

掌蹠角化症症候群知見補遺

大阪大谷大学
臨床薬理学講座
米田耕造

背景

進行性変動性紅斑角皮症 (Erythrokeratoderma variabilis et progressiva: EKVP)の臨床的特徴

- 主な病変は顔、臀部、四肢の伸展側部
- 局所的あるいは全身的に過角化病変が出現
- 一過性の紅斑を発症
- **掌蹠角化症**を合併



• Erythrokeratoderma variabilis et progressiva. J Dermatol 2016.

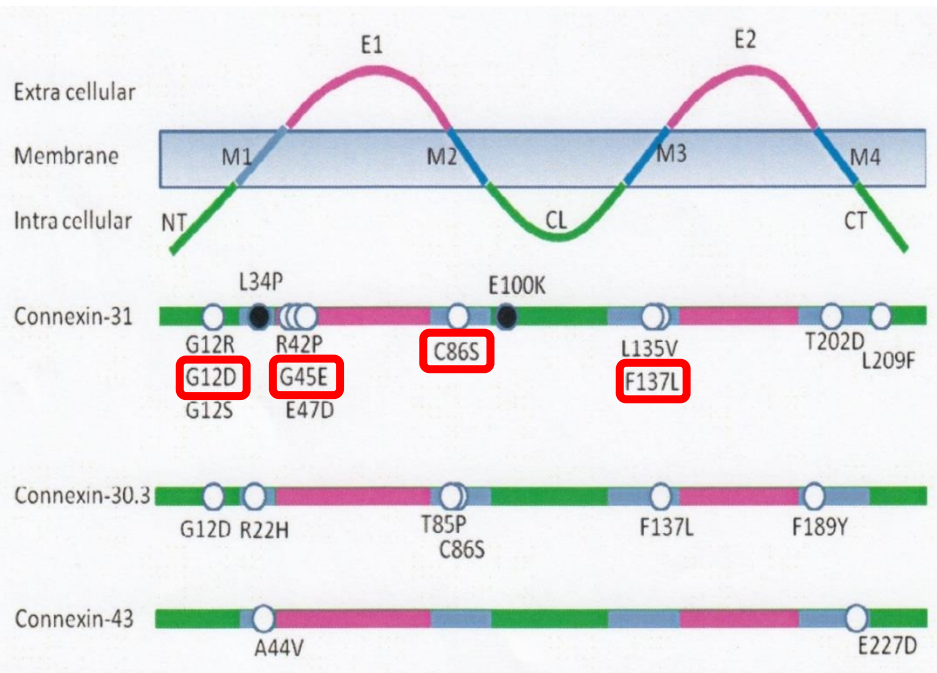
• Dominant De Novo Mutations in GJA1 Cause Erythrokeratoderma Variabilis et Progressiva, without Features of Oculodentodigital Dysplasia. J Dermatol 2015.

背景

- EKVP患者の約50%が掌蹠角化症を併発
- 発症時期は様々である
- 原因遺伝子である Connexin (Cx) 43 (*GJA1*)、Cx31 (*GJB3*)、Cx30.3 (*GJB4*) の変異により生じた、変異タンパク質が生成することで生じる疾患である

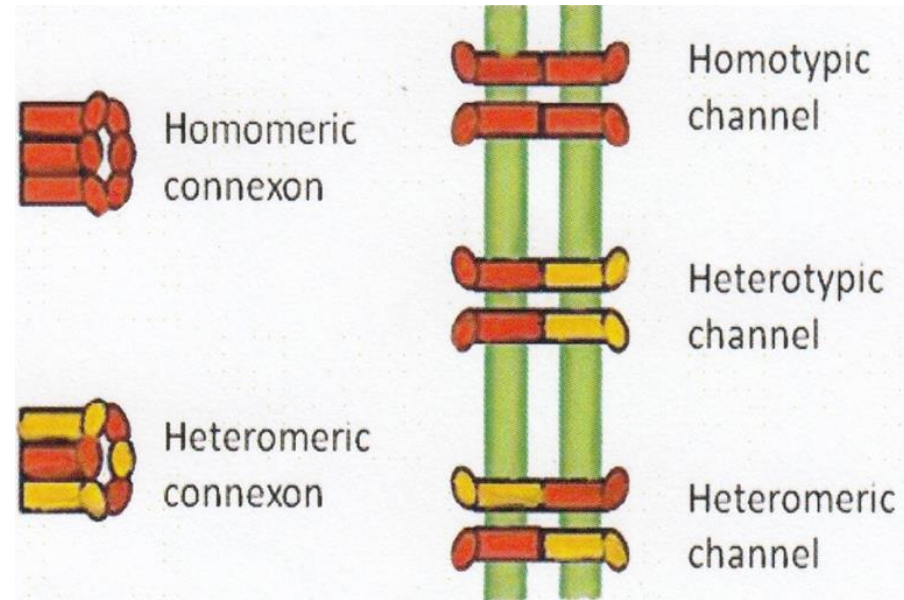
Cx の変異と病態の関連については
明らかとなっていない

EKVP は Cx 遺伝子の突然変異が原因



CL:細胞内ループ E1/E2:細胞外ドメイン
M1-M4:膜貫通ドメイン

- Cx は細胞間に存在
- Cx は分子量 (kDa) によって分類
- Cx は、ホモあるいはヘテロ 6 量体 (Connexon) となり、ギャップ結合を形成
- EKVP では、複数の変異が存在



ギャップ結合の役割

- 1 kDa未満の小さい分子とイオンを輸送
- 組織の恒常性
- 成長コントロール
- 反応の伝達維持

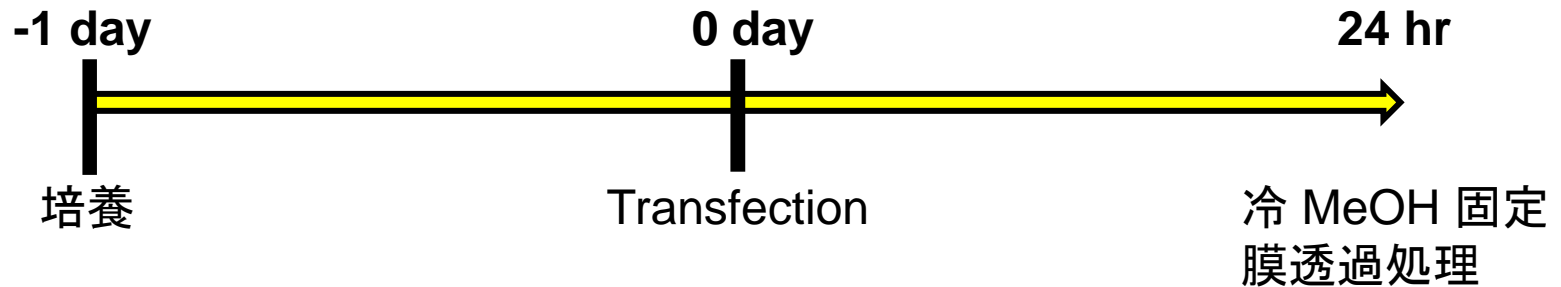
目的

1. EKVPのモデル細胞を作製し創薬に役立てる
2. EKVPモデル細胞の病態を検討する
3. まずEKVP細胞のバリア機能を調べることにした

実験方法

• 細胞免疫染色

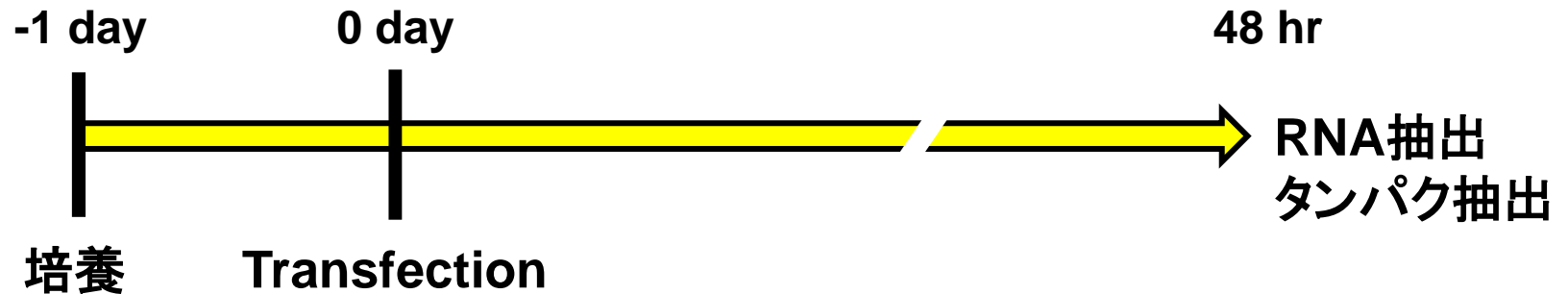
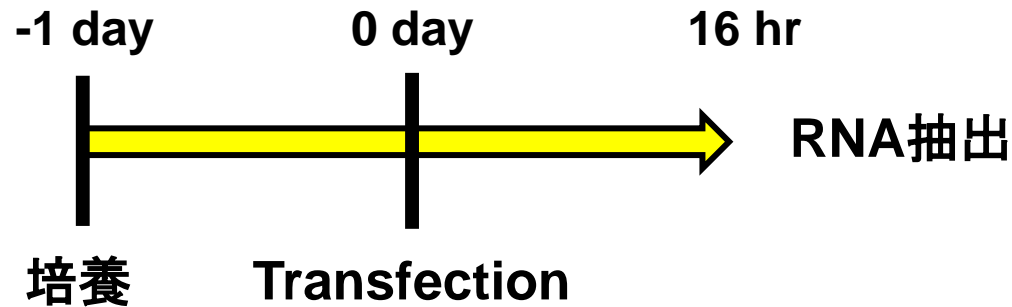
Cell line: HaCat 細胞 (ヒト ケラチノサイト細胞株)



固定・透過	<ul style="list-style-type: none">• 冷 MeOH -30°C 10 分
1 次抗体	<ul style="list-style-type: none">• Anti-V5 Antibody mouse monoclonal IgG (x1000)• Purified anti-keratin14 rabbit polyclonal IgG (x8000)
2 次抗体	<ul style="list-style-type: none">• Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Biotin antibody produced in goat (x200)• 488 goat anti-rabbit IgG (Alexa Flour 488) (x1000)
発色	<ul style="list-style-type: none">• Streptavidin-Cy3™ from Streptomyces avidinii (x100)• DAPI (x1000)

実験方法

- Real-Time PCR, Western blotting



RNA 抽出 : Sepasol-RNA I Super G

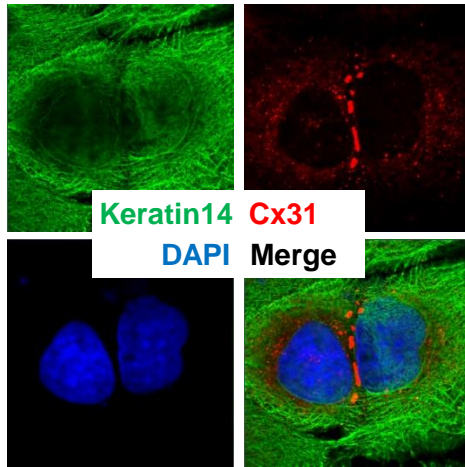
逆転写 : ReverTra Ace

Real-time PCR: THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX

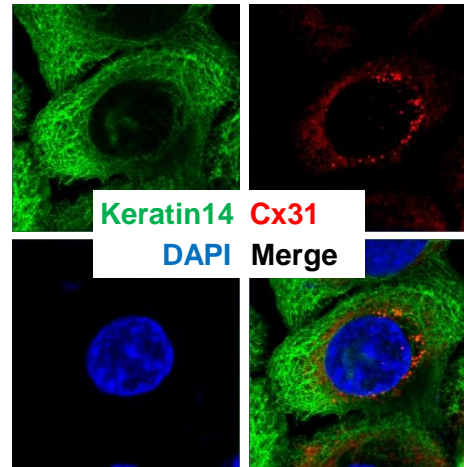
Target gene : TNF- α , IL-6, IL-1 β , ICAM-1, GAPDH

変異型 Cx31 の局在の変化

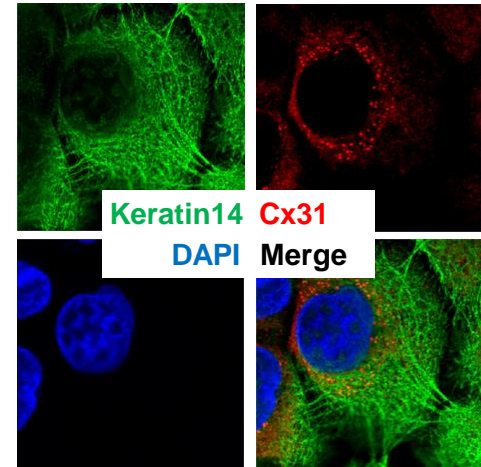
WT



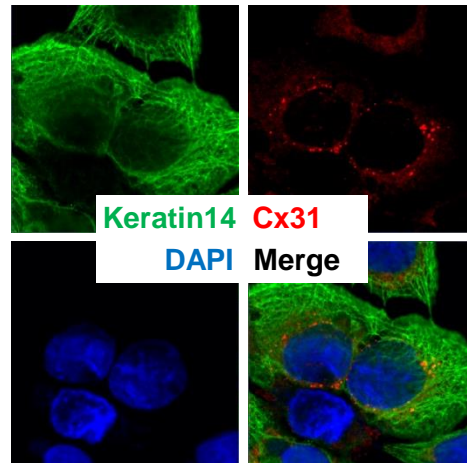
G12R



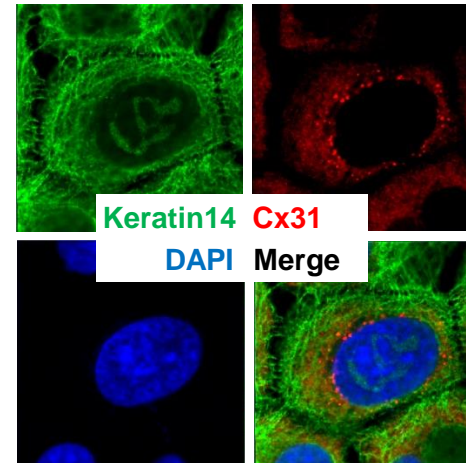
G45E



C86S



F137L



変異型 Cx31 の細胞内局在

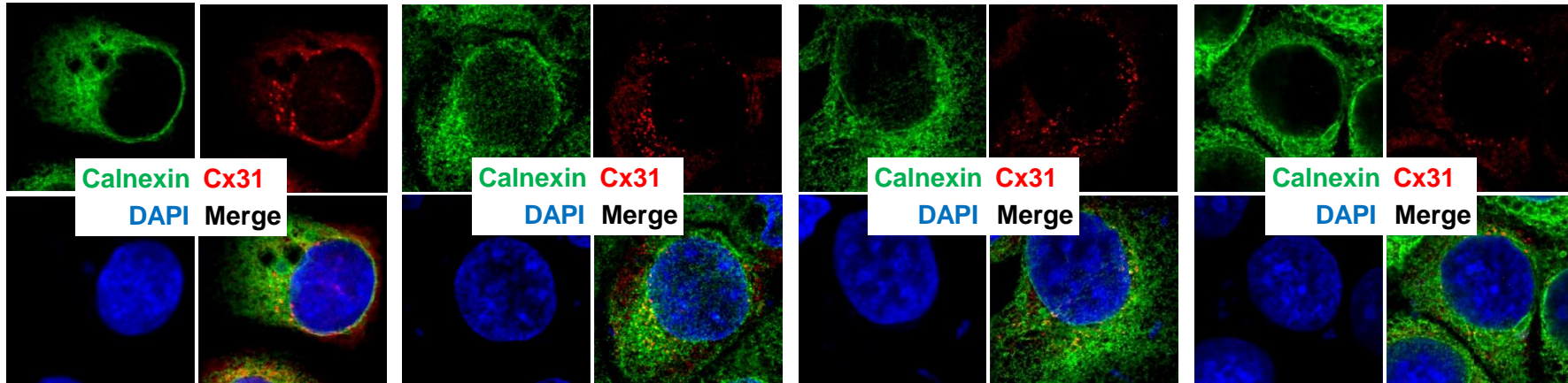
G12R

G45E

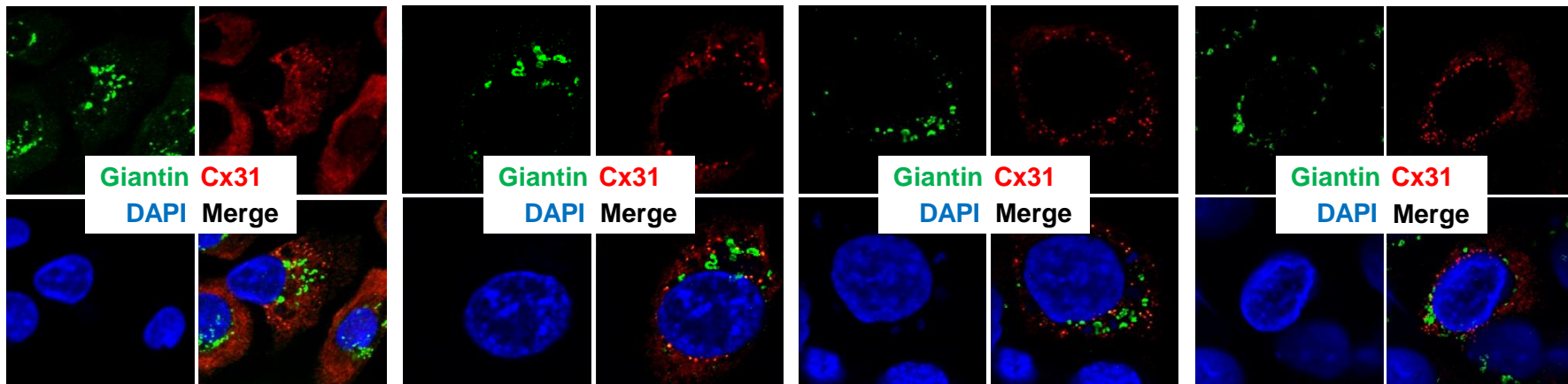
C86S

F137L

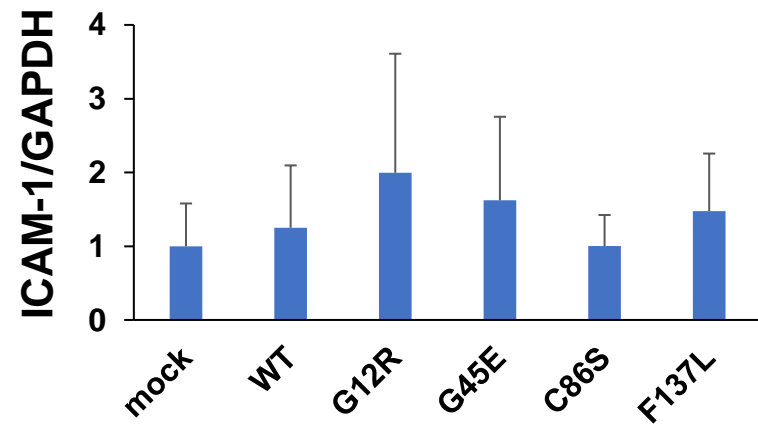
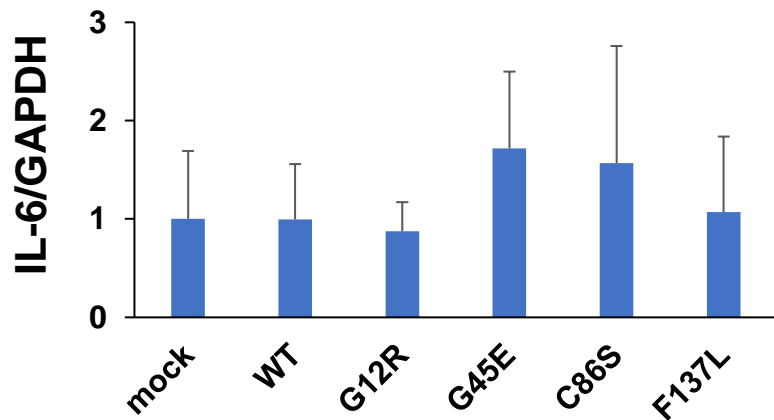
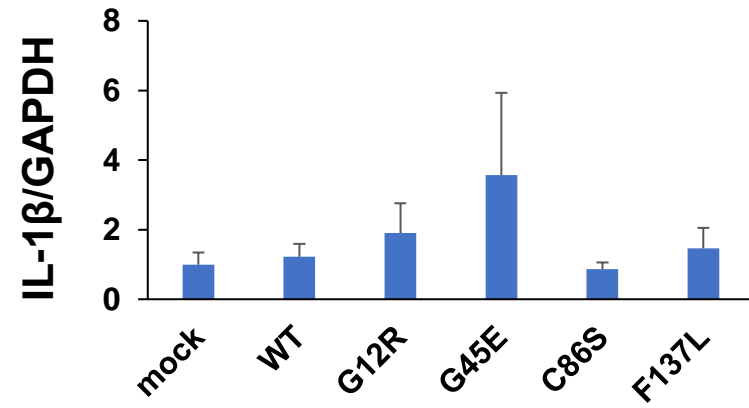
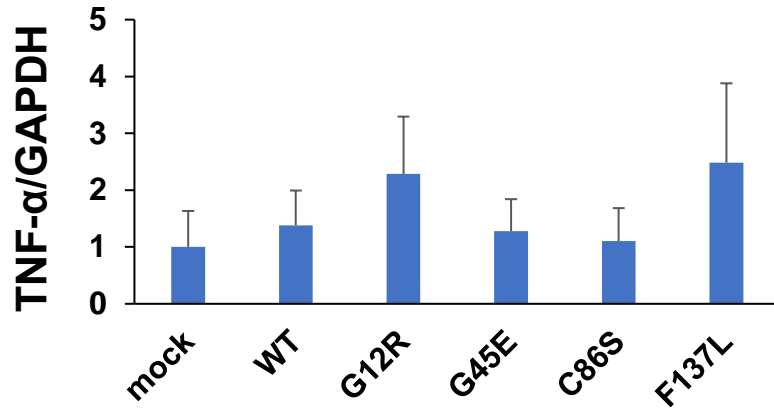
小胞体



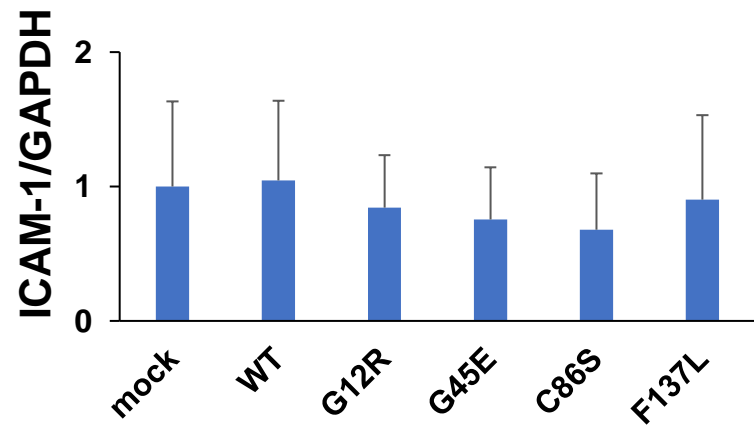
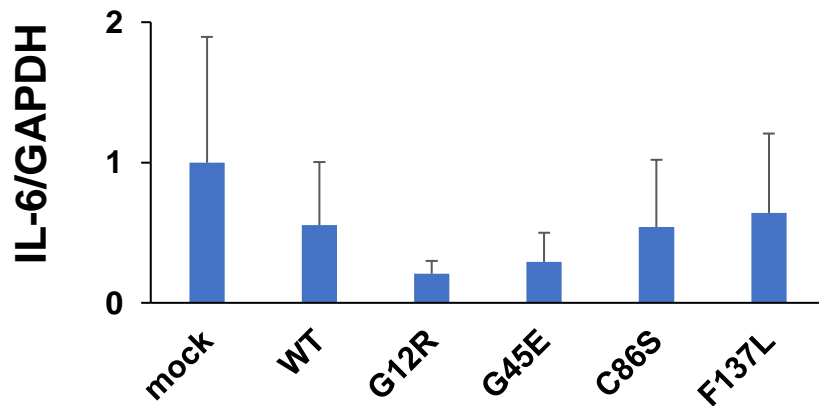
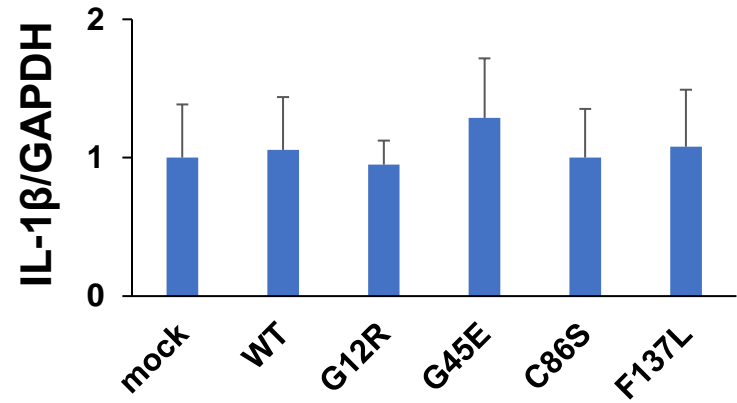
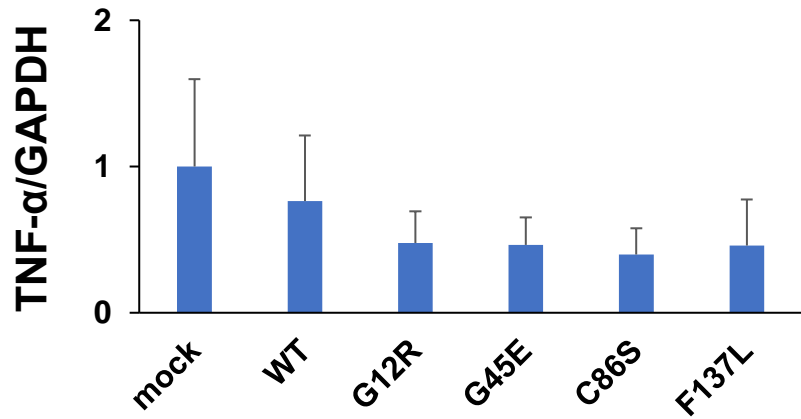
ゴルジ体



変異型 Cx31 transfection 後 16 時間後における 各遺伝子の発現変化



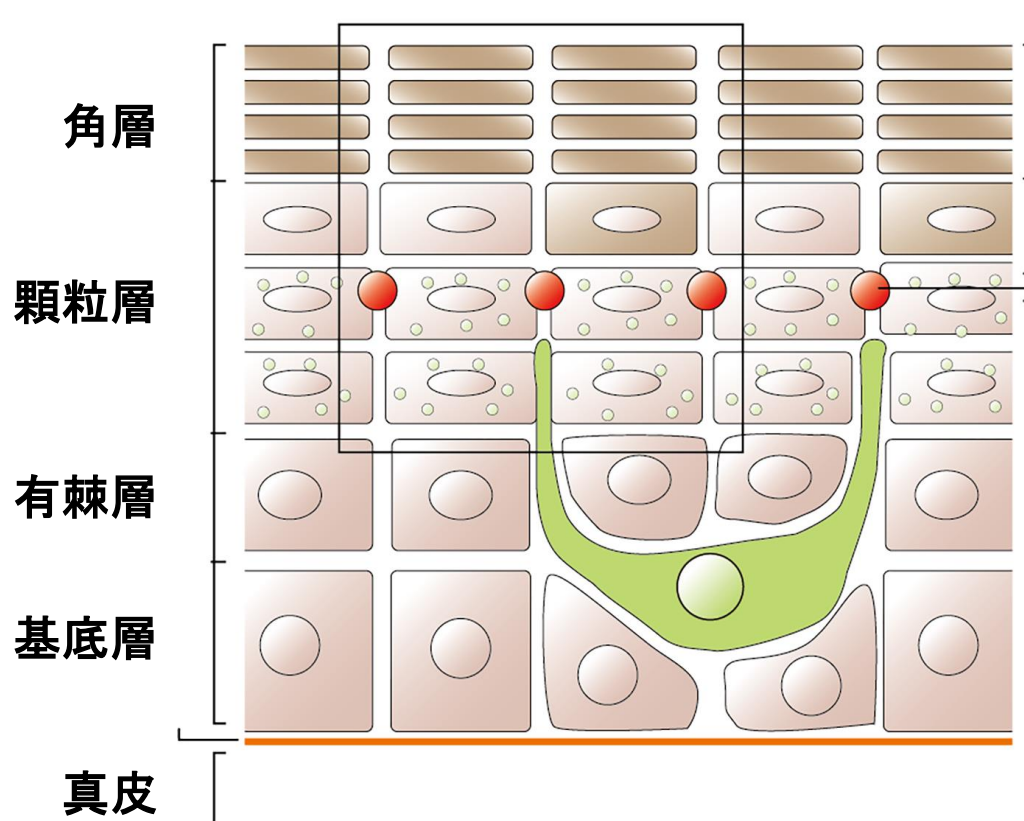
変異型 Cx31 transfection 後 48 時間後における 各遺伝子の発現変化



結論

1. EKVPモデル細胞ではギャップ結合の形成不全を起こしていた
2. EKVPモデル細胞では炎症や細胞接着に関連する遺伝子の発現に影響はみられなかった

皮膚における細胞間結合



タイトジャンクション

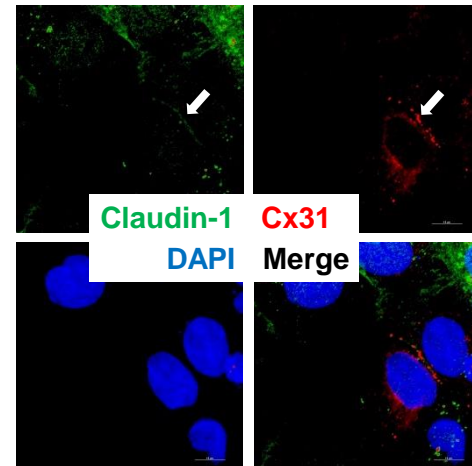
・Claudin、Occludin、などが、
密着結合部を形成。
その裏打ちタンパクとして、
ZO (Zonula occludens) など
がある。

ギャップジャンクション

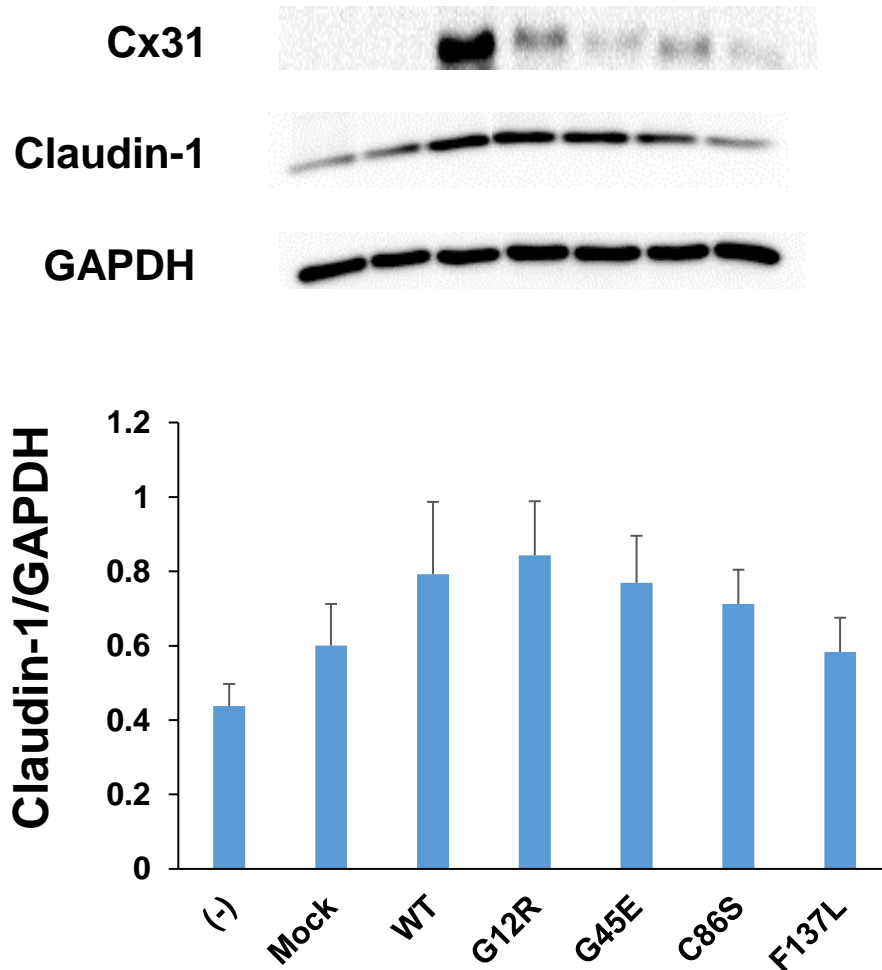
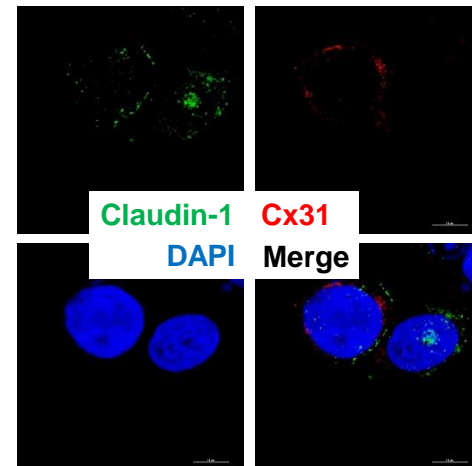
Cx などにより、形成。
皮膚においては、顆粒層から
基底層の間に存在

変異型 Cx31 transfection における Claudin-1 の発現に対する影響

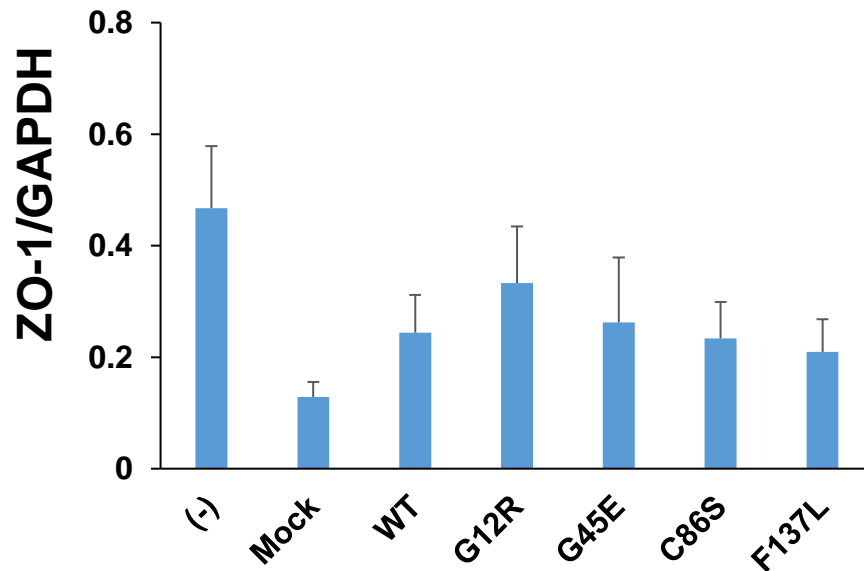
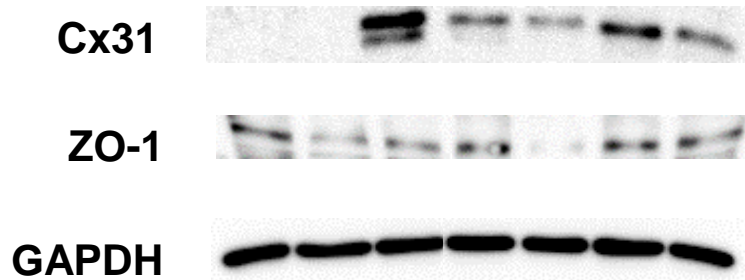
WT



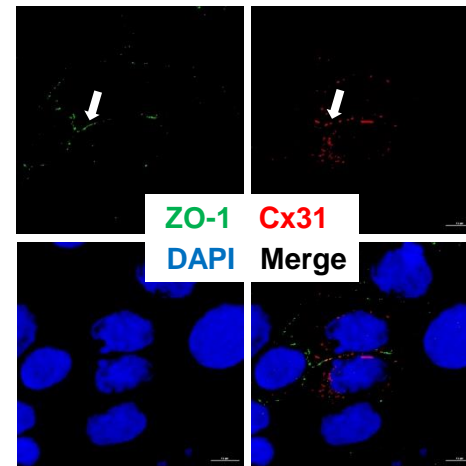
C86S



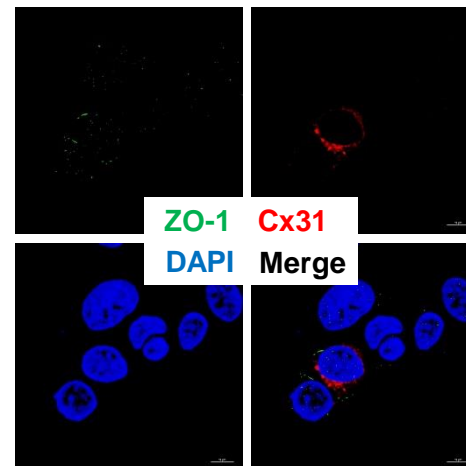
変異型 Cx31 transfection における ZO-1の発現に対する影響



WT



C86S



結論

1. EKVPモデル細胞ではバリア機能に異常が生じていた
2. バリア機能の異常がEKVPの顕著な過角化に関連していると考えられた
3. このモデル細胞を使用して将来、創薬を実現したい