

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791148

研究課題名(和文) KID症候群モデルマウスにおける発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) the mechanism of carcinogenesis in KID (Keratitits-ichthyosis-defness) syndrome by model mouse

研究代表者

藤山 俊晴 (FUJIYAMA, Toshiharu)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60402301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発癌を来したKID症候群患者の変異遺伝子を表皮に発現するモデルマウスを作成し、KID症候群で発癌を来す機序を解明することを目的としていた。作成されたモデルマウスでは、特徴的なフェノタイプを来したが、自然発がんはみらず、紫外線を照射したところ、潰瘍形成し治癒が遅延したが、発癌は認められなかった。一部のモデルマウスでは、多発膿瘍を形成し免疫不全の合併が示唆されたがT細胞のサイトカイン産生能等は保たれていた。免疫不全が発癌に関与した可能性も考えられた。紫外線照射を行うと、変異Cx26遺伝子を導入したHaCaT細胞では細胞死が軽度抑制されており、これが発癌と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism of carcinogenesis in KID (Keratitits-ichthyosis-defness) syndrome by model mouse. The model mouse expressed mutated Connexin 26(Cx26) gene in the epidermis. The mutation was from a patient with KID syndrome with skin cancer. Some of the mice had unusual phenotype, but none of them had progressed skin cancer before they died. We irradiated UVB on the mice. Although no skin cancer was induced by UVB irradiation, the irradiated skin developed ulceration and persisted for several months. Some of the mice had multiple abscess, indicating the complication of immunodeficiency. Although the T cell function seemed normal, some immunodeficiency can be associated with carcinogenesis.

We transfected the mutated gene to the HaCaT cells, and irradiated UVB. The cell death by UVB irradiation was decreased by the gene transfection. This result suggested that mutated Cx26 gene can be related to the UV associated carcinogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学

キーワード：Connexin 26

1. 研究開始当初の背景

コネキシン蛋白の6量体はコネクソンを形成しヘミチャネル及びギャップ結合を形成する。ギャップ結合は、隣接する細胞同士の小分子などの交換を行い細胞の代謝活性を統一するチャネルの役割を担っている。このコネキシン分子の一つであるコネキシン26と発がんやがんの性質との関わりがこれまでに、論じられてきた。具体的には、各種のがんでその遺伝子の発現の増加が報告されているほか、悪性黒色腫の転移における役割が議論されたり、マウスの化学発癌の系では発癌プロモータの TPA シグナルの下流にあることなどが知られている(Wang X et al. Exp Dermatol. 2009)。

この様にコネキシン26は発癌や、癌の性質を決定する上で重要な役割を占めると考えられているが、実際の発癌におけるコネキシン26の詳細な分子機序は不明である。

コネキシン26をコードする遺伝子である GJB2 (NM 004004) の変異が原因で発症すると報告されている Keratitis-ichthyosis-defness(KID)症候群(OMIM #148210)は、角膜炎、過角化、難聴を特徴とする。KID 症候群は時に皮膚がんを併発することから、コネキシン26の変異と皮膚がん発症の関連性が注目されている。

最近、我々は KID 症候群で顔部に皮膚の有棘細胞癌を発症した患者のコネキシン26の遺伝子解析で、ミスセンス変異(Cx26 D50N)を同定し報告した(Sakabe J, et al J Dermatol. 2012.)。この患者では、他の臓器の悪性腫瘍も合併しており、疾患と悪性腫瘍の関連が示唆された。

さらに、同一の遺伝子変異を有する KID 症候群患者で有棘細胞癌を発症した症例の報告が過去に複数存在していることから、本変異は発癌に関連している可能性が高いと考えた。

我々はこの変異をもった遺伝子を導入し、その発現を K14 プロモータにより制御させることで皮膚に変異型コネキシン26を高発現させる KID 症候群のモデルマウスの作成に成功した。

本研究では、このモデルマウスを用いて発癌を調べ、コネキシン26の変異と発癌のメカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

Keratitis-ichthyosis-defness(KID)症候群は、角膜炎、過角化、難聴を主な特徴とする疾患であるが、これらの症状に加えて、皮膚悪性腫瘍を合併したとの報告が複数なされている。本疾患の原因遺伝子はコネキシン26であり、複数の遺伝子変異がこれまでに報告されている。

今回、我々は、KID 症候群で悪性腫瘍を伴った患者に見られたものと同じの変異コネキ

シン26遺伝子を皮膚に高発現するよう設計されたモデルマウスの作成に成功した。

本研究では、このモデルマウスの皮膚に発癌を誘導し、KID 症候群におけるコネキシン26遺伝子の変異と発癌の関連性につき解明を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、作成したモデルマウスのフェノタイプを確認し、発癌に関連し得る要素を抽出する。

次いで、モデルマウスに発癌の誘導を試みる。具体的には、モデルマウスに対して、紫外線(UVB)を照射し、発癌の誘導を試みる。加えて慢性の炎症が、皮膚がんの発生母地となる可能性を踏まえて、紫外線熱傷部位の創傷治癒の経過を観察する。

免疫学的要素による発癌の可能性も考えられるため、末梢血、または脾臓より採取したT細胞のフェノタイプや、サイトカイン産生能を評価する。

平行して、同一の変異遺伝子を正常ヒトケラチノサイトや HaCaT 細胞にプラスミドベクターを用いて導入し、紫外線(UVB)を照射しアポトーシスを含む細胞死を来す頻度をコントロールと比較する。

また、変異遺伝子の創傷治癒能力への影響を推測するため、培養細胞のタイムラプスイメージングを用いた scratch wound healing assay を行う。

これらにより、発癌のメカニズムとなりうる要素を抽出する。

4. 研究成果

(1) モデルマウスのフェノタイプの検討

作成したモデルマウスの一部では、下図のように、髭を欠き口囲から眼周囲にかけて脱



毛が見られる等、特異な表現型を示すものもみられたが、全例ではなかった。病理組織学的には皮

膚の一部で表皮膿腫が認められ角化の過程等で何らかの異常が働いた可能性も考えられた。

また、一部の個体では直径2cm弱までの多発膿瘍が腹腔内に形成され免疫不全の合併

が示唆された。

しかし、2年程度の飼育の間に、変異コネキシン 26 遺伝子を発現する皮膚において、自然発癌を起こした個体は確認されなかった。

腹腔内に形成された膿瘍の病理組織像は主にリンパ球と組織球からなる膿瘍で、RT-PCR では膿瘍内容には導入したコネキシン 26 の遺伝子の発現は認められなかった。従って、免疫力の低下により、間接的に膿瘍を形成したものと考えた。

免疫不全の検索のため、血液および脾臓より採取した T 細胞を PMA とカルシウムイオノフォアで刺激して、サイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色を行いフローサイトメトリーで確認したが、明らかな異常所見を捉えられなかった。

その発現機序は解明できなかったが、聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response ; ABR) では、聴力低下が確認された。

(2) モデルマウスにおける紫外線発癌の誘導

紫外線発癌を誘導するため UVB を照射したところ、照射部位の皮膚に潰瘍を形成し、治癒が遷延し数カ月にわたって潰瘍が持続したが、病理組織学的にも潰瘍部に明らかな発癌は確認できなかった。

(3) 培養 HaCaT 細胞における変異コネキシン 26 遺伝子と紫外線照射による細胞死

プラスミドベクターにより変異型コネキシン 26 遺伝子を導入した HaCaT 細胞と遺伝子を導入していない HaCaT 細胞に UVB を照射したところ、導入細胞には、紫外線照射による死細胞の割合が軽度低下した。紫外線を照射しない場合は、遺伝子を導入するだけでも死細胞の割合は軽度上昇していた。しかし、いずれも統計学的有意差は認められなかった。

(4) 培養 HaCaT 細胞における変異コネキシン 26 遺伝子導入と scratch wound healing assay

培養 HaCaT 細胞に変異コネキシン 26 遺伝子を導入し、タイムラプスイメージング下に scratch wound healing assay を行った。その結果、変異コネキシン 26 遺伝子を導入した細胞では、コントロールに比して invitro での創治癒にも遅延が確認された。

(5) 以上の実験結果から推測されるコネキシン 26 の変異と発癌の関連性

これまでの研究結果から、残念ながら本モデルマウスにおける発癌の誘導には成功しな

かった。

しかし、多発膿瘍を形成したり、創傷治癒が異常に遷延し、同部に慢性炎症を来していた等の所見からは、何らかの免疫学的異常により、腫瘍免疫が十分に働かず発癌を来す可能性や、創傷治癒の遅延と免疫不全が共に働き局所での異常な炎症が慢性的に持続することで、悪性腫瘍の発生母地になるなどの可能性が考えられた。さらに、in vitro での紫外線照射の実験からは、コネキシン 26 の異常により細胞内の恒常性が維持できず、アポトーシスなど、通常存在する異常な細胞を排除する仕組みが正常に働かず、紫外線で遺伝子に損傷が生じた細胞が残存してしまい、その後の発癌などに関わっていることが想定された。これらが実際のヒトでの発癌に関連している可能性を考えている。

また、これまでの報告で KID 症候群におけるコネキシンの変異ではヘミチャネルの機能に異常が見られ、Ca イオンや cAMP 等のセカンドメッセンジャーの出入りに変化が生じている。これらのセカンドメッセンジャーの異常が発癌に関わっている可能性も考えられるため、今後さらに検討したいと考えている。

今回の結果で興味深いのは、我々が用いたコネキシン 26 遺伝子の変異のモデルでは創傷治癒の遅延がみられていたのに対して、別の報告では、例えば R143W の変異で創傷治癒や、皮膚バリア機能が改善するとされており (Man YK et al. J Membr Biol. 2007)、同一の遺伝子の異なる変異によって、創傷治癒能力が通常に比べて向上したり低下したりすることが示唆された。

コネキシン遺伝子の変異の中でも、悪性腫瘍を合併する変異は限られており、創傷治癒の遷延、アポトーシス機能の異常、免疫学的異常、ヘミチャネルの機能亢進を含めた単一または複数の因子が発癌に関連した可能性を考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山俊晴 (FUJIYAMA Toshiharu)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：60402301

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：