

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09749

研究課題名(和文) 落葉状天疱瘡モノクローナル抗体による棘融解性水疱形成機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of blister formation in pemphigus foliaceus analyzed by anti-Dsg1 monoclonal antibodies

研究代表者

石井 健 (ISHII, Ken)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：50296670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：落葉状天疱瘡(PF)は表皮細胞間接着因子であるデスモグレイン1(Dsg1)に対するIgG自己抗体によって生じる。PF血中の抗Dsg1抗体は病的抗体と非病的抗体から構成されていることが解明されている。今回、抗Dsg1 mAb単独または複数の抗Dsg1 mAb混合物を器官培養皮膚を用いて水疱形成機序を比較検討した。病的抗体と非病的抗体の混合によるポリクローナル抗体では、p38 MAPK依存性にDsg1の凝集が起こり、デスモソーム構造変化を促進することで病的抗体単独よりも細胞間接着阻害活性を増強した。非病原性抗体は病原性抗体と協同して水疱形成に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune blistering disease caused by autoantibodies (Abs) against desmoglein 1 (Dsg1). PF sera contain polyclonal Abs which are heterogeneous mixture of both pathogenic and non-pathogenic Abs, as shown by isolation of monoclonal Abs (mAbs). The purpose of study is to investigate how pathogenic and non-pathogenic anti-Dsg1 Abs contribute to blister formation in PF. Using organ-cultured human skin, we compared the effect of a single pathogenic anti-Dsg1 IgG mAb, a single non-pathogenic anti-Dsg1 IgG mAb, and their mixture on blister formation as analyzed by histology, subcellular localization of IgG deposits and desmosomal proteins by confocal microscopy. We found a polyclonal mixture of anti-Dsg1 IgG antibodies enhances pathogenic activity for blister formation associated with p38MAPK-dependent Dsg1 clustering and that not only pathogenic antibodies but also non-pathogenic antibodies coordinately contribute to blister formation in PF.

研究分野：皮膚科

キーワード：天疱瘡 自己抗体 細胞接着 カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は、IgG 型の自己抗体を介する自己免疫性水疱性疾患であり、尋常性天疱瘡 (PV) と落葉状天疱瘡 (PF) の2型に大別される。その自己抗原は、デスモゾームに存在するカドヘリン型の細胞接着因子であるデスモグレイン3 (desmoglein 3, Dsg3) と Dsg1 である。血清中の抗 Dsg1・IgG または抗 Dsg3・IgG 自己抗体が表皮細胞間接着を誘導し、水疱形成すると理解されている。デスモグレインは、膜貫通蛋白で細胞外領域には、カドヘリンリピート領域が4つ連なった分子構造をしており (EC1-4)、デスモゾームにおいてデスモグレイン分子同士が向かい合うデスモグレイン分子同士が、デスモグレイン分子の先端に位置する EC1 領域でカルシウム依存性に接着し、この構造がジッパー様に連なっている構造をしていると考えられている。

天疱瘡の水疱形成機序としては、自己抗体が Dsg 分子接着面に結合することによる直接阻害、細胞内シグナル伝達による酵素の活性化、エンドサイトーシスなどによるデスモゾームからの Dsg3 分子の減少などが提唱されている。しかし天疱瘡の水疱形成機序は未解決である。また、最近、抗 Dsg3 モノクローナル抗体と PV 患者血清中の抗 Dsg3 ポリクローナル抗体とでは水疱形成機序が異なることが指摘され、抗 Dsg3 モノクローナル抗体では p38 MAPK 非依存的に水疱形成が起こるのに対して抗 Dsg3 ポリクローナル抗体は、p38 MAPK 依存性の Dsg3 の凝集とエンドサイトーシスを誘導し水疱形成することを示した。(Saito Met al, PLoS One 7(12):e50696, 2012)

落葉状天疱瘡の抗 Dsg1 抗体は Dsg1 細胞外領域 EC1-5 の様々なエピトープを認識する IgG 抗体で構成されたポリクローナル抗体であることがわかっている。天疱瘡の病態解明を目的として、我々はファージディスプレイ技術を用いて落葉状天疱瘡患者から抗 Dsg1 モノクローナル抗体を複数単離するのに成功しており、Dsg1 抗体は病原性に多様性があり、水疱形成を誘導する病原性のあるモノクローナル抗 Dsg1 抗体と水疱形成を引き起こさない非病原性抗 Dsg1 抗体から構成されていることが明らかにした。しかし、個々の抗 Dsg1 抗体がポリクローナルな状況下で水疱形成にどのような役割を果たしているのか、非病原性抗体は in vivo の状況下で水疱形成に全く関与しないのかはまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体による水疱形成機序の違いに着目し、その相違点を明確にすることで落葉状天疱瘡の水疱形成機序の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 一本鎖抗 Dsg1 モノクローナル抗体と IgG 型の抗 Dsg1 モノクローナル抗体の精製

ファージディスプレイ法を用いて PF 患者末血単球から複数のモノクローナル抗体を単離している。病原性を有する抗 Dsg1 抗体 (PF1-8-15) と非病原性抗 Dsg1 抗体 (PF1-2-6, PF1-2-22) が複数単離されている。これらのモノクローナル抗体は、重鎖、軽鎖の可変領域をリンカーで結合した一本鎖抗体の形で単離されている。患者血清中の抗 Dsg1 抗体は IgG 型の抗体であるので、一本鎖抗 Dsg1 モノクローナル抗体を IgG 型に変換する必要がある。ヒト IgG1 型の発現ベクターに重鎖、軽鎖の可変領域を組み込み、発現プラスミドを作成する。精製した抗 Dsg1 モノクローナル抗体プラスミドを 293FT 細胞にトランスフェクションし、回収した細胞培養液から protein A カラムを用いてモノクローナル抗体を精製した。

(2) 抗 Dsg1 モノクローナル抗体単独と抗 Dsg1 モノクローナル抗体の混合物による Dsg1 分子の変化とその他デスモゾーム関連分子の変化の差異の解析

精製した IgG 型抗 Dsg1 モノクローナル抗体による水疱形成機序をヒト器官培養皮膚 (ex vivo) を用いて解析する。具体的には、正常ヒト皮膚を採取し、至適濃度の抗体を真皮側から 50 μ l 皮内注射する。その後、培養液を入れたトランスウェル上で 37 $^{\circ}$ C で器官培養を行う。注射から 22 時間後に回収し、HE 染色、蛍光抗体法、電子顕微鏡用固定、包埋後免疫電顕法の検体としてブロック作成を行う。注射するパターンは、コントロール (PBS)、病原性モノクローナル抗体単独、非病原性モノクローナル抗体単独、病原性モノクローナル抗体と非病原性モノクローナル抗体の混合の4種類を用いる。

HE 染色では棘融解の有無を確認する。蛍光抗体法では表皮細胞間の IgG 抗体の沈着の変化を、Dsg1 の細胞内分布、デスモゾーム関連分子 (デスモプラキン、プラコグロビン、デスモリン) を 2 重染色で観察する。電子顕微鏡ではデスモゾームの数、大きさの変化、ケラチン線維の変化、細胞間融解の微細構造の変化を観察する。

次に、抗 Dsg1 ポリクローナル抗体と抗 Dsg1 モノクローナル抗体単独の水疱形成機序の相違を生じさせる因子を検討する。具体的には、エピトープの異なる複数のモノクローナル抗体の混合物を投与する他、IgG 型モノクローナル抗体と一本鎖抗体の混合物をヒト器官培養皮膚に投与し、前述と同様の手法を用いて棘融解、Dsg1 の凝集、デスモゾーム関連分子の局在の変化を検討する。

(3) In vitro 病的活性測定法を用いて抗 Dsg1 モノクローナル抗体の複数混合物刺激により細胞接着阻害活性が増強するかを確認する。

Dispase based dissociation assay を用いて細胞接着阻害活性の強度を確認する。具体的にはヒトケラチノサイトを 12 ウェルの培養プレートで培養し細胞シートを作成する。至適濃度の抗体

を添加しインキュベーションし、その後ディスパーゼで細胞シートを剥離し、ピペッティングによる機械的ストレスにより細胞シートが断片化するの
かを確認する。

4. 研究成果

(1) 病原性抗体に非病原性抗体を加えると表皮下層において IgG 及び Dsg1 の染色パターンが変化する。

ヒト皮膚器官培養系を用いて病原性抗体、非病原性抗体、その両者の混合物を注射し凝 22 時間後に、IgG の沈着パターン、Dsg1 の細胞内分布を共焦点顕鏡で観察し、水疱形成の有無を HE 染色で確認した。病原性抗 Dsg1 モノクローナル抗体単独の場合、表皮浅層において裂隙形成が観察され、IgG と Dsg1 の分布は表皮細胞膜上に見られた。非病原性抗体単独の場合、水疱形成は認めず、IgG と Dsg1 の分布が表皮細胞膜上に見られた。一方、病原性モノクローナル抗体と非病原モノクローナル抗体を混合した場合、表皮浅層において裂隙形成が観察され、IgG と Dsg1 の染色パターンが異なり表皮下層に凝集している像が観察された(図1)。

また、電顕で表皮構造を観察すると、コントロールと比較して抗体を注射した検体では表皮細胞間の離解がありデスモソームの長さが短くなっていった。特に、モノクローナル抗体を混合した場合は、Dsg1 の凝集によってデスモソーム長がより短くなっておりデスモソームの分解促進していることが推察された。

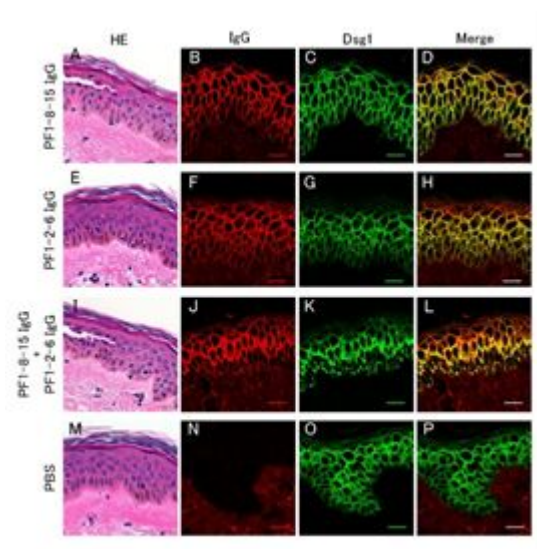


図1 . 器官培養ヒト皮膚において病原性抗体と非病原性抗体の混合物の投与により Dsg1 の凝集が誘導された。

(2) ポリクローナル抗体による Dsg1 の凝集は、p38 MAPK 依存性である。

PV 血清、抗 Dsg3 抗体を用いた実験系において p38MAPK は Dsg3 の凝集、エンドサイトーシスを介して水疱形成に重要な役割を果たしているとの報告がある。そこで我々は、ヒト皮膚器官培養系の実験において p38 MAPK 阻害剤で前処置した皮膚を用いて水疱形成実験を行った。P38 MAPK 阻害剤により Dsg1 の凝集は抑制されたが水疱形成は抑制できなかった。したがって、Dsg1 凝集は p38MAPK 依存性であるが、水疱形成にとっては必須な因子ではないと考えられた。

(3) 病原性抗体に非病原性抗体を加えると細胞接着阻害活性が増強される。

培養ケラチノサイトを用いて水疱形成能を半定量的に解析した。非病原性抗体単独の場合、水疱形成能はない。病原性抗体単独の場合、コントロールに比して3倍の細胞接着阻害活性があった。病的抗体と非病的抗体の混合物は、病的抗体単独のものより細胞接着阻害活性を増強していた。(図2)

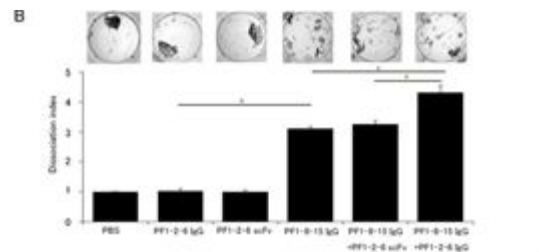


図2 . 病原性抗体と非病原性抗体の混合物は、病原性抗体単独よりも細胞接着阻害活性を増強させる。

考案

モノクローナル抗 Dsg1 抗体と複数のモノクローナル抗体の混合物による水疱形成能を比較検討することにより、ポリクローナル抗体であることも水疱形成能に関与していることが判明した。単独では水疱形成能のない非病原性抗体が単独で水疱形成能を持つ病原性抗体と一緒にになると水疱形成能を増強させた。本研究から推察される水疱形成機序は、モノクローナル抗体単独の場合、p38MAPK 非依存性に Dsg1 同士 trans 結合阻害を起こし、水疱形成を誘導する。ポリクローナル抗体の場合、病原性抗体による trans 結合阻害に加えて、非病原性抗体が病原性抗体と共同して p38MAPK 依存性 Dsg1 clustering を誘導することでデスモソーム構造変化を促進し、細胞間接着阻害を増強すると考えられる。結論としては、落葉状天疱瘡では、病原性抗体だけでなく、非病原性抗体も水疱形成に

関与していることが解明された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 4 件)

1. Yoshida K, Ishii K, Ishiko A: Alopecia developed in a transitional case from pemphigus foliaceus to pemphigus vulgaris. Journal of Dermatology. 44(11):e306-e307. 2017.11 doi: 10.1111/1346-8138.13957 (査読あり)
2. Kenji Yoshida†, Ken Ishii†, Atsushi Shimizu†, Mariko Yokouchi, Masayuki Amagai, Ken Shiraiishi, Yuji Shirakata, John R. Stanley, Akira Ishiko†: Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. J Dermatol Sci. 85(3):197-207 2017.03 doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.12.010. (査読あり)
3. 伊藤 崇†, 石井 健†, 江野澤佳代, 陳 怡如†, 大橋則夫, 石河 晃†: 経過中に疱疹状天疱瘡の皮疹をみた落葉状天疱瘡. 皮膚病診療. 38(11) :1097-1100, 2016.11 (査読あり)
4. Ishii K: Importance of serological tests in diagnosis of autoimmune blistering diseases. J Dermatol. 42(1):3-10. 2015.01 doi: 10.1111/1346-8138.12703. (査読なし)

(学会発表) (計 4 件)

1. Kenji Yoshida, Ken Ishii1, Mari Nakagawa, Akira Ishiko: Desmoglein 1 clustering in pemphigus foliaceus patients' skin. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017.
2. Yoshida K†, Ishii K†, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, John R. Stanley, Ishiko A†: p38MAPK contributes to loss of cell adhesion through clustering of desmoglein 1 but is not required for blistering in pemphigus foliaceus. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016.
3. Yoshida K†, Ishii K†, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, John R. Stanley, Ishiko A†: Polyclonal nature of pemphigus foliaceus IgG antibodies enhances pathogenic effect for blister formation in association with p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. Pathogenesis of pemphigus and pemphigoid 2016 the open blister/mind meeting, 2016.

4. Yoshida K†, Ishii K†, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, John R. Stanley, Ishiko A†: p38 MAPK signaling is necessary for desmoglein 1 clustering and enhances pathogenic effect, but is not required for blistering in pemphigus foliaceus. 45th Annual ESDR Meeting, 2015.

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 健 (ISHII, Ken)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号: 50296670

(2) 研究分担者

石河 晃 (ISHIKO, Akira)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号: 10202988

(4) 研究協力者

吉田 憲司 (YOSHIDA, Kenji)