状態になっている (Fig. 2b)。いずれの症例も爪表在性真菌症の既往はなく、手足の表皮および、爪からの真菌直接鏡検検査で真菌は検出されず、同部位の真菌培養でも真菌は検出されず、爪の変形は、表在性真菌症によるものではないことが確認されている。

3.3 表皮水疱症をもつ家系における Type VII コラーゲン遺伝子検索の結果爪の変形を来す家系のうち解析し得た表皮水疱症の変異を表 2 に示す。表に示した通り、表皮水疱症患者を家系に持ち、かつ爪の変形を来した血族は、全て VII 型コラーゲン遺伝子の collagenous ドメインのグリシンが、他のアミノ酸に置換していた。今回検索した 4 家系のうち爪の変形を来した症例はそれぞれ、G2028E, G2064E, G1549R, G1815R の変異のヘテロであることを確認し得た。代表的な家系の家系図を Fig. 3 に示す<sup>5)</sup>。しかし、これらの変異の近傍の Collagenous ドメインのグリシンが他のアミノ酸に置換された変異 G2037E の変異をみとめた症例では、水疱の形成や創傷治癒の遅延など軽症の表皮水疱症としての症状は認められたが、爪の変形は、認められていない。

一方、挿入、欠失に伴うフレームシフトやスプライシング部位の変異、あるいは一塩基置換に伴って、タンパク質への翻訳の途中で停止コドンを生じてしまう変異のみをへ

表 2 COL7A1 遺伝子変異

症例	変異 1	変異 2
1	G2028E	
2	G2037E	
3	G2064E	
4	G1815R	581delC
5	G1549R	E2827X
6	G2204S	S16989X
7	G2366C	8358+1 G->T

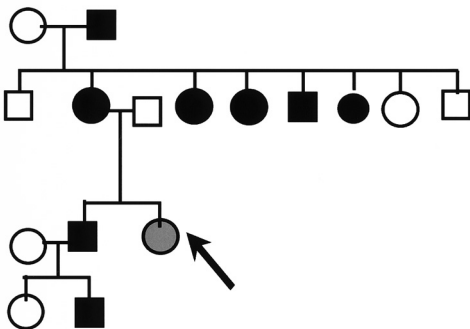


Fig. 3 血族に栄養障害性表皮水疱症患者がいる遺伝性足趾爪変形症の典型的な家系図  
○：足趾爪変形無し。●：足趾爪変形有り。矢印：栄養障害性表皮水疱症患者。

テロで持っている症例については、いずれの個体においても爪の変形は、認められなかった。

3.4 表皮水疱症をもたない家系における Type VII コラーゲン遺伝子検索の結果 nail patella 症候群であったの 2 家系については、Type VII コラーゲン遺伝子の変異は、認められなかった。nail patella 症候群ではない 3 家系について、検索したところ、2 家系では、特別な変異は認められなかった。1 家系では、アミノ酸の置換を伴わない一塩基置換、すなわち、exon 21 の MspI ポリモルフィズム<sup>6)</sup>を検出した。

## 4 考察

表皮水疱症をもつ家系の血族における爪の形状異常において COL7A1 の変異が大きな影響を与えていることが明らかになった。今回の検索で、水疱は出現しないが、爪の変形を来した全ての症例で、COL7A1 の collagenous ドメインのグリシンが他のアミノ酸に変異する一塩基置換を見いだした。このうち、グリシンがアルギニンに変異する一塩基置換が 2 例、グリシンがグルタミン酸に変異する一塩基置換が 2 例検出された。グリシンのアミノ酸置換は、従来優性栄養障害型表皮水疱症を来すと知られている。臨床的に全く水疱をつくらず、爪の変形のみが症状である疾患群が存在する可能性を Shimizu ら<sup>7)</sup> が、報告しているが、本研究において複数例の同様の症例を確認することができた。これらの変異は、臨床的に見落としてしまうほどわずかな変化であるため、以前は silent mutation として気づかれずにいた可能性がある。水疱を形成しない優性栄養障害型表皮水疱症とみなすか、VII 型コラーゲン collagenous ドメインにグリシン置換が検出される遺伝性の爪変形症とするかは、まだ議論の余地がある。

さらに VII 型コラーゲン遺伝子 COL7A1 の変異前体においても同じ collagenous ドメインのグリシン置換であっても、出現する症状が違えることが確認された。今回の 11 家系の検索においても、爪を含めて全く症状を示さないいわゆる silent のグリシン置換変異が一家系、機械的刺激で水疱を生じ、容易に潰瘍や癬痕をつくり皮膚の脆弱性を示す古典的優性栄養障害型表皮水疱症といえる例が 2 例あった。これらの症状の差が遺伝子変異の違いによって簡単には、説明することはできないが、他のアミノ酸へ置換されたグリシンが VII 型コラーゲン全体のどこに位置するか、グリシンがどのようなアミノ酸に置換しているかが症状の差を解明する手がかりになる可能性がある。今回検索した例においては、VII コラーゲンの N 末端に比較的近いところ、あるいは、collagenous ドメインのなかでヒンジ部分に比較的近いところで置換をおこしている症例では、症状を呈しやすく、C 末端に比較的近い部分での変異では silent 変

異である傾向が認められた。一方、どのようなアミノ酸に置換することで症状が変わるかを検討したところ、今回の検索においては、爪甲異常や、優性栄養障害型表皮水疱症の症状を呈する症例で、グリシンがアルギニンあるいは、グルタミン酸に変化しているのに対して、症状を示さない silent mutation は、グリシンがセリンあるいはシステインに変化していた。しかし、これまでに、グリシンがアルギニンやグルタミン酸以外に変異している優性栄養障害性表皮水疱症が報告されているため、単にアミノ酸の差だけで書状の違いを説明することは難しい。

水疱の生成のみならず、爪甲の形状にまで詳細に検討したうえで silent 変異と結論づけている G1812R というグリシンがアルギニンに変異した報告は<sup>8)</sup>、今回検討した爪の変形のみ生じた 4 家系のうち 1 家系 G1815R と極めて近いグリシン置換である。3つのアミノ酸ごとに生じるグリシンが 1 つ分だけずれただけで、臨床症状が違うという事実は、少なくとも置換されたグリシンが VII 型コラーゲン全体のどこに位置するかということが重要であることを示唆する。

表皮水疱症患者が血族にいない爪変形症の家系の VII 型コラーゲンの検索では原因となるような VII 型コラーゲンの遺伝子変異は見いだせなかった。Nail patella 症候群は、ケラチン群の遺伝子変異であるということが解明されつつあるためここでは詳しい言及は行わないが、ケラチン群の変異が、表皮真皮境界部に発現される VII 型コラーゲンのような蛋白に対しても何らかの作用を及ぼしている可能性は十分考えることができる。Nail patella 症候群をもたない爪変形家系のうち、一例で見いだされた Exon 21 の 1 塩基置換は、アミノ酸変異を伴わず、polymorphism であることが報告されている。しかし、アミノ酸変異は生じなくともポリモルフィズムをもつアレルの転写レートが通常よりも低い可能性は否定できない。また、通常、このポリモルフィズムでは、なにも症状は呈さないが、他の遺伝子変異とあわせもつことで疾病の原因となる可能性は否めない。これらの 3 家系においては、VII 型コラーゲン以外の表皮真皮境界部に存在する蛋白に対する検索を今後行わなければならない。

今回の研究で遺伝性の爪変形症について、VII 型コラーゲンが占める役割の一端を明らかにした。今後さらなる研究で、爪の形状に関わる蛋白について明らかにしたい。

本研究の一部は、Sato-Matsumura et al, Some idiopathic toenail dystrophies are caused by substitution mutations in the type VII collagen gene (COL7A1) Archives of Dermatology in press, にて報告した。

#### 謝辞

本研究全にわたりましてきめ細かいご指導を下さいま

した、北海道大学大学院医学研究科北海道大学大学院医学研究科・病態制御学専攻・感覚器病学講座・皮膚粘膜病学分野 清水 宏教授に感謝申し上げます。また、研究に尽力下さいました、北海道大学大学院医学研究科北海道大学大学院医学研究科・病態制御学専攻・感覚器病学講座・皮膚粘膜病学分野 澤村大輔助教授はじめ、安川香菜先生、中村裕之先生、また実験についてご指導を下さいました、中村秀樹技官に厚く御礼申し上げます。

#### (文献)

- 1) Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L, Nishikawa T. Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Laboratory Investigation* 1997;76:753-763.
- 2) Uitto J, Christiano A. Molecular basis for the dystrophic form of epidermolysis bullosa: mutation in the type VII collagen gene. *Arch Dermatol Res* 1994;287:16-22.
- 3) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- 4) Shimizu H, McGrath J, Christiano A, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity. *J Invest Dermatol* 1996;106:119-124.
- 5) Sato-Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, Shimizu H. Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in two families with dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 2001;in submission.
- 6) Christiano A, Chung-Honet L, Hovnanian A, Uitto J. PCR-based detection of two exonic polymorphisms in the human type VII collagen (COL7A1) at 3p21.1. *Genomics* 1992;14:827-828.
- 7) Shimizu H, Hammami-Hauasli N, Hatta N, Nishikawa T, Bruckner-Tuderman L. Compound heterozygosity for silent and dominant glycine substitution mutations in COL7A1 leads to a marked transient intracytoplasmic retention of procollagen VII and a moderately severe dystrophic epidermolysis bullosa phenotype. *Journal of Investigative Dermatology* 1999;113:419-421.
- 8) Masunaga T, Shimizu H, Takizawa Y, Uitto J, Nishikawa T. Combination of novel premature termination codon and glycine substitution mutations in COL7A1 leads to moderately severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 2000;114:204-205.