

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591629

研究課題名(和文)包埋後染色免疫電顕法を用いた尋常性天疱瘡水疱形成機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathomechanism of blister formation in pemphigus vulgaris using post-embedding immuno-electron microscopy

研究代表者

石河 晃 (ISHIKO, Akira)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：10202988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡の水疱形成の発症機序を検討するため、デスモグレイン3に対する新しいモノクローナル抗体をヒト皮膚器官培養に注入することによって起こる変化を包埋後染色免疫電顕法により経時的に解析した。病原性モノクローナル抗体は注射後2時間後ではデスモソームに到達するものの水疱形成は起こらなかった。注射22時間後には棘融解が起こり、デスモソームの消失とdsg3分子の細胞内移行を認めた。非病原性抗体ではこのような変化は起こらなかった。今回初めてヒト皮膚においてdsg3分子の細胞内移行が観察されたが、抗体による分子間結合阻害との関係についてさらに検討を加える必要があると考えた。

研究成果の概要(英文)：In order to give an insight into the pathophysiological mechanism of blister formation in pemphigus vulgaris, we performed ultrastructural experiments using novel monoclonal antibodies against dsg3 injected into organ-cultured human skin. A monoclonal antibody having ability to induce blister reached extracellular surface of desmosomes in all layers of epidermis within 2 hours, but did not induce acantholysis yet. After 22 hours, acantholysis developed and desmosomal structures and dsg3 molecules were disappeared from the keratinocytes cell surface. Some amount of dsg3 were detected in the cytoplasm. Using non-pathogenic monoclonal antibody instead of the pathogenic antibody, nothing of above mentioned changes were observed. These results suggest both steric hindrance and dsg3 internalization occurs in our system within 22 hours, although more precise time-course observation is expected to show dynamic mechanism of blister formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：天疱瘡 デスモグレイン デスモソーム 免疫電顕

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る。尋常性天疱瘡 (PV) と落葉状天疱瘡 (PF) に大別され、PV は表皮細胞デスモソームに存在するデスモグレイン (Dsg) 3 (および 1) を、PF は Dsg1 を標的抗原としている。これまで、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。近年、Payne らはファージ発現法により dsg3 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 PV 患者血清がそれらのエпитープを認識する抗体を有することを明らかにした。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ヒトにおける PV 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。また、もう一つの抗原蛋白である dsg1 についても同様に検討する価値がある。

2. 研究の目的

新規に開発された dsg3 および 1 に対するモノクローナル抗体を免疫電顕的手法により解析し、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を目的とする。そのために下記のことを明らかにする。

(1) 正常ヒト皮膚を基質とした免疫電顕間接法

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。

(2) 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け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。

3. 研究の方法

(1) 抗体作成・HE 染色・蛍光抗体法・電顕法

ファージディスプレイ法を用いて 2 種類のモノクローナル抗体を作成。

(2) 免疫電顕法

今回、凍結固定・凍結置換法を用いた金コロイド免疫電顕法により新しいモノクローナル抗体の結合部位を電顕標本上でマッピングを試みる。正常ヒト皮膚として皮膚腫瘍切除後の正常部分の提供を受け (倫理委員会承認済) 数ミリ大の正常皮膚を -190 の液体プロパン中に急速挿入し、凍結固定する。-80 のアセトンで 120 時間、脱水置換し、LowivryIK11M に包埋、紫外線重合させた後、

室温にもどし、超薄切片を作成する。この方法により、化学固定を使わずに、組織を生体の形態を保ったままで電顕観察に耐える固定包埋を行うことが可能である。得られた切片に抗 dsg1 モノクローナル抗体を反応させ、5nm 金コロイド標識抗ヒト IgG にて IgG を検出する。電子染色をした後、透過電顕で観察する。この方法は最もアーチファクトの少ない信頼できるものであるが、モノクローナル抗体を用いた場合、金プローブがわずかしか検出されない可能性がある。この場合には正常ヒト皮膚を器官培養し、培養液中にモノクローナル抗体を入れることによりデスモソーム代謝に伴い *in vivo* で抗原がラベルされることとなる。この *in vivo* で IgG が結合した皮膚を凍結固定・凍結置換し局在を同定することにより病原エピトープのマッピングが可能であると思われる。

(3) 病原活性を有するモノクローナル抗体投与後の形態変化の解析

ヒト皮膚器官培養に注射し、抗体の沈着、棘融解の有無を HE 染色像、蛍光抗体法、電顕法、免疫電顕法にて確認する。正常ヒト皮膚を数ミリ大に細切し培養液中にて器官培養を行う。この皮膚に皮内針を用いてモノクローナル抗体を皮内注射することにより 3 時間後には表皮に PV と同様な棘融解が生じることには明らかになっており、この形態学的変化を抗体沈着の分布とともに時間経過を追って詳細に観察する。皮膚腫瘍切除後の周囲の正常皮膚を器官培養に供する。至適濃度に希釈した抗体を真皮内に局所注射し、設定した的確な時間おきに固定、蛍光抗体法、電顕法、免疫電顕法の検体としてブロック作成を行う。蛍光抗体法では表皮細胞間の IgG の沈着の進行度を、電顕法ではデスモソームの変化、ケラチン線維の変化、細胞間離開の進行度を、免疫電顕法ではデスモソームの変化と抗体結合との時間的關係を検討し、抗体結合と水疱形成に伴う形態変化を経時的に明らかにする。

同様の実験を dsg1 についても行い、落葉状天疱瘡との違いを検討する。

4. 研究成果

(1) 抗体作成

ファージディスプレイ法にて 2 種類の抗 dsg3 モノクローナル抗体 PX4-3 抗体、PX4-4 抗体を作成し、蛍光抗体法、ELISA 法にて抗体の特異性、抗体価を確認した。

(2) 免疫電顕間接法

新しく作成した正常ヒト皮膚を基質として、抗体結合部位の確認のために PX4-3 抗体、PX4-4 抗体それぞれを反応させ金コロイド免疫電顕を施行した。しかし、デスモソームへの沈着が確認できなかった。正常ヒト皮膚を基質とした染色ができなかったのは、このモノクローナル抗体が Ca 依存性のコンフォメーションエピトープを認

識するものであり、dsg3 の分子間 trans 結合面にエピトープが存在するため、切片上にエピトープの露出がないためと考えられた。そこで器官培養系を用いた免疫電顕法を施行することとした。その結果は事項に記載する。

(3) 病原活性を有するモノクローナル抗体投与後の形態変化の解析

ヒト皮膚の器官培養に2種の抗 dsg3 モノクローナル抗体を真皮内注入し、経時的に表皮の変化と抗体の沈着を観察した。2時間の時点では HE 染色標本にてコントロールとの差は認識できないが (図 1a, b)、蛍光抗体法では表皮全層にわたり細胞表面への沈着が確認された (図 1c, d)。病原性抗体、非病原性抗体注射 2 時間後の HE 染色で、病原性抗体は基底層直上で棘融解形成が観察された。一方、非病原性抗体では棘融解は起こらなかった (図 2a, b)、蛍光抗体法でモノクローナル抗体は表皮全層にわたり細胞表面への沈着がみられた (図 2c, d)。

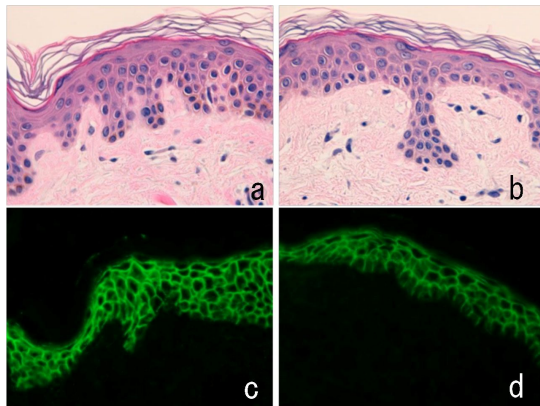


図 1
a. 病原性抗体注射後 2 時間 HE 染色像
b. 病原性抗体注射後 2 時間蛍光抗体法 (IgG)
c. 非病原性抗体注射後 2 時間 HE 染色像
d. 病原性抗体注射後 2 時間蛍光抗体法 (IgG)

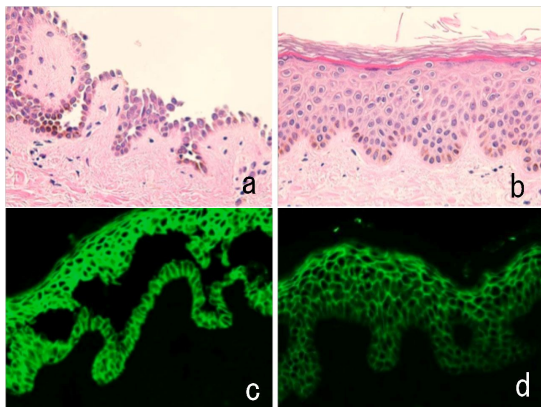


図 2

- a. 病原性抗体注射後 22 時間 HE 染色像
- b. 病原性抗体注射後 22 時間蛍光抗体法 (IgG)
- c. 非病原性抗体注射後 22 時間 HE 染色像
- d. 病原性抗体注射後 22 時間蛍光抗体法 (IgG)

電顕法

・モノクローナル抗体注射 2 時間器官培養後の正常ヒト皮膚

病原性抗体では、基底細胞のデスモソームの細胞外部にわずかに金コロイドの沈着が確認できた (図 3)。非病原性抗体では、基底細胞のデスモソームの細胞外部に多数の金コロイドの沈着が確認できた (図 4)。

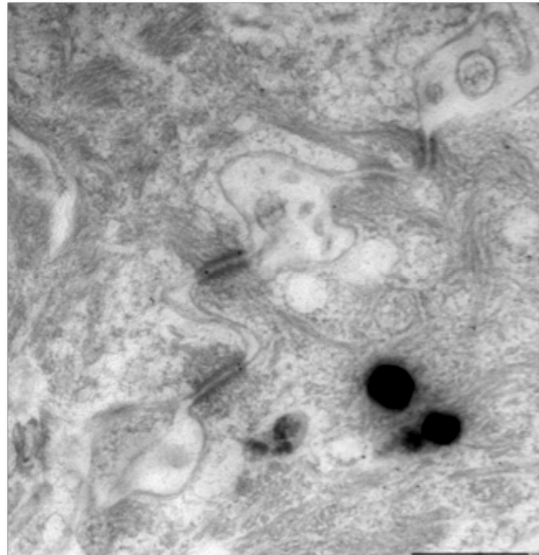


図 3 . 病原性抗体注射 2 時間後。デスモソーム間に抗体の沈着が少数みられるが、棘融解は起きていない。

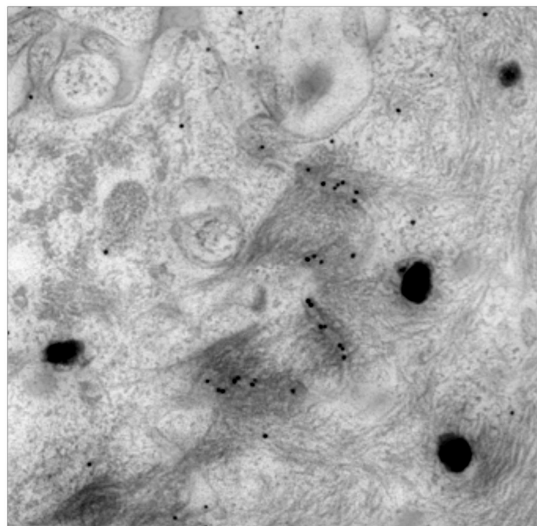


図 4 . 非病原性抗体注射 2 時間後。デスモソーム間に抗体の沈着が多数みられるが、棘融解はおきていない。

・モノクローナル抗体注射 22 時間器官培養後の正常ヒト皮膚

病原性抗体では、基底細胞直上で棘融解形成があった。水疱に面した基底細胞の細胞膜

にはデスモソーム構造はほとんど確認できず、金コロイドはわずかに細胞膜上に散在して沈着していた(図5)。基底細胞側縁では金コロイドはデスモソーム構造が残存している所では細胞外部に沈着しているが、病原性抗体注射後2時間の検体と比較して細胞質内、特にケラチン線維に一致して金コロイドが散在していた(図6)。これは、抗体が沈着したデスモグレイン3分子が個別にendocytosisをおこなっている像の可能性が考えられた。

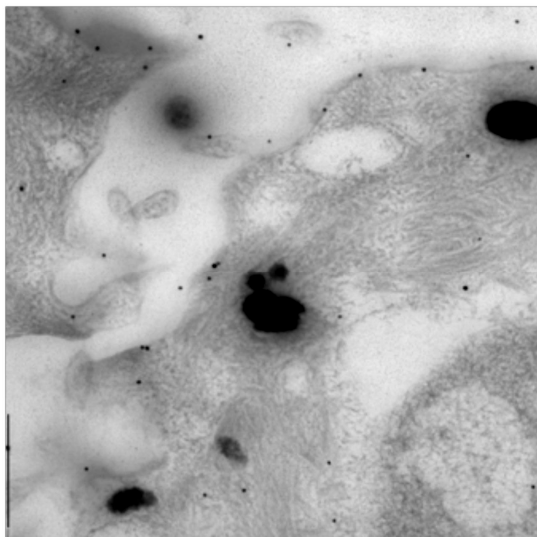


図5. 病原性抗体注射22時間後。棘融解性水疱に面した細胞。デスモソーム構造はほとんど消失し、IgGは細胞膜にわずかに検出された。

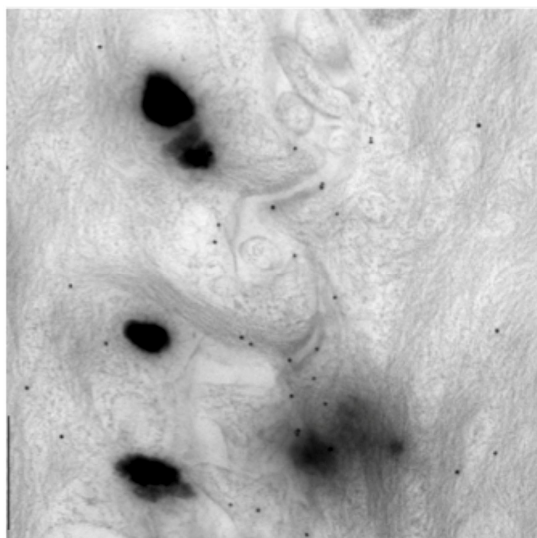


図6. 病原性抗体注射22時間後。基底細胞側面。デスモソーム構造が残存している所では細胞外部に沈着しているが、病原性抗体注射後2時間の検体と比較して細胞質内、特にケラチン線維に一致して金コロイドが散在していた。

非病原性抗体では22時間後の検体もデスモソーム構造は保たれ、金コロイドは主にデス

モソームの細胞外部に沈着していた(図7)。

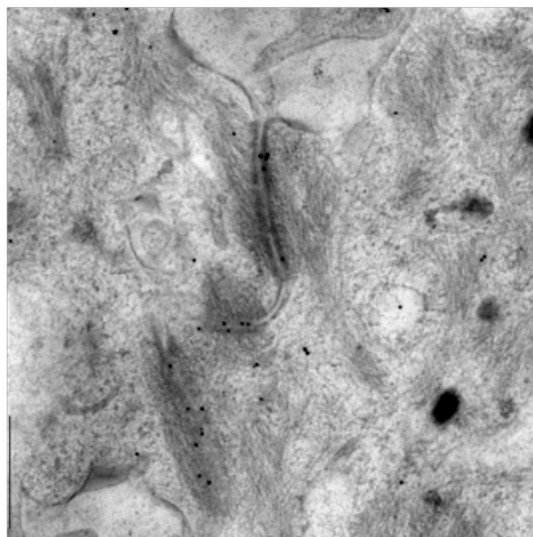


図7. 非病原性抗体注射22時間後。デスモソーム構造は保たれ、金コロイドは主にデスモソームの細胞外部に沈着していた。

以上のことから、病原性抗体は注射後2時間では抗原部位に到着するものの大きな形態学的変化はきたさないが、22時間後にはデスモソームの消失、デスモグレイン3分子の細胞質内移行が見られた。以上のことから水疱の発症機序としてこれまでに観察されていた抗体による分子間結合の直接阻害の他にもdsg3分子の細胞内移行が関与している可能性が示唆された。分子間結合直接阻害は抗体注入早期に起こりえるが、dsg3分子移動はある程度時間を要することから二次的に起きている現象であることも考えられる。今後はこれらの変化がどのような順で起こっているかについてより詳細に検討することが課題である。

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 0件)

[学会発表](計 1件)

Kenji Yoshida, Ken Ishii, Atsushi Shimizu, Mariko Yokouchi, John Stanley, Akira Ishiko
Combination of pemphigus foliaceus IgG monoclonal antibodies (mAbs) promotes desmoglein 1 clustering.
73rd annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 2014.5.9 Aluquerque, New Mexico, USA (Oral presentation)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究協力者

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

吉田憲司 (YOSHIDA, Kenji)
東邦大学・医学部・大学院生