

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 広瀬 拓哉

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 桐澤 力雄（獣医ウイルス学）

副査 教授 北村 浩（獣医生理学）

副査 教授 大杉 剛生（実験動物学）

副査 准教授 渡邊 敬文（獣医解剖学）

## 学位論文要旨

### 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

獣医解剖学 広瀬 拓哉

本論文は皮膚の脆弱性を示す代表的な疾患であるエーラス・ダンロス症候群 (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細胞外マトリックス (ECM) の役割を解明したものである。

第 I 章では transforming growth factor (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 *Slc39a13/Zip13*-knockout (*Zip13*-K0) マウスの真皮 ECM 構造を解析した。*Zip13*-K0 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と示唆された。加えて、*Zip13*-K0 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*-K0 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。このことからコラーゲン分子間架橋の低下がコラーゲン細線維の成長の阻害につながると考えられた。本研究により ZIP13 は TGF- $\beta$  シグナル伝達経路を介して、単にコラーゲンの合成を促すだけでなく、コラーゲンを構成するアミノ酸組成の調整に関与し、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が明らかになった。

第 II 章ではデコリンのグリコサミノグリカン (GAG) 鎖であるデルマタン硫酸 (DS) の合成経路に異常を示す, carbohydrate sulfotransferase 14 (*CHST14*) 遺伝子の K0 マウス (*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が示された。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、層構造の崩れとコラーゲン細線維の密度の低下が認められた。さらに、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。加えて、GAG 鎖について調べたところ

ろ、直線状の GAG 鎖の一端がコラーゲン細線維と結合し、他方の周囲に突き出すように付着している独自の構造が観察された。本研究から CHST14 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。したがって、真皮では Decorin 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と明らかになった。

第 III 章では *CHST14* 遺伝子の変異が原因の musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome (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。さらに *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスとの比較から、*CHST14* 遺伝子の変異は 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、真皮で高い密度のコラーゲン細線維の集合に不可欠な 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づけた。

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、真皮では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、真皮 GAG 鎖の新規モデルを提唱した。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三次元構造からも明らかにした。したがって、真皮では DS で構成された曲線状の 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集合に不可欠であることを示した。

以上より、コラーゲン細線維の量的な変化、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プロテオグリカン (PG) やアミノ酸組成が関与していることを明らかにした。コラーゲン細線維の配置の調整については PG の GAG 鎖の種類が大きく影響することを実証した。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。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

### 論文の概要について

皮膚の力学的な強度を保つ真皮の超微細構造の解明を目的としている。研究は真皮の形成異常によって皮膚の脆弱性を示す代表的な疾患であるエーラス・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome : EDS) を対象とし、真皮の大部分を占める細胞外マトリックス (ECM) の合成の低下、および真皮の基本構成単位であるコラーゲン細線維を規則正しく配列させるグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の合成に異常を起こした組織の形態学的解析によって、正常な真皮組織構造の形成に関する各 ECM の役割を考察したものである。また、GAG 鎖については新規の三次元立体構造モデルの構築を行った。

### 研究の背景と目的

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、皮下組織からなる。真皮の ECM の大半を占めるコラーゲン線維はコラーゲン細線維の集合により形成され皮膚の力学的な耐性を担っている。コラーゲン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。

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 EDS がある。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各 ECM の果たす役割を調べた。

EDS は原因や症状などから様々なサブタイプに分類され、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が、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、ECM の合成を促進させる TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に異常を示す Zip13-knockout マウスの真皮 ECM 構造を解析することで、亜鉛トランスポーターである ZIP13 を介した 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。

次に、真皮 ECM の主な非線維成分であるデコリンに着目した。デコリンの GAG 鎖は真皮ではデルマタン硫酸 (DS) となるが、DS の合成経路の異常によりコンドロイチン硫酸が合成される Chst14-knockout マウスおよび mcEDS-CHST14 患者の皮膚を解析することで、DS がコラーゲン細線維を規則正しく配列させる仕組みを透過型電子顕微鏡により解析した。

GAG 鎖は透過型電子顕微鏡観察による平面情報を基にして種々の立体構造モデルが議論されてきたが明確なモデルは確立されていない。そこで、GAG 鎖の形状の変化を走査透過型電子顕微鏡を用いて解析し、正常な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。

## 研究の成果

第 I 章では TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の抑制により ECM 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、コラーゲン細線維の直径の増大も阻害されていた。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 がコンドロイチン硫酸に置換される 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。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確認され、層構造が崩れ、コラーゲン細線維の密度が低下した。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、コンドロイチン硫酸に置換された GAG 鎖は直線状の 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。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を明らかにした。

第 III 章では CHST14 遺伝子の変異が原因である mcEDS-CHST14 患者の真皮 ECM 構造を解析した。mcEDS-CHST14 患者はマウスと同様な真皮 ECM 構造に異常が認められ、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を明らかにした。

第 IV 章では真皮の GAG 鎖の三次元構造を解析した。真皮では、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、新たに 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。

## 研究の評価

本研究は、真皮の ECM における超微形態学的特徴と、各 ECM が担う物理的特性を解明するために、正常検体と EDS 検体を対象として電子顕微鏡を中心とした手法によって比較解析した独創性の高い研究である。コラーゲン細線維の量的な調整については ZIP13 を介した TGF- $\beta$  シグナル伝達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デコリンやアミノ酸組成が関与していることを明らかにした。合成されたコラーゲン細線維の配列はデコリンの GAG 鎖が関与し、GAG 鎖を形成する糖鎖は DS が重要であることも実証した。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集合体の形成に不可欠であることが最新の電子顕微鏡技術を用いた解析により詳細に示されている。且つ、新たなリングメッシュモデルの提唱は極めて新規性の高い成果であると考えられる。これらの成績は真皮以外の ECM 成分を多く含む組織で適用できることを示唆しており、各組織におけるコラーゲン細線維の集合と GAG 鎖の立体構造の関連と、この構造が破綻したことによって誘導される疾患のメカニズムが明らか

にされることを期待する。

#### 学位論文の一部を公表した論文

1. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1385-1389. 2015.
2. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863:623-631. 2019.

以上のことから、広瀬 拓哉 氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2019年 2月13日

#### 審査委員

副査	教授	桐澤	力雄
副査	教授	北村	浩
副査	教授	大杉	剛生
副査	准教授	渡邊	敬文