

主論文の要旨

Roles of aberrant hemichannel activities due to mutant connexin26 in the pathogenesis of KID syndrome

〔 KID 症候群の病態におけるコネキシン 26 変異による
異常ヘミチャネルの関与 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 皮膚病態学分野

(指導：秋山 真志 教授)

滝 奉樹

【緒言】

KID 症候群は、血管増殖性角膜炎 (keratitis)、魚鱗癬様紅皮症 (ichthyosis)、感音性難聴 (deafness) を三主徴とする遺伝性疾患であり、それぞれの頭文字をとって KID 症候群と呼ばれる。ギャップジャンクション構成成分の connexin(Cx)26 をコードする *GJB2* 遺伝子変異により生ずる。KID 症候群の患者は、真菌症などの慢性皮膚感染症や扁平上皮癌などのリスクが高い。我々は、KID 症候群の病因としての報告例の多い *Gjb2* の変異遺伝子 (Cx26-G12R, -G45E, -D50N) を導入した細胞株を用いて、KID 症候群の病態を明らかにすることを目的とした。

【方法】

KID 症候群の病因としての報告症例が多い Cx26-G12R、-G45E、-D50N の 3 種の変異遺伝子である *Gjb2* c.34G>C、c.134G>A、c.148G>A、および、WT(wild type)のそれぞれの C 末端に FLAG タグを挿入した遺伝子を人工合成し、pIRES2-AcGFP1 vector にサブクローニングした。合成コンストラクト pCMV-*Gjb2* (WT、c.34G>C、c.134G>A、c.148G>A)-FLAG-IRES2-AcGFP1 を HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌株) に形質導入し変異 Cx26 の局在とヘミチャネルの機能解析を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度 1.9 mM 下で変異 Cx26 の導入を行うと、Cx26-D50N 導入細胞は生存していたが、Cx26-G12R と Cx26-G45E の導入細胞は細胞死を来した。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 3.8mM まで増加させたところ、Cx26-G12R および Cx26-G45E 導入細胞の両者とも細胞死を回避できたため、細胞外 Ca^{2+} 濃度を Cx26-D50N では 1.9mM、Cx26-G12R および Cx26-G45E では 3.8mM の条件下で形質導入を行った。

変異 Cx26 の局在の解析は、蛍光抗体法、レクチン蛍光法を用いた。形質導入細胞は eGFP (緑) が発光し、変異 Cx26 は抗 FLAG タグ二次抗体の Alexa Flour 350 (青) で、細胞質マーカーとして抗 trans-Golgi network 抗体 (TGN46 抗体)、TRITC 抱合二次抗体 (赤) で、細胞膜マーカーは wheat germ agglutinin (WGA)、ローダミン抱合 (赤) でそれぞれ発光させた。ヘミチャネルの機能解析は、生理的 Ca^{2+} 濃度下でも生存している Cx26-D50N 導入細胞を用いて、染料 (Neurobiotin; NB) の取り込み実験を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0 mM、1,2mM の 2 つの条件下で行い、2 種類のヘミチャネルブロッカー (carbenoxolone: CBX, 18 α -Glycyrrhetic acid; AGA) で染料の取り込み量がどのように変化するかを調べた。細胞に取り込まれた NB の濃度を、画像解析ソフト (Image J) を用いて解析した。

次に、生理的 Ca^{2+} 濃度下でも生存し得る、Cx26-D50N 形質導入 HaCaT 細胞 (ヒト表皮角化細胞株) を用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。マイクロアレイ解析にて、Cx26-WT 導入細胞に対して発現量が 40%以下であった遺伝子について、DAVID Bioinformatics Resources 6.8 を用いて、functional annotation chart を作成し functional annotation clustering を行った。抽出された遺伝子の中から報告論文数の多い 5 個の遺伝子を選択し、Real-time qPCR を行った。

【結果】

細胞外 Ca^{2+} 濃度 (1.9 mM) 下で、変異 Cx26 の導入を行うと、Cx26-D50N および Cx26-WT の導入では細胞が生存していたが、Cx26-G12R および Cx26-G45E の導入では細胞死を来した。細胞外 Ca^{2+} 濃度 (1.9 mM) 下で行った、蛍光抗体およびレクチン蛍光法では Cx26-D50N および Cx26-WT ともに変異 Cx26 は、細胞質マーカーである抗 TGN46 抗体との共染色は認めず、細胞膜マーカーである WGA との共染色を認めた (Figure 1)。さらに隣接した細胞同士は Gap junction を形成し、細胞間での分子のやり取りをしている可能性が示唆された (Figure 1)。過去の研究からヘミチャネルは細胞外 Ca^{2+} 濃度が増加すると閉じた状態になり、活性が低下すると報告されている。Cx26-G12R および Cx26-G45E に関して、変異 Cx26 の活性を落とせば細胞死を回避できる可能性があるとの仮説を立て、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 3.8mM まで増加させて形質導入を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度が 3.8mM の条件下では Cx26-G12R 導入細胞および Cx26-G45E 導入細胞、両者とも細胞死を逃れた。さらにこの条件下で蛍光抗体およびレクチン蛍光法を行ったところ、Cx26-D50N 導入細胞および Cx26-WT 導入細胞と同様の結果となった (Figure 2)。

次に生理的 Ca^{2+} 濃度 (1.9 mM) 下でも生存している Cx26-D50N 導入細胞を用いて、NB の取り込み量を評価することによって、変異ヘミチャネルの機能解析を行った。まず、細胞外 Ca^{2+} 濃度によって NB の取り込み量の変化を調べると Cx26-D50N 導入細胞および Cx26-WT 導入細胞の両者とも細胞外 Ca^{2+} 濃度を上げると NB の取り込み量が減少した (Figure 3A)。また、生理的 Ca^{2+} 濃度下で比較すると、Cx26-WT 導入細胞よりも Cx26-D50N 導入細胞の方が NB の取り込み量が増加していることが示された (Figure 3A)。これは、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇によって、ヘミチャネルの活性が落ち、コントロール、変異導入細胞の両者とも細胞外からの分子の取り込みが減少するが、生理的 Ca^{2+} 濃度下では、変異導入細胞ではヘミチャネルが異常に活性化していることを示している。さらに、CBX、AGA の 2 種類のヘミチャネルブロッカーを用いて人工的にヘミチャネルをブロックした状態でどのように NB の取り込み量が増加するかを細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0 mM および、1.2mM の 2 つの条件下で調べた。細胞外 Ca^{2+} 濃度が 0 mM の条件下では、Cx26-D50N 導入細胞および Cx26-WT 導入細胞の両者ともで増加していた NB の取り込みが、ヘミチャネルをブロックすると減少した (Figure 3B)。細胞外 Ca^{2+} 濃度が 1.2 mM の条件下では、Cx26-WT 導入細胞ではネガティブコントロールと差は認められなかったが、Cx26-D50N 導入細胞ではコントロールである WT と比較して生理的 Ca^{2+} 濃度下で増大していた NB の取り込みが、ヘミチャネルをブロックすると正常化した (Figure 3C)。

遺伝子発現プロファイリングでは、Cx26-D50N を HaCaT 細胞に形質導入した場合、Cx26-WT の導入時と比較して発現量が低下した遺伝子のうち、23% (16/69) が免疫関連の遺伝子であった。そのうち functional annotation clustering によって p 値が 0.05 以下の遺伝子が 9 個確認できた。この中から報告論文の多い *IL15*, *CCL5*, *IL1A*, *IL23R*, *TLR5* の 5 個の遺伝子について Real-time qPCR によって、それらの発現が実際に低下

していることが確認できた (Figure 4)。

【考察】

KID 症候群の変異 Cx26 は大きく分けて 2 つのカテゴリーに分けられる。1 つ目は変異 Cx26 が細胞膜に局在し、異常ヘミチャネルや異常 Gap junction を形成する場合、もう 1 つが、変異 Cx26 が細胞質に局在し、細胞膜への輸送異常が起こる場合である。

本研究の 3 つの変異はいずれも、細胞膜に局在し、Gap junction も形成されているため、1 つ目のカテゴリーに分類される。一般的にヘミチャネルは細胞外 Ca^{2+} 濃度が上昇すると閉じて分子の透過性が低下すると言われている。本研究では、生理的 Ca^{2+} 濃度下では細胞死した Cx26-G12R 導入細胞および Cx26-G45E 導入細胞を、細胞外 Ca^{2+} 濃度を上昇させることによって、細胞死から回避させることができた。これは、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇によって、変異ヘミチャネルの活性が落ち、細胞が生き残ったと考えられる。また、生理的 Ca^{2+} 濃度下で細胞死が起きなかった Cx26-D50N 導入細胞や Cx26-WT 導入細胞に関しては、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇による、NB の染料の細胞内への取り込みが実際減少しており、 Ca^{2+} 濃度の上昇がヘミチャネルからの分子の取り込みを抑えることが示唆された。生理的 Ca^{2+} 濃度 (1.2mM) 下での Cx26-D50N 導入細胞とコントロールである Cx26-WT 導入細胞との NB の取り込み量を比較した実験では、Cx26-D50N 導入細胞は、変異ヘミチャネルの機能が亢進し、細胞外からの分子の取り込みが増加していることが病因の可能性が高いことが確認された。また、遺伝子発現プロファイリングの結果からは免疫関連遺伝子の発現が有意に低下しており、KID 症候群の易感染性や皮膚悪性腫瘍の合併率が高い原因の一つに、魚鱗様紅皮症による皮膚のバリア障害だけではなく、免疫システム自体の低下が起きている可能性が示唆された。

【結語】

KID 症候群の病態には、異常ヘミチャネルの活動性が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、KID 症候群の易感染性や、悪性腫瘍のリスクが上昇する原因として、魚鱗様紅皮症による皮膚のバリア障害だけではなく、免疫系の遺伝子発現の低下も一因と推察された。