

# XVII型コラーゲン異常に起因する表皮真皮結合破綻の分子機構

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野

澤村 大輔

Mutations in the gene encoding type XVII collagen have been shown to cause generalized atrophic benign epidermolysis bullosa (GABEB), which is characterized by generalized blistering with skin atrophy, enamel hypoplasia diffuse alopecia and nail dystrophy. To further understand the role of type XVII collagen in the integument, we examined two unrelated GABEB families and also four patients with amelogenesis imperfecta (AI), which comprises a clinically and genetically diverse group of conditions affecting the development of dental enamel. Ultrastructural examination of the GABEB patients' skin revealed tissue separation in the lamina lucida and immunohistochemical analyses showed no or little expression of type XVII collagen in the epidermal basement membrane zone. Mutation analysis of the *COL17A1* gene encoding type XVII collagen revealed that patient 1 was compound heterozygous for a deletion and a nonsense mutation (1285delA and Q1387X) and that the patient 2 carried homozygous deletion mutations 4335delC. The developmental mechanism of enamel hypoplasia in GABEB has yet to be elucidated. To understand the possible *COL17A1* function in enamel formation, we investigated whether mutations exist within the *COL17A1* gene in the patients with AI. However, no significant nucleotide changes were found in the gene, suggesting no significant relation between collagen XVII and enamel disease. Further analysis of GABEB patients and *COL17A1* function is required to understand precise mechanisms whereby these mutations can induce multiple symptoms in the integument.

## 1. 緒言

XVII型コラーゲン、180kDa 類天疱瘡抗原は皮膚、粘膜などの上皮組織に発現される膜貫通型の糖蛋白である<sup>1,2)</sup>。XVII型コラーゲンは始めに類天疱瘡の標的自己抗原として同定され、本蛋白の遺伝子の変異により接合部型表皮水疱症が生ずることが明らかにされている<sup>3)</sup>。これらのことから、XVII型コラーゲンは皮膚の基底膜の安定に重要な蛋白であると考えられている。

接合部型表皮水疱症は基底膜のラミナルシダに水疱が形成される遺伝子皮膚疾患群である。その中で、generalized atrophic benign epidermolysis bullosa (GABEB)<sup>4,5)</sup>は比較的水疱形成が中等度で、歯エナメル質の形成不全や脱毛を合併する稀な病型である<sup>6,7,8)</sup>。近年、本症の原因遺伝子の一つとして、XVII型コラーゲンが同定された。また、多くの変異は、ノンセンス、挿入、欠失変異となることが見出された<sup>6,7,9,10,11,12,13,14,15)</sup>。しかしながら、その変異からいかに基底膜の崩壊がおこり、その結果 エナメル質の形成不全や脱毛などの GABEB に特異な臨床症状が生ずる詳細な機序は不明である。

VII型コラーゲンの変異により栄養障害型表皮水疱症が

おこるが、VII型コラーゲンの変異であるが水疱を形成せず爪の変形のみをもつ症例が報告された<sup>16)</sup>。上述したように接合部型表皮水疱症においても、エナメル質の形成不全を合併する<sup>17)</sup>が、XVII型コラーゲン遺伝子の変異で水疱はなくエナメル質の形成不全のみを持つ患者がいることが明らかにされた<sup>10)</sup>。

今回我々は、GABEBの臨床症状をもつ2家系を経験したので、それらの患者におけるXVIIコラーゲンの発現ならびに変異を検索した。さらに、水疱の形成を合併していなエナメル質の形成不全疾患 amelogenesis imperfecta (AI) が歯科領域に報告されているので<sup>18)</sup>、それらの患者のXVII型コラーゲンの変異を検討したので報告する。

## 2. 実験

### 1) GABEB患者

患者1は21歳の男性。両親や兄弟は正常。生下時から全身の繰り返す水疱出現。脱毛、歯牙の異常、爪の変形も合併する。臨床的に略全身に水疱、色素沈着、脱色素沈着が認められる。なお、水疱発生後に癬痕の形成はない。頭髮以外にも眉毛、睫毛、陰毛もなく、すべての爪甲の脱落があった。著明な歯牙の形成異常も認められた。

患者2は41歳の男性。両親は正常。全身の水疱とびらんが生直後から多発している。受診時、主に四肢に水疱とびらんを見るが患者1より明らかに軽微である。色素沈着と脱色素沈着を見るが、癬痕の形成はない。発毛は正常であるが、水疱形成による萎縮性脱毛はあった。患者1とは異なり、眉毛、睫毛、陰毛は存在した。歯牙はエナメル質の形成不全があった。



Molecular mechanisms for collapse of dermoepidermal junction caused by XVII collagen abnormality.

Daisuke Sawamura

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine.

## 2) AI 患者

エナメル形成不全が認められた4 AI患者について検索した。内2名は父と息子である。また、それらの患者の皮膚に水疱形成はみない。

## 3) 免疫組織化学と電顕検索

GABEB患者の皮膚から生検を行い、凍結切片を作成し、蛍光抗体直接法を行った<sup>19)</sup>。使用したXVII型コラーゲンに対するモノクローナル抗体HDD20は、the Netherlands Cancer InstituteのSonnenberg教授から供与を受けたものである。電顕標本には、皮膚を5% glutaraldehydeと1% osmium tetroxideにて固定し、uranyl acetateにて染色した。

## 4) 変異検索

患者末梢血から genomic DNA を抽出した。そのDNAを鋳型として、XVII型コラーゲン遺伝子のすべてのエクソンとエクソン-イントロン境界領域をPCRにて増幅し、それらの塩基配列を決定した<sup>12)</sup>。

# 3. 結果

## 1) 電顕的水疱形成部位

患者1と2の水疱部の電顕所見では、水疱はラミナルシダに存在していた(図1 a, b)。ラミナデンサは水疱底に、基底細胞膜は水疱蓋に見られた。これらのことから患者は接合部型表皮水疱症に分類された。XVII型コラーゲンをを用いた免疫染色において、患者1の皮膚では蛍光は観察されなかった(図1 c, d)。一方、患者2では淡く基底膜に一致して線状あるいは顆粒状の蛍光が認められた。これらの所見は、患者1ではXVII型コラーゲンが完全欠損していること、患者2では部分欠損していることを示すものであった。健常人では基底膜に線状の沈着がみとめられている(図1 e)。

## 2) GABEB患者の変異検出

XVIIコラーゲン遺伝子の検索の結果、患者1ではエクソン15の1285番目のアデニンの欠失とエクソン53の4264番目のシトシンからチミンへの変化が検出された(図2)。1285delAは26塩基下流に早期終止コドンを起こし、4264 C to Tは1387番目のコドンCAG (Gln)を早期終止コドンに変えるQ1387X変異であった。1285delAは父由来、Q1387Xは母由来であった。患者2では、エクソン53の4335番目のシトシンが欠失する変異が両方のアレルに検出された(図3)。この4335delC変異は、35塩基下流に早期終止コドンを派生させた。これらの変異は、すべて制限酵素の消化で再確認している(図2, 3)。

## 3) AI患者の変異検出

4人のAI患者について、そのXVII型コラーゲン遺伝子を調べたが、ポリモルフィズム以外に病気を起こしうる変異は検出できなかった。

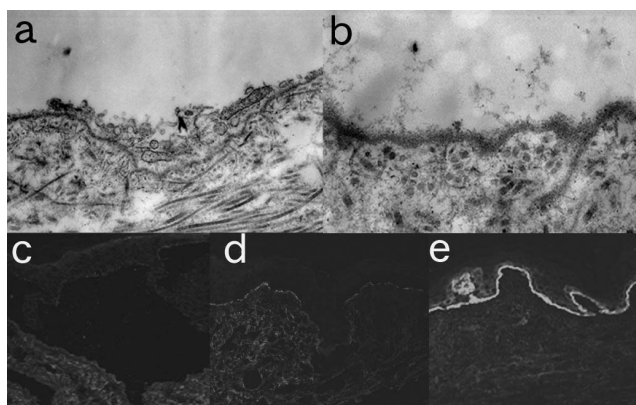


図1 電顕、免疫組織学的検索。患者1 (a)、2 (b)ともに電顕的水疱形成部は、ラミナルシダである。XVIIコラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体直接法で、患者1 (c)はXVIIコラーゲンの完全欠損、患者2では淡い顆粒状の沈着を認めた (d)。健常人コントロール (e)。

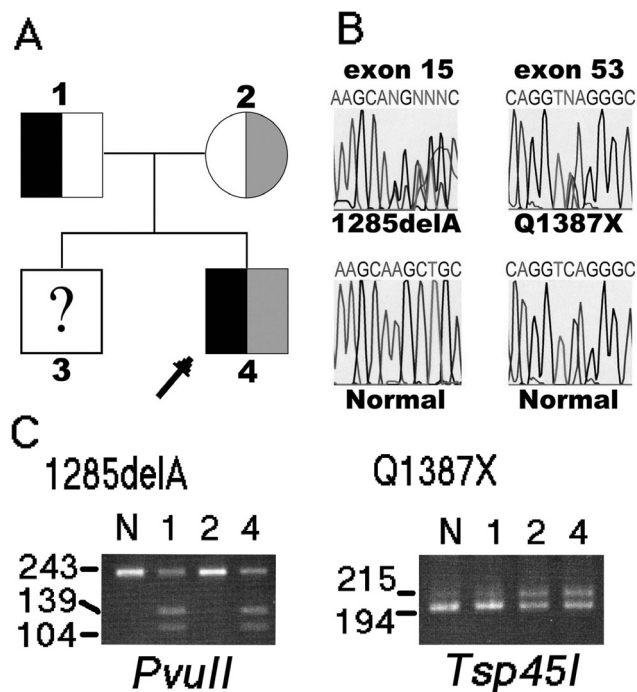


図2 患者1におけるXVIIコラーゲン遺伝子の変異。A: 患者1の家系図。黒色:1285delA変異、灰色:Q1387X変異。B: それぞれの変異のダイレクトシーケンスのクロマトグラム。エクソン15の1285番目のアデニンの欠失とエクソン53の4264番目のシトシンからチミンへの変化のヘテロ接合が検出された。C: 1285delA変異は制限酵素PvuIIのsiteを生じ、Q1387変異はTsp45Iのsiteを消失させた。Nは健常人。

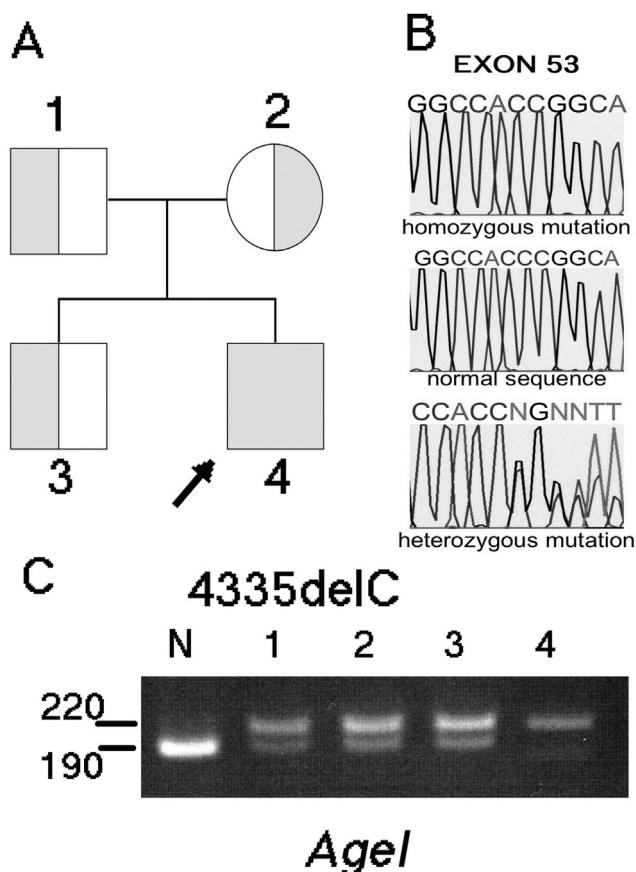


図3 患者2における17コラーゲン遺伝子の変異。A:患者2の家系図。灰色:4335delC変異。B:その変異のダイレクトシーケンスのクロマトグラム。エクソン53の4335番目のシトシンが欠失する変異が両方のアレルに検出された。C:14335delC変異変異は制限酵素Agelのsiteを消失させた。Nは健康人。

#### 4. 考案

本研究で、両患者ともに、ラミナルシダに水疱を形成し、XVIIコラーゲンの発現の著しい減弱があり、臨床的に水疱、脱毛、歯牙の異常、爪の変形を認めたことにより、GABEBと診断した。さらに、患者1は細胞内ドメインにある1285delAと細胞外ドメインにあるQ1387Xのヘテロ接合体、患者2ではC末にあるQ1387Xのホモ接合体であることが示された。

これまでに約50のXVII型コラーゲンの変異が見つかってきているが<sup>20)</sup>、今回の変異は新規のものであった。それらの変異のほとんどは、早期終止コドンを生ずるノンセンス、挿入、欠失変異であり、XVIIコラーゲン蛋白の発現はほとんど検出されなかった。これは早期終止コドンによるmRNAのdecayがおこるためと解釈されている<sup>3, 11)</sup>。この観点から、変異がどの位置にあってもmRNAが消失ため、変異の位置はあまり症状に影響しないことを意味するものであった。

しかしながら、本研究では明らかに患者1に比較して患者の2の臨床症状が軽かった。さらに蛍光抗体直接法

で、患者1ではXVII型コラーゲンの完全欠損であったが、患者2では軽微ではあるがXVII型コラーゲンの発現が認められた。興味あることに、患者の変異は、過去のホモ接合変異の中では、もっともC末端に位置していた<sup>20)</sup>。過去の報告ではホモ接合変異は非コラーゲン領域にある場合とコラーゲン領域にある場合では、臨床症状に相違があることが推測されている<sup>6)</sup>。本研究でも、ホモ接合体に限れば、よりC末の方が臨床症状が軽くなる可能性が示唆された。

エナメル形成不全により、歯の陥凹や齲歯を生じ、これがGABEBの特徴的な臨床所見となっている。以前から接合部型表皮水疱症の原因遺伝子・蛋白となる、ラミニン5や $\alpha 6\beta 4$ インテグリンも歯の発生に重要であることが示されている<sup>21, 22, 23)</sup>が、XVII型コラーゲンとの関連は未だ不明である。AIはエナメル質の形成不全以外に他の臓器の異常を示さない疾患群で、14型に分類されている。現在までに、エナメル蛋白であるamelogenin, ameloblastinやenamelin遺伝子に変異が見つかったが、その原因は不明であるものが多い<sup>24, 25)</sup>。

そこで、AI患者の一部にXVII型コラーゲンに変異のある物があるのではないかと考え、原因の明らかになっていない4例のAI患者の本遺伝子を検索した。その結果、XVII型コラーゲンに有意な異常が見出されなかった。

今回の研究では、XVII型コラーゲン異常に起因する表皮真皮結合破綻の分子機構に関して、人の本蛋白のノックアウトモデルであるGABEBを中心に解析を行った。今後、さらに本研究を発展させるため、本蛋白のトランスゲニックマウスを使用した研究も予定している。本蛋白の機能をより詳細に検討することにより、本蛋白異常に起因する表皮真皮結合破綻を主徴とする類天疱瘡やGABEBの発症機構がさらに明らかになると予想された。

#### 謝辞

本研究は以下の研究者との共同研究である。北海道大学皮膚科:中村裕之、後藤真希、中村秀樹、清水宏、東京大学皮膚科:三井浩、玉置邦彦、北海道大学遺伝子治療部門:貴田みゆき、有賀正(現北大小児科)、崎山幸雄、江別市立病院皮膚科:富澤幸生。(敬称略)

本研究に対して、助成いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

#### (文献)

- 1) Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. Arch Dermatol Res 1999; 291:187-94.
- 2) Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J Invest Dermatol 1999; 112: 411-418.

- 3) McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, et al. Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (TYPE XVII COLLAGEN), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 1995; 11: 83-6.
- 4) Hashimoto I, Schnyder UW, Anton-Lamprecht I, et al. Epidermolysis bullosa hereditaria with junctional blistering in an adult. *Dermatologica* 1976; 152: 72-86.
- 5) Hintner H, Wolff K. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 1982; 118: 375-384.
- 6) Schumann H, Hammami-Hauasli N, Pulkkinen L, et al. Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1344-1353.
- 7) Floeth M, Fiedorowicz J, Schacke H, et al. Novel homozygous and compound heterozygous COL17A1 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 528-533.
- 8) Mazzanti C, Gobello T, Posteraro P, et al. 180-kDa bullous pemphigoid antigen defective generalized atrophic benign epidermolysis bullosa: report of four cases with an unusually mild phenotype. *Br J Dermatol* 1998; 138: 859-66.
- 9) McGrath JA, Darlig T, Gatalica B, et al. A homozygous deletion mutation in the gene encoding the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (TYPE XVII COLLAGEN) in a family with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 771-4.
- 10) McGrath JA, Gatalica B, Li K, et al. Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol* 1996; 148: 1787-96.
- 11) Darling TN, McGrath JA, Yee C, et al. Premature termination codons are present on both alleles of the bullous pemphigoid antigen 2/type XVII collagen gene in five Austrian families generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 463-468.
- 12) Gatalica B, Pulkkinen L, Li K, et al. Cloning of the human type XVII collagen gene (COL17A1), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 352-65.
- 13) Jonkman MF, De Jong MCJM, Heeres K, et al. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. Either 180-kd bullous pemphigoid antigen or laminin-5 deficiency. *Arch Dermatol* 1996; 132: 145-150.
- 14) Scheffer H, Stulp RP, Verlind E, et al. Implications of intragenic marker homozygosity and haplotype sharing in a rare autosomal recessive disorder: the example of the collagen type XVII (COL17A1) locus in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Hum Genet* 1997; 100: 230-5.
- 15) Shimizu H, Takizawa Y, Pulkkinen L, et al. The 97 kDa linear IgA bullous dermatosis antigen is not expressed in a patient with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa with a novel homozygous G258X mutation in COL17A1. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 887-92.
- 16) Shimizu H, Hammami-Hauasli N, Hatta N, et al.. Compound heterozygosity for silent and dominant glycine substitution mutations in COL17A1 leads to a marked transient intracytoplasmic retention of procollagen VII and a moderately severe dystrophic epidermolysis bullosa phenotype. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 419-21.
- 17) Wright JT, Johnson LB, Fine JD. Developmental defects of enamel in humans with hereditary epidermolysis bullosa. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 945-55.
- 18) Witkop CJJ. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol* 1988; 17: 547-553.
- 19) Shimizu H, Suzumori K, Hatta N, et al. Absence of detectable  $\alpha 6$  integrin in pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome and its application for prenatal diagnosis in a family at risk for recurrence. *Arch Dermatol* 1996; 132: 919-925.
- 20) Bauer JW and Lanschuetzer C. Type XVII collagen gene mutations in junctional epidermolysis bullosa and prospects for gene therapy. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 53-60.
- 21) Aberdam D, Aguzzi A, Baudoin C, et al.. Developmental expression of nicein adhesion protein (laminin-5) subunits suggests multiple morphogenetic roles. *Cell Adhesion and Communication* 1994; 2: 115-29.
- 22) Thesleff I. 1995. Differentiation of ameloblasts and its regulation by epithelial-mesenchymal interactions. In: Robinson C, Kirkham J, Shore RC (Eds.), *Dental Enamel: Formation to Destruction*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-22.
- 23) Skobe Z, Stern DN, Probst KS. 1995. The cell biology of amelogenesis. In: Robinson, C., Kirkham J., Shore RC. (Eds.), *Dental Enamel: Formation to Destruction*. CRC Press, Boca Raton, pp. 23-57.
- 24) Kida M, Ariga T, Shirakawa T, et al. Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res* 2002; 81: 738-42.
- 25) Hu JC and Yamakoshi Y. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 387-98.