

- 2) Takeshi T, Ohnishi K, Hartl C, LeRoy EC, Trojanowska M: Characterization of a GC-rich region containing Sp1 binding site(s) as a constitutive responsive element of the $\alpha 2(I)$ collagen gene in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4299-304
- 3) Inagaki Y, Truter S, Ramirez F: Transforming growth factor- β stimulates $\alpha 2(I)$ collagen gene expression through cis-acting element that contains an Sp1 binding site. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14282-34
- 4) Chung KY, Agarwal A, Uitto J, Mauviel A: An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1996; **271**: 3272-78
- 5) Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC, Trojanowska M: Transcriptional regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen promoter. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26717-23
- 6) Kouba DJ, Chung KY, Nishiyama T, Vindevoghel L, Kon A, Klement JF, Uitto J, Mauviel A: Nuclear factor- κB mediates TNF- α inhibitory effect on $\alpha 2(I)$ collagen gene transcription in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 1999; **162**: 4226-34

強皮症感受性を決定するI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 (COL1A2) 遺伝子の転写制御領域の トポロジー解析

班 員：畑 隆一郎 (神奈川歯科大学 口腔生化学)

共同研究者：赤井 潤、木村彰方 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所分子病態)

Topological analysis of the human type I collagen $\alpha 2$ chain (COL1A2) gene which determines susceptibility to systemic sclerosis.

Ryu-Ichiro HATA

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College),

Jun AKAI, and Akinori KIMURA

(Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

Summary

Previously we have shown the presence of two polymorphic dinucleotide repeats in the human type I collagen $\alpha 2$ (COL1A2) gene, one in the 5' flanking region (upstream repeat) and the other in the 1st intron (1st intron repeat) and that the co-presence of these two repeats stimulates expression of the gene. And also a specific haplotype of the two microsatellites of the human COL1A2 gene correlates with susceptibility to systemic sclerosis.

A major part of the DNA double helix within cells exists in the right-handed B-form conformation. Structural transition from the B-form to the left-handed Z-form DNA at dinucleotide repeats is proposed to play an important role in the transcriptional regulation of various genes.

To investigate the association of the change of higher-order structure such as the transition from the B- to Z-form DNA (B-Z transition) with the two repeat regions and its role in transcriptional regulation, we performed two-dimensional (2D) gel electrophoretic analyses of constructs containing or not containing the repeat regions. The results indicated that constructs containing both of the repeats led to a structural transition from B- to Z-form but that the construct lacking either of them did not. Additional 2D gel analyses using several constructs containing either of the two repeats showed that this structural transition occurred only in the upstream repeat, but not in the 1st intron repeat. Total number of supercoil relaxation was measured among the constructs with different combinations of several repetitions of the two repeats. The result supported the idea that B-Z transitions occurred only in the upstream repeat regions. Our findings therefore indicate that the upstream repeat region has the ability to convert its conformation from B- to Z-DNA but that the 1st intron repeats did not, although both of the dinucleotide repeats are indispensable for enhancing transcriptional activity of the COL1A2 gene.

はじめに

我々は先に I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 (*COL1A2*) 遺伝子の転写性制御領域である遺伝子の上流及び第一イントロンに 2 つの反復配列を見出し¹⁾、この反復配列の組み合わせにより、*COL1A2* 遺伝子の転写活性が制御されていること²⁾、及び、高い転写促進性を示す反復配列の組み合わせ (ハプロタイプ) が強皮症に対する感受性に関与していること³⁾ を報告した。本研究ではこの転写制御機構を明らかにするために各種コンストラクトのトポアイソマーを二次元電気泳動法で分離し、転写制御領域の高次構造、特に右巻きの B 型構造から左巻きの Z 型ラセンへの転移を解析した。

材料と方法

1) コンストラクトとトポアイソマーの作製

COL1A2 遺伝子上流の反復配列 (上流反復配列) 及び第一イントロンの反復配列 (イントロン反復配列) の二つの反復配列を含む各種の *COL1A2* 遺伝子コンストラクトを PCR 法で作製し、塩基配列を確認した (Fig. 1)。これらの溶液に種々の濃度 (0~7mM) のエチジウムブロミドを添加して負の超ラセンをリラックスした条件でトポイソメラーゼ I で 25°C、16 時間処理した⁴⁾。

2) 二次元電気泳動によるトポアイソマーの分離

上記の各種コンストラクトのトポアイソマー混合物を精製後、0.7% アガロースゲル、トリス/ホウ酸緩衝液 (TBE) 中で一次元目の電気泳動を 110V で 16 時間行い、ついで 1mM のクロロキンで処理しラセンをリラックスさせた後、1mM のクロロキン存在下で二次元目の泳動を 100V で 18 時間行った。クロロキンを除いた後、エチジウムブロミドで染色し、写真撮影を行い、二次元泳動後のトポアイソマーの移動距離から超ラセン構造を解析した⁴⁾。

3) B 型ラセンから Z 型ラセンへの転移の測定⁵⁻⁸⁾

DNA ラセンの B-Z 転移に伴う超ラセンのリラクセーションは以下の式により計算した。

$$i/10.4+i/12$$

この式で i は反復配列の塩基数、10.4、12 は各々右巻きおよび左巻きラセンの一回転当たりの塩基数を示す。また、B-Z 転移における超ラセン密度は以下の式で算出した。

$$-10.4y/z$$

この式で y は二次元電気泳動の一次元目の泳動で泳動距離のシフトを示したトポアイソマーの番号、 z は用いたコンストラクト (プラスミド) の総塩基数を示す。

結果

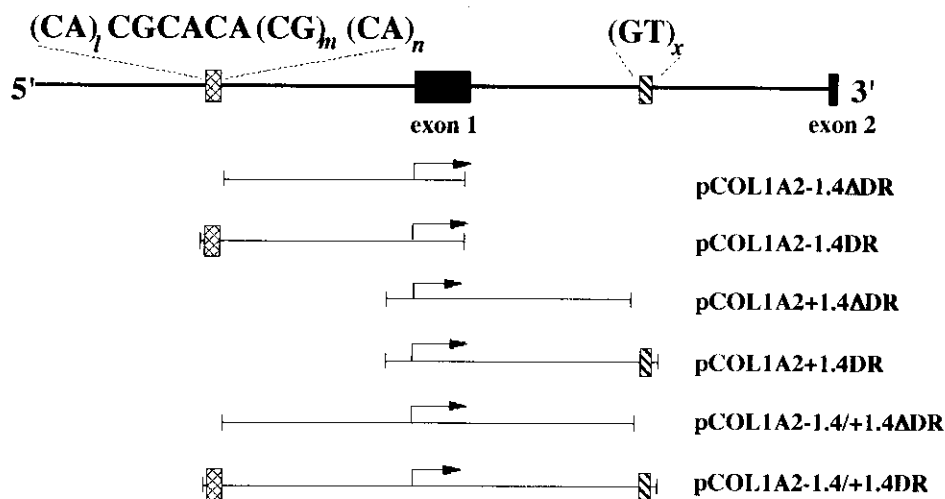


Fig. 1. Schematic diagrams of the 5' region of the *COL1A2* gene (uppermost) and gene fragments (lower diagrams) that were contained in the plasmid clones used for the study. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene. Crosshatched and hatched boxes indicate the dinucleotide repeat in the upstream and in the 1st intron of the gene, respectively. Names of plasmid clones containing the DNA fragments are indicated on the right side.

二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトの高次構造解析

溶液中で遺伝子DNAは一般に右巻きラセンのB型構造をとっている。今回のアガロースゲル二次元電気泳動の解析結果ではCOL1A2遺伝子の二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトでは一次元目の泳動で泳動距離の変化する点が検出され(Fig. 2A)、反復配列を持たないコンストラクトではこの変化が検出されなかった(Fig. 2B)。この結果は少なくとも二つの反復配列を持つコンストラクトには高次構造の異なる(Z型構造)領域が存在していることが示された。

2. Z型構造の局在部位の解析

ついで上流反復配列とイントロン反復配列の両者がZ型構造を形成しているのか、あるいは反復配列のどちらか片方がZ型構造を形成しているのか、ま

たは、Z型構造の形成に二つの反復配列の共存が必要かを調べるために、各々の反復配列を持つコンストラクト(Fig. 3A and 3B)、および反復配列を含まないコンストラクト(Fig. 3C and 3D)を作成し、上記と同様に二次元ゲル電気泳動法で高次構造を解析した。その結果、上流の反復配列を含むコンストラクトは一次元目の泳動で泳動距離が変化する点が存在し、上流反復配列を含まないコンストラクトではトポアイソマーが連続して分離され、泳動距離の変化する点が存在しなかった(Fig. 3A and 3C)。この結果上流反復配列がZ型構造を形成していることが示された。さらに、Z型構造の形成に二つの反復配列の共存は必要無いことが判明した。一方、イントロン反復配列を含むコンストラクト及び同様のコンストラクトで反復配列を持たないものは共に泳動距離の変化する点が存在せず(Fig. 3B and 3D)、イントロン反復配列は同じ条件でZ型構造を形成しないこ

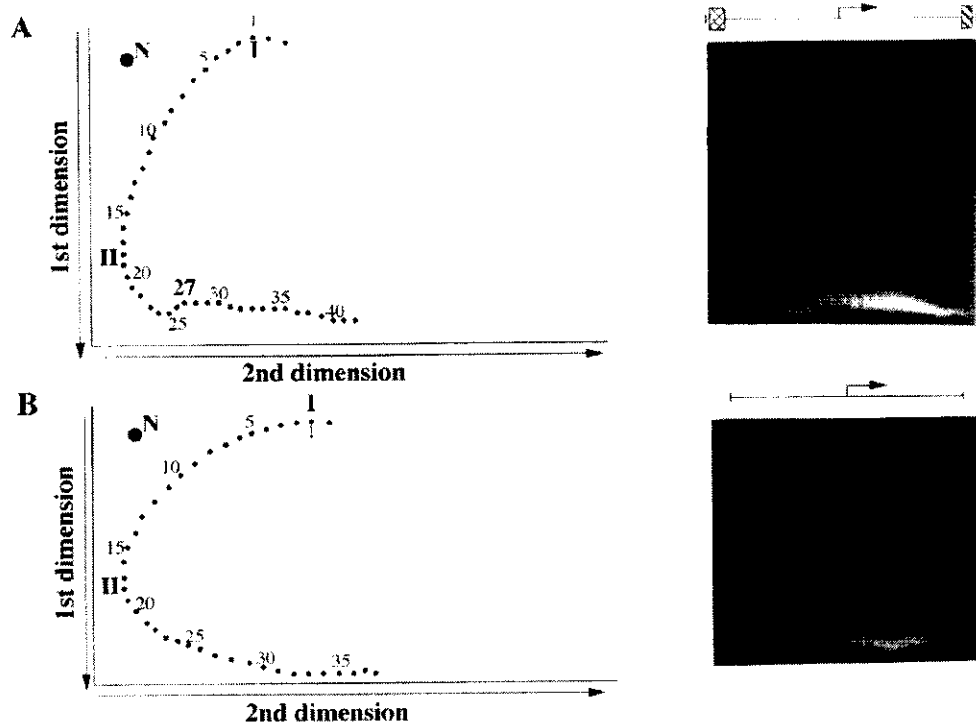


Fig. 2. Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat and $x=12$ of the 1st intron repeat (A), and pCOL1A2-1.4/+1.4DDR, which does not contain either repeat (B). Electrophoretic patterns of the respective plasmids are shown on the right side of the figure; and schematic diagrams of the results, on the left side. The directions of each dimension of electrophoresis are indicated in the figure. Positions I and II correspond to the minima in electrophoretic mobility in the 1st and 2nd dimension, respectively, and relative topoisomer numbers counted from the minima in the first dimension are indicated. N indicates the position of nicked DNA.

とが判明した。

3. 反復配列の長さやZ型構造の存在量との関係の解析

さらに、上流反復配列の長さやZ型構造の形成能との関係を調べるために、種々の長さの上流反復配列を含むコンストラクトを作成し、上記と同様に二次元電気泳動法でZ型構造の形成量を調べた。その結果、Z型構造の形成量は上流反復配列の反復数の総和にのみ比例すること (Fig. 4A, 4B and 4C)、また、上流反復配列とイントロンの組み合わせによっては影響されないことが判明した (Fig. 4C and 4D)。

考 察

最近DNAの高次構造がDNAの一次構造 (塩基配列)と同様に生物情報を持っていることが明らかになってきた⁹⁾。我々は先に *COL1A2* 遺伝子の上流と第一イントロンに二つの2塩基反復配列が存在し、この二つの反復配列の組み合わせにより *COL1A2* 遺伝子の転写活性が促進されること²⁾、及びこの配列の組み

合わせのうち (13, 6, 8)-12 の組み合わせをホモに持つものは強皮症患者のみに存在し、対照の正常な個体では存在しないことを報告した³⁾。そこでこれらの反復配列による *COL1A2* 遺伝子の転写促進機構を明らかにするために二つの反復配列の高次構造を解析した。上流反復配列、イントロン反復配列の両者が塩基配列からはZ型構造を取りうる事が推定されたが、今回の結果は転写開始点の上流のみに左巻きラセンのZ型構造をとった領域が存在することが明らかになった。Z型構造の存在量は上流反復配列の長さに比例することから、反復配列部分がZ型構造をとっていると思われる。B型ラセンからZ型ラセンへの転移においては超ラセン密度の減少を伴い、これは二次元電気泳動の1次元目におけるトポアイソマーの泳動距離の変化によって示される。B型ラセンから十字架型構造への高次構造の変化によっても超ラセン密度の減少を伴う。上流反復配列はCG反復配列を含むので十字架型構造を取りうる。十字架型構造をとった時の超ラセンのリラクゼーションの総量は $i\pi/10.4$ (i はCG反復配列の長さ)で示される。(19, 7, 8)-12の反復配列を持つコンストラクトの

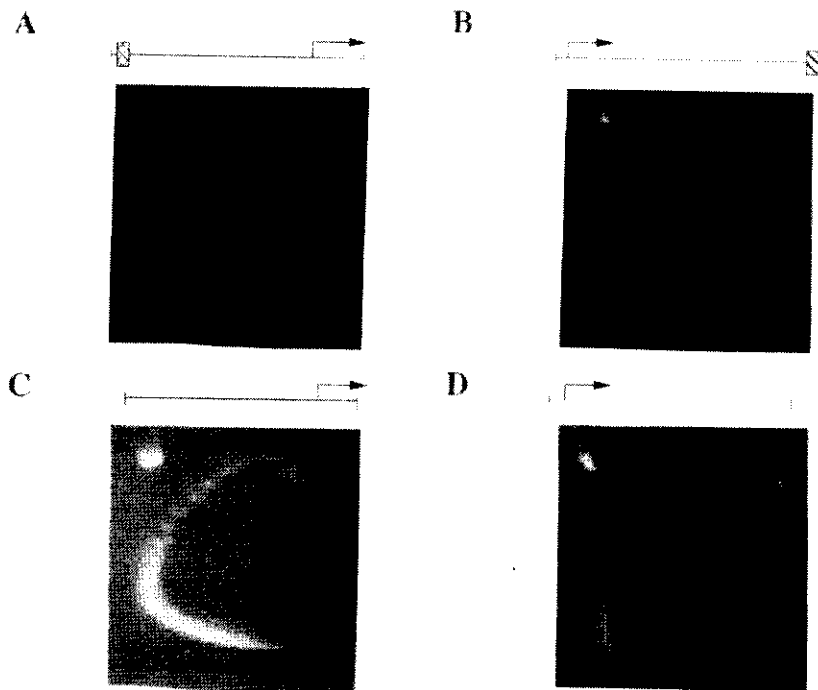


Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat (A), pCOL1A2+1.4DR, containing $x=12$ of the 1st intron repeat (B), and those not containing either dinucleotide repeat, pCOL1A2-1.4DDR (C), and pCOL1A2+1.4DDR (D), respectively.

Diagrams shown at the upper part of the respective figures indicate gross structures of *COL1A2* gene segments contained in these constructs. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene.

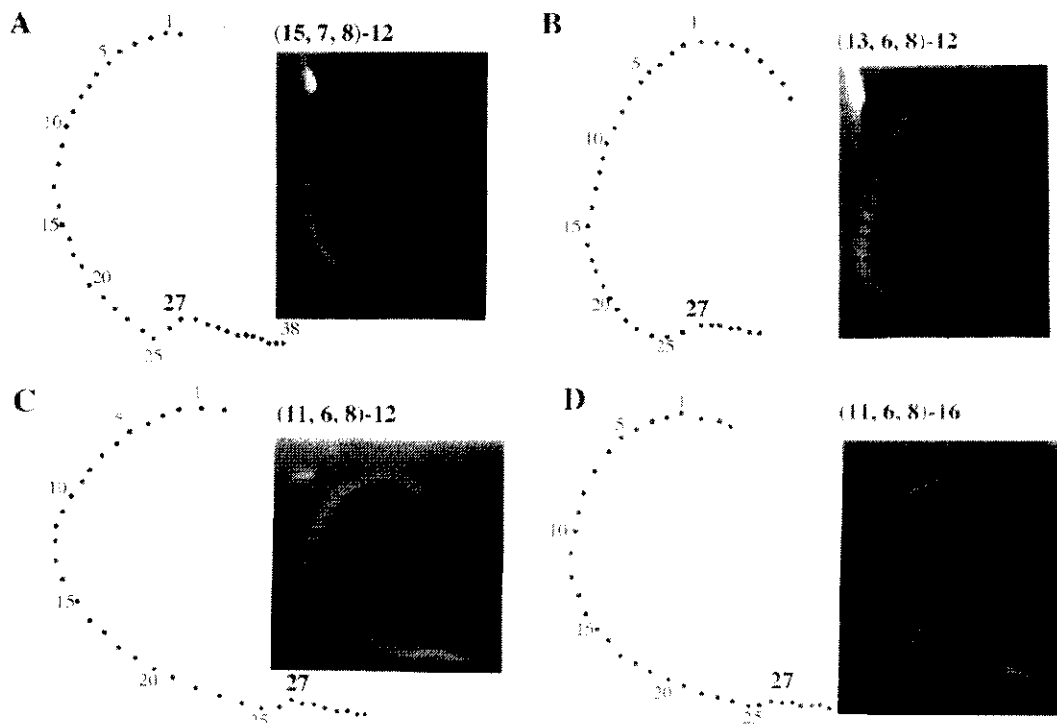


Fig. 4. Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing the following combination of the repeats: (15, 7, 8)-12 (A), (13, 6, 8)-12 (B), (11, 6, 8)-12 (C), and (11, 6, 8)-16 (D). The left side of each figure shows a schematic diagram, and relative topoisomer numbers from minima of the 1st dimension are also indicated.

上流反復配列が十字架型を取るとすると超ラセンのリラクセーションの総量はCG 反復配列を構成する塩基が $2 \times 7 = 14$ なので1.35 (14/10.4)となる。一方、上流反復配列のみがB型ラセンからZ型ラセンへの転移に起こす際の超ラセンのリラクセーションの総量は13.28 (74/10.4+74/12, 74は上流反復配列の総塩基数)である。後者の値は2次元電気泳動による超ラセンのリラクセーションの実測値13 (40-27)と一致する (Fig. 2A)。この結果から、用いたコンストラクトは上流反復配列がB型ラセンからZ型ラセンへの転移をこしたことを支持している。さらに本研究で用いた反復数の異なるコンストラクトの電気泳動における泳動距離のシフトはトポアイソマー番号27で起こっており (Fig. 4)、この値からB型ラセンからZ型ラセンへの転移における超ラセン密度はおおよそ-0.036 (-10.4Y/Z, 4つのコンストラクトでそれぞれ、27/7742、27/7736、27/7732、27/7740)

と算出され、これは過去の反復配列による値と一致する⁵⁷⁾。以上の結果は用いたコンストラクトは上流反復配列のみがZ型構造を取っていることを示す。

しかし、本研究の結果で測定したZ型構造の存在量と転写促進活性は単純な比例関係を示さないので、COL1A2遺伝子の反復配列による転写促進活性を制御する因子はDNAのZ型構造以外にも存在することが示された。これら結果は遺伝子の転写促進において現在の知見では説明できない新しい制御機構の存在を示唆しており、COL1A2遺伝子の研究はこの転写制御の分子機構の研究に好個の材料となるばかりでなく、遺伝子の転写制御と疾患感受性の解明に重要であると考えられる^{10 11)}。

文 献

- 1) Akai J, Kimura A, Arai K, Uehara K, Hata R: Fine structural analysis of the unique 5' region of the human COL1A2 gene containing two regions of dinucleotide repeats adjacent to the transcriptional start site. *Connective Tissue* 1998; **30**: 1-6
- 2) Akai J, Kimura A, Hata R : Transcriptional regulation of the human type I collagen $\alpha 2$ (*COL1A2*) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene* 1999; **239**: 65-73
- 3) Hata R, Akai J, Kimura A, Ishikawa O, Kuwana M, Shinkai H : Association of functional microsatellites in the human collagen $\alpha 2$ chain (*COL1A2*) gene with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **272**: 36-40
- 4) Akai J, Kimura A, Hata R Analysis of the higher-order structure of the two dinucleotide repeat regions that enhance the transcriptional activity of the human type I collagen $\alpha 2$ (*COL1A2*) gene promoter. *Connective Tissue* 2000; **32**: 259-265
- 5) Haniford DB, Pulleyblank DE: Facile transition of poly[d(TG) \rightarrow d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature* 1983; **302**: 632-634
- 6) Rahmouni AR, Wells RD: Stabilization of Z DNA in vivo by localized supercoiling. *Science* 1989; **246**: 358-363
- 7) Peck LJ, Wang JC Energetics of B-to-Z transition in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6206-6210
- 8) Blaho JA, Larson JE, McLean MJ, Wells RD : Multiple DNA secondary structures in perfect inverted repeat inserts in plasmids. Right-handed B- DNA, cruciforms, and left-handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14446-14455
- 9) Herbert A, Rich A : The biology of left handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11595- 11598
- 10) Hata R, Izukuri K, Furue M, Kato Y, Koshika S : Complex gene diseases of the connective tissue. *Connective Tissue* 2001; **33**: in press.
- 11) 畑 隆一郎 I 型コラーゲンの遺伝子多型と結合組織の複合遺伝子病 細胞工学 2001: 印刷中

粥状動脈硬化巣形成過程におけるデルマトポンチンの 役割について

班 員：森 聖二郎（千葉大学 第二内科）
共同研究者：竹本 稔、横手 幸太郎、浅海 直、
齋藤 康（千葉大学 第二内科）

A possible role of dermatopontin in atheromatous plaque formation

**Seijiro MORI, Minoru TAKEMOTO, Koutaro YOKOTE,
Sunao ASAUMI, Yasushi SAITO**

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

Summary

Immunohistochemical analyses were made on the expression of osteopontin (OPN) and dermatopontin (DPN) in neointimal formation of rat carotid arteries caused by balloon catheter-induced endothelial injury. In non-injured arteries, the medial layer stained positively for DPN antibody, but negatively for OPN antibody. At day 7 after endothelial injury, OPN became expressed throughout the intimal thickening where DPN was not expressed. At day 14, OPN expression was gradually decreased whereas DPN became expressed in the intimal layer. At day 28, DPN expression was further increased and expanded all over the intimal layer, but OPN expression was completely diminished. These data suggest that, in the early phase of intimal formation, OPN facilitates the proliferation of intimal smooth muscle cells (SMCs) in autocrine manner, and in the late phase, DPN suppresses the proliferation of intimal SMCs and promotes the synthesis of extracellular matrix possibly by enhancing ambient TGF-beta activity. The reciprocal change of the expression of OPN and DPN may play an important role in determining the nature of atheromatous plaques.

はじめに

粥状動脈硬化巣すなわちプラークを構成する成分のうち、細胞成分を除くと、細胞外マトリックスは脂質とともに量的にも質的にも極めて重要な成分である。特にプラークの破綻、安定化といった観点からは、細胞外マトリックスの量ならびに組成が、プラークの強度を一義的に決定していると言える。プラークの細胞外マトリックスを産生している主たる細胞は平滑筋細胞であり、また細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼを産生している主たる細胞は平滑筋細胞とマクロファージである。

デルマトポンチン (dermatopontin: DPN) は、22 kDaの細胞外マトリックス蛋白である¹⁾。DPNはデコリンならびにTGF- β との結合性を有しており、また培養ミンク肺上皮細胞を用いた検討により、DPNはTGF- β の作用を増強することが示されている²⁾。培養平滑筋細胞において、TGF- β は最も強力なコラーゲン合成刺激作用を有する。実際、インビボでTGF- β の遺伝子を導入された動脈では、1型コラーゲンの産生蓄積が増加していることが示されている³⁾。

我々は前年度の研究において、DPNが血管平滑筋細胞にも発現していることを確認した。そのことにより、平滑筋細胞から分泌されるDPNが、TGF- β の平滑筋細胞への作用に影響を与えることにより、プラーク形成過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで今回我々は、DPNとプ

ラーク形成との関わりについてさらに明らかにすることを目的に、血管組織におけるDPNの発現を免疫組織化学的に検討した。

研究方法

ラットは12週齢のWistar系を用い、バルーンイングによる内膜傷害は常法にしたがって行った⁴⁾。ラット頸動脈を4%パラホルムアルデヒド加リン酸緩衝液で灌流固定した後OCT包埋した。抗ラットオステオポンチン (osteopontin: OPN) 抗体 (MP11TB10)、抗DPN血清を用いた免疫組織染色は常法にしたがって行った⁴⁾。なお本研究はヘルシンキ宣言に準じ、千葉大学医学部における倫理委員会、動物実験取り扱い委員会の規定にしたがい遂行した。

研究結果

我々はまずはじめに、DPNの正常血管壁における発現様式について検討した。ラット頸動脈切片に対し抗DPN抗体を用いた免疫染色を行うと、中膜において平滑筋細胞を中心に、その周辺部位も含めてびまん性に染色された (Figure 1)。この結果から、正常ラット頸動脈では、中膜平滑筋細胞がDPN蛋白を産生しているものと考えられた。

続いて、ラット頸動脈内膜をバルーンカテーテル

Figure 1 Expression of DPN in neointimal lesion of rat carotid artery

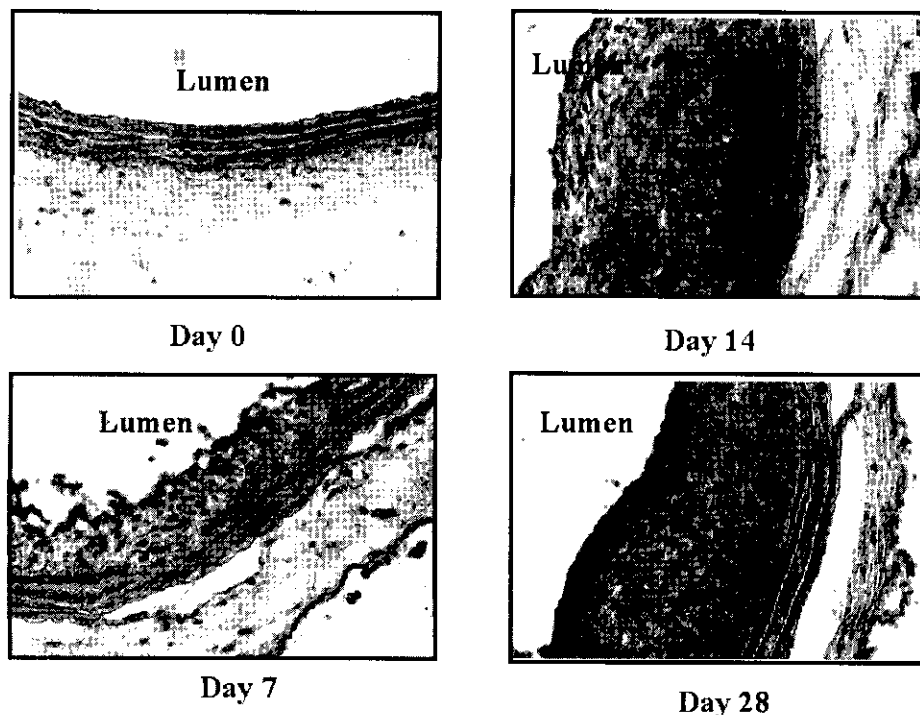
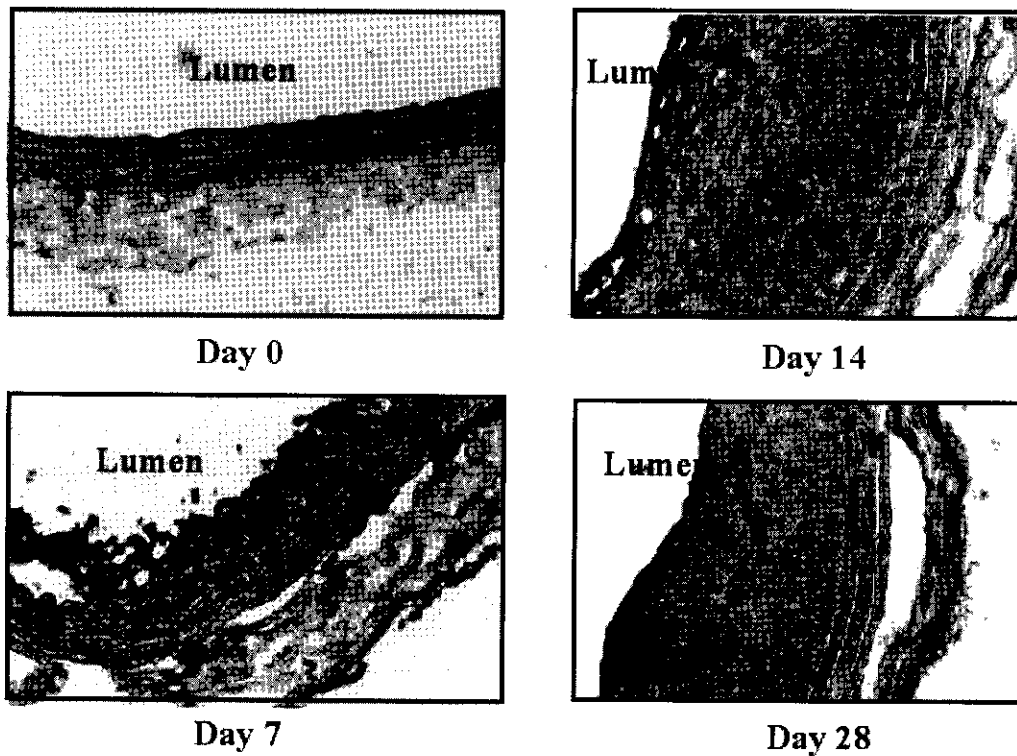


Figure 2. Expression of OPN in neointimal lesion of rat carotid artery



で傷害することによって形成される内膜肥厚モデルを用いて、動脈硬化病変における DPN の発現変化について検討した。その結果、Figure 1 に示すとおり、DPN は内膜傷害後 7 日の時点では、肥厚内膜において全く発現が認められないが、その後 14 日の時点では、肥厚内膜の中膜側を中心に発現が認められるようになり、さらに傷害後 28 日の時点では、肥厚内膜の全層にわたって発現が認められるようになることが判明した。

我々は以前より、OPN が正常動脈壁中膜においては発現していないが、内膜肥厚部においては多量に発現していることを見出していた。したがって、OPN は脱分化した平滑筋細胞のマーカーとなりうることに気付いていた。今回の検討では、Figure 2 に示すとおり、バルーン傷害後 7 日の時点では、肥厚内膜の全層にわたり OPN の発現が認められたが、その後 14 日の時点では、肥厚内膜の管腔側を中心に発現が認められるが、中膜側での発現はかなり減弱し、さらに 28 日の時点では、肥厚内膜の管腔側の一部に発現を認めるのみで、他の部位では発現を殆ど認めないことが判明した。以上のように、OPN の発現は DPN とは極めて対照的であり、したがって DPN は、OPN とは対照的に分化した平滑筋細胞のマーカーとなりう

る可能性がある。

考 察

正常な動脈壁において平滑筋細胞は本来は中膜に存在し、その形質は収縮型と呼ばれ、細胞質は収縮蛋白に富んでいるが蛋白合成は不活発であり、また増殖ならびに遊走活性は低い。その分布は中膜において 3 次的に規則正しく配置され、種々の刺激に応じて適時収縮弛緩することにより血管のトーンスを調整している。一方、プラークに存在する平滑筋細胞は中膜平滑筋細胞に比し分化度が低く、その形質は合成型と呼ばれ、細胞質はゴルジ装置や小胞体に富み活発に蛋白合成を行っているが、収縮蛋白は減少しているため収縮性は乏しい。また、細胞増殖ならびに遊走活性は高い。これら内膜平滑筋細胞は、動脈硬化惹起性刺激に反応して中膜平滑筋細胞が形質変換することにより生じたものと考えられている。平滑筋細胞の形質変換において、基底膜成分であるラミニンは、分化した収縮型平滑筋細胞から脱分化した合成型平滑筋細胞への変換を抑制し、一方で間質結合組織の成分であるフィブロネクチンは、この変換を促進することが知られている。

平滑筋細胞は収縮型から合成型に変化すると、コラーゲン合成能も著しく亢進する。プラークを形成しているコラーゲンは主としてこのような合成型平滑筋細胞によって産生されたものであるが、しかしながら合成型平滑筋細胞のコラーゲン合成速度と増殖速度との間には一般に負の相関がある。したがってプラークが安定化するためには、まずは活発な増殖により十分な量を確保された平滑筋細胞が、その後一旦増殖を休止し、今度はもっぱらコラーゲン産生を行うことによりプラークの構築を強固にするという段階を経る可能性がある。事実、ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて、傷害後2週間の段階では細胞増殖レベルはほぼ初期レベルに復しているにもかかわらず、内膜肥厚は相変わらず増大し続けている⁵⁾。この2週間後の時点では1型コラーゲンのmRNAレベルはピークとなっており、さらに4週間後に向けてゆっくりと減少していく⁶⁾。以上のことから、プラーク形成過程には、初期の平滑筋細胞が活発に増殖するいわゆる増殖期と、その後のコラーゲン産生を活発に行ういわゆるマトリックス形成期とよぶべき2つの時期があることが理解される。

今回、プラークの経時的な免疫組織学的検討から、バルーン傷害後2週間の時点まではOPNの発現が増加するが、その後4週間にかけてはDPNの発現が増加することが判明した。したがってプラーク形成初期の増殖期の段階では、平滑筋細胞から分泌されるOPNがオートクライムの平滑筋細胞の増殖を促進し、一方、その後のマトリックス形成期すなわちプラーク安定化の段階では、平滑筋細胞から分泌されるDPNが、おそらくTGF- β の活性増強作用により、平滑筋細胞の増殖抑制ならびにマトリックス産生の増加をもたらしているものと推察された。

結 論

粥状動脈硬化巣すなわちプラークは、構成する線維成分と脂質成分との量的ならびに質的バランスによりその安定性が決定される。すなわち安定したプラークとは、脂質成分が少なく線維性被膜が強固なプラークであり、一方不安定なプラークとは、脂質成分が多く線維性被膜が薄い脆弱なプラークである。後者は容易に破綻して急速な血栓形成による急性心筋梗塞、あるいは不安定狭心症を発症するため臨床的に問題となる。DPNのプラーク形成過程における作用は今のところ明らかではないが、一般にDPNは局所でのTGF- β の作用を増強すると考えられており、組織の線維化に重要な働きをしていると考えら

れている。したがってプラークにおけるDPNの発現の機能的意義として、線維形成を促進することによりプラークを安定化させる方向に働いている可能性がある。プラーク形成促進作用を有するOPNとは対照的な発現パターンを示すことから、DPNはプラークの安定化さらには退縮過程に重要な働きをしているものと考えられる。

文 献

- 1) Okamoto O, et al: Extracellular matrix 22-kDa protein interacts with decorin core protein and is expressed in cutaneous fibrosis. *J Biochem* 1996; **119**: 106-14
- 2) Okamoto O, et al: Dermopontin interacts with transforming growth factor beta and enhances its biological activity. *Biochem J* 1999; **337**: 537-41
- 3) Nabel EG, et al: Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10759-63
- 4) Takemoto M, et al: Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 624-8
- 5) Clowes AW, et al: Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; **49**: 208-15
- 6) Nikkari ST, et al: Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* 1994; **144**: 1348-56

デコリンコア蛋白質の欠如を伴うエーラス・ダンロス 症候群

班 員：新海 滋（千葉大学 医学部皮膚科）

共同研究者：呉 京海、宇谷厚志、遠藤秀治（千葉大学 医学部皮膚科）

Deficiency of the decorin core protein in the variant form of Ehlers-Danlos syndrome

Hiroshi SHINKAI, Jinghai WU, Atsushi UTANI, Hideharu ENDO

Department of Dermatology, Chiba University School of Medicine

Summary

Decorin belongs to a family of small leucine-rich dermatan sulfate proteoglycans that are involved in the control of matrix organization and cell growth. Here, we described a patient whose skin glycosaminoglycans showed extremely decreased amount of dermatan sulfate compared with a normal control skin. This patient presented clinical features of Ehlers-Danlos syndrome with a chronic skin ulcer. Western blotting revealed that the deficiency of dermatan sulfate was due to the defect of decorin core protein. b-xyloside, an initiator of dermatan sulfate glycosaminoglycan chain elongation, enhanced the synthesis of dermatan sulfate in the fibroblasts of the patient to a similar extent to that of control. This result indicated that the enzymes for the elongation of dermatan sulfate side chains were normal. Northern blotting demonstrated remarkable reduction of decorin mRNA level, while biglycan mRNA level was concomitantly increased and procollagen $\alpha 1(I)$ mRNA level was normal. cDNA and exons sequencing analysis showed there was no mutation in decorin gene of the patient. IL-1 β stimulated decorin expression to about 140% in control fibroblasts while about 110% in patient fibroblasts. On the other hand, TGF- $\beta 1$ resulted in 40% reductions of decorin expression in both control and patient fibroblasts. These data suggested that reduced decorin expression of fibroblasts from the patient of Ehlers-Danlos syndrome may be due to abnormalities in the regulatory regions, which is responsible for the IL-1 β stimulation.

はじめに

プロテオグリカンはコア蛋白質にグリコサミノグリカン鎖を側鎖に結合した分子で細胞接着、他の分子との会合、成長因子との接着が考えられている^{1,2)}。small leucine-rich proteoglycansに属すデコリンはTGF- β と結合する以外に細胞の増殖、移動、コラーゲンとの会合、線維形成に関与している³⁻⁶⁾。本分子の欠損はコラーゲンの線維の不規則なパッキングを来し皮膚の脆弱を招く⁷⁾。エーラス・ダンロス症候群(EDS)は強皮症と異なり皮膚の過進展、関節の過可動⁸⁾を示し、フィブロネクチン、コラーゲンタイプ III、V、 $\alpha 2(I)$ 等⁹⁻¹⁵⁾の欠如がその原因とされている。以前我々はEDSにともなうデコリン欠損を報告したが¹⁶⁾、コラーゲン線維形成におけるデコリンの役割を検討するためにEDSのプロテオグリカンを検討した。

材料と方法

1. 線維芽細胞と皮膚

48歳の慢性皮膚潰瘍を伴ったEDS女性より患者の承諾を得て皮膚を採取し、線維芽細胞を培養した。

2. グリコサミノグリカンの分析

脱脂した皮膚をアルカリ処理、プロナーゼ消化後、徐蛋白、乾燥し、セルローズアセテート膜を用いて二次元電気泳動を行った¹⁷⁾。培地に³H-glucosamine、³⁵S-sodium sulfate、 β -xylosideを添加してグリコサミノグリカン合成能を検討した

17)。

3. IL-1 β 、TGF- β による検討

IL-1 β (10U/ml)、TGF- β 1 (5ng/ml)濃度を培養細胞に添加、24時間後にRNAを回収した。

4. Western blotting

培養細胞および培養液からプロテオグリカンを回収後、chondroitinase ABC消化を行い、SDS-PAGE後PVDF膜に転写し、抗デコリン抗体を用いて検出した。

5. DNA配列の解析

培養細胞から得たデコリンのRT-PCR精製産物(cDNA 82-1258)を用いて解析した。

結果

皮膚グリコサミノグリカン

正常皮膚では乾燥皮膚1gr当たり3.0mgのウロン酸値に対し患者では1.4mgで図1に示すようにデルマタン硫酸はほとんど検出されなかった。

コア蛋白質

デコリンの著し減少がコア蛋白質に由来するか否かを検討するためWestern blottingにより検討したところ正常に比べて著し減少を認めた(図2)。

線維芽細胞のグリコサミノグリカン合成能

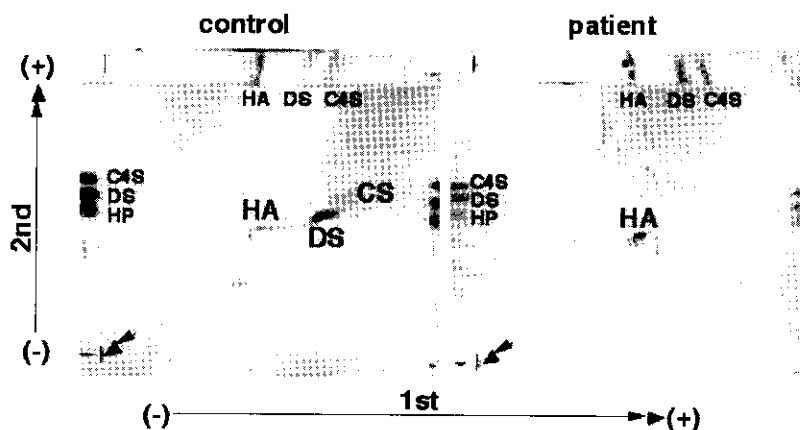


Fig. 1. Two dimensional electrophoretic patterns of GAGs from control and patient skin. Electrophoresis was performed on a cellulose acetate membrane in 0.1 M pyridine/0.47 M formic acid, pH 3.0, at 1 mA/cm for 90 minutes for the first dimension and in 0.1 M barium acetate at 1 mA/cm for 3.5 hours for the second dimension. The membrane was stained by alcian blue. Arrow indicates the origin. HA: hyaluronic acid, DS: dermatan sulfate, C4S: chondroitin-4-sulfate, HP: heparin.

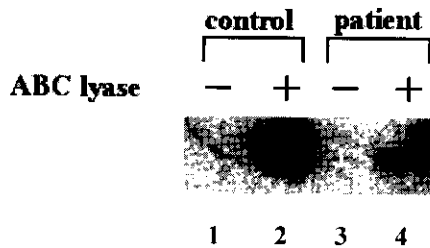


Fig. 2. Western blotting analysis of decorin core protein levels secreted by control and patient fibroblasts. After CPC precipitation from conditioned media, 15 mg samples of control and patient fibroblasts were treated with or without chondroitin ABC lyase. The products were applied on 12.5% SDS-PAGE and followed by western blotting with anti-decorin antibody. Decorin is detected as a single 45 KDa band. Lane 1, control fibroblasts without ABC lyase digestion; lane 2, control fibroblasts with ABC lyase digestion; lane 3, patient fibroblasts without ABC lyase digestion; lane 4, patient fibroblasts with ABC lyase digestion.

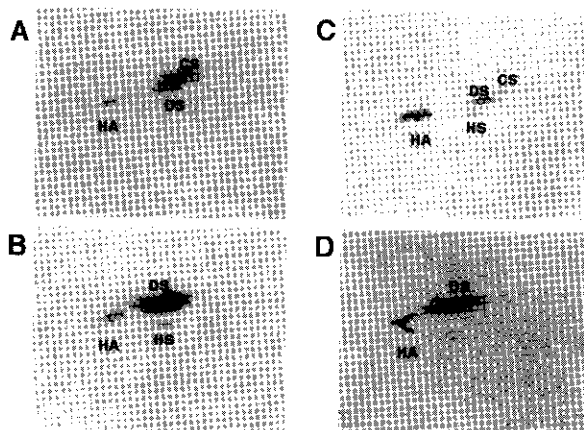


Fig. 3. In vitro study of GAGs synthesis and enzymatic activity for dermatan sulfate elongation. The fibroblasts were metabolically labeled with ^3H -glucosamine and ^{35}S -sodium sulfate, for 24h. The labeled GAGs were collected and separated on a cellulose acetate membrane by two-dimensional electrophoresis and visualized by fluorography. A: control fibroblasts, C: patient fibroblasts. The fibroblasts were also labeled in the presence of β -xyloside. The GAGs were analyzed as above. B: control fibroblasts with β -xyloside, D: patient fibroblasts with β -xyloside. HA: hyaluronic acid, DS: dermatan sulfate, C4S: chondroitin-4-sulfate, HS: heparan sulfate.

β -xylosideはグリコサミノグリカン合成のイニシエーターとなることから培養細胞に添加してデルマタン硫酸の伸長が起こり得るかを検討したとこ

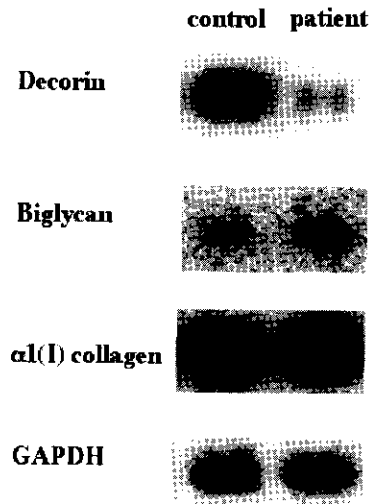


Fig. 4. Northern blotting of decorin, biglycan and $\alpha 1(I)$ collagen mRNA levels of control and patient fibroblasts. The same membrane was stripped and used for northern blotting with each probe.

ろ、添加しない場合と比較してデルマタン硫酸の合成をみとめた(図3)。これらの結果は本細胞はデルマタン硫酸合成系にかかわる酵素 (xylosyl transferase, galactosyl transferase I, II 及び glucuronosyl transferase 18)) には異常がないことが考えられた。

デコリン遺伝子発現

デコリンの減少がコア蛋白質の異常が考えられたため、コア蛋白質の遺伝子発現と他のマトリックス分子の遺伝子発現との関連を検討したところ、本細胞ではデコリン mRNA の発現は減少していたが、バイグリカンは相対的に約3倍増強していた。しかしコラーゲン $\alpha 1(I)$ mRNA の発現には差を見いださなかった(図4)。

デコリン DNA 配列

この著しデコリン遺伝子発現の低下がデコリン遺伝子の DNA 配列異常に基づくかを検討したが、コーディング領域 (exon 1-8) の遺伝子配列異常を見いだすことは出来なかった。

IL-1 β と TGF- β によるデコリン発現の検討

デコリンはサイトカインの影響を受けてその発現を制御されている。本細胞のデコリン遺伝子のコーディング領域に遺伝子異常が存在しないことからその発現に制御されている因子を検討するため IL-1 β と TGF- β によるデコリン発現の検討した。正

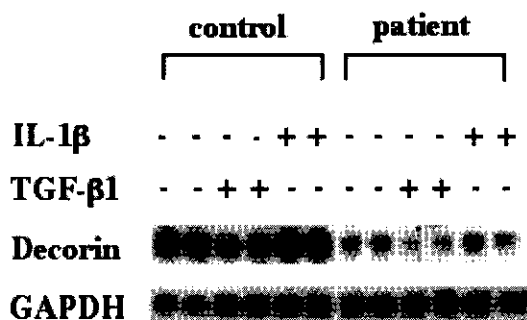


Fig. 5. Effect of IL-1 β or TGF- β 1 on the expression of decorin mRNA. Confluent fibroblasts from control and the patient were cultured in DMEM containing 0.5% FBS with 10 units/ml IL-1 β or 1 ng/ml TGF- β 1 for 24h. RNA was obtained from duplicate experiments and 5 mg of total RNA from control or patient fibroblasts was used.

常人線維芽細胞は IL-1 β 添加によりデコリン遺伝子発現は 140% 増加するが、本細胞はその応答に対して約 110% の増強を示し (図 5)、蛋白質レベルにおいても同様の結果を示した (図 6)。しかし TGF- β に対しては両細胞は約 40% の発現低下を示した。

考 察

EDS ではこれまでコラーゲン I, III, V 型の異常¹⁰⁻¹⁴⁾ の他、デコリン欠損も報告され¹⁵⁾、今回の患者も前回報告の症例に類似する。デコリンはコラーゲン線維の形成を制御し³⁾、その径の調整や線維間をうずめる¹⁹⁻²⁰⁾。デコリンの KO マウスでは皮膚に強く症状 (皮膚の厚さ、脆弱性) が現れる。これまでデコリンはフィブロネクチン、ビトロネクチン、TGF- β と結合して、細胞のミクロの環境を変えることにより、創傷治癒過程で機能しているとの報告がある²¹⁻²²⁾。デコリンの側鎖であるデルマタン硫酸は線維芽細胞成長因子-2 と結合して細胞増殖に関与している²³⁾。

デコリンの転写調節に関して IL-1 β and TGF- β の報告があり、細胞が合成する他の因子が存在するか否かをコンディションメディアムの交換により検討したが、デコリンの遺伝子発現には互いに影響することはなかった。この結果は正常線維芽細胞が分泌する分子は患者線維芽細胞に影響する因子が存在しないことが推測された。

本研究で患者線維芽細胞は IL-1 β でデコリン遺伝子発現が上昇することが判明したが、正常人線維芽細胞のそれと比較して影響は低かった。このことからデコリン発現の原因は発現調節領域の異常ある

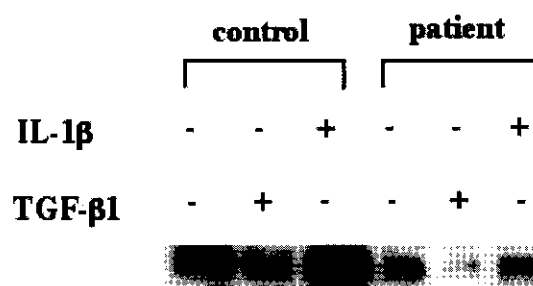


Fig. 6. The expression of decorin protein regulated by IL-1 β or TGF- β 1. Confluent fibroblasts from control and the patient were cultured in DMEM contained 0.5% FBS with 10 units/ml IL-1 β or 1 ng/ml TGF- β 1 for 24h. Samples from the conditioned medium of control or patient fibroblasts were electrophoresed following chondroitin ABC lyase digestion. Decorin was detected with anti-decorin antibody.

いは、同部に結合する転写因子の異常が推測された。デコリン発現低下を伴う carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome²⁴⁾ においても同様の結果が報告されている。一方デコリン異常を伴う Marfan 症候群²⁵⁾ では IL-1 β はデコリン遺伝子に対して影響がなかったとし、デコリンの調節領域の異常が想定されている。

結 語

デコリン欠如は皮膚の脆弱を招き、コラーゲン線維形成に影響を与える。本例ではデコリン遺伝子の発現低下は発現調節領域の異常あるいは、同部に結合する転写因子の異常が推測された。

文 献

- 1) Wight TN, Kinsella MG, Qwarnstrom EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:793-801
- 2) Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991; 64: 867-9
- 3) Vogel KG, Paulsson M, and Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 1984; 223: 587-597
- 4) Keeney DR, San Antonio JD, Mayne R, McQuillan DJ, Sarris G, Santoro SA, and Renato V. Iozzo. Decorin binds near the C terminal of type I collagen. *J Biol Chem* 2000; 275: 20801-20804

- 5) Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5250-6
- 6) Helbom E and Heinegard D. Binding of fibromodulin and decorin to separate site on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 1993; **268**: 27307-12
- 7) Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, and Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; **136**: 729-743
- 8) McKusick VA. Ehlers-Danlos syndrome. In: McKusick VA, ed. *Heritable disorders of connective tissue*. 4th ed. St. Louis: CV Mosby, 1972; 292-371
- 9) Giunta C, Steinmann B. Characterization of 11 new mutations in COL3A1 of individuals with Ehlers-Danlos syndrome type IV: preliminary comparison of RNase cleavage, EMC and DHPLC assays. *Hum Mutat* 2000; **16**: 176-7
- 10) Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J of Hum Genet* 2000; **66**: 1398-402
- 11) Colombi M, Moro L, Zoppi N, Ghinelli A, Barlati S. Altered fibronectin mRNA splicing in skin fibroblasts from Ehlers-Danlos syndrome patients: in situ hybridization analysis. *Cell Biol Int Rep* 1991; **15**: 1195-206
- 12) Hata R, Kurata S, Shinkai H. Existence of malfunctioning pro alpha 1(I) collagen genes in a patient with a pro alpha 2(I)-chain-defective variant of Ehlers-Danlos syndrome. *Eur J Biochem* 1988; **174**: 231-237
- 13) Stolle CA, Pyeritz RE, Meyers JC, Prockop DJ. Synthesis of an altered type III procollagen in a patient with type IV Ehlers-Danlos syndrome, A structural change in the alpha 1(III) chain which makes the protein more susceptible to proteinases. *J Biol Chem* 1985; **260**: 1937-44
- 14) Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome. *J Med Genet* 1996; **33**: 940-6
- 15) Smith LT, Wertelecki W, Milstone LM, Petty EM, Seashore MR, Braverman IM, Jenkins TG, Byers PH. Human dermatosparaxis: a form of Ehlers-Danlos syndrome that results from failure to remove the amino-terminal propeptide of type I procollagen. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 235-44.
- 16) Fushimi H, Kameyama M and Shinkai H. Deficiency of the core proteins of dermatan sulphate proteoglycans in a variant of Ehlers-Danlos syndrome. *J Inter Med* 1989; **226**: 409-16
- 17) Hata R, Nagai Y. A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis. *Anal Biochem* 1972; **45**: 62-8
- 18) Shinkai H. Proteoglycans: structure, biosynthesis, and degradation. In: Lapiere CM, Krieg T, editors. *Connective tissue diseases of the skin*, New York: Marcel Dekker, 1993: 17-30
- 19) Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interaction. *Biochem J* 1988; **252**: 313-323
- 20) Scott PG, Winterbottom N, Dodd CM, Edwards E, Pearson CH. A role for disulphide bridges in the protein core in the interaction of proteodermatan sulphate and collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; **138**: 1348-54
- 21) Huttenlocher A, Werb Z, Tremble P, Huhtala P, Rosenberg L, Damsky CH. Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin. *Matrix Biol*. 1996; **15**: 239-50
- 22) Scott PG, Dodd CM, Tredget EE, Ghahary A, Rahemtulla F. Immunohistochemical localization of the proteoglycans decorin, biglycan and versican and transforming growth factor-beta in human post-burn hypertrophic and mature scars. *Histopathology* 1995; **26**: 423-31
- 23) Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M, Gallo RL. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblasts growth factor-2 function. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28116-21
- 24) Gu J and Wada Y. Aberrant expression of decorin and biglycan genes in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Biochem* 1995; **117**: 1276-9
- 25) Pulkkinen L, Kainulainen K, Krusius T, Makinen P, Schollin J, Gustavsson KH, Peltonen L. Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17780-5

デルマトポンチン・ノックアウトマウスの解析

班 員：新海 滋（千葉大学 皮膚科）

共同研究者：竹田 潮（千葉大学 皮膚科）、安達 栄治郎（北里大学医学部
分子形態学）、松本 健郎（東北大学大学院生体機能工学）

谷口 克（千葉大学大学院免疫発生学）

Targeted disruption of dermatopontin leads to abnormal collagen fibrillogenesis.

H. SHINKAI, U. TAKEDA, E. ADACHI*, T. MATSUMOTO#, M. TANIGUCHI[‡]

(Department of dermatology, Chiba university school of medicine, Chiba, Japan, *Department of Molecular Morphology, Kitasato University Graduate School of Medicine, Sagami-hara, Japan,

[#]Biomechanics Laboratory, Graduate School of Mechanical Engineering, Tohoku University,

Sendai, Japan, [‡]Department of molecular immunology, Chiba university school of medicine,

Chiba, Japan)

Summary

Dermatopontin (DPT) is a 22-kDa extracellular matrix protein (ECM), which widely distributes, including skin, skeletal muscle, bone, cartilage, and other tissues. DPT has been shown to interact with decorin and have cell adhesion activity, which is mediated by cell surface integrin receptor. Moreover, DPT binds to type I collagen and accelerates collagen fibril formation in vitro. We generated the DPT-null mice by gene targeting to study the biological function of DPT. DPT-null mice were born alive, grew to normal size and were fertile. DPT-null mice showed Ehlers-Danlos syndrome-like skin laxity and fragility, although these mice did not exhibit obvious histological abnormalities of the skin. In electronmicroscopic studies, the diameter of collagen fibrils in skin from DPT-null mice is remarkably greater than that of littermate control and individual fibrils in DPT-null mice exhibit irregular contours. In addition, the absence of DPT leads to skin fragility confirmed by tensile strength test. The values of tensile strength measurements of the skin are significantly reduced in DPT-null mice as compared with normal littermate. These results indicate that DPT plays an important role in collagen fibrillogenesis in vivo.

はじめに

強皮症の病態は皮膚、肺をはじめとする結合組織の線維化であり、病変部位へのコラーゲンおよび細胞外マトリックス (ECM) 成分の異常蓄積をみとめるが線維化過程における ECM の調節機序に関してはいまだ不明な点が多い。

新規細胞外マトリックス成分であるデルマトポンチン (DPT)¹⁻³⁾ は、皮膚、骨組織、骨格筋などに発現し^{2,3,6)}、デコリンやコラーゲンに結合することや細胞接着活性があることが判明している^{7, 8)}。そのため線維芽細胞と細胞外マトリックスとの相互作用に関与することが考えられる。In vitro で DPT がコラーゲン細線維形成を促進する報告があることより、強皮症などの線維化過程においてもコラーゲン線維の形成を調節をしている可能性がある^{7, 9)}。

我々はジーンターゲティングにより DPT ノックアウトマウスを作成し、DPT の生体内における機能を検討した。

材料と方法

1. ノックアウトマウスの作製

ヒト DPT cDNA を用いて、マウスゲノムライブラリ (λ DASHII) よりマウス DPT の翻訳開始コドンを含むエクソン 1 をスクリーニングした。エクソン 1 がネオマイシン・カセットと置換するようにターゲティングベクターを構築し、R1 ES 細胞にエレクトロポレーションにより遺伝子導入した (Fig. 1A)。相同組み換えしたクローンをサザンプロットにより確認し、aggregation 法によりキメラマウスを得た。F1 ヘテロ 同士の交配によって得られた F2 マウスをサザンプロットおよび PCR 法により genotyping を行い、wild type (コントロール) およびノックアウトマウスを解析にもちいた (Fig. 1B, C)。

ノックアウトマウスにおける DPT 遺伝子および蛋白レベルの発現が欠失していることを、RT-PCR 法、ウエスタンプロットにより確認した (Fig. 1D, E)。

2. 形態学的解析

6 週齢から 8 週齢のマウスの背部より皮膚組織を採取し、10% ホルマリン固定後、HE 染色、Azan 染色にて光顕レベルでの組織学的解析を行った。また、電顕によりコラーゲン細線維形成の解析を行った。

3. 皮膚の引張試験

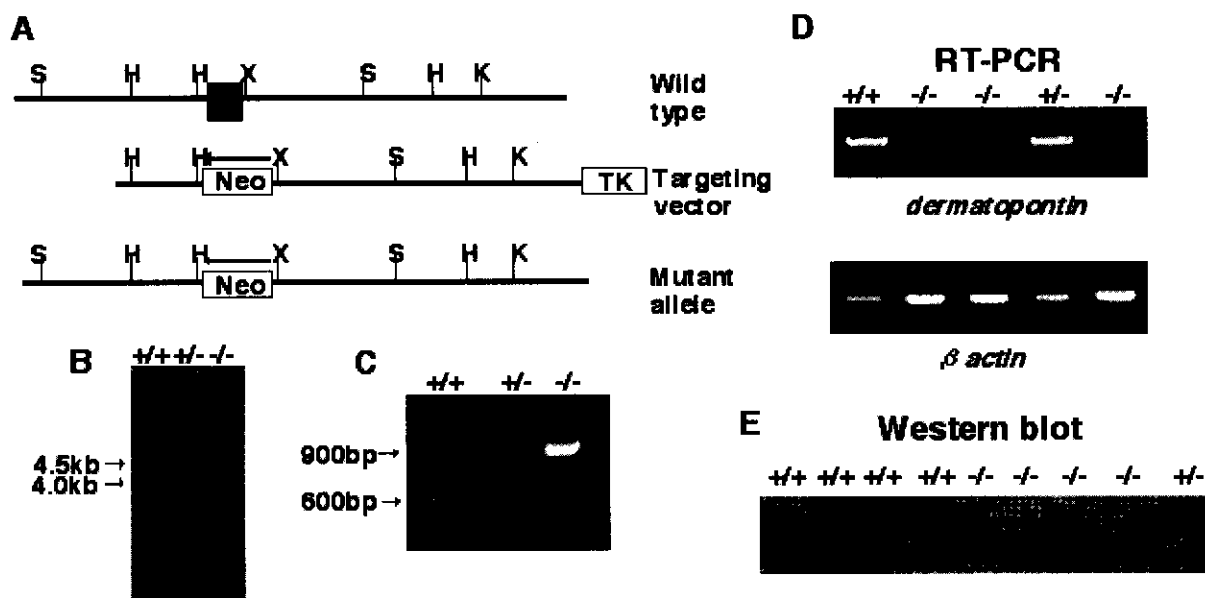


Figure 1. Targeted disruption of the DPT gene and generation of DPT-null mice.

(A) Targeting strategy. Schematic representation of the DPT locus, targeting vector, and recombination at the DPT locus. Correct targeting should replace the 0.6-kb Hind3-Kpn1 segment containing the exon 1 with the 1.1-kb pMC1neo cassette for positive selection. H, Hind3; K, Kpn1; S, Sac1; X, Xba1. (B) Southern blot analysis of DNA isolated from the wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) adult mouse. Presence of a 4.5-kb Sac1 fragment indicates one correctly targeted allele. (C) PCR detection of the targeted allele. (D) RT-PCR analysis of RNA from the tail tissues. (E) Immunoblot analysis of protein (100 μg) extracted from the tail tissues using anti-DPT antibody. Notice the presence of the 22-kD protein in the wild type and heterozygous animal while no immunoreactive material was detected in the homozygous mouse.

体幹部より採取した皮膚を体の左半分、右半分に分け、各々からダンベル型皮膚片を長軸方向が腹と背中を結ぶ方向に一致するようにそれぞれ1ケずつ切出し、引張試験 (20mm/min) を行った。

4. グリコサミノグリカン (GAG) の解析

背部皮膚組織を細切した後、0.5M NaOHで4℃、一晚攪拌。0.5N HClで中和後、pH8.0、60℃の条件でプロナーゼによる消化を行い、遠心後に上清を回収。トリクロロ酢酸を加え1時間氷上で静置した後遠心、上清を回収し蒸留水に対して透析したものを凍結乾燥し、GAGサンプルとした。各々のサンプルをウロン酸定量および2次元電気泳動に供した。

結果

ノックアウトマウスは正常に生育し、生殖能にも異常はみとめられなかった。外観もコントロールと比較して明らかな異常はみとめられなかったが、ノックアウトマウスでは、皮膚の伸展性の亢進が触知された。

1. 皮膚の組織学的変化

HE染色、Azan染色標本 (Fig. 2) では、ノックアウトマウスの真皮コラーゲン線維束の密度がコントロールに比して疎であることがみとめられた。

2. コラーゲン細線維の形態学的変化

真皮において電顕所見より、ノックアウトマウスではコラーゲン細線維の密度が疎であり、コラーゲン細線維の直径が大小不同であることが観察された (Fig. 3)。

3. 皮膚の脆弱性

ノックアウトマウスとコントロールを比較すると皮膚の伸びと負荷の関係には有意な差はみとめられなかったが、皮膚が破断する時の最大張力はノックアウトマウスでは有意に減少していた (Fig. 4)。

4. GAG成分の変動

乾燥重量当たりのGAG総量が、ウロン酸定量の結果からノックアウトマウスでコントロールと比較して約2倍に増加していた (Fig. 5A)。2次元電気泳動

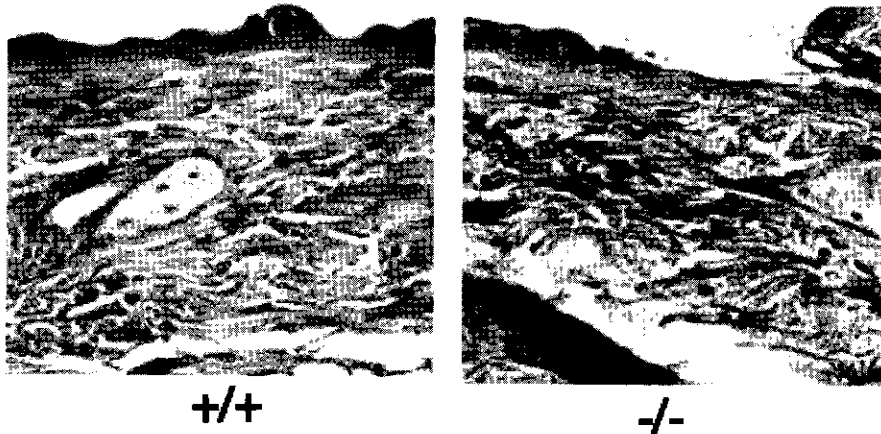


Figure 2. Histological analysis of dorsal skin from wild type (+/+) and DPT-null (-/-) mice. The sections were Azan stained in which the connective tissue, collagens primarily stain blue. The collagen fibers in DPT-null (-/-) mice were sparse and interfiber spaces were increased.

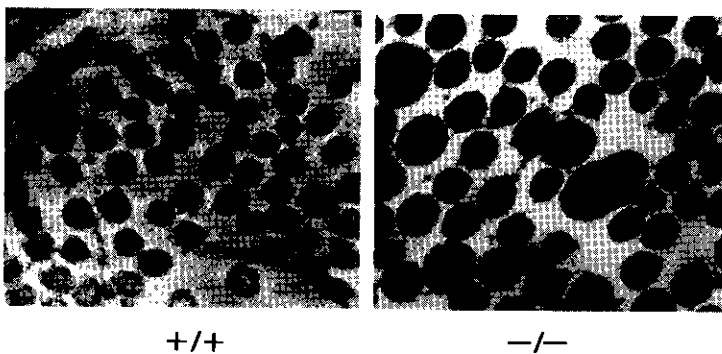


Figure 3. Transmission electron micrography of collagen fibrils in reticular dermis. The presence of larger fibrils with irregular contours in the tissue from DPT-null (-/-) mice, in comparison with the more compact and uniform pattern of fibrils in the control (+/+) mice.

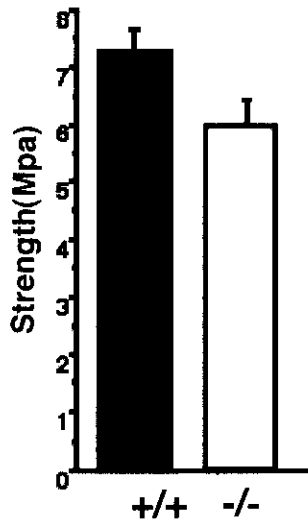


Figure 4. Skin tensile stress-strain measurements. The average of maximum strength in DPT-null (-/-) was 20% lower than the wild type (+/+) mice.

によりノックアウトマウスではヒアルロン酸が著明に増加していることが判明した (Fig. 5B)。

考察

DPT ノックアウトマウスではコラーゲン細線維の径が顕著に増大していることより、DPT は細線維形成を調節していることが明らかになった。これまでにプロテオグリカンの一つであるデコリンのノック

アウトマウスでは、皮膚の脆弱性と張力低下があり、電顕像ではコラーゲンは粗維で細線維の太さが不均一であった¹⁰⁾。また、ルミカン¹¹⁾、ファイブロモジュリン¹²⁾のノックアウトマウスでも同様の電顕像をみとめている。最近、プロテオグリカンではないECM成分のトロンボスポンディン2・ノックアウトマウスでも同様の所見が報告されており¹³⁾、様々なECM分子がコラーゲンの線維の形成に関与していることが考えられる。DPT が直接的に、あるいはデコリンなどの他のECMと協調して細線維径を調節しているのかは今後解明すべき問題である。

DPT ノックアウトマウスのGAG 解析によりヒアルロン酸の増加がみられた。これは、真皮のコラーゲン線維の密度が疎になっていることへの生体の代償的作用の可能性が考えられる。

強皮症の線維化過程ではコラーゲン細線維の径は細くなり、密度も増加することが知られている。今後、DPT のコラーゲン細線維形成調節機構を分子レベルで解明し、線維化モデルにおいて抗体やペプチドを用いてDPT の機能を抑制し、線維化に対する効果を検討していく予定である。

文献

- 1) Okamoto, O., Suzuki, Y., Kimura, S. & Shinkai, H. Extracellular matrix 22-kDa protein interacts with decorin core protein and is expressed in cutaneous fibrosis. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 119: 106-14

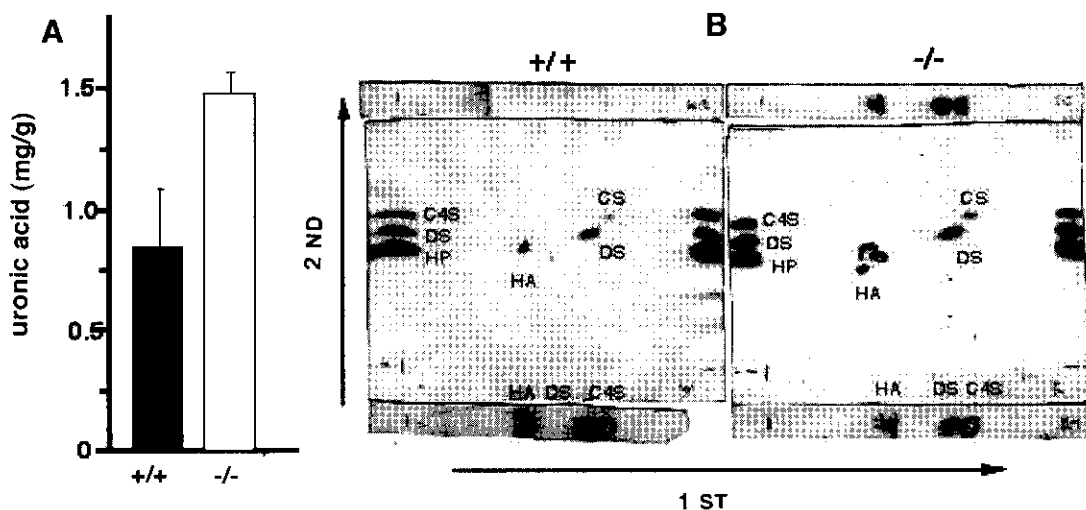


Figure 5. GAGs analysis of dorsal skin. (A) Total uronic acid content in skin specimens from DPT-null (-/-) and wild type (+/+) mice. The average of total uronic content in DPT-null (-/-) increased two-fold above the wild type (+/+) mice. (B) Representative two-dimensional electrophoretic pattern of GAGs from DPT-null (-/-) and wild type (+/+) mice. Note hyaluronic acid in DPT-null (-/-) remarkably increased compared with wild type (+/+) mice, while there was no difference in dermatan sulfate and chondroitin sulfate. HA, hyaluronic acid; DS, dermatan sulfate; C4S, chondroitin 4-sulfate; HP, heparin sulfate.