

真皮の細胞外マトリックス構造に  
関する超微形態学的研究

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

広瀬拓哉

獣医ウイルス学  
指導教員 教授 桐澤 力雄

2018 年度

## 目次

凡例	1
緒言	2
第 I 章 <i>Slc39a13/Zip13</i> -knockout マウス真皮の細胞外マトリックスの構造	
1. 序文	6
2. 材料と方法	8
3. 結果	11
4. 考察	20
5. 小括	23
第 II 章 <i>Chst14</i> -knockout マウス真皮の細胞外マトリックスの構造	
1. 序文	24
2. 材料と方法	26
3. 結果	29
4. 考察	40
5. 小括	43
第 III 章 McEDS- <i>CHST14</i> ヒト真皮の細胞外マトリックスの構造	
1. 序文	44
2. 材料と方法	46
3. 結果	48
4. 考察	56
5. 小括	58
第 IV 章 真皮のグリコサミノグリカン鎖の立体構造	
1. 序文	59
2. 材料と方法	60
3. 結果	61
4. 考察	73
5. 小括	77
総括	78
謝辞	81
引用文献	82

## 凡例

CB (cupromeronic blue) : キュプロメロニックブルー  
CS (chondroitin sulfate) : コンドロイチン硫酸  
DS (dermatan sulfate) : デルマタン硫酸  
DSE (dermatan sulfate epimerase) : デルマタン硫酸エピメラーゼ  
D4ST1 (dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1) : デルマタン 4-*O*-硫酸基転移酵素 1  
ECM (extracellular matrix) : 細胞外マトリックス  
EDS (Ehlers-Danlos syndrome) : エーラス・ダンロス症候群  
FIB-SEM (focused ion beam scanning electron microscope) : 集束イオンビーム走査電子顕微鏡  
GAG (glycosaminoglycan) : グリコサミノグリカン  
HA (hyaluronic acid) : ヒアルロン酸  
HE (hematoxylin-eosin) : ヘマトキシリン・エオジン  
HP (heparin) : ヘパリン  
HRP (horseradish peroxidase) : 西洋ワサビペルオキシダーゼ  
HS (heparan sulfate) : ヘパラン硫酸  
KS (keratan sulfate) : ケラタン硫酸  
mcEDS (musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome) : 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群  
MMP (matrix metalloproteinase) : マトリックスメタロプロテアーゼ  
PB (phosphate buffer) : リン酸緩衝液  
PBS (phosphate buffered saline) : リン酸緩衝生理食塩水  
PG (proteoglycan) : プロテオグリカン  
SEM (scanning electron microscope) : 走査型電子顕微鏡  
spEDS (spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome) : 脊椎異形成型エーラス・ダンロス症候群  
STEM (scanning transmission electron microscope) : 走査透過型電子顕微鏡  
TEM (transmission electron microscope) : 透過型電子顕微鏡  
TGF (transforming growth factor) : トランスフォーミング増殖因子

## 緒言

皮膚は体表を覆う最大の組織であり、外界の様々な刺激から体を守る働きがある。その構造は外側から表皮、真皮、皮下組織から成るが、部位によってそれぞれの厚さや構成が異なる[69]。表皮は重層扁平上皮で表層から角化層、顆粒層、有棘層、基底層に分けられ、特に直接外界と接触する角化層の厚さは部位により大きく変化する。表皮の基底層の細胞はヘミデスモゾームによって基底膜と接着する[69]。基底膜の真皮側ではⅦ型コラーゲンが、真皮に存在するコラーゲン細線維を抱えるようにして真皮との接着部を形成する[69]。真皮は密線維性結合組織であり、皮膚の主体をなす。真皮も部位で厚さが異なり、皮膚の強度に関与する[2]。真皮は基底膜を介して表皮と接している乳頭層と深部の網状層に分けられ、乳頭層では繊細な線維が緻密に配置される。一方、網状層は乳頭層と構成する成分に大きな差はないものの、乳頭層と比べると大型の線維がやや疎に配置される[69]。

真皮には細胞外マトリックス（ECM）を産生する線維芽細胞や、肥満細胞やマクロファージ、形質細胞などの免疫細胞が存在する。ECMは細胞間の空間を埋める非細胞成分であり、線維成分と非線維成分に分類される。線維成分としてはコラーゲン線維や弾性線維、細網線維があり、非線維成分としてプロテオグリカン（PG）やグリコサミノグリカン（GAG）がある[36]。

ECMの線維成分で代表的なコラーゲン線維は、複数のコラーゲン分子が結合したコラーゲン細線維の集合により形成され、真皮のECMの大半を占める。このコラーゲン線維は皮膚の強度に深く関与する[2]。乳頭層のコラーゲン線維は線維径が小さく、方向の異なるコラーゲン線維が重なるように走行し、表皮に対して平行な層構造を形成する。一方、網状層のコラーゲン線維は乳頭層のコラーゲン線維より径が大きく、不規則な方向に走行する[69]。コラーゲン線維を形成するコラーゲン細線維はⅠ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲン、Ⅴ型コラーゲンに代表される線維性のコラーゲン分子から構成され[26]、複数のコラーゲン分子が約 67 nm（D 周期）ずれて結合することで生じる周期的な縞模様（a から e バンド）が認められる[85]。コラーゲン分子間にはリジルオキシダーゼによって触媒されるリジンやヒドロキシリジン残基の共有結合によって架橋される[30]。1つのコラーゲン分子は3本の $\alpha$ 鎖が互いに絡み合った螺旋構

造をとり[95]、1本の $\alpha$ 鎖は約1,000個のアミノ酸で構成される。コラーゲン分子の $\alpha$ 鎖はグリシン-X-Y（X、Yは任意のアミノ酸）からなる特徴的な繰り返し構造をとる[95]。X、Yの組み合わせは複数存在するが、Xがプロリン、Yがヒドロキシプロリンの組み合わせの割合が最も多い[95]。

コラーゲン線維と同様に ECM の主要な線維成分である弾性線維は皮膚の弾性に関与しており、フィブリリンを主体とするマイクロフィブリルの間隙にエラスチンが沈着することで形成される[69]。真皮乳頭層の弾性線維はオキシタラン線維と呼ばれ、線維径が小さく表皮に対して垂直に走行しており、フィブリリンの割合が多い。一方、真皮網状層の弾性線維は線維径が大きく、コラーゲン線維間を走行しており、エラスチンの割合が多い[69]。ECM の非線維成分である PG はコアタンパク質のセリン残基に GAG 鎖のキシロースが共有結合した糖タンパク質の総称で、数多くの種類が存在する[36]。皮膚ではバーシカン、アグリカン、パールカン、ビグリカン、ケラトカン、デコリン、フィブロモジュリン、ルミカンなどが存在する[52]。このうちデコリン、フィブロモジュリン、ルミカンはコラーゲン細線維と結合することが知られる[36, 52]。特に、真皮ではデコリンが最も多く、コアタンパク質部分がコラーゲン細線維に結合する[52, 72]。デコリンのコアタンパク質には GAG 鎖が結合し、GAG 鎖で隣り合うコラーゲン細線維同士を繋ぐ[72]。GAG にはヒアルロン酸 (HA)、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸 (DS)、ヘパリン (HP)、ヘパラン硫酸 (HS)、ケラタン硫酸 (KS) があり、中でも真皮では CS や DS がデコリンのコアタンパク質と結合する[63, 72]。HA 以外の GAG はコアタンパク質と結合した PG として存在し、コアタンパク質との結合部位では共通の四糖結合領域を持つ[36, 53]。四糖結合領域以外はウロン酸とアミノ糖の二糖の繰り返しで 50 から 200 回程度連なった構造をとり、GAG は二糖の組み合わせにより分類される[36]。HA はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミン、CS はグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミン、DS はイズロン酸と N-アセチルガラクトサミン、HP はイズロン酸とグルコサミン、HS はグルクロン酸とグルコサミン、KS はガラクトースと N-アセチルグルコサミンで構成される[53]。GAG の合成について、CS と DS は合成経路の一部が共通する[56, 65]。CS では、初めにグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの二糖の繰り返しで構成されるコンドロイチンが合成され、コンドロイチンに chondroitin 4-O-

sulfotransferase や chondroitin 6-*O*-sulfotransferase などが硫酸基を付加することで CS が生成される。一方、コンドロイチンにデルマタン硫酸エピメラーゼ (DSE) が作用すると、グルクロン酸がイズロン酸に変換されデルマタンが生成される。さらにデルマタンに dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 (D4ST1) が硫酸基を付加すると、DS が生成される[25, 44, 62]。真皮に存在するデコリンは、若齢期では CS の割合が高い GAG 鎖を結合するのに対して、成体では GAG 鎖の大部分が DS で構成される[63]。

コラーゲン細線維と GAG 鎖の空間的な位置関係については、これまでにいくつかのモデルが提唱されてきた。Scott によって提唱されたモデルでは、隣り合うコラーゲン細線維のそれぞれから直線的に伸長した GAG 鎖が平行に重なり合い、GAG 鎖同士が引きつけ合うことでコラーゲン細線維を束ねるとされる[84]。一方、Nomura によって提唱されたモデルでは、GAG 鎖の形状が直線的ではなく曲線状で、コラーゲン細線維の周囲を部分的に GAG 鎖が覆い、その電気的な力でコラーゲン細線維を束ねるとされる[72]。これらのモデルは透過型電子顕微鏡を用いた二次元的な観察や生化学的な実験を基に考案されたものであったが、近年の電子顕微鏡技術の発達により超微細構造の三次元的な形態解析が可能になると、Watanabe らによって集束イオン走査電子顕微鏡 (FIB-SEM) を用いた GAG 鎖の三次元構造解析が行われ、リングメッシュモデルが提唱された[105]。このモデルではコラーゲン細線維の d バンドに沿って存在する GAG 鎖がコラーゲン細線維の全周を覆い、GAG 鎖のリングが一平面上に揃って配置することでコラーゲン細線維を束ねる。

コラーゲンや PG、GAG といった ECM は線維芽細胞で合成、分泌が行われ、transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1 によって刺激される Smad 経路が、その主な誘導経路となる[60, 64]。TGF- $\beta$ の受容体は I 型受容体と II 型受容体が複合体を形成して細胞膜上に存在しており、TGF- $\beta$ 1 が受容体と結合すると I 型受容体がリン酸化され活性化し、転写因子 Smad2/3 をリン酸化する[60, 64]。二つのリン酸化された Smad2/3 は一つの Smad4 と三量体を形成して核内へ移行し、標的遺伝子のエンハンサーエレメントに結合することで ECM の合成が促進される[60, 64]。

皮膚の力学的な耐性を担うコラーゲン線維や弾性線維に異常をきたすと、皮膚は脆弱になり、容易な裂傷や創傷治癒の遅延が生じる。フィブリリンの遺

伝子 (*FBNI*) や TGF- $\beta$  の II 型受容体の遺伝子 (*TGFBR2*) の変異が原因となるマルファン症候群は皮膚の脆弱性や骨の形成異常、血管の脆弱性などを示す [54, 71]。一方で、コラーゲンやその他の ECM に関連する遺伝子の変異が原因となる疾患にエーラス・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome : EDS) がある [18]。EDS は全身の結合組織に異常をきたす遺伝性疾患で、ヒトに限らずウシやウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギでも報告されている [3, 15, 31, 78, 88, 96, 101]。EDS は原因や症状などから様々なサブタイプに分類され、The 2017 International Classification for the Ehlers–Danlos Syndromes による分類に従えば、13 種のサブタイプに分けられる [59]。代表的なものには Classical EDS、Cardiac-valvular EDS、Vascular EDS、Hypermobile EDS、Arthrochalasia EDS、Dermatosparaxis EDS、Kyphoscoliotic EDS があり、それらの多くがコラーゲンの遺伝子に変異を生じている [13, 18, 59]。これらの患者では皮膚の過伸展や脆弱性、関節の過可動を示すが、Cardiac-valvular EDS、Vascular EDS、Arthrochalasia EDS では動脈破裂など、より重篤な症状を示す場合もある [18, 59]。代表的なサブタイプは古くから認知されてきたが、近年の遺伝子診断技術の向上は新しいタイプの EDS の発見に繋がっている [23, 28, 49, 63, 86]。例えば、Spondylodysplastic EDS (spEDS) や Musculocontractural EDS (mcEDS) は、それぞれコラーゲンの合成系に関与する細胞内亜鉛トランスポーターの遺伝子 (*SLC39A13/ZIP13*) と DS 合成酵素の遺伝子 (*CHST14/D4ST1*) の変異によることが証明された [23, 28, 49, 63, 86]。

本研究では EDS 検体と正常検体の皮膚組織を形態学的に比較解析することで正常な真皮の構造形成に対する各 ECM の果たす役割を調べた。第 I 章ではコラーゲンの合成経路に異常を示す spEDS-*ZIP13* のモデルマウスである *Zip13*-knockout マウスの皮膚を解析した [33]。第 II 章では PG の GAG 合成経路に異常を示す mcEDS-*CHST14* のモデルマウスである *Chst14*-knockout マウスの皮膚を解析した。第 III 章では対象をヒトに移し、*CHST14* 遺伝子の変異による mcEDS-*CHST14* 患者の皮膚を解析した。さらに第 IV 章では第 II 章および第 III 章で明らかにした GAG 鎖の形状の変化を三次元的に解析し、健常者真皮と比較することで真皮の GAG 鎖の正常な三次元構造について検討した。

## 第 I 章 *Slc39a13/Zip13*-knockout マウス真皮の細胞外マトリックスの構造

### 1. 序文

皮膚は表皮と真皮から成り、真皮にはコラーゲン線維が豊富に含まれる。真皮のコラーゲン線維は、コラーゲン細線維がプロテオグリカン（PG）であるデコリンのグリコサミノグリカン（GAG）鎖により束ねられ形成される[72, 84, 105]。コラーゲン線維は高密度に様々な方向へ走行しており、皮膚の機械的な強度に関わるとされる[2]。一方、コラーゲン細線維はコラーゲン分子が共有結合によって架橋し線維状になったもので、その直径や形状はコラーゲン分子種の割合やデコリンの含有比によって決定される[80, 92]。例えば、コラーゲン細線維は他のコラーゲン細線維と融合することで直径を増大させるが[104]、デコリンを欠損させたマウスの皮膚では横断面に複数の円が融合しているような歪な形をした直径の大きなコラーゲン細線維が観察される[16]。

エーラス・ダンロス症候群（Ehlers-Danlos syndrome : EDS）は、皮膚の過伸展や脆弱性、関節の過可動、血管の脆弱性など結合組織に異常を示す遺伝子疾患群である[18]。EDS は原因や症状に基づき分類され、2017 年に改定された分類に従えば、13 種のサブタイプに分類される[59]。これまでにコラーゲン分子の遺伝子変異、フィブロンекチンの欠損、I 型プロコラーゲン N-プロテイナーゼ活性の欠如、デルマトン硫酸転移酵素活性の欠如などが EDS の原因となることが示されており、ECM が病態と密接にかかわると考えられている[13, 18, 96]。皮膚の組織構造に関して、EDS 患者の皮膚は正常な皮膚と比較してコラーゲン線維径が大きく、コラーゲン線維束の密度が低下し、走行が乱れ、真皮網状層の厚さは健常者の約 1/3 であることが知られている[32]。加えて真皮の GAG 含有比に変化を認めた症例も報告されている[96]。

Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 は TGF- $\beta$  スーパーファミリーの一つで、間葉系細胞に働きコラーゲンや PG などの細胞外マトリックス (ECM) の合成を促すサイトカインである[68]。TGF- $\beta$ 1 は ECM の合成を促進する他に、種々のプロテアーゼの産生を阻害することによって、ECM の分解も抑制する[55]。TGF- $\beta$ 1 は真皮に存在するデコリンと結合するが、デコリンと結合している TGF- $\beta$ 1 は不活性型（潜在型）であり、デコリンから分離すると ECM 中に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって活性化する[8]。



TGF- $\beta$ の受容体は細胞膜上で I型受容体と II型受容体からなるヘテロ複合体を形成しており、活性型の TGF- $\beta$ 1 が受容体と結合すると、I型受容体が活性化し、Smad2/3 をリン酸化する[60, 64]。さらにリン酸化された Smad2/3 は Smad4 と三量体を形成し、核内へ移行後、標的遺伝子のエンハンサーエレメントに働きかけることで ECM の合成を促進する[60, 64]。このような TGF- $\beta$ のシグナルの異常が原因とされる疾患は複数知られており、代表的なものとしてマルファン症候群が挙げられる[54, 71]。マルファン症候群は TGF- $\beta$ の II型受容体や TGF- $\beta$ シグナリングにより誘導されるフィブリリン-1 の遺伝子変異が原因とされ、全身の結合組織で脆弱性が認められる。またマルファン症候群の患者はネガティブフィードバックによる TGF- $\beta$ の血中濃度の増加が顕著である[54, 71]。Fukada らは TGF- $\beta$ のシグナル経路に SLC39A13 / ZIP13（以下、ZIP13）が必須の役割を果たすことを明らかにした[28]。ZIP13 は、骨芽細胞、軟骨細胞、象牙芽細胞および線維芽細胞のゴルジ装置に局在する Slc39 / ZIP 亜鉛輸送体ファミリーのメンバー分子である[27]。ZIP13 はゴルジ装置から細胞質への亜鉛の輸送を担うことで、TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路における Smad タンパクの核内移行を制御する[5-6, 28, 68]。さらに過去の培養系を用いた検討では、Zip13 を欠損させた線維芽細胞で Smad タンパクの核内移行が減少することによる I型コラーゲンの  $\alpha$ 2 鎖の mRNA 発現量の低下が報告されている[28]。加えて、Zip13 をノックアウトしたマウスでは発育遅延や骨格異常、皮膚の脆弱性が認められ、spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome (spEDS) のサブタイプである spEDS-ZIP13 (OMIM 612350) に似た症状を示す[28]。事実、spEDS の患者の中には ZIP13 遺伝子の機能欠損変異が認められている[23, 28]。これまで脆弱な皮膚の真皮 ECM 構造については、コラーゲン分子の遺伝子変異を持つマウスやデコリンを欠損させたマウスで観察されてきたが[12, 14, 76]、ECM の合成を制御するシグナルの異常を持つ真皮の ECM 構造は明らかにされていない。そこで Zip13-knockout (Zip13<sup>-/-</sup>) マウスの真皮 ECM 構造を解析することで、ZIP13 欠損による TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の抑制が真皮の ECM 構造に与える影響を検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試動物

C57BL/6J.129-*Slc39a13*<sup>tm1Thir</sup> 系統のヘテロ接合体マウスを理研バイオリソース研究センターより入手し、それらを交配させ得られたオスの *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスおよび *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスを各群 3 匹ずつ実験に供した。実験期間中は通常飼料を自由給餌し、12 週齢時にペントバルビタールの麻酔下で安楽殺し、速やかに背部から皮膚を採材した。本実験は酪農学園大学遺伝子組換え実験安全委員会（承認番号:127）および酪農学園大学動物実験委員会（承認番号:VH15A6）により承認され、実験動物の飼育管理および実験操作は、酪農学園大学動物実験指針を遵守し実施した。

### 2) 光学顕微鏡観察

試料を 1 cm 角に切り取り、ブアン液に浸漬し室温で一晩固定した。エタノール系列による脱水後、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した。ミクロトームで厚さ 8  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施した。観察には光学顕微鏡（VANOX-S : Olympus、東京、日本）を用いた。各試料から無作為に抽出した 8 つの領域から 5 か所ずつ（サンプルあたり計 40 か所）選択し、表皮と真皮（表皮下から毛根底）の厚さを測定した。加えて、同領域内で 10,000  $\mu\text{m}^2$  あたりの細胞数を計測した。計測には解析ソフト Image J（version1.48v、National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA）の Measure 機能を用いた。

### 3) 免疫組織化学

試料を 4% パラホルムアルデヒドに浸漬し、室温で一晩固定した後、エタノール系列による脱水後、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した。ミクロトームで厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、キシロール系列による脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素水／メタノールで 10 分反応させ、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。リン酸ナトリウム緩衝液（PBS）で洗浄後、ブロッキング液（Vectastain ABC kit rabbit IgG : Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA）で 2 時間室温にて反応させた。その後 PBS で洗浄し、一次抗体として 100 倍希釈の mouse decorin biotinylated antibody（BAF1060 : R&D Systems、Minneapolis、MN、USA）

を用いて一晩 4℃で静置した。その後、PBS で洗浄し ABC 試薬（Vectastain ABC kit rabbit IgG : Vector Laboratories）に 30 分反応させた。発色には DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel) , 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) を用いて 5 分間反応させ、VANOX-S で観察した。

#### 4) 透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope : TEM) 観察

試料を 0.5 mm 角に細切し、3.0%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (PB、pH7.4) に浸漬し室温で 2 時間固定した。固定した試料を PB で洗浄したのち、1.0%四酸化オスミウム/0.1 M PB に浸漬し室温で 1 時間後固定した。その後、試料を蒸留水で洗浄し、エタノール系列で脱水、QY-1 (日新 EM、東京、日本) で置換した後、Quetol 812 (日新 EM) に包埋した。包埋試料をウルトラミクロトーム (Reichert Supernova : Leica, Wetzlar, Germany) を用いてダイヤモンドナイフで厚さ約 80 nm の切片を作製した。切片を銅グリッドに載せ、0.2%タンニン酸を含む 10%エタノール 15 分、1.0%酢酸ウラン 5 分および 1.0%クエン酸鉛 10 秒で電子染色を施した。染色した試料は TEM (JEM-1220 : JEOL、東京、日本) を用いて加速電圧 80kV で観察した。各試料の真皮網状層から無作為に抽出した 500 本のコラーゲン細線維の直径を Image J の Measure 機能を用いた測定した。

#### 5) アミノ酸分析

試料を直径 5 mm の生検トレパンを用いて切り取った。それぞれの試料を 0.01 g に調製した後、6 N の塩酸 2 mL に溶解し、110℃で 24 時間加水分解した。その後、減圧濃縮で塩酸を除去し、蒸留水 20 mL で回収したものをアミノ酸分析機 (L-8900: 日立製作所、東京、日本) に適用した。その後、ヒドロキシプロリン量からコラーゲン量を算出した。

#### 6) GAG 分析

採取し凍結保存していた試料を氷上で細切し、ジエチルエーテルを用いて 4℃で 30 分間攪拌を 3 回、アセトンを用いて 4℃で 30 分間攪拌を 3 回行い、脱水および脱脂を行った。試料の乾燥重量を測定し、試料の 20 倍量の 0.5 N の水酸化ナトリウム溶液中に 4℃で試料を一晩攪拌した後、1 N の塩酸を用いて中

和した。試料溶液を 100℃で 10 分間加熱しタンパク質を変性させた。試料溶液の pH を 1 M のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) で pH 8.0 に調製し、1 mg / mL のプロテイナーゼ (アクチナーゼ E: 生化学工業、東京、日本) を用いて 50℃、24 時間でタンパク質を分解した。トリクロロ酢酸を最終濃度 10% となるように加え、1 時間室温で静置した後、沈殿したタンパク質を除去するために 1,600×g で 15 分間遠心分離し、得た上清を 4℃の蒸留水中で 3 日間透析した。透析された試料を凍結乾燥し、セルロースアセテート膜を用いて、過去の報告に従い二次元電気泳動を行った[96]。泳動分離した GAG を 0.1%アルシアンブルー8GX (Merck、Darmstadt、Germany) / 0.1%酢酸溶液で染色した。染色された GAG の部分を切り取り、1,4-ジオキササンに溶解し分光光度計を用いて GAG 含有量を測定した。ヒアルロン酸 (HA)、デルマタン硫酸 (DS)、ヘパリン (HP) およびコンドロイチン-6-硫酸 (C6S) (ナカライテクス、京都、日本) を GAG 標準物質として使用した。

#### 7) TGF-β1 の血漿濃度

採取した血液サンプルをヘパリンと混和させ、ただちに氷中に移し 10～60 分間静置した後、1,000×g で 4℃、20 分間遠心分離し、さらにその上清を 10,000×g で 4℃、10 分間遠心分離して得た上清を測定に使用するまで -80℃で保存した。測定には TGF-β1 測定キット (Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit : R&D Systems) を用いて、マニュアルに従い測定した。

#### 8) 統計分析

表皮および真皮の厚さ、細胞の密度、コラーゲン量、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジン含有率にはスチューデントの t 検定を用いた。コラーゲン細線維の直径および TGF-β1 の血漿濃度にはマンホイットニーの U 検定を用いた。いずれも統計ソフト (R、version 3.2.0) で解析し  $P < 0.05$  を有意と判定した。

### 3. 結果

#### 1) *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚組織の光学顕微鏡観察

皮膚全体の組織構造を比較するため、HE 染色を施し観察した (図 1a、b)。*Zip13*<sup>-/-</sup>群、*Zip13*<sup>+/+</sup>群ともに表皮に基底層、有棘層、顆粒層、角化層が認められた。表皮の厚さは *Zip13*<sup>-/-</sup>群で  $9.2 \pm 0.56 \mu\text{m}$ 、*Zip13*<sup>+/+</sup>群で  $10.4 \pm 0.96 \mu\text{m}$  であり、有意な差 ( $P=0.37$ ) は認められなかった (図 1c)。加えて、両群ともに真皮内に被毛および毛包、毛球が認められ、毛包に近接して脂腺も認められた。一方、真皮の厚さは *Zip13*<sup>-/-</sup>群で  $162.2 \pm 22.5 \mu\text{m}$ 、*Zip13*<sup>+/+</sup>群で  $231.4 \pm 22.1 \mu\text{m}$  であり、両群間に有意な差が認められた (図 1d)。また、真皮に存在する細胞の密度は *Zip13*<sup>-/-</sup>群 ( $31.0 \pm 3.6$  個/ $0.01 \text{ mm}^2$ ) で *Zip13*<sup>+/+</sup>群 ( $24.6 \pm 1.5$  個/ $0.01 \text{ mm}^2$ ) と比べ有意に増加していた (表 1)。よって、ZIP13 の欠損は表皮や、毛包などの付属器官の形成には影響せず、真皮の形成にのみ影響すると考えられる。

#### 2) 免疫組織化学による *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス皮膚組織のデコリンの検出

*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚組織のデコリンの局在を調べるため、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学を実施した。*Zip13*<sup>-/-</sup>群および *Zip13*<sup>+/+</sup>群共に真皮全体にデコリンの発現が認められた。特に表皮直下の真皮乳頭層で強い陽性像が確認されたが、*Zip13*<sup>-/-</sup>群と *Zip13*<sup>+/+</sup>群の間でデコリンの局在に明らかな差は認められなかった。表皮や毛包、脂腺、脂肪細胞は陰性であった (図 2)。よって、ZIP13 の欠損は皮膚でのデコリンの発現分布には影響しないと考えられる。

#### 3) *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮網状層のコラーゲン線維およびコラーゲン細線維の TEM 観察

*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮の菲薄化が認められたことから、コラーゲン線維およびコラーゲン細線維の形態を解析するため、TEM で観察した。*Zip13*<sup>-/-</sup>群で *Zip13*<sup>+/+</sup>群と比べてコラーゲン線維の間隙が広く、密度が低下していた (図 3)。*Zip13*<sup>-/-</sup>群のコラーゲン細線維の直径の中央値は  $81.4 \text{ nm}$ 、範囲は  $20 \sim 200 \text{ nm}$  であった。一方、*Zip13*<sup>+/+</sup>群のコラーゲン細線維の直径の中央値は  $89.4 \text{ nm}$ 、範囲は  $20 \sim 320 \text{ nm}$  であり、*Zip13*<sup>+/+</sup>群でのみ直径  $200 \text{ nm}$  以上コラーゲン細線維が認められた (図 3、表 1)。以上より、ZIP13 はコラーゲンの合成だけでなく、コラーゲン細線維の融合や直径の増大に関与すると考えられる。

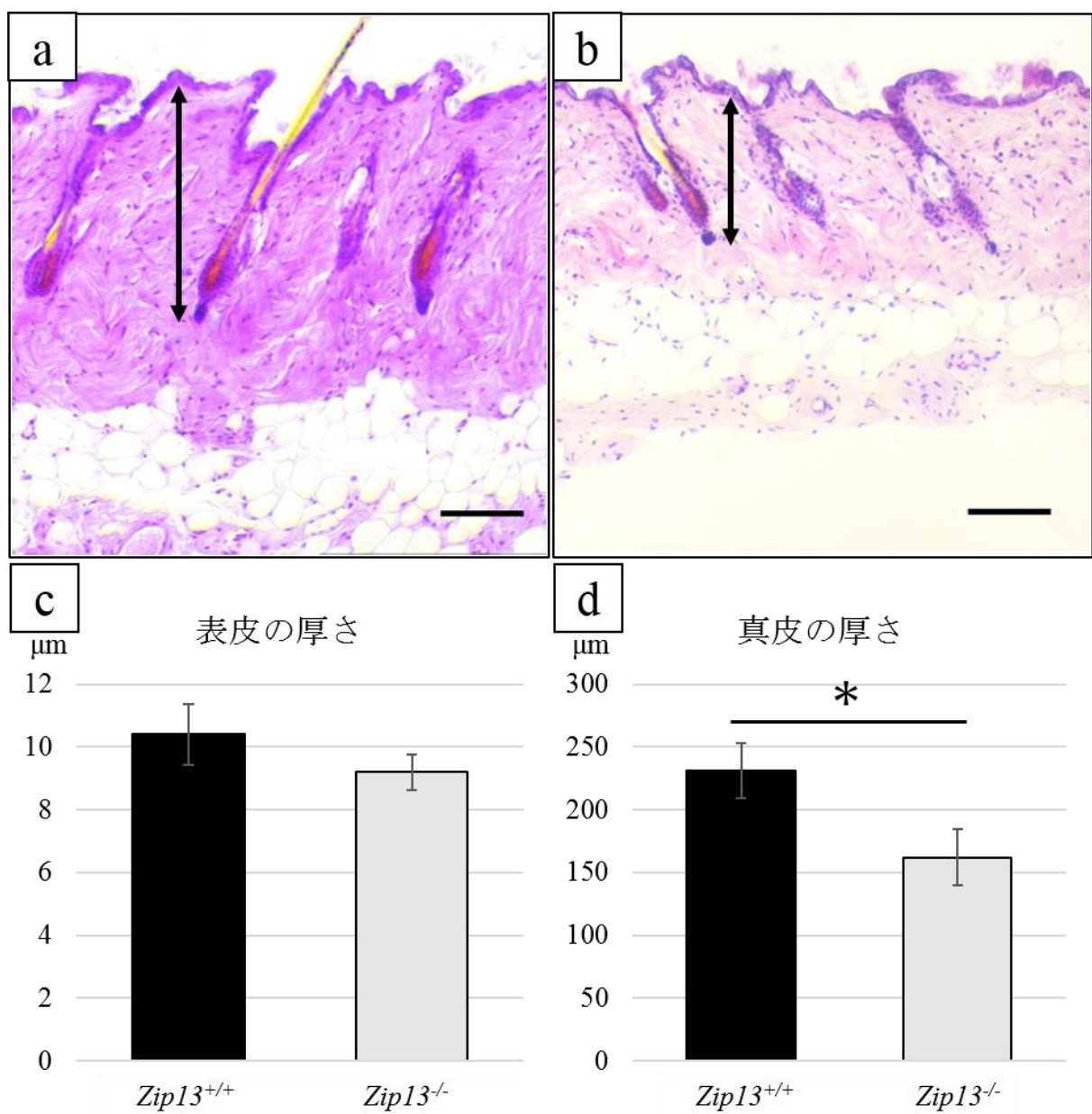


図1 *Zip13*<sup>+/+</sup>および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚組織の HE 染色像

a、b は *Zip13*<sup>+/+</sup> (a) および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス (b) の 3 検体中の代表的な標本について示す。背部皮膚を採取し、HE 染色後、観察した。両矢印は真皮の厚さを示す。(Bar=100 μm) c、表皮の厚さの比較。d、真皮の厚さの比較。\*有意差あり ( $P < 0.05$  vs. *Zip13*<sup>+/+</sup>マウス)。c、d は 3 検体の平均値と標準誤差を示す。

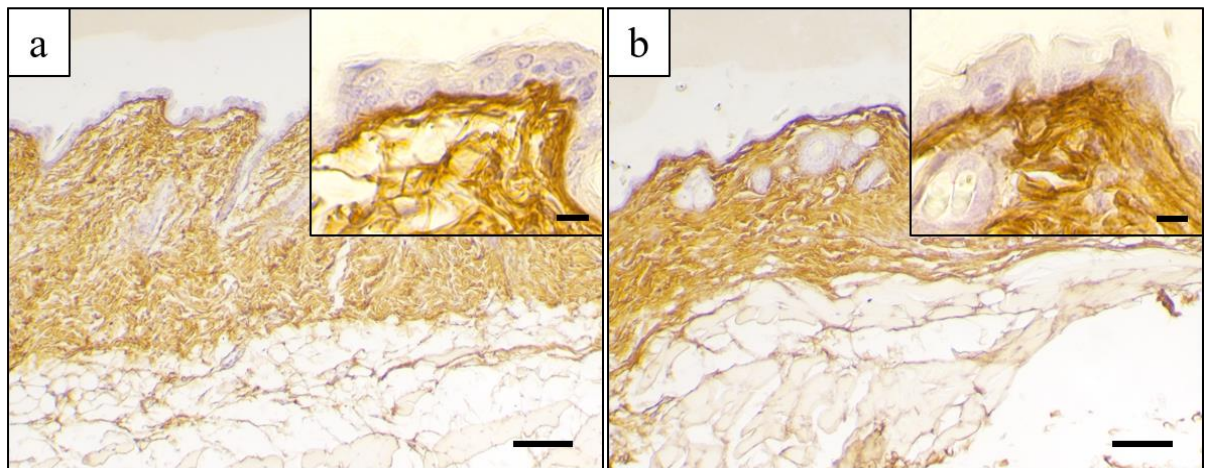


図 2 *Zip13*<sup>+/+</sup>および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚組織のデコリンの発現

a、b は 3 検体中の典型的な 1 例の結果を示す。*Zip13*<sup>+/+</sup> (a) および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス (b) の背部皮膚を採材し、免疫組織化学を用いてデコリンを検出した。それぞれの真皮乳頭層の強拡大像を右上に示す。(Bar=100  $\mu$ m、挿入図: Bar=10  $\mu$ m)

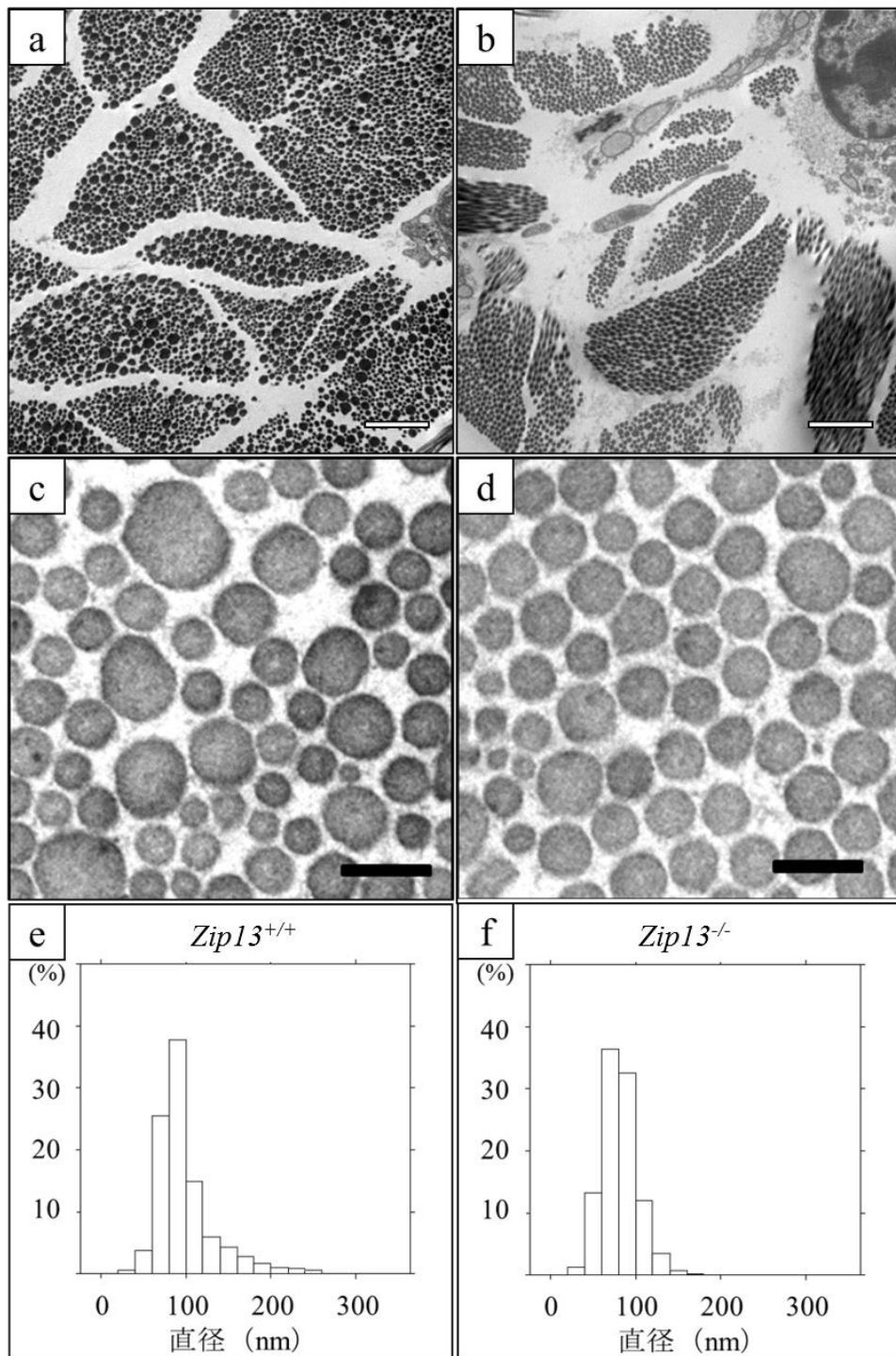


図3 真皮網状層のコラーゲン線維の比較

*Zip13*<sup>+/+</sup> (a, c, e) と *Zip13*<sup>-/-</sup> (b, d, f) マウスの真皮を解析した。a から d、透過型電子顕微鏡によるコラーゲン線維 (a, b) およびコラーゲン細線維 (c, d)。(a, b : Bar=2 μm、c, d : Bar=200 nm) e, f、コラーゲン細線維直径の度数分布表。横軸にコラーゲン細線維の直径を、縦軸にその割合を示す。



#### 4) *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス真皮のコラーゲン含有量およびアミノ酸含有比

*Zip13*<sup>-/-</sup>マウス真皮の形態学的な解析からコラーゲンの減少が示唆されたため、コラーゲン含有量を測定した。図 4 上段に示すように、コラーゲン含有量は *Zip13*<sup>-/-</sup>群 ( $22.2 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) で *Zip13*<sup>+/+</sup>群 ( $72.3 \pm 8.8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) と比較し、有意に低下していた。続いて、コラーゲン細線維直径の低下を認めたことから、組成に変化がないか調べるために構成する各アミノ酸含有比を測定した。ヒドロキシプロリン (残基/1,000 総残基) の比率は *Zip13*<sup>-/-</sup>群で  $84.0 \pm 2.5$ 、*Zip13*<sup>+/+</sup>群で  $95.7 \pm 0.9$  であった。加えて、ヒドロキシリジン (残基/1,000 総残基) の比率は *Zip13*<sup>-/-</sup>群で  $4.8 \pm 0.9$  であったのに対して、*Zip13*<sup>+/+</sup>群で  $6.9 \pm 0.2$  であり、*Zip13*<sup>-/-</sup>群でヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンの含有比率の有意な低下が認められた (図 4 下段)。以上より、ZIP13 はコラーゲン細線維中のヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンの含有比を決めることが判明した。

#### 5) *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス真皮の GAG 含有比

次に、コラーゲンとデコリン以外の ECM として GAG の含有比を二次元電気泳動で解析した。*Zip13*<sup>-/-</sup>群および *Zip13*<sup>+/+</sup>群共に HA と DS のみ検出された (図 5)。得られたスポットから GAG を抽出し HA および DS の含有量を測定したところ、*Zip13*<sup>-/-</sup>群で HA は 63.2%、DS は 36.8%であるのに対して、*Zip13*<sup>+/+</sup>群では HA が 55.5%、DS が 44.5%であった (表 1)。このことから ZIP13 は真皮の GAG 含有比を調節すると考えられる。

#### 6) *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの血漿中 TGF- $\beta$ 1 濃度

TGF- $\beta$ 1 は ECM 合成を促進する因子である。そこで血漿中 TGF- $\beta$ 1 濃度を測定した。*Zip13*<sup>-/-</sup>では  $2.74 \pm 1.35 \text{ ng/ml}$  であったのに対して、*Zip13*<sup>+/+</sup>群では  $1.45 \pm 0.42 \text{ ng/ml}$  であり、両群間に有意な差を認めた ( $P < 0.05$ 、図 6)。したがって、ZIP13 の欠損は TGF- $\beta$ 1 の産生または分解の過程の異常を導くと考えられる。

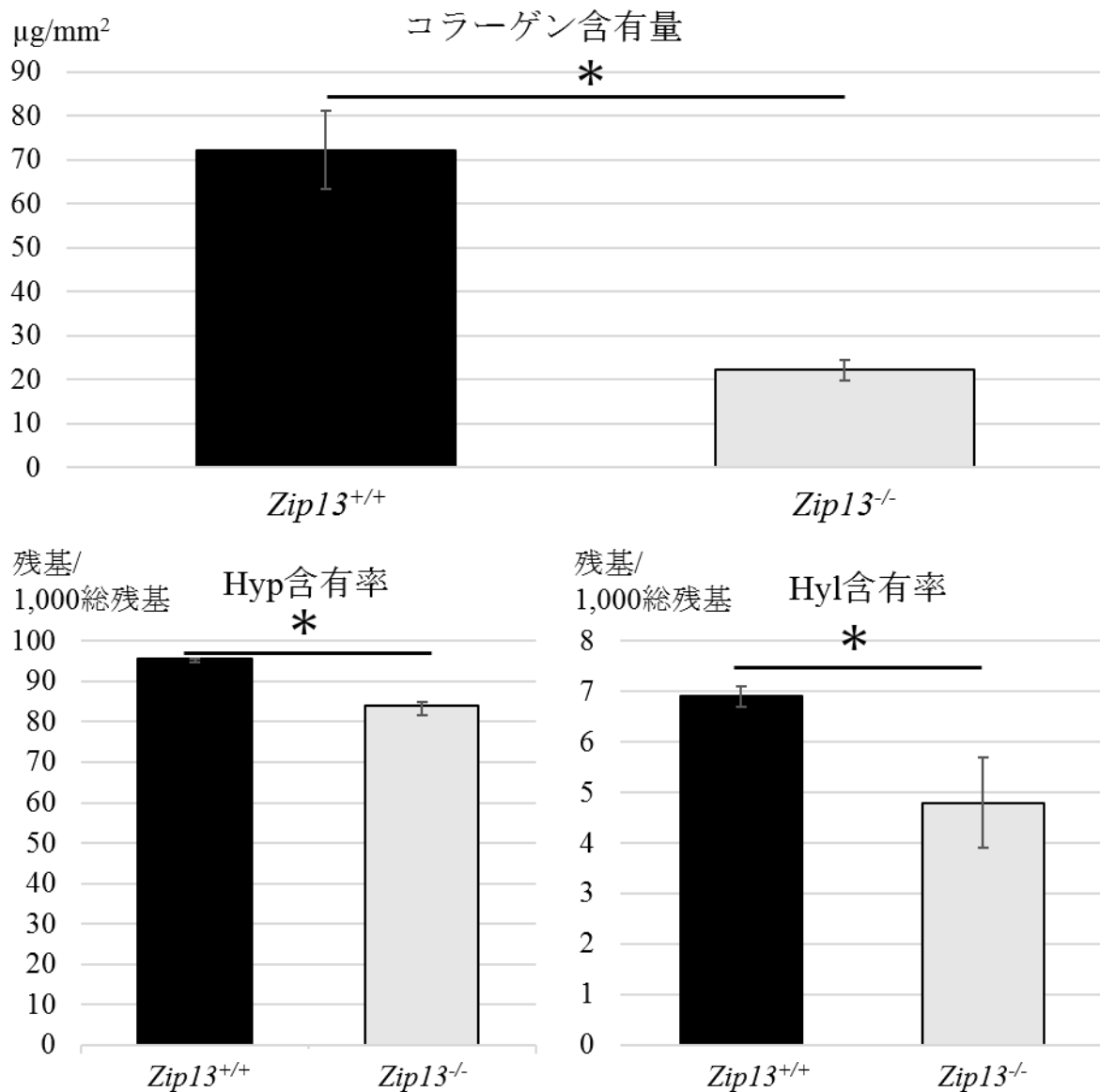


図4 *Zip13<sup>+/+</sup>*および*Zip13<sup>-/-</sup>*マウスの皮膚組織のコラーゲン含有量およびアミノ酸含有率

*Zip13<sup>+/+</sup>*および*Zip13<sup>-/-</sup>*マウスの背部皮膚を採材し、アミノ酸分析を行った。上段、コラーゲン含有量の比較。下段左、ヒドロキシプロリン (Hyp) 含有率の比較。下段右、ヒドロキシリジン (Hyl) 含有率。\*有意差あり ( $P < 0.05$  vs. *Zip13<sup>+/+</sup>* マウス)。図は3検体の平均値と標準誤差を示す。

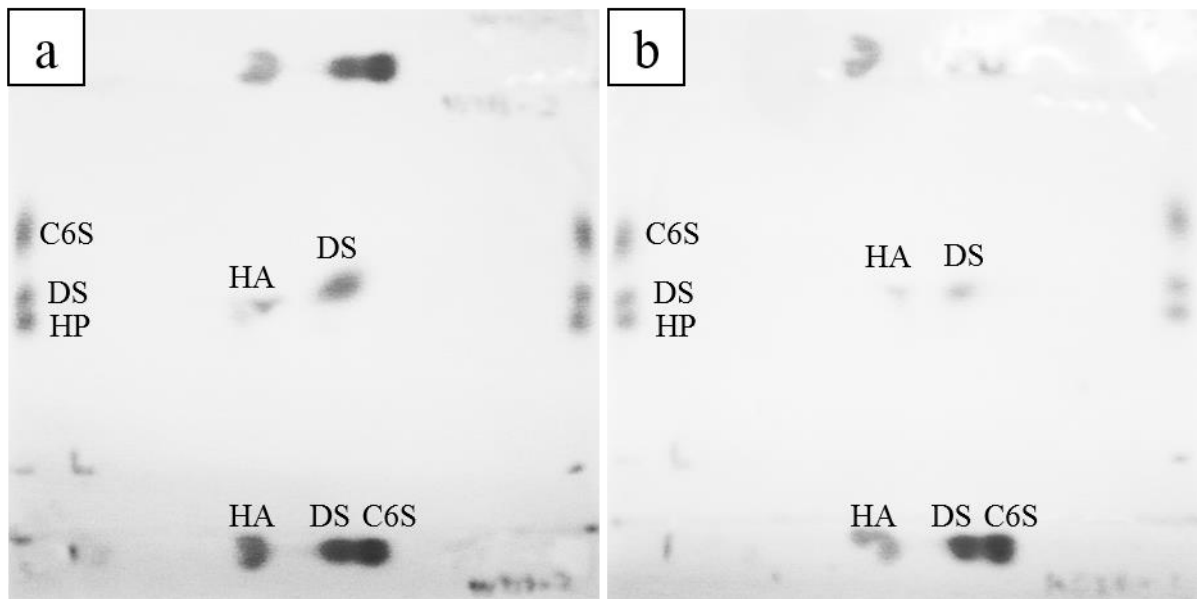


図5 *Zip13*<sup>+/+</sup>および*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚組織のグリコサミノグリカン(GAG)の検出

*Zip13*<sup>+/+</sup> (a) および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウス (b) の背部皮膚を採材し、二次元電気泳動法を用いて GAG を検出した。図は 3 検体中の典型的な 1 例の結果を示す。C6S、コンドロイチン-6-硫酸。DS、デルマトン硫酸。HA、ヒアルロン酸。HP、ヘパリン。

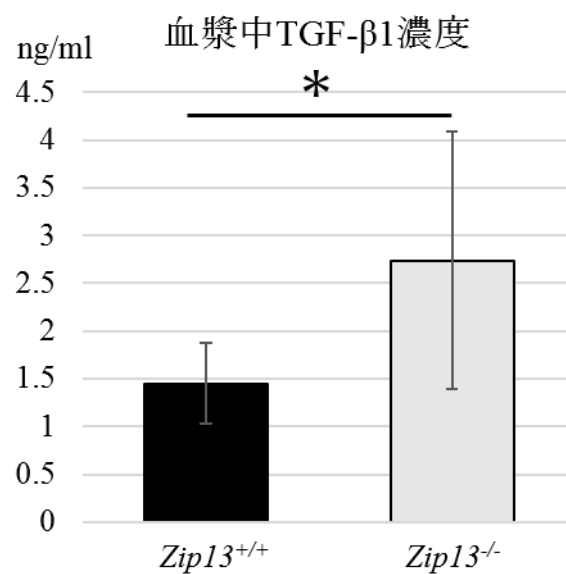


図 6 *Zip13*<sup>+/+</sup>および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの血漿中の TGF-β1 濃度

*Zip13*<sup>+/+</sup>および *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの血液を採取し、血漿中の TGF-β1 濃度を測定した。\*有意差あり ( $P < 0.05$  vs. *Zip13*<sup>+/+</sup>マウス)。図は 3 検体の平均値と標準誤差を示す。

表 1 *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスおよび *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの形態学的および生化学的解析

解析項目	<i>Zip13</i> <sup>+/+</sup>	<i>Zip13</i> <sup>-/-</sup>
真皮内の細胞密度 (個/0.01 mm <sup>2</sup> )	24.6±1.5	31.0±3.6*
コラーゲン細線維の直径範囲 (nm)	20～320	20～200
コラーゲン細線維直径の中央値 (nm)	89.4	81.4
グリコサミノグリカン成分割合		
ヒアルロン酸 (%)	55.5	63.2
デルマタン硫酸 (%)	44.5	36.8

値は 3 匹の平均±標準誤差を示す。\**P*<0.05 vs. *Zip13*<sup>+/+</sup>群。

#### 4. 考察

これまでの研究により ZIP13 欠損の線維芽細胞の亜鉛濃度はゴルジ装置で増加し、核で減少することが明らかになった[28]。加えて、この細胞では Smad タンパクの核内移行が抑制され、I 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖の mRNA 発現量が低下することも明らかにされた[28]。一方、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスは皮膚の脆弱性、発育遅延、骨の菲薄化といった支持組織の異常が報告されているが[28]、皮膚の詳細な ECM の構造については明らかでない。本研究は形態学および超微形態学的手法を用いて *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚の ECM 構造を明らかにした。*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮は *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスの真皮に比べ薄く、コラーゲン線維の密度の低下が認められた。加えて、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスでは直径 200 nm 以上のコラーゲン細線維が認められず、コラーゲンのアミノ酸組成の変化（ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン含有比率の低下）が認められた。このことから、ZIP13 は TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路を介して、コラーゲンの合成を促すだけでなく、何らかの経路でアミノ酸組成を調節し、正常なコラーゲン細線維の形成に関わることも真皮 ECM 構造の維持に寄与すると考えられる。

皮膚の強度には表皮や真皮の厚さが大きな要因となる[2]。今回の結果からは *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの表皮の厚さは *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスと差がなかったが、真皮の厚さは有意に減少した。加えて、単位面積当たりのコラーゲン含有量が減少していたことも考え併せると、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚に特徴的な脆弱性は真皮のコラーゲンの減少による菲薄化が大きな要因であると考えられる。加えて、ECM 構造については、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮コラーゲン線維の密度の低下も明らかとなった。これまでの報告によれば ZIP13 が欠損するとコラーゲンの発現を促進する TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路が阻害されることから、TGF- $\beta$ 1 シグナルの不全がコラーゲンの合成低下の要因になると考えられる[28]。線維芽細胞は細胞突起を伸ばし、細胞間結合により互いに連絡を取っている[42, 51]。この線維芽細胞の細胞突起はコラーゲン線維を囲うように形成されており、細胞の成長に伴うコラーゲン線維の増加により伸長し、細胞間の距離を広げることが知られている[97]。*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスで細胞密度が増加したのは、コラーゲン線維の減少による細胞突起の短縮化の結果、細胞間距離が広がらなかったことによると推測される。

河原や Bradshaw らの報告によれば、正常なマウスの真皮のコラーゲン細線

維は径の異なるものが混在し、大きいものでは直径 200 nm 以上のコラーゲン細線維も存在する[9, 40]。今回の結果では、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚では直径が 200 nm 以上のコラーゲン細線維は認められなかった。このことから ZIP13 の欠損はコラーゲン細線維の融合や直径の増大を阻害することが示唆される。しかし、興味深いことにコラーゲン細線維直径の中央値には差が認められなかった。コラーゲン細線維は複数のコラーゲン分子が架橋して形成されるが、コラーゲン分子の架橋はリジルオキシダーゼによってリジンやヒドロキシリジン残基が共有結合することで生じる[35]。過去の報告から spEDS-ZIP13 患者の尿中に排出されるヒドロキシリジンの割合が健常者より減少することが明らかとなった[28]。また、本研究でも *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮コラーゲン中のヒドロキシリジンおよびヒドロキシプロリンの含有率が低下した。以上の知見を考え併せるとヒドロキシリジン残基などによるコラーゲン分子の架橋の減少が径の大きなコラーゲン細線維の出現を妨げたことが示唆される。加えて、ヒドロキシプロリンはコラーゲン分子の三重螺旋構造の安定化に重要であることが知られているため[30, 95]、特にヒドロキシプロリンの減少はタンパク質の 4 次構造のレベルで安定性を変化させることで、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスに特徴的なコラーゲン細線維の形成に関与している可能性がある。

コラーゲン分子の 4 次構造やコラーゲン分子間の架橋に加えて、コラーゲン細線維は他のコラーゲン細線維と融合し直径を増大させることも知られる[104]。一方、コラーゲン細線維の融合にはデコリンが関与することが報告されている[16]。今回の *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚の GAG 分析から、ZIP13 欠損により DS の割合の減少が示された。一般に哺乳類の成体ではデコリンの GAG 鎖は DS で構成されていることを考えると[63]、DS の減少はデコリンの減少が原因と推察される。もし、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスでデコリンが減少していたならば、これがコラーゲン細線維直径の低下の主要因の一つであると考えられる。一方、デコリンのコアタンパク質は TGF- $\beta$ 1 との結合部位を有しており、結合することで TGF- $\beta$ 1 を不活性状態である潜在型 TGF- $\beta$ 1 として ECM 中に保持することも知られている[8]。したがって、デコリンの減少により ECM 中に保持できなかった TGF- $\beta$ 1 が血中へ移行したことで、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの血漿中 TGF- $\beta$ 1 濃度が上昇した可能性がある。

これまでの研究ではデコリンが欠損したマウスではコラーゲン細線維の融

合の増加がみられ、コラーゲン細線維の直径が増大するという報告がある[16]。意外なことに今回の研究ではコラーゲン細線維の直径の減少が観察され、結果が一致しなかった。その遠因を探ると、過去の研究ではデコリンの欠損のみ認められ、コラーゲン合成系に異常がない事例であるのに対して[16]、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスはデコリンの減少の可能性に加えて、コラーゲン合成の低下も認められている[28]。このことを踏まえて今回の結果を精査した。デコリンの免疫組織化学の結果から、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスと *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスともにコラーゲン線維上のみデコリンが認められたこととデコリンの染色性に明瞭な差が認められなかったことを考え併せると、一束のコラーゲン線維に結合するデコリンの発現量には差がないと考えられる。しかしながら、今回の研究の結果からコラーゲン線維の減少が明らかになった。したがって、真皮全体を考慮すると、デコリンの絶対量はコラーゲンと共に減少したが、コラーゲンとの相対量では変化がなかったと考えられる。すなわち、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスではデコリンだけでなくコラーゲンの減少を伴うことが、コラーゲン細線維の直径について過去の研究と今回の結果が異なる原因であると推察される。さらに、コラーゲン細線維の直径の調節にはデコリンだけではなく、コラーゲン分子種の割合（Ⅲ型コラーゲンやⅤ型コラーゲンの割合）や SPARC タンパクの関与が知られる[9]。このため、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスのコラーゲン細線維の変化の機序についてはそれぞれの要因に着目して、今後検討する必要がある。



## 5. 小括

本章では TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の抑制によりコラーゲンの合成が低下している *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚 ECM の構造を形態学的に解析した。*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスは *Zip13*<sup>+/+</sup>マウスと比べ表皮に変化がなかったが、真皮は薄く、真皮のコラーゲン線維の密度が低下していた。このことから、真皮の菲薄化が皮膚の脆弱化の大きな要因であることが示唆された。*Zip13*<sup>-/-</sup>マウス真皮の細胞密度の上昇はコラーゲン線維の発達が阻害されたため、細胞突起の伸長に依存した細胞間距離の維持が抑制されたことが原因と推察される。また、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスでは、直径 200 nm 以上のコラーゲン細線維が欠如し、コラーゲン分子のアミノ酸組成が変化（ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン含有比率の低下）した。この現象はコラーゲン分子間架橋の低下によるコラーゲン細線維の直径の増大が阻害されたことによると考えられる。以上の知見より、ZIP13 は TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路を介したコラーゲンの合成を促すだけでなく、何らかの経路でアミノ酸組成を調節し、正常なコラーゲン細線維の形成に関わることで真皮 ECM 構造の維持に寄与すると考えられる。

## 第II章 *Chst14*-knockout マウス真皮の細胞外マトリックスの構造

### 1. 序文

皮膚の真皮層は表皮直下の乳頭層と深部の網状層で構成される密線維性結合組織でコラーゲン線維を豊富に含み、皮膚の強度に大きく関与する[2]。コラーゲン線維は複数のコラーゲン細線維が PG によって束ねられ形成されており、真皮のコラーゲン細線維を束ねる PG はデコリンが主体である[72]。デコリンはコアタンパク質に 1 本の GAG 鎖が結合した PG で、その GAG 鎖はコンドロイチン硫酸 (CS) と DS で構成されるが、成体では DS が主体となる[63, 72]。DS は ECM 成分の GAG の一つであり、他の ECM の GAG には CS やヘパラン硫酸、ヒアルロン酸などがある[53]。GAG はウロン酸とアミノ糖の二糖の繰り返しで 50 から 200 程度続く構造をもち、通常、枝分かれのない長鎖である[36]。このウロン酸とアミノ糖の組み合わせや硫酸基の付加によって GAG の種類が分類される[53]。

DS の合成経路は CS と共通することが知られている[65]。初めにグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの二糖の繰り返しで構成されるコンドロイチンが合成され、コンドロイチンに chondroitin 4-*O*-sulfotransferase や chondroitin 6-*O*-sulfotransferase などが働き硫酸基を付加することでコンドロイチン硫酸が生成される。一方、コンドロイチンにデルマタン硫酸エピメラーゼ (DSE) が作用するとグルクロン酸がイズロン酸に変換され、デルマタンが合成される。そこに dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 (D4ST1) が作用することで硫酸基が付加され、デルマタン硫酸が生成される[25, 56, 62]。D4ST1 は carbohydrate sulfotransferase 14 (*CHST14*) 遺伝子にコードされる硫酸基転移酵素である[25, 62-63]。事実、過去の研究では *CHST14* が欠損するとデルマタン硫酸は合成されず、デコリンの DS が CS に置き換わることが報告された[63]。

Musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome due to *CHST14*/D4ST1 deficiency (mcEDS-*CHST14*) は2017年に新たに分類されたEhlers-Danlos syndrome (EDS) の一つで、*CHST14* の欠損によって生じる遺伝性の疾患である。症状は先天性多発関節拘縮や特徴的な頭蓋顔面、皮膚の脆弱性、易出血性などが挙げられる[59]。これまでにmcEDS-*CHST14*については、皮膚や筋などの病態解析が進められ、mcEDS-*CHST14*患者はデルマタン硫酸が合成されずコンドロイチン硫酸に置き換わることが明らかにされた[22, 38, 45, 57,

63, 67]。また、mcEDS-*CHST14*の疾患モデル動物とされる*Chst14*-knockout (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスは出生率の低下や胎盤の異常、神経系の異常、骨格の異常が報告されている[1, 81, 98, 108]。しかし、The 2017 International Classification for the Ehlers–Danlos Syndromes の定めるmcEDS-*CHST14*の大基準として規定される皮膚の脆弱性について[59]、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚で確認した報告はない。そこで本研究では*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚を解析し、D4ST1 (*Chst14*) 欠損による真皮のECM構造への影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試動物

皮膚材料は信州大学の吉沢隆浩博士と東京農工大学の野村義宏博士より提供された。*C57BL/6J.129-Chst14<sup>tm1Lex</sup>* 系統のヘテロ接合体マウスを交配し得た 1 歳齢の *Chst14<sup>+/+</sup>* および *Chst14<sup>-/-</sup>* マウスの背部皮膚を解析に供した。なお本実験は信州大学および東京農工大学で動物実験の承認の下、採材された（承認番号、信州大学：270030、280116、東京農工大学：29-99）。

### 2) 皮膚引張試験

背部皮膚を 1×4 cm の大きさに裁断し、EZ-S・500N（島津製作所、京都、日本）を用いて最大引張強度を測定した。表選管の長さは 20 mm で器具に固定し、試験速度を 10 mm/min とした。採取した皮膚は測定まで氷上、PBS(-)中で保存し、採材日と同日に測定した。測定は各個体 2 つの皮膚片を用意し、それぞれの値の平均をその個体の値とした。本試験は東京農工大学の橋本綾菜氏が実施し、その提供されたデータを解析した。

### 3) 光学顕微鏡観察

皮膚試料を 10%ホルムアルデヒド溶液に浸漬し室温で一晩固定した。エタノール系列による脱水後、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した。ミクロトームで厚さ 4 μm の切片を作製し HE 染色を施した。観察には光学顕微鏡（VANOX-S：Olympus）を用いた。各試料から無作為に抽出した 5 つの領域から 4 か所ずつ（サンプルあたり計 20 箇所）選択し、表皮と真皮の厚さを測定した。計測には解析ソフト Image J (version 1.48v、National Institutes of Health) の Measure 機能を用いた。

### 4) 免疫組織化学

皮膚試料を 10%ホルムアルデヒドに浸漬し、室温で一晩固定した後、エタノール系列による脱水後、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した。ミクロトームで厚さ 4 μm の切片を作製し、キシロール系列による脱パラフィン後、3%過酸化水素水／メタノールで 5 分反応させ、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。リン酸ナトリウム緩衝液（PBS）で洗浄後、2%ウシ血清を室温で

1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、一次抗体として mouse decorin antibody (AF1060 : R&D Systems) を用いて 4℃で一晩反応させた。その後、PBS で洗浄し、二次抗体 (Histofine® Simple Stain Mouse MAX-PO(R) : ニチレイ、東京、日本) を反応させた。発色は DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel) , 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) を用いて調製した試薬を 5 分間反応させた。観察には VANOX-S を使用した。

#### 5) 透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope : TEM) 観察

皮膚試料を 0.5 mm 角に細切し、3.0%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (PB、pH7.4) に浸漬し、室温で 2 時間固定した。固定した試料を PB で洗浄したのち、1.0%四酸化オスミウム/0.1 M PB に室温で 1 時間浸漬固定した。その後、試料を蒸留水で洗浄、エタノール系列で脱水、置換剤の QY-1 (日新 EM) で置換した後、Quetol 812 (日新 EM) に包埋した。包埋試料をウルトラミクロトーム (Reichert Supernova : Leica) を用いてダイヤモンドナイフで厚さ約 80 nm の切片を作製した。切片を銅グリッドに載せ、0.2%タンニン酸を含む 10%エタノール 15 分、1.0%酢酸ウラン 5 分および 1.0%クエン酸鉛 10 秒間の条件で電子染色を施した。染色した試料は TEM (JEM-1220 : JEOL) を用いて加速電圧 80kV で観察した。各試料の真皮網状層から無作為に抽出した 500 本のコラーゲン細線維の直径および円形度を Image J の Measure 機能を用いて測定した。加えて、Collagen Fibril Index (CFI、単位面積あたりにコラーゲン細線維が占める割合) を各サンプル 5 つの領域 (計 20,000,000 nm<sup>2</sup>) から Image J の Measure 機能を用いて計測した。

#### 6) 走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope : SEM) 観察

皮膚試料を 1.0 mm 角に細切し、3.0%グルタルアルデヒド/0.1 M PB (pH7.4) に室温で 2 時間浸漬固定した。0.1 M PB で洗浄後、1.0%タンニン酸水溶液に 1 時間浸漬し、PB で洗浄した。後固定として 1.0%四酸化オスミウム/0.1 M PB に 1 時間浸漬した。エタノール系列で脱水した試料に t-ブチルアルコールを用いた凍結乾燥を施し、試料台に固定した後、イオンスパッタ (JUC-5000 : JEOL) で白金をコートした。調製した試料は SEM (JSM-5200 : JEOL) を用いて加速電圧 20 kV の条件で観察した。

#### 7) キュプロメロニックブルー (cupromeronic blue : CB) 染色を用いた TEM 観察

採取した試料を 0.5 mm 角に細切し、CB 染色液 [0.05% (w/v) CB (生化学工業)、0.1 M 塩化マグネシウム、3.0% グルタルアルデヒド / 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8)] に 4℃ で 5 日間浸漬し、固定および染色を施した。固定、染色した試料を PB で洗浄したのち、34 mM タングステン酸ナトリウム水溶液に室温で 1 時間浸漬した。その後、試料を蒸留水で洗浄し、エタノール系列で脱水、QY-1 で置換した後、Quetol 812 に包埋した。包埋試料を Reichert Supernova を用いてダイヤモンドナイフで厚さ約 80 nm の切片を作製した。切片を銅グリッドに載せ、1.0% 酢酸ウラン 10 分間の条件で電子染色を施した。染色した試料は TEM (HT7700、日立製作所) を用いて加速電圧 80 kV で観察した。各試料の真皮網状層から無作為に抽出した 100 本の GAG 鎖から直線状の GAG 鎖の割合を算出した。直線状の GAG 鎖以外の GAG 鎖については曲率を測定した。各項目は Image J の Measure 機能を用いて測定した。

#### 8) 統計分析

統計ソフト (R、version 3.2.0) にあるスチューデントの t 検定法を用いた。P 値が 0.05 未満を有意な差と判定した。

### 3. 結果

#### 1) *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚の引張試験

これまでに *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで皮膚の脆弱性を検討した報告はない。そこで、機械的な強度の指標として引張強度を測定した。*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは引張強度は  $1.47 \pm 0.145$  N であった。これに対して、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスでは  $6.08 \pm 0.740$  N であり、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで有意に低い値 ( $P=0.0037$ ) を示した (図 7)。よって、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚は脆弱であると示された。

#### 2) *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚の光学顕微鏡観察

次に皮膚の強度に関わる表皮と真皮の組織構造を明らかにするため、HE 染色を実施した。表皮の厚さは *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは  $11.20 \pm 0.658$   $\mu\text{m}$  であるのに対して *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスでは  $11.44 \pm 0.675$   $\mu\text{m}$  であり、両者に統計学的に有意な差は認められなかった ( $P=0.81$ 、図 8a)。同様に、真皮の厚さも *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは  $160.60 \pm 8.445$   $\mu\text{m}$  であるのに対して *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスでは  $155.94 \pm 9.727$   $\mu\text{m}$  であり、有意な差は認められなかった ( $P=0.74$ 、図 8b)。これらの結果と対照的に真皮網状層コラーゲン線維や線維束の境界は *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスではコラーゲン線維や線維束の境界が不明瞭であったのに対して、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスでは明瞭であった (表 2、図 8c、d)。以上のことから、D4ST1 は皮膚の厚さには関与しないが、コラーゲン線維の形成異常に関与すると考えられる。

#### 3) 免疫組織化学による *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス背部皮膚のデコリンの検出

*Chst14*<sup>-/-</sup>マウス背部皮膚のデコリンの局在を調べるため、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学を実施した。*Chst14*<sup>-/-</sup>マウス、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウス共に、真皮のコラーゲン線維上にデコリンの発現が認められたが、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスと *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスの間でデコリンの局在に明らかな差はなかった。表皮や毛包、脂腺、脂肪細胞は陰性であった (図 9)。したがって、D4ST1 は皮膚でのデコリンの発現分布に影響しないと考えられる。

#### 4) *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚の電子顕微鏡観察

次に、コラーゲン線維の形態を詳細に解析するため、TEM で真皮を観察した。図 10a で示すように、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスの真皮乳頭層では表皮に対して平行に走

行するコラーゲン線維が折り重なるようにして層構造を形成していた。対照的に、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは表皮に対して垂直に走行するコラーゲン線維が存在し、層構造が崩れていた（図 10b）。加えて *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの真皮乳頭層はコラーゲン細線維間が広がり、密度が低下していた。一方、真皮網状層では *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスで向きの揃ったコラーゲン細線維がコラーゲン線維を形成している様子が確認されたのに対して（図 10c）、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは同一のコラーゲン線維内で走行の異なるコラーゲン細線維が混在し、コラーゲン線維の形状に異常がみられた（図 10d）。次に、乳頭層では認められなかった同一コラーゲン線維内でのコラーゲン細線維の走行の乱れが *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの網状層で認められたため、SEM で網状層のコラーゲン細線維の走行についてさらに詳細に観察した。*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスではコラーゲン細線維が束になり同一方向に走行していた（図 10e、矢印）。一方、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの網状層ではコラーゲン細線維が 2、3 本でまとまり、一つの線維束が曲がり、別の線維束に集合しながら様々な方向に走行している様子が認められた（図 10f、矢頭）。以上より、D4ST1 はコラーゲン細線維の集合に関与すると考えられる。

TEM 観察によりコラーゲン細線維の集合不全を認めたことから、真皮網状層のコラーゲン細線維の形状と分布について、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスと *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで比較した。コラーゲン細線維の直径は *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスで  $98.5 \pm 6.71$  nm であるのに対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで  $91.9 \pm 4.80$  nm であり統計学的に有意な差は認められなかった（ $P=0.24$ ）。形状の指標として円形度（1 に近いほど真円であることを示す）を調べたところ、この指標も *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスと *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで差は認められなかった（*Chst14*<sup>+/+</sup>マウス： $0.885 \pm 0.0009$  nm<sup>2</sup>/nm<sup>2</sup>、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウス： $0.887 \pm 0.0004$  nm<sup>2</sup>/nm<sup>2</sup>、 $P=0.93$ ）。一方、コラーゲン細線維の密度を示す CFI について調べたところ、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスで  $65.2 \pm 2.02\%$  であるのに対して *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで  $52.5 \pm 1.32\%$  であり、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで有意に低下した（ $P=0.006$ 、表 2）。以上より D4ST1 はコラーゲン細線維自体の形成には関与しないが、コラーゲン細線維の集合に関与すると考えられる。

続いて、コラーゲン細線維の集合不全を認めたことから、コラーゲン細線維を束ねる GAG 鎖について調べた。GAG 鎖を可視化するために CB 染色を施し、観察したところ、コラーゲン細線維の縦断方向からの観察では、両群ともにコラーゲン細線維の D 周期と一致して GAG 鎖が付着していた（図 11a、b）。



しかし、コラーゲン細線維の横断面方向からの観察では、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスはコラーゲン細線維に巻き付くように付着する GAG 鎖が認められたのに対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは直線状の GAG 鎖が一端をコラーゲン細線維と結合し、他方は周囲に突き出すように付着している様子が認められた（図 11c、d）。これに一致して、直線状の GAG 鎖の割合は *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスで 8.8±1.03% に対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで 33.1±3.29% であり、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで直線状の GAG 鎖の顕著な増加が認められた（*P* = 0.002、表 2）。以上より、D4ST1 欠損は GAG 鎖を直線状に変化させると判明した。一方、直線状 GAG 鎖以外の GAG 鎖の形状の解析として曲率（値が小さいほど、より直線的であることを示す）を計測した結果、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスで 0.0257±0.00180 nm<sup>-1</sup> であるのに対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスで 0.0215±0.00035 nm<sup>-1</sup> と有意な差は認められなかった（*P* = 0.082、表 2）。

図 12 は電子顕微鏡観察の結果を模式的に表した。デコリンのコアタンパク質（図 12、矢印）は *Chst14*<sup>+/+</sup>マウスの真皮のコラーゲン細線維の d バンドに結合し、DS の GAG 鎖（図 12a、c、黒矢頭）はコアタンパク質から伸長し d バンドの位置でコラーゲン細線維の辺縁に沿って接着する。この d バンドの位置は隣接するコラーゲン細線維の間で同期している。*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでもデコリンのコアタンパク質はコラーゲン細線維の d バンドに結合するが、CS の GAG 鎖（図 12b、d、白矢頭）は、コアタンパク質を起点にコラーゲン細線維に対して垂直方向に直線的に伸長する。

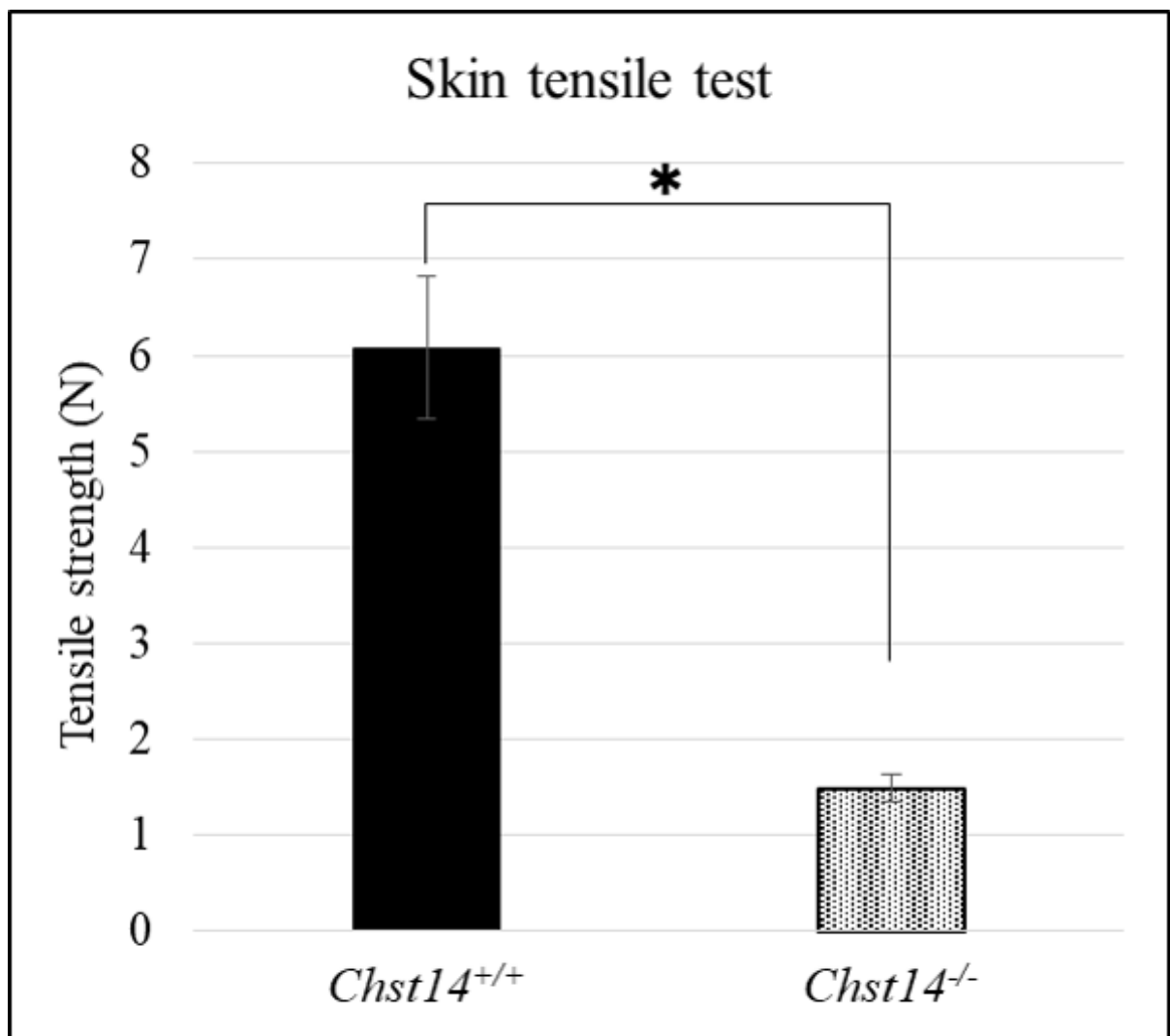


図7 *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚の引張試験

メスの *Chst14*<sup>+/+</sup>マウス(黒)と *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス(網掛け)の背部皮膚を採材し、引張強度を測定した。グラフはそれぞれ5匹の *Chst14*<sup>+/+</sup> マウス、3匹の *Chst14*<sup>-/-</sup> マウスの平均±標準誤差を示す。\**P*<0.05 vs. *Chst14*<sup>+/+</sup> マウス。

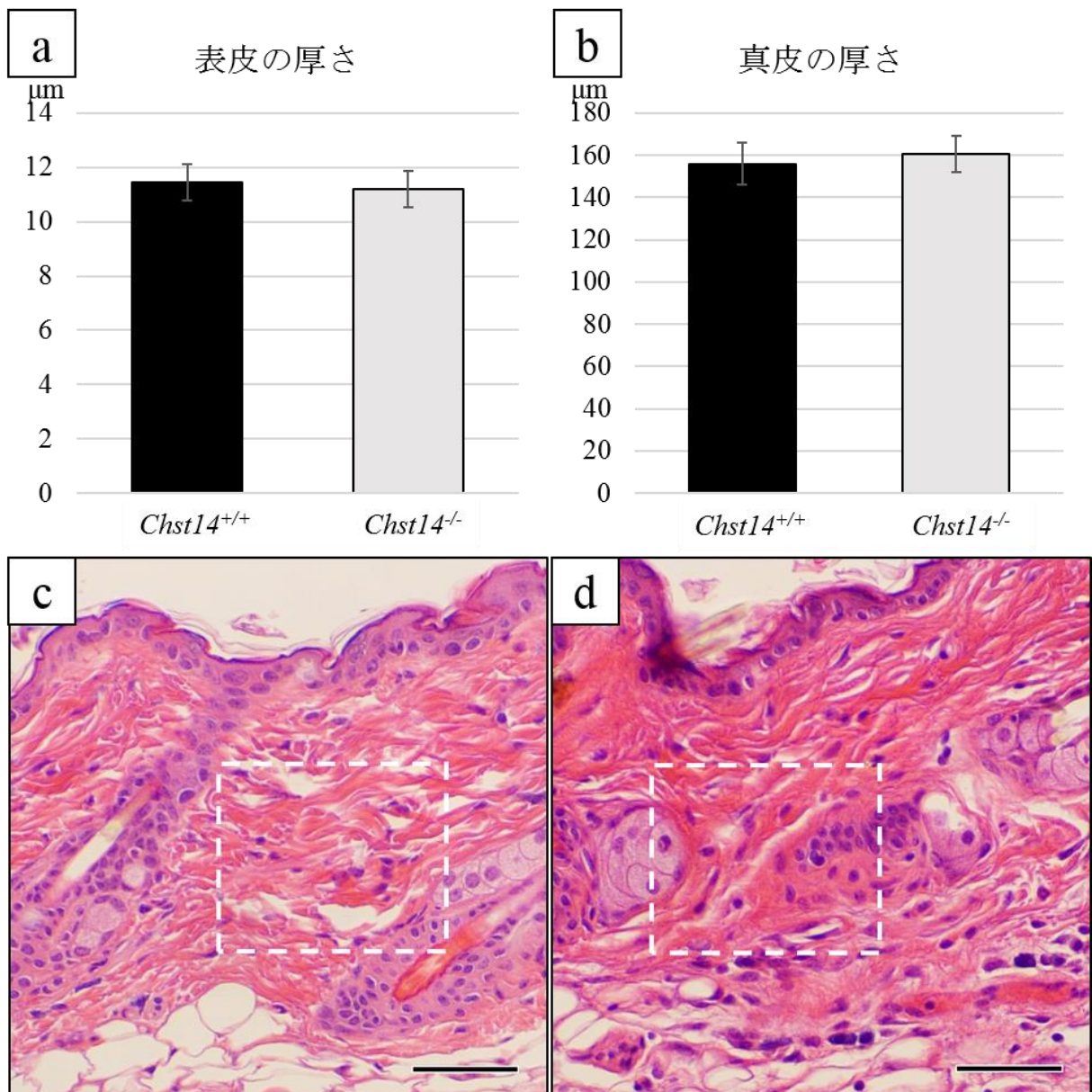


図 8 *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚の HE 染色像

a、表皮の厚さの比較。b、真皮の厚さの比較。\*有意差あり ( $P < 0.05$  vs. *Chst14*<sup>+/+</sup>マウス)。a、b は 3 検体の平均値と標準誤差を示す。c、d、メスの *Chst14*<sup>+/+</sup>マウス (c) と *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス (d) の背部皮膚を採取し、HE 染色を施した。c、d は 3 例中の典型的な 1 例のデータを示す。白破線は真皮網状層の深層を示す。(Bar=50 μm)

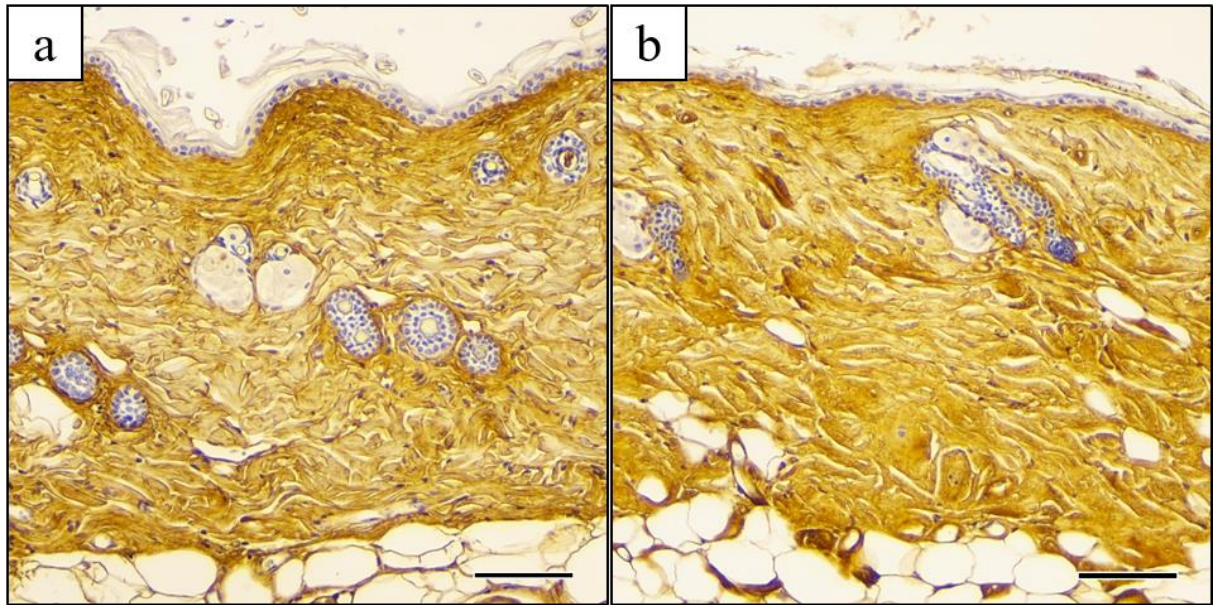


図 9 *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの背部皮膚のデコリンの発現

メスの *Chst14*<sup>+/+</sup>マウス (a) と *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス (b) の背部皮膚を採取し、デコリンを免疫組織化学的手法で検出した。図は 3 例中の典型的な 1 例のデータを示す。(Bar=100  $\mu$ m)



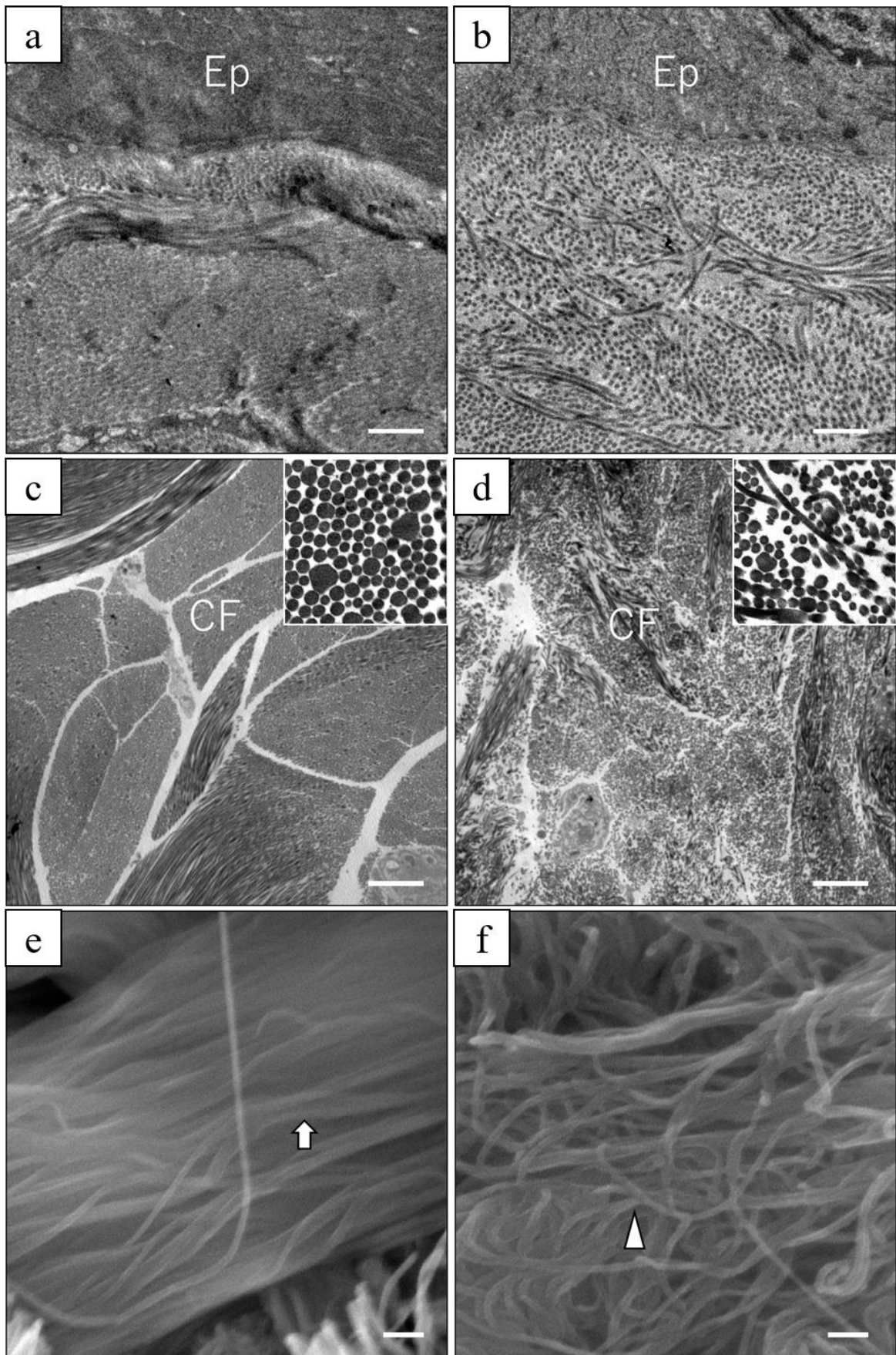


図 10 *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの真皮コラーゲン線維およびコラーゲン細線維の電子顕微鏡像

*Chst14*<sup>+/+</sup>マウス (a、c、e) および *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス (b、d、f) の真皮を電子顕微鏡観察に供した。図は 3 例中の典型的な 1 例のデータを示す。a、b、真皮乳頭層。Ep、表皮。c、d、真皮網状層。CF、コラーゲン線維。挿入図、コラーゲン細線維。e、f、真皮網状層の走査型電子顕微鏡像。矢印、同一方向に走行するコラーゲン細線維。矢頭、異なる方向にコラーゲン細線維。(Bar=1.0  $\mu$ m)

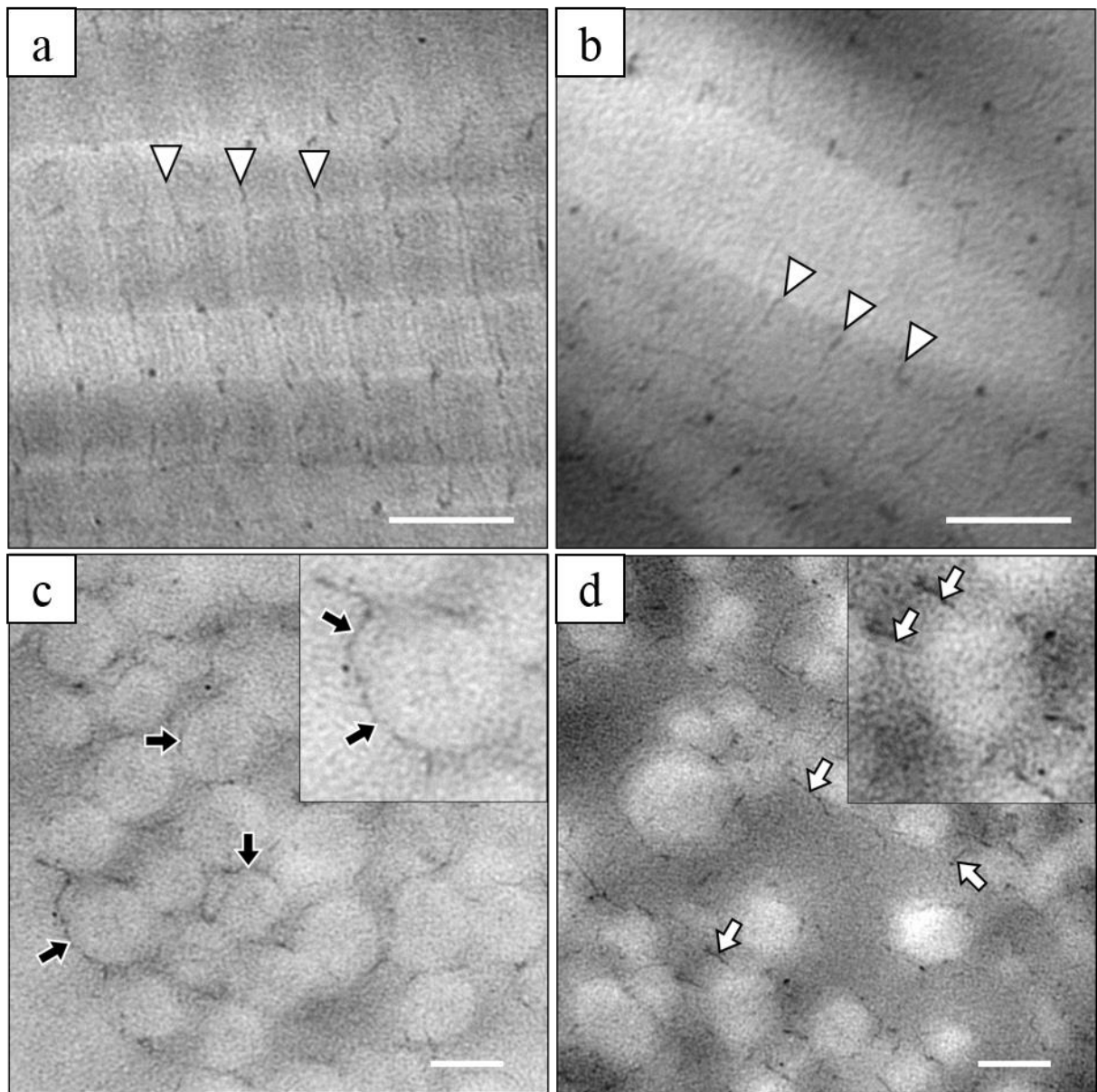


図 11 コラーゲン細線維およびグリコサミノグリカン（GAG）鎖のキュプロメロニックブルー染色像

*Chst14*<sup>+/+</sup>マウス（a、c）および *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス（b、d）の真皮をキュプロメロニックブルーで染色し透過型電子顕微鏡で観察した。a、b、コラーゲン細線維の縦断像。白矢頭、D 周期で接着する GAG 鎖。c、d、コラーゲン細線維の横断像。黒矢印、コラーゲン細線維に巻き付くような GAG 鎖。白矢印、コラーゲン細線維から周囲に突き出すような直線状の GAG 鎖。（Bar=100 nm）

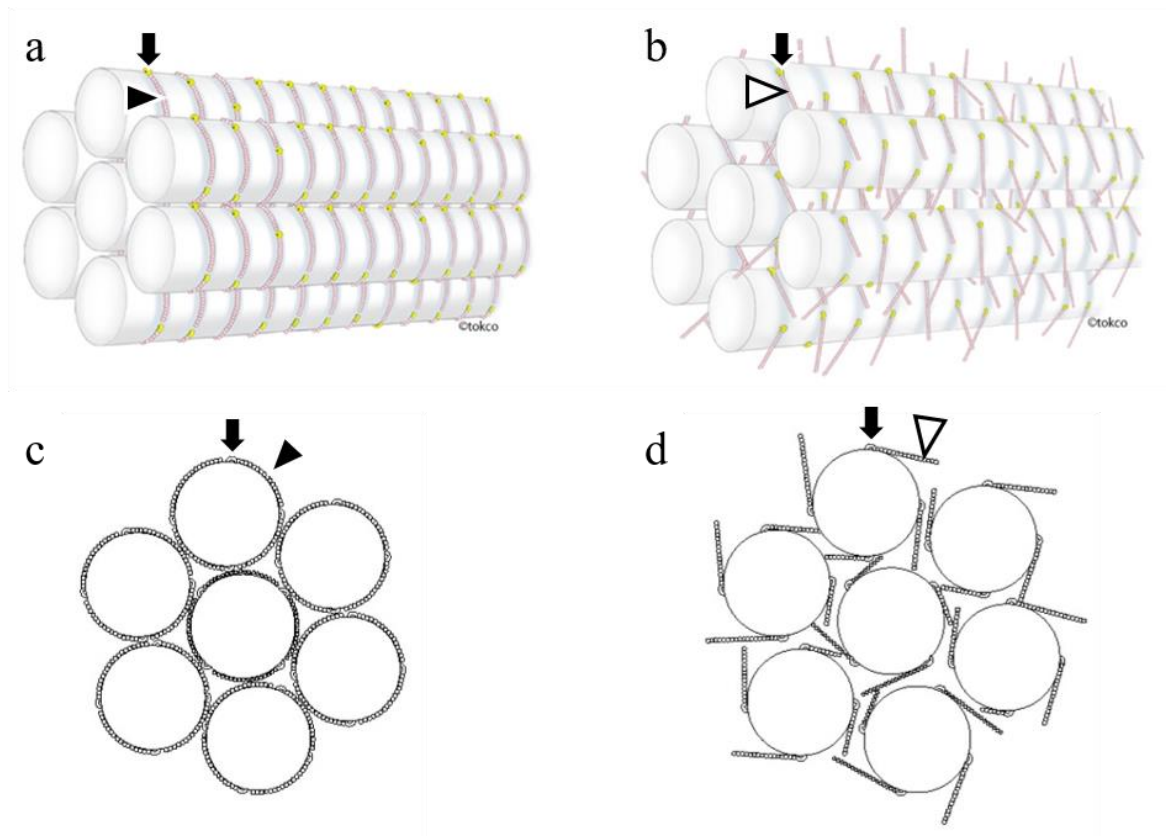


図 12  $Chst14^{+/+}$ および  $Chst14^{-/-}$ マウスのコラーゲン細線維とグリコサミノグリカン（GAG）鎖の構造を表した模式図

a、c、 $Chst14^{+/+}$ マウス。b、d、 $Chst14^{-/-}$ マウス。a、b、立体模式図。c、d、コラーゲン細線維横断面の模式図。黒矢印、デコリンコアタンパク質。黒矢頭、曲線状の GAG 鎖。白矢頭、直線状の GAG 鎖。



表 2 *Chst14*<sup>+/+</sup>および *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚細胞外マトリックスの形態解析

解析項目	<i>Chst14</i> <sup>+/+</sup>	<i>Chst14</i> <sup>-/-</sup>
コラーゲン細線維の直径 (nm)	98.5±6.71	91.9±4.80
コラーゲン細線維の円形度 (nm <sup>2</sup> /nm <sup>2</sup> )	0.885±0.0009	0.887±0.0004
Collagen Fibril Index (%)	65.2±2.02	52.5±1.32*
直線状の GAG 鎖の割合 (%)	8.8±1.03	33.1±3.29*
GAG 鎖の曲率 (nm <sup>-1</sup> )	0.0257±0.00180	0.0215±0.00035

値は3匹の平均±標準誤差を示す。\*有意差あり ( $P < 0.05$  vs. *Chst14*<sup>+/+</sup>マウス)。

GAG、グリコサミノグリカン。

#### 4. 考察

本研究によって、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚が力学的に脆弱であることが示された。この要因としてコラーゲンやデコリンのコアタンパク質、デコリンの GAG 鎖の異常が考えられる。それぞれについて、今回の結果と過去の報告を比較した。初めに、皮膚の強度に関わるコラーゲンについて、コラーゲン細線維は主に I 型コラーゲンで構成されているが III 型コラーゲンや V 型コラーゲンも含まれる[2]。これらの I 型、III 型、V 型コラーゲン分子の遺伝子変異は EDS の原因であることも知られる[59]。例えば、I 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖をコードする *COL1A1* の変異が原因の Classical EDS では、患者の皮膚で大小不同のコラーゲン細線維や大きく歪な形をしたコラーゲン細線維、コラーゲン細線維がほどけたような細い線維の出現が報告された[17, 73, 93]。また、*Colla1* の遺伝子変異を持つ *Colla1*<sup>prt/+</sup>マウスではコラーゲン細線維の直径の減少が認められた[12]。一方、I 型コラーゲンの  $\alpha 2$  鎖をコードする *COL1A2* の変異が原因の Cardiac-valvular EDS 患者では、コラーゲン細線維の直径と密度の低下、歪な形のコラーゲン細線維が報告された[58]。III 型コラーゲンに関しては、このタンパク質をコードする *COL3A1* が原因の Vascular EDS 患者では、コラーゲン細線維の密度の低下や大小不同のコラーゲン細線維、顆粒状のコラーゲンが認められた[24]。さらに V 型コラーゲンをコードする *COL5A1* および *COL5A2* の変異については、*COL1A1* の変異と同様に Classical EDS の原因として知られる。事実、*Col5a2* ノックダウンマウスでは、コラーゲン細線維の密度の低下と大きく歪な形をしたコラーゲン細線維が確認された[76]。以上のことより、コラーゲン細線維を構成するコラーゲン分子の遺伝子変異はコラーゲン細線維の直径や形状に影響を与えることが明らかである。さらに、*in vitro* の報告から III 型や V 型コラーゲンの割合が増加することでコラーゲン細線維の直径が減少することも知られている[7, 92]。このような過去の知見に加え、今回の *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスのコラーゲン細線維の直径と円形度に変化が認められなかったことを考え併せると、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスではコラーゲン分子に異常がないと考えられる。よって、D4ST1 の欠損はコラーゲン細線維中のコラーゲン分子種の割合に影響を与えないと示唆された。

次に、デコリンのコアタンパク質について検討した。線維芽細胞から分泌されたコラーゲン細線維は側面同士の融合でも直径を増大させる[39, 87]。この

コラーゲン細線維の側面同士の融合にデコリンのコアタンパク質が関与しており[19, 50, 70, 82-83]、デコリンを欠損したマウスの皮膚ではコラーゲン細線維が過剰に融合し、歪な横断面を持つコラーゲン細線維が出現する[14]。さらに、*in vitro* の実験でデコリンのコアタンパク質を添加したコラーゲンの線維化モデルではコラーゲン細線維の直径に変化がみられた[79]。これらのことから、デコリンのコアタンパク質の異常はコラーゲン細線維の形状に影響すると言える。今回の TEM 観察の結果からコラーゲン細線維の直径や円形度に差を認めなかったことに加えて、免疫組織化学の結果からデコリンのコアタンパク質の真皮層内での分布に差が見られなかったため、D4ST1 欠損はデコリンのコアタンパク質に影響を与えないことが示唆された。

過去の報告では真皮ではデコリンの GAG 鎖がコラーゲン細線維同士を束ねるとされる[72, 105]。成体のデコリンの GAG 鎖は一本の DS 鎖で構成される[63, 72]。D4ST1 の機能が欠損すると DS が合成されずに CS に置き換わることが明らかになり[63]、実際に *mcEDS-CHST14* 患者の皮膚のデコリンの GAG 鎖は CS に置き換わっている[66]。したがって、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでも同様にデコリンの GAG 鎖が一本の CS 鎖に置き換わると推測される。今回、コラーゲン細線維に接着する GAG 鎖を観察したところ、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスの GAG 鎖はコラーゲン細線維に巻き付くように接着していたのに対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの GAG 鎖はコラーゲン細線維から周囲に突出するように接着していた。この違いは DS と CS の違いによるものと考えられる。DS と CS はウロン酸とアミノ糖の二糖の繰り返し構造のウロン酸の違いで分類され、ウロン酸がイズロン酸であるのが DS であり、グルクロン酸であるのが CS である[36, 53]。化学構造上の特徴から、DS のイズロン酸は <sup>1</sup>C<sub>4</sub>、<sup>2</sup>S<sub>0</sub> および <sup>4</sup>C<sub>1</sub> の立体配座間での移行がほぼ等エネルギーで行われるため、DS 鎖全体では柔軟性を持つが、CS のグルクロン酸は立体配座間のエネルギー差が大きいため <sup>4</sup>C<sub>1</sub> の立体配座で保持されており、CS 鎖全体では剛直性を持つと示唆されている[10-11, 63]。したがって、D4ST1 欠損はデコリンの GAG 鎖を DS から CS に変化させ、その GAG 鎖の二糖間の結合角度が固定されて GAG 鎖が直線状に変化したと考えられる。

過去の研究報告や今回の研究結果から、皮膚の脆弱性に関与するコラーゲン細線維の密度の低下や走行の乱れといったコラーゲン細線維の集合不全は

GAG 鎖の形状の変化が原因と推察される。実際に、*in vitro* の実験でコラーゲン細線維の走行に対する DS と CS の作用が検討されている。DS を添加したコラーゲンの線維化モデルではコラーゲン細線維の D 周期ごとに DS 鎖が付着しており、数本のコラーゲン細線維が束となって一方向に配列していた。対照的に、CS を添加したコラーゲンの線維化モデルでは D 周期ごとに CS 鎖が付着していたが、コラーゲン細線維の走行に乱れが認められた[79]。加えて、過去の実験では DS 添加のコラーゲンゲルは無添加のコラーゲンゲルより強い引張強度を示したが、CS 添加のコラーゲンゲルでは無添加のコラーゲンゲルと比べ引張強度に変化がみられなかったことが報告された[34, 91]。以上の知見より、D4ST1 を欠損させると、CS のみからなる GAG 鎖を持つデコリンが生成され、結果として GAG 鎖の形状が直線化することで、コラーゲン細線維の集合不全が生じることが明らかになった。

## 5. 小括

本章ではデコリンの GAG 鎖である DS の合成経路に異常を示す *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚 ECM 構造を解析した。皮膚引張試験によって *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚が力学的に脆弱であることが示された。組織学的には真皮乳頭層では表皮に対して垂直に走行するコラーゲン線維が存在し、層構造が崩れたことに加えて、コラーゲン細線維間が広がり、密度が低下した。真皮網状層ではコラーゲン線維の形成が不明瞭であり、コラーゲン細線維の密度および走行に異常が認められた。CB 染色の解析から直線状の GAG 鎖は一端をコラーゲン細線維と結合し、他方を周囲に突き出すように付着している様子が認められた。これらのことから *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは、GAG 鎖の組成の変化に伴う形状の変化がコラーゲン細線維の集合を阻害することで、皮膚の ECM 構造を変化させることが示唆された。

### 第Ⅲ章 McEDS-*CHST14* ヒト真皮の細胞外マトリックスの構造

#### 1. 序文

デコリンはコアタンパク質に DS が主体の GAG 鎖を共有結合した PG で、特に皮膚や軟骨、大動脈の ECM に豊富に存在する[36]。DS は増殖因子との相互作用を介して多くの生物学的作用を持ち、ECM の形成に加えて、ECM に依拠した創傷治癒、抗凝固作用などが知られている[99-100]。DS はイズロン酸と N-アセチルガラクトサミンの二糖の繰り返しで 50～200 回程度連なって構成される[41, 99-100]。

近年、DS 合成に関与する *CHST14* 遺伝子の異常が示された mcEDS-*CHST14* は 27 家族から 40 人の患者が報告された[20-21, 37-38, 45, 48-49, 57, 61, 67, 86, 89-90, 94, 102, 106-107]。mcEDS-*CHST14* の患者は頭蓋顔面特徴、先天性多発性拘縮、眼球および内臓奇形が見られるのに加え、皮膚過伸展性および脆弱性、脱臼および亜脱臼、大腿皮下血腫、内臓破裂といった進行性の組織脆弱性を示すことが報告されている[46]。これらの病変のうち、皮膚の異常は前章で述べたように、真皮におけるデコリンの GAG 鎖の構造異常に起因すると想定される。これまでの研究から、mcEDS-*CHST14* 患者の皮膚線維芽細胞から単離された GAG 鎖では DS が検出されず、CS のみ発現していることが明らかにされた。これは D4ST1/*CHST14* 欠損によりデルマトンの硫酸化が障害され、DSE によってイズロン酸からグルクロン酸に変換されたことで DS から CS への置換が生じたためと考えられる[22, 63, 94]。

デコリンの GAG 鎖の異常が報告される一方で、mcEDS-*CHST14* の皮膚病理所見は様々に報告されている。Miyake ら (2010) は mcEDS-*CHST14* 患者の皮膚の HE 染色標本を光学顕微鏡で観察したところ、小さいコラーゲン線維が真皮乳頭層から網状層全体に存在し、正常な大きいコラーゲン線維が著しく減少することを報告した[63]。さらに TEM 観察により、正常な真皮では規則的で密に集合したコラーゲン細線維が観察されるが、患者真皮網状層のコラーゲン細線維は集合せず、分散していることを明らかにした。一方で患者真皮のコラーゲン細線維は、正常真皮で観察されたコラーゲン細線維と同様に均一な直径を持ち、辺縁が平滑な円形を呈するものであった。これに一致して、Janecke ら (2016)、Kono ら (2016)、および Mochida ら (2016) も TEM を用

いて同様の結果を得ており、mcEDS-CHST14 患者の皮膚の脆弱性はデコリンの DS 鎖が CS 鎖に置換することによるコラーゲン細線維の集合不全を生じると示唆している[38, 45-47, 67]。これに反して、Dündar ら（2009）は、HE 染色、弾性線維染色、PAS 染色を施した標本の光学顕微鏡観察により mcEDS-CHST14 患者の皮膚は正常であるとし、TEM 観察でも正常な直径および外形を有するコラーゲン細線維が正常に集合していると報告している[22]。一方で Malfait ら（2010）は TEM 観察により、大小不同および花状のコラーゲン細線維を含む小さなコラーゲン線維を mcEDS-CHST14 患者の皮膚に認め、さらに線維の不規則な間隙やコラーゲン線維束またはコラーゲン線維の間隙に顆粒状の線維性の構造物を認めている。また、拡張した小胞体を持つ線維芽細胞も報告している[57]。これらの報告はいずれも 1 例または少数例での検討に留まる。そこで本研究では複数の mcEDS-CHST14 患者の皮膚を同時に解析することで mcEDS-CHST14 特有の真皮 ECM 構造を明らかにすることを目的とした。さらに電子顕微鏡下で GAG 鎖を可視化できる CB 染色を用いて解析することで、デコリンの DS 鎖が CS 鎖に置換されたことによる真皮 ECM 構造への影響を検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) 提供試料

皮膚の試料は4人の健常者（C1：6歳 男児、C2：5歳 女児、C3：11歳 女児、C4：14歳 女児）および5人の mcEDS-*CHST14* 患者（P1：18歳 女児、P2：12歳 男児、P3：3歳 男児、P4：20歳 女性、P5：41歳 女性）から採取され、信州大学の古庄知己博士と獨協医科大学の旗持淳博士から提供を受けた。すべての患者は mcEDS-*CHST14* に特徴的な症状を示し、*CHST14* の両対立遺伝子に変異を有する。臨床症状の詳細について、P1 および P4 は Kosho ら、P3 は Shimizu ら、P5 は Kono らによりそれぞれ報告された[45, 49, 86]。P4 および P5 については電子顕微鏡による検査が実施されており、それぞれ Miyake ら（2010）、Kono ら（2016）が報告した[45, 63]。本研究は信州大学医学部の機関審査委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言の原則に従った。加えて、酪農学園大学の人を対象とする医学系研究倫理委員会により承認され、規程に従い実施した（承認番号：16-4）。

### 2) 免疫組織化学

皮膚試料は上腕（C4、P4）、腹部（P1-1）、背部（P1-2）より採取された。試料を20%ホルムアルデヒドに浸漬固定した後、エタノール系列により脱水し、キシロールで透徹した後にパラフィンに包埋した。ミクロトームで厚さ 3 $\mu$ m の切片を作製し、キシロール系列による脱パラフィン後、1 mM EDTA / 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）を用いて30分間マイクロウェーブ法で抗原を賦活化処理した。その後、一次抗体として human decorin antibody（115402：R&D Systems）を、二次抗体として EnVision+ kit（Dako、Santa Clara、CA、USA）を用いて免疫組織化学を行った。対比染色として、ヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡（AX80：Olympus）で観察した。なお、本試験は信州大学の中山淳博士が実施し、その提供されたデータを解析した。

### 3) 透過型電子顕微鏡（transmission electron microscope：TEM）観察

試料を0.5 mm 角に細切し、一部を一般染色用に3.0%グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液（PB、pH7.4）に浸漬し、室温で2時間固定した。その後PBで洗浄し、1.0%四酸化オスミウム／0.1 M PB に浸漬し、室温で1時間、後



固定した。残りの試料を CB 染色液 [0.05% (w/v) CB、0.1 M 塩化マグネシウム、3.0% グルタルアルデヒド / 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8)] に浸漬し 4°C で 5 日間固定および染色を実施した。固定、染色した試料を PB で洗浄したのち、34 mM タングステン酸ナトリウム水溶液に室温で 1 時間浸漬した。その後、全ての試料を蒸留水で洗浄し、エタノール系列で脱水、QY-1 (日新 EM) で置換した後、Quetol 812 (日新 EM) に包埋した。包埋試料をウルトラミクロトーム (Reichert Supernova : Leica) を用いてダイヤモンドナイフで厚さ約 80nm の切片を作製した。切片を銅グリッドに載せ、一般染色用の試料は 0.2% タンニン酸を含む 10% エタノールで 15 分間、1.0% 酢酸ウランで 5 分間、さらに 1.0% クエン酸鉛で 10 秒間電子染色を施した。CB 染色用の試料には 1.0% 酢酸ウランで 10 分間電子染色を施した。染色した試料は TEM (JEM-1220 : JEOL および HT7700 : 日立製作所) を用いて加速電圧 80 kV で観察した。コラーゲン細線維の直径および円形度は一般染色用の各試料の真皮網状層から無作為に 500 本抽出し、計測した。一方、CFI は各サンプル 5 つの領域 (計 20,000,000 nm<sup>2</sup>) から計測した。加えて、直線状の GAG 鎖の割合は CB 染色用の各試料の真皮網状層から無作為に 100 本の GAG 鎖を抽出し、算出した。直線状の GAG 鎖以外の GAG 鎖については曲率を測定した。各項目は Image J (version 1.48v、National Institutes of Health) を用いて計測した。

#### 4) 統計解析

各解析から得られたデータは正規性を確認するため、コルモゴロフ - スミルノフ検定を有意水準 5% で実施した。コラーゲン細線維の直径および円形度、CFI、GAG 鎖の曲率についてはスチューデントの t 検定を用い、直線状の GAG 鎖の割合についてはウェルチの t 検定を用いた。いずれも統計ソフト (R、version 3.2.0) で解析し  $P < 0.05$  を有意と判定した。

### 3. 結果

#### 1) 免疫組織化学による真皮網状層のデコリン検出

健常者と mcEDS-CHST14 患者の真皮網状層でのデコリンの発現を免疫組織化学的に解析した。図 13 の C4 で示すように健常者の真皮網状層ではデコリンの陽性像がコラーゲン線維上に認められ、健常者の真皮網状層のコラーゲン線維径は大きく、境界は明瞭であった。一方、mcEDS-CHST14 患者の真皮網状層ではコラーゲン線維上にデコリンの陽性像が認められたが、コラーゲン線維径は小さく、細かい線維状であり、コラーゲン線維間の境界が不明瞭であった（図 13P1-1、2、P4）。したがって健常者、mcEDS-CHST14 患者ともにコラーゲン線維とデコリンの局在は一致するが、両者のコラーゲン線維の形状に差を認めた。

#### 2) 真皮のコラーゲン線維およびコラーゲン細線維の TEM 観察

免疫組織化学の結果からコラーゲン線維の形状に差を認めたため、TEM を用いて詳細なコラーゲン線維およびコラーゲン細線維の形態を観察した。真皮乳頭層について、健常者の真皮乳頭層ではコラーゲン線維およびコラーゲン細線維は表皮に対して平行に走行し、層構造を形成していた（図 14C1）。一方、mcEDS-CHST14 患者ではコラーゲン線維の形成が乏しく、コラーゲン細線維が分散した状態で表皮に対して垂直に走行しており、層構造が破綻していた（図 14P1-5）。

次に真皮網状層について、健常者の真皮網状層ではコラーゲン線維間を走行する弾性線維は少数のみ認められた。コラーゲン線維径は大きく、境界が明瞭であった（図 15C1）。一方で、mcEDS-CHST14 患者の真皮網状層ではコラーゲン線維間を走行する多数の弾性線維を認めた（図 15P1-5）。コラーゲン線維径は小さく、コラーゲン線維間には分散したコラーゲン細線維も多数確認された。さらにコラーゲン細線維の断面を観察したところ、図 16 に示したように健常者と mcEDS-CHST14 患者はともに辺縁が平滑な円形であり、コラーゲン細線維横断面の形を示す円形度については健常者 ( $0.88 \pm 0.001 \text{ nm}^2/\text{nm}^2$ ) と mcEDS-CHST14 患者 ( $0.88 \pm 0.003 \text{ nm}^2/\text{nm}^2$ ) の間に有意な差はなかった ( $P=0.45$ 、表 3)。またコラーゲン細線維の直径については健常者で  $98.4 \pm 6.98$ （平均 $\pm$ 標準誤差）nm であるのに対し mcEDS-CHST14 患者で  $87.5 \pm 5.02$  nm であり、両

群間に有意な差はなかった ( $P=0.24$ 、表 3)。対照的に、コラーゲン細線維の間隙は mcEDS-CHST14 患者で広がっており、不規則に広がった空間も観察された (図 16P1-5)。加えて、CFI は健常者で  $70.7\pm1.48\%$ であったのに対して mcEDS-CHST14 患者で  $57.8\pm3.85\%$ となり、mcEDS-CHST14 患者で有意 ( $P=0.049$ ) に減少した (表 3)。以上のことから mcEDS-CHST14 患者の真皮ではコラーゲン細線維の形状に異常はないものの、コラーゲン細線維の集合に異常をきたし、配置や走行に乱れが生ずることが示唆された。

### 3) 真皮網状層の GAG 鎖の TEM 観察

mcEDS-CHST14 患者ではコラーゲン細線維の密度が低下したことから、その原因を探るために、コラーゲン細線維を束ねる GAG 鎖を観察した。図 17 で示すように、健常者と mcEDS-CHST14 患者のすべての試料でコラーゲン細線維に接着する GAG 鎖が認められた。また、健常者、mcEDS-CHST14 患者ともにコラーゲン細線維の縦断像ではコラーゲン細線維の長軸に対して垂直に接着する GAG 鎖が観察され、接着位置も d バンドにあった。また隣接するコラーゲン細線維の d バンドと同期するように GAG 鎖が接着した (図 17C1-b、P2-b)。対照的に、コラーゲン細線維の横断像では健常者と mcEDS-CHST14 患者で観察像が大きく異なっていた。健常者の真皮では曲線状の GAG 鎖がコラーゲン細線維の辺縁に沿うように接着していた (図 17C1-a)。しかしながら、mcEDS-CHST14 患者では直線状の GAG 鎖が存在し、一端をコラーゲン細線維と接しながら周囲に突き出すように接着していた (図 17P1、P2-a、P3)。これに一致して、直線状の GAG 鎖の割合を比較すると、mcEDS-CHST14 患者 ( $39.3\pm0.67\%$ ) は健常者 ( $16.7\pm3.71\%$ ) と比べて、顕著に増加していた ( $P=0.03$ 、表 3)。さらに、GAG 鎖の曲率は健常者に比べ mcEDS-CHST14 患者では有意 ( $P=0.02$ 、表 3) に低下していた。したがって、mcEDS-CHST14 患者の真皮網状層の GAG 鎖はコラーゲン細線維との接着位置を変えず、形状を直線的に変化したと考えられる。

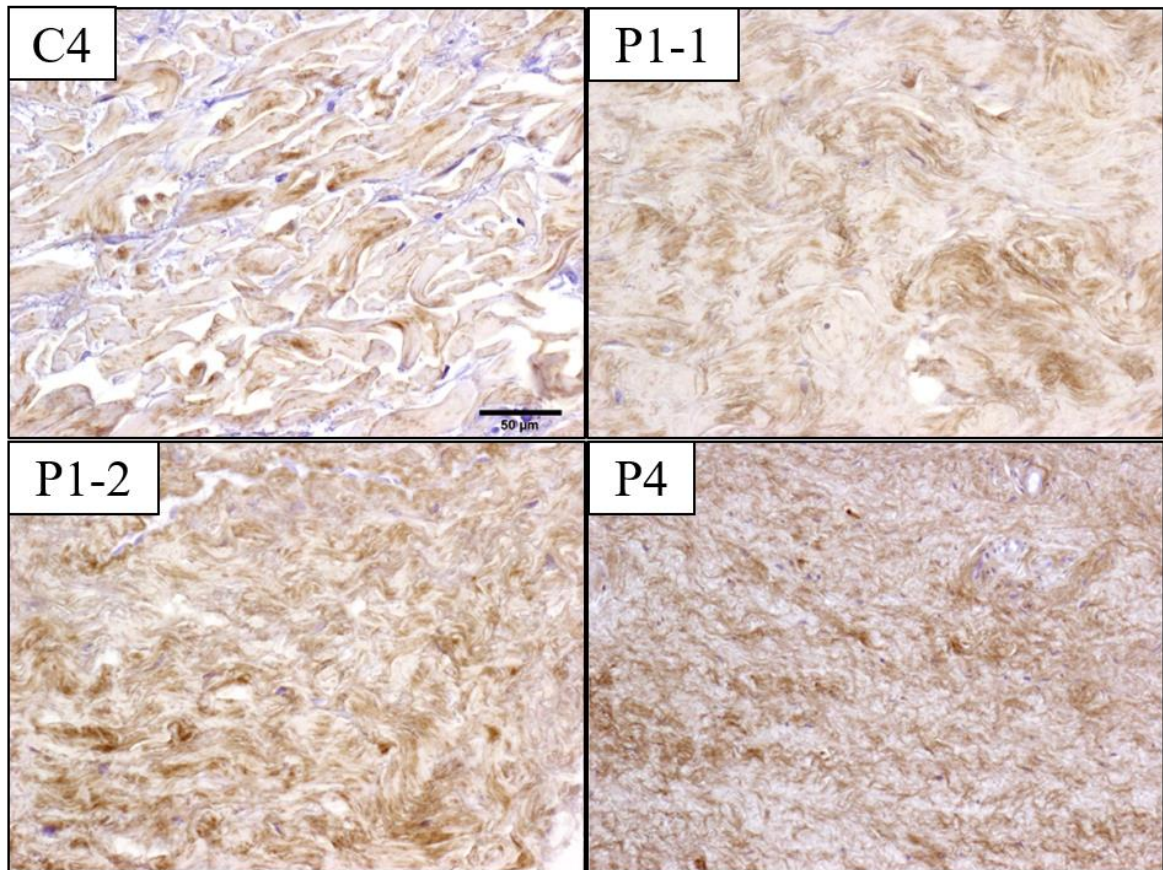


図 13 健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮網状層でのデコリンの局在上腕 (C4、P4)、腹部 (P1-1)、背部 (P1-2) より皮膚を採取しデコリンを免疫組織化学により検出した。C4、健常者。P1-1、2、P4、mcEDS-*CHST14* 患者。(Bar=50 μm)

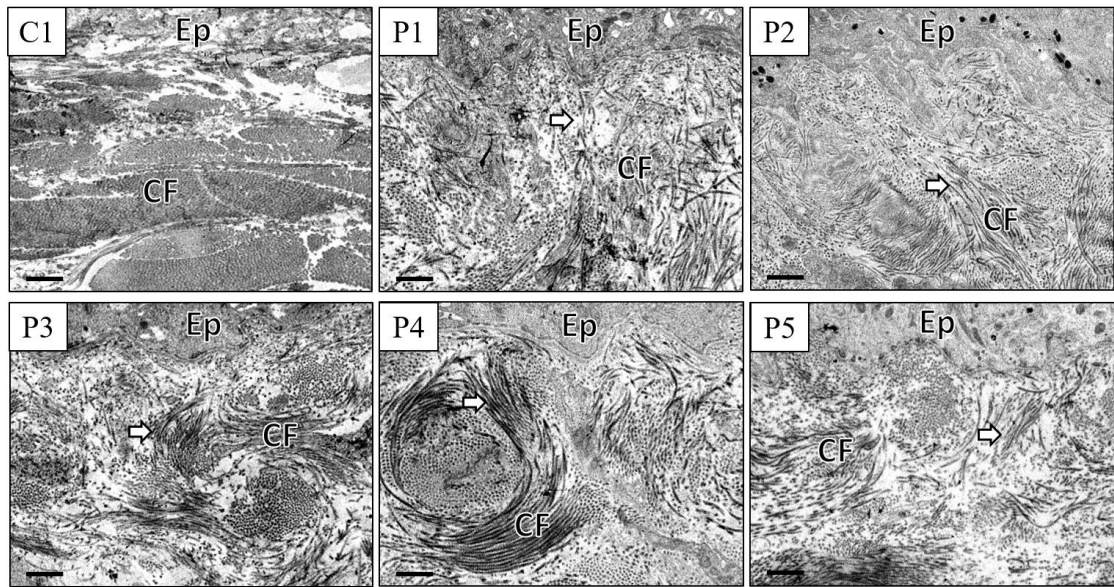


図 14 健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮乳頭層のコラーゲン線維およびコラーゲン細線維の透過型電子顕微鏡像

健常者（C1）と mcEDS-*CHST14* 患者（P1 から P5）の真皮乳頭層を透過型電子顕微鏡観察に供した。CF、コラーゲン線維。Ep、表皮。矢印、表皮に対して垂直に走行する真皮乳頭層のコラーゲン線維。（Bar=1  $\mu$ m）

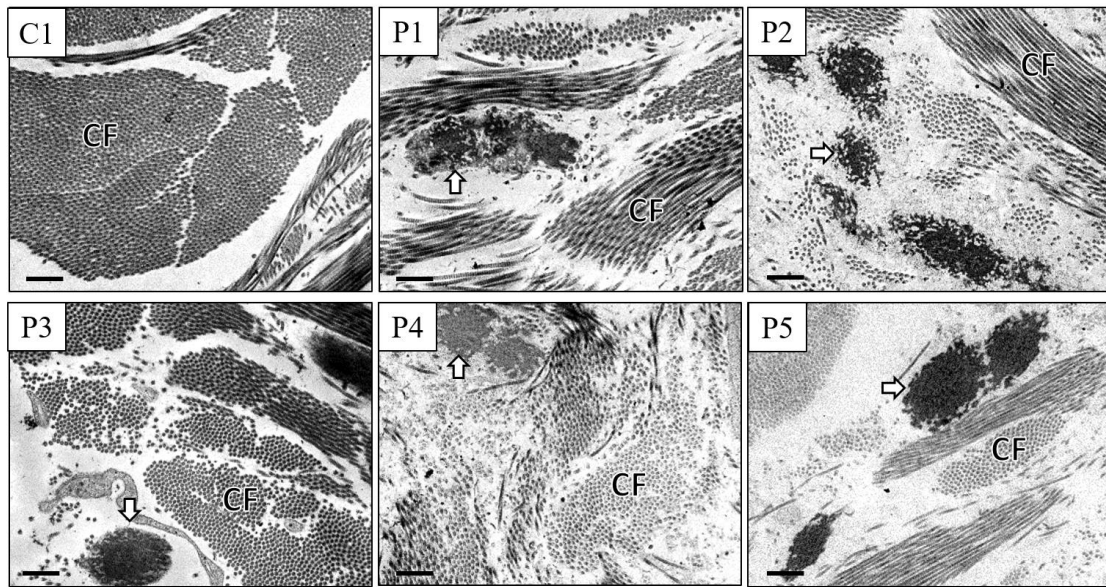


図 15 健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮網状層のコラーゲン線維およびコラーゲン細線維の透過型電子顕微鏡像

健常者 (C1) と mcEDS-*CHST14* 患者 (P1 から P5) の真皮網状層を透過型電子顕微鏡観察に供した。CF、コラーゲン線維。矢印、弾性線維。(Bar=1  $\mu$ m)



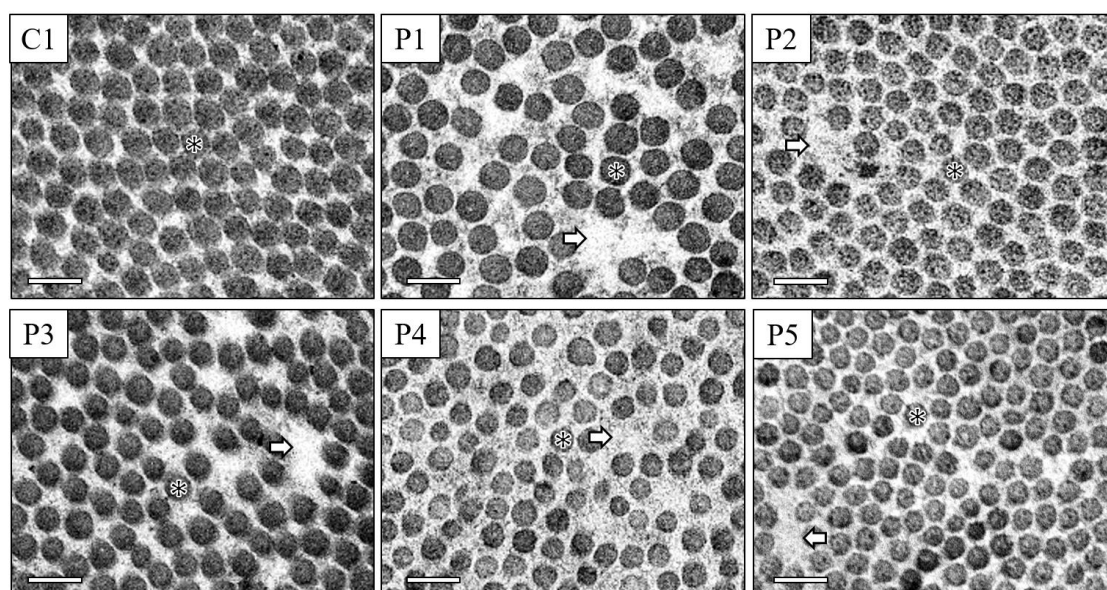


図 16 健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮網状層のコラーゲン細線維横断面の透過型電子顕微鏡像

健常者 (C1) と mcEDS-*CHST14* 患者 (P1 から P5) の真皮網状層のコラーゲン細線維を透過型電子顕微鏡観察に供した。\*、コラーゲン細線維。矢印、真皮網状層のコラーゲン細線維間に不規則に広がった空間。(Bar=200 nm)

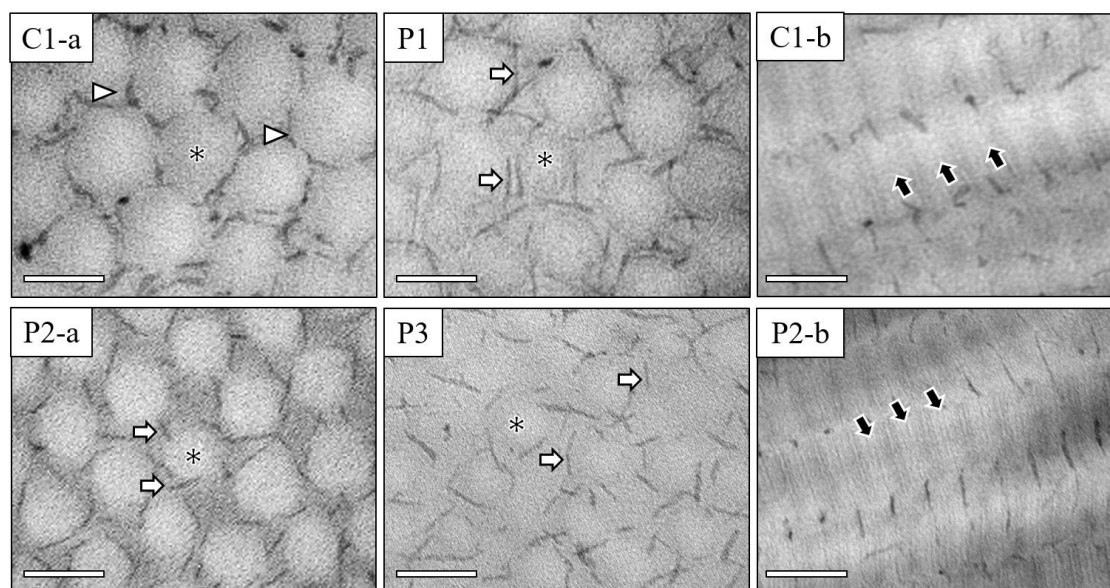


図 17 キュプロメロニックブルー染色を施した健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮網状層のコラーゲン細線維および GAG 鎖の透過型電子顕微鏡像

健常者 (C1) と mcEDS-*CHST14* 患者 (P1 から P5) の真皮網状層のコラーゲン細線維にキュプロメロニックブルー染色を施し、透過型電子顕微鏡観察に供した。C1-a、P1、P2-a、P3、コラーゲン細線維横断像。C1-b、P2-b、コラーゲン細線維縦断像。\*、コラーゲン細線維。白矢頭、曲線状の GAG 鎖。白矢印、直線状の GAG 鎖。黒矢印、コラーゲン細線維の d バンド。(Bar=100 nm)



表 3 コラーゲン細線維および GAG 鎖の形態解析結果の比較

試料	コラーゲン 細線維直径 (nm)	コラーゲン 細線維円形度 (nm <sup>2</sup> /nm <sup>2</sup> )	Collagen Fibril Index (%)	直線状の GAG 鎖の割合 (%)	GAG 鎖の曲率 (nm <sup>-1</sup> )	
健常者	C1	92.2	0.878	73.3	14	0.023
	C2	112.4	0.883	70.6	12	0.030
	C3	90.8	0.872	68.2	24	0.029
	平均±標準誤差	98.4±6.98	0.88±0.001	70.7±1.48	16.7±3.71	0.027±0.0022
mcEDS- CHST14 患者	P1	105.7	0.880	61.6	38	0.016
	P2	87.1	0.878	61.7	40	0.020
	P3	88.3	0.883	60.7	40	0.019
	P4	78.2	0.883	42.4	ND	ND
	P5	78.2	0.877	62.6	ND	ND
	平均±標準誤差	87.5±5.02	0.88±0.003	57.8±3.85*	39.3±0.67*	0.018±0.0012*

\*有意差あり (p<0.05)、ND：測定不可、GAG：グリコサミノグリカン

#### 4. 考察

今回の研究では mcEDS-*CHST14* の皮膚病理所見について、他の EDS サブタイプの皮膚病理所見と比較した。これまでの EDS 患者の皮膚コラーゲン線維の報告では、1) *COL1A1* 遺伝子または遺伝子の変異が原因である arthrochalasia EDS 患者ではコラーゲン細線維の直径が小さく、大小不同のコラーゲン細線維が存在し、不規則に走行する[29]。2) *COL3A1* 遺伝子の変異が原因である vascular EDS の患者では歪なコラーゲン細線維が存在する[74]。3) *COL5A1* 遺伝子または *COL5A2* 遺伝子の変異が原因である classical EDS の患者では、非常に大きく横断面が歪なコラーゲン細線維の出現や大小不同のコラーゲン細線維が認められる[17, 73, 93, 103]。4) *ADAMTS2* 遺伝子の変異が原因である dermatosparaxis EDS の患者ではリボン状や象形文字様のコラーゲン細線維が認められる[59]。一方、今回検討した mcEDS-*CHST14* の皮膚病理所見では、真皮乳頭層でコラーゲン線維が表皮に対して垂直に走行することに加えて、真皮網状層で不規則に線維の間隙が拡張し、集合不全を生じたコラーゲン細線維がみられるという上記のいずれのタイプの EDS 患者でも認められない特有の皮膚病理所見であった。言い換えれば、今回観察された皮膚病理所見は mcEDS-*CHST14* を診断するうえで基準となりうる。一方、CB 染色による GAG 鎖の形状の変化については病因学的な観点から mcEDS-*CHST14* 特有のものと考えられるが、これらの解析は他のサブタイプで行われておらず、比較できないため推測にとどまる。今後の検討に期待したい。

本章では mcEDS-*CHST14* 患者の真皮の構造と前章で述べた *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの真皮の構造を比較し、動物種間で共通な CHST14 で制御される真皮の構造変化について検討した。両種に共通する所見として、真皮乳頭層のコラーゲン線維の層構造の破綻が挙げられる。すなわち、CHST14 による DS の合成は真皮乳頭層のコラーゲン線維の層構造形成に不可欠と考えられる。対照的に、真皮網状層のコラーゲン細線維は、mcEDS-*CHST14* 患者で CFI の低下とコラーゲン細線維の分散が認められたのに対して、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスではこれらの変化に加えて、コラーゲン細線維の走行も大きく乱れた。この違いはコラーゲン細線維の構造の種間差に大きく依存すると考える。すなわち、ヒトの真皮乳頭層と網状層のコラーゲン細線維は均一な直径を示すが、マウスの真皮のコラーゲン細線維は

乳頭層で均一な直径を示すものの、網状層では大小不同である[9, 40]。このことは真皮網状層のコラーゲン細線維の構築の分子メカニズムがマウスとヒトで異なることを示唆する。以上のことより、マウスの場合はコラーゲン細線維の直径が大きく異なるために GAG 鎖がコラーゲン細線維間を広げるなかで、均一に広がらず配置（走行）を乱すことが真皮網状層の構造の乱れに繋がっていると推測される。

GAG 鎖の形状について、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスと mcEDS-*CHST14* 患者いずれも直線状の GAG 鎖の割合の増加が認められた。しかしながら、曲率については mcEDS-*CHST14* 患者でのみ有意な低下が認められた。GAG 鎖の曲率はコラーゲン細線維の直径にも影響される。GAG 鎖がコラーゲン細線維の辺縁に沿って曲がっていても、直径が大きいコラーゲン細線維に接着している GAG 鎖は、直径が小さいコラーゲン細線維の GAG 鎖より、曲がり具合が弱く、曲率は低い値を示す。実際にマウスの皮膚のコラーゲン細線維は直径の異なるものが混在する[9, 40]。これらのことを考え併せると、*Chst14*<sup>+/+</sup>マウスではコラーゲン細線維の直径の影響で GAG 鎖の曲率の値のばらつきが大きく、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスと有意な差が認められなかったと考えられる。一方で、ヒトの皮膚のコラーゲン細線維は直径がほぼ均一であるため、曲率はコラーゲン細線維の直径の影響を受けず、GAG 鎖の組成の違いが強調されたと考えられる。

## 5. 小括

本章ではデコリンのコアタンパク質の免疫組織化学および TEM での一般電子染色、CB 染色による解析によって、mcEDS-*CHST14* 患者の真皮 ECM 構造を解析した。mcEDS-*CHST14* 患者の真皮の構造の特徴として、1) 真皮乳頭層で小型のコラーゲン線維が表皮に対して垂直に走行すること、2) 真皮網状層で不規則に線維の間隙が拡張し、コラーゲン細線維の集合不全が生じることを見出した。加えて、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスとの比較から、CHST14 遺伝子の変異は曲線状の GAG 鎖を直線化し、コラーゲン細線維の集合不全を種共通で惹起することを明らかにした。以上より、真皮でコラーゲン細線維を高密度に集合させるために必要な DS の曲線状の GAG 鎖は、正常な皮膚を形作るうえで、動物種間で共通な構造であると結論した。

## 第Ⅳ章 真皮のグリコサミノグリカン鎖の立体構造

### 1. 序文

皮膚は表皮と真皮、皮下組織で構成される組織であり、そのうち真皮ではコラーゲンを主体とするコラーゲン線維が多くを占める。コラーゲン線維は多数のコラーゲン細線維が PG であるデコリンにより束ねられ形成される [72, 84, 105]。コラーゲン細線維は約 67 nm 周期 (D 周期) で繰り返すバンドを持ち、このうちの d バンドにデコリンのコアタンパク質が結合し、デコリンの GAG 鎖も d バンドに沿って接着する[75, 77, 85]。

これまでに透過型電子顕微鏡を用いた二次元的な観察や生化学的な実験を基に、コラーゲン細線維と GAG 鎖の位置関係についてモデルが提唱された。Scott [84]は、隣り合うコラーゲン細線維のそれぞれから直線的に伸長した GAG 鎖が平行に重なり合いコラーゲン細線維を束ねると提唱した。一方、Nomura [72]は、コラーゲン細線維周囲に GAG 鎖が巻き付いており、電氣的な力でコラーゲン細線維を束ねると提唱した。近年、超微構造の三次元解析が可能な集束イオン走査電子顕微鏡 (focused ion beam scanning electron microscope : FIB-SEM) を用いた腱構造の観察により、Watanabe ら[105]はリングメッシュモデルを提唱した。このモデルではコラーゲン細線維の d バンドに沿って存在する GAG 鎖のリングが同一平面上に揃って配置し、コラーゲン細線維の全周を取り巻くことで、コラーゲン細線維を束ねるとする。本章ではこのリングメッシュモデルが腱のみならず、真皮でも当てはまるか調べた。また、健常者と mcEDS-*CHST14* 患者の真皮の GAG 鎖の三次元構造解析を行い、真皮で *CHST14* 変異によって生じた GAG 鎖の組成の変化が立体構造にどのように変化をもたらすかをリングメッシュモデルに当てはめて検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) 提供試料

本研究は健常者（11 歳女兒、第Ⅲ章 C3）および mcEDS-*CHST14* 患者（12 歳 男児、第Ⅲ章 P2）の皮膚を用いた。第Ⅲ章で樹脂包埋したサンプルを三次元構造解析に使用した。本研究は信州大学医学部の機関審査委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言の原則に従った。加えて、酪農学園大学の人を対象とする医学系研究倫理委員会により承認され、規程に従い実施した（承認番号：16-4）。

### 2) FIB-SEM 解析

健常者の皮膚を解析に供した。樹脂包埋されたサンプルをカーボンテープとカーボンペーストで試料台に固定し、FIB-SEM（Crossbeam550：Carl Zeiss、Oberkochen、Germany）観察下で解析を行う部位を決定した。観察部位を 10 nm 間隔で切削し、切削した表面を撮影することで連続画像を取得した。連続画像からの立体構築には解析ソフト Image Pro（日本ローパー、東京、日本）を用いた。

### 3) 走査型透過電子顕微鏡（scanning transmission electron microscope：STEM）トモグラフィ解析

健常者および mcEDS-*CHST14* 患者の皮膚を解析に供した。樹脂包埋サンプルからウルトラミクロトームを用いて 200 から 250 nm 厚の超薄切片を作製し、ホルムバール支持膜付きのワンスロットの銅グリッドに載せ、STEM（Titan：FEI、Eindhoven、Netherlands および JEM-F200：JEOL）観察下で解析を行う部位を決定した。観察部位を中心軸に $-70^{\circ}$  から  $70^{\circ}$  の範囲を  $2^{\circ}$  間隔で傾斜角を変えて撮影し、得られた画像データを基に解析ソフト inspect 3D（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を用いて連続断面画像を取得した。連続断面画像からの立体構築には解析ソフト Image Pro を用いた。

### 3. 結果

#### 1) 健常者の真皮 GAG 鎖の FIB-SEM 観察

真皮で GAG 鎖のリングメッシュ構造が存在するか明らかにするため、リングメッシュモデルを提唱した Watanabe ら[105]と同様に FIB-SEM を用いて、健常者の真皮コラーゲン細線維と GAG 鎖の連続画像を取得した。取得した二次元画像からコラーゲン細線維の短軸方向に横断する GAG 鎖と、コラーゲン細線維の側面に点在する GAG 鎖を観察した（図 18）。これらの GAG 鎖はコラーゲン細線維の長軸方向に一定間隔で存在し、この間隔は  $63.84 \pm 9.507$  nm（平均±標準偏差）であり、D 周期とほぼ一致した。加えて、同一箇所を Z 軸方向の連続画像で観察すると、コラーゲン細線維を横断する GAG 鎖の消失する箇所、その側面に点在する GAG 鎖が観察された（図 19 a-h）。またこの点在する GAG 鎖の消失する箇所で再び横断する GAG 鎖が観察されるというパターンが繰り返された（図 19 i-p）。このことから D 周期間隔でコラーゲン細線維の周囲を GAG 鎖が覆っていると考えられる。

次に、隣り合う 2 本のコラーゲン細線維間に存在する GAG 鎖を Z 軸方向の連続画像で観察した。図 20 で示すように、GAG 鎖は 2 本から 1 本に変化し、再び 2 本になることが確認された（図 20）。このことから、近接するコラーゲン細線維間では GAG 鎖の重なりはなく、一本の GAG 鎖を挟んでコラーゲン細線維が位置すると判明した。

続いて、FIB-SEM で得た画像を Watanabe らの方法[105]に従い立体構築した。GAG 鎖はコラーゲン細線維の D 周期間隔の同一平面上にリングメッシュ構造を形成した（図 21）。すなわち、真皮の GAG 鎖も腱で提唱されたリングメッシュモデルと同様の構造をとることが明らかになった。一方で、近接するコラーゲン細線維間の GAG 鎖の配置は、腱のモデルと大きく異なった。

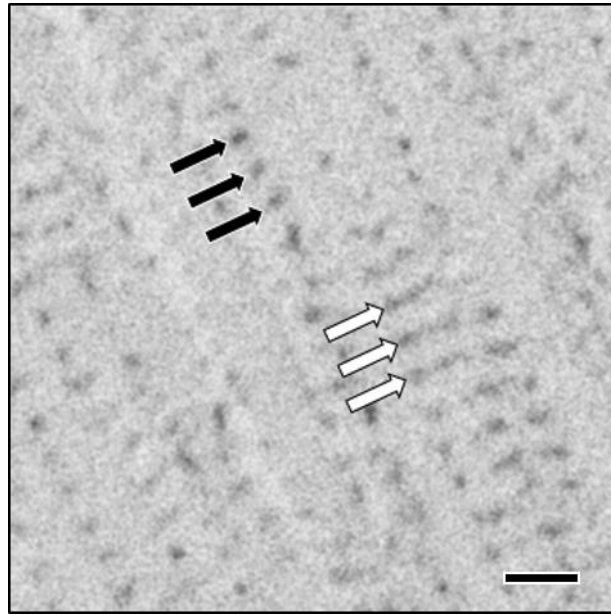


図 18 健常者真皮の GAG 鎖の FIB-SEM 像

白矢印、コラーゲン細線維を横断する GAG 鎖。黒矢印、コラーゲン細線維の側面に点在する GAG 鎖。(Bar=100 nm)



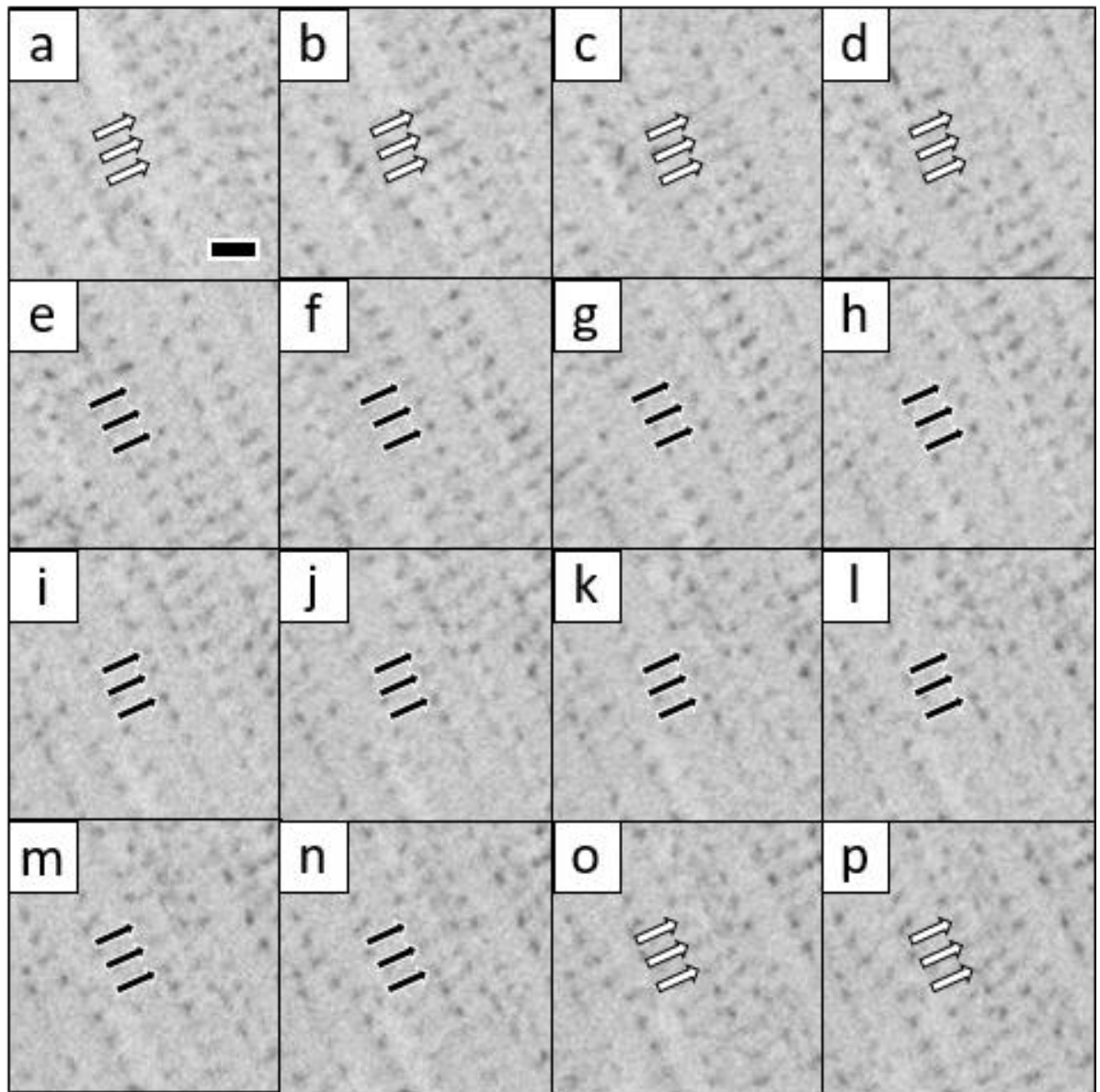


図 19 FIB-SEM で連続撮影した健常者真皮のコラーゲン細線維上の GAG 鎖  
 白矢印、コラーゲン細線維を横断する GAG 鎖。黒矢印、コラーゲン細線維の側  
 面に点在する GAG 鎖。a から p 順で Z 軸方向に深さ 10 nm ずつ連続撮影した。  
 (Bar=100 nm)

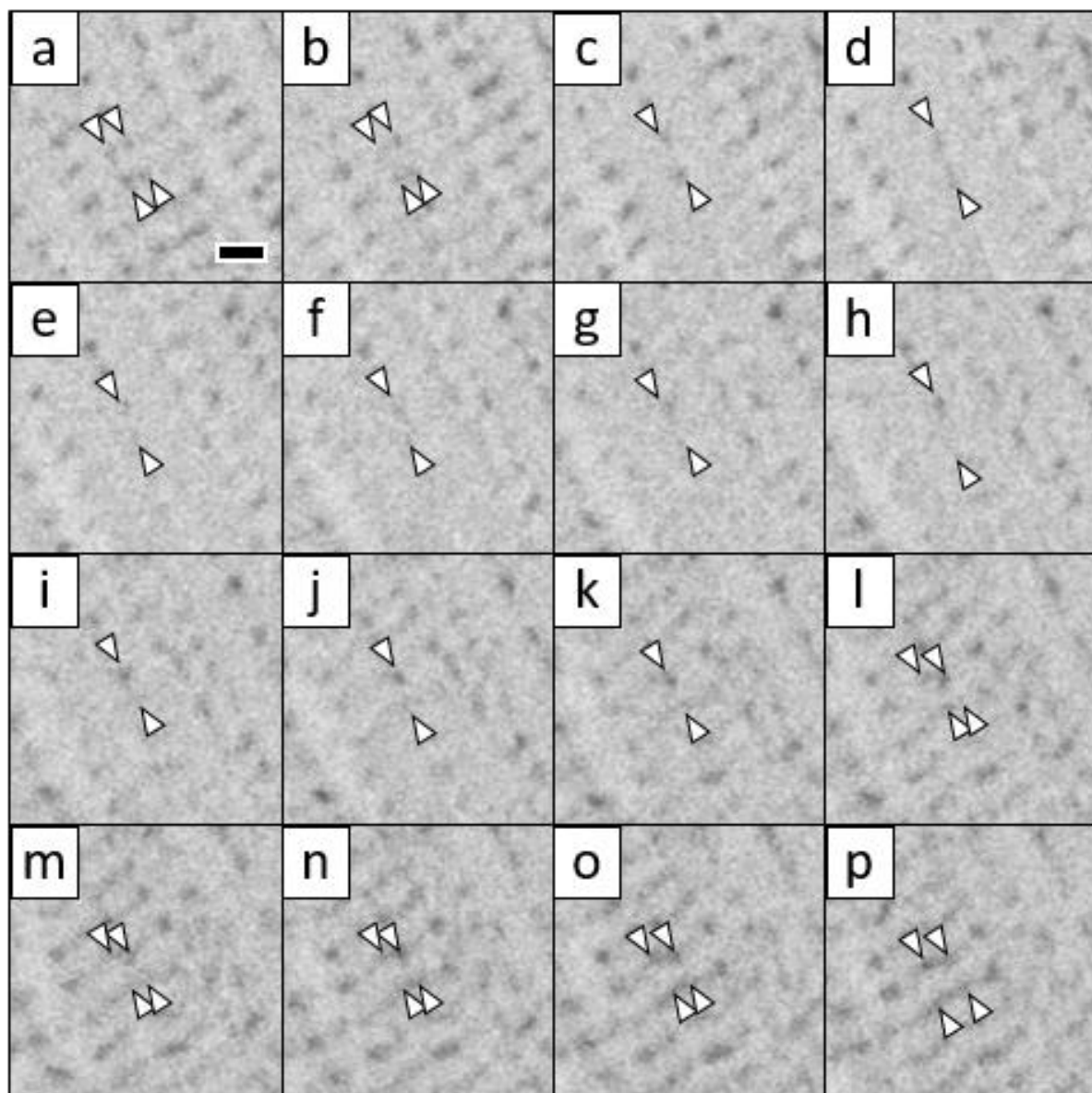


図 20 FIB-SEM で連続撮影した健常者真皮のコラーゲン細線維間の GAG 鎖  
 白矢頭、コラーゲン細線維間の GAG 鎖。a から p 順で Z 軸方向に深さ 10 nm ず  
 つ連続撮影した。(Bar=100 nm)

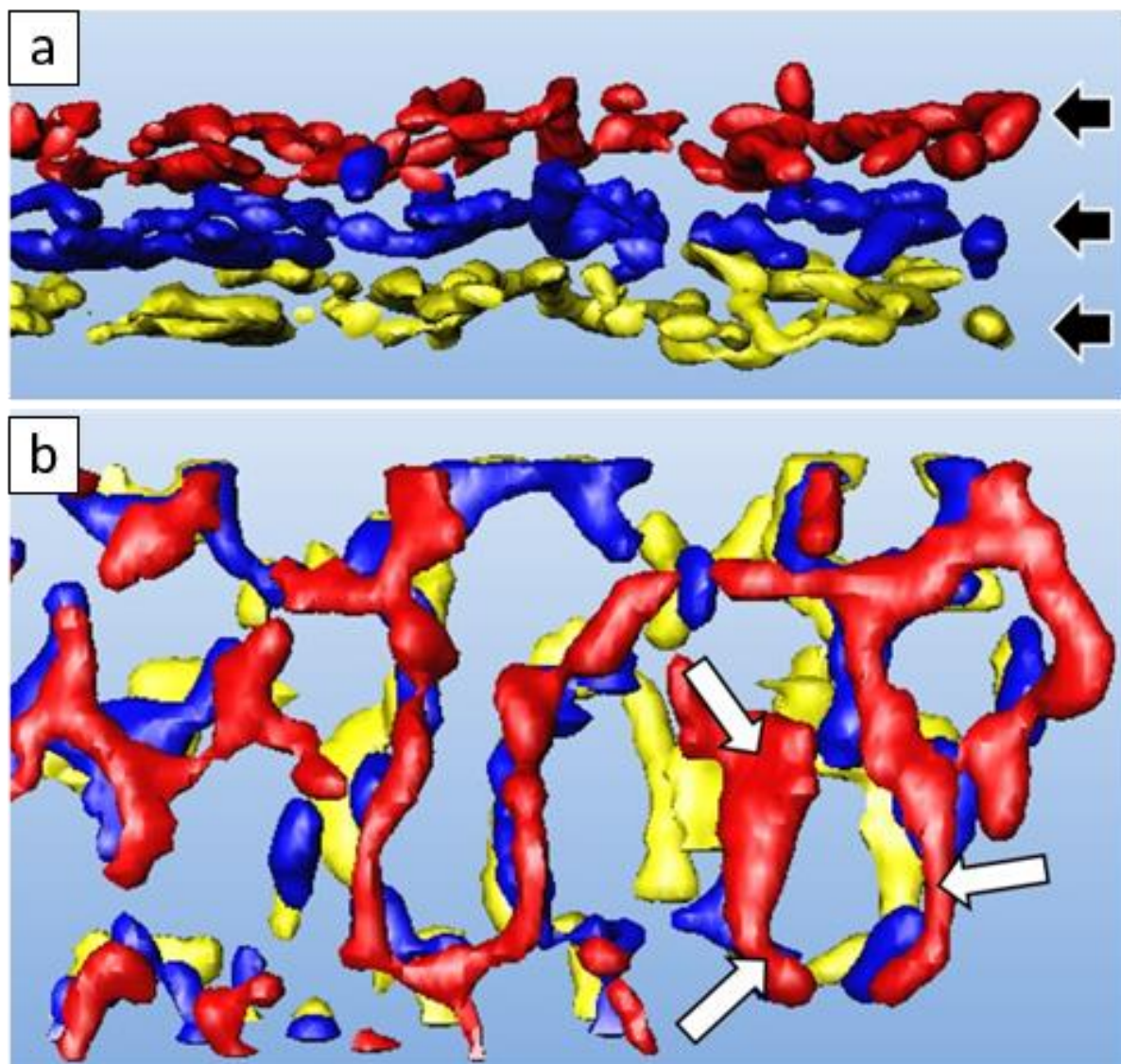


図 21 FIB-SEM 解析による健常者真皮の GAG 鎖の三次元構造

a、コラーゲン細線維縦断方向。b、コラーゲン細線維横断方向。黒矢印、D 周期間隔で存在する同一平面上の GAG 鎖。白矢印、リングメッシュを構築する GAG 鎖。図中の同色（赤、青、黄）の構造は同一平面上に存在する GAG 鎖を示す。

## 2) 健常者および mcEDS-CHST14 患者の真皮 GAG 鎖の STEM トモグラフィー観察

前章で述べたように mcEDS-CHST14 患者では真皮の GAG 鎖に異常が生じる。この変化を STEM トモグラフィー法で再解析した。まず健常者の STEM トモグラフィー法で取得した断面画像では、FIB-SEM の結果と同様に、コラーゲン細線維の短軸方向に横断する GAG 鎖やコラーゲン細線維の側面に点在する GAG 鎖が確認された (図 22 a)。これらの GAG 鎖は mcEDS-CHST14 患者でも認められた (図 22 b)。加えて、健常者と mcEDS-CHST14 患者共に GAG 鎖はコラーゲン細線維の長軸方向に一定間隔で分布し、この間隔は健常者で  $63.46 \pm 6.232$  (平均±標準偏差) nm、mcEDS-CHST14 患者で  $59.86 \pm 5.570$  nm であり、それぞれの D 周期とほぼ一致した。このことから、健常者と mcEDS-CHST14 患者共に D 周期間隔でコラーゲン細線維に GAG 鎖が接着すると判明した。

次に連続画像でコラーゲン細線維と GAG 鎖の構造上の位置関係を調べた。1) の項で述べた FIB-SEM の結果と同様に、健常者の真皮の GAG 鎖はコラーゲン細線維の側面に点在し (図 23 a-d)、この GAG 鎖が消失する箇所で横断する GAG 鎖が出現した (図 23 e-h)。また、健常者の真皮では隣り合う 2 本のコラーゲン細線維間の GAG 鎖が 2 本から 1 本に収れんすると (図 24 a-h)、再び 2 本に分離する (図 24 i-p) というパターンを繰り返した。対照的に mcEDS-CHST14 患者の真皮では隣り合う 2 本のコラーゲン細線維間の GAG 鎖は常に一本のみであり、2 本に分離する像はどの断面でも認められなかった (図 25)。このことから、mcEDS-CHST14 患者の真皮はリングメッシュ構造が破綻していることが判明した。

続いて、連続画像から GAG 鎖を抽出して三次元像を構築した。健常者の皮膚では D 周期間隔でコラーゲン細線維の d バンド平面上に曲線状の GAG 鎖を認めた (図 26 a)。このとき、GAG 鎖が形成するリングに一部間隙があり (図 26 b)、不完全なリングメッシュ構造であった (図 26 c)。一方、mcEDS-CHST14 患者では D 周期間隔でコラーゲン細線維の d バンド平面上に GAG 鎖が認められたものの (図 27 a)、曲線状ではなく直線状の GAG 鎖であり (図 27 b)、リングメッシュ構造が破綻していた (図 27 c)。以上より、mcEDS-CHST14 患者の真皮で見られる直線状の GAG 鎖はリングメッシュ構造の破綻を導くと考えられる。

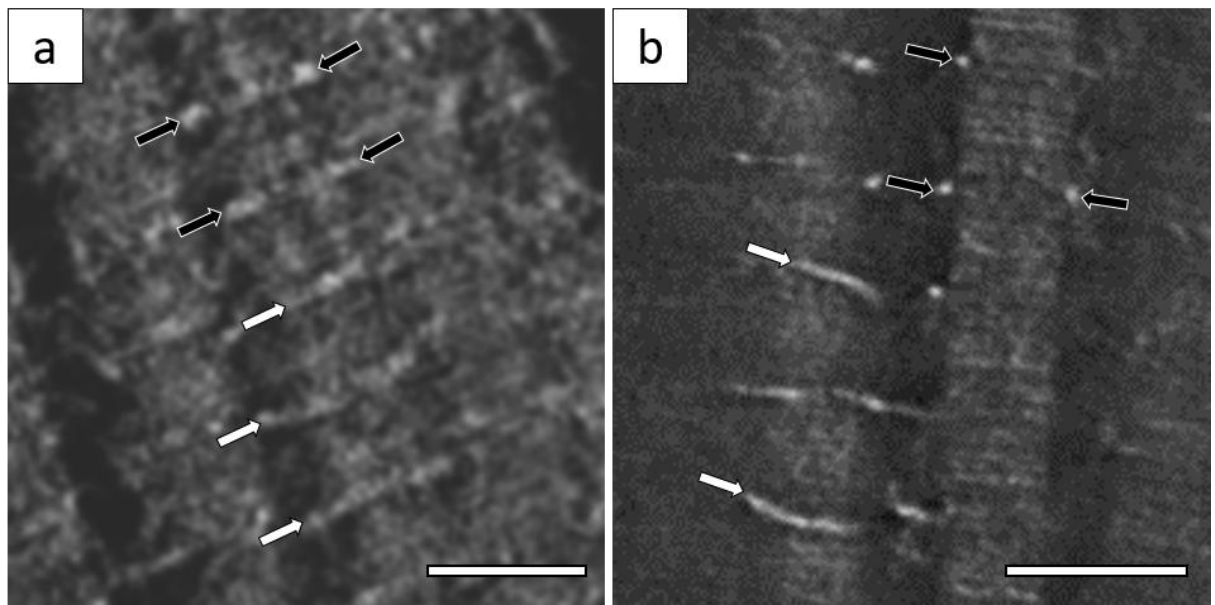


図 22 健常者および mcEDS-*CHST14* 患者真皮の GAG 鎖の STEM トモグラフィー法で取得した断面画像

a、健常者。b、mcEDS-*CHST14* 患者。白矢印、コラーゲン細線維を横断する GAG 鎖。黒矢印、コラーゲン細線維の側面に点在する GAG 鎖。(Bar=100 nm)

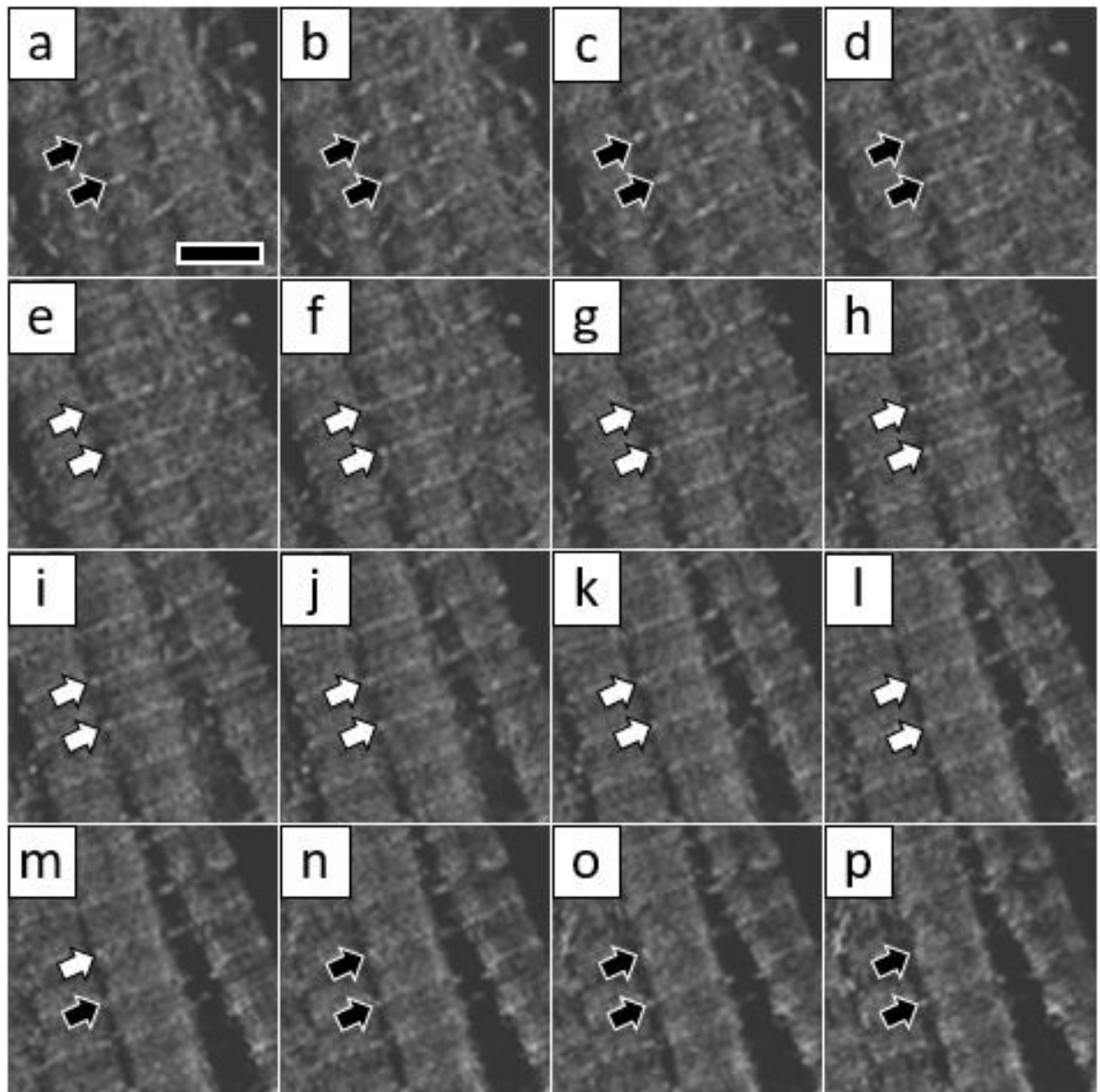


図 23 STEM トモグラフィー法で取得した連続断面画像での健常者真皮のコラーゲン細線維上の GAG 鎖

白矢印、コラーゲン細線維を横断する GAG 鎖。黒矢印、コラーゲン細線維の側面に点在する GAG 鎖。a から p、Z 軸方向に 4.4 nm 間隔の画像を示す。(Bar=100 nm)



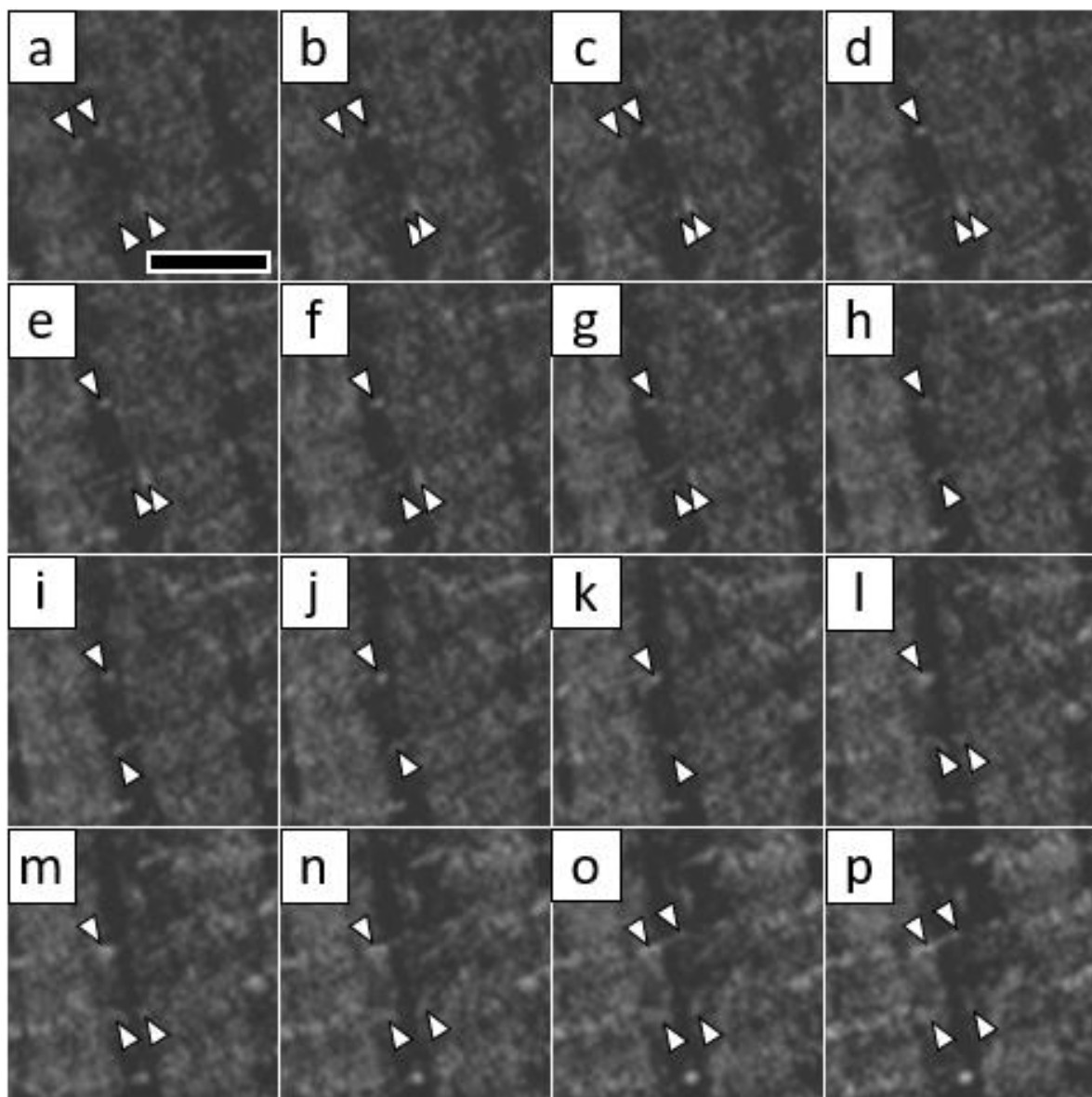


図 24 STEM トモグラフィー法で取得した連続断面画像での健常者真皮のコラーゲン細線維間の GAG 鎖

白矢頭、コラーゲン細線維間の GAG 鎖。a から p、Z 軸方向に 4.4 nm 間隔の画像を示す。(Bar=100 nm)

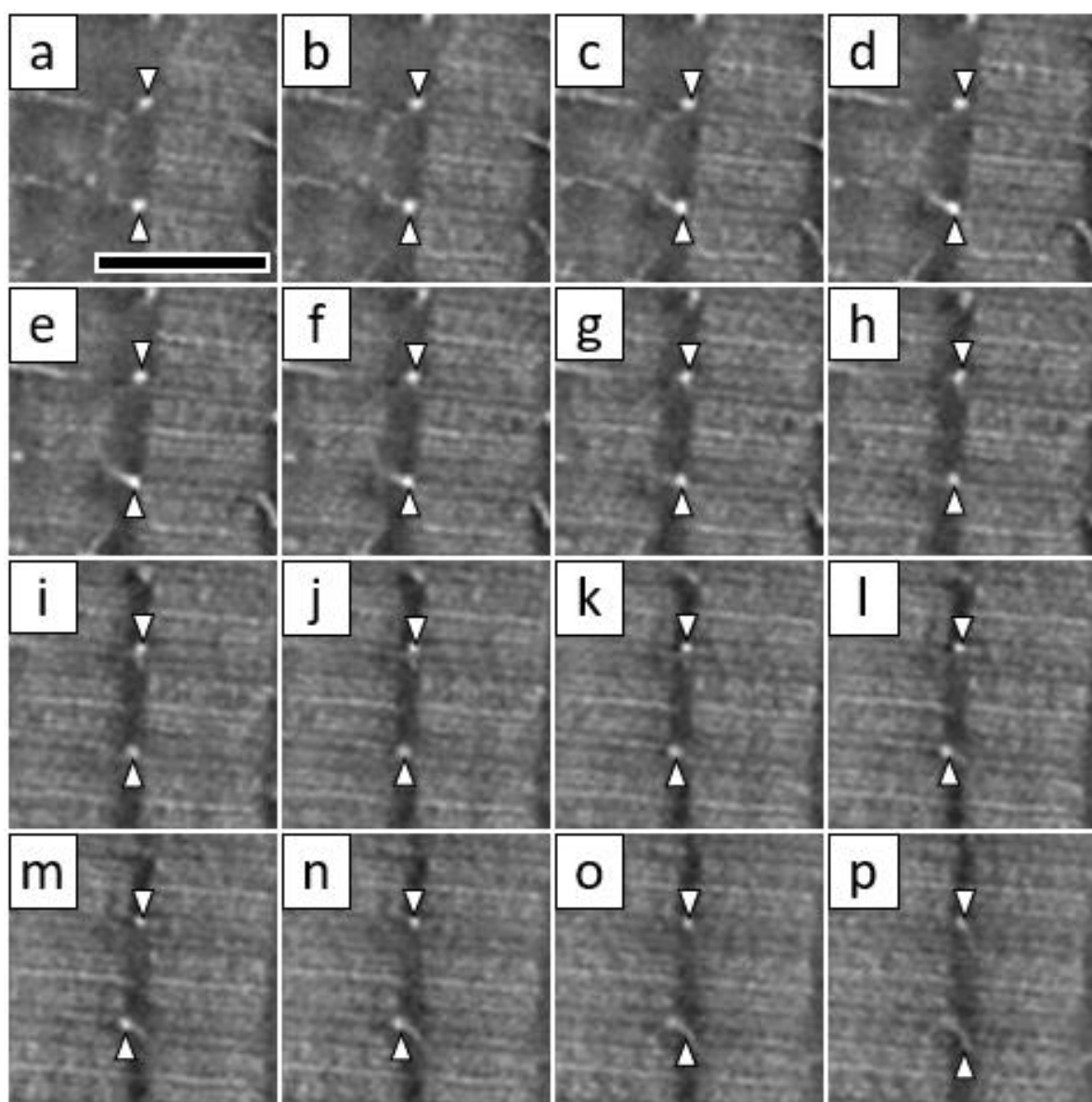


図 25 STEM トモグラフィー法で取得した連続断面画像での mcEDS-*CHST14* 患者真皮のコラーゲン細線維間の GAG 鎖  
 白矢頭、コラーゲン細線維間の GAG 鎖。a から p、Z 軸方向に 4.4 nm 間隔の画像を示す。(Bar=100 nm)



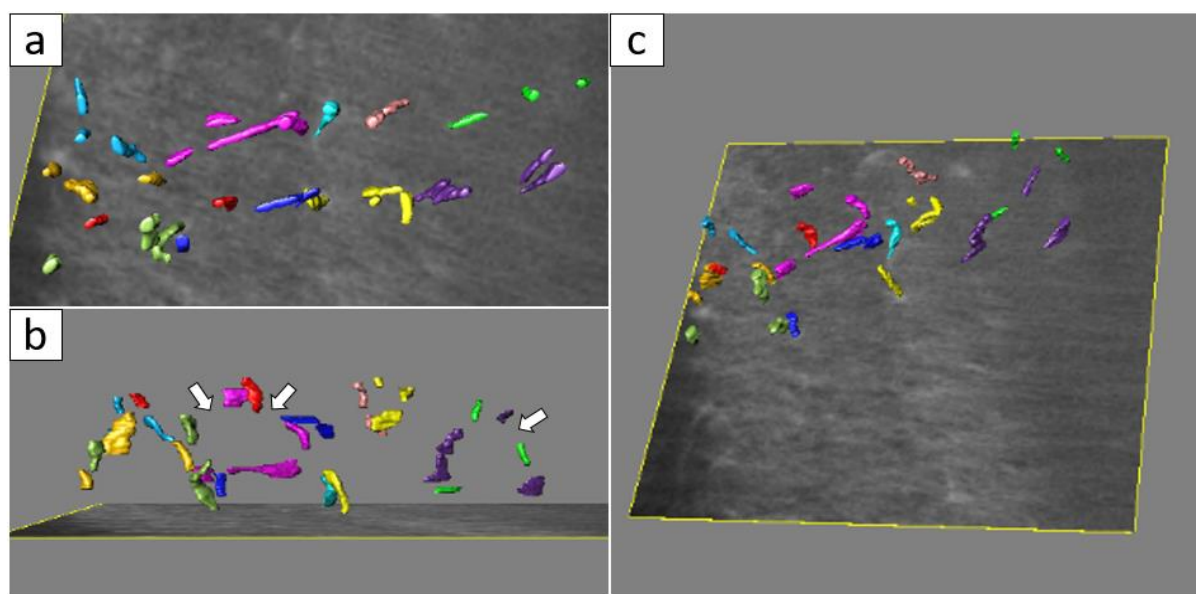


図 26 STEM トモグラフィー解析による健常者真皮の GAG 鎖の三次元構造  
a、コラーゲン細線維縦断方向の立体構築像。b、コラーゲン細線維横断方向の立体構築像。c、斜め方向からの俯瞰図。同一 d バンド上で同一のコラーゲン細線維に接着する GAG 鎖を同色で示す。白矢印、リングメッシュを構成する GAG 鎖の間隙。

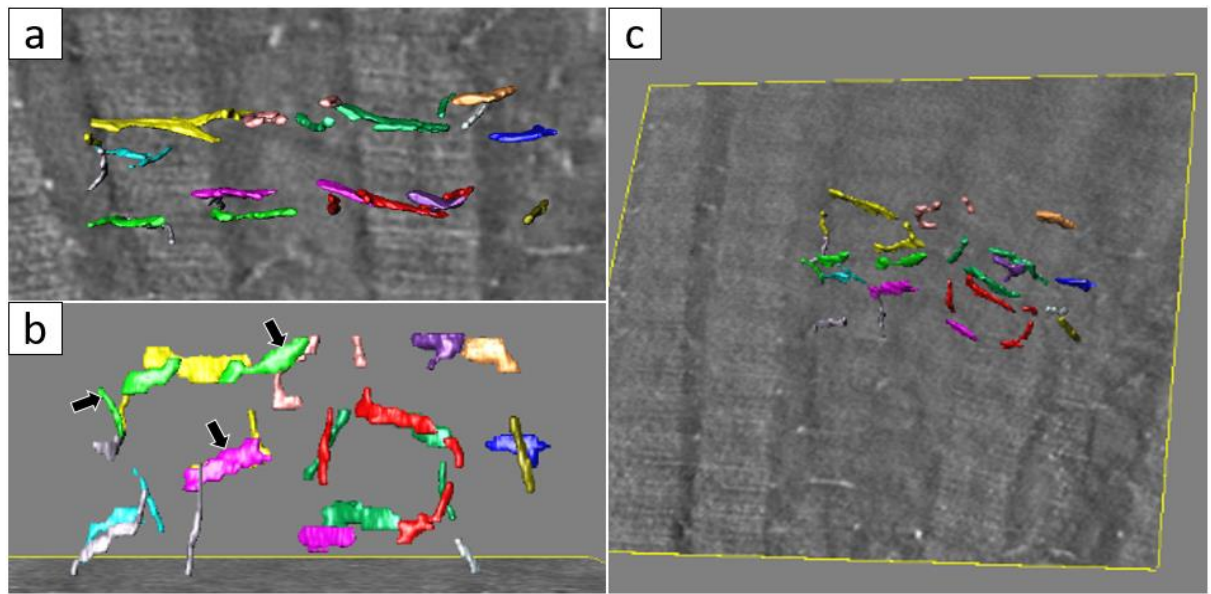


図 27 STEM トモグラフィー解析による mcEDS-*CHST14* 患者真皮の GAG 鎖の立体構築像

a、コラーゲン細線維縦断方向の立体構築像。b、コラーゲン細線維横断方向の立体構築像。c、斜め方向からの俯瞰図。同一 d バンド上で同一のコラーゲン細線維に接着する GAG 鎖を同色で示す。黒矢印、直線状の GAG 鎖。

#### 4. 考察

本章では、臍で提唱された GAG 鎖のリングメッシュモデル[105]が真皮の GAG 鎖の立体構造に適用できるか検討した。今回の FIB-SEM の結果から、臍と同様に、真皮の GAG 鎖でもコラーゲン細線維の全周を取り巻くリングメッシュ構造が認められた。対照的に、STEM トモグラフィーの結果からは真皮の GAG 鎖が形成するリングの一部に間隙を認め、不完全なリングメッシュ構造を成していた。この結果の相違は FIB-SEM と STEM トモグラフィーの Z 軸方向の分解能の差によるものと考えられる。FIB-SEM の Z 軸方向の分解能は 10 nm であるのに対して、STEM トモグラフィーでは 1.1 nm と差が見られる。このため、Z 軸方向に 10 nm 以下の GAG 鎖の間隙が存在した場合、FIB-SEM では間隙を識別できず、GAG 鎖が全周を覆うように観察される (図 28 a 左図)。一方で、STEM トモグラフィーでは間隙を捉えられるため、不完全なリングとして観察される (図 28 b 左図)。したがって、臍でも STEM トモグラフィー法で解析を行えば、GAG 鎖が不完全なリングとして観察される可能性が高い。これらのことから、臍で提唱された GAG 鎖のリングメッシュモデルに対して、今回の STEM トモグラフィーで観察された GAG 鎖の不完全なリングメッシュ構造を GAG 鎖立体構造の新規モデルとして提唱する。

新規モデルの GAG 鎖の間隙については複数のデコリンの GAG 鎖がそれぞれコラーゲン細線維を部分的に覆うことで生じた間隙と考えられる (図 28 b 左図)。コラーゲン細線維とデコリンの結合部については、デコリンのコアタンパク質が d バンド上の 4 つのコラーゲン分子と結合することが知られている[75, 77, 85]。コラーゲン細線維の d バンド上には多数のコラーゲン分子が並ぶため[4]、デコリンとの結合部位は多数存在する。以上のことから、真皮ではコラーゲン細線維の d バンド上に複数のデコリンが結合し、それらの GAG 鎖がそれぞれ部分的に周囲を覆うことでリングを形成すると明らかになった。また、複数のデコリンの GAG 鎖が接着することで様々な方向に存在するコラーゲン細線維の集合に対応すると考えられる。さらには、デコリンの GAG 鎖の長さには多様性があり[72]、これは様々な間隔に存在するコラーゲン細線維の集合に寄与すると考えられる。

今回は FIB-SEM と STEM トモグラフィーの解析から、近接するコラーゲン細線維間では GAG 鎖の重なりがなく、一本の GAG 鎖を挟んでコラーゲン細線維が位置することも明らかになった。このことも新規モデルに反映させ、リングメッシュモデルとの相違点を図 28 に示した。リングメッシュモデルではコラーゲン細線維の全周を GAG 鎖が覆っており、どの箇所を切り取っても常に隣り合うコラーゲン細線維間には GAG 鎖が 2 本存在する（図 28 a）。しかし、今回の結果（図 24）に基づく新規モデルでは、コラーゲン細線維同士が離れている箇所（図 24 a、p、図 28 b 破線 1、3）では二本の GAG 鎖がコラーゲン細線維間に存在する。一方で、コラーゲン細線維同士が接近している箇所（図 24 h-k、図 28 b 破線 2）では、一本の GAG 鎖を挟んでコラーゲン細線維が位置する。GAG 鎖とコラーゲン細線維の位置関係の意義について、リングメッシュモデルを含むこれまでに提唱されたモデルでは GAG 鎖同士が重なり電氣的に引きつけ合う力によって束ねるとされる [72, 84, 105]。しかしながら、デコリンの GAG 鎖の大部分を占めるデルマタン硫酸や少量存在するコンドロイチン硫酸は負に荷電する硫酸基を持つことから[41, 99-100]、GAG 鎖同士の作用だけで説明するのは困難であった。今回の新規モデルではコラーゲン細線維と GAG 鎖の相互作用こそがコラーゲン細線維を束ねる主要な機構であると考えられる。事実、過去の研究では DS と CS はコアタンパク質がない GAG 鎖単体でも、コラーゲン細線維の d バンドに一致して接着することが明らかにされた[79]。加えて、コラーゲン細線維のバンドは疎水性アミノ酸や酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の分布の偏りにより構成される[43]。このアミノ酸の偏在により、d バンドでは局所的に正に荷電と考えられる。これらを考え併せると、正に荷電したコラーゲン細線維の d バンド領域が、負に荷電した GAG 鎖と電氣的に相互作用することでコラーゲン細線維を束ねていると推察される。

McEDS-CHST14 患者の真皮の GAG 鎖は直線状であったためリングメッシュ構造が崩壊していた。健常者の真皮のデコリンの GAG 鎖主成分は DS であるのに対して、mcEDS-CHST14 患者の真皮では CS が主成分である[63, 94]。CS は DS と比べ柔軟性を欠くことから、GAG 鎖の直線化を引き起こし、結果的に曲線状の GAG 鎖が骨格をなすリングメッシュ構造の崩壊に繋がると考えられる。GAG 鎖によるリングメッシュ構造の崩壊は、それが束ねるコラーゲン細線維の集合

を阻害することに繋がることから、mcEDS-*CHST14* 患者の真皮で密度の高いコラーゲン細線維の集合が破綻し、真皮が脆弱になったと推察される。以上より、真皮では DS で構成される GAG 鎖によるリングメッシュ様の新規モデルの構造が密度の高いコラーゲン細線維の集合に不可欠であることが示された。

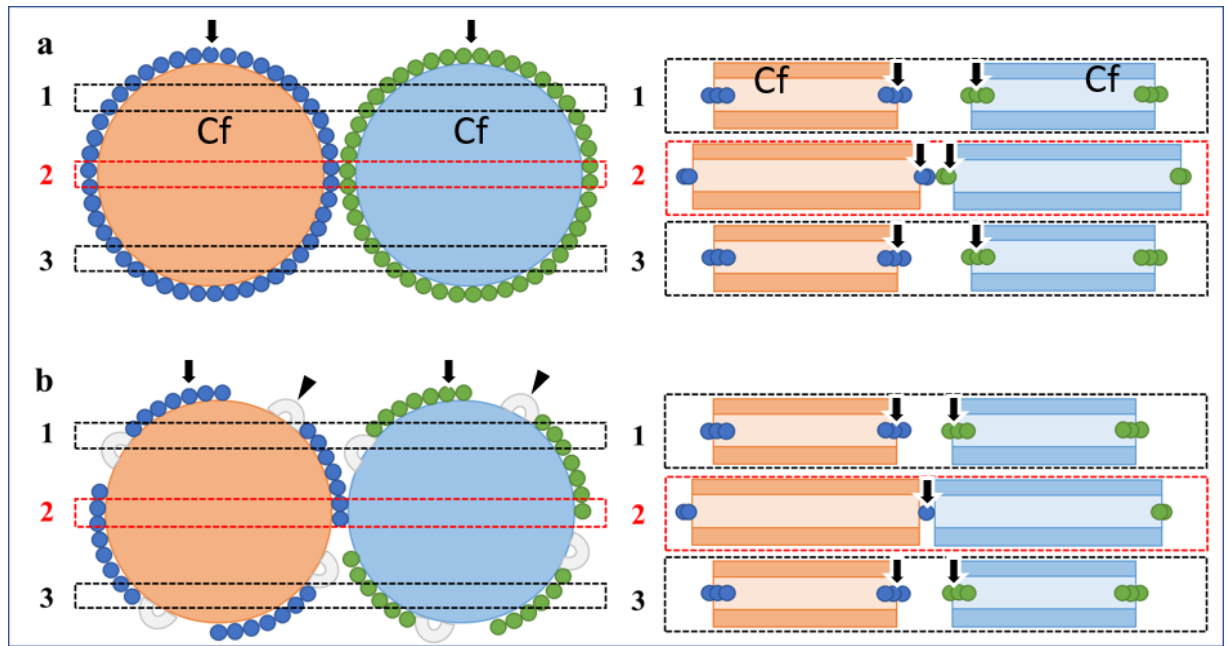


図 28 腱や真皮のコラーゲン細線維と GAG 鎖の位置関係

a、Watanabe らが腱で提唱したコラーゲン細線維と GAG 鎖のリングメッシュモデル[105]。b、今回の結果をもとに構築した真皮 GAG 鎖の新規モデル。左図はコラーゲン細線維の横断面、右図はコラーゲン細線維の縦断面を示す。a、b の左図の破線で囲われた 1 から 3 の領域の縦断面を右図に示す。矢印、GAG 鎖。矢頭、デコリンのコアタンパク質。Cf、コラーゲン細線維。

## 5. 小括

本章では、超微構造の三次元構造解析が可能な FIB-SEM および STEM トモグラフィーを用いて、真皮の GAG 鎖の構造を解析した。STEM トモグラフィー解析により、これまで臍で提唱された GAG 鎖同士の相互作用ではなく、コラーゲン細線維と GAG 鎖の相互作用によって、コラーゲン細線維が束ねられることが明らかになった。加えて、複数の GAG 鎖がコラーゲン細線維を部分的に覆うことでリングメッシュ構造を形成するという GAG 鎖の新たな構造モデルを提唱した。さらに DS が CS に置換されている mcEDS-CHST14 患者の真皮では GAG 鎖が直線的に変化し、リングメッシュ構造が崩れることがコラーゲン細線維の集合不全の原因であることを三次元構造からも明らかにした。以上より、真皮では DS で構成される GAG 鎖によるリングメッシュ様の新規モデルの構造が密度の高いコラーゲン細線維の集合に不可欠であることを示した。

## 総括

本論文は皮膚の脆弱性を示す代表的な疾患である EDS を対象とし、マウスおよびヒトの皮膚組織構造を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて形態学的に解析することで、正常な皮膚組織構造の形成に関する各 ECM の役割を解明したものである。

第 I 章では TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の抑制によりコラーゲンの合成が低下している *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮 ECM 構造を解析した。*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスの真皮は薄く、コラーゲン線維の密度が低下しており、真皮の菲薄化が皮膚の脆弱化の大きな要因であることが示唆された。加えて *Zip13*<sup>-/-</sup>マウスではコラーゲン線維が減少したため、細胞突起の伸長に依存した細胞間距離の維持が抑制された。また、*Zip13*<sup>-/-</sup>マウスでは直径 200 nm 以上のコラーゲン細線維が欠如するとともに、コラーゲン細線維を構成するコラーゲン分子のアミノ酸組成の変化が認められた。これらの変化に起因するコラーゲン分子間架橋の低下がコラーゲン細線維の直径の増大の阻害につながると考えられる。今回の知見により ZIP13 はコラーゲンを構成するアミノ酸組成を決定し、コラーゲン細線維の形態維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

第 II 章ではデコリンの GAG 鎖である DS の合成経路に異常を示す *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの真皮 ECM 構造を解析した。皮膚引張試験によって *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚が力学的に脆弱であることを示した。このとき真皮乳頭層では、正常マウスでは見られない、表皮に対して垂直に走行するコラーゲン線維が確認され、層構造が崩れ、コラーゲン細線維間の密度が低下した。一方、真皮網状層でもコラーゲン線維の形成が不明瞭であり、コラーゲン細線維の密度および走行に異常が認められた。一方、GAG 鎖について調べたところ、直線状の GAG 鎖の一端がコラーゲン細線維と結合し、他方は周囲に突き出すように付着している独自の構造を取ることが観察された。これら今回の知見から D4ST1 の機能不全により引き起こされる GAG 鎖の組成の変化は GAG 鎖の形状の変化をもたらし、コラーゲン細線維の集合を阻害することで、真皮コラーゲン細線維の配置を乱すことが明らかになった。これまでもコラーゲン細線維の集合に GAG 鎖が関与することは知られていたが、今回の知見により、真皮ではデコリンの DS で構成され



る GAG 鎖が密度の高いコラーゲン細線維の集合に不可欠であり、GAG 鎖の組成がコラーゲン細線維の集合を決定づける因子であることが明らかになった。

第Ⅲ章では *CHST14* 遺伝子変異が原因である mcEDS-*CHST14* 患者の真皮 ECM 構造を解析した。mcEDS-*CHST14* 患者に特有の真皮 ECM 構造の特徴として、1) 真皮乳頭層で小型のコラーゲン線維が表皮に対して垂直に走行すること、2) 真皮網状層で不規則に線維の間隙が拡張し、コラーゲン細線維の集合不全が生じることを見出した。ヒト患者は *CHST14* 遺伝子以外の変異も病態に関わる可能性は否定できないが、年齢や性別にかかわらず真皮 ECM 構造に異常が認められたことから、GAG 鎖の構成がコラーゲン細線維の配置を決定する要因となることを示す。加えて、*CHST14* 遺伝子の変異は曲線状の GAG 鎖を直線化し、コラーゲン細線維の集合不全をもたらすことを明らかにした。また、マウスとヒトで共通の構造変化が認められたことから、DS の曲線状の GAG 鎖は種を超えてコラーゲン細線維の集合に必要であることが判明した。

第Ⅳ章では真皮の GAG 鎖の三次元構造を解析した。真皮でも、腱で提唱されたリングメッシュ様の構造は認められた。しかしながら、相違点として、1) GAG 鎖同士の相互作用ではなく、コラーゲン細線維と GAG 鎖の相互作用によって、コラーゲン細線維が束ねられること、2) 複数の GAG 鎖がそれぞれ部分的にコラーゲン細線維を覆うことでリングメッシュ構造を形成することを明らかにし、GAG 鎖の新規モデルを提唱した。さらに mcEDS-*CHST14* 患者の真皮では GAG 鎖が直線的に変化したことによるリングメッシュ構造の破綻がコラーゲン細線維の集合不全の原因であることを明らかにした。以上より、少なくとも真皮では、DS からなる GAG 鎖とコラーゲン細線維の相互作用により生ずるリングメッシュ様の新規モデルの構造がコラーゲン細線維の高密度の集合に貢献していることを明らかにした。

以上のことから、コラーゲン細線維については量的な変化、形態的な変化、配置（走行）の変化が直接的に真皮の強度に関わることが示された。コラーゲン細線維の量的な調整については ZIP13 が仲介する TGF- $\beta$  シグナル経路が決定要因として働き、コラーゲン細線維の形態的な調整については PG やアミノ酸組成が関与していることを明らかにした。配置の調整には PG の GAG 鎖が関与することを明らかにした。さらにコラーゲン細線維の配置は PG の GAG 鎖の種類が大

きく影響することも実証した。特に、真皮では **DS** で構成される **GAG** 鎖によるリングメッシュ構造が密度の高いコラーゲン細線維の形成に不可欠であることが示された。今後は真皮以外の組織で **GAG** 鎖の新規モデルが適用できるか検討し、各組織でコラーゲン細線維の集合と **GAG** 鎖の立体構造の関連が明らかにされることを期待する。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご高閲を賜った酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医組織解剖学ユニットの竹花一成前教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医ウイルス学ユニットの桐澤力雄教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医解剖学ユニットの植田弘美准教授、渡邊敬文准教授ならびに懇切なるご指導賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科実験動物学ユニットの大杉剛生教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医生理学ユニットの北村 浩教授に深く感謝いたします。

解析および論文執筆にあたり多大なるご協力を頂いた徳島文理大学薬学部病態薬理学研究室の深田俊幸教授、信州大学医学部遺伝医学教室の古庄知己教授に深謝いたします。また、解析試料を提供いただいた獨協医科大学医学部皮膚科学講座の旗持淳前教授、東京農工大学農学部硬蛋白質利用研究施設の野村義宏教授、信州大学基盤研究支援センター生命科学分野動物実験支援部門の吉沢隆浩助教に深謝いたします。FIB-SEM および STEM 解析にあたり懇切なるご指導頂いた信州大学基盤研究支援センター機器分析部門の亀谷清和技官に心より感謝いたします。FIB-SEM および STEM 解析にあたりご協力いただいたカールツァイス株式会社、日本電子株式会社、北海道大学ナノテク連携研究推進室に感謝いたします。*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスおよび mcEDS-*CHST14* 患者の解析にあたりご協力いただいた信州大学学術研究院医学系分子病理教室の中山淳教授、信州大学医学部遺伝医学教室の高橋有希博士、東京農工大学農学部硬蛋白質利用研究施設の橋本綾菜院生に感謝いたします。最後に、常時様々な面でご協力いただいた酪農学園大学獣医学群獣医組織解剖学ユニットならびに獣医解剖学ユニットの皆様心より感謝いたします。

本研究は日本医療研究開発機構の難治性疾患実用化研究事業、日本顕微鏡学会の長船記念特別研究奨励金、一般財団法人楓会の助成を受けて実施されました。

## 引用文献

1. Akyuz, N., Rost, S., Mehanna, A., Bian, S., Loers, G., Oezen, I., Mishra, B., Hoffmann, K., Guseva, D., Laczynska, E., Irintchev, A., Jakovcevski, I. and Schachner, M. 2013. Dermatan 4-*O*-sulfotransferase1 ablation accelerates peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **247**: 517-530.
2. Aziz, J., Shezali, H., Radzi, Z., Yahya, N. A., Abu Kassim, N. H., Czernuszka, J. and Rahman, M. T. 2016. Molecular mechanisms of stress-responsive changes in collagen and elastin networks in skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **29**: 190-203.
3. Bavinton, J. H., Peters, D. E. and Ramshaw, J. A. 1985. A morphologic study of a mild form of ovine dermatosparaxis. *J. Invest. Dermatol.* **84**: 391-395.
4. Bertassoni, L. E., Orgel, J. P., Antipova, O. and Swain, M. V. 2012. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* **8**: 2419-2433.
5. Bin, B. H., Fukada, T., Hosaka, T., Yamasaki, S., Ohashi, W., Hojyo, S., Miyai, T., Nishida, K., Yokoyama, S. and Hirano, T. 2011. Biochemical characterization of human ZIP13 protein: A homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J. Biol. Chem.* **286**: 40255-40265.
6. Bin, B. H., Hojyo, S., Hosaka, T., Bhin, J., Kano, H., Miyai, T., Ikeda, M., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Cho, E. G., Fukue, K., Kambe, T., Ohashi, W., Kim, K. H., Seo, J., Choi, D. H., Nam, Y. J., Hwang, D., Fukunaka, A., Fujitani, Y., Yokoyama, S., Superti-Furga, A., Ikegawa, S., Lee, T. R. and Fukada, T. 2014. Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol. Med.* **6**: 1028-1042.
7. Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J. and Linsenmayer, T. F. 1990. Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell Sci.* **95**: 649-657.
8. Border, W. A., Noble, N. A., Yamamoto, T., Harper, J. R., Yamaguchi, Y., Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. 1992. Natural inhibitor of transforming

- growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* **360**: 361-364.
9. Bradshaw, A. D., Puolakkainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J. M., Wight, T. N. and Helene Sage, E. 2003. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 949-955.
  10. Casu, B., Petitou, M., Provasoli, M. and Sinay, P. 1988. Conformational flexibility: A new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 221-225.
  11. Catlow, K. R., Deakin, J. A., Wei, Z., Delehedde, M., Fernig, D. G., Gherardi, E., Gallagher, J. T., Pavao, M. S. and Lyon, M. 2008. Interactions of hepatocyte growth factor/scatter factor with various glycosaminoglycans reveal an important interplay between the presence of iduronate and sulfate density. *J. Biol. Chem.* **283**: 5235-5248.
  12. Chen, F., Guo, R., Itoh, S., Moreno, L., Rosenthal, E., Zappitelli, T., Zirngibl, R. A., Flenniken, A., Cole, W., Grynepas, M., Osborne, L. R., Vogel, W., Adamson, L., Rossant, J. and Aubin, J. E. 2014. First mouse model for combined osteogenesis imperfecta and Ehlers-Danlos syndrome. *J. Bone Miner. Res.* **29**: 1412-1423.
  13. Colige, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D. H., Reardon, W., Byers, P. H., Lapiere, C. M., Prockop, D. J. and Nussgens, B. V. 1999. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 308-317.
  14. Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G., Bianco, P. and Young, M. F. 2002. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* **17**: 1180-1189.

15. Counts, D. F., Knighten, P. and Hegreberg, G. 1977. Biochemical changes in the skin of mink with Ehlers-Danlos syndrome: Increased collagen biosynthesis in the dermis of affected mink. *J. Invest. Dermatol.* **69**: 521-526.
16. Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E. and Iozzo, R. V. 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* **136**: 729-743.
17. De Paepe, A., Nuytinck, L., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I. and Naeyaert, J. M. 1997. Mutations in the *COL5A1* gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 547-554.
18. Deren-Wagemann, I., Kuliszkiewicz-Janus, M. and Schiller, J. 2010. Ehlers-Danlos syndrome. *Adv Clin Exp Med* **19**: 6.
19. Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D. and Worch, H. 2006. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* **7**: 2388-2393.
20. Dundar, M., Kurtoglu, S., Elmas, B., Demiryilmaz, F., Candemir, Z., Ozkul, Y. and Durak, A. C. 2001. A case with adducted thumb and club foot syndrome. *Clin. Dysmorphol.* **10**: 291-293.
21. Dundar, M., Demiryilmaz, F., Demiryilmaz, I., Kumandas, S., Erkilic, K., Kendirci, M., Tuncel, M., Ozyazgan, I. and Tolmie, J. L. 1997. An autosomal recessive adducted thumb-club foot syndrome observed in turkish cousins. *Clin. Genet.* **51**: 61-64.
22. Dundar, M., Muller, T., Zhang, Q., Pan, J., Steinmann, B., Vodopietz, J., Gruber, R., Sonoda, T., Krabichler, B., Utermann, G., Baenziger, J. U., Zhang, L. and Janecke, A. R. 2009. Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 function results in adducted thumb-clubfoot syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **85**: 873-882.
23. Dusanic, M., Dekomien, G., Lucke, T., Vorgerd, M., Weis, J., Epplen, J. T., Kohler, C. and Hoffjan, S. 2018. Novel nonsense mutation in *SLC39A13* initially presenting as myopathy: Case report and review of the literature. *Mol. Syndromol.* **9**: 100-109.
24. Eder, J., Laccone, F., Rohrbach, M., Giunta, C., Aumayr, K., Reichel, C. and

- Trautinger, F. 2013. A new COL3A1 mutation in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Exp. Dermatol.* **22**: 231-234.
25. Evers, M. R., Xia, G., Kang, H. G., Schachner, M. and Baenziger, J. U. 2001. Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **276**: 36344-36353.
  26. Fleischmajer, R., MacDonald, E. D., Perlish, J. S., Burgeson, R. E. and Fisher, L. W. 1990. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J. Struct. Biol.* **105**: 162-169.
  27. Fukada, T. and Kambe, T. 2011. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* **3**: 662-674.
  28. Fukada, T., Civic, N., Furuichi, T., Shimoda, S., Mishima, K., Higashiyama, H., Idaira, Y., Asada, Y., Kitamura, H., Yamasaki, S., Hojyo, S., Nakayama, M., Ohara, O., Koseki, H., Dos Santos, H. G., Bonafe, L., Ha-Vinh, R., Zankl, A., Unger, S., Kraenzlin, M. E., Beckmann, J. S., Saito, I., Rivolta, C., Ikegawa, S., Superti-Furga, A. and Hirano, T. 2008. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* **3**: e3642.
  29. Giunta, C., Chambaz, C., Pedemonte, M., Scapolan, S. and Steinmann, B. 2008. The arthrochalasia type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIIA and VIIB): The diagnostic value of collagen fibril ultrastructure. *Am. J. Med. Genet. A* **146a**: 1341-1346.
  30. Gjaltema, R. A. and Bank, R. A. 2017. Molecular insights into prolyl and lysyl hydroxylation of fibrillar collagens in health and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**: 74-95.
  31. Hansen, N., Foster, S. F., Burrows, A. K., Mackie, J. and Malik, R. 2015. Cutaneous asthenia (Ehlers-Danlos-like syndrome) of burmese cats. *J. Feline Med. Surg.* **17**: 954-963.
  32. Hausser, I. and Anton-Lamprecht, I. 1994. Differential ultrastructural aberrations of collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome types I-IV as a means of diagnostics and classification. *Hum. Genet.* **93**: 394-407.

33. Hirose, T., Ogura, T., Tanaka, K., Minaguchi, J., Yamauchi, T., Fukada, T., Koyama, Y. and Takehana, K. 2015. Comparative study of dermal components and plasma TGF-beta1 levels in *Slc39a13/Zip13*-KO mice. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1385-1389.
34. Hsu, S., Jamieson, A. M. and Blackwell, J. 1994. Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology* **31**: 21-36.
35. Ida, T., Kaku, M., Kitami, M., Terajima, M., Rosales Rocabado, J. M., Akiba, Y., Nagasawa, M., Yamauchi, M. and Uoshima, K. 2018. Extracellular matrix with defective collagen cross-linking affects the differentiation of bone cells. *PLoS One* **13**: e0204306.
36. Iozzo, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 609-652.
37. Janecke, A. R., Unsinn, K., Kreczy, A., Baldissera, I., Gassner, I., Neu, N., Utermann, G. and Muller, T. 2001. Adducted thumb-club foot syndrome in sibs of a consanguineous austrian family. *J. Med. Genet.* **38**: 265-269.
38. Janecke, A. R., Li, B., Boehm, M., Krabichler, B., Rohrbach, M., Muller, T., Fuchs, I., Golas, G., Katagiri, Y., Ziegler, S. G., Gahl, W. A., Wilnai, Y., Zoppi, N., Geller, H. M., Giunta, C., Slavotinek, A. and Steinmann, B. 2016. The phenotype of the musculocontractural type of Ehlers-Danlos syndrome due to *CHST14* mutations. *Am. J. Med. Genet. A* **170a**: 103-115.
39. Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A. and Chapman, J. A. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* **316**: 1-11.
40. 河原栄. 1983. マウス皮膚における細胞外マトリックス構成成分の加齢に伴う超微構造的変化. *金沢大学十全医学会雑誌* **92**: 771-788.
41. Kjellen, L. and Lindahl, U. 1991. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 443-475.
42. Ko, K., Arora, P., Lee, W. and McCulloch, C. 2000. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**: C147-157.



43. 小林邦彦, 星野洸. 1987. コラーゲン分子—生化学と超微形態学をつなぐもの—. *細胞* **19**: 379-383.
44. Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N. W., Silbert, J. E. and Rosenberg, R. D. 1999. Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **274**: 10474-10480.
45. Kono, M., Hasegawa-Murakami, Y., Sugiura, K., Ono, M., Toriyama, K., Miyake, N., Hatamochi, A., Kamei, Y., Kosho, T. and Akiyama, M. 2016. A 45-year-old woman with Ehlers-Danlos syndrome caused by dermatan 4-*O*-sulfotransferase-1 deficiency: Implications for early ageing. *Acta Derm. Venereol.* **96**: 830-831.
46. Kosho, T. 2016. CHST14/D4ST1 deficiency: New form of Ehlers-Danlos syndrome. *Pediatr. Int.* **58**: 88-99.
47. Kosho, T., Mizumoto, S. and Sugahara, K. 2014. Carbohydrate (n-acetylgalactosamine 4-*O*) sulfotransferase 14 (CHST14). pp 1135-1148. *In*: Handbook of glycosyltransferases and related genes, (Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y. and Angata, T., eds.), Springer Japan.
48. Kosho, T., Takahashi, J., Ohashi, H., Nishimura, G., Kato, H. and Fukushima, Y. 2005. Ehlers-Danlos syndrome type VIB with characteristic facies, decreased curvatures of the spinal column, and joint contractures in two unrelated girls. *Am. J. Med. Genet. A* **138a**: 282-287.
49. Kosho, T., Miyake, N., Hatamochi, A., Takahashi, J., Kato, H., Miyahara, T., Igawa, Y., Yasui, H., Ishida, T., Ono, K., Kosuda, T., Inoue, A., Kohyama, M., Hattori, T., Ohashi, H., Nishimura, G., Kawamura, R., Wakui, K., Fukushima, Y. and Matsumoto, N. 2010. A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations. *Am. J. Med. Genet. A* **152a**: 1333-1346.
50. Kuc, I. M. and Scott, P. G. 1997. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect. Tissue Res.* **36**: 287-296.

51. Langevin, H. M., Cornbrooks, C. J. and Taatjes, D. J. 2004. Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochem. Cell Biol.* **122**: 7-15.
52. Li, Y., Liu, Y., Xia, W., Lei, D., Voorhees, J. J. and Fisher, G. J. 2013. Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci. Rep.* **3**: 2422.
53. Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K. and Esko, J. D. 2015. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. pp 207-221. *In: Essentials of glycobiology*, 3rd ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L. and Seeberger, P. H., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
54. Loeys, B. L., Mortier, G. and Dietz, H. C. 2013. Bone lessons from marfan syndrome and related disorders: Fibrillin, TGF- $\beta$  and BMP at the balance of too long and too short. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **10 Suppl 2**: 417-423.
55. Ma, C. and Chegini, N. 1999. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF- $\beta$ 1. *Mol. Hum. Reprod.* **5**: 950-954.
56. Maccarana, M., Olander, B., Malmstrom, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J. P. and Malmstrom, A. 2006. Biosynthesis of dermatan sulfate: Chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J. Biol. Chem.* **281**: 11560-11568.
57. Malfait, F., Syx, D., Vlummens, P., Symoens, S., Nampoothiri, S., Hermanns-Le, T., Van Laer, L. and De Paepe, A. 2010. Musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome (former EDS type VIB) and adducted thumb clubfoot syndrome (ATCS) represent a single clinical entity caused by mutations in the dermatan-4-sulfotransferase 1 encoding *CHST14* gene. *Hum. Mutat.* **31**: 1233-1239.
58. Malfait, F., Symoens, S., Goemans, N., Gyftodimou, Y., Holmberg, E., Lopez-Gonzalez, V., Mortier, G., Nampoothiri, S., Petersen, M. B. and De Paepe, A. 2013. Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome overlap syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**: 78.

59. Malfait, F., Francomano, C., Byers, P., Belmont, J., Berglund, B., Black, J., Bloom, L., Bowen, J. M., Brady, A. F., Burrows, N. P., Castori, M., Cohen, H., Colombi, M., Demirdas, S., De Backer, J., De Paepe, A., Fournel-Gigleux, S., Frank, M., Ghali, N., Giunta, C., Grahame, R., Hakim, A., Jeunemaitre, X., Johnson, D., Juul-Kristensen, B., Kapferer-Seebacher, I., Kazkaz, H., Kosho, T., Lavallee, M. E., Levy, H., Mendoza-Londono, R., Pepin, M., Pope, F. M., Reinstein, E., Robert, L., Rohrbach, M., Sanders, L., Sobey, G. J., Van Damme, T., Vandersteen, A., van Mourik, C., Voermans, N., Wheeldon, N., Zschocke, J. and Tinkle, B. 2017. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **175**: 8-26.
60. Massague, J. and Gomis, R. R. 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* **580**: 2811-2820.
61. Mendoza-Londono, R., Chitayat, D., Kahr, W. H., Hinek, A., Blaser, S., Dupuis, L., Goh, E., Badilla-Porras, R., Howard, A., Mittaz, L., Superti-Furga, A., Unger, S., Nishimura, G. and Bonafe, L. 2012. Extracellular matrix and platelet function in patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in the *CHST14* gene. *Am. J. Med. Genet. A* **158a**: 1344-1354.
62. Mikami, T., Mizumoto, S., Kago, N., Kitagawa, H. and Sugahara, K. 2003. Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: Implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**: 36115-36127.
63. Miyake, N., Kosho, T., Mizumoto, S., Furuichi, T., Hatamochi, A., Nagashima, Y., Arai, E., Takahashi, K., Kawamura, R., Wakui, K., Takahashi, J., Kato, H., Yasui, H., Ishida, T., Ohashi, H., Nishimura, G., Shiina, M., Saitsu, H., Tsurusaki, Y., Doi, H., Fukushima, Y., Ikegawa, S., Yamada, S., Sugahara, K. and Matsumoto, N. 2010. Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mutat.* **31**: 966-974.
64. Miyazono, K., ten Dijke, P. and Heldin, C. H. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* **75**: 115-157.

65. Mizumoto, S., Ikegawa, S. and Sugahara, K. 2013. Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **288**: 10953-10961.
66. Mizumoto, S., Kosho, T., Hatamochi, A., Honda, T., Yamaguchi, T., Okamoto, N., Miyake, N., Yamada, S. and Sugahara, K. 2017. Defect in dermatan sulfate in urine of patients with Ehlers-Danlos syndrome caused by a CHST14/D4ST1 deficiency. *Clin. Biochem.* **50**: 670-677.
67. Mochida, K., Amano, M., Miyake, N., Matsumoto, N., Hatamochi, A. and Kosho, T. 2016. Dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1-deficient Ehlers-Danlos syndrome complicated by a large subcutaneous hematoma on the back. *J. Dermatol.* **43**: 832-833.
68. Munemasa, T., Idaira, Y., Fukada, T., Shimoda, S. and Asada, Y. 2014. Histological analysis of dentinogenesis imperfecta in *Slc39a13/Zip13* knockout mice. *J. Hard Tissue Biol.* **23**: 6.
69. Naylor, E. C., Watson, R. E. and Sherratt, M. J. 2011. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69**: 249-256.
70. Neame, P. J., Kay, C. J., McQuillan, D. J., Beales, M. P. and Hassell, J. R. 2000. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 859-863.
71. Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., Ramirez, F., Sakai, L. Y. and Dietz, H. C. 2003. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in marfan syndrome. *Nat. Genet.* **33**: 407-411.
72. Nomura, Y. 2006. Structural change in decorin with skin aging. *Connect. Tissue Res.* **47**: 249-255.
73. Nuytinck, L., Freund, M., Lagae, L., Pierard, G. E., Hermanns-Le, T. and De Paepe, A. 2000. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1398-1402.
74. Ong, K. T., Plauchu, H., Peyrol, S., Roux, E., Errazuriz, E., Khau Van Kien, P., Arbeille, B., Gaulier, A., Georgescu, G., Collignon, P., Germain, D. P., Gaveau,

- M. N., Perdu, J., Laurent, S., Bruneval, P. and Boutouyrie, P. 2012. Ultrastructural scoring of skin biopsies for diagnosis of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Virchows Arch.* **460**: 637-649.
75. Orgel, J. P., Eid, A., Antipova, O., Bella, J. and Scott, J. E. 2009. Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS One* **4**: e7028.
  76. Park, A. C., Phan, N., Massoudi, D., Liu, Z., Kernien, J. F., Adams, S. M., Davidson, J. M., Birk, D. E., Liu, B. and Greenspan, D. S. 2017. Deficits in *Col5a2* expression result in novel skin and adipose abnormalities and predisposition to aortic aneurysms and dissections. *Am. J. Pathol.* **187**: 2300-2311.
  77. Pringle, G. A. and Dodd, C. M. 1990. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 1405-1411.
  78. Rashmir-Raven, A. 2013. Heritable equine regional dermal asthenia. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **29**: 689-702.
  79. Raspanti, M., Viola, M., Forlino, A., Tenni, R., Gruppi, C. and Tira, M. E. 2008. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils. *J. Struct. Biol.* **164**: 134-139.
  80. Reed, C. C. and Iozzo, R. V. 2002. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* **19**: 249-255.
  81. Rost, S., Akyuz, N., Martinovic, T., Huckhagel, T., Jakovcevski, I. and Schachner, M. 2016. Germline ablation of dermatan-4O-sulfotransferase1 reduces regeneration after mouse spinal cord injury. *Neuroscience* **312**: 74-85.
  82. Ruhland, C., Schonherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R. V., Bruckner, P. and Seidler, D. G. 2007. The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J.* **274**: 4246-4255.
  83. Salchert, K., Oswald, J., Streller, U., Grimmer, M., Herold, N. and Werner, C. 2005. Fibrillar collagen assembled in the presence of glycosaminoglycans to

- constitute bioartificial stem cell niches in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16**: 581-585.
84. Scott, J. E. 1992. Morphometry of cupromeronic blue-stained proteoglycan molecules in animal corneas, versus that of purified proteoglycans stained in vitro, implies that tertiary structures contribute to corneal ultrastructure. *J. Anat.* **180**: 155-164.
  85. Scott, J. E. and Orford, C. R. 1981. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.* **197**: 213-216.
  86. Shimizu, K., Okamoto, N., Miyake, N., Taira, K., Sato, Y., Matsuda, K., Akimaru, N., Ohashi, H., Wakui, K., Fukushima, Y., Matsumoto, N. and Kosho, T. 2011. Delineation of dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am. J. Med. Genet. A* **155a**: 1949-1958.
  87. Silver, F. H., Freeman, J. W. and Seehra, G. P. 2003. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* **36**: 1529-1553.
  88. Sinke, J. D., van Dijk, J. E. and Willemse, T. 1997. A case of Ehlers-Danlos-like syndrome in a rabbit with a review of the disease in other species. *Vet. Q.* **19**: 182-185.
  89. Sonoda, T. and Kouno, K. 2000. Two brothers with distal arthrogryposis, peculiar facial appearance, cleft palate, short stature, hydronephrosis, retentio testis, and normal intelligence: A new type of distal arthrogryposis? *Am. J. Med. Genet.* **91**: 280-285.
  90. Steinmann, B., Gitzelmann, R., Vogel, A., Grant, M. E., Harwood, R. and Sear, C. H. 1975. Ehlers-Danlos syndrome in two siblings with deficient lysyl hydroxylase activity in cultured skin fibroblasts but only mild hydroxylysine deficit in skin. *Helv. Paediatr. Acta* **30**: 255-274.
  91. Stuart, K. and Panitch, A. 2008. Influence of chondroitin sulfate on collagen gel structure and mechanical properties at physiologically relevant levels. *Biopolymers* **89**: 841-851.

92. Stuart, K. and Panitch, A. 2009. Characterization of gels composed of blends of collagen I, collagen III, and chondroitin sulfate. *Biomacromolecules* **10**: 25-31.
93. Symoens, S., Malfait, F., Vlummens, P., Hermanns-Le, T., Syx, D. and De Paepe, A. 2011. A novel splice variant in the N-propeptide of *COL5A1* causes an eds phenotype with severe kyphoscoliosis and eye involvement. *PLoS One* **6**: e20121.
94. Syx, D., Van Damme, T., Symoens, S., Maiburg, M. C., van de Laar, I., Morton, J., Suri, M., Del Campo, M., Hausser, I., Hermanns-Le, T., De Paepe, A. and Malfait, F. 2015. Genetic heterogeneity and clinical variability in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by impaired dermatan sulfate biosynthesis. *Hum. Mutat.* **36**: 535-547.
95. Taga, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K. and Hattori, S. 2014. Highly accurate quantification of hydroxyproline-containing peptides in blood using a protease digest of stable isotope-labeled collagen. *J. Agric. Food Chem.* **62**: 12096-12102.
96. Tajima, M., Miyake, S., Takehana, K., Kobayashi, A., Yamato, O. and Maede, Y. 1999. Gene defect of dermatan sulfate proteoglycan of cattle affected with a variant form of Ehlers-Danlos syndrome. *J. Vet. Intern. Med.* **13**: 202-205.
97. Takahashi, N., Tangkawattana, P., Ootomo, Y., Hirose, T., Minaguchi, J., Ueda, H., Yamada, M. and Takehana, K. 2017. Morphometric analysis of growing tenocytes in the superficial digital flexor tendon of piglets. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1960-1967.
98. Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W. Y., Martin, F., Grant, D., Solloway, M., Parker, L., Ye, W., Forrest, W., Ghilardi, N., Oravec, T., Platt, K. A., Rice, D. S., Hansen, G. M., Abuin, A., Eberhart, D. E., Godowski, P., Holt, K. H., Peterson, A., Zambrowicz, B. P. and de Sauvage, F. J. 2010. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat. Biotechnol.* **28**: 749-755.
99. Thelin, M. A., Bartolini, B., Axelsson, J., Gustafsson, R., Tykesson, E., Pera, E., Oldberg, A., Maccarana, M. and Malmstrom, A. 2013. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J.* **280**: 2431-2446.
100. Trowbridge, J. M. and Gallo, R. L. 2002. Dermatan sulfate: New functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* **12**: 117r-125r.

101. Uri, M., Verin, R., Ressel, L., Buckley, L. and McEwan, N. 2015. Ehlers-Danlos syndrome associated with fatal spontaneous vascular rupture in a dog. *J. Comp. Pathol.* **152**: 211-216.
102. Voermans, N. C., Kempers, M., Lammens, M., van Alfen, N., Janssen, M. C., Bonnemann, C., van Engelen, B. G. and Hamel, B. C. 2012. Myopathy in a 20-year-old female patient with D4ST-1 deficient Ehlers-Danlos syndrome due to a homozygous *CHST14* mutation. *Am. J. Med. Genet. A* **158a**: 850-855.
103. Vogel, A., Holbrook, K. A., Steinmann, B., Gitzelmann, R. and Byers, P. H. 1979. Abnormal collagen fibril structure in the gravis form (type I) of Ehlers-Danlos syndrome. *Lab. Invest.* **40**: 201-206.
104. Watanabe, T., Hosaka, Y., Yamamoto, E., Ueda, H., Sugawara, K., Takahashi, H. and Takehana, K. 2005. Control of the collagen fibril diameter in the equine superficial digital flexor tendon in horses by decorin. *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 855-860.
105. Watanabe, T., Kametani, K., Koyama, Y. I., Suzuki, D., Imamura, Y., Takehana, K. and Hiramatsu, K. 2016. Ring-mesh model of proteoglycan glycosaminoglycan chains in tendon based on three-dimensional reconstruction by focused ion beam scanning electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **291**: 23704-23708.
106. Winters, K. A., Jiang, Z., Xu, W., Li, S., Ammous, Z., Jayakar, P. and Wierenga, K. J. 2012. Re-assigned diagnosis of D4ST1-deficient Ehlers-Danlos syndrome (adducted thumb-clubfoot syndrome) after initial diagnosis of marden-walker syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **158a**: 2935-2940.
107. Yasui, H., Adachi, Y., Minami, T., Ishida, T., Kato, Y. and Imai, K. 2003. Combination therapy of DDAVP and conjugated estrogens for a recurrent large subcutaneous hematoma in Ehlers-Danlos syndrome. *Am. J. Hematol.* **72**: 71-72.
108. Yoshizawa, T., Mizumoto, S., Takahashi, Y., Shimada, S., Sugahara, K., Nakayama, J., Takeda, S., Nomura, Y., Nitahara-Kasahara, Y., Okada, T., Matsumoto, K., Yamada, S. and Kosho, T. 2018. Vascular abnormalities in the placenta of *Chst14*<sup>-/-</sup> fetuses: Implications in the pathophysiology of perinatal



lethality of the murine model and vascular lesions in human CHST14/D4ST1 deficiency. *Glycobiology* **28**: 80-89.

# Ultrastructural study of the extracellular matrix in the dermis

Takuya Hirose

Veterinary Medicine, Doctoral Course, Graduate School of Veterinary Medicine, Rakuno  
Gakuen University Graduate School

In this study, I investigated the skin structures of mice and humans by morphological analysis using light and electron microscopy, targeting Ehlers–Danlos syndrome (EDS), a representative disease involving skin fragility. I revealed the role of each extracellular matrix (ECM) component in the formation of a normal skin structure.

As described in chapter I, I analyzed the dermal structure of *Slc39a13/Zip13*-knockout (*Zip13*<sup>-/-</sup>) mice, whose collagen synthesis is reduced by suppressing the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling pathway. The dermis of *Zip13*<sup>-/-</sup> mice was thin and the density of collagen fibers was reduced. It was suggested that thinning of the dermis is a major factor in the fragility of the skin. In addition, since collagen fibers decreased in *Zip13*<sup>-/-</sup> mice, maintenance of cell-to-cell distance dependent on elongation of cell processes was suppressed. Moreover, collagen fibrils with a diameter of 200 nm or more were lost in *Zip13*<sup>-/-</sup> mice and the amino acid composition of collagen molecules was changed. It was suggested that the reduction of collagen molecular crosslinking led to inhibition of collagen fibril growth. In this study, I revealed that ZIP13 not only promotes the synthesis of collagen but is also related to maintaining the amino acid composition of collagen molecules through the TGF- $\beta$  signaling pathway. In addition, I revealed that ZIP13 plays an important role in maintaining the shape of collagen fibrils.

As described in chapter II, I also analyzed the dermal structure of *Chst14*-knockout (*Chst14*<sup>-/-</sup>) mice. These mice show abnormality in the synthetic pathway of dermatan sulfate (DS) which is the decorin glycosaminoglycan (GAG) chain. A skin tensile test showed that the skin of *Chst14*<sup>-/-</sup> mice was mechanically weak. In the papillary dermis, collagen fibers running perpendicular to the epidermis, which are not shown in normal mice, were confirmed. Moreover, collapse of the layered structure and a decrease in the density of collagen fibrils were observed.

In the reticular dermis, formation of collagen fibers was unclear, and abnormality was found in the density and running of the collagen fibrils. In addition, a unique structure was observed in which the linear GAG chains bonded to the collagen fibrils and protruded into around space. In this study, it was revealed that the change in the composition of GAG chains caused by the dysfunction of *CHST14* resulted in the change in the shape of GAG chains, disturbing the normal arrangement of dermal collagen fibrils by inhibiting their assembly. Therefore, in the dermis, the decorin GAG chain composed of DS is indispensable for the assembly of dense collagen fibrils, and it became clear that the composition of the GAG chain is a factor that determines the assembly of collagen fibrils.

As described in chapter III, the dermal structure in patients with musculocontractural Ehlers–Danlos syndrome caused by *CHST14* mutation (mcEDS-*CHST14*) was analyzed. The dermal structure of mcEDS-*CHST14* patients includes 1) small collagen fibers running perpendicular to the epidermis in the papillary dermis, and 2) irregular extension of the spaces among collagen fibrils and the failure of collagen fibril assembly in the reticular dermis. Furthermore, comparison with *Chst14*<sup>−/−</sup> mice revealed that linearization of the GAG chains caused by *CHST14* mutation and failure of collagen fibril assembly were shared between these species. Therefore, it was concluded that the curved GAG chain composed of DS, which is indispensable for the assembly of high-density collagen fibrils in the dermis, is a common structure among animal species for the formation of normal skin.

Chapter IV describes analysis of the three-dimensional structure of the GAG chains in the dermis. Even in the dermis, a ring mesh structure advocated with tendons was observed. However, as differences from the ring mesh model, 1) collagen fibrils were bundled not by interaction between GAG chains, but by interaction between collagen fibrils and GAG chains in the dermis; and 2) multiple GAG chains partially covered the collagen fibrils and formed a ring mesh-like structure. Accordingly, based on these points, I proposed a novel model of dermal GAG chains. Furthermore, in the dermis of an mcEDS-*CHST14* patient with GAG chains composed of CS, it was also revealed in the three-dimensional structure that the failure of collagen fibril assembly is due to collapse of the ring mesh-like structure caused by linearization of the GAG chain. Therefore, in the dermis, it was shown that the ring mesh-like

structure with curved GAG chains composed of DS is indispensable for the assembly of dense collagen fibrils.

In conclusion, it was shown that the quantitative change, morphological change, and arrangement (running) of collagen fibrils are directly related to the strength of the dermis. Regarding the quantitative adjustment of collagen fibrils, it became clear that the TGF- $\beta$  signaling pathway mediated by ZIP13 acts as a determinant of this, and proteoglycan (PG) and amino acid compositions are involved in the morphological regulation of collagen fibrils. In addition, regarding the adjustment of the arrangement of collagen fibrils, it was demonstrated that the composition of GAG chains of PG has a large effect. In the future, it would be investigated whether a novel model of GAG chain can be applied in tissues other than the dermis, and the association between the assembly of collagen fibrils and the three-dimensional structure of GAG chains would be clarified in each tissue.