

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591329
 研究課題名（和文）
 病原活性を持つ新しいモノクローナル抗体を用いた落葉状天疱瘡水疱形成の解明
 研究課題名（英文）
 Analysis of mechanism for blister formation in pemphigus foliaceus using novel monoclonal antibody with pathogenic activity
 研究代表者
 石河 晃 (ISHIKO AKIRA)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：10202988

研究成果の概要（和文）：

落葉状天疱瘡は全身の皮膚に水疱、びらんをきたす自己免疫疾患であるが、自己抗体が抗原に結合してから水疱発生までの機序は明らかではない。本研究では正常ヒト皮膚器管培養にクローン化した抗体を局所注射し、経時的に超微細組織変化を観察した。病原性抗体注射後 2 時間後にはデスモソームの減少が見られ、22 時間後にはデスモソームの消失と細胞離開が見られた。デスモソームの数が減少することによる細胞離開の経路が存在することが推察された。

研究成果の概要（英文）：

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease characterized by blister and erosion formation over the whole body surface. The mechanism of blister formation after antibody binding to the antigen has not been fully elucidated. In this study, we observed ultrastructural change after injection of monoclonal antibody derived from the patient with PF, to the organ cultured normal human skin. As results, number of desmosomes was markedly decreased in 2 hours, and disappearance of desmosome and cell detachment were observed 22 hours afterward. This result suggested the presence of the pathway of cell detachment with the decrease of desmosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：皮膚科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：自己免疫、免疫電顕、水疱症、デスモソーム、天疱瘡

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は表皮内に水疱を形成する自己免疫性水疱症で、表皮細胞間に対する自己抗体により引き起こされ、落葉状天疱瘡（PF）は Dsg1 を標的抗原としている。これまで、尋常性天疱瘡（PV）の水疱発症機序に関しては、

自己抗体が dsg3 分子接着面に結合することによる直接阻害、シグナル伝達による酵素の活性化、dsg3 分子のデスモソームからの減少などが提唱されている。一方 PF は、病理組織学的に棘融解細胞を見ることが少なく、異常角化細胞が見られるなどの、PV と異なる

特徴を有し、また、責任抗原も異なることから、PV とは異なる発症機序を有する可能性があると思われる。昨年度まで、研究代表者らは PV および PF の電顕的形態を再検討し、PF 患者血清を用いた病態解明のための研究を行ってきた。ごく最近、分担研究者の石井らはファージ発現法により *dsg1* に対する複数のモノクローナル抗体を作成し、そのうち二つが水疱形成能を有すること、多くの PF 患者血清がそれらのエピトープを認識する抗体を有することを明らかにした (J Invest Dermatol)。この病原活性を有するモノクローナル抗体の解析を進めることは PF の水疱発症機序の解明やより詳細な病勢の判定法の開発、病的抗体除去などのエピトープ特異的治療に結びつき、きわめて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は新規に開発されたこのモノクローナル抗体を蛍光抗体法、透過型電子顕微鏡、免疫電顕法により解析し、抗原エピトープの超微細局在を解明するとともに、正常ヒト皮膚において抗体結合から水疱形成までの変化を経時的に解析することで、病原活性のある抗体の性質および水疱発症メカニズムを解明することにある。

3. 研究の方法

正常ヒト皮膚を基質とした蛍光抗体法、免疫電顕間接法を用いて、病原活性のある抗体および病原活性のない抗体のエピトープの超微細局在を明らかにし、エピトープの位置と病原活性の有無の関係を解析する。つづいて、ヒト皮膚器官培養系を用いてこれらのモノクローナル抗体を皮下投与した際におこる棘融解を経時的に光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察、その形態学的変化を解析する。さらに免疫電顕法にて抗原に結合した IgG の局在を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 初年度は病原活性を有する新しいモノクローナル抗体のエピトープマッピングを主眼に実験を進めた。正常ヒト皮膚を急速凍結固定、凍結置換を行い、紫外線重合した後に超薄切片を作成し、免疫染色の基質に供することにより、化学固定剤を用いずに包埋後染色法による金コロイド免疫電顕法を施行することができた。しかし、抗原が膜蛋白であることから切片表面に露出する抗原の量が少ないことと、抗体がモノクローナルであることから抗原のエピトープが少ないことにより、解析に十分な反応が得られなかった。そこで、*in vivo* による染色法を試みた。正常ヒト皮膚を DMEM

培養液中にて器官培養し、表皮直下に新しい一本鎖モノクローナル抗体を局注し、まずは形態の変化と抗体の動向を経時的 (0.5 時間 ~ 22 時間) にそれぞれ HE 染色、蛍光抗体法にて観察した。その結果、注射 10 時間後、一部の検体では顆粒層レベルで水疱を形成し始め、注射後 18 時間後以降はすべての標本で顆粒層に水疱形成が認められた (図 1)。標本によりばらつきがみられたが、注入部位の深さや抗体の周囲への漏れ出しなどに差があることが原因の一つと考えられた。しかし、蛍光抗体法にて IgG は注入後約 0.5 時間で表皮中層まで、また 1.5 時間後には表皮上層顆粒層レベルに達していることが確認できた (図 2)。

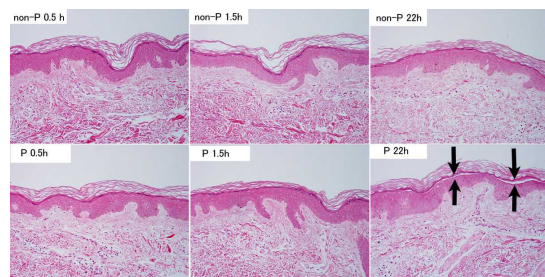


図 1 H E 染色病理組織像。(上段：非病原性抗体。下段：病原性抗体、左から 0.5 時間、1.5 時間、22 時間後) 非病原性抗体注射後、水疱形成は認めなかったが、病原性抗体注射後 22 時間後には顆粒層における水疱形成がみられた。

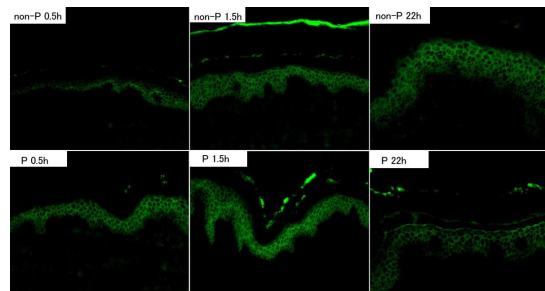
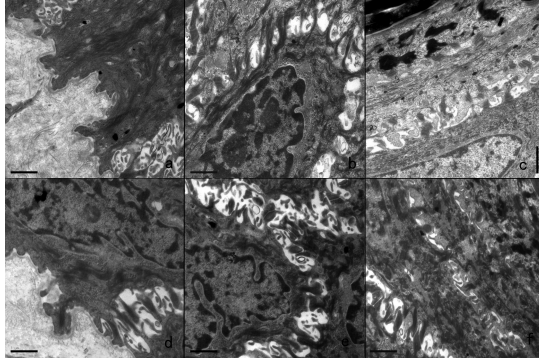


図 2 蛍光抗体直接法 (上段：非病原性抗体。下段：病原性抗体、左から 0.5 時間、1.5 時間、22 時間後) IgG は注入後約 0.5 時間で表皮中層まで、また 1.5 時間後には表皮上層顆粒層レベルに達していることが確認できた。病原性抗体注射 22 時間後には水疱掲載がみられている。

(2) 2 年度は電顕的観察に主眼をおいた。上記培養系における抗体注入による微細形態の変化を観察したところ、非病原性抗体注入においては有意な変化がみられなかったが (図 3a-c)、病原性抗体注射により 2 時間後には

デスモソームの減少、細胞間の開大が有棘層～顆粒層下部に認められた(図 3d-f)。22 時間経過後には非病原性抗体注入においては有意な変化がみられなかったが(図 4a-c)、病原性抗体注射によりデスモソームはほとんど消失しており、細胞間接着は極めて減少していた(図 4d-f)。また、ケラチン線維には著



変を認めず細胞膜から消退した所見はなかった。

図3 抗体注射2時間後(a-c:非病原性抗体、d-f:病原性抗体、ad:基底細胞、be:有棘細胞、cf:顆粒層下層)

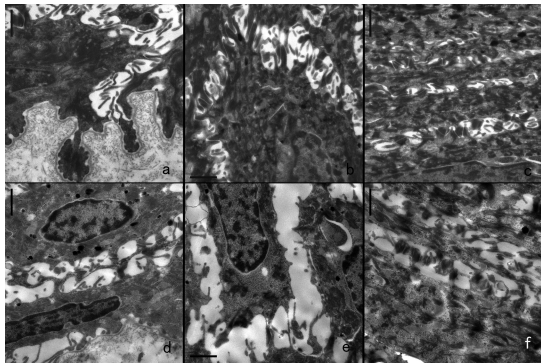


図4 抗体注射22時間後(a-c:非病原性抗体、d-f:病原性抗体、ad:基底細胞、be:有棘細胞、cf:顆粒層下層)

(3)3年次には免疫電顕法を施行した。非病原抗体を注射2時間後、IgGはデスモソームの接着板の間に存在し、デスモソームのない細胞膜にはあきらかな沈着はみられなかった(図5a,b)。一方、病原抗体を注射した際にはデスモソームには数の減少がみられ、IgGは主に細胞質内にみられた(図6)。これは今まで尋常性天疱瘡ではみられたことがなかった所見であり、デスモソームの機能喪失に加えて、数の減少の方が水疱形成に関わっていることが示唆された。

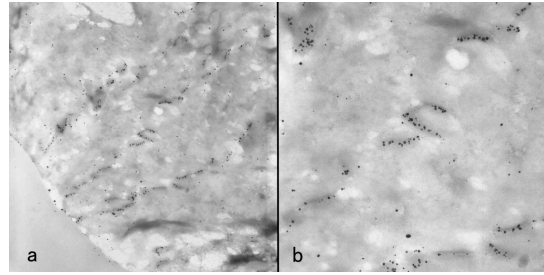


図5 非病原性抗体注射1時間後の免疫電顕所見。ヒトIgGを金コロイドで包埋後染色法にて染色した。非病原性抗体はデスモソーム接着板間に局在していた。

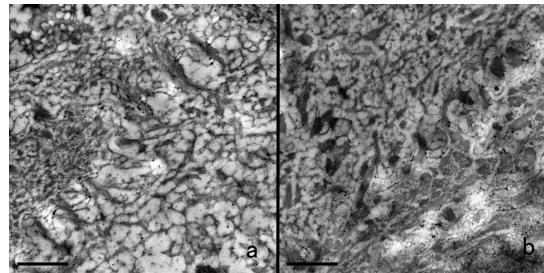
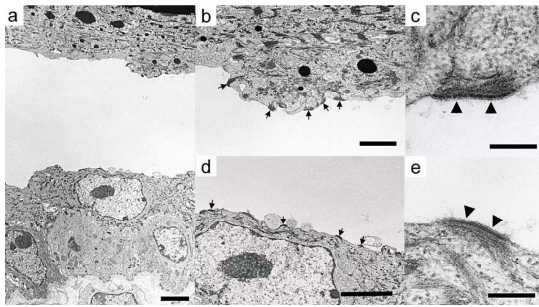


図6 病原性抗体注射1時間後の免疫電顕所見。ヒトIgGを金コロイドで包埋後染色法にて染色した。病原抗体を注射したところ、IgGは主に細胞質内に分布してみられた。

(4)以上の結果からデスモソームの数の減少が水疱形成に関与していることが示唆された。他方、デスモグレイン1の機能不全が水疱形成に十分な条件であるかどうかを検討するためデスモグレイン1を特異的に切断する酵素であるETAによる消化で除去した際に起こる変化を観察したところ、ETA消化1時間後には細胞表面からデスモグレイン1の細胞外ドメインは消失し、トノフィラメントを付着した、半割されたデスモソームが多数観察された(図7)。ひきつづいてデスモグレイン1の細胞内ドメイン、デスモコリンが細胞膜から消失することが観察された。以上からデスモグレイン1の細胞外ドメインが切断されることのみで棘融解を引き起こすことが可能であることが結論された。

(5)以上から、デスモソーム半割の経路と、消失の経路の両者が生体内では起こりうることを示唆され、実際の水疱形成にどちらがどの程度寄与しているかについて今後検討する余地が残された。

図7 ETA 投与 1 時間後。水疱蓋、水疱底に半分割されたデスモソームが観察された。



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 1 件)

Koji Nishifuji, Atsushi Shimizu, Akira Ishiko, Toshiroh Iwasaki, Masayuki Amagai: Removal of amino-terminal extracellular domains of desmoglein 1 by staphylococcal exfoliative toxin is sufficient to initiate epidermal blister formation. J Dermatol Sci Sep; 59(3): 184 -191, 2010 (査読あり)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石河 晃 (ISHIKO AKIRA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 10202988

(2) 研究分担者

舩越 建 (FUNAKOSHI TAKERU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 80365353

石井 健 (ISHII KEN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 50296670

大内 健嗣 (OUCHI TAKESHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 30528419

清水 篤 (SHIMIZU ATSUSHI)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号 : 60383733