



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation
Author(s)	西村, 真智子
Description	配架番号 : 2225
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12121号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12121
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61654
Type	doctoral thesis
File Information	Machiko_Nishimura.pdf



学位論文

Extracellular cleavage of collagen XVII is
essential for correct cutaneous basement
membrane formation

(17 型コラーゲンの細胞外領域での切断は
正常な基底膜構築に不可欠である)

2016 年 3 月

北海道大学

西村 真智子

学位論文

Extracellular cleavage of collagen XVII is
essential for correct cutaneous basement
membrane formation

(17 型コラーゲンの細胞外領域での切断は
正常な基底膜構築に不可欠である)

2016 年 3 月

北海道大学

西村 真智子

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	12 頁
実験方法	13 頁
実験結果	32 頁
考察	51 頁
総括および結論	54 頁
謝辞	55 頁
引用文献	56 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Machiko Nishimura, Wataru Nishie, Yoshinori Shirafuji, Satoru Shinkuma, Ken Natsuga, Hideki Nakamura, Daisuke Sawamura, Keiji Iwatsuki, Hiroshi Shimizu

Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation

Hum. Mol. Genet. 25, 328-39 (2016).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Machiko Nishimura, Wataru Nishie, Yoshinori Shirafuji, Satoru Shinkuma, Ken Natsuga, Hideki Nakamura, Daisuke Sawamura, Keiji Iwatsuki, Hiroshi Shimizu

Essential role of collagen XVII in basement membrane formation and keratinocyte migration

International Investigative Dermatology, Edinburgh, U.K., May 8th, 2013

緒言

皮膚は人体最大の組織である。外界と直接接し、物理化学的な刺激や外来抗原から生体を守っている。この役割を果たすため、表皮は様々な細胞外基質タンパク(extracellular matrix, ECM)を介して真皮と結合している一方で、表皮基底細胞は常に基底膜から解離し分化増殖している。基底膜は細胞外基質の一部であり、表皮基底細胞を真皮の結合組織と結合させている¹。中間径フィラメントであるケラチン、マイクロフィラメントであるアクチンは、それぞれヘミデスモゾーム、フォーカルコンタクトを介して基底細胞の細胞膜と結合している²。そしてこれらの部位を介して接着、解離が制御されている。このうちヘミデスモゾームはインテグリン $\alpha 6$ 、インテグリン $\beta 4$ 、17 型コラーゲン(type XVII collagen, COL17)、CD151、プレクチン、BP230 で構成される接着装置である^{1,3}。ヘミデスモゾームを構成するタンパクの遺伝子異常により表皮水疱症(epidermolysis bullosa, EB)を発症することからも、ヘミデスモゾームが表皮真皮境界部の接着装置として重要な役割を果たしていることがわかる⁴⁻⁶。

COL17 について

COL17 はアミノ末端(amino terminus, N 末端)が細胞質内、カルボキシル末端(carboxyl terminus, C 末端)が ECM に存在する 2 型膜貫通タンパクである^{7,8}。COL17 をコードする *COL17A1* の遺伝子異常によりヒトでは接合部型表皮水疱症(junctional EB, JEB)を発症し⁴、マウスでも同様の症状を発症することが報告されている⁹。さらに、COL17 に自己抗体が結合し炎症が惹起された結果、表皮と真皮の接着が解離し、表皮下水疱が生じる自己免疫性表皮水疱症は水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid, BP)として知られている^{10,11}(図 1)。これらの遺伝性および自己免疫性の水疱症は、COL17 が表皮真皮間の結合に重要な分子であることを示唆している。

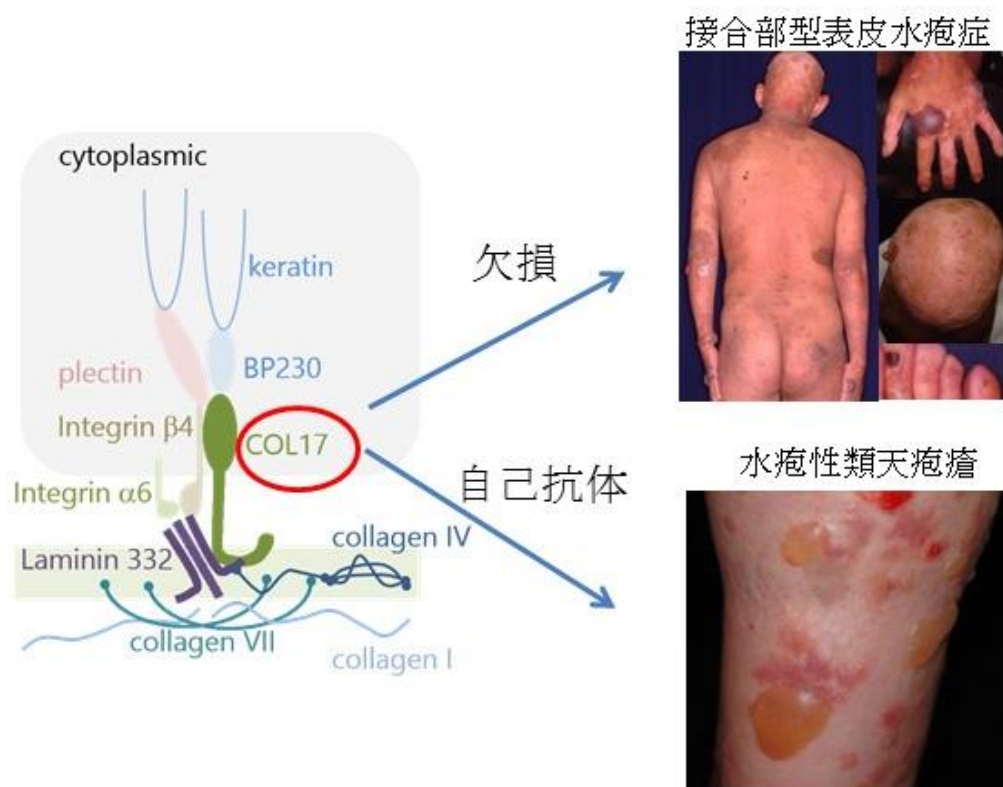


図 1

COL17 はヘミデスモゾーム構成タンパクの 1 つである。COL17 を先天的に欠損すると接合部型表皮水疱症を発症し、COL17 に対する自己抗体ができると水疱性類天疱瘡を発症する。

COL17 は分子量 180kDa で 1497 アミノ酸のポリペプチドが 3 本会合したホモ三量体である¹²。COL17 の 120kDa 細胞外領域は non-collagenous 16A (NC16A) 領域で ADAM9/10,17 などにより生理的に切断されて生じることが知られている^{10,13,14} (図 2)。さらに COL17 の C 末端から 23kDa 上流で 97kDa に切断されることも報告されている¹⁵。COL17 の細胞外領域での切断の生理的な意義は明らかになっていないが、表皮基底細胞の遊走に関与していると推測されている¹⁶。

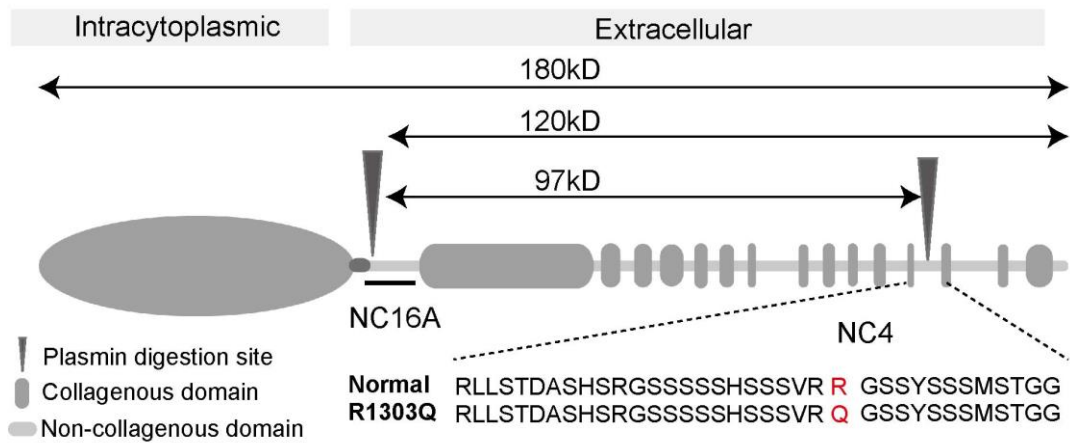
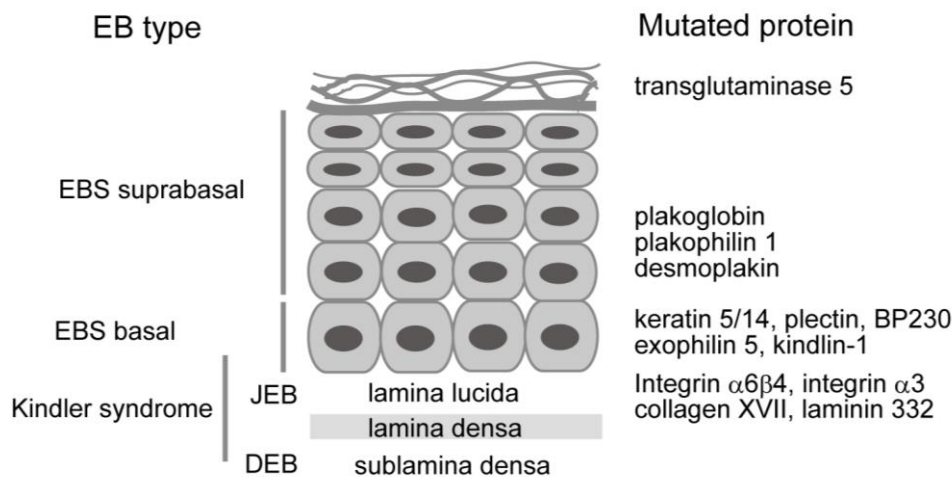


図 2 COL17 の模式図

COL17 は NC16A 領域で切断をうけて 120kD の断片となり、さらに NC4 領域付近の C 末端で切断を受けると 97kD の断片になる。

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa, EB)について

EBは先天的に皮膚が脆弱であり、わずかな外力により全身、特に機械的刺激を受けやすい部位に水疱、びらん、潰瘍を形成する。2014年の国際分類では裂隙の形成部位により大きく単純型 (epidermolysis bullosa simplex, EBS)、接合部型 (junctional epidermolysis bullosa, JEB)、栄養障害型 (dystrophic epidermolysis bullosa, DEB)、混合型であるキンドラー症候群 (kindler syndrome, KS) の4型に大分類されている¹⁷ (図3)。基底膜を構成する分子をコードする様々な遺伝子変異により発症する (図3)。診断確定のためには患者皮膚の採取が必須であり、蛍光抗体直接法でタンパクレベルでの異常を同定し、さらに必要に応じて電子顕微鏡で裂隙形成部位を調べ、最終的に遺伝子変異を同定して診断する。



Level of skin cleavage	Major EB type	Major EB subtype
Intraepidermal	EBS	Suprabasal EBS
		Basal EBS
Intralamina lucida	JEB	JEB, generalized
		JEB, localized
Sublamina densa	DEB	DDEB
		RDEB
Mixed	Kindler syndrome	

図3 表皮水疱症の分類

COL17 に変異をもつ JEB について

JEB はラミニン 332、COL17、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ 等のタンパクの異常により発症する。さらに変異の部位により、大きく臨床症状が変わることが知られ、図 4 のように JEB は細分化されている。本研究では、2014 年の EB 分類最新版で稀なバリエーションとして追加された JEB, late onset (JEB-LO) に注目した。

Major JEB subtype		Usual level of Blister formation	Targeted protein(s)	Protein staining pattern
JEB, generalized	JEB, generalized severe	Intra-LL	Laminin 332	Absent or markedly reduced
	JEB, generalized intermediate	Intra-LL	laminin 332 Colalgen XVII	Reduced
	JEB with pyloric atresia	Intra-LL	Integrin $\alpha 6\beta 4$	Absent or reduced
	JEB, late onset (JEB-LO)	Intra-LL or no apparent blistering	Collagen XVII	Reduced or positive but with abnormal pattern
	JEB with respiratory and renal involvement	Intra-LL	Integrin $\alpha 3$ Subunit	Absent or normal
JEB, localized	JEB, localized	Intra-LL	Collagen XVII Integrin $\alpha 6/\beta 4$ Laminin 332	Absent or reduced Reduced Reduced
	JEB, inversa	Intra-LL	Laminin 332	Reduced
	JEB-LOC syndrome	No blistering	Laminin 332, Isoform $\alpha 3$ chain	Normal

図 4

接合部型表皮水疱症 (junctional epidermolysis bullosa, JEB) の分類

JEB-LO について

JEB-LO は *COL17A1* に c.3908.G>A, p.R1303Q 変異をホモで有する接合部型表皮水疱症患者（R1303Q 患者）で、特徴的な臨床症状、検査所見を呈することが知られている¹⁸⁻²²。出生時に診断される他の EB とは異なり、JEB-LO の診断年齢は幼少期から思春期までと幅広い。加齢とともに進行する多型皮膚萎縮、萎縮性皮膚、四肢末端の線維化を特徴とする（図 5）。



図 5 臨床像

（上）症例 1 （下）症例 2

症例 1，2 ともに手指先端は線維化による硬化を反映して皮膚が白色に変化している。後頸部には多型皮膚萎縮がみられる。→は生検部位を示す

本病型に注目した理由として、基底膜構成タンパクの重層化があげられる（図 6）。電子顕微鏡での微細構造の観察でも基底膜の重層化を確認した（図 7）。

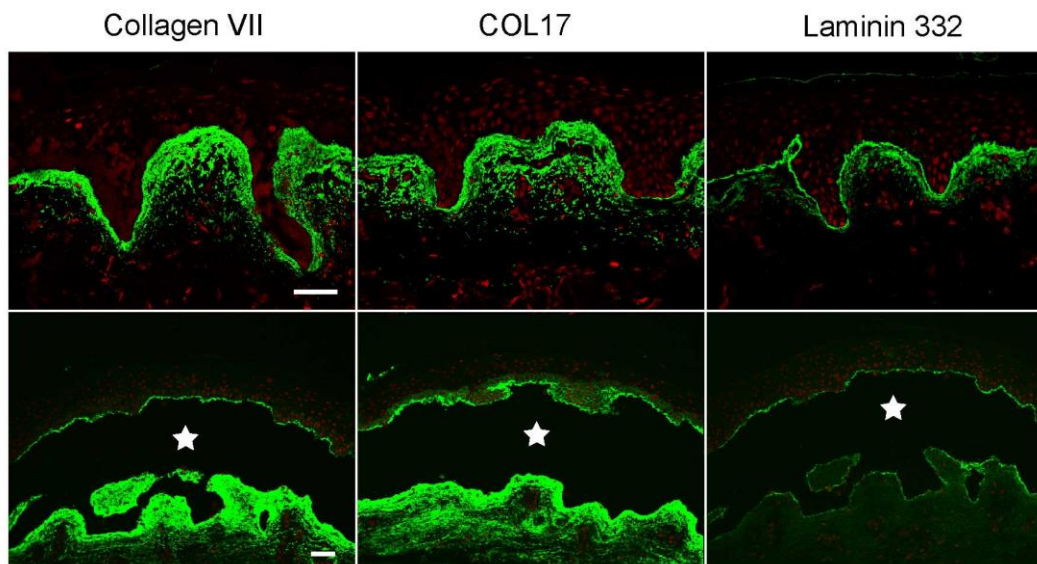


図 6

（上）症例 1 （下）症例 2 ★は水疱部を示す。

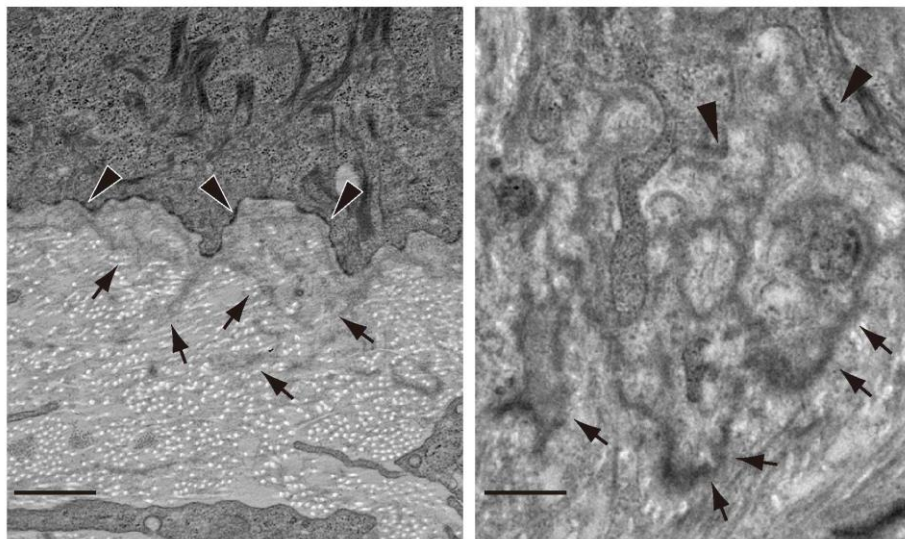


図 7

（左）症例 1、（右）症例 2 の電子顕微鏡観察像を示す。

▼ヘミデスモゾームが基底膜に沿って配置し、→基底膜が重層化している． Scale bar: 5.0μm

一方でプレクチン、インテグリン $\alpha 6$ 、インテグリン $\beta 4$ などのヘミデスモゾーム構成タンパクの発現には異常がなかった。私達が解析・診断した症例では、BP230 が細胞質に異所性に発現していた（図 8）。

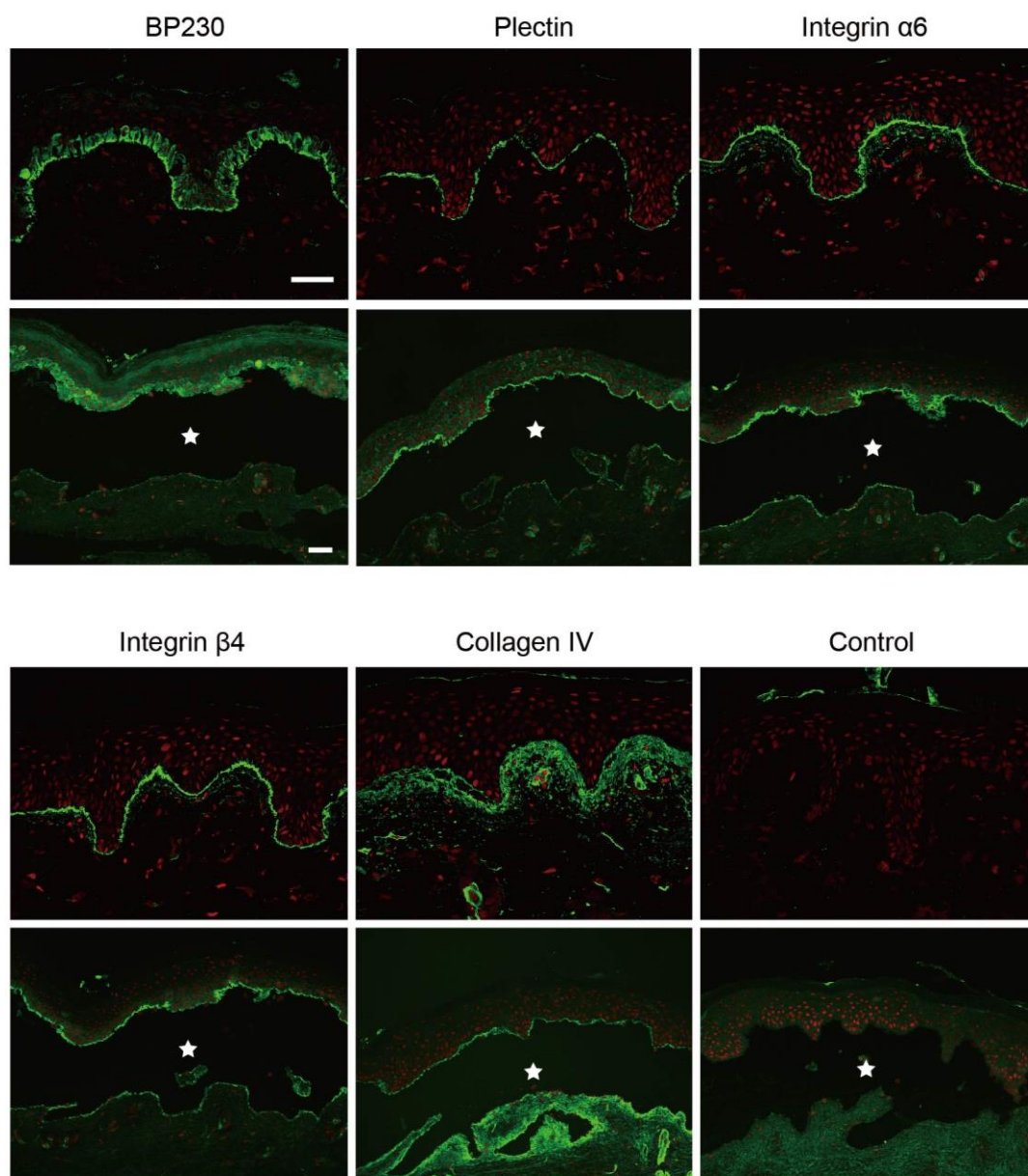


図 8
（上）症例 1、（下）症例 2 ★は水疱を示す。

基底膜の重層化

基底膜の重層化は R1303Q 患者の特徴的な病理組織学的な所見であるが、これは COL17 が基底膜形成に重要な分子であることを示唆している。COL17 の 1303 番目のアルギニンは COL17 の NC4 領域に存在し、ラミニン 332 を含む他の ECM と相互作用をもつ分子であると推測されている¹⁹。しかし R1303Q 変異がきたす病理機構は明らかになっていない。基底膜の重層化は様々な分子の異常により引き起こされる。ヒトでは COL17 の R1303Q 変異のほか、キンドラー症候群の Kindlin-1²³、インテグリン $\alpha 3$ の欠損²⁴でみられることが知られている。これらの事実から COL17、Kindlin-1、インテグリン $\alpha 3$ が正常な皮膚基底膜構築に重要な役割を担っていることが推測できる。キンドラー症候群では基底膜の重層化に加え、R1303Q 患者と酷似した臨床を呈することが知られている。COL17 はヘミデスモゾーム構成タンパク、kindlin-1 はフォーカルコンタクト構成タンパクであり、生体内では共存していない。これら 2 つのタンパクの異常により酷似した臨床所見と検査所見を示すことは大変興味深い。COL17 と kindlin-1 はいずれも直接あるいは間接的に基底膜構成分子であるラミニン 332 と結合することが知られている²⁵ (図 9)。

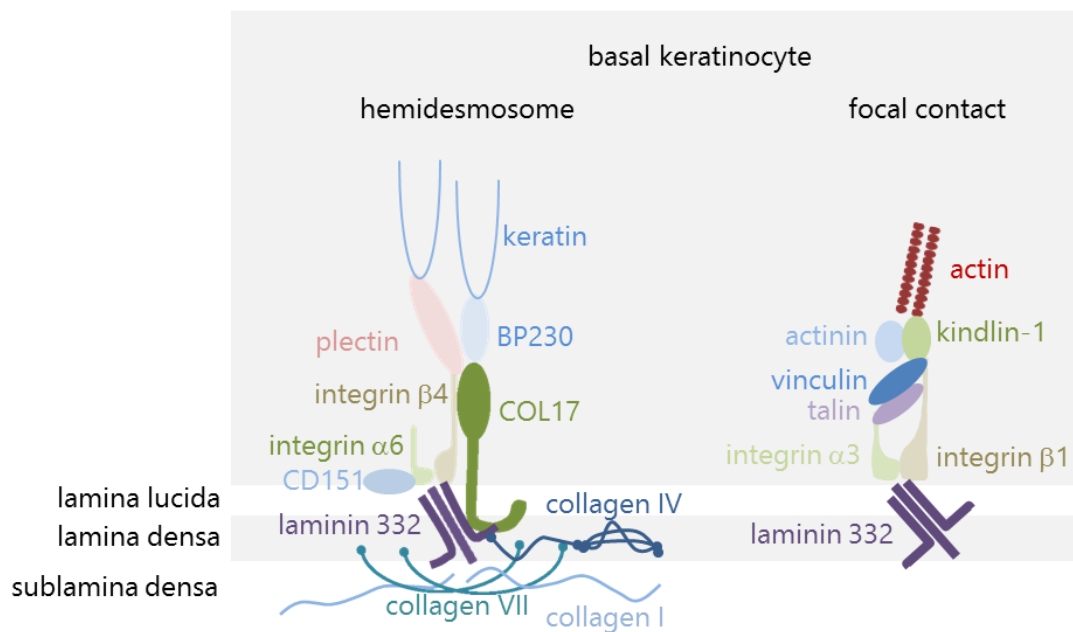


図 9

ヘミデスモゾームおよびフォーカルコンタクト構成タンパクの模式図

本研究の目的

本研究の目的は、COL17 の C 末端に R1303Q 変異を生じた際の病態生理を解明することである。R1303Q 変異に伴う基底膜の重層化機序を解明することで、皮膚基底膜の構築機序の解明に迫るものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BP	bullous pemphigoid
BSA	bovine serum albumin
COL17	type XVII collagen
C 末端	carboxyl terminus
DEB	dystrophic epidermolysis bullosa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EB	epidermolysis bullosa
ECM	extracellular matrix
EBS	epidermolysis bullosa simplex
FBS	fetal bovine serum
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
HPPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
JEB	junctional epidermolysis bullosa
JEB-LO	JEB, late onset
KS	kindler syndrome
MMP	metalloproteinases
mRNA	messenger ribonucleic acid
NC16A	non-collagenous 16A
NHEK	normal human epidermal keratinocyte
N 末端	amino terminus
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、参加者から書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した。

1. 各種試料の作成

① 皮膚生検

正常ヒト皮膚は3名の年齢を一致させた手術検体の正常部余剰皮膚組織から得た。3名とも文章での同意を得た。R1303Q 角化細胞は1名の患者皮膚から得た。皮膚はエピネフリン添加1%キシロカインで局所麻酔し、15番メスを用いて皮膚を切除し、5-0 PDSあるいは4-0 PDSで真皮縫合し、5-0 ナイロンで皮膚縫合した。採取した皮膚はHE染色、電子顕微鏡検査、免疫染色、初代角化細胞培養で使用した。

② 皮膚凍結切片の作成

クリオモルド・プラスチック包埋皿（サクラファンテックジャパン株式会社、日本）に皮膚切片を入れ、クリオマウント（武藤化学株式会社、日本）で充填した。ドライアイス上で急速に凍結し、固定台に載せて薄切して5 μ m切片を作成し、免疫染色で使用した。

③ 電子顕微鏡観察試料の作成

皮膚生検で得た皮膚から電子顕微鏡観察試料を作成した。サンプルを5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、回転ローターを用いて4°Cで一晩、攪拌した。緩衝液を除去後にオスミウム溶液を加え、1時間静置した。オスミウム溶液を除去後に、1%酢酸ウラン溶液を加え、4°Cで1時間静置し溶液を除去し、サンプル内部の水分をエタノール→参加プロピレン→エポキシ樹脂の順で置換した。その後ゼラチンカプセル（応研商事、日本）に包埋し、80°Cで4日間以上静置し樹脂を硬化させた試料を用いて、電子顕微鏡観察を行った。

④ 表皮角化細胞の培養

採取した皮膚は Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後に脂肪を除去し、ディスパーゼ I (合同酒精株式会社、日本) 2ml で一晚 4°C で静置した。表皮を撮子で剥離し、眼科剪刀で細かく刻んで 0.25% トリプシン 2ml に浸し、37°C で 7 分静置した。その後パスツールで激しくピペッティングを行い、10% fetal bovine serum (FBS) 含有 PBS 8ml 加えた。培地は medium supplemented with bovine pituitary extract and epidermal growth factor (Cnt-57, CELLnTEC) を用いた。セルストレーナー (BD) で濾過後に遠心し、細胞成分を CnT57 で溶解し、培養した。本研究で用いた細胞の継代数は 4 回以内とした。作成した培養株を用いて、免疫組織化学、遊走能解析等を行った。以下、正常人から採取した表皮角化細胞を normal human epidermal kearatinocyte (NHEK)、COL17 に R1303Q 患者から採取した表皮角化細胞を R1303Q keratinocyte (R1303Q KC) と記す。

⑤ 免疫染色のための表皮角化細胞の観察試料作成

細胞培養前にカバーガラスのコーティング除去を行った。24 ウェルプレート (BD) の底にカバーガラス (Matsunami) を 1 枚ずつ置いた。500μl の 1M NaOH を入れて 1 時間、室温で静置した後に吸引した。続いて 500μl の 1M HCl を入れて 1 時間室温で静置し、HCl を吸引した。蒸留水で 2 回洗浄し、コーティング剤を除去した。次に NHEK、R1303Q KC を播種し、CnT57 (Cellntec) を 500μl ずつ入れ、37°C、5% CO₂ 下で培養した。24 時間経過後に CnT57 培地を吸引し、4% パラホルムアルデヒド 500μl を入れ、10 分間室温で静置した。吸引後に PBS 500μl で洗浄し、0.1% Triton-X (Sigma) 500μl を入れて室温で 20 分間静置し透過処理した。次に 10mM グリシンで洗浄した後に、3% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を 500μl 入れて 30 分間室温で静置しブロッキングを行った。その後 10mM グリシン 500μl で 1 回洗浄して標本作成を終了し、免疫染色で使用した。

2. 変異検索

患者の genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) は患者末梢血から DNeasy Blood & Tissue Kit (Invitrogen)で抽出した。polymerase chain reaction(PCR) に よ っ て *COL17A1* (NM_000494) と *FERMT1* (NM_017671)のすべてのエクソンとイントロンーエクソン境界部を増幅した。総量 100ng の gDNA(100ng/μl)を 2μl(200ng)、各種 forward、reverse プライマー (10μmol/l) をそれぞれ 4μl (40pmol)、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems) 25 μl 使用し、Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて増幅した。PCR 増幅反応は、(94°C 5 分) ×1 サイクル→ (94°C 45 秒→Annealing temperature 45 秒→72°C 45 秒) ×30 サイクル→ (72°C 7 分) ×1 サイクルで行った。増幅した PCR 産物のエタノール沈殿を行った。最後に 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。*COL17A1* と *FERMT1* のプライマー配列^{4,26}をそれぞれ図 10、図 11 に示す。

Primer	Sequence (position)	Annealing Temperature (°C)	Product Size (bp)
COL17 1F	ccgtgcacattctagaag (1)	55	350
COL17 1R	ttgtctctaaagcccgctat (+256)		
COL17 2F	ttatcagcttcaacagtgag (-82)	55	245
COL17 2R	gatacagtggttggttaga (+106)		
COL17 3F	tatgcttagcctgtgacaga (-91)	55	185
COL17 3R	ccctcacaatgtgacctact (+49)		
COL17 4F	ctgactccaccctgaatta (-43)	55	211
COL17 4R	ttctgtggtgtctctcttt (+64)		
COL17 5F	ctccctgagtgacttggtt (-98)	55	289
COL17 5R	gaatgagtgaggttgctgg (+62)		
COL17 6F	ctgtggaggtccagaataa (-101)	55	230
COL17 6R	tactccaccacttcacttc (+82)		
COL17 7F	gccacctcttatatactgc (-44)	55	177
COL17 7R	gtactccttacctccctg (+97)		
COL17 8F	tcagcctaaaggtccactgc (-96)	55	219
COL17 8R	agcactagccctggaaatct (+56)		
COL17 9F	cagtagtcagaatccaca (-94)	55	331
COL17 9R	ctttcactgtctctggtc (+95)		
COL17 10F	gcttcaatcccaaccagg (-95)	55	342
COL17 10R	tggcaaacattctgaggtg (+ 87)		
COL17 11F	catttctctgtgctctgc (-88)	55	260
COL17 11R	cagtagcatggaagaagg (+100)		
COL17 12F	gaaagtgtttgggactctg (-88)	55	240
COL17 12R	tgggtctcctaatcagtg (+ 80)		
COL17 13F	gcttctcctgagtcacatgc (-61)	60	184
COL17 13R	gtaatcctccctgtgctcca (+53)		
COL17 14F	gcacatgtctctctcttta (-39)	60	317
COL17 14R	tttctgactcatagggtcc (+100)		
COL17 15F	gaacacaggagcagagtgga (-66)	55	242
COL17 15R	tggacacacatttgatagc (+95)		
COL17 16F	ctactccatagcagagcagc (-66)	55	183
COL17 16R	cactcatctggtccattgac (+72)		
COL17 17F	tcactcagccagaaagtca (-95)	55	376
COL17 17R	attcacagattcctgccctt (+84)		
COL17 18F	taggagcagtgatgaaag (-67)	60	384
COL17 18R	ggatgatgtactcacgca (+77)		
COL17 19F	agatgtgaagctgactcagg (-38)	55	186
COL17 19R	agtcatcagctcttctcc (+ 119)		
COL17 20F	gtgcctcacttgaataac (-117)	55	268
COL17 20R	caactgtccactctgtgtc (+ 124)		
COL17 21+22F	tctggctgaccactctctc (-40)	55	377
COL17 21+22R	cagggtttctgtttggtt (+138)		
COL17 23F	caggttagcccaagctatg (-152)	55	383
COL17 23R	ctcagggtgggtctcagta (+129)		
COL17 24F	tgaatgcctctaggtatc (-213)	55	352
COL17 24R	gctctctctgtgacctat (+77)		
COL17 25F	ctggcctgaatacactcac (-133)	55	377
COL17 25R	taagccagtcagaaaggat (+209)		
COL17 26F	tatgtgtcctgtatgtg (-97)	55	290
COL17 26R	gcaatgtgtctctgaaga (+ 133)		
COL17 27F	tgaaggtctgtagacaga (-162)	55	312
COL17 27R	tctgttcaggtcctgtgc (+108)		
COL17 28F	acaggagttcaggatacag (-115)	55	327
COL17 28R	ctccttactcctcactcag (+ 177)		
COL17 29F	tcagaagctgtctcttgac (-104)	55	323
COL17 29R	tggccagacacagaatgac (+ 154)		
COL17 30F	cactgggacagttagaggag (-75)	55	282
COL17 30R	ttctaatgactgtctggc (+ 171)		
COL17 31F	ctttccacctgccagcaagt (-117)	60	290
COL17 31R	ctgacacctgcacatgcaca (+ 101)		
COL17 32F	agctgagagtgccaaggatg (-164)	55	347
COL17 32R	tctaaaggtgcttctcacga (+157)		
COL17 33F	agtgtgctgtgtgagtag (-99)	55	247
COL17 33R	gatgccactgttgatccagg (+ 115)		
COL17 34+35F	tcttcagacaacacctctc (-41)	55	448
COL17 34+35R	gccaaagcctattgtctgatt (+47)		
COL17 36F	caggctgactcgaattgct (-150)	60	268
COL17 36R	gaacagagagcccatgtcc (+ 84)		
COL17 37F	agaggtgagagtggtgcag (-71)	55	261
COL17 37R	gcagaagagagcagaagaga (+60)		
COL17 38F	ggacaggagattcaatcac (-24)	55	242
COL17 38R	ctcttctataagccagcc (+ 103)		
COL17 39F	cgtctggctggcttatagg (-103)	55	216
COL17 39R	tctgtagggacaaggctg (+58)		
COL17 40F	catccatccaccatccaac (-126)	60	229
COL17 40R	ggacacatactggcttctgg (+ 83)		
COL17 41F	tgaaggagagacacagga (-137)	55	239
COL17 41R	tcaaaagctctggagagtg (+76)		
COL17 42+43F	tacaggctgttgtaggtg (- 62)	60	340
COL17 42+43R	acttgctgcatctcttcagg (+ 85)		
COL17 44F	cgaattgtgatcacacac (-95)	55	176
COL17 44R	gagaggaactttggtcact (+31)		
COL17 45F	ctcagacatggaagctatt (-86)	55	272
COL17 45R	cttggcaagagactgtatc (+ 63)		
COL17 46F	gcaggagcttgatagctgt (-98)	55	308
COL17 46R	gagatgagctctggaggaa (+72)		
COL17 47F	agacaacacagctggtagcc (-101)	55	260
COL17 47R	aaggctcagagagagacaag (+91)		
COL17 48F	gtcctgtagtgcactcctct (-29)	60	251
COL17 48R	caatcacagggaagtccaag (+ 81)		
COL17 49+50F	ccaacctctctgtatccg (-87)	55	474
COL17 49+50R	ccaggagaacttagactgcc (+ 95)		
COL17 51F	tttctctctccatcaccc (-140)	55	374
COL17 51R	tgtcccttaagtgcctccc (+ 88)		
COL17 52F	caagctttctctccacga (-58)	55	526
COL17 52R	ccacaacaagaagccagt (+79)		
COL17 53F	cactgtgctctctgtaga (-70)	60	251
COL17 53R	tatccagttaggcaggtgct (+46)		
COL17 54+55F	ttgatgtccaaagctccag (-61)	55	416
COL17 54+55R	ctaagagctcagccttgc (+62)		
COL17 56F	cagtagtcacggtgccata (-90)	55	216
COL17 56R	tggagacctggacctaatg (4669)		

図 10 COL17A1 プライマー配列

Primer	Sequence (position)	Annealing Temperature (°C)	Product Size (bp)
KIND1F	AAATCTGCAGACTGCGCCTC (372)	60	473
KIND1R	GAGGCTGCAGAAAGAAAGGG (+101)		
KIND2F	ATATCTGGAGCACCTGGAAC (-150)	58	401
KIND2R	ATTGCTCTCCAGGGCATTAC (+116)		
KIND3F	TGAGGAGCTGGAGATCAGTT (-123)	58	416
KIND3R	GAAGTAGGCAGAATGCACAC (+83)		
KIND4F	GACCCTGAGTCTTAGAAGGA (-67)	58	343
KIND4R	GCCTTTCCTCATCACATCAG (+129)		
KIND5F	CAGTGCCCAGCTTGACTTAT (-144)	58	455
KIND5R	ATCCCTAGGCCTACCAACTT (+97)		
KIND6F	CAGTGCTCAGAAAGTGTCAG (-186)	58	407
KIND6R	GCTAAACAGGCGATCACACA (+118)		
KIND7F	CTGAGCTGAAGTTTGCTGCA (-117)	58	434
KIND7R	GTGTGTGGATTATGAGGAGC (+209)		
KIND8F	AAGGAGACCTCTGTTTAGGA (-133)	56	404
KIND8R	CTTGTTAGGTGAAGAGCATC (+139)		
KIND9F	GTAGCGAGTGTAAGTGAAG (-168)	56	315
KIND9R	ACCTTTGAACCATGAACCTG (+109)		
KIND10F	TGCAGCGTGTTCCACATTTT (-60)	58	257
KIND10R	GGATTACAGGTTTGAGCCAC (+72)		
KIND11F	ACAGATGCCTCAGAACTCAG (-46)	58	208
KIND11R	TGCTCTTAGGCTTAGTGGAG (+55)		
KIND12F	GCTTTGCACTTGAGCTTGCT (-43)	58	375
KIND12R	GTGCTGGAATTACAGGTGTG (+110)		
KIND13F	CTAACAGGGTGATCACAGAG (-66)	56	269
KIND13R	CTAAATGAGAAAAGTGGGGCT (+78)		
KIND14F	CTTCATTGTCCATTCCTCTG (-123)	58	328
KIND14R	CAATTCTGAGGGACACACAT (+60)		
KIND15F	CCAGTCCAGCAAAGCACTTT (-74)	58	343
KIND15R	GTCCAGAATCTACATGCTGG (+95)		

図 11 *FERMT1* プライマー配列

3. 免疫組織化学

1-②で作成した皮膚凍結切片および 1-⑤で作成した細胞標本を用いて、免疫染色を行った。一次抗体と 1 時間室温で反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体と 1 時間室温で反応させた。一次抗体は COL17 (D20, 尾張部教授より供与、 NC16A-1, Bruckner-Tuderman 教授より供与¹⁵⁾、 BP230 (s1193, J. R. Stanley 教授より供与)、プレクチン (HD1-121, 尾張部教授より供与)、ラミニン 332 (GB3, Abcam)、IV 型コラーゲン (NeoMarkers)、VII 型コラーゲン (LH7.2, Chemicon)、V 型コラーゲン (LS-C 119460, LifeSpan BioSciences)、インテグリン $\alpha 6$ (GoH3, A. Sonnenberg 先生より供与)、インテグリン $\beta 1$ (4B7R, Abcam)、インテグリン $\beta 4$ (3E1, Chemicon) を使用した。二次抗体は FITC (Jackson Immuno Research)、Alexa488-conjugated antibodies (Invitrogen) を使用した。細胞骨格の染色のため ローダミン-ファロイジン (R415, Invitrogen) を使用した。

4. ウェスタンブロット

試料を 7% ポリアクリルアミドを用いて SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜 (BioRad) へ転写した。2% BSA でブロッキング後に、一次抗体を 4℃で一晩反応させ、Tris Buffered Saline (TBS) で洗浄後に二次抗体を室温で 1 時間反応させた。一次抗体は COL17 (NC16A-3, Bruckner-Tuderman¹⁵⁾ より供与)、ラミニン 332 (ab14509, Abcam)、ラミニン $\alpha 3$ (BM2, also termed BM165²⁷⁾、ラミニン $\beta 3$ (sc-20775, Santa Cruz)、ラミニン $\gamma 2$ (D4B5, Millipore)、 β -tubulin (ab6046, Abcam) を用いた。二次抗体は Horseradish peroxidase 標識二次抗体 (anti-mouse IgG は Jackson Immuno Research、anti-rabbit IgG は Invitrogen) を用いた。二次抗体と反応させた後に ECL-plus (GE Healthcare) と室温で 5 分間反応させ、LAS-4000 mini (富士フイルム) でシグナルを検出した。

5. 正常 COL17 および R1303Q 変異を有する COL17 リコンビナントタンパク作成のためのサブクローニング

クローニングはベクターおよびインサートを各制限酵素 (BioLabs) で処理後、PCR purification kit (Quiagen) あるいは Gel Extraction Kit (Quiagen) で精製した。これらをアガロースゲル電気泳動し、ライゲーション時のインサート：ベクターの混合比率を決定した。合計 10 μ l になるように調整したインサート、ベクターに 2x ligation Mix (タカラバイオ) 10 μ l を加え、コンピテントセル (TOP10) と混和した。これを LB プレート (選択用のアンピシリン、クロラムフェニコールを含む) に塗布し 37°C で一晩培養後に、コロニーをピックアップし、LB+アンピシリン培地で振盪培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit でプラスミド DNA を精製し、構造は制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動で確認した。最終的に作成したベクターはシーケンスで配列を確認し、遺伝子が正しく挿入されていることを確認した。

最初に N 末端に FLAG-tag をもつ human *COL17A1* cDNA (FLAG-hCOL17, Kim B. Yancey 教授より供与) を pcDNA5/FRT にクローニングした。FLAG-hCOL17-pBC (NotI site に hCOL17 が挿入されている) を NotI で切断して FLAG-hCOL17 を切り出した。次に、NotI で切断した pcDNA5/FRT にクローニングし、FLAG-hCOL17-pcDNA5/FRT を作成した。

次に N 末端に FLAG-tag をもち R1303Q 変異を有する human *COL17A1* cDNA (FLAG-R1303Q) を作成し、pcDNA5/FRT にクローニングした。クローニングの詳細な過程を図 12 に示し、使用した制限酵素を後述②~⑤に示す。

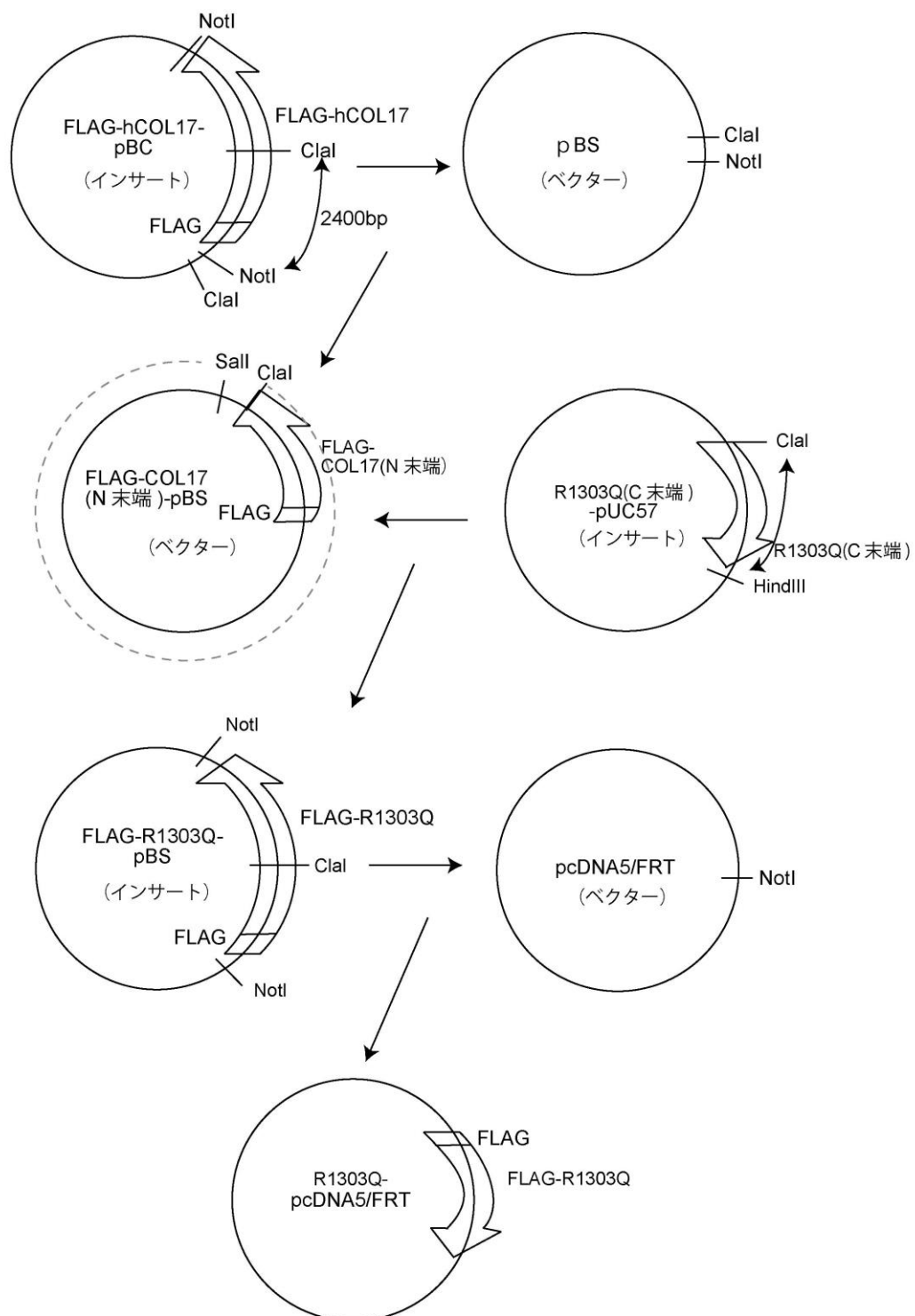


図 12

R1303Q 変異を有する COL17 リコンビナントタンパク作成のためのサブクローニングの過程

①R1303Q 変異を含む COL17 の C 末端側 2073 塩基の合成

遺伝子合成を Genescript 社に依頼した。2443~2445 番目の塩基である ClaI 切断部位から stop コドンまでの間に c.3908 G>A 変異を含み、N 末端には ECORV 切断部位、終始コドンの N 末端には NotI、HindIII 切断部位を付加した (図 13)。合成した 2073bp の遺伝子を pUC57 に挿入し R1303Q(C 末)-pUC57 を作成した。

```
GATATCATCGATGCTCACTGTCCAGGCCCGCCAGGACCTCCTGGAGCCATGGGACCCCGAGGACCTCCAGGTGCCCCAG
EcoRV   ClaI

GCCCTGCCGGCCCCAGCTGGTCTCCAGGACATCAAGAAGTTCTTAATTTACAAGGTCCCCAGGCCACCCGGCCCCACGC
GGGCCACCCAGGGCCTTCCATTCCAGGCCACAGGACCCCGAGGCCACCCAGGGGAGGGTTTGCCAGGCCACCCAGGCC
ACCAGGATCGTTCTGTCCAACCTCAGAAACCTTCTCTCCGGCCCCCGAGGCCACCTGGCCCCCGAGGTCCCAAGGGAG
ACCAAGGTCCCCAGGCCCGAGGACACCAAGGCGAGCAAGGCCTCCAGGTTTCTCAACCTCAGGGTCCAGTTCTTTTC
GGACTCAACCTTCAGGGACC ACCAGGCCACCTGGCCCCCGAGGCCAAAGGTGACAAAGGTGATCCAGGTGTTCCAGG
GGCTCTTGGCATTCTAGTGGTCTTCTGAAGGGGGATCATCAAGTACCATGTACGTGTCAGGCCCGCCAGGGCCCCCTG
GGCCCCCTGGGCCTCGGGGCTCTATCAGCAGCTCTGGCCAGGAGATTGAGCAGTACATCTCTGAGTACATGCAGAGTGAC
AGTATTAGATCTTACCTATCCGGAGTTGAGGGTCCCCAGGCCACCTGGTCCCCCGAGGACCTGTCACCACCATCACAGG
CGAGACTTTCGACTACTCAGAGCTGGCAAGCCACGTTGTGAGCTACTTACGGACTTCGGGGTACGGTGTGAGCTTGTCT
CGTCTCCATCTCTTCTGAAGACATTCTGGCTGTGCTGCAGCGGGATGACGTGCGTCAGTACCTACGTGAGTACTTGATG
GGCCCTCGGGGTCCGCCAGG GCCACCAGGAGCCAGTGGAGATGGGTCCCTCCTGTCTTTGAGTATGCAGAGCTGAGTAG
TCGCATTCTCAGCTACATGTGAGTTCTGGGATCAGCATTGGGCTTCTGGTCCCCCGGGCCCCCTGGCTTGGCGGAA
CCTCCTATGAGGAGCTCCTCTCCTTGCTGCGAGGGTCTGAATTCAGAGGCATCGTTGGACCCCGAGGTCCCCCGGGTCCA
CCAGGGATCCAGGCAATGT GTGGTCCAGCATCAGCGTGGAGGACCTCTCGTCTTACTTACATACTGCCGGCTTGTCATT
CATCCAGGCCCTCCAGGACCTCCTGGTCCCCCGAGGCCCTCGAGGGCCCCCGGGTGTCTCAGGAGCCCTGGCAACCTATG
CAGCTGAAAACAGCGACAGCTTCCGGAGCGAGCTGATCAGCTACCTCACAAGTCTGATGTGCGCAGCTTCATTGTTGGC
CCCCAGGCCCTCCTGGGCCGAGGGACCCCTGGGGACAGCCGCTCCTGTCCACGGATGCCTCCACAGTCGGGGTAG
CAGCTCCTCCTCACACAGCTCATCTGTAGGCAGGGCAGCTCCTACAGCTCTTCCATGAGCACAGGAGGAGGTGGTGCAG
c.3908 G>A

GCTCCCTGGGTGCAGGCGGTGCCTTTGGTGAAGCTGCAGGAGACAGGGGTCCCTATGGCACTGACATCGGCCAGGCGGA
GGCTATGGGGCAGCAGCAGAAGGCGGCATGTATGCTGGCAATGGCGGACTATTGGGAGCTGACTTTGCTGGAGATCTGGA
TTACAATGAGCTGGCTGTGAGGGTGTGAGAGAGCATGCAGCGTCAGGGCCTACTGCAAGGGATGGCCTACACTGTCCAGG
GCCACCAGGCCAGCCTGGGCCACAGGGGCCACCCGGCATCAGCAAGGTCTTCTCTGCCTACAGCAACGTGACTGCGGAC
CTCATGGACTTCTTCCAAAC TTATGGAGCCATTCAAGGACCCCTGGGCAAAAAGGAGAGATGGGCACTCCAGGACCCAA
AGGTGACAGGGGCCCTGCTGGGCCACAGGTCATCCTGGGCCACCTGGCCCTCGAGGACACAAGGGAGAAAAAGGAGACA
AAGGTGACCAAGTCTATGCTGGGCGGAGAAGGAGAAGAAGTATTGCTGTCAAGCCGTGAGCGGCCGCAAGCTT
Stop NotI HindIII
```

図 13

遺伝子合成した R1303Q 変異を含む COL17 の C 末端側 2073 塩基の遺伝子配列

②FLAG-hCOL17 (N 末端) - pBS の作成

FLAG-hCOL17-pBC を NotI、ClaI で切断してできた 2073bp、2400bp、3400bp の断片の中から 2400bp の断片を Gel Extraction Kit (Quiagen) で抽出した。次に pBluscript II SK(+/-) vector (pBS) を ClaI、NotI で切断した。両者をライゲーションし、FLAG-hCOL17 (N 末端) -pBS を作成した。

③FLAG-R1303Q-pBS の作成

②で作成した FLAG-hCOL17(N 末端)-pBS を SalI で切断し、T4 DNA Polymerase (Takara) を用いて末端を平滑化した後に、ClaI で切断した。次に①で作成し R1303Q-pUC57(C 末端)を HindIII で切断後に平滑化し、次に ClaI で切断した。両者をライゲーションして FLAG-R1303Q-pBS を作成した。

④FLAG-R1303Q-pcDNA5/FRT の作成

pcDNA5/FRT と③で作成した FLAG-R1303Q-pBS を NotI で切断した。両者をライゲーションして FLAG-R1303Q-pcDNA5/FRT を作成した。

6. 正常 COL17 リコンビナントタンパク (normal-COL17) および R1303Q を有する COL17 リコンビナントタンパク (R1303Q-COL17) の作成

① FlpIn293 細胞へ FLAG-COL17-pcDNA5/FRT (あるいは FLAG-R1303Q-pcDNA5/FRT) を遺伝子導入

あらかじめ Flp-In-293 細胞を 10cm シャーレに播種し、サブコンフルエントとなった細胞を用意した。

1. optiMEM (Gibco) 1.5ml、pOG44 21.6 μ g, FLAG-hCOL17-pcDNA5/FRT (または FLAG-R1303Q-pcDNA5/FRT) 24 μ g を混合し、5 分間室温で静置した。
2. optiMEM 1.5ml と Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 60 μ l を混合し、5 分間室温で静置した。
3. 1 と 2 を混合し室温で 20 分静置した。
4. FlpIn293 細胞 (10cm シャーレ) に Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 15ml を入れ、3 を添加した。
5. ヒグロマイシン (Invitrogen) 200 μ g/ml でセクションした。

② ライセートの抽出

セクション後に、FLAG-COL17 あるいは FLAG-R1303Q を安定発現する FlpIn293 細胞を Dulbecco's Eagle's medium (DMEM) で培養し、ライセート採取の 24 時間前に 50 μ g/ml アスコルビン酸を添加した。ライシスバッファの組成は 1% Nonident P-40, protein inhibitor cocktail, 10mM EDTA in 25 mM Tris, pH 7.2 とした。培養シャーレにライシスバッファをいれ、30 分氷上で振盪した。最後にセルスクレーパーを用いてライセートを回収した。

③ 免疫沈降法による normal-COL17 および R1303-COL17 リコンビナントタンパクの抽出

COL17 の N 末端に付加した FLAG による免疫沈降法を行った。最初に FLAG 抗体つきビーズ (M185-9, MBL) 50 μ l をエッペンチューブに入れ、磁石に取り付け上清を除いた。残ったビーズを②で得たライセート 200 μ l + PBS 800 μ l で溶解し、4°C で一晩攪拌しながら結合させた。翌日、0.1% Nonident P-40 (Nacalai tesque) で洗浄後に、FLAG ペプチド (F3290, Sigma) を加え室温で 15 分間振盪した。チューブに磁石を取り付け、溶出した COL17 リコンビナントタンパクを含む上清を回収した。上清はフラグペプチドを除去するため、透析膜 (ダイアラシスメンブラン サイズ 20、Wako) で蓋をしたチューブに入れ、0.1% Nonident P-40 を含む PBS で 4°C 一晩透析した。

精製したタンパク濃度を BCA Protein Assay Kit, Pierce で測定した。

7. COL17 リコンビナントタンパクの切断実験

Normal-COL17 および R1303Q-COL17 をヒトプラスミン(ab90928, Abcam) で 0.0001~0.02 mg/ml、37℃、1 時間で切断した。

8. COL17-ラミニン 332 結合能解析

過去のプロトコール^{28,29}を改変し、COL17-ラミニン 332 結合能解析プロトコールを作成した。96 ウェルプレートにラミニン 332 0.5 µg/well (天野先生より供与³⁰) を 4℃で一晩静置し吸着させた。PBS で洗浄後に 2% BSA を加え 2 時間室温で静置し、非特異的な結合部位をブロッキングした。PBS で段階希釈した正常および変異 COL17 リコンビナントタンパクを、一晩 4℃で静置し吸着させた。PBS で 3 回洗浄した後に、固相化したラミニン 332 に結合した COL17 を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で検出した。ELISA 法の一次抗体は NC16A に対するウサギポリクローナル抗体³¹、二次抗体は Horseradish peroxidase 標識二次抗体 (anti-rabbit IgG、Invitrogen)を用いた。酵素基質 (MBL) と反応させて発色させ、Sunrise マイクロプレートリーダー (TECAN) で吸光度を測定した。

以上のプロトコールは、以下のように①ラミニン 332 コーティング濃度、②COL17、ラミニン 332 コーティング順序を検討した上で作成した。

①ラミニン 332 のコーティング濃度の最適化

96 ウェルプレートへラミニン 332 を 0.2 μ g/well、0.5 μ g/well、1.0 μ g/well の各濃度でコーティングし、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。翌日 PBS で 3 回洗浄後に 1% BSA で 2 時間室温の条件下でブロッキングした。その後 normal-COL17 リコンビナントタンパクを 0-4mg/well の濃度で添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後に ELISA 法で吸着量を測定した。ラミニン 332 のコーティングは 0.5 μ g/well で行うことにした (図 14)。

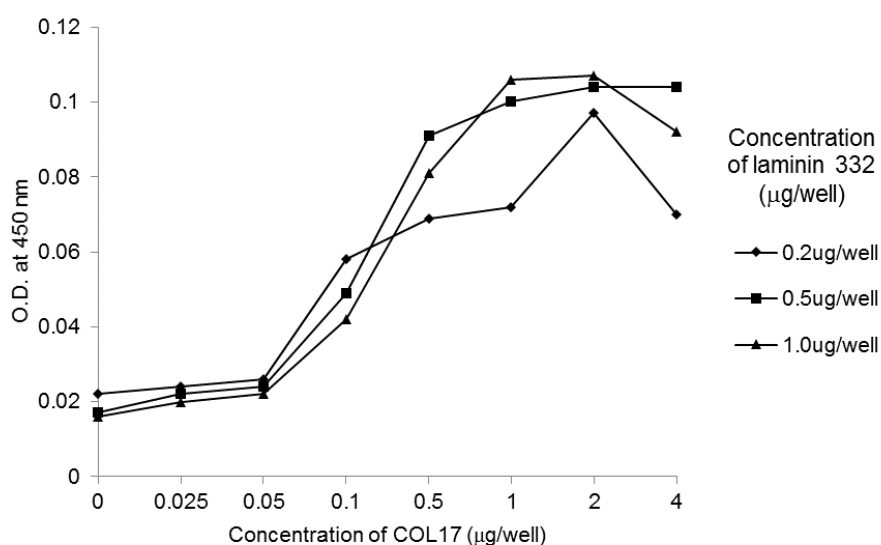


図 14 ラミニン 332 のコーティング濃度の最適化

② コーティング順序の検討

次に COL17 をコーティング後に 1% BSA でブロッキングし、ラミニン 332 をコーティングし、抗ラミニン 332 抗体(ab14509, Abcam)を用いた ELISA 法を施行した。COL17 のコーティング濃度にかかわらず、一定の割合でラミニン 332 はプレートに吸着した (図 15)。

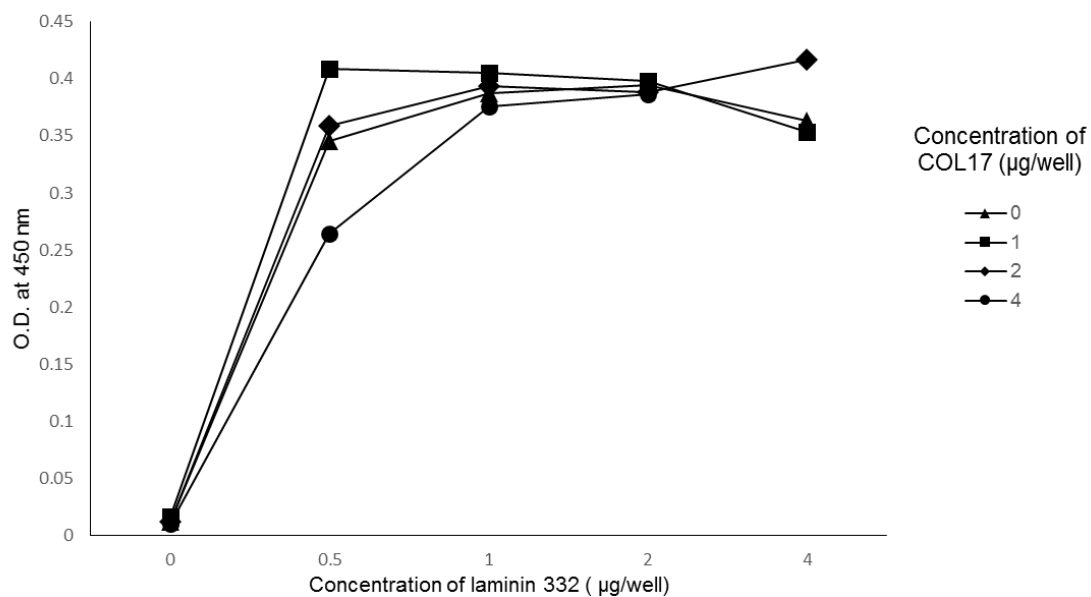


図 15 COL17-ラミニン 332 結合能解析

COL17 をコーティングした後のブロッキングが不十分であるため、ラミニン 332 が非特異的に吸着してしまった可能性を考え、ブロッキング剤 1%BSA から 2% BSA および 5%スキムミルクへ変更した。COL17 には依存せず、ラミニン 332 の濃度のみに依存して吸着した (図 16)

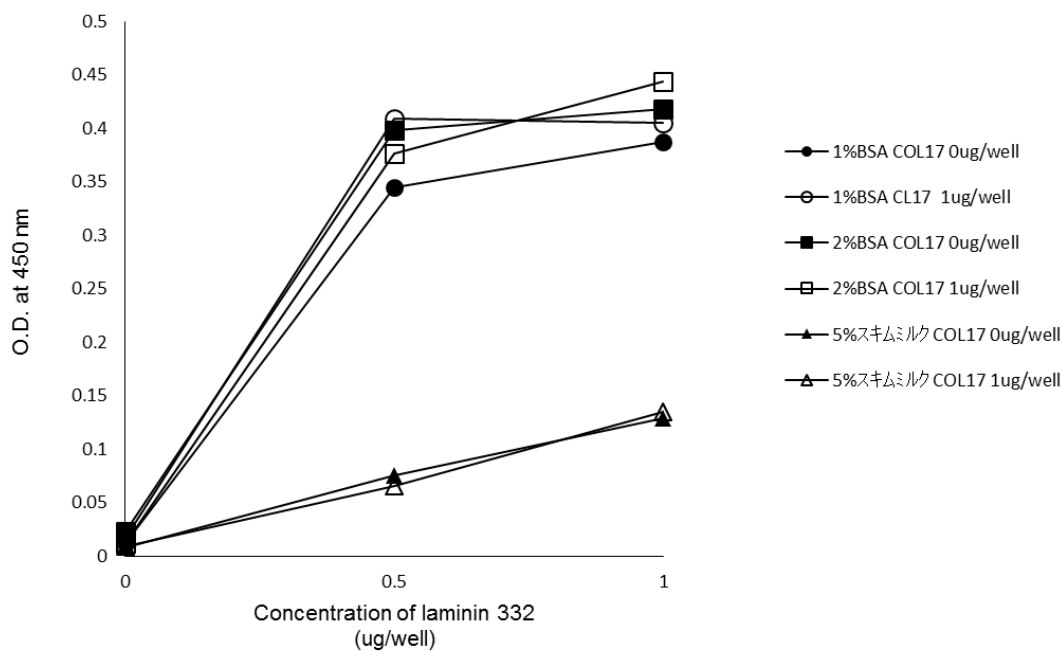


図 16 COL17-ラミニン 332 結合能解析における
ブロッキング剤の検討

以上の結果から、ラミニン 332 は吸着力が高いため、ブロッキングの有無にかかわらず非特異的に吸着することが示唆された。コーティングはラミニン 332、COL17 の順で行うこととした。

9. 初代培養細胞を用いた実験

① 接着能

過去の論文³²を参考にプロトコールを作成した。96 ウェルプレートに 4.0×10^4 cells/well の NHEK および R1303Q KC を播種し、37°C で 1 時間培養した。その後 PBS で洗浄し 70%エタノール、30 分間室温で固定した。0.5%クリスタルバイオレットを用いて 15 分間室温で染色した。接着した細胞はプレートリーダーで吸光度(540nm)を測定した。実験は 3 回行った。

② 形態と遊走能

1.0×10^4 /ml の NHEK および R1303Q KC を μ -dishes (Ibidi) に播種した。5% CO₂ at 37°C で 18 時間培養

し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV100 confocal laser scanning microscope、Olympus)を用いて観察した。

遊走能は位相差像を 5 分間隔で 2 時間撮影し、Image J software (Manual tracking and *Chemotaxis and Migration Tool software (Ibidi)*)で解析した。

実験は 3 回繰り返した。

③ 培養細胞の上清、ライセートの回収

6cm シャーレに 1 シャーレあたり 1.2×10^6 cells を播種し、37°C で 24 時間培養した。上清は全量回収し Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore)で 20 倍に濃縮した。ライセートは PBS で洗浄後にライシスバッファを加え 30 分氷上で振盪した。セルスクレーパーを用いてライセートを回収した。ライシスバッファの組成は 1% Nonident P-40, protein inhibitor cocktail、10mM EDTA in 25 mM Tris, pH 7.2 とした。

④ 培養細胞の ECM タンパクの抽出

In vitro のシャーレ上で表皮角化細胞を培養すると、細胞はラミニン 332、COL17 等の ECM タンパクやヘミデスモゾーム構成タンパクからなる migration track をシャーレ上に分泌しながら移動する（図 17）。

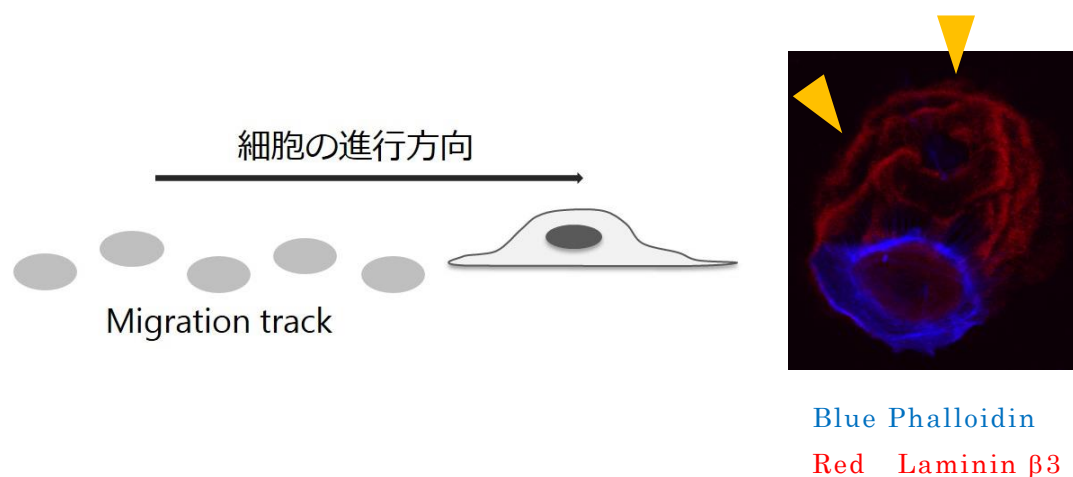


図 17 Migration track の模式図

NHEK および R1303Q KC を 6 ウェルプレートで 48 時間培養した後に、培地を吸引し PBS で 3 回洗浄した。20 mM NH_4OH 溶液を添加し、細胞がはがれたことを確認した後に NH_4OH を吸引し、蒸留水で 3 回洗浄した。PBS で 3 回洗浄後に、サンプルバッファー 10 μl 添加して ECM タンパクをセルスクレーパーで回収した。回収後に PBS を加えて 50 μl になるように調整した（図 18）。

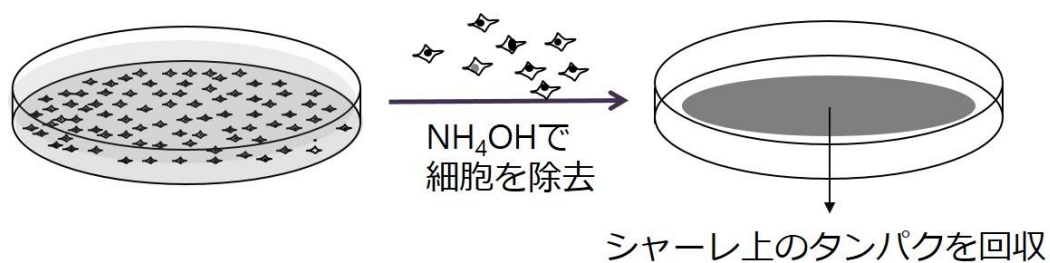


図 18 ECM タンパクの回収方法

⑤ Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

最初に培養細胞から messenger ribonucleic acid (mRNA)を抽出した。6 ウェルプレート(1 ウェルあたり 4.0×10^5 個の NHEK および R1303Q KC を播種して 24 時間培養し、RNeasy Mini Kit (Invitrogen) を用いて mRNA を抽出した。つづいて single-strand cDNA を RT2 First Strand Kit (Qiagen)を用いて合成した。最後に RT2 ProfilerTM PCR Array System with Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules (Qiagen)と RT2 SYBR GREEN/ROX PCR Master Mix (Qiagen)を組み合わせ、Step-OnePlus (Applied Biosystems)を用いて RT-PCR を施行した。それぞれ 3 回ずつ繰り返し、RT2 Profiler program (Qiagen)で結果を解析した。鋳型 RNA の補正のためのハウスキーピング遺伝子は、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPPRT1) housekeeping gene を選択した。

⑥ 上清タンパクの Matrix metalloproteinase (MMP) 解析

6 ウェルプレート(BD)の 1 ウェルあたり 4.0×10^5 個の NHEK および R1303Q KC を播種して 24 時間培養し、上清を回収した。Ray Bio Human Matrix Metalloproteinase Antibody Array 1 Map (RayBiotech Inc)を用いて解析した。一次抗体反応後に Horseradish peroxidase 標識二次抗体を反応させ、ECL-plus (GE Healthcare)を用いて LAS-4000 mini (富士フイルム) でシグナルを検出した。

10. 統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA)を用いた。解析結果は平均 ± 標準誤差で示した。P 値は parametric Student's unpaired t-test あるいは non-parametric Mann-Whitney U-test で解析した。P 値は 0.05 未満を有意差ありとみなし、* $0.01 < p < 0.05$, ** $0.01 < p < 0.001$, *** $0.0001 < p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ で示した。

実験結果

1. COL17 とラミニン 332 間の結合に関する解析

In silico の予測により、R1303Q 変異は COL17 とラミニン 332 の親和性に影響を与える可能性があると報告されている¹⁹。R1303Q 変異により両者の結合能が変化するかを解析した。

正常 COL17 リコンビナントタンパク (Normal-COL17) と R1303Q 変異を有する COL17 リコンビナントタンパク (R1303Q-COL17) を作成した。作成した Normal-COL17 と R1303Q-COL17 はともに 180kDa ポリペプチドの 3 本鎖からなる 540kDa のリコンビナントタンパクであることを確認した (図 19)。

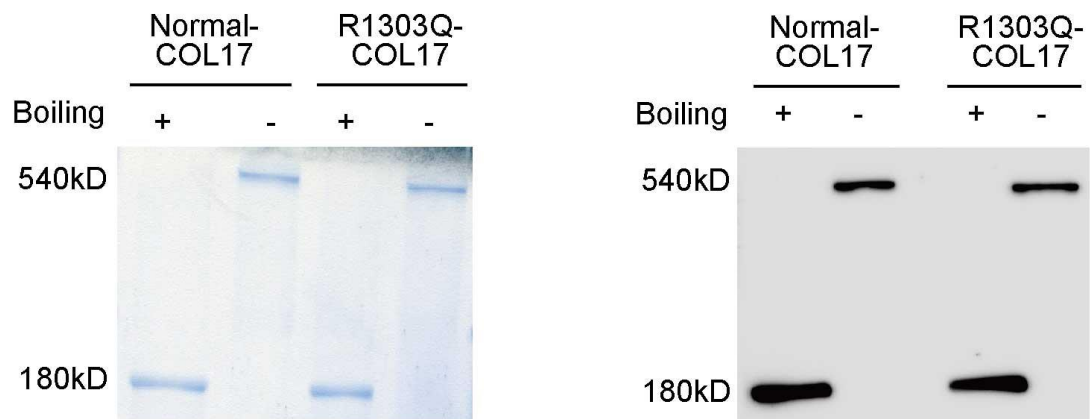


図 19

(左) クマシーブルー染色

(右) 抗 NC16A-3 抗体を用いたウェスタンブロット

次にラミニン 332-COL17 binding assay を行った。*In silico* の予測¹⁹ とは異なり、Normal-COL17 とラミニン 332 の結合能は R1303Q-COL17 の結合能と比較して変化しなかった (図 20)。

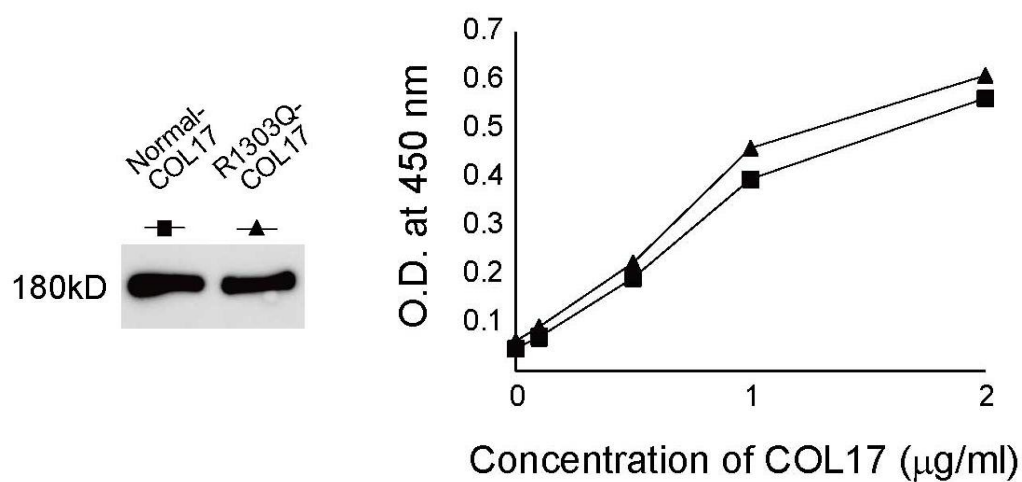


図 20

(左) 実験に用いた Normal-COL17、R1303Q-COL17 のウェスタンブロットを示す。

(右) COL17-laminin 332 の binding assay では両者に差はなかった。

2. COL17 リコンビナントタンパクの C 末端切断に関する解析

NC16A 領域で切断され 120kDa になった COL17 は、さらに C 末端で切断をうけ 97kDa になる (図 2) ^{15,33,34}。分子量に基づいた *in silico* の予測で、C 末端での切断部位は R1303Q が存在する COL17 の NC4 領域付近と推測されているため ¹⁹ (図 2)、R1303Q の変異が C 末端の切断に影響を与えているのではないかと推測した。セリンプロテアーゼであるプラスミンは、アルギニンの C 末端を切断し ³⁵、COL17 を 120kD および 97kD に切断することが知られている ¹⁵。そこでプラスミン切断の影響の有無を調べた。

Normal-COL17 と R1303Q-COL17 をそれぞれプラスミンで処理すると、R1303Q-COL17 では 97kD への切断が阻害されたが、120kD への切断は阻害されなかった (図 21)。これは NC16A 領域での切断は阻害されず、C 末端の切断のみが阻害されたことを示唆している。

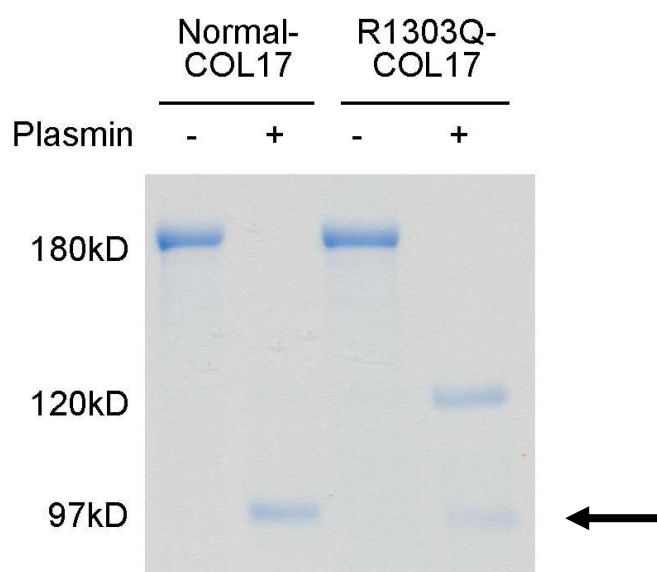


図 21

Normal-COL17 と R1303Q-COL17 をプラスミン 0.01mg/ml、37°C、1 時間の条件で切断し、SDS-PAGE 後にクマシーブルー染色を行った。97kDa の断片 (←) は R1303Q-COL17 で著明に減少した。

次にプラスミン処理濃度を上げていくと、Normal-COL17 では濃度依存性に 97kDa 断片が増えるが、さらにプラスミン濃度を濃くすると 120kDa 断片は減少し 97kDa 断片が増えた。一方で R1303Q-COL17 でもプラスミンの濃度を濃くすると 97kD の断片が増えた（図 22）。R1303Q の変異は COL17 の C 末端での切断を完全には阻害しなかった。

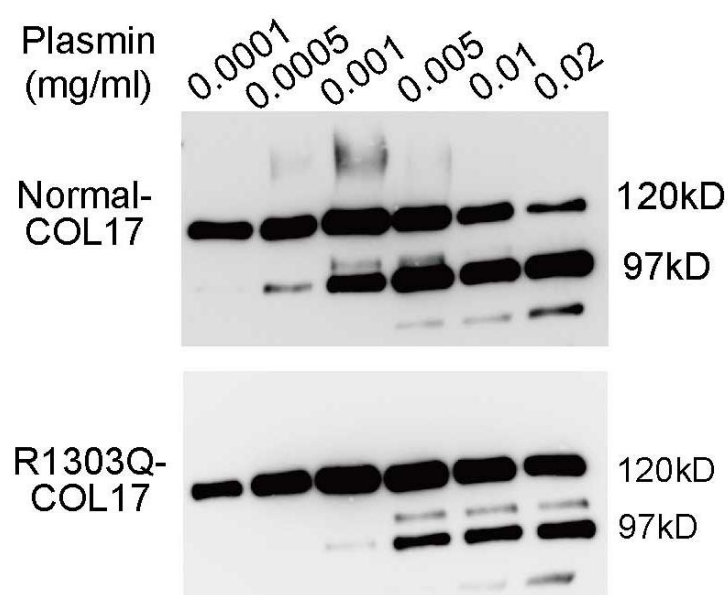


図 22

以上から、R1303Q 変異はプラスミンによる COL17 の C 末端での切断を完全に阻害しないことを明らかにした。しかし、部分的ではあるが確実に阻害されていることを示した。

3. R1303Q KC を用いた解析

R1303Q 変異が *in vitro* でのタンパク質発現に与える影響を、NHEK と R1303Q KC（症例 2）を用いて解析した。

最初に COL17 の発現を解析した。NHEK および R1303Q KC をプラスチックシャーレに同数播種し、37℃で 48 時間培養後に ECM タンパクを回収した。*In vitro* でのプラスミン切断実験の結果（図 21）と一致して、R1303Q KC の ECM 中には 97kDa の断片は著明に減少していた（図 23 左）。しかし培養上清中では、NHEK と同様に R1303Q でも 97kD のバンドが認められた（図 23 右）。ECM に分泌された COL17 と培養上清中に分泌された COL17 では、細胞外領域の切断方法が異なることが示唆された。

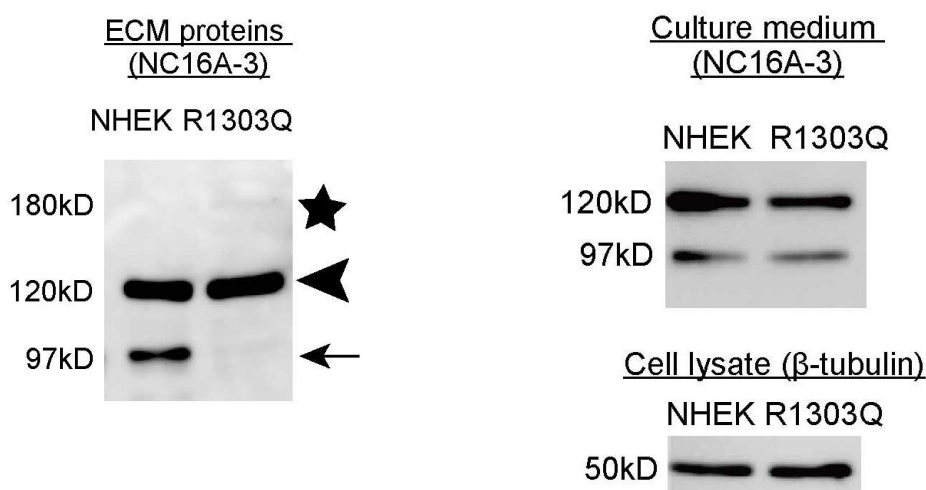


図 23

（左）ECM

180kD (star), 120kD (arrowhead), 97kD (arrow)を示す。

R1303Q KC の ECM 中には、97kD の断片は NHEK と比較して少ない。

（右）培養上清

ECM とは異なり R1303Q でも 97kDa のバンドが確認された。

これまでの結果から、R1303Q KC が分泌した ECM タンパク中には C 末端での切断をうけない COL17 が増えていることがわかった。COL17 の C 末端はラミニン 332 との結合に重要な部位であること^{28,36}から、切断をうけない COL17 を多く含む R1303Q の ECM 中には、ラミニン 332 の沈着量が増えているのではないかと推測し、ECM タンパク中のラミニン 332 の発現を解析した。予想通り、R1303Q KC の ECM 中には NHEK と比較してラミニン 332 の沈着量が増えていた(図 24)。

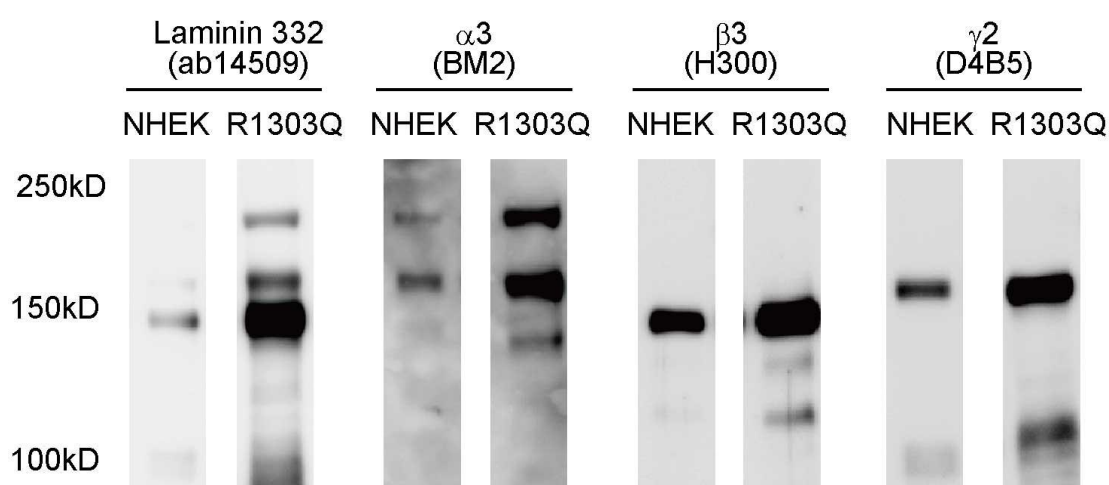


図 24 ECM タンパク中のラミニン 332

R1303Q KC の ECM ではラミニン 332 の沈着量が増えていた。プロセシングのパターンには差はなかった。

次に遺伝子レベルでのラミニン 332 の発現量を検討した。NHEK および R1303Q KC から mRNA を抽出し、RT-PCR を施行した。ラミニン 332 の遺伝子発現量は NHEK に比べ R1303Q KC で低下していた (図 25)。

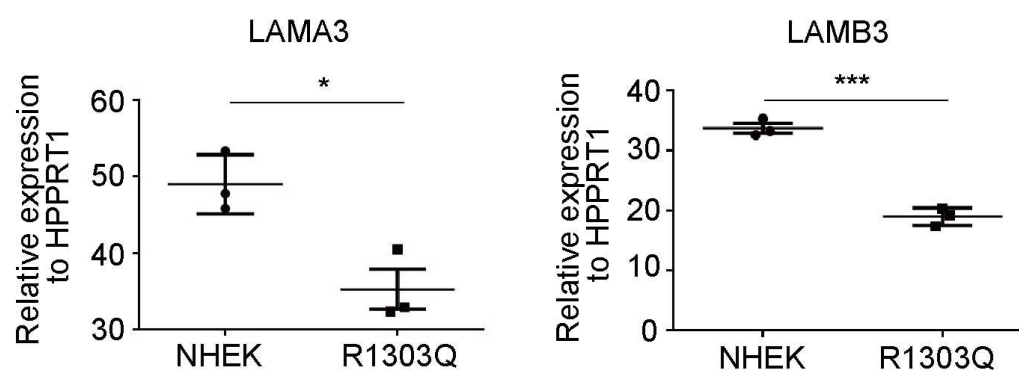


図 25 ラミニン 332 の細胞内における遺伝子発現量
R1303Q KC におけるラミニン α 3 (*LAMA3*)、ラミニン β 3 (*LAMB3*)
の遺伝子発現量は NHEK と比較して有意に減少していた。

4. C 末端での切断を受けた COL17 とラミニン 332 の発現

図 21,22 で R1303Q-COL17 は C 末端でのプラスミンによる切断が阻害されていることを示し、図 24 では ECM 中のラミニン 332 の沈着量が増えていることを示した。一方で *in silico* 予測とは異なり、図 20 で R1303Q 変異は 180kDa の COL17 とラミニン 332 の結合能に影響を与えないことを明らかにした。以上の結果から、COL17 の C 末端での切断の有無がラミニン 332 との結合能に影響を与えるのではないかと推測した。そこでプラスミンで切断した 120kDa+97kDa のリコンビナントタンパクとラミニン 332 間の結合能を、180kDa の COL17 とラミニン 332 間の結合能と比較した。120kDa+97kDa に切断された COL17 はラミニン 332 に結合しなかった (図 26)。

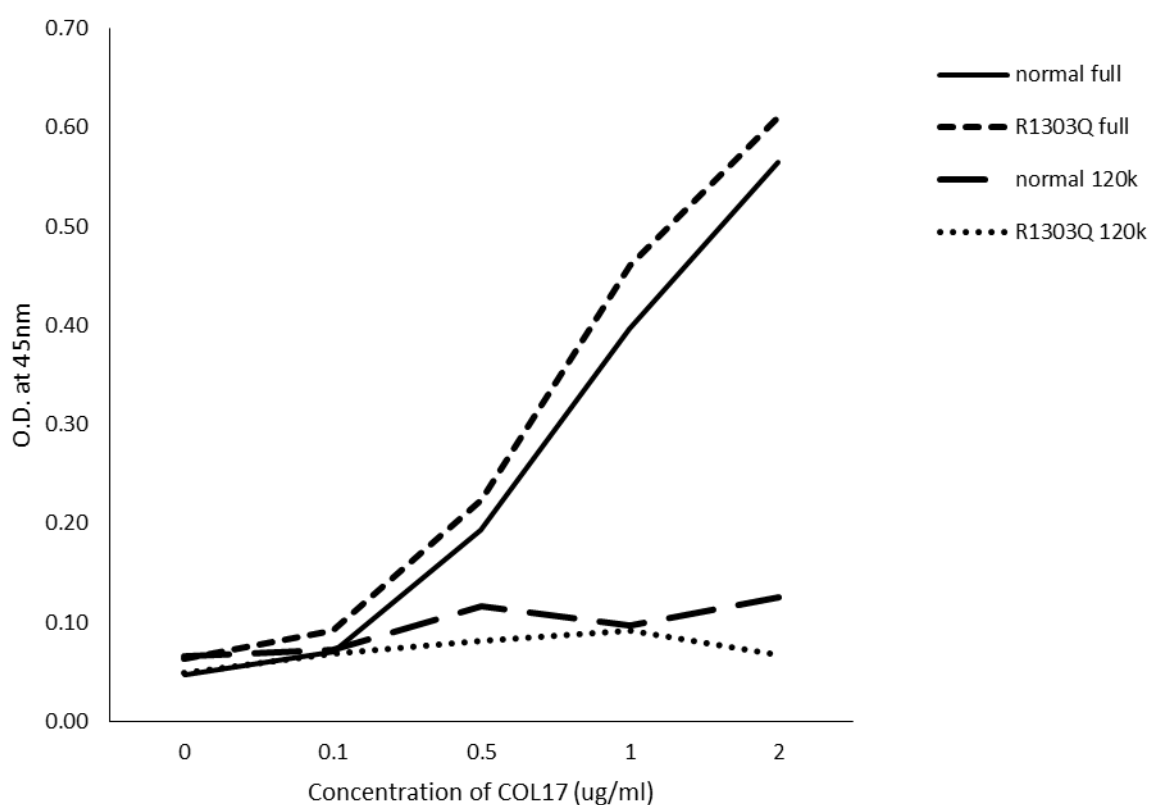


図 26
COL17-ラミニン 332 binding assay

プラスミンでの切断をうけた COL17 リコンビナントタンパクがラミニン 332 に結合しない理由として、①120kDa や 97kDa に切断された COL17 はラミニン 332 に結合できない、②切断に使ったプラスミンがラミニン 332 に結合して COL17 が結合できない、などの可能性を考えた。Affinity chromatography 法で切断に用いたプラスミンを除去したが、結果は図 26 と同様だった。また図 23 で示すように上清中には 120kDa と 97kDa との COL17 が存在するが、ECM 中には migration track のみに存在する³⁶。つまり ECM 中の切断された COL17 断片の由来は、上清中に分泌された COL17 の切断断片ではなく、切断を受けていない COL17 が ECM 中に分泌されタンパクと結合した後に切断をうけたものであると推測した。

以上の結果から、R1303Q KC の ECM 中でラミニン 332 が増加した原因は、細胞内での発現の増加が原因ではなく、翻訳後のプロセスが関与している可能性が示唆された。すなわち、プラスミンによる COL17 の C 末端での切断部位よりもさらに C 末端で COL17 はラミニン 332 と結合するため、C 末端での切断が阻害された R1303Q-COL17 ではラミニン 332 との結合が解除されない。その結果として ECM へのラミニン 332 の沈着量が増えると考えた (図 27)。

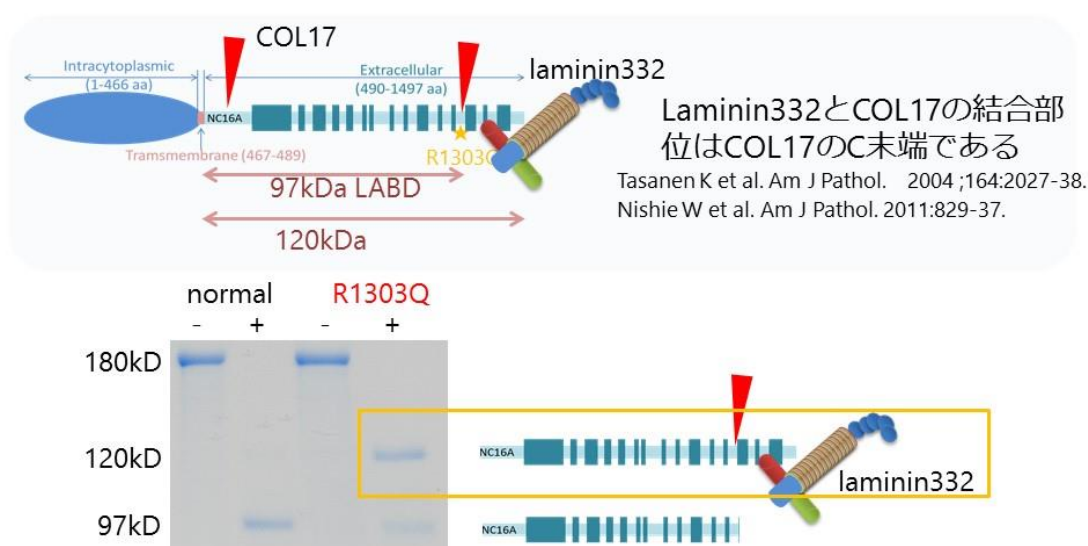


図 27

▼ (赤) はプラスミンによる切断部位を示す

5. R1303Q 変異による形態の変化

ラミニン 332、COL17 はともに細胞の接着、遊走能等を制御していることが知られている³⁷⁻⁴⁰。接着能、細胞の形態、遊走能の評価を行った。R1303Q KC と NHEK を比較したが、接着能には変化がなかった (図 28)。

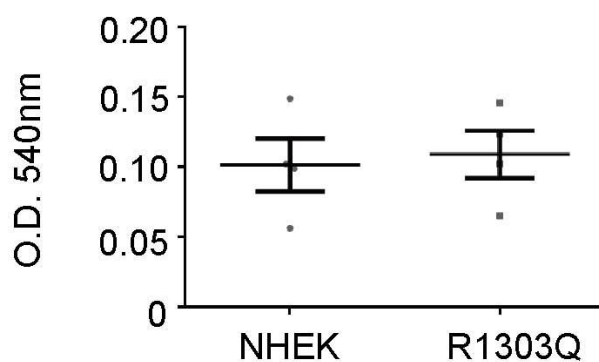


図 28

R1303Q KC は NHEK と比較して接着能に変化はなかった ($n=3$, $p=0.47$)。

次に形態を評価した。R1303Q KC は NHEK に比べ有意に細胞面積が大きかった（図 29）。

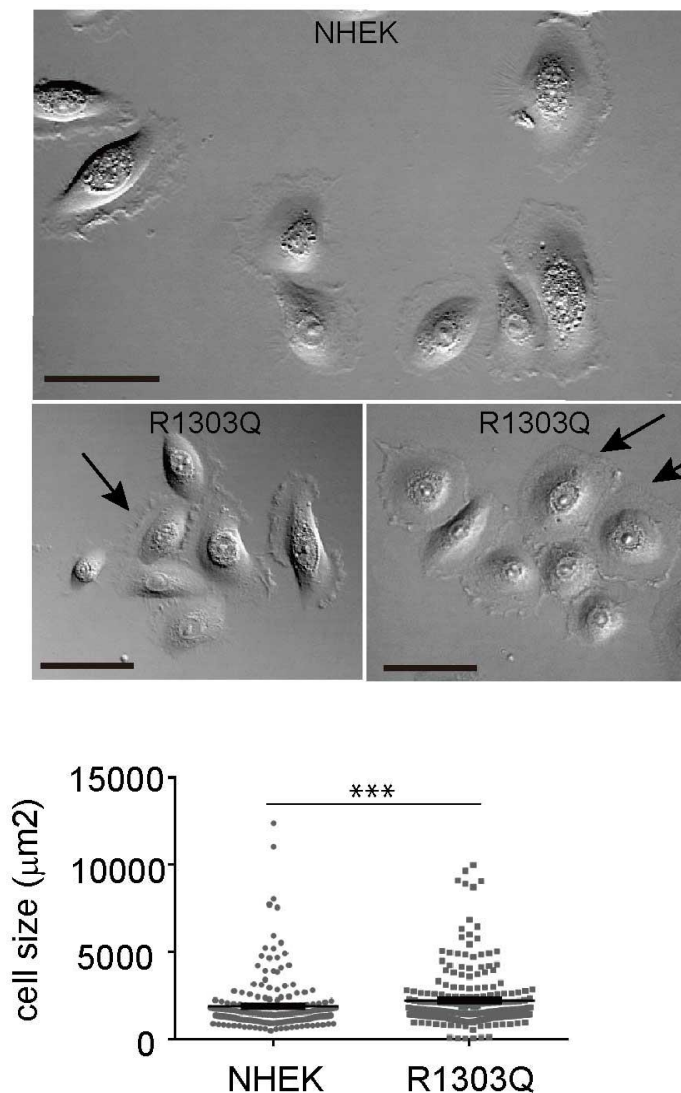


図 29

（上）位相差像。R1303Q KC では NHEK と比較して細胞が大きいが、特に→のように細胞が集まっている部分では大きい傾向があった。

Scale bar: 50 μm

（下） R1303Q KC (n=229) の細胞面積は NHEK (n=205) と比較して有意に大きかった (** $p=0.0002$)。

ヘミデスモゾームやフォーカルコンタクトに関連したタンパクは接着や遊走能に変化を与えることが知られているため、次にこれらのタンパクの発現を評価した。ヘミデスモゾームである COL17、フォーカルコンタクト構成タンパクであるインテグリン $\beta 1$ ともに、細胞全周性に発現がみられた。Migration track と呼ばれる部分の発現も R1303Q KC で亢進していた（図 30）。これらの結果は COL17 の C 末端切断が阻害されたことにより、ケラチノサイトが ECM から解離しにくくなったことを示唆する。

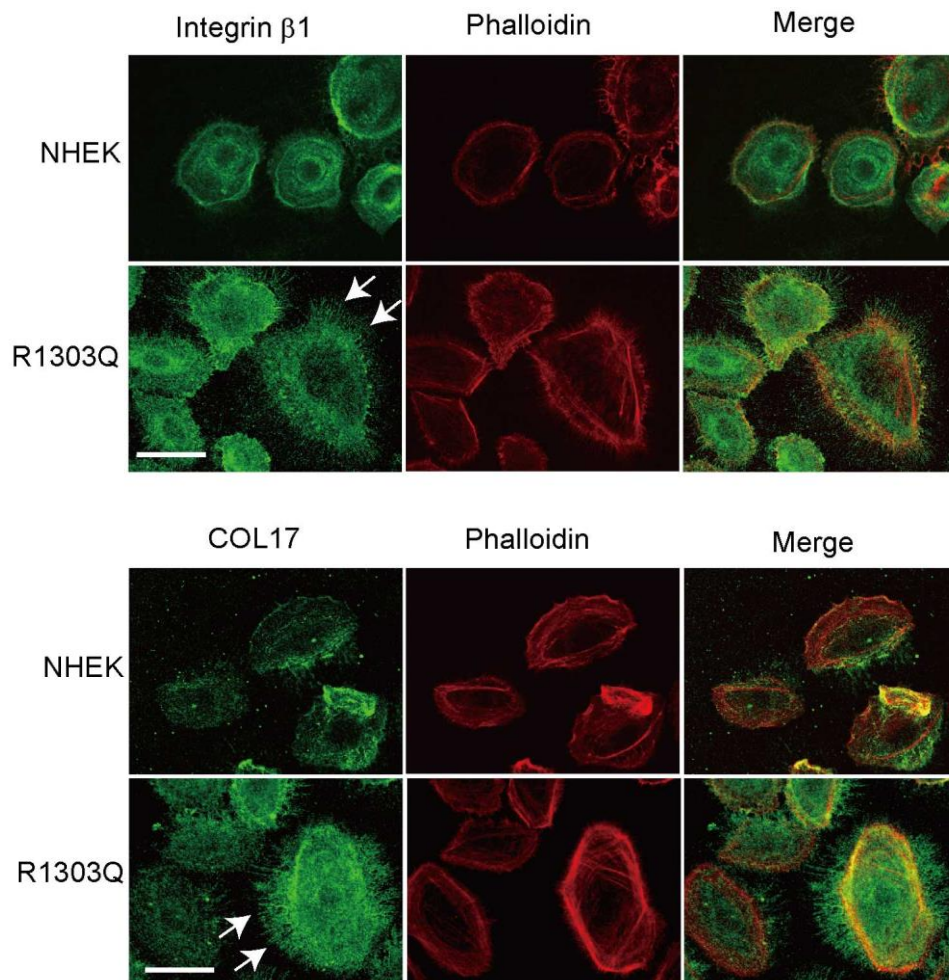


図 30

COL17 とインテグリン $\beta 1$ は R1303Q KC の ECM 中の migration track (→) で全周性に広がっていた。

Scale bar: 40 μ m

次に遊走能を評価した。COL17-ラミニン 332 結合が解除されにくくなり、ケラチノサイトの ECM タンパクから解離が困難になることで遊走能が低下していると推測した。R1303Q KC の遊走能は低下し（図 31）、移動距離の比較でも R1303Q KC では有意に移動距離が短くなっていた（図 32）。移動距離は開始地点から最終地点までに細胞が動いた長さを測定した。

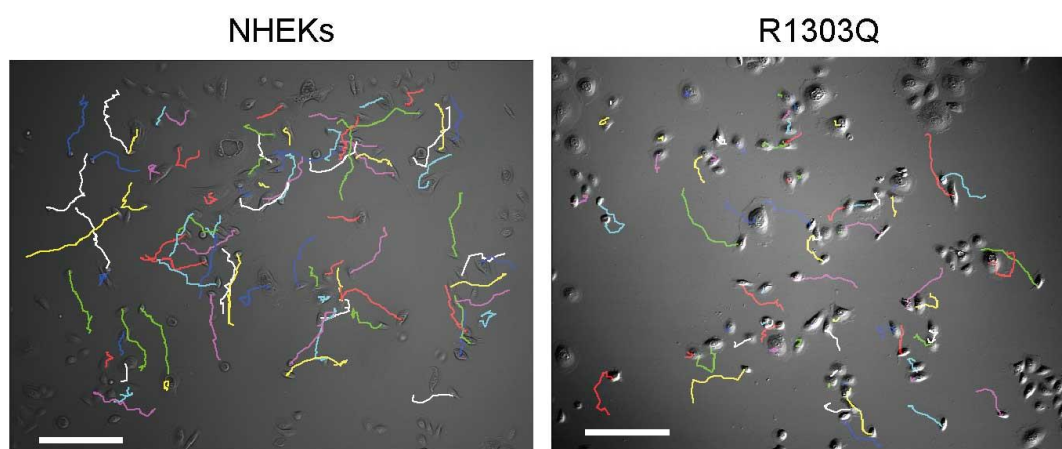


図 31 NHEK と R1303Q KC のタイムラプス像

5 分おきに 2 時間撮影したタイムラプス像を示す。軌跡は細胞の動線を示す。R1303Q KC では NHEK に比べて動いていない細胞が多い。

Scale bar: 200 μ m

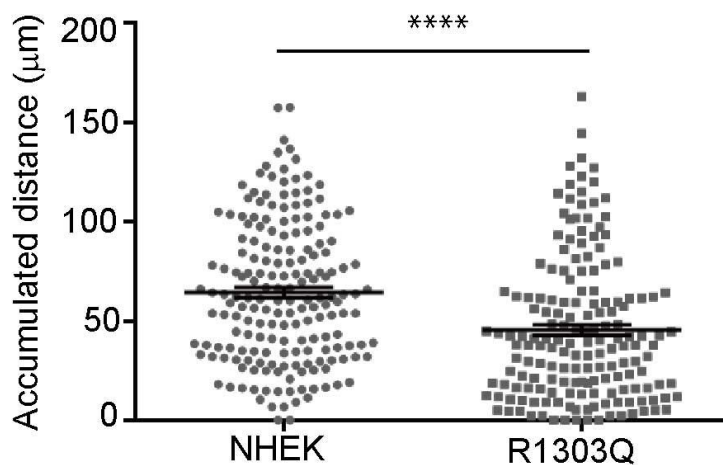


図 32 遊走能の比較

1 時間で移動した累積距離は NHEK と比較し R1303Q KC で有意に減少していた (**** $p=0.0001$)。

次に、接着や遊走において重要な役割を果たすフォーカルコンタクトタンパクを解析した²⁵。図 33 で示すように全周性に分布し NHEK と発現量を比較したが、インテグリン $\alpha 1$ 、 $\beta 3$ ともに有意差はなかった。

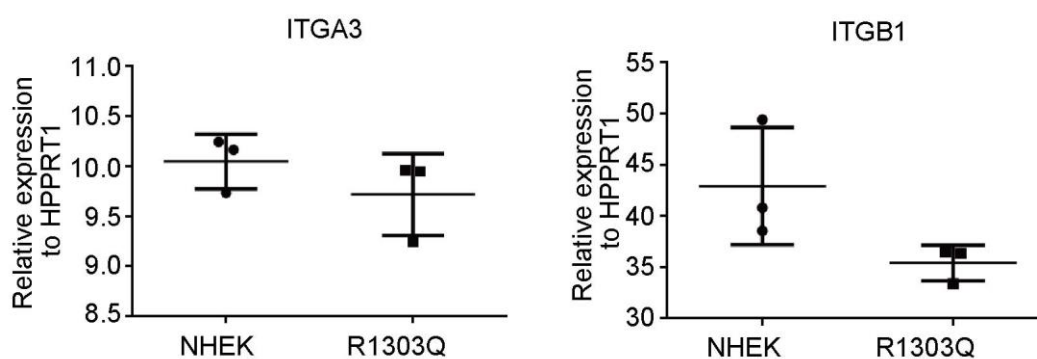


図 33

細胞内での *ITGA3* と *ITGB1* の遺伝子発現量

インテグリン $\alpha 3$ (*ITGA3*, $p=0.3095$) とインテグリン $\beta 1$ (*ITGB1*, $p=0.0952$) の遺伝子発現量に有意差はなかった。

遊走を制御している因子として知られる MMPs と Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) 発現量を解析した。細胞から抽出した mRNA を用いた RT-PCR では、MMP の遺伝子発現レベルは R1303Q KC で低下する傾向にあった (図 34)。

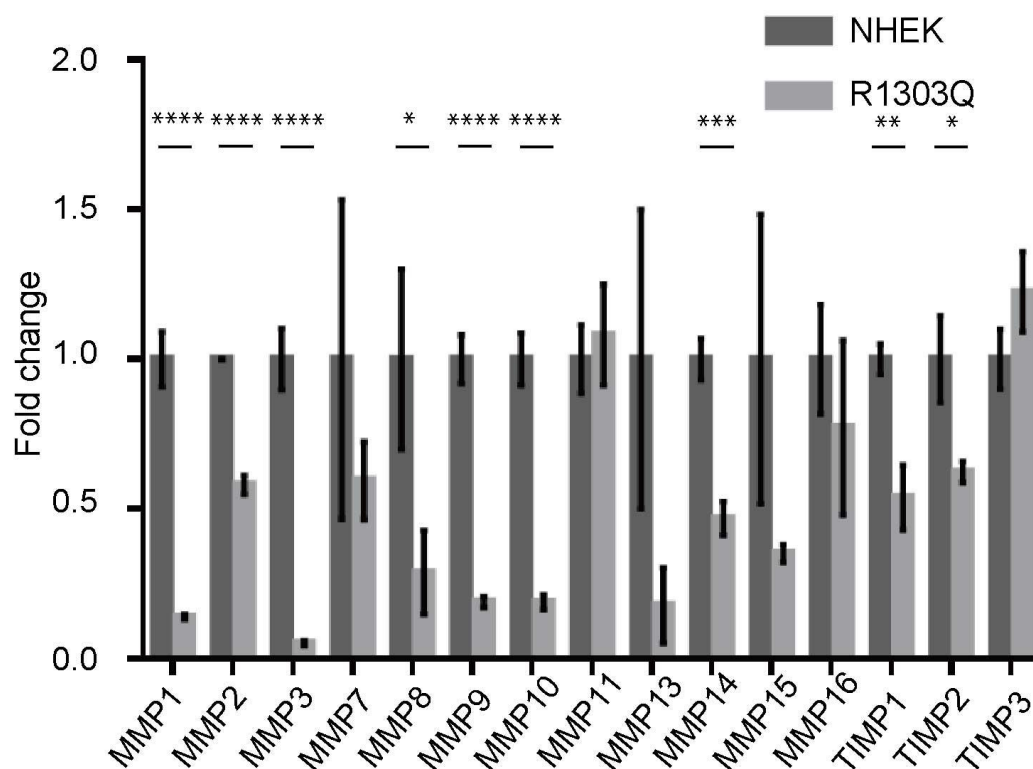


図 34
細胞内での MMP および TIMP の発現

一方で上清中のタンパク発現量には明らかな変化がみられなかった (図 35)。

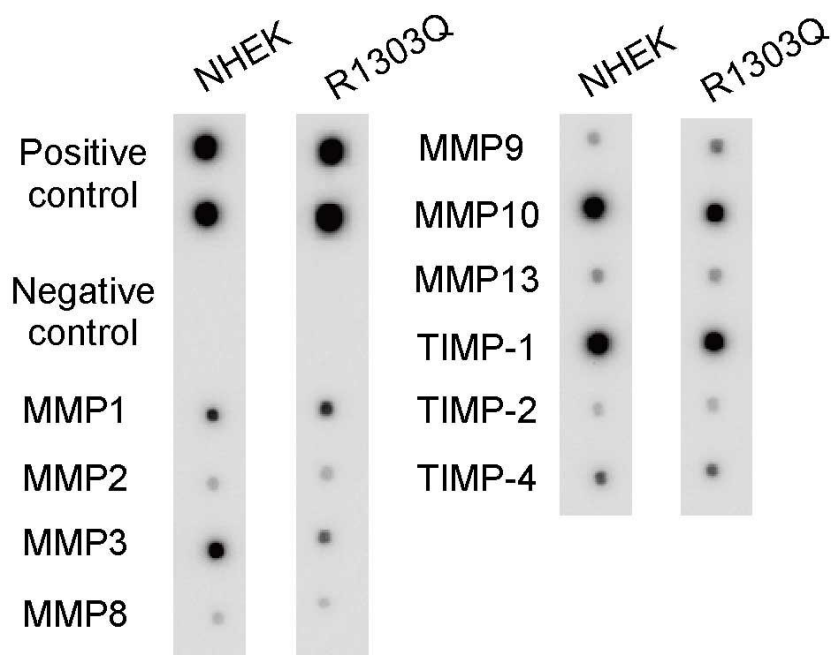


図 35 上清中の MMP および TIMP 発現量の比較

以上の結果から、上清中の MMP や細胞膜上のインテグリンの発現は、R1303Q KC の遊走能を制御していないと推測した。

6. そのほかの ECM タンパク解析

R1303Q 変異をもつ患者では進行する皮膚萎縮、瘢痕、爪異常、手指の瘢痕等の特徴的な臨床症状を示すが^{18,19,21}、この理由は明らかになっていない。そこで臨床的に皮膚の線維化を特徴とする強皮症患者では、初期の真皮では COL5 の発現が亢進していることに注目した⁴¹。興味深いことに、ケラチン 5 をプロモーターとして COL5 を強制発現させた遺伝子改変マウスでは、R1303Q 患者と同様に基底膜の重層化がみられる⁴²。

症例 2 の線維化していない皮膚から表皮角化細胞を培養し、これを本研究に用いたが、図 36 に示すように COL5 をコードする *COL5A1* の発現が R1303Q KC では有意に亢進していた（図 36）。

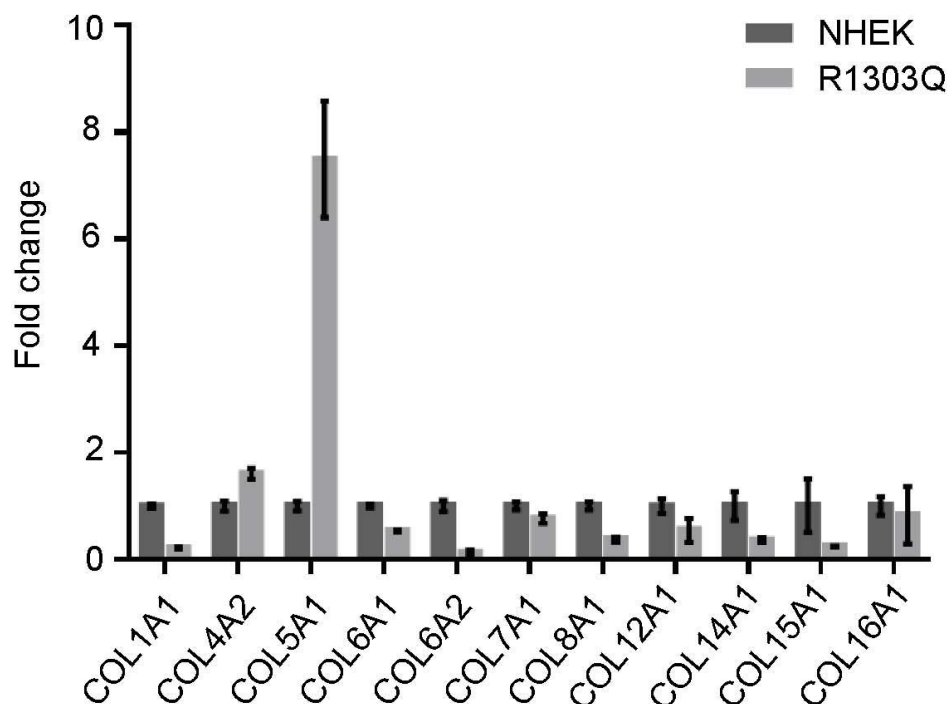


図 36 コラーゲン分子の遺伝子発現量の比較

さらに患者皮膚での COL5 発現を検討した。症例 1, 2 ともに真皮上層での COL5 の発現が正常ヒト皮膚と比較して亢進していた(図 37)。

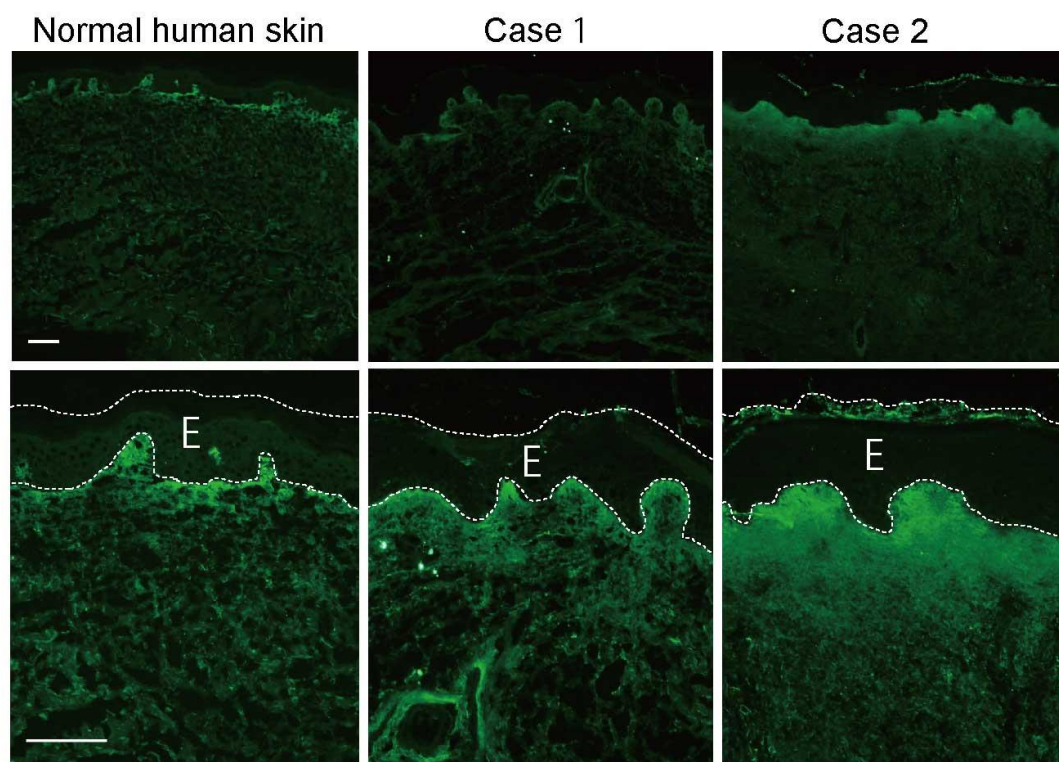


図 37 患者皮膚と正常皮膚における COL5 の発現

(上) 弱拡大、(下) 強拡大。E: epidermis。Scale bar: 100 μ m

これらの所見から、R1303Q KC における COL5 の上昇は臨床的な硬化や組織学的に基底膜の重層化がみられることに関与していると推測される。

図 36 では線維化の際に発現が亢進する *COL1A1* の発現が減少していた。表皮角化細胞でも遺伝子レベルでの *COL1A1* 発現は確認されているが、*COL1A1* がコードする 1 型コラーゲンは主に繊維芽細胞により分泌されるため、本症例の病態には深く関与していないと考えた。図 38 に遺伝子発現を確認した ECM 関連タンパクの fold-change を示す。

	Symbol	Fold Change	p value
1	ADAMTS1	0.5986	0.018401
2	ADAMTS13	0.7685	0.05159
3	ADAMTS8	0.3383	0.039734
4	CD44	0.7133	0.002242
5	CDH1	0.7739	0.008541
6	CLEC3B	0.8375	0.526353
7	CNTN1	7.5731	0.00001
8	COL11A1	18.8	0.115165
9	COL12A1	0.5045	0.042252
10	COL14A1	0.3612	0.013834
11	COL15A1	0.2579	0.05928
12	COL16A1	0.6529	0.623838
13	COL1A1	0.2158	0.000005
14	COL4A2	1.6021	0.001767
15	COL5A1	7.4545	0.000502
16	COL6A1	0.529	0.000017
17	COL6A2	0.1153	0.000202
18	COL7A1	0.76	0.024328
19	COL8A1	0.3671	0.000221
20	CTGF	0.3339	0.000065
21	CTNNA1	0.6797	0.000225
22	CTNNA1	1.1089	0.423239
23	CTNND1	0.9537	0.808889
24	CTNND2	1.9773	0.000013
25	ECM1	0.7478	0.007727
26	FN1	0.1232	0
27	HAS1	0.1614	0.000049
28	ICAM1	0.1	0.000002
29	ITGA1	1.0245	0.868199
30	ITGA2	0.6566	0.001607
31	ITGA3	0.9668	0.309538
32	ITGA4	0.9381	0.20631
33	ITGA5	0.9843	0.790541
34	ITGA6	0.7703	0.045357
35	ITGA7	0.5767	0.00372
36	ITGA8	0.6199	0.881667
37	ITGAL	0.3572	0.090007
38	ITGAM	0.2866	0.0095
39	ITGAV	0.5253	0.000027
40	ITGB1	0.8288	0.095152
41	ITGB2	0.2022	0.000413
42	ITGB3	0.2619	0.01014
43	ITGB4	0.8343	0.081267
44	ITGB5	1.7092	0.001087
45	KAL1	1.3146	0.001019
46	LAMA1	1.4527	0.077736
47	LAMA2	0.8331	0.041259
48	LAMA3	0.7167	0.01648
49	LAMB1	0.9575	0.44833
50	LAMB3	0.5609	0.000239
51	LAMC1	0.8146	0.00191
52	MMP1	0.14	0.00008
53	MMP10	0.1879	0.000103
54	MMP11	1.0761	0.530506
55	MMP12	1.6101	0.399273
56	MMP13	0.1654	0.050569
57	MMP14	0.468	0.000496
58	MMP15	0.3768	0.0809
59	MMP16	0.7413	0.313999
60	MMP2	0.5798	0.000021
61	MMP3	0.0521	0.000092
62	MMP7	0.646	0.269731
63	MMP8	0.2742	0.020886
64	MMP9	0.1903	0.000073
65	NCAM1	0.4165	0.029736
66	PECAM1	0.5299	0.039009
67	SELE	0.339	0.074632
68	SELL	0.4192	0.014451
69	SELP	0.2969	0.08379
70	SGCE	1.789	0.002164
71	SPARC	0.6233	0.00022
72	SPG7	0.9024	0.109212
73	SPP1	2.8326	0.000001
74	TGFB1	1.0105	0.895663
75	THBS1	0.3685	0.000156
76	THBS2	2.2957	0.000159
77	THBS3	1.0893	0.61495
78	TIMP1	0.5321	0.002522
79	TIMP2	0.6274	0.011939
80	TIMP3	1.2235	0.079892
81	TNC	0.2883	0.000077
82	VCAM1	0.1818	0.007588
83	VCAN	3.0123	0.000032
84	VTN	0.9751	0.965742
85	ACTB	0.7888	0.020575
86	B2M	0.7982	0.116234
87	GAPDH	0.7048	0.01443
88	HPRT1	1	0
89	RPLP0	0.6902	0.014717
90	HGDC	0.4602	0.201216
91	RTC	1.4254	0.487673
92	RTC	1.5894	0.398412
93	RTC	1.5162	0.388513
94	PPC	0.5579	0.116966
95	PPC	0.5579	0.118136
96	PPC	0.527	0.136876

图 38

考察

COL17 は表皮基底細胞を真皮と結合させる重要な役割をもった膜貫通型タンパクである。COL17 の重要性は遺伝性の表皮水疱症^{4,43-45}や自己免疫性の水疱症である BP に関する研究^{9,11,46}で明らかにされた。その一方で、COL17 の切断に関する生理学的な役割は十分に明らかにされていない。過去の報告によれば、細胞膜近傍の細胞外領域である NC16A 領域での COL17 の切断は角化細胞の遊走能に関与しており、おそらくこの切断が基底膜からの角化細胞が解離する際に重要であると推測されていた^{36,47,48}。しかし COL17 の C 末端での切断の生理学的な重要性は明らかにされていなかった。本研究では、R1303Q 変異が COL17 の C 末端での切断を阻害していることを明らかにした。さらに変異をもつ患者由来角化細胞を用いた実験で、C 末端での切断が阻害されたことでラミニン 332 の異所性の沈着が生じ、これが基底膜構築異常の原因であることを示した。

ラミニン 332 は基底膜構築に重要な分子であり、他の ECM タンパクに対する受容体として機能している⁴⁹⁻⁵¹。皮膚においてはインテグリン $\alpha 3\beta 1$ と $\alpha 6\beta 4$ インテグリンはそれぞれフォーカルコンタクト、ヘミデスモゾームタンパクの構成分子であるが、両者はラミニン 332 と相互作用を有する⁵²。*In vitro* では遊走する表皮角化細胞はラミニン 332 を ECM 上に分泌する⁵³⁻⁵⁶。ラミニン 332 は細胞の遊走や接着に影響を与えることが知られているが³⁷⁻³⁹、polymerized ラミニン 332 は NHEK の接着を促進する一方で、遊走を阻害することが知られている⁵⁷。これらの所見と一致して、本研究では R1303Q KC の ECM へのラミニン 332 沈着量が増えたことが、遊走能低下や細胞面積の拡大につながったことを示した。

過去の *in silico* の予測とは異なり¹⁹、本研究では R1303Q 変異が COL17 とラミニン 332 の結合能を変化させないことを明らかにした。さらに R1303Q KC 内でのラミニン 332 の遺伝子発現量が減少していた一方で、ECM でのラミニン 332 の沈着量が増加していたことを示した。ラミニン 332 は COL17 の C 末端と相互作用を有することが報告されているが^{19,28,36}、特に COL17 の NC4 領域がラミニン 332 との結合に非常に重要であることが知られている¹⁹。そこで C 末端にある NC4 領域で切断を受けた COL17 は、全長の COL17 に比べてラミニン 332 との結合能は低いのではないかと推測した。本研究では正常および R1303Q を有する COL17 リコンビナントタンパクをプラスミンで切断し、変異が COL17 の NC4 領域での切断を阻害していることを明

らかにした。さらにその結果として ECM へのラミニン 332 の沈着量が増えたと推測した。

*In vivo*で COL17 を 97kDa に切断するプロテアーゼは明らかになっていないが、セリンプロテアーゼであるプラスミンは COL17 を 97kDa に切断することが知られている¹⁵。プラスミンによる COL17 の詳細な切断部位は報告されていないが、分子量に基づき NC4 領域で切断されているのではないかと推測されている。COL17 の NC4 領域はプラスミンの切断部位候補であるアルギニンを 4 つ含み、そのうち 2 つは 1302 番目と 1303 番目である。本研究では R1303Q 変異が COL17 の C 末端での切断を阻害することを示したが、COL17 の C 末端はプラスミンが高濃度であれば、R1303Q 変異を生じてでも COL17 の C 末端を切断可能だった。この結果は COL17 の NC4 領域での切断は生物学的に重要であることを示唆しており、R1303Q 患者では C 末端の切断は R1302 など他の部位で代償されているのではないかと推測した。

基底膜の重層化は基底細胞の様々な分子の異常により引き起こされる。EB 患者では COL17 の R1303Q 変異¹⁸⁻²¹のほか、キンドラー症候群の Kindlin-1²³、インテグリン $\alpha 3$ の欠損²⁴、マウスにおいてはインテグリン $\alpha 3$ ⁵⁸ や 4 型コラーゲンの欠損⁵⁹、COL5 の過剰発現⁴²でも基底膜重層化がみられる。これらの事実は、角化細胞内の分子のみならず ECM に存在する分子も基底膜形成に関与していることを示唆している。しかし、これらの疾患に伴い基底膜が重層化する機序だけでなく、正常の基底膜が形成されるメカニズムは殆ど解明されていない。本研究では COL17 の C 末端での切断が阻害されたことによりラミニン 332 の異所性の沈着がみられ、これが基底膜の重層化を引き起こしたことを示した。正常な基底膜構築のためには ECM タンパクの分解が正しく制御される必要があることを世界で初めて解明したものである。

COL17 に R1303Q 変異を有する EB 患者では、手指などに硬化がみられる。一方でキンドラー症候群²³やインテグリン $\alpha 3$ 欠損^{24,58}など、フォーカルコンタクト構成タンパクの異常により基底膜の重層化がみられる疾患では、皮膚の硬化はみられない。皮膚硬化の原因となる線維化は、活性化された線維芽細胞が ECM タンパクの過剰発現と沈着をひきおこすことが原因とされる⁶⁰。ECM タンパクの主な供給源は線維芽細胞であるが、表皮角化細胞もまた *in vitro* で ECM タンパクの発現を調整している⁶¹⁻⁶⁵。本研究では *in vitro* で表皮角化細胞内での COL5A1 の過剰発現と、線維化がみられない部位から生検した患者皮膚の真皮で COL5 の過剰発現を示した。線維化や線維の太さを調節する際に重要な役割をもつ ECM 構成分子の中では、COL5 は比較的目

立たない分子である^{66,67}。しかし、表皮基底細胞で COL5 が過剰発現するマウスでは基底膜の重層化を認める⁴²。これらの報告を考慮すると、COL5 の発現亢進はごく一部ではあるが、COL17 に p.R1303Q 変異に関連した初期の線維化のメカニズムや基底膜の重層化に重要な役割を果たしていると考ええる。

総括および結論

本研究では以下の新知見を得た。

- ・COL17 の C 末端での切断が表皮基底細胞の遊走や基底膜の構成に重要であることを示した最初の報告である。
- ・ECM タンパクのプロセッシングを正しく制御することが皮膚基底膜の形成には不可欠である。

以上から基底膜ではタンパクが正常に発現するだけでなく、ECM タンパクの分解を正しく制御することも重要であることを示した。COL17 は表皮水疱症や水疱性類天疱瘡の病態に関与する分子であるため、臨床的には水疱症に関連した研究が多い。しかし本研究では、表皮角化細胞が COL17 を介して真皮に存在する分子の制御にも関与していることを明らかにした。

今回の研究では COL17 の p.R1303Q 変異による基底膜重層化のメカニズム解析として、ECM での COL17 とラミニン 332 の相互作用に注目したが、実際には多くの分子が関与していると推測される。BP230 は COL17 と結合する分子の 1 つであるが、COL17 を発現しない JEB 患者の皮膚では BP230 が異所性に分布していることが知られている⁶⁸。本研究では R1303Q 変異が基底細胞内に BP230 の異所性発現を引き起こしていることを示唆した。また 4 型コラーゲンは基底膜の主な構成分子の 1 つであるが、R1303Q KC では遺伝子レベルでわずかな上昇がみられた。このように基底膜の構築、解体に関して未解明な部分も多い。本研究で作成した R1303Q KC をヌードマウスへ移植することや遺伝子改変マウスを作成することで、*in vivo* で R1303Q が ECM へ与える影響を解析し、ECM 分子間相互作用の解析が可能になると考えている。

今後の課題として、*in vitro* での実験系は *in vivo* の病態を忠実に再現することが困難である点があげられる。JEB-LO の患者が診断される時期は 5-17 歳と他の EB と比較して遅いため¹⁹、COL17 に R1303Q 変異を生じるとどの様な時期に基底膜が重層化するかは未だ不明である。本課題の解決のためマウスモデルの作成を予定しているが、解析までに非常に長い期間を要する場合、どの様な手法を用いるかは解決すべき課題の一つである。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授に、そして直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 西江 渉准教授に心より感謝いたします。そして本研究にご協力いただきました表皮水疱症患者さんに深く御礼申し上げます。最後に、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。とくに技術員の田邊美香さんからは、多大なサポートをいただきました。

引用文献

- 1 McMillan, J. R., Akiyama, M. & Shimizu, H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 169-177 (2003).
- 2 Hopkinson, S. B. *et al.* Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**, 247-263 (2014).
- 3 Borradori, L. & Sonnenberg, A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 411-418 (1999).
- 4 McGrath, J. A. *et al.* Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat. Genet.* **11**, 83-86 (1995).
- 5 Ruzzi, L. *et al.* A homozygous mutation in the integrin alpha6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J. Clin. Invest.* **99**, 2826-2831 (1997).
- 6 Vidal, F. *et al.* Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat. Genet.* **10**, 229-234 (1995).
- 7 Franzke, C. W., Tasanen, K., Schumann, H. & Bruckner-Tuderman, L. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol.* **22**, 299-309 (2003).
- 8 Giudice, G. J., Emery, D. J. & Diaz, L. A. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 243-250 (1992).
- 9 Nishie, W. *et al.* Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* **13**, 378-383 (2007).
- 10 Giudice, G. J. *et al.* Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J. Immunol.* **151**, 5742-5750 (1993).
- 11 Nishie, W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J. Dermatol. Sci.* **73**, 179-186 (2014).
- 12 Hirako, Y., Usukura, J., Nishizawa, Y. & Owaribe, K. Demonstration of the molecular shape of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J. Biol. Chem.* **271**, 13739-13745

- (1996).
- 13 Zimina, E. P., Bruckner-Tuderman, L. & Franzke, C. W. Shedding of collagen XVII ectodomain depends on plasma membrane microenvironment. *J. Biol. Chem.* **280**, 34019-34024 (2005).
 - 14 Franzke, C. W., Bruckner-Tuderman, L. & Blobel, C. P. Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J. Biol. Chem.* **284**, 23386-23396 (2009).
 - 15 Hofmann, S. C. *et al.* Plasmin plays a role in the in vitro generation of the linear IgA dermatosis antigen LADB97. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1730-1739 (2009).
 - 16 Franzke, C. W. *et al.* Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* **21**, 5026-5035 (2002).
 - 17 Fine, J. D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 1103-1126 (2014).
 - 18 Yuen, W. Y., Pas, H. H., Sinke, R. J. & Jonkman, M. F. Junctional epidermolysis bullosa of late onset explained by mutations in COL17A1. *Br. J. Dermatol.* **164**, 1280-1284 (2011).
 - 19 Has, C. *et al.* The missense mutation p.R1303Q in type XVII collagen underlies junctional epidermolysis bullosa resembling Kindler syndrome. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 845-849 (2014).
 - 20 Vanotti, S. *et al.* Late-onset skin fragility in childhood: a case of junctional epidermolysis bullosa of late onset caused by a missense mutation in COL17A1. *Br. J. Dermatol.* **169**, 714-715 (2013).
 - 21 Schumann, H. *et al.* Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* **60**, 1344-1353 (1997).
 - 22 Kiritsi, D. *et al.* Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J. Med. Genet.* **48**, 450-457 (2011).
 - 23 Has, C. *et al.* Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history. *Hum. Mutat.* **32**, 1204-1212 (2011).
 - 24 Has, C. *et al.* Integrin alpha3 mutations with kidney, lung, and skin disease. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1508-1514 (2012).
 - 25 Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K. J. & Jones, J. C. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **62**,

- 1-7 (2011).
- 26 Siegel, D. H. *et al.* Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am J Hum Genet* **73**, 174-187 (2003).
 - 27 Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. & Burgeson, R. E. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* **114**, 567-576 (1991).
 - 28 Tasanen, K. *et al.* Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *Am. J. Pathol.* **164**, 2027-2038 (2004).
 - 29 Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K. & Timpl, R. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* **184**, 241-248 (1989).
 - 30 Tsunenaga, M. *et al.* Laminin 5 can promote assembly of the lamina densa in the skin equivalent model. *Matrix Biol.* **17**, 603-613 (1998).
 - 31 Natsuga, K. *et al.* Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. *J. Immunol.* **188**, 5792-5799 (2012).
 - 32 Has, C. *et al.* Kindlin-1 Is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes. *Am. J. Pathol.* **175**, 1442-1452 (2009).
 - 33 Nishie, W. *et al.* Ectodomain shedding generates Neopeptides on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. *J. Immunol.* **185**, 4938-4947 (2010).
 - 34 Hirako, Y. *et al.* The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1554-1556 (2003).
 - 35 Syrovets, T., Lunov, O. & Simmet, T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 509-519 (2012).
 - 36 Nishie, W. *et al.* Dynamic interactions of epidermal collagen XVII with the extracellular matrix: laminin 332 as a major binding partner. *Am. J. Pathol.* **179**, 829-837 (2011).
 - 37 Miyazaki, K. *et al.* A large cell-adhesive scatter factor secreted by human gastric carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11767-11771 (1993).
 - 38 Kikkawa, Y., Umeda, M. & Miyazaki, K. Marked stimulation of cell adhesion and motility by ladsin, a laminin-like scatter factor. *J Biochem* **116**, 862-869 (1994).

- 39 Rousselle, P. & Aumailley, M. Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J. Cell Biol.* **125**, 205-214 (1994).
- 40 Loffek, S. *et al.* Transmembrane collagen XVII modulates integrin dependent keratinocyte migration via PI3K/Rac1 signaling. *PLoS One* **9**, e87263 (2014).
- 41 Martin, P. *et al.* Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **11**, 827-835 (2012).
- 42 Bonod-Bidaud, C. *et al.* In vivo evidence for a bridging role of a collagen V subtype at the epidermis-dermis interface. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1841-1849 (2012).
- 43 Fine, J. D. *et al.* The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J. Am. Acad. Dermatol.* **58**, 931-950 (2008).
- 44 Pasmooij, A. M. *et al.* Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to COL17A1 mutations in the Netherlands. *Br. J. Dermatol.* **156**, 861-870 (2007).
- 45 Murrell, D. F. *et al.* Retrospective diagnosis of fatal BP180-deficient non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa suggested by immunofluorescence (IF) antigen-mapping of parental carriers bearing enamel defects. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1772-1775 (2007).
- 46 Liu, Z. *et al.* Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *J. Autoimmun.* **31**, 331-338 (2008).
- 47 Hirako, Y., Yoshino, K., Zillikens, D. & Owaribe, K. Extracellular cleavage of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen and its involvement in hemidesmosomal disassembly. *J Biochem* **133**, 197-206 (2003).
- 48 Nishie, W. *et al.* Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *Am. J. Pathol.* (2015).
- 49 Dowling, J., Yu, Q. C. & Fuchs, E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* **134**, 559-572 (1996).
- 50 Gagnoux-Palacios, L. *et al.* Functional Re-expression of laminin-5 in laminin-gamma2-deficient human keratinocytes modifies cell morphology, motility, and adhesion. *J. Biol. Chem.* **271**, 18437-18444

- (1996).
- 51 Shinkuma, S., McMillan, J. R. & Shimizu, H. Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa. *Clin. Dermatol.* **29**, 412-419 (2011).
 - 52 Kiritsi, D., Has, C. & Bruckner-Tuderman, L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr* **7**, 135-141 (2013).
 - 53 Gagnoux-Palacios, L. *et al.* The short arm of the laminin gamma2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion. *J. Cell Biol.* **153**, 835-850 (2001).
 - 54 Frank, D. E. & Carter, W. G. Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *J. Cell Sci.* **117**, 1351-1363 (2004).
 - 55 deHart, G. W., Healy, K. E. & Jones, J. C. The role of alpha3beta1 integrin in determining the supramolecular organization of laminin-5 in the extracellular matrix of keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **283**, 67-79 (2003).
 - 56 Sehgal, B. U. *et al.* Integrin beta4 regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *J. Biol. Chem.* **281**, 35487-35498 (2006).
 - 57 Kariya, Y., Sato, H., Katou, N. & Miyazaki, K. Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration. *PLoS One* **7**, e35546 (2012).
 - 58 DiPersio, C. M. *et al.* alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J. Cell Biol.* **137**, 729-742 (1997).
 - 59 Lettmann, S. *et al.* Col6a1 null mice as a model to study skin phenotypes in patients with collagen VI related myopathies: expression of classical and novel collagen VI variants during wound healing. *PLoS One* **9**, e105686 (2014).
 - 60 Canady, J., Karrer, S., Fleck, M. & Bosserhoff, A. K. Fibrosing connective tissue disorders of the skin: molecular similarities and distinctions. *J. Dermatol. Sci.* **70**, 151-158 (2013).
 - 61 Garner, W. L. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. *Plast. Reconstr. Surg.* **102**, 135-139 (1998).
 - 62 Harrison, C. A. *et al.* Investigation of keratinocyte regulation of collagen I synthesis by dermal fibroblasts in a simple in vitro model. *Br. J. Dermatol.* **154**, 401-410 (2006).

- 63 Lacroix, M., Bovy, T., Nusgens, B. V. & Lapiere, C. M. Keratinocytes modulate the biosynthetic phenotype of dermal fibroblasts at a pretranslational level in a human skin equivalent. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 659-664 (1995).
- 64 Sawicki, G. *et al.* Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.* **269**, 209-216 (2005).
- 65 Koskela, A. *et al.* Regulation of fibroblast gene expression by keratinocytes in organotypic skin culture provides possible mechanisms for the antifibrotic effect of reepithelialization. *Wound Repair Regen.* **18**, 452-459 (2010).
- 66 Chanut-Delalande, H. *et al.* Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6049-6057 (2004).
- 67 Sun, M. *et al.* Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J. Cell Sci.* **124**, 4096-4105 (2011).
- 68 Borradori, L. *et al.* Role of the bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of hemidesmosomes and cell adhesion--reexpression of BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **239**, 463-476 (1998).