

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591634

研究課題名(和文) 尋常性天疱瘡抗体の結合による表皮細胞内でのシグナル発生機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which pemphigus vulgaris autoantibodies cause cellular signaling in human keratinocytes

研究代表者

齋藤 昌孝 (Saito, Masataka)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30306774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：様々なデスモゾーム関連蛋白がヒトケラチノサイト細胞膜上の脂質ラフトと生化学的に関連していることが示され、さらに脂質ラフトがデスモゾームの形成と分解の制御という点において重要なプラットフォームとなっていることが強く示唆された。また、尋常性天疱瘡患者血清中の抗デスモグレイン(Dsg)3抗体によって細胞膜上のDsg3分子のクラスターが形成され、脂質ラフト依存性ならびに細胞内シグナル依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが分かった。

研究成果の概要(英文)：It was shown that desmosomal proteins are biochemically associated with lipid rafts on the human keratinocyte cell membrane. Furthermore, lipid rafts are considered to be an significant platform for both assembly and disassembly of desmosomes. It was also demonstrated that anti-desmoglein (Dsg) 3 autoantibodies in the sera of pemphigus vulgaris patients cause clustering of Dsg3 on the cell surface, and the clustered Dsg3 molecules are to be internalized in a both lipid raft-dependent and cellular signaling-dependent manner.

研究分野：自己免疫性水疱症

キーワード：尋常性天疱瘡 デスモゾーム 脂質ラフト 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

表皮細胞間で形成されるデスモゾームにおいては、細胞膜貫通蛋白であるデスモグレイン3 (Dsg3) などのデスモゾームカドヘリンがアミノ末端同士で互いに結合することで表皮細胞間の強固な接着が維持される。

尋常性天疱瘡は、Dsg3 や Dsg1 に対する自己抗体によって、Dsg 分子の接着機能が障害され粘膜や皮膚に水疱が形成される自己免疫疾患である。これまでの研究で、尋常性天疱瘡患者の大部分は Dsg3 分子のアミノ末端に対する抗体を保持すること、また Dsg3 に対するマウスモノクローナル抗体のうち、細胞接着障害を引き起こすのは主としてアミノ末端に対する抗体であることが示され、抗体による直接的な接着阻害 (steric hindrance) が病態に関与することが示唆されてきた。一方で、自己抗体によって引き起こされるデスモゾームの接着障害および崩壊には、Dsg3 のエンドサイトーシスや細胞内シグナルが関与していることを示唆する報告が近年相次いでいる。中でも、特に注目されているのは p38 MAPK を中心としたシグナル伝達であり、p38 MAPK を阻害することによって、尋常性天疱瘡抗体による Dsg3 のエンドサイトーシスおよび細胞接着障害が抑制されることが *in vivo* においても示されている。

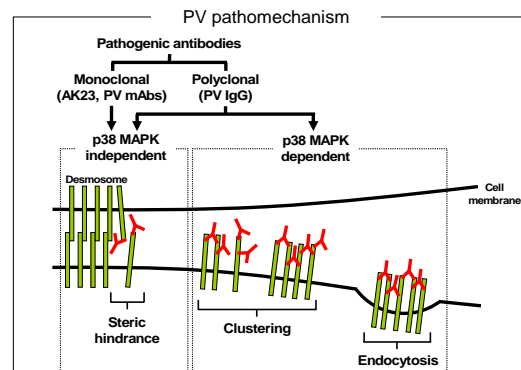
研究代表者による最近の研究の中で、尋常性天疱瘡抗体のポリクロナリティが病原性に大きく寄与していることが示された。すなわち、尋常性天疱瘡患者の自己抗体はポリクローナル抗体であり、Dsg3 分子の様々なエピトープに結合する抗体が混ざっているため、細胞膜表面において Dsg3 分子のクラスターを形成し、その結果 Dsg3 分子のエンドサイトーシスが惹起されることが示された。さらに、このクラスター形成およびエンドサイトーシスは p38 MAPK 依存性であり、p38 MAPK 阻害剤によっていずれも抑制されることが示された。一方で、Dsg3 のアミノ末端に対するマウスモノクローナル抗体である AK23 は、*in vivo* においても病原性があることが示されているが、Dsg3 分子のクラスター形成もエンドサイトーシスも惹起せず、p38 MAPK 阻害剤の存在化でも病原性は保たれることが分かった。

以上の結果から、尋常性天疱瘡において、ポリクローナルな自己抗体の中に含まれる Dsg3 分子のアミノ末端に対する抗体は、AK23 と同様に p38 MAPK 非依存性に Dsg3 分子の接着を直接的に阻害し、それ以外のエピトープに対する抗体による p38 MAPK 依存性の Dsg3 分子クラスター形成および、その結果として生じる Dsg3 分子のエンドサイトーシスが病態に大きく関わっていることが示された (図 1)。

一方で、様々な細胞膜蛋白の抗体などによるクロスリンクは、エンドサイトーシスや細胞

胞内シグナル発生を惹起し、しかもそれは細胞膜上の特別な領域である脂質ラフトにおいて生じることが数多く報告されている。

図 1



(Saito M, et al. PLoS One 2013)

2. 研究の目的

脂質ラフトは細胞内シグナル発生におけるプラットフォームとして重要な役割を演じると考えられており、尋常性天疱瘡においても、p38 MAPK をはじめとした細胞内シグナルが病態に関与していることが明らかになりつつあることから、注目すべき構造と考えられる。実際、いくつかの細胞接着分子が少なくとも一時的には脂質ラフト内に入り込むことが近年示されている。したがって、本研究において、尋常性天疱瘡抗体による Dsg3 分子のクロスリンク (クラスター形成) の結果、Dsg3 分子と脂質ラフトとの関連性が強まり、それをきっかけとして p38 MAPK を含めた一連の細胞内シグナルが惹起されるのではないかと仮説を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞膜の特殊な領域である脂質ラフト構造と細胞膜蛋白との関連性を示すために、シヨ糖密度勾配遠心分離法を用いて解析を行う。Dsg3 のみならず、プラコグロビンやデスモプラキンなどのデスモゾーム構成蛋白も含めて脂質ラフトとの関連性の有無を調べる。また、尋常性天疱瘡抗体の存在下、すなわち Dsg3 分子がクロスリンクされた場合に、脂質ラフトへの分布に変化がみられるかどうかを解析する。以上の生化学的なデータに加えて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、フロティリン 1 などの脂質ラフトマーカーとの共局在や、抗体によってクロスリンクされた Dsg3 分子の挙動を、ライブイメージを含めた画像解析によって示す。さらに、脂質ラフトと関連する各種シグナル分子の解析により、p38 MAPK シグナルの上流のカスケードを明らかにする。

4. 研究成果

本研究ならびにこれまでの研究代表者らによる一連の研究によって、様々なデスモゾーム関連蛋白がヒトケラチノサイト細胞膜上の脂質ラフトと生化学的に関連していることが初めて示された。さらに、超解像蛍光顕微鏡を用いた形態学的分析によって、Dsg3は細胞間境界部において脂質ラフトマーカーと共局在することが分かった。この共局在はCa濃度依存性にデスモゾームが形成されるにしたがって顕著になり、コレステロールを欠乏させることによって脂質ラフトを破壊すると、デスモゾームそのものが形成されなくなることが示された。

また、脂質ラフトが破壊されると、尋常性天疱瘡患者血清中の抗Dsg3抗体によって引き起こされるデスモゾームの分解が抑制されることが判明した。

以上の結果から、細胞膜脂質ラフトがデスモゾームの形成と分解の制御という点において重要なプラットフォームとなっていることが強く示唆された。

脂質ラフトは、ナノスケールの大きさのものが細胞膜上で融合しつつ、より大型の脂質ラフトドメインとなることによって膜状でより安定化すると考えられている。つまり、デスモゾーム関連蛋白の少なくとも一部が脂質ラフトと関連して細胞膜上に存在しているとすれば、これらの蛋白が他のデスモゾーム関連蛋白と次々に結合することで、徐々に大きなクラスターが形成され、最終的にデスモゾームが形成されていくとすれば、デスモゾーム構造体が脂質ラフトドメインという細胞膜上のプラットフォームの中で安定強化されている可能性が示唆される。

脂質ラフトとの関連が生化学的にも形態学的にも強く示唆されたデスモゾーム関連蛋白の中でも、細胞膜貫通型蛋白であるDsg3に関しては、その細胞膜貫通領域が脂質ラフトと関連するためには重要なのか、あるいは細胞外領域または細胞内領域が重要なのかを調べるための解析も試みた(未発表データ)。

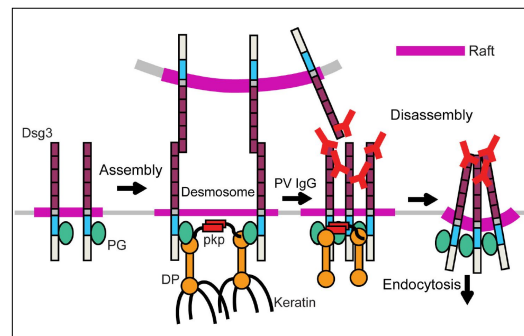
研究代表者らの過去の研究において、尋常性天疱瘡患者血清中の抗Dsg3抗体によって細胞膜上でDsg3分子のクラスターが形成されることが示されていたが、本研究の中で、このクラスターが脂質ラフトを大量に含む線状構造物となり、それが脂質ラフト依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが分かった。

なお、クラスター形成およびエンドサイトーシスはp38 MAPK依存性であり、脂質ラフトが細胞内シグナル伝達のプラットフォームとして重要な役割をもっていることを考慮すると、尋常性天疱瘡の病態において、脂質ラフトを舞台にしてダイナミックな細胞活動が引き起こされる可能性が強く示唆

される。ひとつの可能性として、デスモゾーム外の細胞膜上に存在する個々のDsg3分子は脂質ラフトとの関連性は弱いものの、患者血清中の抗Dsg3抗体によってDsg3分子がクロスリンクされるにしたがって、脂質ラフトの融合も促進され、その結果として細胞内シグナル発生に必要なシグナル分子その他の必要条件が整い、エンドサイトーシスへとつながる細胞内シグナルが惹起されるのではないかということが挙げられる。このことを証明するために、患者血清を加えた場合に、生化学的にDsg3と脂質ラフトとの関連性が増加するかどうかの検討も行ったが、再現性のある結果を得るには至っていない。

尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割の解明が尋常性天疱瘡の特異的な治療法の開発に結び付くものと考えられる。現在は、尋常性天疱瘡に対してはステロイドによる非特異的免疫抑制治療が中心となっており、様々な副作用の問題がある。しかし、抗Dsg3抗体によって引き起こされるデスモゾームの分解に関わるシグナル分子のカスケードの解明と、それらの脂質ラフトとの関連を調べることによって、より効率的かつ特異的、そして安全にデスモゾーム分解反応を抑制することができる薬剤を治療に応用できる可能性がある。本研究の結果をもとに、尋常性天疱瘡の病態における脂質ラフトの役割のさらなる解明につなげたいと考えている。

図2



(Stahley SN, Saito M, et al. PLoS One 2014)

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)

1. Stahley SN, Saito M^{*}, Faundez V, Koval M, Mattheyses AL, Kowalczyk AP.

Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent.

PLoS One 2014, 9: e87809. 査読あり

^{*} co-first author

〔学会発表〕(計1件)

1. Saito M, Stahley SN, Faundez V, Koval M, Kowalczyk AP.

Lipid rafts are membrane platforms for desmosome assembly and dynamic regulation.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012.12.08, Loisir Hotel & Spa Tower Naha Pacific Hotel Okinawa, Okinawa, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 昌孝 (SAITO, Masataka)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30306774

(2) 研究分担者

山上 淳 (YAMAGAMI, Jun)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327618

天谷 雅行 (AMAGAI, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90212563

(3) 研究協力者

アンドリュー P. コワルチェック

(KOWALCZYK, AP)

米国エモリー大学・医学部・准教授