

# 主論文

## Collagen XVIII Deposition in the Basement Membrane Zone beneath the Newly Forming Epidermis during Wound Healing in Mice

(マウスの皮膚創傷治癒において XVIII 型コラーゲンは再上皮化した表皮の基底膜領域に発現する)

### 【緒言】

IV 型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、パーレカンなどの細胞外マトリックスで構成される基底膜は、様々な細胞に存在する。表皮基底膜は真皮-表皮間の接着、細胞の増殖・移動・分化などに関与し、皮膚創傷治癒に影響を及ぼす。IV 型コラーゲンには 6 つの  $\alpha$  鎖があり、表皮基底膜には  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$  鎖が存在する。IV 型コラーゲン分子のメッシュ構造は、他の基底膜成分にとっての足場となる。ラミニンは組織特異的なヘテロ 3 量体分子で、ラミニン-332 は創傷直後から創部に発現してケラチノサイトの接着・移動を制御する。ラミニン-332 遺伝子の突然変異は、表皮水疱症の原因となる。パーレカンとニドゲンは、ラミニンと IV 型コラーゲンなどを架橋している。

これらに加えてヘパラン硫酸プロテオグリカンである XVIII 型コラーゲンは、様々な基底膜に広く存在する。XVIII 型コラーゲンには short、medium、long の 3 つのアイソフォームがあり、それぞれの N 末端非コラーゲン (NC) ドメインは長さが異なるが、コラーゲンと C 末端 NC-1 ドメインを共有する。NC-1 ドメインのエンドスタチン (ES) は、抗血管新生作用と抗腫瘍形成活性を有している。ヒトの COL18A1 遺伝子の突然変異によるノブロック症候群は、重度の眼球異常や後頭骨欠損を来す。この眼の異常は short アイソフォームの欠損に関連することが知られているが、各アイソフォームの機能については未解明なことが多い。

皮膚では、表皮基底膜に全てのアイソフォームがあり、血管と筋肉には short アイソフォームのみ存在する。Seppinen らは、ES トランスジェニックマウス (tg) での皮膚創傷治癒の遅れと、XVIII 型コラーゲン欠損 (Col18a1<sup>-/-</sup>) マウスでの血管新生増加と創収縮を報告している。しかし、皮膚創傷治癒に関して、各アイソフォームの発現パターンと機能は不明である。

げっ歯類の皮膚創傷は急速に創収縮するが、スプリントモデルを用いることで収縮を最小限に抑えるためヒトの創傷治癒をよく模倣する。本研究では、スプリントモデルで創傷治癒における表皮基底膜領域での XVIII 型コラーゲンの時空間的発現を調べた。

### 【材料と方法】

#### 動物実験

8 週齢のオス C57BL/6J マウスの背部を除毛後、直径 8mm の全層皮膚欠損を作成した。皮膚欠損部をシリコン製スプリントで固定し、フィルムドレッシング剤で保護した。皮膚欠損作成後の 3、6、9 日目にそれぞれ 3 匹ずつから組織を採取し、OCT に包埋した。

#### 組織実験

凍結切片 (8 $\mu$ m) をヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色した。免疫組織染色は、凍結切片 (8 $\mu$ m) を XVIII 型コラーゲンの全てのアイソフォームに対する抗体 (All-18)、medium と long アイソフォーム両方に対する抗体 (Medium/Long-18)、IV 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖に対する抗体、パーレカンに対する抗体、ラミニン-332 に対する抗体、ニドゲン-1 に対する抗体、サイトケラチン 14 に対する抗体を一次抗体に用いて二重染色を行った。組織を蛍光顕微鏡で撮影し、創部中央における再上皮化の長さ・創の長さ・免疫染色の陽性反応の長さを Image J ソフトウェアで計測した。再上皮化の長さは、創の境界からの表皮の長さとし、創の長さは創の境界の間の長さとした。

#### 透過電子顕微鏡 (TEM)

3、6 日目の組織を固定後、Spurr 樹脂に包埋して超薄切片を作製した。超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

## リアルタイム PCR

ステンレスビーズで創傷組織を破砕後に total RNA を抽出・精製し、逆転写酵素で cDNA を合成した。RT-qPCR はサイバークリーン法で行った。XVIII 型コラーゲンの short, medium, long 各アイソフォームの相対 RNA レベルは、Gapdh で値を補正して  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法により算出した。

## 統計解析

統計解析は対応のない t 検定で行い、0.05 未満の P 値を有意とみなした。

## 【結果】

### マウス皮膚創傷治癒における組織形態

まず、マウスの皮膚創傷治癒モデルを検証するため、3、6、9 日目の創中央部の切片で HE 染色を行い、再上皮化の長さや創の長さを計測した。創の長さは徐々に短くなり、9 日目で 0 日目の約 50% となった。再上皮化の長さは徐々に長くなって 6 日目に創の 50% に達し、9 日目に完全に上皮化した。次に、TEM で創部の表皮基底膜の超微細構造を観察した。3 日目の創部ではヘミデスモソームの下に不連続なラミナデンサを認めた。6 日目では創の境界に近い領域でラミナデンサは正常構造であったが、境界から遠い領域では不連続であった。また、両日とも、創の境界から遠い領域で表皮基底層の下にフィブリンが観察された。

### 再上皮化部位での XVIII 型コラーゲンの発現

再上皮化部位の基底膜タンパク質の分布を調べるため、免疫組織染色を行った。XVIII 型コラーゲンを表皮と血管の基底膜に認めた。3、6 日目の新しく形成された表皮ではサイトケラチン 14 が陽性であり、XVIII 型コラーゲンとラミニン-332 は新しく形成された表皮基底膜領域で共局在していた。

次に、新たに形成された表皮基底膜領域での XVIII 型コラーゲン、ラミニン-332 の時空間的発現と、IV 型コラーゲン  $\alpha 1$ 、ニドゲン-1、パーレカンとを免疫組織染色の陽性シグナルの長さで比較した。XVIII 型コラーゲンとラミニン-332 の陽性シグナルの長さが再上皮化領域に一致するのでこれらを比較の対照とした。新たに形成された表皮基底膜領域で IV 型コラーゲン  $\alpha 1$  とニドゲン-1 は 3 日目では検出されず 6 日目では検出されたが、統計学的有意差はなかった。同様にパーレカンの長さは両日ともに統計学的有意差はなかった。

### XVIII 型コラーゲンの各アイソフォームの発現

XVIII 型コラーゲンの各アイソフォームの発現パターンの違いを免疫組織染色で調べた。正常皮膚で、Medium/Long-18 が表皮基底膜では検出されたが血管基底膜では検出されなかった。新しく形成された表皮基底膜領域で Medium/Long-18 は All-18 よりも、3 日目と 6 日目とも有意に短かった。つまり、short アイソフォームは、新たに形成された表皮基底膜領域に創傷治癒初期から発現していた。

また、3 日目の創部の XVIII 型コラーゲンの各アイソフォームの mRNA を、リアルタイム RT-PCR により 0 日目の創部の mRNA と比較した。short アイソフォームの相対 mRNA レベルは増加傾向だったが、統計学的有意差はなかった。medium と long アイソフォームの相対的 mRNA は変化が少なく、統計学的有意差はなかった。

## 【考察】

表皮基底膜形成過程における細胞外マトリックスの時空間的発現パターンは、ラミニン-332 が IV 型コラーゲン、パーレカン、ニドゲンなどよりも先に発現することが知られている。今回、XVIII 型コラーゲンが創傷治癒初期からケラチンサイトと同じ速さで表皮基底膜領域に発現し、ラミニン-332 と共局在することを示した。さらに、All-18 が新しく形成される表皮基底膜領域に初期から発現するのに対して、medium/long アイソフォームが遅れて発現することを示した。3 日目に short アイソフォームの mRNA が増加傾向だったが、medium と long アイソフォームの mRNA はあまり変化しなかった。これらより、XVIII 型コラーゲン short アイソフォームがラミニン-332 と同じように、新しく形成される表皮基底膜領域に創傷治癒初期から発現することを示した。

TEM では、3 日目に未成熟のヘミデスモソームの下にラミナデンサが不連続に形成され、6 日目の創の境界から近い領域では正常となった。この基底膜の超微細構造変化は、以前に報告のあったコラーゲン上層の表皮細胞の培養モデルと一致している。本実験の免疫組織染色の結果では、表皮基底膜領域での IV 型コラーゲン  $\alpha 1$  とニドゲン-1 が、3 日目では発現せず 6 日目で発現を認めた。IV 型コラーゲンがラミナデンサの主成分であることから、TEM で観察されたラミナデンサの形成過程と免疫組織染色で観察された IV 型コラーゲン  $\alpha 1$  とニドゲン-1 の発現パターンが対応すると考えられる。これらから、XVIII 型コラーゲン short アイソフォームが再上皮化中の表皮基底膜領域に、基底膜完成前に発現していると考えられる。また、Seppinen らが *Col18a1*<sup>-/-</sup> および ES-tg マウスにおいて、TEM で表皮基底膜のラミナデンサの肥厚と肉芽組織中の血管の異常を報告している。基底膜の超微細構造と創傷治癒との関係において、XVIII 型コラーゲンの重要性が示唆される。

組織中の基底膜において、short アイソフォームの ES ドメインは基底膜側に配向されることが示されている。しかし、創傷治癒において表皮基底膜におけるアイソフォーム特異的な配向性と機能は同定されていない。皮膚創傷治癒における基底膜の動的構築は、損傷した皮膚を修復するために重要であるが、XVIII 型コラーゲンの配向性が基底膜構造の維持やその生理学的機能にとって重要である可能性がある。

これらの結果は、XVIII 型コラーゲンが再上皮化中の表皮基底膜の形成において重要な役割を果たすことを示唆する。

## 【結論】

XVIII 型コラーゲンの short アイソフォームは、マウスの皮膚創傷治癒において再上皮化で新たに形成される表皮基底膜領域に創傷治癒初期から発現する。