

学 位 論 文 題 名

Expression of mRNA for type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains by cultured dermal fibroblasts from patients with X-linked Alport syndrome

(X連鎖アルポート症候群患者の培養皮膚線維芽細胞による
IV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ 鎖 mRNA の発現)

学位論文内容の要旨

1. 概要

6 種ある IV 型コラーゲン [$\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$]のうち、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の異常により発症する X 連鎖アルポート症候群(XLAS)患者の皮膚あるいは腎基底膜においては、しばしば、変異蛋白である $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖のみならず、 $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖も欠損し、また腎糸球体基底膜における $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の発現は増強する。本研究においては、正常および XLAS 患者から得られた培養皮膚線維芽細胞を用いて、その $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA 発現を解析する系を確立することによって、上記の疑問の解明を試みた。その結果、XLAS 患者の皮膚線維芽細胞は、少なくとも *in vitro* においては正常と同様のレベルの $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA を発現していることが判明した。また同時に行った患者皮膚基底膜の免疫染色では、やはり $\alpha 6(\text{IV})$ が発現低下ないし欠損することから、XLAS 皮膚基底膜における $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現異常は、 $\alpha(\text{IV})$ 鎖蛋白翻訳後に基底膜形成の過程で生じてくる事が示唆された。

2. 背景と目的

基底膜構成成分としてきわめて重要な蛋白である IV 型コラーゲンは、現在まで 6 種の鎖タイプ [$\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$]が存在することが知られ、この中の 3 本が組合わさって三重鎖構造を形成する。また、全身各臓器の基底膜に大量に分布する $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 2(\text{IV})$ と、腎臓をはじめとする限られた組織の基底膜に分布し微量ながら基底膜の特殊機能の維持に重要な役目をなす $\alpha 3(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖とは、各々独立したネットワークを形成していると考えられる。 $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ 遺伝子は、3 種の染色体に 2 種ずつ対をなして存在する [$\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ は 13 番染色体、 $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ は 2 番染色体、 $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ は X 染色体に、それぞれ転写開始点を head to head に向き合わせて存在する]。

アルポート症候群は、感音性難聴や円錐角膜などの眼異常をしばしば合併する進行性の遺伝性腎疾患である。病理学的には、腎糸球体基底膜の菲薄化、層状化など特徴的な電顕所見を呈する。1990 年、XLAS が、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の変異で起こることが初めて証明されて以来、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異についての数多くの報告が存在する。しかし、それぞれの遺伝

子変異が、最終的に本症に特徴的な糸球体基底膜病変を引き起こす機序は未だ証明されていない。たとえば、本症候群基底膜では、変異蛋白である $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖だけではなく、その他の α 鎖[$\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖]も欠損[免疫染色レベルでの腎基底膜における $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の消失、皮膚基底膜における $\alpha 6(\text{IV})$ の消失]することが知られている。それに対し、 $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の発現は、糸球体基底膜において増強する。

本研究では、培養皮膚線維芽細胞を用いて $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA 発現の検討が可能なることを証明し、また以下のことを明らかにする事を試みた。(i) 各種 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の変異が、それぞれ $\alpha 5(\text{IV})$ mRNA 発現量に及ぼす影響するか (ii) 各種 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異が、 $\alpha 6(\text{IV})$ mRNA 発現量を抑制し得るか (iii) 各種 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異が、 $\alpha 1(\text{IV})$ mRNA 発現量を増加し得るか。

3. 結果と考察

a) 正常培養皮膚線維芽細胞による IV 型コラーゲン α 鎖 mRNA の発現

mRNA 発現の検討には、 $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA 配列にそれぞれ特異的 RNA プローブを設計し、RNase protection assay を用いた。これにより、正常培養皮膚線維芽細胞は、6 種の $\alpha(\text{IV})$ 鎖のうち $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA を発現していることが示された。またこれは、皮膚基底膜の $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現パターンとも一致し、線維芽細胞が皮膚基底膜の形成、維持に寄与していることを強く支持する所見と考えられた。

b) XLAS 培養皮膚線維芽細胞による $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA の発現

9 名 XLAS 患者の皮膚から得られた培養皮膚線維芽細胞を用いて検討した (正常コントロールは 8 名)。9 名の患者のうち 5 名でその $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異が判明している (エクソン 4 から 3'末端までの欠失 1 名、*splice*変異 2 名、点変異 2 名)。

- (i) $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 mRNA について: $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の欠失例を除いて、全ての患者で mRNA が検出された。ナンセンス変異症例 (他の遺伝性疾患で mRNA 発現量を減少させる事が報告されている - nonsense mRNA decay)を含めて、XLAS における $\alpha 5(\text{IV})$ mRNA 発現量は正常と有意差を認めなかった。
- (ii) $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA について: 構造上、 $\alpha 6(\text{IV})$ 遺伝子は、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子とプロモーター領域を共有しながら head to head に向き合って存在するが、 $\alpha 6(\text{IV})$ mRNA は、欠失例を含めて全例に検出された。また、その発現量も正常と有意差を認めなかった。
- (iii) $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 mRNA について: 欠失例 1 例において、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 mRNA 発現量の有意な増加を認めた。しかし、その他の例においては、その発現量は正常と有意差を認めなかった。

c) XLAS 患者皮膚基底膜における $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖蛋白の発現

4 名の XLAS 患者において、モノクローナル抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。いずれの症例も、*in vitro* においては皮膚線維芽細胞が mRNA を充分量発現しているにも関わらず、その蛋白レベルの発現は、 $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ ともに欠損ないし著しい低下を示した。

4. 結論

ヒト培養線維芽細胞は、 $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA を発現している事を示し、また、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖遺伝子異常により発症する XLAS 基底膜における他の $\alpha(\text{IV})$ 鎖の発現異常は、蛋白

翻訳後に基底膜形成の段階で生じてくる事が示唆された。

さらに、この培養皮膚線維芽細胞による α (IV)鎖発現系を用いることにより、糸球体基底膜における IV 型コラーゲン α 5(IV), α 6(IV)鎖の役割をさらに解明することができると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

Expression of mRNA for type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains by cultured dermal fibroblasts from patients with X-linked Alport syndrome

(X連鎖アルポート症候群患者の培養皮膚線維芽細胞による
IV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ 鎖 mRNA の発現)

アルポート症候群は、感音性難聴や円錐角膜などをしばしば合併する進行性の遺伝性腎疾患である。病理学的には、腎糸球体基底膜の菲薄化、層状化など特徴的な電顕所見を呈する。遺伝的にX連鎖性と常染色体性があり、X連鎖アルポート症候群(XLAS)は、6種類あるIV型コラーゲン[$\alpha 1(\text{IV}) \sim \alpha 6(\text{IV})$]のうち $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の変異で起こってくることが証明されて以来、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異についての数多くの報告が存在する。しかし、その遺伝子変異が、最終的に本症に特徴的な糸球体基底膜病変を引き起こす機序は未だ証明されていない。たとえば、本症候群基底膜では、変異蛋白である $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖だけではなく、その他の α 鎖[$\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖]も免疫染色レベルで欠損することが知られている。それに対し、 $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の発現は、糸球体基底膜において増強する。本研究では、正常の培養皮膚線維芽細胞が $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA 発現をすることを証明し、次いで、患者および正常の培養皮膚線維芽細胞を用いて、(i) 種々の異なる $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異とその mRNA 発現量の関係 (ii) それぞれの $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子変異と $\alpha 6(\text{IV})$ mRNA および $\alpha 1(\text{IV})$ mRNA 発現量の関係、を検索した。[材料と方法] 9例の異なる患者(内5例で変異が確定している: エクソン4から3'末端までの欠失1名、スプライス変異による premature stop codon 2名、点変異2名)から皮膚線維芽細胞を得た。IV型コラーゲン mRNA 発現の検討には、 $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA 配列にそれぞれ特異的 RNA プロブを設計し、RNase protection assay を用いて行った。なお、蛋白質発現の検索はモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に行った。[結果と考察] 正常培養皮膚線維芽細胞は、6種の α 鎖のうち $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$,

$\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA を発現していることが示された。これは、IV 型コラーゲンが線維芽細胞が皮膚基底膜の形成、維持に寄与していることを強く支持する所見と考えられた。9 名の XLAS 患者の皮膚から得られた培養皮膚線維芽細胞では、(i) $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 mRNA は、一例の欠失例を除いて、全ての患者で mRNA が検出された。(ii) $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 mRNA は、 $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子とプロモーター領域を共有しながら head to head に向き合って存在するが、この mRNA は、 $\alpha 5(\text{IV})$ 欠失例を含めて全例に検出された。また、その発現量も正常と有意差を認めなかった。(iii) $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 mRNA は $\alpha 5(\text{IV})$ 欠失例 1 例において、有意な増加を認めた。しかし、その他の例においては、その発現量は正常と有意差を認めなかった。4 名の XLAS 患者において、モノクローナル抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。いずれの症例の皮膚線維芽細胞も $\alpha 1(\text{IV})$ 蛋白の発現は認めたが、 $\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 6(\text{IV})$ に関しては、その mRNA を充分量発現しているにも関わらず、蛋白レベルの発現はともに欠損ないし著しい低下を示した。以上から、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖遺伝子異常により発症する XLAS 基底膜における他の $\alpha(\text{IV})$ 鎖の発現異常は、蛋白翻訳後に基底膜形成の段階で生じてくる事が示唆された。さらに、この培養皮膚線維芽細胞による IV 型コラーゲン $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現系は、糸球体基底膜における同分子鎖の役割をさらに解明する手段になると期待された。

公開発表に際し、副査の吉木教授から、XLAS における他の症状と IV 型コラーゲン変異との関係、mRNA が発現しながら蛋白として発現しない機序に関して、腎基底膜の機能について、XLAS の genotype と phenotype 関係についてなど、また副査の小池教授から、XLAS で IV 型コラーゲンの mRNA があるにも関わらず蛋白として同定できない理由について、とくに変異 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖に起因する蛋白の 3 次構造との関係、この研究を皮膚線維芽細胞で行った意義についてなど、主査の小林教授から、蛋白発現を抗体で見ることの妥当性、XLAS の線維芽細胞への正常 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖遺伝子導入による IV 型コラーゲンの再構成実験の可能性などの質問がなされたが、申請者は何れに対しても実験結果と文献を引用し、適切な回答を行った。審査員一同は、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖遺伝子異常を呈する XLAS 基底膜における他の $\alpha(\text{IV})$ 鎖の発現異常の機序を分子生物学的および免疫組織学的手法で解析したこと、また培養皮膚線維芽細胞による $\alpha(\text{IV})$ 鎖発現系が糸球体基底膜における IV 型コラーゲンの研究に応用できることを明らかにした点を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。