

D. 考 察

コラーゲンは、一般に3本鎖の高次構造を構成するため、親水性と疎水性の部分複雑に入組んでいる。さらに、VII型コラーゲンはそのコラーゲンのなかでも最長のコラーゲンである。我々は、リコンビナントVII型コラーゲンを得るために、細菌にその遺伝子を組み込んだが、発現する細菌は死滅し、出来たVII型コラーゲンも可溶性にやならなかった。次に、ヒトの表皮細胞で挿入された遺伝子を強力に発現するpCY4BにVII型コラーゲンのcDNAを組込み、ヒト表皮細胞に導入したが、発現細胞は増殖しなかった。そこで我々は、2段階方式であるFlp-in systemを採用し、最終的にVII型コラーゲンの持続発現株の作成に成功している。また、VII型コラーゲンの発現株に形態的な異常はなかった。

現在までに、VII型コラーゲン遺伝子導入細胞から分泌されるVII型コラーゲンを大量に分離する方法を開発中である。今回の研究では、VII型コラーゲン自体の潰瘍治癒作用を確認するため、VII型コラーゲンを含む培養上清で潰瘍の治療を行った。その結果、対照と比較してVII型コラーゲン添加群では有意に治療効果が確認できた。この結果は、表皮水疱症患者の潰瘍面にVII型コラーゲン蛋白を外用したり、自己培養表皮シート移植の場合にVII型コラーゲンを添加してから表皮シートを移植する療法が有効である可能性が示唆された。また、VII型コラーゲンの遺伝子を導入する遺伝子治療を鑑み、VII型コラーゲン遺伝子を導入した表皮細胞株から表皮シートを作成し、潰瘍面に移植したが、対照と比較して有意な差はなかった。今回の実験で用いたラットはVII型コラーゲンに関しては正常であるため、このような結果であったことが推測され、今後VII型コラーゲンノックアウトマウスを使用する実験を予定している。

E. 結 論

VII型コラーゲン蛋白を外用する治療やVII型コラーゲンを外用してから表皮シートを移植する療法の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究発表や論文投稿に関して準備中である。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金
（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

VII 型コラーゲン遺伝子に確認された alternative splicing の創傷治癒への関与

増永卓司（株式会社コーセー研究本部 主任研究員）

研究要旨

VII 型コラーゲンは栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子である。その蛋白補充療法や遺伝子治療のための、VII 型コラーゲン cDNA の全長を作成した。その作成過程で見出された 27bp の挿入が alternative splicing から生ずることを確認し、前年に報告した。本研究では、その alternative splicing が創傷治癒に関連している可能性が示唆された。

A. 目 的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年、表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする種々の遺伝子変異により本症が発症することが明らかとなった。VII 型コラーゲン遺伝子は、栄養障害型の原因遺伝子でありが、遺伝子が 3 万塩基対と非常に長く、エクソンも 118 と数が多い。そこで本症の、蛋白補充療法や遺伝子治療に用いられる遺伝子は、イントロンを除いた cDNA となる。

本研究グループではすでに VII 型コラーゲン cDNA の全長を表皮細胞のライブラリーからクローニングしている。VII 型コラーゲンは N 末端側の非コラーゲン領域 NC-1 domain (145kDa) と C 末端側の非コラーゲン領域 NC-2 domain (34kDa) とが、Gly-X-Y の繰り返し構造からなるコラーゲン領域 collagenous domain (145kDa) を挟む構造をとる。その NC-1 ドメインは各種のコラーゲンやラミニンとの結合に関与している。前回の研究では、NC-1 ドメイン遺伝子に alternative splicing が生じていることを確認した。そこで、今回はその alternative splicing の生体での意義を検討した。

B. 研究方法

1) Alternative splicing のコンピューターによる解析

Alternative splicing から新しく生ずるアミノ酸の立体構造、NC-1 ドメインのどのサブドメインに挿入されるのか、それによってどのような状況が NC-1 ドメインにおこるのかを、コンピュータープログラムを用いて推測した。

2) TGF- β の効果

TGF- β 4 は VII 型コラーゲンの発現を強力に誘導する作用があるし、創傷治癒促進作用がある。そこで、培養表皮細胞に TGF- β を加え、alternative splicing の頻度が増加するかどうかを、検討した。

3) 生体の皮膚での確認

alternative splicing の実際のヒト皮膚で確認するため、熱傷や外傷などで皮膚潰瘍を生じている患者を選択し、正常部と潰瘍周辺から皮膚を採取した。皮膚をデスパーゼ処理し表皮を分離した後、トリプシンにて表皮細胞を単離した。次に、表皮細胞から RNA を抽出し、オリゴ d T にてプライミングしリバーストランスクリプターゼにて cDNA を合成した。その後、PCR を行い alternative splicing の定量化を行った。

C. 研究結果

1) Alternative splicing のコンピューターによる解析

解析の結果、alternative splicing によるアクセプターサイトの移動により、イントロンの配列から新しく 9 アミノ酸が翻訳されることが判明した。そのうち、3 個がプロリンでありこの 9 アミノ酸は turn 構造を作りやすいことが推測された。また、VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインには 9 個のフィブロネクチンタイプ 3 の繰り返し構造があるが、この 9 アミノ酸はフィブロネクチンタイプ 3 の 6 と 7 番目の間にちょうどおさまると予想された。

2) TGF- β の効果

TGF- β を培養細胞に添加し、RT-PCR を行い alternative splicing を検討した所、TGF- β 添加によって alternative splicing の増加が認められた。

3) 生体の皮膚での確認

潰瘍辺縁部と健常部の表皮から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。その結果、健常部と比較して潰瘍辺縁部で、有為に alternative splicing の増加が認められた。

D. 考 察

近年、ヒトのすべてのゲノムの塩基配列が明らかにされ、以前は10万個と考えられた遺伝子数は、3から4万と是正された。そして、数少ない遺伝子から、多機能をもつ蛋白質を作り出す1つの手段として、alternative splicing が注目されている。今回、我々の作成した VII 型コラーゲン遺伝子 cDNA 全長に発見された塩基の挿入は、正常の細胞でも確認された。

その alternative splicing 結果、蛋白では9アミノ酸の挿入となった。その9アミノ酸はプロリンが豊富で折り曲げ構造をとりやすい構造と推測された。VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインには9個のフィブロネクチンタイプ3の繰り返し構造がある。フィブロネクチンタイプ3構造は、約90個のアミノ酸からなり、7つの β ストランドが見つかる。その3ストランドから1つの β シートが、さらに残りの4つからもう1つの β シートが作成される。2つの β シートは向かいあう構造をとり β バレル構造をとる。その結果、フィブロネクチンタイプ3のN末とC末から引っ張る力が働くと、あたかもバネのように伸びたり縮んだりすることが可能になる。今回の alternative splicing により生ずる9アミノ酸は丁度、6と7番目のフィブロネクチンタイプ3ドメインの間に存在し、バネの角度を変え、NC-1 ドメイン全体の細胞外基質への接着能を変化させると推測した。

つぎに、その alternative splicing が表皮と真皮の接着に関与すると推測されたので、創傷治癒への関与も検討してみた。はじめに、創傷治癒を促進させるサイトカインである TGF- β の影響を調べたところ、alternative splicing の増加が認められた。さらに、創傷治癒過程にある潰瘍辺縁の表皮を検討した結果、正常部と比較して alternative splicing の増加が観察された。

E. 結 論

今回、我々が見い出した alternative splicing は、NC-1 ドメインの接着能や表

皮と真皮の結合に変化をもたらし、その結果皮膚の創傷治癒に関連することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究発表や論文投稿準備中。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Akiyama M, Matsuo I, <u>Shimizu H</u>	Formation of cornified cell envelope in human hair follicle development.	Br J Dermatol	146	968-976	2002
Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, McMillan JR, Eady RAJ, <u>Shimizu H</u>	Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development.	J Histochem Cytochem	50	1493- 1500	2002
Ishida- Yamamoto A, Senshu T, Eady RAJ, Takahashi H, <u>Shimizu H</u> , AkiyamaM, Iizuka H:	Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination.	J Invest Dermatol	118	282-287	2002

Kimura K, Sato- Matsumura KC, Nakamura H, Onodera Y, Morita K, Enami N, Shougase T, Ohsaki T, Kato M, Takahashi T, Yamaguchi Y, <u>Shimizu H</u>	A novel A97P amino acid substitution in α -galactosidase A leads to a classical Fabry disease with cardiac manifestations.	Br J Dermatol	147	545-548	2002
Meng X, <u>Sawamura D</u> , Ina S, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I	Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin.	Exp Dermatol	11	456-461	2002
Sato- Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, <u>Shimizu H</u>	Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in 2 families with dystrophic epidermolysis bullosa.	Arch Dermatol	138	269-271	2002

Sawamura D, Yasukawa K, Kodama K, Yokota K, Sato- Matsumura KC, Tanaka T, <u>Shimizu H</u>	The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product.	J Invest Dermatol	118	967-971	2002
Sawamura D, Akiyama M <u>Shimizu H</u>	Direct injection of naked DNA and cytokine transgene expression: implications for keratinocyte gene therapy.	Clin Exp Dermatol	27	480-484	2002
Shibahara M, Nanko H, Shimizu M, Kanda N, Kubo M, Ikeda M, Matsumoto M, Nonaka S, <u>Shimizu H</u>	Dermatitis herpetiformis in Japan :Au update.	Dermatol	204	37-42	2002
Shimizu T, Nishihira J, Mizue Y, Abe R, Watanabe H, <u>Shimizu H</u>	Increased macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the sera of patients with extensive alopecia areata.	J Invest Dermatol	118	555-557	2002

Shimizu T, Tateishi Y, <u>Furuichi Y,</u> Sugimoto M, Kawabe T, Matsumoto T, <u>Shimizu H</u>	Diagnosis of Werner syndrome by immunoblot analysis	Clin Exp Dermatol	27	157-159	2002
Tanita M, Matsunaga J, Miyamura Y, Dakeishi M, Nakamura E, Kono M, <u>Shimizu H,</u> Tagami H, Tomita Y	Polymorphic sequences of the tyrosinase gene: allele analysis on 16 OCA1 patients in Japan indicate that three polymorphic sequences in the tyrosinase gene promoter could be powerful markers for indirect gene diagnosis.	J Hum Genet	47	1-6	2002
Tsuji Y, Kawashima T, Yokota K, Tateishi Y, Tomita Y, Matsumura T, <u>Shimizu H</u>	Clinical and serological transition from pemphigus vulgaris to pemphigus foliaceus demonstrated by desmoglein ELISA system.	Arch Dermatol	138	95-96	2002
Yasukawa K, Sato- Matsumura KC, McMillan J, Tsuchiya K, <u>Shimizu H</u>	Exclusion of COL7A1 mutation in Kindler syndrome.	J Am Acad Dermatol	46	447-450	2002

Yasukawa K, <u>Sawamura D</u> , McMillan JR, Nakamura H, <u>Shimizu H</u>	Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly.	J Biol Chem	277	23670-23674	2002
Yokota K, Takizawa Y, Yasukawa K, Kimura K, Nishikawa T, <u>Shimizu H</u>	Analysis of ATP2C1 gene mutation in 10 unrelated Japanese families with Hailey-Haily disease.	J Invest Dermatol	118	550-551	2002
Okubo S, Sato- Matsumura KC, Abe R, Aoyagi S, Akiyama M, Yokota K, <u>Shimizu H</u>	The use of ELISA to detect desmoglein antibodies in a pregnant woman and fetus.	Arch Dermatol (in press)			
<u>Sawamura D</u> , McMillan JR, Akiyama M, <u>Shimizu H</u>	Epidermolysis bullosa: Directions for future research and new challenges for clinical scientists.	Arch Dermatol Res (in press)			
Arita K, Akiyama M, Tsuji Y, Iwao F, Kodama K, <u>Shimizu H</u>	Squamous cell carcinoma in a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma.	Br J Dermatol (in press)			

Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Kon A, Akiyama M, <u>Shimizu H</u>	Identification of COL7A1 alternative splicing inserting 9 amino acid residues into the fibronectin type III linker domain	J Invest Dermatol (in press)			
Tsuji Y, Akiyama M, Arita K, Senshu T, <u>Shimizu H</u>	Changing pattern of deiminated proteins in developing human epidermis.	J Invest Dermatol (in press)			
TomitaY, Sato- Matsumura KC, <u>Sawamura D</u> , Matsumura T, <u>Shimizu H</u>	The simultaneous occurrence of three independent squamous cell carcinomas in a recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient.	Acta Dermato -Venereol (in press)			
Sato- Matsumura KC, Matsumura T, Yokoshiki H, Chiba H, <u>Shimizu H</u>	Xanthoma Striatum Palmare as an Early Sign of Familial type III Hyperlipoproteinemia with an Apoprotein E genotype e2/e2.	Clin Exp Dermatol (in press)			
Sato- Matsumura KC, <u>Sawamura D</u> , Goto M, Nakamuram H, <u>Shimizu H</u>	A Novel Paternal Four Base Pairs Insertion and a Maternal Nonsense Point Mutation in COL7A1 identified in Hallopeau-Siemens Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa.	Acta Dermato -Venereol (in press)			

Akiyama M, Takizawa Y, <u>Sawamura D</u> , Matsuo I, <u>Shimizu H</u>	Disruption of suprabasal keratin network by mutation M150T in the helix initiation motif of keratin 10 does not affect cornified cell envelope formation in human epidermis.	Exp Dermatol (in press)			
Imamura O, Fujita K, Itoh C, Takeda S, <u>Furuichi Y</u> , Matsumoto T	Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion.	Oncogene	21	954-963	2002
Shiratori M, Suzuki T, Itoh C, Goto M, <u>Furuichi Y</u> , Matsumoto T	WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA as a component of an RNA polymerase I-associated complex.	Oncogene	21	2447-2454	2002
Kawasaki H, <u>Sawamura D</u> , Iwao F, Kikuchi T, Nakamura H, Okubo S, Matsumura T, <u>Shimizu H</u>	Multiple squamous cell carcinoma developed in a 12-year-old boy with non-Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa.	Br J Dermatol (in press)			
Akiyama M, <u>Sawamura D</u> , <u>Shimizu H</u>	The clinical spectrum of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis.	Clin Exp Dermatol (in press)			

20020743

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.25- P.31の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。