

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2011 年度

課題番号：23659542

研究課題名（和文） 表皮ギャップジャンクションの網羅解析と難聴を伴った掌蹠角化症の病態探索

研究課題名（英文） Gene analysis of epidermal gap junction and pathological search for palmoplantar hyperkeratosis associated with hearing impairments

研究代表者

神戸 直智 (KAMBE, Naotomo)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50335254

研究成果の概要（和文）：

難聴を伴う掌蹠角化症の母子例と同じ臨床症状を呈する個発例を数例経験し、ミトコンドリア DNA やコネクシン (Cx) の異常が報告されている症例と臨床症状が合致するにも関わらず、これらの異常は検出できなかった。患者由来の表皮細胞と健常者から得た表皮細胞では、その増殖や分化に差は認められず、三次元培養した際の形態も障害は生じなかった。また、Cx 遺伝子の発現を解析したが、これも差異を認めることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

We have experienced a mother and her son suffering from palmoplantar hyperkeratosis with hearing impairments and also some unrelated patients. Even though they showed clinical symptoms identified to be almost same as the reported cases with mutations within mitochondria DNA or Connexin (Cx) genes coding of gap junctions, we cannot find any mutations in those reported genes. In conventional 2D culture condition of keratinocytes, no significant differences were observed between patient-derived and control cells in proliferation and differentiation. Even in 3D culture system, any impairments in patient-derived cells and significant difference in Cx gene expression were not observed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：挑戦的萌芽研究

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 11・皮膚科学 714

キーワード：皮膚病理学・角化症

1. 研究開始当初の背景

臨床の場での患者との出会いを契機に、我々は自然免疫に関わる分子の遺伝子異常によ

って肉芽腫や蕁麻疹などの臨床症状を呈する自己炎症疾患の解析 (Nakamura Y, et al. *J Exp Med* 2009, Okafuji I, et al. *Arthritis Rheum* 2009, Saito H, et al. *Blood* 2008) に携わり、ヒ

トの全ゲノム配列が解読された今日、遺伝性疾患が遺伝子の機能解析に貴重な情報をもたらすと実感した。

その中で我々は、難聴を伴う掌蹠角化症の母子例を経験し、同じ臨床症状を呈する個発例も数例経験した。難聴を伴う掌蹠角化症では、母系遺伝のものの一部ではミトコンドリア DNA の異常が、それ以外のものでは Gap junction に関わるコネクシン (Connexin, Cx) の異常が報告されているが、自験例ではミトコンドリア DNA の既報告領域および Cx 26 (GJB2), Cx 31 (GJB3), Cx 30.3 (GJB4), Cx 30 (GJB6), Cx 43 (GJA1) の全配列を検索したが、異常は検出できなかった。

Gap junction は、Cx 蛋白 6 個が作るコネクソンという単位が、隣り合う細胞間同士で 2 つ結合することで形成され、中央がトンネル状になることで分子量 1.8 kDa 以下の分子を通過させ細胞間の情報伝達を行い、細胞集団の協調的機能調節に重要な働きをしていると推測される。我々は、これまでに、抗原提示細胞として機能する樹状細胞に Gap junction が存在し、これを介した情報伝達が細胞の活性化に関与していることを報告した (Matsue H, et al. *J Immunol.* 2006)。しかしながら、表皮細胞間における Gap junction が角化というステップで、いかなる機能を担っているかは明らかでない。

2. 研究の目的

今日まで、Gap junction が角化というステップに、いかに関わっているかは明らかにされていない。本研究は、表皮細胞間における Gap junction が角化というプロセスにいかに関わるのかを明らかにすることを目的としており、その解析の足がかりとなる。

特に、ヒトにおいて掌蹠の角化という表現形を示していることから、Gap junction を構成するコネクシン (Cx) の異常は、表皮細胞においては顆粒層および角質の肥厚をもたらす増殖あるいは分化の異常に結びつく機能を担っていると推測される。この際、Cx 異常を背景とする掌蹠角化症は優性遺伝形式を示すことから、異常な構造を示す Cx が一定以上の割合で存在すること、あるいは

は正常な Cx の発現量の一部が低下することで、機能的な障害を生じると推測される。このことは、表皮細胞へ変異を持った Cx を外来性に遺伝子移入する、あるいはその発現を部分的であれ抑制することで、表皮細胞における Gap junction の機能を評価する系を確立することが可能であることを示しており、表皮細胞の分化様式を明らかにするための新たな分子メカニズム評価法の確立につながる。

さらには、アトピー性皮膚炎の発症にフィラグリンの異常に関わることが明らかにされて以降、皮膚のバリア機能の障害とアレルギー性疾患の発症およびその病態への修飾が注目を集めている。表皮における Gap junction というバリア構成成分が表皮細胞の分化に果たす役割を検討する本研究での成果は、皮膚のバリア機能の障害がアレルギー性疾患の発症およびその病態への修飾にいかに関わるかという解析においても新たなアプローチとなる視点を提供できるものと期待される。

本研究は、掌蹠角化症という遺伝性疾患を足がかりに遺伝子の機能を検討するという戦略のため、候補遺伝子が角化の異常という表皮細胞の分化および増殖に関わることが担保されている。また、本研究での成果は、表皮細胞間における Gap junction が角化に及ぼす機能について有用な情報をもたらすと期待され、角化異常症の治療を考える上での分子生物学的基盤となり得る。

3. 研究の方法

- 表皮細胞間における Gap junction が角化に及ぼす機能について検討を行うため、難聴を伴った掌蹠角化症患者および健康者からの表皮細胞の培養を行う。
- 三次元培養を行った表皮細胞から発現する mRNA を単離し、Gap junction に関わるコネクシン (Cx) の発現に注目して、qPCR 法を用いて Cx family 分子を網羅的に検討する。
- 健康者に比して遺伝子発現の差異が認められた候補遺伝子のシーケンスを、エクソンのみならず遺伝子発現に関わ

る 5UTR 領域を含めて検討する。

- 表皮細胞への同定された遺伝子導入を行い、細胞の増殖および分化能への影響を検証する。

これらを当初の研究目標として設定した。

具体的には、本研究の基盤となる技術として、研究協力者の鎌田（千葉大）は、患者検体から効率よく表皮細胞の三次元培養を行うシステムを確立した（未発表データ）。この表皮細胞の三次元培養実験の実施に当たっては、学内の倫理委員会の承認を得て実施している。

難聴を伴った掌蹠角化症患者および健常者からの表皮細胞の培養に際しては、十分なインフォームドコンセントを行い文章にて同意を得た後、検体を採取し、表皮細胞の単層培養および三次元培養を行った。その後、掌蹠角化症患者由来の培養表皮細胞の形態を、健常者由来の培養表皮細胞と比較した。すなわち、単層培養系において、表皮細胞の増殖能、培養液中の Ca^{2+} 濃度を変化させた際の分化度を、表皮各層に発現する特異的遺伝子・蛋白の発現の差異として、PCR 法や western blotting 法にて検証した。さらに、両者を三次元培養した際の形態学的な差異を検討した。次いで、三次元培養を行った表皮細胞から発現する mRNA を単離し、解析に際しては、Gap junction に関わるコネキシン (Cx) の発現に注目して、定量性に優れる qPCR 法を用いて Cx family 分子を網羅的に検討した。

4. 研究成果

解析対象とした難聴を伴った掌蹠角化症症例において、ミトコンドリア DNA の既報告領域および Cx 26 (GJB2), Cx 31 (GJB3), Cx 30.3 (GJB4), Cx 30 (GJB6), Cx 43 (GJA1) の全配列を検索し、変異が検出できないことを再度確認した。その上で、健常者および患者検体よりインフォームドコンセントを行い同意を得た後、表皮細胞の培養を行った。

しかしながら、単層培養系での表皮細胞の増殖能、培養液中の Ca^{2+} 濃度を変化させた際の分化度に関しては、患者由来の表皮細胞と

コントロールとしての健常者から得た表皮細胞では差違は認められなかった。さらに、三次元培養した際の形態学的な差異を検討しても、患者由来の表皮細胞に障害は生じていなかった。また、PCR にて Cx 遺伝子の発現を網羅的に解析したが、発現に健常者由来の表皮細胞と比して差異を認めることはできなかった。このため、今回樹立した培養細胞を用いて発現遺伝子の網羅解析を行うため、その前段階として健常者から樹立した三次元培養系を用いて、共同研究を行っているかずさ DNA 研究所（千葉県木更津市）において遺伝子発現の網羅的解析を実施した。

現在までのところ、難聴を伴った掌蹠角化症症例の病態を明らかにできる成果は残念ながら得られていないが、これらの解析を通じて角化症研究を専門としている先生方に Cx の遺伝子異常を当教室で行っていることが認知され、長崎大学の皮膚科から遺伝子検査を依頼されるなど、萌芽研究としては一定の成果を上げられたと思う。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Kimura A, Kambe N, Satoh T, Togawa Y, Suehiro K, Matsue H. (2011)
Follicular keratosis and bullous formation are typical signs of extragenital lichen sclerosis.
*J Dermatol.*38: 834-36.
PMID: 21352315
Doi: 10.1111/j.1346-81382010.01079.x
査読：有
2. Nakano M, Kambe N, Satoh T, Togawa Y, Kamada N, Matsue H. (2011)
Dermoscopy of keratosis follicularis squamosa
Dermatology Reports. 3: e26
Doi: 10.4081/dr.2011.e26
査読：有

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 林 郁伶, 神戸直智, 田島綾子, 松江弘之, 高橋健造 (2011)
限局性掌蹠角化症の1例
(第26回角化症研究会, 7月30日, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸 直智 (KAMBE, Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50335254

(2) 研究分担者

松江 弘之 (MATSUE, Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10250424

(3) 連携研究者

鎌田 憲明 (KAMADA, Noriaki)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 10250424