

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

角化症研究会記録集 (2003.02) 17巻:12～15.

Curth-Macklin型豪猪皮状魚鱗癬における変異K1の発現様式の検討

山本明美, 飯塚一, RichardG.



Curth-Macklin型豪猪皮状魚鱗癬における変異K1の発現様式の検討

山本明美, 飯塚 一

旭川医科大学皮膚科

G. Richard

ジェファーソン医科大学皮膚科：米国

Distribution of mutant keratin in Ichthyosis Hystrix Curth-Macklin

Yamamoto A, Iizuka H
(Department of Dermatology, Asahikawa Medical College)

Richard G
(Department of Dermatology, Jefferson Medical College, USA)

はじめに

K1は分化した表皮角化細胞で発現される主要なケラチンのひとつで、その変異によりいくつかの角化異常症が生じることが知られている。我々は最近、K1遺伝子のheterozygousなframeshift変異(1609-1610delGGinsA)(図1)によるCurth-Macklin型豪猪皮状魚鱗癬(IHCM)の1家系を発見した(OMIM 146590)¹⁾。本症はまれな角化異常症で、角化細胞の核をかこむ殻のような構造が特徴的とされている。この変異により76個のアミノ酸からなる異常なC末端をもったK1蛋白がつくられると予想される。ごく最近、非常によく似たheterozygousなK1遺伝子変異(1628delG)が線状掌蹠角化症(SPPK, OMIM 148700)の1家系で報告された²⁾(図1)。この変異によってつくられるケラチンの変異したC末端70個のアミノ酸配列はIHCMの症例のものと同じである。また、これらの変異ケラチン遺伝子を*in vitro*で導入すると変異ケラチンは主に核内に局在すると報告された³⁾。本研究で我々はIHCMの1例における変異ケラチンの*in vivo*での発現様式を検討したところ核内ではなく、細胞質に発現することが分かったので報告する。

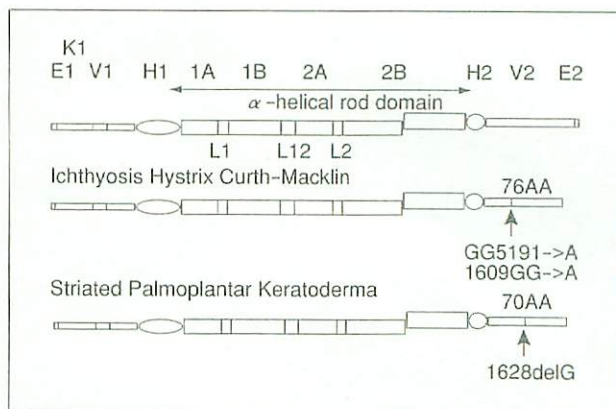


図1-K1テイルドメインの変異

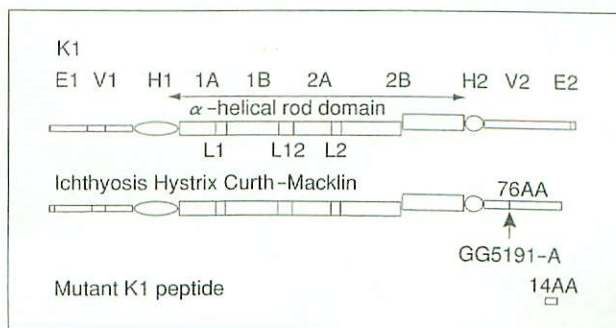


図2-抗体作成に使用した抗原ペプチド

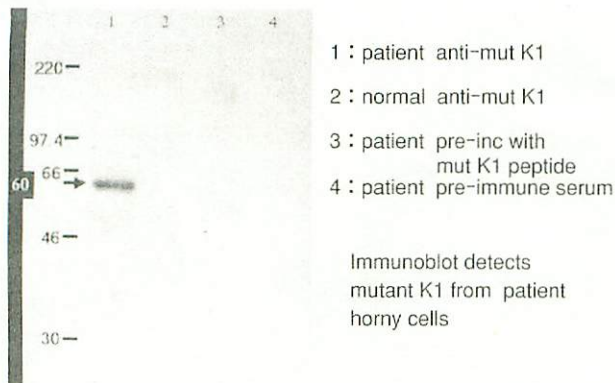


写真1-イムノブロット法により患者角質層サンプルから変異K1が検出された。

方法及び結果

変異ケラチンを検出するために変異ケラチンのC末端の14個のアミノ酸とそのN末端にシステインを付加したペプチド(配列はCLAAGALAAGALEAP)を合成し、これに対する兔ポリクローナル抗体をすでに報告した方法²⁾により作成した(図2)。IHCM患者¹⁾と正常人の角層細胞をすでに報告した方法²⁾により免疫ブロットに供した。患者サンプルのみにおいておよそ60kDaのバンドが検出され、これは分子量65494の野生型K1より32アミノ酸短い変異ケラチンのバンドと考えられた(写真1)。患者および正常ヒト足底皮膚をもちいて免疫組織化学を施行した。変異K1は患者表皮において基底細胞直上の細胞から角層細胞にいたるまで検出された。野生型と変異K1は細胞質において共存しており、両者はいずれも核内には発現していなかった(写真2)。正常ヒトでは野生型のK1のみが検出された。免疫電顕によって野生型と変異型のK1は中間線維上で共存しており、これらの線維はデスマゾームに連結していた(写真3)。

考案

早期停止コドンのあるmRNAはしばしば急速に分解されることが知られているが¹⁾、今回の研究結果、およびすでに報告した角層ペプチドの質量分析の結果は¹⁾変異アレレが実際に蛋白を発現させていることを証明した。今回の研究はさらに、変異K1が部位、分化特異的に発現していることも示した。また、変異K1が野生型K1と共存していること、IHCMが殻様構造に代表される特徴的な細胞骨格の異常をしめすことは、変異ケラチンが優性ネガティブ効果によってケラチンの束状構造とネットワーク形成を障害することを強く示唆する。我々の結果は*in vitro*における変異ケラチンの核内局在のデータ²⁾と

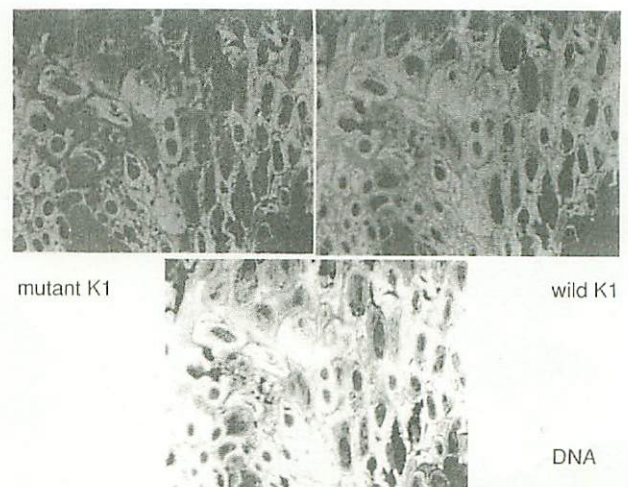


写真2-蛍光抗体法により野生型、変異型K1ともに細胞質内に局在していることが示された。

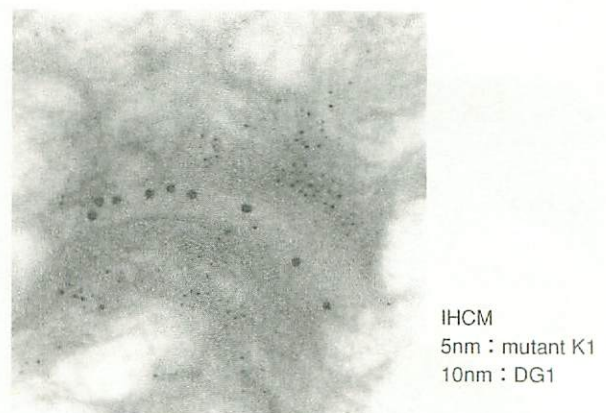


写真3-変異K1陽性繊維はデスマゾームに連結している。

矛盾している。しかし、変異ケラチンには核移行シグナルもみられず、*in vitro*でのケラチンの核内発現の意義は不明と言わざるをえない。

K1変異によるSPPKの症例においてはデスマゾームの異常もあり、ケラチン線維が挿入されるouter plaqueと、midline構造が痕跡的であったと報告されている²⁾。SPPKはデスマブラキン、およびデスマグレイン1の変異によっても生じることが知られており^{5,6)}、デスマブラキンの変異症例ではデスマゾームの形態的異常が報告されている^{5,6)}。我々のIHCM症例では掌蹠の角質肥厚はSPPKの症例よりもはるかに重篤であるが(論文Sprecher et al., 2001のFig 2cを参照)、手掌の角質肥厚部位には特異的な線状の角質肥厚の増強がみられたため、本例におけるデスマゾームの形状とデスマグレイン、デスマブラキンの発現についても検討した。しかし、有意と思われる異常は全くみられなかった。このことは、本症においては変異ケラチンはデスマゾームの形成障害ではなく、何らかの別の細胞障害をおこすことにより角質肥厚

をまねていることを示唆している。これについては既に報告したようにロリクリンなどの細胞内蛋白の局在を変異ケラチンがおかすことによるのかもしれない¹⁾。

謝 辞：慶応大学皮膚科石河晃先生ならびに増永卓司先生にcryoultramicrotomy法の手技につきご教示いただきましたことをお礼申し上げます。

文 献

- 1) Sprecher E et al : Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. *J Invest Dermatol* 116 : 511-519, 2001
- 2) Whittock NV et al : Frameshift mutation in the V2 domain of human keratin 1 results in striate palmoplantar keratoderma. *J Invest Dermatol* 118 : 838-844, 2002
- 3) Ishida-Yamamoto A et al : Mutant loricrin is not crosslinked into the cornified cell envelope but is translocated into the nucleus in loricrin keratoderma. *J Invest Dermatol* 115 : 1088-1094, 2000
- 4) Frischmeyer PA, Dietz HC : Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8 : 1893-1900, 1999
- 5) Armstrong DKB et al : Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8 : 143-148, 1999
- 6) Whittock NV et al : Striate palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. *J Invest Dermatol* 113 : 940-946, 1999
- 7) Rickman L et al : N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Human Mol Genet* 8 : 971-976, 1999
- 8) Norgett EE et al : Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, wooly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 9 : 2761-2766, 2000

DISCUSSION

眞鍋 変異K1を強制発現させたときに、核に一致してケラチンが局在していたというデータですが、共焦点顕微鏡や免疫電顕で見ないと、核の周辺を取り囲んでいるか、中にあるのかはわからないと思います。

変異ケラチンに対する抗体で染めたときに、細胞質も核周囲もデスモソームも一様に染まっているのですか。また、症例の電顕を見たときに、ケラチンが核周囲に凝集塊を形成するという所見はあったのでしょうか。

山本 Curth-Macklin型豪猪皮魚鱗癬では、核周囲には空胞やリボソームの多い部分があって、その周囲に異常な形態をしたケラチンが存在します。今回の変異K1の染色性もそこに一致していて、そこから外側に向かってデスモソームのところまで陽性でした。

眞鍋 ケラチンは核周囲ではなく、主に細胞の周辺ということですね。in vitroでトランスフェクションした仕事では、組織の免疫染色は、細胞質全体が染まっていたような気がしますが、細胞周辺と見るのでしょうか。

山本 核を取り囲むように細胞質がびまん性に染まっていました。

基底細胞の直上の細胞はそれほど空胞化していませんので、核の外側から陽性に染まっているように見えます。

北島 データの解釈の問題ですが、デスモブラキンを染めた蛍光抗体の写真について右側に正常、左側に患者さんと出されたと

きに、デスモブラキンの分布は正常と変わりないとおっしゃいました。しかし、正常に比べて患者さんの写真は倍率が高く、倍率が高いにもかかわらずデスモブラキンはドット状に見えないで、びまん性のラインに見えました。

どんなにやってもドット状に見えないということは、デスモブラキンの数がきわめて多くなっているとしか考えられません。1個1個のデスモブラキンは異常がないけれども、数がきわめて多い。

患者さんのデスモブラキンの写真をよく見て、正常と同じようにドット状、少なくとも遊離した点線状に見えるかどうかは、確認する必要があると思いました。

山本 ドット状だったかどうかは、帰って確かめてみます。倍率については、2枚は同じです。たぶん細胞骨格が異常であることによって、患者さんの角化細胞、有棘細胞、顆粒細胞は大きいのです。正常で見られるような基底細胞から上に行くにしたがって扁平化するという分化過程が異常なために、患者さんの顆粒細胞は扁平ではなく、大きいままです。その違いのために、同じ倍率で見てもあのように見えます。

見た感じでは、それほど違いはないと解釈しましたが、定量的に解析する必要があると思いました。しかし、細胞の大きさが違うので、デスモソーム1個に値する金粒子の数を数えるとか、細胞膜の長さあたりの粒子の数を数えるとか、定量的解析にどういった方法が適当なのかがよくわかりま

せんでしたので、その解析はまだ行っていません。

石橋 Curth-Macklinの臨床症状は2核をつくったり、細胞の中にまた膜をつくる構造が見られたりしますが、そのフェノタイプと変異の関係はどのようにお考えでしょうか。

また、臨床的に角化異常が顕著ですが、変異K1のフェノタイプはなぜそういう形をとるとお考えでしょうか。

山本 今回の研究に用いた症例では、2核の細胞は非常に数が少なかったのです。CurthとMacklinが最初に報告して、あとでアントン・ラップレヒトが電顕で詳細に検討した症例では、かなりの数の角化細胞が2核でしたが、今回の症例ではそうした変化は非常に稀でした。ですから、核が2核であることがどういう臨床像を説明するのかわかりません。

CurthとMacklinが最初に報告した症例は、今回の症例よりもさらに角化異常の範囲が広がったので、個体のほかの遺伝的背景の違いによって、同じようなケラチンの異常であっても細胞に与えるインパクトが違い、核の輪郭をうまく形成できなくなる作用も違うのかもしれない。

いままでに変異がわかった豪猪皮魚鱗癬はこの1家系ですし、2核の頻度が解析されている症例もそれほど多くないので、そこまではまだわかっていません。

同じような変異であるにもかかわらず、臨床型が線状掌蹠角化症様であったり、も

う少し広い範囲の角化異常があったりすることの原因もまだわかりません。BCIEやVörner型掌蹠角化症のときも、同じような変異であっても家系によって重症度に違いがあるのと同じように、ほかのケラチンの発現量や生活環境によって違ってくるのか

もしれません。今回お示した家系の中でも、掌蹠以外に顕著な発疹が見られたのは1例だけで、ほかの症例は主に掌蹠だけでしたので、そういうことで違ってきているのかもしれないと思います。

座長 一方陽太郎
山形大学医学部皮膚科

眞鍋 求
秋田大学医学部皮膚科

北島康雄
岐阜大学医学部皮膚病態学

石橋康正
東京通信病院名誉院長