

カルシウムイオンの生体内観察・操作による KID 症候群の病態解析

京都大学医学研究科皮膚科学講座

村田 光麻

Connexins (Cxs) make gap-junction/hemichannel that mediate cell-cell/cell-extracellular movement of water-soluble molecules such as calcium ions (Ca^{2+}). In some of hereditary diseases caused by mutations in Cxs, marked thickening of corneal layer of the skin occurs (Cx-related keratoderma), resulting in significant cosmetic and functional disadvantages. It is revealed that gain of function mutations that induce hyperactive hemichannels cause Cx-related keratoderma, and that keratinocytes-specific introduction of pathogenic mutant Cx reproduce the hyperkeratosis in mice, indicating that Cx-mutations in keratinocytes are responsible for the hyperkeratosis. However, it is still elusive how hyperactive hemichannels on keratinocytes result in hyperkeratosis. Here, using a mouse model of Cx-related keratoderma in combination with two-photon microscope, we show a close association between hyperkeratosis and distinct dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in Cx-mutant keratinocytes *in vivo*. We made an inducible mouse model of KID syndrome, one of the representative Cx-related keratoderma, by crossing Cx26S17F mice and K14creERT mice. In this model, hyperkeratosis at the footpads of the paws was observed within 2 weeks after the induction of mutation. We then crossed the mice with transgenic mice systemically expressing a Ca^{2+} indicator (GCaMP3) and evaluated the cytoplasmic Ca^{2+} -dynamics in keratinocytes throughout the course of disease development. In normal keratinocytes, a transient elevation of cytoplasmic Ca^{2+} preceded the cornification at granular layer uniformly at a single-cell level. In contrast, in keratinocytes with Cx mutations before the formation of hyperkeratosis, patterns of cytoplasmic Ca^{2+} elevation were heterogenous spatiotemporally. Subsequently, we identified intense elevation of cytoplasmic Ca^{2+} in the granular layer just before the formation of hyperkeratosis. Our results not only demonstrate the plausible role of aberrant Ca^{2+} -dynamics in the hyperkeratosis of Cx-related keratoderma, but also suggest the importance of strictly regulated Ca^{2+} -dynamics for epidermal homeostasis.

1. 緒 言

皮膚の最表面は死細胞によって構成される角層であり、その異常を示す疾患には、ありふれた胼胝(タコ)から稀な先天性疾患まで多数が存在するが、いずれの疾患も難治である。その原因の1つに、表皮細胞の角化による角層形成のメカニズムが未解明であり、特異的な治療がないことがあげられる。報告者はこれまでに、生体マウスの皮膚内で角化細胞内の細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})濃度を直接観察することで、角化直前に表皮細胞が Ca^{2+} 濃度を上昇させることを見出した¹⁾。この現象は皮膚の恒常性維持メカニズムに重要な視点を与えるとともに、角層の異常を来す疾患の病態解明・治療法の開発の糸口になることが期待される。

Keratitits-Ichthyosis-Deafness (KID) 症候群は、角層肥厚・角膜炎・難聴を特徴とする先天性の難病で、コネキシン26や30をコードする遺伝子の変異による²⁾。顔面を含む全身が侵され醜形を来すため、角層肥厚の病態の解明と治療法の開発が強く望まれている(図1)。そこで、KID症



図 1

候群の病態を明らかにし、治療薬の候補をあげるため、以下の2つを明らかにしたいと考えた。

- ① KID 症候群における表皮細胞内 Ca^{2+} 動態の異常の有無
- ② Ca^{2+} 動態と角化の異常との因果関係

2. 方 法

2. 1. 変異コネキシン26の導入による表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の観察

現存する KID 症候群のモデルマウスを改良し、後天的に KID 症候群の変異コネキシン26が導入されるマウスモデルを作成した。具体的には、Cx26S17Fマウス³⁾と K14Cre-ERTマウス⁴⁾を交配し、得られた成体マウスにタモキシフェン(0.1mg/g BW, 5日連続、腹腔内)を投与



Analysis of pathogenesis of KID syndrome by *in vivo* observation and manipulation of cytoplasmic Ca^{2+} ion concentration

Teruasa Murata

Department of dermatology, Kyoto University

した。このマウスに、カルシウムレポータータンパクである GCaMP3⁵⁾ と、形態を観察するための tadem-dimer Tomato (tdTomato) のそれぞれの全身発現マウスを交配し、2 光子顕微鏡で、生体マウスの表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度を観察するとともに形態学的解析を行った。

2.2. 表皮細胞内の Ca^{2+} 濃度の制御異常と角層の肥厚との因果関係の検証

次に、生体マウスの表皮細胞内の Ca^{2+} 濃度を特異的に上昇させるため、Chemogenetics の手法を用いた。化学物質 (Clozapin-N-oxide: CNO) の投与により活性化し細胞内 Ca^{2+} を上昇させる G タンパク共役型レセプター (hM3Dq) を発現するマウス⁶⁾ を用い、表皮細胞特異的にこれらの分子を発現するようにしたマウスを作成した。具体的には、これらの loxP-stop-loxP マウスと、IVL-CreERT2 マウスとを交配し、タモキシフェン (0.1 mg/g BW, 週 2 回、腹腔内) を投与し、2 光子顕微鏡で観察中に、CNO (1 mg/kg BW, 皮下) を投与した。

3. 結 果

3.1. KID 症候群モデルマウスにおける表現型

KID 症候群モデルマウスでは、タモキシフェン投与 3-4 週で肉眼的な病変が前後肢のフットパッドを中心に出現

した。病変の分布は、KID 症候群患者における角層肥厚が著明な部位と一致しており、KID 症候群をよく模倣する系と考えられた (図 2)。

3.2. KID 症候群の病変形成過程における表皮細胞内 Ca^{2+} 動態

タモキシフェン投与直後から、フットパッドの表皮細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度を測定した。すると、意外なことに細胞質 Ca^{2+} 濃度は角層の最下層から上昇し始め、その後、顆粒層、有棘層へとその上昇が拡大していた。重要なことに、顆粒層の細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇の直後に角層の肥厚が起こっていた。この時間的な関係は、顆粒細胞の Ca^{2+} 濃度が角化の亢進に関与していることを示唆する。

また、角層肥厚よりも 1 週間以上前から、角層最下層の細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇していたことから、角化の亢進の結果として Ca^{2+} 濃度の上昇が起こったのではなく、ヘミチャネルによる Ca^{2+} 動態の異常が先に生じると考えられ、実験系が想定通り成立したと考えられた (図 3)。

3.3. 細胞質 Ca^{2+} 濃度を操作する実験系の確立

さらに、細胞質 Ca^{2+} 濃度と角化亢進との因果関係を *in vivo* で証明するためのモデルマウスを作成した。CNO 投与により、速やかに表皮細胞の細胞質 Ca^{2+} は上昇し、生



図 2

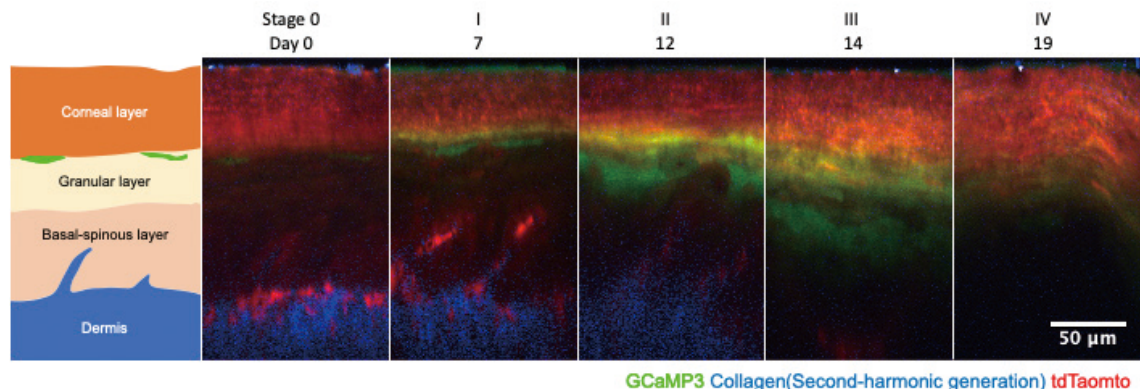


図 3

理的な角化中(図4, 矢印)に匹敵する濃度となった。しかし、その位置は、顆粒層の中層から有棘層にとどまり、肝心の角化前の顆粒細胞ではその上昇は軽度にとどまり、因果関係を検討する実験系は完成していない。現在、投与する薬剤や投与経路の変更による改善を試みている。

4. 考 察

KID症候群モデルマウスを用いた生体内観察により、角層の肥厚と細胞質Ca²⁺濃度の異常との、時間的に密接な関係が明らかになった。この結果は、KID症候群の病態の中心に顆粒層のCa²⁺濃度の異常があることを強く示唆する重要なものである。今後、ヘミチャネルの阻害薬を含めた治療薬の開発が期待されるが、顆粒層に作用させるためのドラッグデリバリーの検討も重要と考えられた。

表皮の上皮細胞の最終分化(細胞死)の誘導メカニズムは未だ明らかではない。今回得られた結果は、細胞質Ca²⁺濃度の上昇が最終分化の単なる結果ではなく、その誘導メカニズムの一端である可能性を示唆した。今後、上述の*in vivo*の系に続き、*in vitro*の系での因果関係の検討を計画している。

表皮において、個々の細胞は互いに時間的、空間的に前後しながら継続的に分化するため、分化に関わるシグナルや酵素反応は組織のごく一部に限局する。そのため、従来の方法では真の現象とノイズとの区別が難しかった。本研究は、このような時間的・空間的に稀な現象に着目する新しい形態学的アプローチであった。また、現象間の因果関係や薬理作用まで生体内で検証し、細胞間相互作用を見落とすことなく評価する点に本研究の特色がある。さらに、観察中に遺伝子変異を導入することで、変異タンパクが病態を形成するまでの過程全体を捉えようとする点は前例がない。この方法は原因遺伝子が知られているものの病態が明らかになっていない疾患の解析方法の一例となると考えられる。

謝 辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

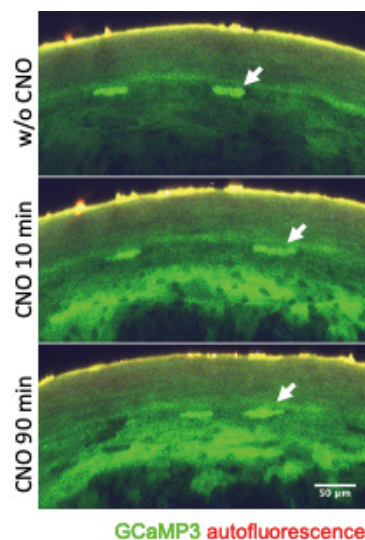


図 4

(引用文献)

- 1) Murata, T. *et al.* Transient elevation of cytoplasmic calcium ion concentration at a single cell level precedes morphological changes of epidermal keratinocytes during cornification. *Sci. Rep.* **8**, 6610 (2018).
- 2) Lilly, E., Sellitto, C., Milstone, L. M. & White, T. W. Connexin channels in congenital skin disorders. *Semin. Cell Amp Dev. Biol.* **50**, 4-12 (2016).
- 3) Bosen, F. *et al.* Altered epidermal lipid processing and calcium distribution in the KID syndrome mouse model Cx26S17F. *FEBS Lett.* **589**, 1904-1910 (2015).
- 4) Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. & Fuchs, E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8551-8556 (1999).
- 5) Ebina, T. *et al.* 3D clustering of GABAergic neurons enhances inhibitory actions on excitatory neurons in the mouse visual cortex. *Cell Rep.* **9**, 1896-1907 (2014).
- 6) Zhu, H. *et al.* Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. *genesis* **54**, 439-446 (2016).