

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860929

研究課題名(和文)ケラチン6c遺伝子異常による掌蹠角化症の解析

研究課題名(英文)Mutational analysis of palmo-plantar keratoderma caused by keratin 6c mutation

研究代表者

赤坂 英二郎 (Akasaka, Eijiro)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：掌蹠角化症(PPK)は手掌・足底の過角化を主症状とする遺伝性皮膚疾患群である。我々は日本人掌蹠角化症の家系で新規ケラチン6c(K6c)遺伝子変異を同定した。本研究の目的はK6c遺伝子異常に伴う掌蹠角化症の症例を蓄積し表現型や他のPPKとの差異について検討することであった。症例を蓄積した結果、K6cによるPPKでは足底の有痛性の限局性過角化が特徴であり、K6a、6b、16、17で見られるような爪甲変形や外胚葉異常は見られなかった。今後、ケラチン6cの発現、局在、機能についての詳細な検討やモデルマウスの作成、siRNAを用いた遺伝子治療などについて引き続き検討を行いたい。

研究成果の概要(英文)：The palmo-plantar keratodermas (PPKs) are a large group of genodermatoses characterized by hyperkeratosis on the palms and soles. Recently, mutations of KRT6C, coding keratin 6c, have been identified in families with focal PPK. We previously reported a first Japanese PPKs pedigree harboring a novel KRT6C mutation. The aim of this study was to analyze the differences of clinical manifestations between PPKs with KRT6C mutations and other PPKs, to elucidate the pathogenicity of PPKs, and to establish a novel therapy of PPKs. In this study, we revealed that KRT6C mutations generally can cause focal PPK, exceptionally diffuse PPK, without nail lesions or ectodermal abnormality. However, KRT6C mutations were detected only 5 PPKs cases so far. Further accumulation of PPKs cases is necessary to clarify how keratin 6c mutation induce focal PPK. In addition, we have to continue to make an effort to establish PPKs model mice which have a KRT6C mutation to develop novel therapy for PPKs.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ケラチン6c 掌蹠角化症 遺伝子 変異

1. 研究開始当初の背景

掌蹠角化症は手掌・足底の過角化を主症状とする遺伝性皮膚疾患群である。掌蹠角化症は多くの臨床的亜型に分類され、手掌・足底にびまん性の過角化を呈するもの(図 1)や、限局性の過角化を呈するもの(図 2、3)が存在する。掌蹠角化症の原因遺伝子や発症機構は徐々に解明されてきているが、その中で特に限局性のものは、遺伝子異常が同定されていない亜型も多く、その発症に関しても不明な点が多い。

近年、限局性の掌蹠角化症の新たな原因遺伝子としてケラチン 6c 遺伝子が発見され注目されている(Wilson JN et.al. *J Invest Dermatol.* 2010)。申請者らは、びまん性と限局性の両方の表現型を示す日本人掌蹠角化症の家系を経験し、新規ケラチン 6c 遺伝子変異を同定した(Akasaka E et.al. *Br J Dermatol* 2011)。驚くべきことに、同じ変異をもつが掌蹠の過角化を示さない症例もあった。

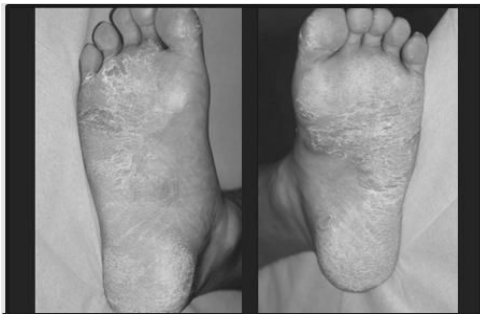


図1:びまん性過角化



図2:限局性過角化



図3:限局性過角化

つまり、ケラチン 6c 遺伝子変異は、掌蹠の過角化を生ずるが、外的刺激などにより、びまん性、限局性、正常の表現型を取りうるということが明らかとなった。

そこで、申請者は、通常外来でみている胼胝や鶏眼などの症例で、実はケラチン 6c の変異を有している患者が存在するのではないかと考え、本症の病態解明も含め、本研究を着想した。

2. 研究の目的

掌蹠角化症の病態解明と新規治療法確立のため、以下のことを検討する。

(1)ケラチン 6c 遺伝子変異検索

外来などで、胼胝や鶏眼など、限局性の掌蹠角化を示す症例から DNA を採取し、ケラチン 6c 遺伝子変異検索を同定する。さらに、遺伝型と表現型の相関関係、他の掌蹠角化症との差異を解析する。

(2)ケラチン 6c の発現、機能についての検討

培養細胞、および患者の病変より角化細胞を分離培養し、ケラチン 6c の発現、局在、機能、腫瘍免疫との関連について検討する。

(3)ケラチン 6c 変異モデルマウスの作製

患者と同じ変異を持つモデルマウスを作製し、遺伝子変異が及ぼす表現型の違いを検討、さらに構造学的影響を光学顕微鏡で確認する。

3. 研究の方法

(1) ケラチン 6c 遺伝子変異検索による掌蹠角化症の解析

胼胝・鶏眼患者、および原因遺伝子が同定されていない掌蹠角化症患者・家族の末梢白血球より定法に従って DNA を抽出し、PCR 法で目的とするケラチン 6c 遺伝子領域を増幅したのち、直接シーケンスにてケラチン 6c 遺伝子変異について解析する。検体の採取にあたっては十分な説明の上に患者の同意を得、同意書を取得する。

ケラチン 6c 遺伝子変異について、その変異の形態（ミスセンス、ナンセンス、塩基欠失など）や部位・臨床症状を統計学的に解析し、遺伝型と表現型の関連について検討する。

ケラチン 6c 遺伝子変異を持たない胼胝・鶏眼の症例や、他のケラチン遺伝子変異による掌蹠角化症との比較検討を行うことでケラチン 6c 遺伝子変異による掌蹠角化症の疾患概念の確立を目指す。

(2) ケラチン 6c の生物学的特徴の解析

培養ヒト角化細胞より RNA、タンパクを抽出し、ケラチン 6c の発現をリアルタイム RT-PCR やウェスタンブロット法にて定量的に解析する。また免疫染色、免疫蛍光を用いて細胞内での局在についての検討も行う。

掌蹠角化症患者で同定された遺伝子変異を有するケラチン 6c 遺伝子を培養ヒト角化細胞に形質導入し、ケラチン 6c 遺伝子変異細胞株を作製する。

ケラチン 6c 遺伝子変異細胞株におけるケラチン 6c の形態学的異常や発現量につき、免疫染色、免疫蛍光、RT-PCR、ウェスタンブロットで解析を行う。

(3) 掌蹠角化症モデルマウスの作成

遺伝子変異検索で同定したヒト変異ケラチン 6c 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作成する。プロモーターは CMV

のものとして強力に発現させる。同時に、正常ヒトケラチン 6c 遺伝子を発現させるトランスジェニックマウスも作成する。この 2 系統のマウスを交配することにより、患者と同様にヘテロの状態を作成し、掌蹠角化症のモデルマウスを作製する。皮膚の変化を肉眼的、あるいは皮膚生検を行い組織学的に経時的に観察し、遺伝型と表現型の解析を行う。

4 . 研究成果

(1) ケラチン 6c 遺伝子変異検索による掌蹠角化症の解析 :

胼胝・鶏眼患者、および原因遺伝子が同定されていない掌蹠角化症患者・家族の末梢白血球より定法に従って DNA を抽出し、PCR 法で目的とするケラチン 6c 遺伝子領域を増幅したのち、直接シーケンスにてケラチン 6c 遺伝子変異について解析した。現段階ではまだ症例数が少ないため、表現型と遺伝子型の相関については不明であるが、少なくともケラチン 6c 変異による掌蹠角化症の表現型は足底の限局性の過角化が多く、手掌は症状が軽微であり、爪甲変形は全くないかあっても軽症であることが示唆された。また他の外胚葉以上も呈さないことが明らかになった。胼胝鶏眼患者においてはケラチン 6c 変異は同定されていないが、ケラチン 6c の SNPs が多発する傾向にある。

(2) ケラチン 6c の生物学的特徴の解析 :

培養ヒト角化細胞ではケラチン 6c 遺伝子発現は確認されたが、タンパク発現はみられなかった。転写後調節機構が関与していると考えられた。また、掌蹠角化症患者で同定された遺伝子変異(p.G472K)を有するケラチン 6c 遺伝子および野生型ケラチン 6c 遺伝子を培養ヒト角化細胞(HaCaT 細胞)に形質導入し、変異型ケラチン 6c 発現角化細胞株の作製を目指す。これらは Kubo らによりすでに検討されているが(Kubo A. et al. *J Dermatol.*

2013; 40: 553-7)、現在申請者らも、変異型および野生型ケラチン 6c 発現ベクターを作成中である。

(3) 今後の研究の推進方策等

遺伝子検索で同定した p.E472K 変異を有するケラチン 6c 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作成する。プロモーターは CMV のものとして強力に発現させる。同時に、野生型ヒトケラチン 6c 遺伝子を発現させるトランスジェニックマウスも作成する。この 2 系統のマウスを交配することにより、患者と同様にヘテロの状態を作成し、掌蹠角化症のモデルマウスを作製する。皮膚の変化を肉眼的、あるいは皮膚生検を行い組織学的に経時的に観察し、遺伝型と表現型の解析を行う。変異ケラチン 6c を遺伝子導入した培養ヒト角化細胞株において、siRNA を用いて変異ケラチン 6c 遺伝子の mRNA 発現を抑制し、形態学的、機能的変化について免疫染色、免疫蛍光、RT-PCR、ウェスタンブロットで解析を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Akasaka E, Nakano H, Korekawa A, Fukui T, Nishikawa Y, Kaneko T, Koga H, Hashimoto T, Sawamura D.: Anti-laminin gamma1 pemphigoid associated to ulcerative colitis and psoriasis vulgaris, co-existing with distinct autoantibodies to laminin gamma1, type XVII collagen, and laminin 332. 査読有, Eur J Dermatol. 2015 印刷中, doi:10.1684/ejd.2014.2499
Akasaka E, Okawa Y, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe D, Toyomaki Y, Sawamura D, Sueki H: Two Japanese familial cases of punctate palmoplantar keratoderma caused by a novel AAGAB

mutation, c.191_194delCAA. 査読有, J Dermatol Sci. 2015 印刷中, doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.004.

Minakawa S, Kaneko T, Matsuzaki Y, Akasaka E, Mizukami H, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Mitsuhashi Y, Sawamura D: Case of oculocutaneous albinism complicated with squamous cell carcinoma, Bowen's disease and actinic keratosis. 査読有, J Dermatol. 2014; 41(9): 863-864. doi: 10.1111/1346-8138.12597.

Minakawa S, Nakano H, Nakajima K, Matsuzaki Y, Takiyoshi N, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D : Mutational analysis on 16 Japanese population cases with epidermolysis bullosa simplex. 査読有, J Dermatol Sci. 2013;72:330-332. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.08.001.

[学会発表](計 11 件)

赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、中野あおい、玉井克人、野村和夫、三橋善比古、橋本 功、澤村大輔：栄養障害型表皮水疱症 133 家系の COL7A1 遺伝子変異解析。第 113 回日本皮膚科学会総会、2014.5.30-6.1.国立京都国際会館。(京都)

赤坂英二郎、鷹木由里子、豊巻由香、中野 創、澤村大輔、矢口 直：SERPINB7 変異を同定した長島型掌蹠角化症の 1 例。日本皮膚科学会青森地方会第 366 回例会、2014.5.25.ホテルニューキャッスル(弘前)

櫻庭裕佑、赤坂英二郎、六戸大樹、中野 創、澤村大輔：長島型掌蹠角化症型の遺伝子診断 第 29 回角化症研究会、2014.8.2.東京商工会議所(東京)

Eijiro Akasaka, Hajime Nakano, Daisuke Sawamura : Mutational

analysis of 133 Japanese pedigrees of dystrophic epidermolysis bullosa . 3rd Eastern Asia Dermatology Congress(第 3 回東アジア皮膚科会議)、2014.9.24-26. Jeju, Korea (済州島、韓国), Jeju International Convention Center (ICC JEJU)

赤坂英二郎、中野 創、澤村大輔：末梢血単核球における 型コラーゲンの mRNA 発現について . 第 20 回分子皮膚科学フォーラム . 2013.4.12-13.浅草ビューホテル(東京)

赤坂英二郎、中野 創、澤村大輔：点状掌蹠角化症の 2 家系例.第 28 回角化症研究会、2013.7.27 東京商工会議所(東京)

赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔、中野あおい、玉井克人、野村和夫、三橋善比古、橋本 功：表皮水疱症の遺伝子診断～優性栄養障害型表皮水疱症について～、日本皮膚科学会青森地方会第 363 回例会、2013.8.25. 八戸パークホテル(八戸)

赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔：多発する稗粒腫を主症状とした優性栄養障害型表皮水疱症.第 35 回水疱症研究会、2013.10.19-20.大分県労働福祉会館ソレイユ(大分)

赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔、中野あおい、玉井克人、野村和夫、三橋善比古、橋本 功：表皮水疱症の遺伝子診断～劣性栄養障害型表皮水疱症について～. 日本皮膚科学会青森地方会第 364 回例会、2013.11.24. 弘前大学医学部コミュニケーションセンター(弘前)

赤坂英二郎、豊巻由香、澤村大輔、中野創：唾液由来 DNA を用いて PPOX 遺伝子変異を同定した異型ポルフィリン症のカンボジア人 1 家系例. 第 3 回光皮膚科学研究会、2014.3.8. 神戸国際会議場(神戸)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤坂 英二郎 (AKASAKA, Eijiro)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436034